



UNIVERSIDAD  
SAN SEBASTIAN

VOCACIÓN POR LA EXCELENCIA

**FACULTAD MEDICINA VETERINARIA  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA  
CARRERA MEDICINA VETERINARIA  
SEDE LA PATAGONIA**

**BÚSQUEDA DE ELEMENTOS GENÓMICOS NO DESCRITOS CON  
RELEVANCIA PARA LA MEDICINA VETERINARIA EN  
HUMEDALES URBANOS DE LA REGIÓN DE LOS LAGOS, CHILE**

MEMORIA DE TÍTULO COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO

Profesor tutor: Dr. Daniel Alejandro Medina Salas  
Estudiante: Keerth Sebastians Prenzlau Asencio

**Puerto Montt, Chile**

**2025**

**® Keerth Sebastians Prenzlau Asencio.**

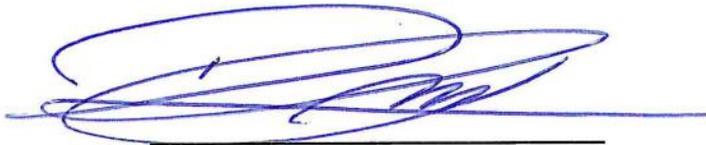
**Se autoriza la reproducción parcial o total de esta obra, con fines académicos por cualquier forma, medio o procedimiento, siempre y cuando se incluya la cita bibliográfica del documento.**

**Puerto Montt, Chile**

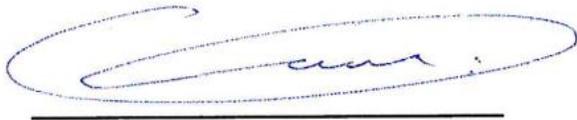
**2025**

## HOJA DE CALIFICACIÓN

En Puerto Montt, el 10 de Julio de 2025 los abajo firmantes dejan constancia que el (la) estudiante Keerth Sebastians Prenzlau Asencio de la carrera o programa de Medicina Veterinaria ha aprobado la tesis o memoria de título para optar al título o grado académico de Médico Veterinario con una nota de 7



**Dr. Daniel Medina**



**Dr. Juan Pablo Pontigo**



**Dra. Natasha Barrios**

## AGRADECIMIENTOS

En esta primera instancia quisiera agradecer a mi profesor guía el Dr. Daniel Alejandro Medina Salas por acompañarme en este proceso desde el principio hasta el final, por la paciencia de su parte, el tiempo y la dedicación con el trabajo que presentamos, aun sabiendo que nos queda un largo camino por recorrer. El Dr. siempre tiene una disponibilidad increíble y mucho optimismo hacia la investigación, considerando el enorme trabajo que representan la investigación, las clases y a su vez el trabajo con sus memoristas, quiero destacar su gran cariño hacia la docencia y el esfuerzo que esto conlleva.

En segundo lugar, quiero agradecerme a mí mismo, por estar con todo el ánimo cuando se trata de investigar, por no darme por vencido ni proponerme cosas imposibles, mirar siempre hacia delante y nunca dejarme llevar por opiniones externas. Además del esfuerzo considerable que representa llevar a cabo una memoria junto con un semestre lleno de clases, siendo delegado del año académico y además formar parte de un nuevo centro de alumnos.

Agradezco a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo por la financiación brindada a través del proyecto FONDECYT INICIACIÓN N°11230295 y también al Fondo de Vinculación Internacional N°FOVI220211. Sin su apoyo, este trabajo de investigación no habría sido posible.

Agradezco al Laboratorio Nacional de Computación de Alto Rendimiento (NLHPC) por el acceso a sus recursos computacionales de última generación, con el código CCSS210001.

Además, quiero agradecer a todas las personas vinculadas a la universidad con quienes comparto día a día, profesores, clínicos, secretaría, etc. A veces no nos damos cuenta de la ayuda que brindamos a algunas personas, ya que si algunos profesores o compañeros supieran las veces que me han salvado de días pésimos simplemente con su compañía o una pequeña broma, no me creerían.

Por último y no menos importante, agradecer a mi familia, quienes siempre me apoyan en todo lo que me he propuesto. A Renata Marín por la paciencia, comprensión y apoyo incondicional, además de las palabras de aliento, que han sido esenciales para la culminación de este proyecto. Lo extraordinaria que es, es admirable.

<b>Tabla de contenido</b>	<b>Pag</b>
<b>AUTORIZACIÓN</b> .....	I
<b>HOJA DE CALIFICACIÓN</b> .....	II
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	III
<b>TABLA DE CONTENIDO</b> .....	IV
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	VI
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	VII
<b>RESUMEN</b> .....	VIII
<b>ABSTRACT</b> .....	IX
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 Microorganismos en la salud animal, pública y ambiental</b> .....	1
<b>1.2 Una salud</b> .....	2
<b>1.3 Humedales y antimicrobianos</b> .....	4
<b>1.4 Genómica y bioinformática</b> .....	5
<b>1.5 Técnicas y reconocimiento de elementos genómicos</b> .....	6
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	10
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	11
<b>3.1 Objetivo General</b> .....	11
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	11
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	12
<b>4.1 Tipo de estudio</b> .....	12
<b>4.2 Área de obtención de las muestras y características de las muestras utilizadas</b> .....	12
<b>4.3 Preparación bioinformática de las secuencias metagenómicas</b> .....	13
<b>4.4 Análisis funcional de las secuencias ensambladas</b> .....	14
<b>4.5 Búsqueda y descripción funcional de elementos genéticos móviles</b> .....	15
<b>4.6 Representación de datos recopilados</b> .....	16
<b>5. RESULTADOS</b> .....	16
<b>5.1 Ensamblaje y análisis de MAGs</b> .....	16
<b>5.2 Caracterización taxonómica</b> .....	21
<b>5.3 Caracterización de elementos genéticos móviles</b> .....	28
<b>5.4 Análisis taxonómico de plásmidos</b> .....	30
<b>5.5 Elementos genéticos de resistencia y virulencia</b> .....	31
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	36
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	44
<b>8. REFERENCIAS</b> .....	45
<b>9. ANEXOS</b> .....	59

<b>9.1 Anexo 1.</b> Lista de software comúnmente utilizados en bioinformática para el estudio de secuencias genómicas. ....	59
<b>9.2 Anexo 2.</b> Ejemplo de un archivo “.stats” en las salidas de MetaWRAP después de su módulo de refinamiento. A continuación, se muestran las estadísticas genómicas de los bin obtenidos previo al proceso de selección de los mejores en términos de completitud y contaminación. Con esta información se realiza la selección de los mejores bins. ....	60

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Diagrama de flujo para el análisis genómico de las muestras. ....	12
<b>Figura 2.</b> Mapa de distribución de los humedales en sus ciudades correspondientes. Puntos en rojo indican los lugares donde se obtuvieron las muestras. Adaptado de: “Metagenomics Insight into Veterinary and Zoonotic Pathogens Identified in Urban Wetlands of Los Lagos, Chile”, por Opitz et al., 2024, Pathogens. 13(9):788. ....	13
<b>Figura 3.</b> Porcentaje de clasificación con software METAXA2 (Bengtsson-Palme, 2015).....	23
<b>Figura 4.</b> Número de genes hipotéticos anotados por PROKKA (Seeman, 2014), en humedales urbanos de la Región de Los Lagos.....	29
<b>Figura 5.</b> Número de plásmidos obtenidos por humedal.....	30

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Lista de patologías de carácter bacteriano de denuncia obligatoria al SAG. ....	3
<b>Tabla 2.</b> Ejemplo del ensamblaje final de las muestras utilizadas con MetaWRAP, con sus características de ensamblado, representando los mejores 10 bins en parámetros de completitud.....	17
<b>Tabla 3.</b> Resumen de genes de resistencia antimicrobiana encontrados en los MAGs ensamblados.....	18
<b>Tabla 4.</b> Resumen de genes relacionadas con factores de virulencia en los MAGs ensamblados.....	20
<b>Tabla 5.</b> Caracterización taxonómica utilizando el software MetaWRAP (Uritskiy et al., 2018). ....	22
<b>Tabla 6.</b> Diferencias taxonómicas entre METAXA2 y Kraken2. ....	24
<b>Tabla 7.</b> Resumen final de la clasificación taxonómica de los MAGs ensamblados con las diferentes herramientas bioinformáticas utilizadas para este proceso. Centrándonos en las clasificaciones más profundas a nivel de género y especie.....	26
<b>Tabla 8.</b> Resumen de genes virulentos más importantes con relevancia para la Medicina Veterinaria, obtenidos de anotaciones hechas a muestras tomadas de humedales urbanos de la Región de Los Lagos. Estos genes representan una alarma biológica debido a su capacidad para generar adaptaciones en las bacterias.....	28
<b>Tabla 9.</b> Resumen de bacterias infectocontagiosas presentes según plásmidos encontrados en humedales urbanos de la Región de Los Lagos. La inclusión de estas bacterias se realizó en base a su capacidad para generar enfermedades tanto en animales, como personas. ...	31
<b>Tabla 10.</b> Resultados de ABRicate para genes de resistencia antimicrobiana en plásmidos aislados en humedales urbanos de la Región de Los Lagos. ....	32
<b>Tabla 11.</b> Genes relacionados con factores de virulencia encontrados gracias a VFDB en plásmidos obtenidos de humedales urbanos de la Región de Los Lagos.....	33

## Resumen

Los microorganismos son los seres más abundantes del planeta, colonizando cualquier ambiente. El estudio de estos con métodos de secuenciación masiva nos permite identificar nuevas especies, además de elementos genómicos potencialmente patógenos. Junto a esto se suma que nos brinda más información para aumentar la prevención, control y mitigación de posibles enfermedades.

En el presente estudio se evaluó la reconstrucción de genomas ensamblado por metagenomas y, además, la presencia de elementos genómicos no descritos pertenecientes a microorganismos de interés veterinario, utilizando muestras metagenómicas obtenidas de 13 humedales urbanos de la Región de Los Lagos, Chile. Se logró la reconstrucción de 40 MAGs (genomas ensamblados desde metagenomas) de alta calidad, y se identificaron numerosos genes asociados a resistencia antimicrobiana y virulencia. Destacó la presencia de genes como *blaOXA*, *mcr-4.3* y *oqxB*, relacionados con resistencia a antimicrobianos de uso crítico en medicina humana y veterinaria, y genes como *hipA*, *ccdB* y *virB11*, asociados a mecanismos de persistencia, daño celular y secreción de toxinas. Además, se identificaron elementos genéticos móviles, especialmente plásmidos, que actuaban como vectores potenciales para la diseminación horizontal de estos genes. Los análisis taxonómicos revelaron que un número significativo de los MAGs no pudo ser clasificado a nivel de especie, lo que sugiere la existencia de microorganismos aún no descritos en bases de datos genómicas. Este hallazgo, junto con la coexistencia de genes de resistencia y virulencia en plásmidos, refuerza la hipótesis de que los humedales urbanos actúan como reservorios de material genético clínicamente relevante. Se concluye que los humedales urbanos estudiados representan ecosistemas con alto potencial de riesgo sanitario, al albergar bacterias con perfiles genéticos peligrosos para la salud animal y humana. Se recomienda la implementación de sistemas de monitoreo ambiental genómico bajo el enfoque Una Salud, además de futuras investigaciones que integren estudios funcionales y fenotípicos para validar el impacto de los genes detectados.

**Palabras clave:** *Microorganismos, Elementos genómicos, Humedales, Resistencia antimicrobiana, Virulencia.*

## **Abstract**

Microorganisms are the most abundant beings on the planet, colonizing any environment. The study of these mass sequencing methods allows us to identify new species, in addition to potentially pathogenic genomic elements. Along with this, it adds that it gives us more information to increase the prevention, control and mitigation of possible diseases.

This study will evaluate the presence of undescribed genomic elements belonging to microorganisms of veterinary interest, using metagenomic samples obtained from 13 urban wetlands in the Region of Los Lagos, Chile.

The reconstruction of 40 high-quality MAGS (genomes assembled metagenomes) was achieved, and numerous genes associated with antimicrobial resistance and virulence were identified. He highlighted the presence of genes such as *blaOXA*, *mcr-4.3*, and *eqxB*, related to resistance to antimicrobials critics used in human and veterinary medicine, and genes such as *hipA*, *ccdB* and *virB-11*, associated with mechanisms of persistence, cell damage and secretion of toxins.

In addition, mobile genetic elements were identified, especially plasmids, which acted as potential vectors for the horizontal dissemination of these genes.

Taxonomic analyses revealed that a significant number of MAGs could not be classified at the species level, suggesting that the existence of microorganisms not yet resistant and virulent genes in plasmids, reinforces the hypothesis that urban wetlands act as reservoirs of material genetic clinically relevant.

It is concluded that the urban wetlands studied represent ecosystems with high potential for health risk, by housing bacteria with dangerous genetic profiles for animals and humans' health. The implementation of genomic environmental monitoring systems under the One Health approach is recommended, in addition to future research that integrates functional and phenotypic studies to validate the impact of the genes detected.

**Key words:** *Microorganism, Genomic Elements, Wetlands, Antimicrobial resistance, Virulenc*

## **1. Introducción**

### **1.1 Microorganismos en la salud animal, pública y ambiental**

Los microorganismos son los seres más primitivos y numerosos que existen en el planeta colonizando cualquier ambiente (Arias et al., 2010), los cuales están presentes en la mayoría de los ciclos de nutrientes del planeta y también en procesos metabólicos para los seres vivos y el ambiente. Además, su capacidad para generar enfermedades en casos específicos de proliferación aumentando su capacidad epidemiológica, los dotan de una importancia absoluta respecto a la salud de animales y humanos. En los últimos años, la variedad de formas en que han sido usados abarca grandes avances en tecnologías médicas, humanas, salud animal, procesamiento de alimentos, seguridad y calidad de alimentos, ingeniería genética, protección del medio ambiente, biotecnología agrícola y correcto tratamiento de desechos (Higa et al., s. f.). Como se menciona, son los seres vivos con mayor número de especies a nivel taxonómico y, además, de aquellos que menos información genética se conoce. Esto se debe a que, a pesar de las asociaciones cruciales en fisiología, sus características genómicas y coexistencia con otras especies son aún desconocidas (Yang et al., 2021).

En lo que respecta a la mínima cantidad de organismos descritos, cerca del 1% de las bacterias conocidas poseen géneros que son de relevancia etiológica en enfermedades para los seres vivos (Caeme, 2021). Entre los microorganismos patógenos se encuentra un número considerable que representan una amenaza por su capacidad de producir enfermedades zoonóticas, es decir, que se transmiten de animales a humanos. La Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2023) estima que el 61% de los 1.415 patógenos humanos conocidos tiene un origen zoonótico. En los últimos 30 años la prevalencia de enfermedades infecciosas ha aumentado en forma de que el 75% de las enfermedades infecciosas emergentes son de origen animal (Osburn et al., 2009), esto sin tomar en cuenta las nuevas patologías que aparecen conforme la humanidad avanza su estadio en el planeta.

## 1.2 Una salud

Una salud corresponde a un enfoque colaborativo e interdisciplinario, cuyo fin es equilibrar y optimizar de manera sostenible la salud humana, animal y ecosistémica (Organización Mundial de Sanidad Animal [OIE], 2023). Las primeras palabras que mencionaban esta idea nacieron con Hipócrates (460-370 AC), el mencionaba que existía una estrecha relación entre la salud, ambiente y prevalencia de enfermedades infecciosas (Zunino, 2018). Aunque las primeras bases fueron prescritas y se asociaron con la aparición de la enfermedad respiratoria grave (SARS) a principios del 2003, posteriormente con la propagación de la influenza aviar (H5N1) y con una serie de objetivos estratégicos conocidos como “Principios de Manhattan” derivados de la reunión de la Wildlife Conservation Society en 2004 (Mackenzie, 2019). Estos objetivos fueron los primeros en reconocer legalmente la relación entre la salud animal y humana y las amenazas que las enfermedades plantean en economía y alimentación. Aunque el objetivo destacado entre todos fue la inclusión de la salud de fauna silvestre y ambiental y el foco esencial de prevención, vigilancia, control y mitigación de enfermedades a nivel mundial que debería tenerse en esta área.

Según la Organización Mundial de la Sanidad animal (OIE, 2011) “el 60% de los agentes patógenos que causan enfermedades humanas provienen de animales domésticos o silvestres”. Por este y otros factores, la amenaza que representan las enfermedades zoonóticas deja en evidencia la necesidad de implementar estrategias que permitan reaccionar de manera rápida y eficaz, permitiendo a profesionales y empresas del sector herramientas y servicios esenciales para el control y mitigación de enfermedades (Rodríguez et al., 2023).

Desde el 2015 la OMS desarrolló una investigación en 54 países con el fin de localizar los microorganismos prioritarios que podrían causar brotes o pandemias. La lista fue publicada por primera vez en el 2017 y en la última edición publicada el 30 de Julio de 2024 alberga un total de 28 familias de virus y un grupo central de bacterias, que abarcan 1.652 patógenos en total (OMS, 2024).

En Chile, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), es consciente de la salud humana y animal, por esto, generó un listado de enfermedades zoonóticas de declaración

obligatoria (EDO), con el fin de informar a los profesionales sobre y así generar mecanismos de respuesta rápida para favorecer el control y erradicación de estas. Este listado consta de diversas patologías bacterianas que afectan tanto a animales como a humanos (Burgos, 2024).

**Tabla 1** Lista de patologías de carácter bacteriano de denuncia obligatoria al SAG.

<b>Enfermedad de denuncia obligatoria en Chile</b>	<b>Agente etiológico</b>
Aborto enzoonótico ovino	<i>Chlamydia abortus</i>
Adenitis equina	<i>Streptococcus equi</i>
Agalaxia contagiosa	<i>Mycoplasma agalactiae</i>
Brucelosis	<i>Brucella abortus</i> , <i>Brucella ovis</i> y <i>Brucella melitensis</i>
Campilobacteriosis genital bovina / Vibriosis	<i>Campylobacter fetus subsp venerealis</i>
Carbunco bacteridiano	<i>Bacillus anthracis</i>
Clamidiosis aviar	<i>Chlamydophila psittaci</i>
Cólera aviar	<i>Pasteurella multocida</i>
Erisipela porcina	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>
Fiebre Q	<i>Coxiella burnetii</i>
Infección por <i>Rhodococcus equi</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
Micoplasmosis aviar	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> , <i>Mycoplasma synoviae</i> y <i>Mycoplasma meleagridis</i>
Paratuberculosis	<i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i>
Purolosis	<i>Salmonella pullorum</i>
Salmonelosis	<i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> y <i>Salmonella abortus ovis</i>
Tifosis aviar	<i>Salmonella gallinarum</i>
Tuberculosis bovina	<i>Mycobacterium bovis</i>

Adaptado de: Análisis metagenómico de Microorganismos de Relevancia en Medicina Veterinaria Identificados en Humedales Urbanos de la Región de Los Lagos, por A. Burgos, 2024, *Memoria de título para optar al grado de licenciado en*

### **1.3 Humedales y antimicrobianos**

Los humedales corresponden a ecosistemas de origen natural o artificial, que pueden estar cubiertos de agua de forma permanente o temporal (Bergamini et al., 2020), representan una fuente de agua considerable para gran número de especies nativas en nuestro país, además de la importancia en la conservación de ciclos biológicos para plantas, animales y especies de micelios (Humedales de Chiloé, 2018). Pese a su importancia estimaciones científicas indican que desde 1900 han desaparecido el 64% de los humedales a nivel mundial (Davidson, 2014).

La Convención RAMSAR (2016) define a los humedales como:

Extensiones de marismas, pantanos y turberas, o superficies cubiertas de aguas, sean éstas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluidas las extensiones de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros.

En la actualidad, se considera que las actividades humanas alteran sus funciones normales. Debido a un exceso de nutrientes que son consecuencia principalmente de la ganadería intensiva, la contaminación y el crecimiento poblacional, lo que desemboca en un aumento en el desarrollo microbiológico descontrolado. Este deterioro en la calidad del agua de estos humedales puede contribuir un riesgo para la salud humana, animal y ambiental (Opitz et al., 2024). Además, estos microorganismos están dotados de genes resistentes a los antimicrobianos y genes de virulencia, por lo que animales silvestres, asilvestrados, mascotas y domesticados que entran en contacto con estas aguas contaminadas, pueden incorporar estos microorganismos y transformarse en un foco de alerta sanitaria, afectando a la salud pública, y facilitando la diseminación de especies patógenas entre las poblaciones urbanas.

La era antibiótica que comenzó en los años 1940, revolucionando la medicina y la guerra contra enfermedades infecciosas iniciada hace más de 2500 años en China (Quiñones, 2017), ha evolucionado a tal nivel que los antimicrobianos hoy en día son de fácil acceso para la población. Sin embargo, el aumento en la producción de

antimicrobianos y el uso indiscriminado de estos, produjeron una respuesta de resistencia de las bacterias. Por esta razón la OMS ha declarado que la RAM (Resistencia Antimicrobiana) es una de las amenazas más importantes para la salud pública que enfrenta la humanidad en este siglo (OMS, 2021; Bhardwaj et al., 2022). Las bacterias por ejemplo adquieren genes de resistencia antibiótica de dos maneras, de manera natural o intrínseca, consistente en una transmisión vertical (células hijas) (Fernández, 2003). Y de manera adquirida, por ejemplo, mutación de cromosomas o intercambio de genes de resistencia por transferencia horizontal, a través de diferentes procesos denominados conjugación (vía plásmidos u otro material genético transportable), traducción y transformación (Baran, 2023). De esta última manera, una bacteria puede adquirir resistencia a múltiples antimicrobianos sin necesidad de haber estado en contacto con estos (Quiñones, 2017).

#### **1.4 Genómica y bioinformática**

En 1975, se publicó el primer método enzimático para secuenciar ADN (Sanger y Coulson, 1975), por medio de la incorporación de dideoxinucleótidos terminales, y gracias al desarrollo de esta metodología, poco después secuenciaron el primer genoma de un bacteriófago (MS2). Unos años más adelante aparecieron los secuenciadores automáticos, hasta que el primer genoma bacteriano fue secuenciado en 1995 (Fleischmann et al., 1995).

Siguiendo este método, varios otros genomas fueron secuenciados y publicados en años posteriores y para 1997 el número de genomas eran 7 en total (seis procariontes y *Saccharomyces cerevisiae*) fue entonces cuando Tatusov, Koonin y Lipman crearon y pusieron a disposición la base de datos Clusters of Orthologous Genes (COG) por sus siglas en inglés (Tatusov et al., 1997), previendo que el número de genomas secuenciados aumentaría exponencialmente en los siguientes años. Y no se equivocaron, cerca de 24 años después la cifra es de más de 350.000 (Sayers et al., 2019).

La base de la microbiología ha sido el estudio de cultivos bacterianos (Clínico San Carlos Madrid y Suárez, 2017), sin embargo, algunos microorganismos no se pueden aislar ni cultivar fácilmente *in vitro*, debido a sus complejos hábitats naturales, como, por ejemplo, complejidades ambientales, temporales, físicas,

bioquímicas y genéticas irreproducibles (Yang, 2021). El desarrollo de la secuenciación masiva generó gran cantidad de información que cambió el modo de investigación en microbiología (Hernández, 2020), esto demanda exclusivamente la aplicación de la bioinformática en la interpretación y análisis microbiológicos. Al integrar técnicas matemáticas, estadística y computación en el estudio microbiológico, la bioinformática requiere estudios básicos en cuanto a herramientas de programación se refiere.

El proceso de secuenciación masiva consta de 4 etapas principales: extracción de ADN de la muestra, la preparación de bibliotecas (hay que preparar los fragmentos que serán utilizados), la secuencia propiamente tal y el análisis bioinformático e interpretación de los resultados (Hernández, 2020). A su vez el análisis de datos también cuenta con pasos a seguir: La generación y el control de calidad, el alineamiento contra bases de datos específicas y la generación de datos a partir de los resultados de la etapa anterior. Hoy en día existen diferentes softwares de uso libre que nos permiten trabajar en cada etapa del experimento de secuenciación masiva y a continuación se mencionan algunos y con qué objetivo están creados.

### **1.5 Técnicas y reconocimiento de elementos genómicos**

La reducción de costos en la secuenciación permite estudiar poblaciones microbianas que hasta hace unos años era prácticamente inalcanzables (Wu et al., 2022).

La metagenómica es un ejemplo de metodología exitosa en este campo:

La metagenómica se conoce como una técnica de extracción de ADN de una muestra ambiental o un huésped, seguida de una secuenciación rápida, es decir el conjunto de genes y/o genomas de los miembros de un microbioma, secuenciados (Marchesi & Ravel, 2015). El metagenoma es el conjunto de lecturas obtenidas de dicha secuenciación (Setubal, 2021).

Ya que en la medida que una lectura de metagenoma esté lo suficientemente bien cubierta, puede contener información genética de todos o casi todos los microorganismos presentes en la muestra (Setubal, 2021). Esto permite el ensamblaje de genomas a través de las secuencias metagenómicas, lo que se

conoce como genoma ensamblado desde metagenomas (Metagenomes-Assemble Genomes, MAG). Para lograr el ensamblaje se requiere el uso de programas bioinformáticos complejos, que se operan a través de computación de alto rendimiento. Estos programas ensamblan lecturas y las agrupan en fragmentos de mayor tamaño conocidos como contigs, los cuales luego se agrupan de acuerdo con sus patrones de secuencia y similitud para conformar un mismo genoma, proceso que se conoce como binnig (Uritski, 2018).

Un contig se refiere a un conjunto de lecturas de gel en la secuenciación de ADN que se superponen y pertenecen a una sola secuencia, que se pueden sumar para formar una secuencia de consenso contigua (Lapidus, 2009).

Gran número de los microorganismos de estudio no cuentan con genomas de referencia de alta calidad y/o reales, por lo tanto, una vez se hayan ensamblado los MAG y contigs, no se ve ninguna realidad biológica en ciertos grupos de elementos genómicos presentados en la literatura, es decir, no hay evidencia cuantificable para expresar que las muestras sean pertenecientes a una especie en particular (Garg et al., 2021). Sin embargo, existen herramientas bioinformáticas que nos permiten identificar elementos que no están descritos en bases de datos, esto se logra mediante la anotación en base a su identidad de secuencia.

Actualmente es posible explorar asociaciones de microorganismos con genomas de referencia de alta calidad (Yang et al., 2021), lo cual produce un desafío técnico para identificar genomas de especies concretas, esto como se mencionó anteriormente, es producto de la falta de elementos genéticos aislados de las especies de interés de cada investigador.

El/los softwares de clasificación metagenómica utilizan diversos criterios como las firmas de secuencias de nucleótidos (por ejemplo, el contenido de GC y la frecuencia de tetranucleótidos), las filogenias de genes específicos, la profundidad de cobertura de las secuencias de ADN y los patrones de abundancia en las muestras. La combinación de estos factores permite generar bins de alta calidad (Bowers, 2017). Esta técnica ha demostrado ser efectiva para extraer genomas de organismos poco frecuentes en la comunidad, es decir, aquellos que representan menos del 1% de la población total.

La homología, siendo un concepto biológico, está altamente ligada cuando se quiere analizar MAGs de interés. Con el fin de entendimiento de lenguaje utilizado en este estudio, imitaré un lenguaje propuesto en 2021 por Joao C. Setubal, donde le menciona que existen categorías de MAG. MAG que se les puede asignar una especie (SMAG) y los MAG que no es posible, porque supuestamente pertenecen a especies nuevas (Setubal, 2021).

Dos secuencias de ADN (dos secuencias de genes) son homólogos si comparten un ancestro en común. Para la práctica se debe recurrir a la “similitud” de dos secuencias para inferir que pueden ser homólogas. Esto se comprueba con pruebas estadísticas y bioinformática. Cuando se puede inferir una relación de homología entre dos secuencias de ADN, en ausencia de factores complejantes, se puede utilizar el término ortología (Setubal, 2021).

Para establecer si son SMAG o HMAG el autor hace referencia a que el genoma deberá o no presentar un alineamiento con una secuencia de genoma aislado de una especie X. Si es este presenta un alineamiento perfecto (alineamiento de un 97% hacia arriba, aunque algunos autores describen desde un 95%) con un aislado de cualquier fuente del planeta, entonces estamos seguros de que es un SMAG. Incluso se puede utilizar la ayuda de técnicas estadísticas como en GGDC (Genome-to-Genome Distance Calculator) (Meier- Kolthoff et al., 2013).

Por otra parte, comprobar si un HMAG es realmente una especie nueva es más complejo, debido a la ausencia de un genoma de referencia para comparar. Todo lo que se tiene es el conjunto de contigs. La realidad es que los HMAG tienen una realidad apremiante, ya que la mayoría de los MAG son HMAG.

Dentro de los segmentos de ADN estudiados en bacterias se encuentran los elementos genéticos móviles (MGEs) de estos microorganismos, siendo los más importantes y descritos los plásmidos (autorreplicación, ADN extra cromosómico) y transposones (cromosómicos o integrados en plásmidos, son casetes de ADN transmisibles) (Cabrera et al., 1994). Aunque no son los únicos, ya que también se encuentran presentes los, integrones, islas genómicas, fagos entre otros. Todos estos de vital importancia en la adquisición o mutación de genes de resistencia, ya sea a antibióticos o desinfectantes.

El proceso de identificación y etiqueta de una secuencia genómica, como mínimo

debería incluir las coordenadas de la región codificante. Pero, en algunos casos se desea ir más allá para descubrir los ARN no codificantes, péptidos señal, etc (Seemann, 2014). La forma tradicional de predecir lo que codifica un gen (antes mencionada) consiste en compararlo con una base de datos de secuencias conocidas. Existen muchas herramientas que trabajan de esta manera, sin embargo, hay unas capaces de reconocer la funcionalidad de ciertos genes, es decir, son capaces de comparar ciertos contigs o bin, con otros ya aislados y caracterizados, para así lograr una categorización funcional de elementos genómicos no reconocibles por todos los softwares.

La importancia del uso de técnicas como la metagenómica, secuenciación masiva, MAG o reconocimiento de plásmidos en la medicina veterinaria y humana, ayudan en gran medida a reconocer especies potencialmente dañinas para la salud de todos y en la prevención de nuevas epidemias, desde hace años se trabaja el concepto general de una salud, y desconcertadamente las últimas epidemias de nuestra era son asociadas a zoonosis, es decir, provienen desde el enfoque de nuestra profesión. Mejorando el acercamiento con materias útiles y herramientas que ayuden a entender y descubrir nuevas especies, se puede a su vez, incrementar la prevención.

Por medio del presente estudio, se realizará la búsqueda de elementos genómicos de interés para la medicina veterinaria, obtenidas mediante secuenciaciones de metagenómica desde humedales de la Región de Los Lagos, Chile. Estas estarán enfocadas directamente en elementos capaces de generar patologías, mecanismos de resistencia o mecanismos de virulencia. La información obtenida nos dará una idea de la evolución que han tenido los microorganismos en su genoma, la capacidad que tienen para adquirir caracteres necesarios para su supervivencia y posibles fuentes de contaminantes

## **2. Hipótesis**

En humedales urbanos de la Región de Los Lagos, existen elementos genómicos funcionales asociados a RAM y virulencia aún no descritos, presentes en microorganismos de interés veterinario, que pueden tener la capacidad de afectar la salud animal y humana.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo General**

Identificar la presencia de elementos genómicos no descritos pertenecientes a microorganismos de interés veterinario que habitan en humedales urbanos de la Región de Los Lagos.

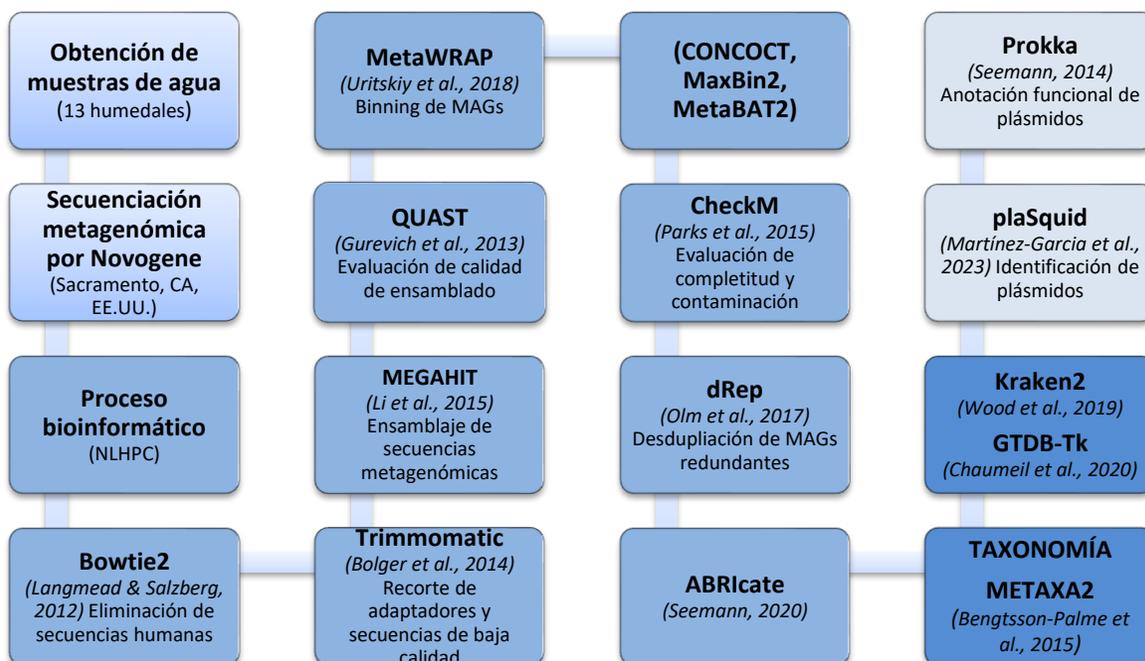
#### **3.2 Objetivos específicos**

- I. Reconstruir genomas a partir de secuencias metagenómicas (MAG) de microorganismos de interés veterinario en humedales urbanos de la Región de Los Lagos.
- II. Realizar una caracterización taxonómica a nivel de especie en los genomas ensamblados desde metagenomas (MAG) de microorganismos de interés veterinario de humedales urbanos de la Región de Los Lagos.
- III. Reconocer elementos genómicos no caracterizados vinculados con genes de resistencia antimicrobiana y genes de virulencia en microorganismos de interés veterinario de humedales urbanos en la Región de Los Lagos.

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1 Tipo de estudio

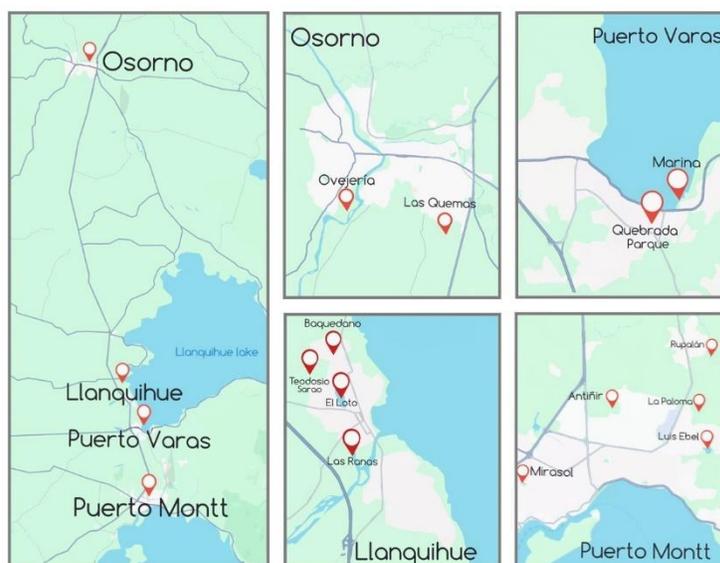
El siguiente estudio corresponde a una investigación cuantitativa de tipo observacional que tiene un alcance descriptivo retrospectivo (Manterola, 2015), que se llevó a cabo gracias a la obtención de muestras en investigaciones previas de colaboradores de la misma institución.



**Figura 1** Diagrama de flujo para el análisis genómico de las muestras.

### 4.2 Área de obtención de las muestras y características de las muestras utilizadas

Las muestras empleadas en este trabajo corresponden a secuencias obtenidas del trabajo de Opitz-Ríos, 2024. Las cuales pertenecen a 13 humedales correspondientes a las ciudades de Osorno (Las Quemadas y Ovejería), Llanquihue (El Loto, Baquedano, Las Ranas y Teodosio Sarao), Puerto Varas (Marina y Quebrada Parque) y Puerto Montt (Luis Ebel, La Paloma, Antifir, Rupallán y Mirasol).



**Figura 2** Mapa de distribución de los humedales en sus ciudades correspondientes. Puntos en rojo indican los lugares donde se obtuvieron las muestras. Adaptado de: “Metagenomics Insight into Veterinary and Zoonotic Pathogens Identified in Urban Wetlands of Los Lagos, Chile”, por Opitz et al., 2024, Pathogens. 13(9):788.

Estas muestras fueron enviadas a secuenciar en el servicio genómico Novogene (Sacramento, CA, EE.UU.) para su secuenciación metagenómica de escopeta (shotgun). El ADN fue secuenciado mediante la utilización de paired-end (2 x 150 pb) utilizando la plataforma Illumina Novaseq 6000 con una salida de 6 GB por muestra. Los datos en bruto de la investigación mencionada (Opitz-Rios, 2024) se depositaron en la base de datos ENA-EMBL con el número de acceso PRJEB77702 (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB77702>, consultado el 5 de octubre de 2024).

### 4.3 Preparación bioinformática de las secuencias metagenómicas

Los procesos bioinformáticos se realizaron utilizando el super computador de mayor capacidad de Chile, el Guacolda-Leftraru Epu, que cuenta con una arquitectura distribuida con nodos de cómputo y nodos GPU y ofrece un rendimiento de 280 TFlops y cuenta con 7.360 núcleos de cómputo y 24.320 GB de memoria RAM, ubicado en el Laboratorio Nacional de Computación de Alto Rendimiento (NLHPC) permite la realización de simulaciones complejas, análisis de grandes conjuntos de datos y el desarrollo de proyectos de investigación multidisciplinarios. Antes de su respectivo análisis, se filtró todas las mediciones que no reflejaban interés para las

investigaciones microbiológicas, como por ejemplo el ADN de origen humano o vírico (López et al., 2021; Navgire et al., 2022), la herramienta bioinformática empleada para esto es Bowtie2 (Utturkar, 2020). A continuación, las muestras se procesaron utilizando Trimmomatic, cuya función principal es la eliminación de secuencias de baja calidad de los datos crudos obtenidos (Krueger, 2011). Posteriormente, se ensambló las lecturas utilizando la herramienta MEGAHIT, diseñada específicamente para manejar datos metagenómicos complejos (Li et al., 2015). Una vez completado el ensamblaje, se llevó a cabo una evaluación de la calidad del ensamblaje del genoma empleando el software QUAST (Gurevich et al., 2013). Finalmente, para lograr el ensamblaje de genomas (MAG) se utilizó la herramienta MetaWRAP (Tan, 2024; Uritskiy et al., 2018), software que permite el análisis avanzado de las secuencias debido a sus módulos independientes, resultando en agrupaciones de secuencias pertenecientes a un mismo genoma (bins) de alta calidad (Uritskiy et al., 2018). Posteriormente, se procedieron a seleccionar de los bins ensamblados de acuerdo con su completitud y contaminación (40% y 20% respectivamente) (Uritskiy et al., 2018). Además, se eliminaron los bins duplicados utilizando la herramienta dRep (Olm et al., 2017).

#### **4.4 Análisis funcional de las secuencias ensambladas**

En búsqueda de elementos genómicos característicos de virulencia y resistencia antimicrobiana se utilizó la herramienta ABRicate la cual facilita la detección de numerosos genes asociados a la virulencia y resistencia a antimicrobianos a partir de secuencias del genoma bacteriano extraídas de diversas bases de datos, como NCBI, VFDB, Resfinder, Arg-ANNOT, MEGARES, PlasmidFinder, por mencionar algunas (Carattoli et al., 2014; Chen et al., 2016; Feldgarden et al., 2019; Zankari et al., 2012). ABRicate produce un archivo de salida en formato tabular que incluye información sobre los genes de resistencia antimicrobiana y virulencia identificados en la secuencia del genoma bacteriano. Los resultados se presentan en una hoja de cálculo, y los hallazgos más relevantes se resumieron mediante representaciones gráficas (Seemann, 2020). Para finalizar, se completó una caracterización taxonómica a nivel especie para los genomas ensamblados, utilizando la herramienta bioinformática de METAXA2, cuyo principal objetivo es la identificación y asignación

a un origen arqueal, bacteriano, eucariota nuclear, mitocondrial o cloroplástico (Bengtsson-Palme, 2015). También, con el fin de comparar y tener mayor amplitud en cuanto a base de datos, se utilizó el software de Kraken2 (Wood et al., 2019), que proporciona una clasificación taxonómica rápida basada en *k*-meros. Por último, buscando comparativas entre los reconocimientos taxonómicos, utilizamos GTDB-Tk, un conjunto de herramientas de software para asignar clasificaciones taxonómicas objetivas, este está diseñado para trabajar con los métodos y avances recientes que permiten obtener genomas ensamblados por metagenomas (Chaumeil et al., 2022).

#### **4.5 Búsqueda y descripción funcional de elementos genéticos móviles**

Al comienzo de esta evaluación, lo primero es la identificación de genes específicos de elementos móviles, para esto empleamos plaSquid, una herramienta bioinformática que nos ayuda en la detección y clasificación de plásmidos en secuencias genómicas y metagenómicas (Giménez et al., 2022). PlaSquid resume los resultados brutos recopilados de los dos enfoques complementarios en una única tabla de salida, lo que nos ayuda a analizar en profundidad cada plásmido. Para la evaluación funcional de las secuencias plasmídicas primero se llevó a cabo la anotación de genes obtenidos a través de la herramienta PROKKA (Seeman, 2014), Prokka integra un conjunto de herramientas de software para lograr una anotación completa y fiable de secuencias genómicas bacterianas. A continuación, se aplicó por segunda ocasión ABRicate (Seemann, 2020), como se describe en el párrafo anterior, orientando la búsqueda en genes plasmídicos relacionados con virulencia y genes de resistencia antimicrobianos.

#### **4.6 Representación de datos recopilados**

Los datos obtenidos fueron representados mediante tablas, figuras y gráficos, con un componente escrito descriptivo. Las representaciones visuales fueron realizadas en Microsoft Excel versión 2310, herramienta que nos permite analizar una gran cantidad de datos brutos en conjunto, por su facilidad de utilizar y su capacidad de entregar datos en forma cuantitativa y cualitativa, nos ayuda a identificar tendencias y patrones de los datos (Madrid, 2023). Por consiguiente, los análisis y resultados representados de manera escrita se llevaron a cabo con Microsoft Word 2021-2024, siguiendo el formato empleado para realizar esta investigación.

## **5. Resultados**

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de las secuencias metagenómicas procesadas en este escrito, pertenecientes a 13 humedales urbanos de la Región de Los Lagos. Serán agrupados en el mismo orden que la sección de objetivos específicos.

A lo largo de todo este punto se incluyen métricas de calidad de ensamblaje, distribución taxonómica, genes codificantes específicos de resistencia antimicrobiana y virulencia, además de los detalles de los elementos móviles que los portan.

### **5.1 Ensamblaje y análisis de MAGs**

#### **5.1.1 Ensamblado**

El análisis comenzó con el ensamblaje de los datos obtenidos a través del supercomputador del Laboratorio Nacional de Computación de Alto Rendimiento (NLHPC). Posteriormente, se evaluó la calidad del ensamblaje genómico utilizando la herramienta QUAST. Los resultados revelaron un valor promedio de N50 de 15.728 pares de bases (pb) y una longitud media de contigs (L50) de 9.925 pb, a partir del análisis de 15 muestras. El valor N50 indica la longitud mínima del contig más largo que cubre al menos el 50 % del genoma ensamblado, mientras que el L50 representa la longitud mediana de todos los contigs. Estos resultados sugieren que las muestras presentan una calidad de ensamblaje adecuada para su posterior análisis (Gurevich et al., 2013).

A continuación, a través de MetaWRAP (Uritskiy et al., 2018) se utilizaron 3 software para el proceso de binning de las muestras metagenómicas. CONCOCT (Alneberg et al., 2014), MetaBAT2 (Kang et al., 2015, 2019), MaxBin2 (Wu et al., 2016). Por último, gracias al módulo de refinamiento de MetaWRAP, se escogió los bins con mejor calidad después de un refinamiento basados en los parámetros de completitud y contaminación utilizados para esta investigación (40% y 20% respectivamente). La puntuación de completitud hace referencia a cuanto porcentaje de genes en particular están presentes en el bin. Mientras que la contaminación demuestra la proporción de genes presentes en múltiples bins, lo que nos da un indicativo que el bin genómico puede contener ADN de más de un

microorganismo (Pechlivanis & Psomopoulos, 2023). En los archivos de salida después del refinamiento, nos enfocamos en los archivos “.stats” Los archivos “.stat” contienen información útil sobre cada contenedor, incluyendo su integridad y contaminación (Uritskiy et al., 2018). Un ejemplo de estos archivos se encuentra en el Anexo 1.

Como ya mencionamos en la introducción de este estudio, cada bin es comparable a un genoma ensamblado desde metagenoma (MAG).

El número total de bins obtenidos luego del refinamiento fue de 186, de los cuales 48 son de alta calidad ( $\geq 95\%$  de completitud y  $\leq 5\%$  de contaminación) 78 de calidad intermedia ( $< 95\%$  de completitud, pero  $> a 50\%$  de la misma) y 60 de baja calidad ( $< 50\%$  de completitud). En este punto los bins obtenidos obtuvieron un valor medio de N50 de 58.529 pb y un tamaño medio de bin de 3.861.003 pb. Por último estos 48 bins fueron filtrados utilizando el software dRep (Olm et al., 2017), el cual elimina bins redundante (replicados), obteniéndose finalmente un total de 40 bins (40 MAG) ensamblados. Cabe mencionar que las secuencias utilizadas para el objetivo 2 fueron estrictamente seleccionados y corresponden a los 40 bins de mejor completitud y contaminación aquí mencionados (Uritskiy et al., 2018). En la tabla 2 se muestra un ejemplo del archivo final de ensamblaje.

**Tabla 2** Ensamblaje final de las muestras utilizadas con MetaWRAP, con sus características de ensamblado, representando los mejores 10 bins en parámetros de completitud.

Humedal	bin	completitud	contaminación	Linaje	N50	Tamaño
Mirasol	bin.1	100.0	0.512	Enterobacteriaceae	336251	5267259
Antiñir	bin.7	100.0	0.446	Enterobacteriaceae	336188	5190028
Antiñir	bin.6	100.0	0.0	Gammaproteobacteria	445722	5179078
Marina	bin.11	100.0	0.869	Alphaproteobacteria	287647	4153009
Quebrada parque	bin.6	100.0	0.540	Gammaproteobacteria	245210	4037938
Quebrada parque	bin.16	100.0	0.031	Gammaproteobacteria	178631	3729320
Quebrada parque	bin.13	100.0	0.810	Gammaproteobacteria	55171	4651150
El Loto	bin.2	100.0	0.0	Gammaproteobacteria	409005	2599354
El Loto	bin.1	100.0	0.545	Xanthomonadaceae	219786	4192901
Luis Ebel	bin.10	100.0	0.877	Gammaproteobacteria	32903	4837812

Fuente: Elaboración propia. Utilizando el software MetaWRAP (Uritskiy et al., 2018).

### 5.1.2 Análisis funcional

Al momento de la implementación de la herramienta ABRicate el análisis de los MAGs ensamblados, se utilizaron 2 bases de datos en particular, la base datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) (Feldgarden et al., 2019), la cual arrojó una cantidad de 27 genes de resistencia antibiótica. Y a su vez, se utilizó la base de datos ResFinder (perteneciente al Centro de Epidemiología Genómica) (Florensa et al., 2022) arrojando un total de 22 genes de resistencia antibiótica. En cuanto a los resultados con estas bases de datos, los fármacos a los cuales se les encontró mayor número de genes de este tipo, fue la familia de los betalactámicos, coincidente con estudios previos (Opitz—Ríos et al., 2024), realizados con las mismas secuencias metagenómicas. En este punto y pesar de la variabilidad fármacos, los englobaremos a nivel de las familias de antibióticos, con el fin de resumir este punto y abarcar el objetivo de manera general. Los principales genes encontrados en los MAGs ensamblados se resumen en la tabla 3.

**Tabla 3** Resumen de genes de resistencia antimicrobiana encontrados en los MAGs ensamblados.

Humedal	Gen	Resistance	Base de Datos
Mirasol	<i>blaOXA-296</i>	BETA-LACTAM	NCBI
Las Ranas	<i>blaOXA-551</i>	BETA-LACTAM	NCBI
Las Ranas	<i>blaOXA-551</i>	BETA-LACTAM	NCBI
Antiñir	<i>blaOXA-427</i>	BETA-LACTAM	NCBI
Antiñir	<i>blaFOX-2</i>	BETA-LACTAM	NCBI
Antiñir	<i>cphA5</i>	BETA-LACTAM	NCBI
Antiñir	<i>blaSPR-1</i>	BETA-LACTAM	NCBI
Antiñir	<i>bla-C</i>	BETA-LACTAM	NCBI
Antiñir	<i>oqxB9</i>	PHENICOL; QUINOLONE	NCBI
Marina	<i>aph(6)-Smalt</i>	AMINOGLYCOSIDE	NCBI
Marina	<i>blaL1</i>	BETA-LACTAM	NCBI
Rupallán	<i>mcr-4.3</i>	POLIMIXINA	NCBI
Rupallán	<i>blaOXA-549</i>	BETA-LACTAM	NCBI

Rupallán	<i>blaJOHN-1</i>	BETA-LACTAM	NCBI
Quebrada Parque	<i>oqx</i> B30	PHENICOL;QUINOLONE	NCBI
Quebrada Parque	<i>bla</i> SPR-1	BETA-LACTAM	NCBI
Luis Ebel	<i>bla</i> ACC-1a	BETA-LACTAM	NCBI
El Loto	<i>tet</i> (H)	TETRACYCLINE	NCBI
El Loto	<i>bla</i> -C	BETA-LACTAM	NCBI
El Loto	<i>oqx</i> B11	PHENICOL; QUINOLONE	NCBI
Las Quemas	<i>bla</i> RAHN-2	CEPHALOSPORIN	NCBI
Las Quemas	<i>bla</i> SPR-1	BETA-LACTAM	NCBI
Las Quemas	<i>bla</i> -C	BETA-LACTAM	NCBI
Luis Ebel	<i>bla</i> THIN-B	BETA-LACTAM	NCBI
Luis Ebel	<i>bla</i> Rm3	BETA-LACTAM	NCBI
Luis Ebel	<i>bla</i> A_Yent	BETA-LACTAM	NCBI
Luis Ebel	<i>vat</i> (F)	STREPTOGRAMIN	NCBI
Mirasol	<i>bla</i> OXA-296_1		resfinder
Las Ranas	<i>bla</i> OXA-551_1		resfinder
Las Ranas	<i>bla</i> OXA-551_1		resfinder
Antiñir	<i>bla</i> OXA-427_1	BETA-LACTAM	resfinder
Antiñir	<i>bla</i> FOX-2_1		resfinder
Antiñir	<i>cph</i> A5_1		resfinder
Antiñir	<i>bla</i> OXA-427_1	BETA-LACTAM	resfinder
Antiñir	<i>bla</i> FOX-2_1		resfinder
Antiñir	<i>cph</i> A5_1		resfinder
Antiñir	<i>oqx</i> B_1	QUINOLONE	resfinder
Marina	<i>aph</i> (3')-IIc_1		resfinder
Marina	<i>bla</i> L1_3		resfinder
Rupallán	<i>mcr</i> -4.3_1	COLISTIN	resfinder
Rupallán	<i>bla</i> OXA-549_1		resfinder
Rupallán	<i>bla</i> JOHN-1_1		resfinder
Quebrada Parque	<i>oqx</i> B_1	QUINOLONE	resfinder
Luis Ebel	<i>bla</i> ACC-3_1	BETA-LACTAM	resfinder
El Loto	<i>tet</i> (H)_3	TETRACYCLINE	resfinder
El Loto	<i>oqx</i> B_1	QUINOLONE	resfinder
Las Quemas	<i>bla</i> RAHN-2_2		resfinder
Luis Ebel	<i>bla</i> A_2		resfinder
Luis Ebel	<i>vat</i> (F)_1	STREPTOGRAMIN	resfinder

Fuente: Elaboración propia. Utilizando el software de ABRicate (Seemann, 2020).

A continuación, utilizando la Base de Datos de Factores de Virulencia (VFDB por sus siglas en inglés) para identificar genes específicos de virulencia (Liu et al.,

2022), se logró dar con 156 genes relacionados con factores de virulencia. En relación con este número, destacamos el hecho de que el humedal El Loto (Llanquihue) y Luis Ebel (Puerto Montt) fueron quienes presentaron la mayor cantidad de genes de este tipo, sumados cubren el 69% del total. Además, las bacterias con mayor número de factores virulentos fueron *Yersinia enterocolitica subsp. Enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Brucella melitensis*. Un ejemplo resumido de los hallazgos obtenidos de VFDB (Liu et al., 2022) en este punto será presentado a continuación en la tabla 4.

**Tabla 4** Resumen de genes relacionados con factores de virulencia en los MAGs ensamblados.

Gen	Repeticiones	Humedales	Función
<i>fliG</i>	10	['Antiñir' 'Rupallán' 'Quebrada Parque' 'El Loto' 'Las Quemas' 'Luis Ebel']	flagellar motor switch protein G
<i>fliM</i>	9	['Antiñir' 'Rupallán' 'Quebrada Parque' 'El Loto' 'Las Quemas' 'Luis Ebel']	flagellar motor switch protein FliM
<i>fliA</i>	7	['Antiñir' 'Rupallán' 'El Loto' 'Las Quemas' 'Luis Ebel']	flagellar biosynthesis sigma factor
<i>fliP</i>	7	['Rupallán' 'Quebrada Parque' 'El Loto' 'Luis Ebel']	flagellar biosynthetic protein FliP
<i>flgH</i>	6	['Rupallán' 'Quebrada Parque' 'El Loto' 'Luis Ebel']	flagellar L-ring protein precursor FlgH
<i>fliC</i>	5	['Antiñir' 'Quebrada Parque' 'El Loto' 'Las Quemas' 'Luis Ebel']	flagellar biosynthesis transcription activator FliC
<i>cheY</i>	5	['Antiñir' 'Quebrada Parque' 'El Loto' 'Las Quemas' 'Luis Ebel']	chemotaxis regulatory protein CheY
<i>flgG</i>	5	['Rupallán' 'El Loto' 'Luis Ebel']	flagellar basal-body rod protein FlgG
<i>flgI</i>	5	['Rupallán' 'El Loto' 'Luis Ebel']	flagellar P-ring protein precursor FlgI
<i>fliI</i>	4	['Rupallán' 'El Loto' 'Luis Ebel']	flagellum-specific ATP synthase FliI
<i>fleQ</i>	4	['Rupallán' 'El Loto']	transcriptional regulator FleQ
<i>pilG</i>	4	['Marina' 'Rupallán' 'El Loto']	twitching motility protein PilG
<i>fleN</i>	4	['Rupallán' 'El Loto']	flagellar synthesis regulator FleN
<i>flgC</i>	4	['Rupallán' 'El Loto' 'Luis Ebel']	flagellar basal-body rod protein FlgC

<i>flhA</i>	3	['El Loto' 'Luis Ebel']	flagellar biosynthesis protein FlhA
<i>fliN</i>	3	['El Loto' 'Luis Ebel']	flagellar motor switch protein FliN
<i>pilH</i>	3	['Rupallán ' 'El Loto']	twitching motility protein PilH
<i>algI</i>	2	['El Loto']	alginate o-acetyltransferase AlgI
<i>acpXL</i>	2	['Marina']	acyl carrier protein
<i>mbtH-like</i>	2	['El Loto']	MbtH-like protein from the pyoverdine cluster
<i>algA</i>	2	['El Loto']	phosphomannose isomerase / guanosine 5'-diphospho-D-mannose pyrophosphorylase
<i>fliQ</i>	2	['El Loto' 'Luis Ebel']	flagellar biosynthetic protein FliQ
<i>algB</i>	2	['El Loto']	alginate-c5-mannuronan-epimerase AlgG
<i>motA</i>	2	['El Loto' 'Luis Ebel']	flagellar motor protein
<i>pilT</i>	2	['Marina' 'El Loto']	twitching motility protein PilT
<i>algU</i>	2	['El Loto']	alginate biosynthesis protein AlgZ/FimS
<i>pvdS</i>	2	['Rupallán ' 'El Loto']	extracytoplasmic-function sigma-70 factor

Fuente: Elaboración propia. Utilizando el software ABRicate (Seeman, 2020).

## 5.2 Caracterización taxonómica

### 5.2.1 MetaWRAP

Cabe destacar que el software de MetaWRAP nos da un acercamiento taxonómico a cada bin, gracias al método de asignación taxonómica mediante el programa CheckM (Parks et al., 2015), pero a un nivel taxonómico poco profundo, debido a la pequeña base de datos con la que el programa se instala por defecto. En cuanto a los hallazgos de este software, lo más específico que se logró identificar taxonómicamente fue a nivel de género. La clase Gammaproteobacteria fue la más abundante e identificada en el estudio, con un total de 30 reconocimientos taxonómicos, pertenecientes a orden Pseudomonales y familias como

Enterobacteriaceae, Moraxellaceae, Xanthomonadaceae, además de géneros como *Pseudomonas* y *Shewanella*. Por otra parte, y en menor cantidad, se reconocieron bacterias pertenecientes a clases como las Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Flavobacteriales y Actinomycetes, junto con familias como Micrococcaceae, Flavobacteriaceae. Los resultados de la clasificación con este software están resumidos en la Tabla 5.

**Tabla 5** Caracterización taxonómica de MAGs ensamblados utilizando el software MetaWRAP (Uritskiy et al., 2018).

Linaje	Número
Clase Gammaproteobacteria	6
Orden Pseudomonadales	2
Familia Enterobacteriaceae	13
Familia Moraxellaceae	3
Familia Xanthomonadaceae	2
Genero <i>Shewanella</i>	3
Genero <i>Pseudomonas</i>	1
Clase Alphaproteobacteria	1
Orden Burkholderiales	3
Clase Flavobacteriales Familia Flavobacteriaceae	3
Orden Rhizobiales	1
Familia Micrococcaceae	1
Reino bacteria	1

Fuente: Elaboración propia. Utilizando la herramienta bioinformática MetaWRAP (Uritskiy et al., 2018).

### 5.2.1 METAXA2

Siguiendo con el mismo paso de reconocimiento taxonómico, a continuación, y con la ayuda de METAXA2 (Bengtsson-Palme, 2015), se caracterizó un total de 15 genomas pertenecientes a la clase Gammaproteobacteria, siendo la familia Enterobacteriaceae la más presente dentro de esta clase, seguido por la familia

Pseudomonadaceae. Dentro de esta clase, se aparecieron otras familias como la Moraxellaceae, Xanthomonadaceae, Shewanellaceae y Aeromonadaceae. Al igual que la clasificación asignada por MetaWRAP, la escala taxonómica máxima identificada a través de este software fue a nivel de género. Cabe destacar que de los 40 bin, 17 fueron identificados, mientras tanto la mayoría continúan sin clasificar con esta herramienta (Figura 2). Esto puede deberse a su manera de identificación basado en su alineación con la base de datos BLAST (Alneberg et al., 1990) y calculando las identidades de secuencias intra e intertaxonómicas a cada nivel taxonómico (Bengtsson-Palme et al., 2018). Aunque también puede deberse a la ausencia de información genómica de los bins en cuestión.



**Figura 3:** Porcentaje de clasificación con software METAXA2 (Bengtsson-Palme, 2015).

### 5.2.3 Kraken2

Continuando la línea del objetivo 2, en este punto, utilizamos la herramienta bioinformática de Kraken2, que mejora a Kraken1 (Breitwieser et al., 2018) reduciendo el uso de memoria en un 85%, ideal para alcanzar una mayor cantidad de datos genómicos de referencia, manteniendo lo más importante, la precisión y la velocidad (Wood et al., 2019). Al momento de realizar las lecturas con este software, los resultados arrojaron una identificación taxonómica a nivel de género para los 40 MAGs, pero solo el 67,5% de los genomas lograron ser clasificados a nivel de especie, por lo que se mantiene un 32,5% de los genomas sin clasificación y son

los potenciales para unas especies sugerentemente sin describir. Cabe mencionar que existen diferencias en 5 genomas con relación a la taxonomía a nivel de genero reconocida por METAXA2. De estas diferencias 2 es a nivel de familia y 3 es a nivel de orden. Los resultados taxonómicos de estos 5 MAGs se encuentran en la Tabla 6.

**Tabla 6** Diferencias en la clasificación taxonómica de los MAGs entre METAXA2 y Kraken2.

METAXA2		Kraken2	
Genero	Especie	Genero	Especie
Aeromonas	unclassified	Erwinia	unclassified Erwinia
Serratia	unclassified	Rouxiella	Rouxiella badensis
Pseudomonas	unclassified	Serratia	Serratia fonticola
Serratia	unclassified	Morganella	Morganella morgani
Stenotrophomonas	unclassified	Pseudomonas	Pseudomonas mونسensis

Fuente: Elaboración propia. Utilizando los softwares METAXA2 (Bengtsson-Palme, 2015) y Kraken2 (Wood et al., 2019).

#### 5.2.4 GTDB-Tk

Por último, en búsqueda de una tercera comparativa respecto a clasificación taxonómica de los genomas ensamblados desde metagenomas utilizamos el Kit de Herramientas de Taxonomía de la Base de Datos del Genoma (GTDB-Tk), por sus siglas en inglés. La ventaja de utilizar este conjunto de herramientas es que nos proporciona una caracterización taxonómica en base a 120 marcadores taxonómicos al colocarlos en árboles de referencia de proteínas concatenados y específicos (Chaumeil et al., 2020, 2022). Este kit llama genes utilizando Prodigal (algoritmo de predicción genética) (Hyatt et al., 2010), e identifica un total de 120 genes marcadores bacterianos y 122 arqueales gracias a HMMR (método de inferencia probabilística) (Eddy, 2011) por lo que brinda una mayor cantidad de probabilidades de asignar correctamente la clasificación taxonómica. A pesar de contar con una base de datos perteneciente a la Taxonomía de la Base de Datos Genómica (GTDB) (Parks et al., 2022), hubo un 42,5% (17) de los MAGs que no se logró reconocer con esta herramienta de software. Además de esto, hubo un 7,5%

(3) de genomas que identificó, los cuales no pudo identificar Kraken2. Por último, hubo un 22,5% (9) de genomas con una clasificación diferente en comparación con el software de Kraken2, pero, al igual que este, presenta gran variedad de especies sin clasificar. Aunque de los 17 MAGs reconocidos por GTDB.Tk, hay 3 genomas que si se lograron clasificar con Kraken2. Sin embargo, hay un número importante de especies sin clasificar que siguen siendo candidatos óptimos y potenciales para especies nuevas, lo cual no se puede descartar. Los resultados finales y comparativos entre los 4 software de clasificación taxonómica utilizados en este estudio, se describen a continuación en la tabla 7.

**Tabla 7** Resumen final de la clasificación taxonómica de los MAGs ensamblados con las diferentes herramientas bioinformáticas utilizadas para este proceso. Centrándonos en las clasificaciones más profundas a nivel de género y especie.

		MetaWRAP	METAXA2	Kraken2		GTDB-TK	
Humedal	Bin	Genero	Genero	Genero	Especie	Genero	Especie
Baquadano	bin.12	unclassified	unclassified	<i>Rouxiella</i>	<i>Rouxiella badensis</i>	<i>Rouxiella</i>	<i>Rouxiella silvae</i>
Mirasol	bin.2	unclassified	unclassified	<i>Acinetobacter</i>	unclassified <i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter bohemicus</i>
Teodosio Sarao	bin.6	unclassified	unclassified	<i>Acinetobacter</i>	unclassified <i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter albensis</i>
Teodosio Sarao	bin.22	unclassified	<i>Aeromonas</i>	<i>Erwinia</i>	unclassified <i>Erwinia</i>	<i>Erwinia</i>	unclassified <i>Erwinia</i>
Las Ranas	bin.4	unclassified	unclassified	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter pseudolwoffii</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter lwofii_B</i>
Las Ranas	bin.2	<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella baltica</i>	<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella baltica</i>
Las Ranas	bin.3	<i>Shewanella</i>	unclassified	<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella baltica</i>	<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella morhuae</i>
Antiñir	bin.7	unclassified	unclassified	<i>Serratia</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Serratia</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
Antiñir	bin.6	unclassified	unclassified	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas piscicola</i>
Antiñir	bin.1	unclassified	<i>Serratia</i>	<i>Rouxiella</i>	unclassified <i>Rouxiella</i>	<i>Rouxiella</i>	unclassified <i>Rouxiella</i>
Antiñir	bin.5	unclassified	<i>Duganella</i>	<i>Duganella</i>	<i>Duganella dendranthematis</i>	<i>Duganella</i>	unclassified <i>Duganella</i>
Marina	bin.11	unclassified	unclassified	<i>Pseudochrobactrum</i>	unclassified <i>Pseudochrobactrum</i>	<i>Pseudochrobactrum</i>	unclassified <i>Pseudochrobactrum</i>
Marina	bin.3	unclassified	unclassified	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas indicatrix</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas indicatrix</i>
Marina	bin.12	unclassified	<i>Morganella</i>	<i>Morganella</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Morganella</i>	<i>Morganella psychrotolerans_A</i>
Rupallán	bin.14	unclassified	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium</i>	unclassified <i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium hibernum</i>
Rupallán	bin.7	unclassified	<i>Pseudomonas</i>	<i>Serratia</i>	unclassified <i>Serratia</i>	<i>Serratia</i>	unclassified <i>Serratia</i>
Rupallán	bin.10	<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella</i>	unclassified <i>Shewanella</i>	<i>Shewanella</i>	unclassified <i>Shewanella</i>
Rupallán	bin.4	unclassified	unclassified	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>
Rupallán	bin.8	unclassified	unclassified	<i>Rouxiella</i>	<i>Rouxiella badensis</i>	<i>Rouxiella</i>	unclassified <i>Rouxiella</i>
Quebrada Parque	bin.6	unclassified	<i>Serratia</i>	<i>Morganella</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Morganella</i>	<i>Morganella psychrotolerans_B</i>
Quebrada Parque	bin.16	unclassified	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	unclassified <i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter rudis</i>
Quebrada Parque	bin.13	unclassified	<i>Providencia</i>	<i>Providencia</i>	<i>Providencia heimbachae</i>	<i>Providencia</i>	unclassified <i>Providencia</i>
Quebrada Parque	bin.8	unclassified	unclassified	<i>Myroides</i>	unclassified <i>Myroides</i>	<i>Myroides</i>	unclassified <i>Myroides</i>
Quebrada Parque	bin.2	unclassified	unclassified	<i>Erwinia</i>	<i>Erwinia rhapontici</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Erwinia persicina</i>
Quebrada Parque	bin.11	unclassified	unclassified	<i>Serratia</i>	<i>Serratia proteamaculans</i>	<i>Serratia</i>	<i>Serratia proteamaculans</i>
La Ovejería	bin.17	unclassified	unclassified	<i>Flavobacterium</i>	unclassified <i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium</i>	unclassified <i>Flavobacterium</i>
La Ovejería	bin.14	unclassified	unclassified	<i>Bradyrhizobium</i>	unclassified <i>Bradyrhizobium</i>	unclassified	unclassified

La Ovejera	bin.15	unclassified	unclassified	Rhodoferax	unclassified Rhodoferax	Rhodoferax	unclassified Rhodoferax
Luis Ebel	bin.4	unclassified	Hafnia-Obesumbacterium	Hafnia	Hafnia alvei	Hafnia	Hafnia alvei
El Loto	bin.2	unclassified	unclassified	Ignatzchineria	Ignatzschineria rhizosphaerae	Ignatzchineria	unclassified Ignatzchineria
El Loto	bin.1	unclassified	unclassified	Stenotrophomonas	unclassified Stenotrophomonas	Stenotrophomonas	unclassified Stenotrophomonas
El Loto	bin.7	unclassified	unclassified	Serratia	Serratia plymuthica	Serratia	Serratia plymuthica
El Loto	bin.4	unclassified	Pseudomonas	Pseudomonas	unclassified Pseudomonas	Pseudomonas	unclassified Pseudomonas
El Loto	bin.6	Pseudomonas	Stenotrophomonas	Pseudomonas	unclassified Pseudomonas	Pseudomonas	unclassified Pseudomonas
Las Quemadas	bin.1	unclassified	unclassified	Rahnella	Rahnella aceris	Rahnella	Rahnella aquatilis
Las Quemadas	bin.7	unclassified	unclassified	Flavobacterium	unclassified Flavobacterium	Fluviicola	unclassified Fluviicola
Las Quemadas	bin.6	unclassified	unclassified	Serratia	Serratia proteamaculans	Serratia	Serratia proteamaculans
Teodosio Sarao	bin.17	unclassified	unclassified	Glutamicibacter	unclassified Glutamicibacter	Glutamicibacter	unclassified Glutamicibacter
Luis Ebel	bin.7	unclassified	unclassified	Yersinia	Yersinia enterocolitica	Yersinia	Yersinia enterocolitica
Luis Ebel	bin.2	unclassified	unclassified	Janthinobacterium	unclassified Janthinobacterium	Janthinobacterium	unclassified Janthinobacterium

Fuente: Elaboración propia. Utilizando los softwares de MetaWRAP (Uritskiy et al, 2018), METAXA2 (Bengtsson-Palme, 2015), Kraken2 (Wood et al., 2019) y GTDB-Tk (Chaumeil et al., 2022).

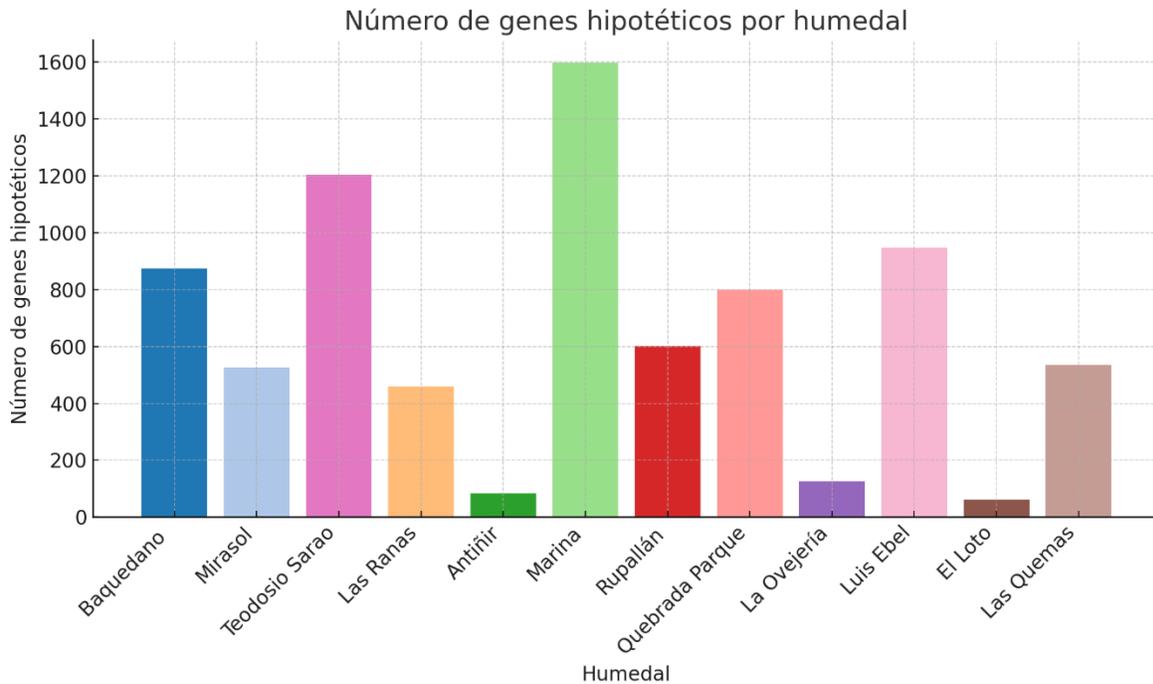
### 5.3 Caracterización de elementos genéticos móviles

Lo primero realizado en este punto fue una anotación genómica utilizando PROKKA (Seeman, 2014), no olvidar que la anotación de genes es el proceso de identificación y etiqueta de los elementos genéticos relevantes en una secuencia (Richardson y Watson, 2013). Gracias a este método, se logró reconocer elementos genómicos importantes y funcionales para las bacterias, además de elementos con potenciales virulentos y de patogenicidad, los principales resultados de este proceso se presentan en la tabla 8. Por supuesto además de estos genes caracterizados, se logró dar con una variable cantidad de elementos genómicos no identificados por humedal, en donde la media es de 659 genes hipotéticos. El único humedal que no presentó anotaciones de ningún tipo fue La Paloma (Puerto Montt). Estos resultados son presentados en la figura 4.

**Tabla 8** Resumen de genes virulentos más importantes con relevancia para la Medicina Veterinaria, obtenidos de anotaciones hechas a muestras tomadas de humedales urbanos de la Región de Los Lagos. Estos genes representan una alarma biológica debido a su capacidad para generar adaptaciones en las bacterias.

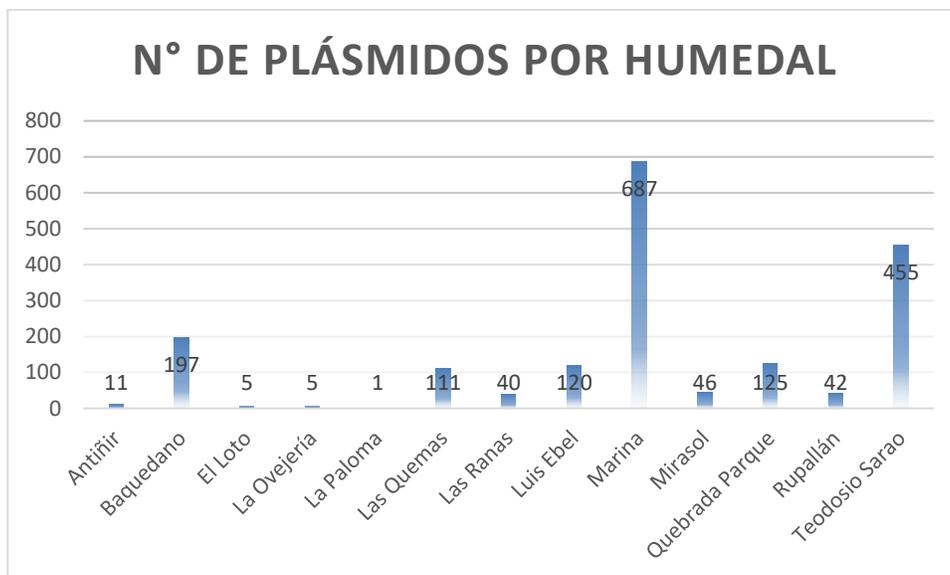
Humedal	Gen	Función resumida
Baquadano	<i>hipA</i>	Induce persistencia al inhibir traducción
Mirasol	<i>hipA</i>	Induce persistencia al inhibir traducción
Teodosio Sarao	<i>ccdB</i>	Daña ADN al inhibir la ADN girasa
Las Ranas	<i>rtx-I</i>	Transporta toxinas hemolíticas fuera de la célula
Antiñir	<i>TcpE</i>	Favorece adhesión bacteriana en intestino
Marina	<i>hipA</i>	Induce persistencia al inhibir traducción
Rupallán	<i>relE</i>	Corta ARNm en ribosomas, detiene traducción
Quebrada Parque	<i>ccdB</i>	Daña ADN al inhibir la ADN girasa
La Ovejería	<i>relE3</i>	Induce latencia al degradar ARNm
Luis Ebel	<i>ccdB</i>	Daña ADN al inhibir la ADN girasa
La Paloma	-	Sin genes de virulencia identificados
El Loto	<i>virB11</i>	Transporta efectores hacia células huésped
Las Quemadas	<i>vgrG1</i>	Destruye actina en células humanas
Teodosio Sarao	<i>hipA</i>	Induce persistencia al inhibir traducción
Luis Ebel	<i>hipA</i>	Induce persistencia al inhibir transducción

Fuente: Elaboración propia. Utilizando la herramienta bioinformática PROKKA (Seeman, 2014).



**Figura 4** Número de genes hipotéticos anotados por PROKKA (Seeman, 2014), en humedales urbanos de la Región de Los Lagos.

A continuación, al momento de utilizar plaSquid (Giménez et al., 2022), se realizó con las secuencias metagenómicas iniciales, debido a que este software es capaz de identificar plásmidos y categorizarlos taxonómicamente según su base de datos, todo gracias a su archivo de salida multifasta. En este punto pudimos detectar un promedio de 123 plásmidos por humedal y los resultados aparecen resumidos en la Figura 5. Además, el humedal del cual se pudieron obtener más plásmidos fue el humedal Marina de la ciudad de Puerto Varas, seguido por Teodosio Sarao y Baquedano de Llanquihue, estos muestran la variabilidad en el número de plásmidos y su tendencia a aumentar en ciudades aledañas al Lago Llanquihue, sugerente de que en estas ciudades hay mayor intercambio genómico Inter especie.



**Figura 5** Número de plásmidos obtenidos por humedal.

#### **5.4 Análisis taxonómico de plásmidos**

Junto con lo anterior, se realizó un análisis taxonómico utilizando la misma herramienta bioinformática plaSquid para determinar las principales especies infectocontagiosas encontradas en las muestras y a qué humedales corresponden. El resumen se encuentra en la tabla 9. Sin embargo, la presencia de estos plásmidos no significa necesariamente que estas bacterias estén presentes, significa que estos plásmidos se han aislado de estas bacterias anteriormente y están asociados a estas en la base de datos.

**Tabla 9** Resumen de bacterias infectocontagiosas presentes según plásmidos encontrados en humedales urbanos de la Región de Los Lagos. La inclusión de estas bacterias se realizó en base a su capacidad para generar enfermedades tanto en animales, cómo personas.

Bacteria	Humedales
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Baquedano, Las Ranas, Mirasol, Teodosio Sarao
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Mirasol
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	El Loto, Mirasol, Teodosio Sarao
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	Baquedano
<i>Aeromonas caviae</i>	Antiñir, El Loto, Las Ranas, Luis Ebel, Marina, Mirasol, Rupallán, Teodosio Sarao
<i>Escherichia coli</i>	Baquedano, Luis Ebel
<i>Klebsiella michiganensis</i>	Luis Ebel, Mirasol, Rupallán, Teodosio Sarao
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Luis Ebel
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Baquedano, El Loto, Marina, Mirasol, Teodosio Sarao
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Luis Ebel
<i>Pseudomonas fragi</i>	Baquedano
<i>Pseudomonas koreensis</i>	Baquedano, Luis Ebel
<i>Serratia liquefaciens</i>	Antiñir, El Loto, Las Ranas, Marina, Mirasol, Quebrada Parque, Rupallán, Teodosio Sarao
<i>Vibrio furnissii</i>	Baquedano
<i>Yersinia frederiksenii</i>	Luis Ebel

Fuente: Elaboración propia. Utilizando los resultados entregados por el software plaSquid (Giménez et al., 2022).

Aparentemente los elementos genéticos móviles (MGEs) que se recuperaron de secuencias metagenómicas ensambladas de más de 2000 pb, pudieron, todos y cada uno, ser identificados quedando clasificados taxonómicas y funcionalmente.

### 5.5 Elementos genéticos de resistencia y virulencia

La última parte del estudio correspondió a buscar genes de resistencia antimicrobiana y virulencia en humedales urbanos de la Región de los Lagos estudiados. A partir de los plásmidos identificados y caracterizados con plaSquid, pudimos ejecutar ABRicate con el respaldo de que los plásmidos ya estaban asignados a una taxonomía a nivel de especie.

Utilizando la base datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) (Feldgarden et al., 2019), La Base de Datos Completa

de Resistencia Antibiótica (CARD por sus siglas en inglés) (Alcock et al., 2023) y ResFinder (pertenece al Centro de Epidemiología Genómica) (Florensa et al., 2022) pudimos identificar genes específicos de resistencia antimicrobiana (RAM). Y utilizamos la Base de Datos de Factores de Virulencia (VFDB por sus siglas en inglés) para identificar genes específicos de virulencia (Liu et al., 2022).

Los resultados de estas secuencias demostraron la presencia de una variada cantidad de genes con RAM para distintas familias de antibióticos tales como  $\beta$ -lactámicos, tetraciclinas, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, derivados del fenol, rifamicinas. El humedal Marina es donde se encontraron más plásmidos relacionados con presencia de genes de resistencia antibiótica (RAM). A su vez, la mayoría de las muestras no arrojaron resultados. Los resultados de ABRicate (Seeman, 2020) para genes de resistencia antimicrobiana se encuentran en la tabla 10.

**Tabla 10** Resultados de ABRicate para genes de resistencia antimicrobiana en plásmidos aislados en humedales urbanos de la Región de Los Lagos.

Humedal	Gen	Base de datos	Resistencia
Baquadano	<i>blaRAHN-2</i>	ncbi	cephalosporin
Baquadano	<i>blaRAHN-2_2</i>	resfinder	
Mirasol	<i>MexF</i>	card	diaminopyrimidine;fluoroquinolone;phenicol
Marina	<i>emrY</i>	card	tetracycline
Marina	<i>crp</i>	card	fluoroquinolone;macrolide;penam
Marina	<i>mdtG</i>	card	fosfomycin
Marina	<i>mdtM</i>	card	acridine_dye;fluoroquinolone;lincosamide;nucleoside;phenicol
Marina	<i>MexF</i>	card	diaminopyrimidine;fluoroquinolone;phenicol
Marina	<i>pmrF</i>	card	peptide
Marina	<i>msbA</i>	card	nitroimidazole
Marina	<i>Escherichia_coli_ampH</i>	card	cephalosporin;penam
Marina	<i>Escherichia_coli_ampC</i>	card	cephalosporin;penam
Marina	<i>ugd</i>	card	peptide
Marina	<i>kdpE</i>	card	aminoglycoside
Marina	<i>acrB</i>	card	cephalosporin;fluoroquinolone;glycylcycline;penam;phenicol;rifamycin;tetracycline;triclosan

Marina	<i>Escherichia_coli_acrA</i>	card	cephalosporin;fluoroquinolone;glycylcycline;pen am;phenicol;rifamycin;tetracycline;triclosan
Marina	<i>mdtN</i>	card	acridine_dye;nucleoside
Marina	<i>eptA</i>	card	peptide
Marina	<i>blaRAHN-2</i>	ncbi	cephalosporin
Marina	<i>blaEC-18</i>	ncbi	cephalosporin
Marina	<i>blaRAHN-2_2</i>	resfinder	
Rupallán	<i>MCR-4.3</i>	card	peptide
Rupallán	<i>mcr-4.3</i>	ncbi	Colistin
Rupallán	<i>mcr-4.3_1</i>	resfinder	Colistin
El Loto	<i>tet(H)</i>	card	tetracycline
El Loto	<i>tet(H)</i>	ncbi	tetracycline
El Loto	<i>tet(H)_3</i>	resfinder	Doxycycline;Tetracycline
Las Quemadas	<i>blaRAHN-2</i>	ncbi	cephalosporin
Las Quemadas	<i>blaRAHN-2_2</i>	resfinder	
Teodosio Sarao	<i>blaRAHN-2</i>	ncbi	cephalosporin
Teodosio Sarao	<i>blaRAHN-2_2</i>	resfinder	

Fuente: Elaboración propia. Utilizando el software de ABRicate (Seeman, 2020).

Además, con la utilización de la base de datos VFDB, se logró reconocer 72 genes relacionados con factores de virulencia en plásmidos. Los resultados se presentan a continuación en la tabla 11. Como se observa en la tabla existe la presencia de bacterias patógenas y de alerta sanitaria. Tales como *Salmonella entérica*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolítica* y *Shigella dysenteriae*, las cuales son agentes que son objeto de vigilancia de laboratorios.

**Tabla 11** Genes relacionados con factores de virulencia encontrados gracias a VFDB en plásmidos obtenidos de humedales urbanos de la Región de Los Lagos

Gen	Humedales	Función
<i>astA</i>	Luis Ebel	heat-stable enterotoxin 1 [ <i>Escherichia coli</i> O44:H18 042]
<i>cheA</i>	Luis Ebel	chemotaxis protein CheA [ <i>Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica</i> ]
<i>cheB</i>	Luis Ebel	chemotaxis-specific methyl-esterase CheB [ <i>Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica</i> ]
<i>cheD</i>	Luis Ebel	methyl-accepting chemotaxis protein CheD [ <i>Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica</i> ]
<i>cheR</i>	Luis Ebel	chemotaxis methyltransferase CheR [ <i>Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica</i> ]
<i>cheW</i>	Luis Ebel	purine-binding chemotaxis protein CheW [ <i>Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica</i> ]

<i>cheY</i>	Luis Ebel	chemotaxis regulatory protein CheY [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>cheZ</i>	Luis Ebel	chemotaxis regulator CheZ [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>Enterocolitica</i> ]
<i>csgG</i>	Marina	curli production assembly/transport protein CsgG [ <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> ]
<i>entA</i>	Marina	23-dihydro-23-dihydroxybenzoate dehydrogenase [ <i>Escherichia coli</i> ]
<i>entB</i>	Marina	isochorismatase [ <i>Escherichia coli</i> ]
<i>entE</i>	Marina	23-dihydroxybenzoate-AMP ligase component of enterobactin synthase multienzyme complex [ <i>Escherichia coli</i> ]
<i>fimB</i>	Marina	Type 1 fimbriae Regulatory protein fimB [ <i>Escherichia coli</i> ]
<i>fimD</i>	Marina	Outer membrane usher protein fimD precursor [ <i>Escherichia coli</i> ]
<i>fimE</i>	Marina	Type 1 fimbriae Regulatory protein fimE [ <i>Escherichia coli</i> ]
<i>fimF</i>	Quebrada Parque	FimF protein precursor [ <i>Escherichia coli</i> ]
<i>fimG</i>	Quebrada Parque	FimG protein precursor [ <i>Escherichia coli</i> ]
<i>fimH</i>	Quebrada Parque	FimH protein precursor [ <i>Escherichia coli</i> ]
<i>flgA</i>	Luis Ebel	flagellar basal body P-ring biosynthesis protein FlgA [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>flgB</i>	Luis Ebel	flagellar basal-body rod protein FlgB [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>flgC</i>	Luis Ebel	flagellar basal-body rod protein FlgC [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>flgD</i>	Luis Ebel	flagellar basal-body rod modification protein FlgD [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>flgE</i>	Luis Ebel	flagellar hook protein FlgE [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>flgF</i>	Luis Ebel	flagellar basal-body rod protein FlgF [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>flgG</i>	Luis Ebel	flagellar basal-body rod protein FlgG [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>flgH</i>	Luis Ebel	flagellar L-ring protein precursor FlgH [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>flgI</i>	Luis Ebel	flagellar P-ring protein precursor FlgI [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>flgJ</i>	Luis Ebel	flagellar rod assembly protein/muramidase FlgJ [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>flgK</i>	Luis Ebel	flagellar hook-associated protein 1 FlgK [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>flgL</i>	Luis Ebel	flagellar hook-associated protein 3 FlgL [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>flgM</i>	Luis Ebel	negative regulator of flagellin synthesis [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>flgN</i>	Luis Ebel	flagella synthesis protein FlgN [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>flhA</i>	Luis Ebel	flagellar biosynthesis protein FlhA [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>flhB</i>	Luis Ebel	flagellar biosynthetic protein FlhB [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>flhC</i>	Luis Ebel	flagellar biosynthesis transcription activator FlhC [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>flhD</i>	Luis Ebel	flagellar transcriptional activator FlhD [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>flhE</i>	Luis Ebel	flagellar biosynthesis protein FlhE [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>fliD</i>	Luis Ebel	flagellar capping protein FliD [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>fliE</i>	Luis Ebel	flagellar hook-basal body complex protein FliE [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>fliF</i>	Luis Ebel	flagellar M-ring protein FliF [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>fliG</i>	Luis Ebel	flagellar motor switch protein G [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]

<i>fliH</i>	Luis Ebel	flagellar assembly protein H [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>fliI</i>	Luis Ebel	flagellum-specific ATP synthase FliI [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>fliJ</i>	Luis Ebel	flagellar protein FliJ [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>fliK</i>	Luis Ebel	flagellar hook-length control protein FliK [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>fliL</i>	Luis Ebel	flagellar basal body protein FliL [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>fliM</i>	Luis Ebel	flagellar motor switch protein FliM [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>fliN</i>	Luis Ebel	flagellar motor switch protein FliN [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>fliO</i>	Luis Ebel	flagellar protein FliO [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>fliP</i>	Luis Ebel	flagellar biosynthetic protein FliP [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>fliQ</i>	Luis Ebel	flagellar biosynthetic protein FliQ [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>fliR</i>	Luis Ebel	flagellar biosynthetic protein FliR [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>fliS</i>	Luis Ebel	flagellar protein FliS [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>fliT</i>	Luis Ebel	flagellar protein FliT [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>gspC</i>	Marina	general secretion pathway protein C [ <i>Shigella dysenteriae</i> ]
<i>gspD</i>	Marina	general secretion pathway protein D [ <i>Shigella dysenteriae</i> ]
<i>gspF</i>	Marina	general secretion pathway protein F [ <i>Shigella dysenteriae</i> ]
<i>gspG</i>	Marina	general secretion pathway protein G [ <i>Shigella dysenteriae</i> ]
<i>gspH</i>	Marina	general secretion pathway protein H [ <i>Shigella dysenteriae</i> ]
<i>gspI</i>	Marina	general secretion pathway protein I [ <i>Shigella dysenteriae</i> ]
<i>gspJ</i>	Marina	general secretion pathway protein J [ <i>Shigella dysenteriae</i> ]
<i>gspK</i>	Marina	general secretion pathway protein K [ <i>Shigella dysenteriae</i> ]
<i>inv</i>	Luis Ebel	invasin [ <i>Yersinia enterocolitica</i> ]
<i>motA</i>	Luis Ebel	flagellar motor protein MotA [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>motB</i>	Luis Ebel	flagellar motor protein MotB [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> ]
<i>ospG</i>	Marina	type III secretion system effector kinase OspG [ <i>Shigella flexneri</i> 2a]
<i>yagV/ec</i> <i>pE</i>	Marina	<i>E. coli</i> common pilus chaperone EcpE [ <i>Escherichia coli</i> O157:H7]
<i>yagW/ec</i> <i>cpD</i>	Marina	polymerized tip adhesin of ECP fibers [ <i>Escherichia coli</i> O157:H7]
<i>yagX/ec</i> <i>pC</i>	Marina	<i>E. coli</i> common pilus usher EcpC [ <i>Escherichia coli</i> O157:H7]
<i>yagY/ec</i> <i>pB</i>	Marina	<i>E. coli</i> common pilus chaperone EcpB [ <i>Escherichia coli</i> O157:H7]
<i>yagZ/ec</i> <i>pA</i>	Marina	<i>E. coli</i> common pilus structural subunit EcpA [ <i>Escherichia coli</i> O157:H7]
<i>ykgK/ec</i> <i>pR</i>	Marina	regulator protein EcpR [ <i>Escherichia coli</i> O157:H7]

Fuente: elaboración propia. Utilizando el software de ABRicate (Seeman, 2020).

## 6. Discusión

El crecimiento exponencial de las ciudades, impulsado por el crecimiento demográfico, además de la deforestación y urbanización de zonas pertenecientes a hábitats silvestres, ha disminuido las fronteras que existían entre animales y humanos (Rodríguez et al., 2023). Dichas actividades antropogénicas, además de destruir hábitats naturales y contribuir a la pérdida de biodiversidad, han generado una relación estrecha entre los seres humanos y la fauna, lo que facilita el intercambio de patógenos y a su vez incrementa la contaminación por residuos de todo tipo (OMS 2020).

En primera instancia, un hallazgo particularmente interesante es la presencia de especies particularmente importantes en la Medicina Veterinaria. Uno de los patógenos cobra relevancia es *Aeromonas salmonicida*, un bacilo gramnegativo inmóvil causante de la enfermedad denominada Furunculosis (Kaattari & Piganelli, 1996), que afecta tanto a salmónidos en todas las etapas de cultivo, como a especies nativas. Su nombre deriva de las lesiones licuefactivas musculares que genera en etapas crónicas de la enfermedad, que rara vez se llega a presentar en etapas agudas, donde generalmente se desarrolla una rápida septicemia. En la Región de los Lagos donde la salmonicultura es una fuente de trabajo importante y una de las actividades económicas más reconocidas a nivel regional, por lo que la presencia de este agente en aguas continentales nos sugiere una contaminación ambiental por parte de los procesos del cultivo del salmón.

En segunda instancia, la presencia de *Yersinia enterocolitica* una bacteria gramnegativa zoonótica de la familia *Enterobacteriaceae* (OMSA, 2022), la cual es residente natural de tractos intestinal en múltiples especies animales, pero su reservorio principal el cerdo. La yersiniosis causa sintomatología diarreica en humanos, pero también se ha descrito asociada a patología entérica en chinchillas, rumiantes y équidos, causando sintomatología similar (dolor abdominal, diarrea, pérdida de peso, etc). Su principal importancia radica en la zoonosis, donde la principal fuente de transmisión es la contaminación de alimentos con la bacteria, en el caso de los humanos, los principales lugares donde se ha aislado es la carne de cerdo y la leche de vaca (Sotohy et al., 2024).

Otro hallazgo importante fue la elevada proporción de MAGs que no pudieron ser

clasificados taxonómicamente a nivel de especie. El hecho de utilizar múltiples herramientas y softwares bioinformáticos diferentes al momento de la identificación taxonómica, nos permite realizar un análisis comparativo al momento de la entrega de resultados de cada programa. Ya sea con MetaWRAP a través de CheckM y su método para evaluar la calidad del ensamblado utilizando marcadores colocados específicos de linaje determinados gracias a un genoma de referencia de un árbol genómico (Parks et al., 2015), utilizando bases de datos genómicas pertenecientes al sistema Integrated Microbial Genomes (IMG) (Markowitz et al., 2014). O por METAXA2 con la utilización de los marcadores del gen ARNr subunidad pequeña (SSU; 16S/18S), y también el ARNr de la subunidad grande (LSU; 23S/28S) para seleccionarlos una clasificación mediante Búsqueda Básica de Alineación Local (BLAST, por sus siglas en inglés). Incluso Kraken2 mediante su clasificación taxonómica en base a *k*-meros y su consulta a taxones de la base de datos RefSeq del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Y, por último, GTDBT-k y su selección de más de 100 proteínas marcadoras genómicas para compararlos con el sistema la base de datos de genoma bacteriano más grande y completa actualmente, la Base de Datos de Taxonomía del Genoma (GTDB). Conforme con la utilización de esta última base de datos, cabe destacar que es un software que está en constante actualización, incluyen borradores de genomas de microorganismos no cultivados, obtenidos de células individuales y metagenómica, lo que garantiza una mejor visión genómica del mundo microbiano, actualmente cuentan con más de 700.000 genomas, y cerca de 140.000 especies identificadas, por lo que se podría decir que, cualquier genoma exento de esta base de datos es un potencial candidato a nueva especie, eesta situación, observada en un 32,5% a 42,5% de los MAGs según el software utilizado, sugiere la presencia de genomas pertenecientes a especies no descritas previamente.

Esto es coherente con lo planteado por Setubal (2021), quien define a estos genomas como HMAGs (High quality Metagenome Assembled Genomes) no clasificables, debido a la ausencia de homología con genomas de referencia. La relevancia de estos HMAGs radica en que pueden contener información genética única, incluyendo genes de resistencia o virulencia impensables, que podrían representar una amenaza emergente para la salud animal y humana.

Debido a que las muestras de agua fueron obtenidas de humedales, los cuales son ambientes propicios para la evolución y diseminación de estos genomas novedosos, estos resultados no solo evidencian un vacío en los árboles taxonómicos de genomas bacterianos, sino que también destacan la necesidad de fortalecer las bases de datos genómicas con información proveniente de ambientes sub-estudiados como los humedales.

Los hallazgos anteriores confirman la hipótesis planteada, al demostrar que los humedales urbanos con impacto antropogénico actúan como reservorios de material genético, especies potencialmente patógenas, y clínicamente relevantes para la medicina veterinaria. Coincidente con hallazgos similares en estudios recientes (Di Cesare et al., 2023; La Rosa et al., 2025) donde se comprueba el rol que cumplen estos ecosistemas en la adquisición de genes de resistencia. Sin embargo, se sugieren estudios con tecnologías de secuenciación más modernas y actualizadas, que permitan obtener secuencias de mayor número de pares de bases (mayor tamaño) y nos permita obtener información más completa con relación a cada genoma y sus respectivas secuencias. De esta forma, podemos complementar espacios vacíos en las secuencias y a su vez dejar un menor margen de error dentro del estudio.

La abundancia de genes relacionados con resistencia a betalactámicos, como los identificados en múltiples humedales (por ejemplo., *blaOXA*, *blaFOX*, *cphA*), coincide con estudios recientes en ambientes bajo influencia antropogénica, donde el uso intensivo de antibióticos en medicina, la agricultura cercana a vertientes de agua, pisciculturas cercanas a sitios de agua y en algunos casos la expresión repentina de estos genes promueve la aparición de cepas resistentes (Zhuang et al., 2021). Estudios anteriores evidenciaron patrones similares a alta tendencia de genes de resistencia a betalactámicos en ambientes acuáticos urbanos de la Región de Los Lagos (Campanini et al., 2024). Además, los residuos que son liberados al ambiente por la ganadería o la piscicultura son cada vez mayores (Kim et al., 2023), por lo que su presencia en ambiente acuáticos ambientales son el factor número uno indicativo de diseminación aguas residuales en contacto con efluentes naturales (Sivalingam et al., 2024)

Uno de los hallazgos particulares de este punto fue la detección del gen *mcr* (Mobile

Colistin Resistance), asociado a resistencia a Colistina, en el humedal Rupallán. La Colistina es uno de los antibióticos de última línea, empleados en casos de infecciones multirresistentes, por lo que su detección en ambientes urbanos es un riesgo sanitario. El gen *mcr* se encuentra principalmente en plásmidos, por lo que su diseminación fácilmente genera resistencia en otras bacterias (OMS, 2016). Actualmente en Chile no hay estudios recientes referentes a la prevalencia de este gen, sin embargo, Martino et al. (2024) informan que existen tasas notables en Argentina (4,2% en aislamientos de *E. coli*). Geográficamente, el gen abarca seis continentes, con una alta incidencia de casos en Asia y Europa. La prevalencia multifacética de China, desde la clínica (7,5 % en pacientes hospitalizados) (Zhong et al., 2018) hasta la ambiental (100 % en muestras de ríos) (Yang et al., 2017), refleja su papel como foco de infección. Por el contrario, regiones como EE. UU. y Suiza reportan una detección mínima, ausencia variable o una gestión ineficaz en toma de muestras (Mavrici et al., 2017; Zurfluh et al., 2017). Este hallazgo refuerza la relevancia clínica y plantea serias implicancias para la salud pública y animal bajo el enfoque de Una Salud.

El análisis de factores de virulencia arrojó un total de 156 genes, siendo los humedales de El Loto y Luis Ebel los que tuvieron una mayor concentración de estos genes. La presencia de genes como *hipA*, *ccdB* y *relE*, vinculados a la inducción de estados persistentes y daño al ADN, sugiere la existencia de mecanismos adaptativos que favorecen la supervivencia bacteriana en ambientes estresantes. Este sistema, conocido como toxina-antitoxina, se ha estudiado por su rol en la tolerancia a antibióticos y persistencia intracelular, lo cual complica las infecciones crónicas (Page & Peti, 2016). Además, la detección de genes relacionados con movilidad bacteriana y adhesión, como *fliG*, *cheY* y *TcpE*, los cuales incrementan la capacidad de colonización de los microorganismos, y también potencian su virulencia en hospedadores, incluyendo especies de interés veterinario. La alta carga de estos genes en ambientes urbanos confirma que los humedales pueden actuar como reservorios activos de microorganismos con potencial zoonótico.

En cuanto a elementos genéticos móviles (MGE), la identificación de más de 120 plásmidos por humedal, en promedio, revela una carga genética móvil muy alta presente en estos ecosistemas. La abundancia es preocupante considerando que muchos de estos plásmidos portan genes asociados a resistencia antimicrobiana y

virulencia, lo que los posiciona como vectores clave en la transferencia horizontal de genes entre especies bacterianas. El uso de PROKKA permitió también reconocer mecanismos completos, por ejemplo, módulos de resistencia más genes reguladores adyacentes que aumentan la probabilidad de expresión funcional de estos genes en hospedadores. Este es un hallazgo clave porque, aunque no se confirma totalmente la función fenotípica, en un contexto genético, se indica la posibilidad verídica de transferencia y activación en cepas bacterianas receptoras de estos genes, tanto en microorganismos ambientales como patógenos.

Al utilizar la herramienta plaSquid se logró no solo detectar estos elementos (plásmidos), sino también asociarlos con bacterias patógenas relevantes como *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Aeromonas caviae*. Todas ellas tienen un historial clínico de infecciones en animales y humanos, lo cual eleva la preocupación sobre el potencial zoonótico de los elementos genéticos encontrados. Cabe mencionar que la presencia de estos plásmidos en el ambiente no confirma la existencia activa de este tipo de bacteria, pero sí evidencia que los genes relacionados con ellas circulan en la comunidad microbiana de estos ambientes. Sin embargo, no se puede descartar la presencia de elementos genéticos móviles con potencial para ser candidatos a genes no descritos, debido principalmente a que el software utilizado solamente puede reconocer los elementos presentes en su base de datos (plásmidos).

Aunque los plásmidos tienden a ser los MGEs más fáciles de traspasarse entre microorganismos, ya mencionamos antes que no son los únicos, por lo cual la falta de software específicos limita el estudio de otros elementos genéticos móviles relacionados con la transferencia horizontal de genes.

Estudios recientes han demostrado que los plásmidos pueden persistir en el ambiente por largos periodos de tiempo, dependiendo de condicionantes ambientales, favoreciendo el intercambio genético entre cepas ambientales y patógenas (Rozwandowicz et al., 2018). Esto refuerza aún más la necesidad de monitorear estos elementos mediante estudios específicos como parte integral de la vigilancia epidemiológica en medio ambientes naturales, especialmente en ecosistemas urbanos como los humedales representados en este estudio.

La aplicación de la herramienta ABRicate en las secuencias plasmídicas permitió

identificar una amplia gama de genes asociados a resistencia antimicrobiana y factores de virulencia. Se logró determinar que los plásmidos recuperados desde los humedales urbanos portaban genes relevantes desde el punto de vista clínico y veterinario, tales como *blaOXA-296*, *blaJOHN-1*, *mcr-4.3*, *tet(H)*, *oqxB*, entre otros. Estos genes confieren resistencia a grupos antimicrobianos críticos, como betalactámicos, colistina, quinolonas y tetraciclinas, todos ellos catalogados por la OMS como de alta prioridad en la lucha contra la resistencia bacteriana. Además, ABRicate permitió reconocer genes de virulencia en estos plásmidos, como *vgrG1*, *virB11* e *hipA*, los que están involucrados en funciones como la secreción de toxinas, persistencia intracelular y evasión de la respuesta inmune del hospedador. Esta concurrencia de genes de resistencia y virulencia en el mismo plásmido representa la evolución que existe en la transferencia horizontal de genes y representa sin dudas un riesgo sanitario importante, ya que combina la capacidad de causar enfermedad con la posibilidad de sobrevivir a tratamientos antimicrobianos.

Los resultados de este estudio permiten establecer que los humedales urbanos estudiados de la Región de Los Lagos actualmente están funcionando como un reservorio ecológico de genes de resistencia antimicrobiana y virulencia, coincide con los hallazgos descritos por Opitz et al. (2024) en la zona, así como Mao et al. (2025) en Hong Kong o incluso Mirsalami et al. (2025) en Irán, en aguas continentales. El hecho de que coincidan los hallazgos de ABRicate tanto en los MAGs, como en los plásmidos, llama especialmente la atención, ya que nos está indicando positivamente la probabilidad de que el intercambio genético se está efectuando activamente en estos hábitats, y ya se pueden evidenciar integrado a nivel del genoma de diversas especies de microorganismos. Por supuesto, esto convierte a los humedales en un potencial punto caliente de organismos multirresistentes, representando una amenaza para la salud humana, animal y ambiental.

Es en este punto que el enfoque Una Salud cobra vital importancia para la vigilancia sanitaria de estos ecosistemas ubicados en zonas donde existe una alta interacción entre los seres humanos, las mascotas, la fauna silvestre y los animales productivos, por lo que se puede deducir de esta investigación, existe un riesgo real debido a la transferencia de genes perjudiciales para la salud en especies patógenas de relevancia médica.

No hay que olvidar la presión antropogénica, como las descargas ilegales de aguas servidas, escorrentías agrícolas y residuos domiciliarios que favorecen y contribuyen a la selección de bacterias con rasgos genéticos resistentes y virulentos, capaces incluso de aumentar sus capacidades de patogenicidad indirectamente. La evidencia presente en este estudio y otros similares realizados en China (Zhang et al., 2025), Japón (Xiao et al., 2025), Europa (Sivalingam et al., 2024; Wang et al., 2021; Chen et al., 2019), Sudamérica (Urrea et al., 2025) y otras partes del planeta, plantean la necesidad de implementar estos ambientes acuáticos en estrategias de monitoreo microbiológico ambiental, sobre todo por los cambios producidos en la actualidad como el cambio climático y la expansión urbana.

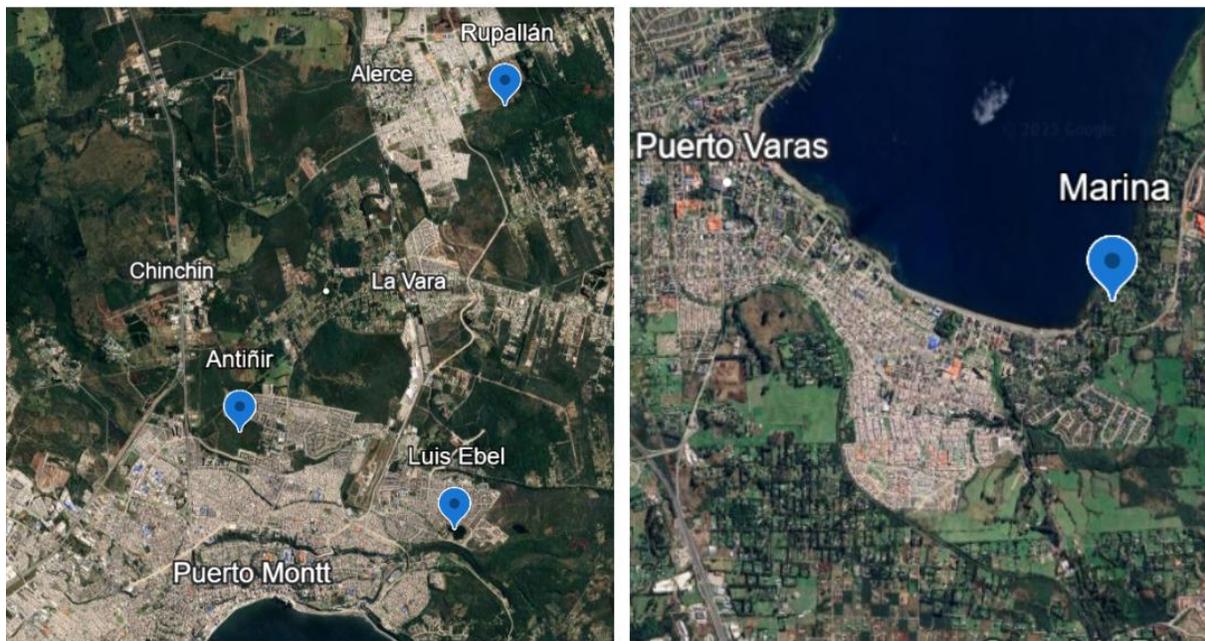
A pesar de los hallazgos significativos de este trabajo, este estudio presenta ciertas limitaciones que hay que considerar. En primera instancia, si bien las secuenciaciones metagenómicas permiten detectar una amplia gama de genes, no nos permite confirmar la expresión fenotípica de estos mismos, por lo que no se puede asegurar su funcionalidad *in vivo*. Además, la reconstrucción de genomas desde metagenomas (MAG) utilizando el tipo de secuenciación de metagenómica de escopeta, la cual es una secuenciación de segunda generación, no nos permite (en la mayoría de los casos) obtener genomas completamente verídicos y sólo se basa mayormente en el sistema de probabilidades implementado para cada software. Esto se debe principalmente a que sólo nos permite obtener secuencias cortas de entre 25 y 400 pb, lo cual genera que la lectura de secuencias se vea limitada ante las repeticiones en tándem del ADN. Esto puede causar errores en la lectura en forma de espacios y complicaciones en el ensamblaje final, Rojas-Villalta et al. (2024) discuten las ventajas y limitaciones de plataformas como Illumina, PacBio y Oxford Nanopore. En ese sentido, destacamos nuevamente que este estudio se realizó en base a secuenciación de segunda generación, y en la actualidad la sugerencia es complementar estas lecturas con secuencias de molécula larga, también conocidas como tercera generación de secuenciación. El estudio de co-ensamblaje de ambas tecnologías nos permite tener descripciones más completas (Chakrawarti et al. 2024; Krakau et al. 2022; Ye et al. 2022).

Otra limitación importante son las dependencias de las bases de datos públicas para la clasificación taxonómica y funcional. Muchos MAGs y genes quedaron sin identificar

o sin clasificar debido a la ausencia de información genómica homóloga, lo cual restringe el alcance interpretativo de aquellos elementos genómicos considerados en esta investigación como candidatos a no descritos anteriormente. Lo cual sugiere la necesidad de ampliar y diversificar las bases de datos actuales esencialmente con material proveniente de ambientes naturales y en América del Sur.

En un futuro se recomienda complementar este tipo de investigación, con estudios de metatranscriptómicos o inclusive con ensayos fenotípicos *in vitro*, así se podría validar la calidad de los genes detectados. Del mismo modo, la implementación de técnicas de cultivo bacteriológico aislado y dirigido que permitan comprender las características y funcionalidad de especies candidatas a nuevas descripciones o incluso evaluar el riesgo real de diseminación genética en modelos experimentales.

Por último, se sugiere implementar planes de vigilancia epidemiológica sistemática en humedales urbanos de la Región de Los Lagos, el país y el mundo, integrando específicamente el enfoque Una Salud con herramientas de vigilancia genómica, con el fin de identificar a tiempo patógenos resistentes y mejorar la respuesta sanitaria global.



**Figura 6:** Diagrama descriptivo de los principales hallazgos bacteriológicos y genómicos del estudio. Donde se describen 4 humedales en particular; Marina (mayor cantidad de genes y genes plasmídicos), Rupallán (presencia del gen *mcr-4.3*), Antañir (presencia de *Aeromonas salmonicida*), Luis Ebel (presencia de *Yersinia enterocolitica*).

## 7. Conclusiones

Este estudio logró ensamblar 40 genomas desde metagenomas (MAGs) en muestras metagenómicas obtenidas de humedales urbanos de la Región de Los Lagos para especies de interés veterinario, como, por ejemplo: *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia enterocolitica*, *Morganella morganii*, *Providencia heimbachae*, *Hafnia alvei*, *Ignatzschineria rhizosphaerae*, *Serratia proteamaculans*, afectando gran variedad de especies animales. Las demás especies aisladas no tienen relevancia etiológica, pero si presentan importancia debido a ser portadoras de genes de resistencia, tales como *Acinetobacter bohemicus*, *Acinetobacter albensis*, *Rouxiella badensis*, etc.

Nuestro estudio demostró la amplia variabilidad de especies bacterianas presente en estos nichos microbianos acuáticos debido a que se lograron reconocer un total de 25 de los 40 MAGs ensamblado, es decir, el 62,5% de los genomas ensamblados pudieron ser clasificados taxonómicamente, mientras que el 37,5% restante funcionan como potenciales especies no descritas en los humedales urbanos de la Región de Los Lagos.

Se describieron elementos genéticos móviles pertenecientes a plásmidos de los 13 humedales urbanos incluidos en este estudio, de los cuales se pudo obtener genes vinculados con la resistencia antimicrobiana a familias como betalactámicos, tetraciclinas, fluoroquinolonas, macrólidos, polimixinas. Además, se lograron identificar plásmidos pertenecientes a especies especialmente patógenas para animales y humanos como *Yersinia enterocolitica subs. Enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Brucella Melitensis*. Por último, se detectaron genes codificantes sin clasificación, pertenecientes a múltiples especies e indicadores potenciales de elementos genéticos móviles y funcionales no descritos.

Este estudio no solo logró cumplir con su objetivo principal, sino que también sentó las bases para futuras investigaciones en los campos de la ecología microbiana y la medicina veterinaria en entornos de humedales urbanos. Los resultados obtenidos destacan la importancia de estos ecosistemas como reservorios de microorganismos con potencial impacto veterinario, resaltando a su vez la necesidad de una vigilancia permanente para mitigar eventuales riesgos sanitarios.

## 8. Referencias

- Alcock, B. P., Huynh, W., Chalil, R., Smith, K. W., Raphenya, A. R., Wlodarski, M. A., Edalatmand, A., Petkau, A., Syed, S. A., Tsang, K. K., Baker, S. J. C., Dave, M., McCarthy, M. C., Mukiri, K. M., Nasir, J. A., Golbon, B., Imtiaz, H., Jiang, X., Kaur, K., ... McArthur, A. G. (2023). CARD 2023: Expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D690–D699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac920>
- Alneberg, J., Bjarnason, B. S., de Bruijn, I., Schirmer, M., Quick, J., Ijaz, U. Z., Lahti, L., Loman, N. J., Andersson, A. F., & Quince, C. (2014). Binning metagenomic contigs by coverage and composition. *Nature Methods*, 11(11), 1144–1146. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3103>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Baran, A., Kwiatkowska, A., & Potocki, L. (2023). Antibiotics and Bacterial Resistance-A Short Story of an Endless Arms Race. *International journal of molecular sciences*, 24(6), 5777. <https://doi.org/10.3390/ijms24065777>
- Bengtsson-Palme, J., Hartmann, M., Eriksson, K. M., Pal, C., Thorell, K., Larsson, D. G., & Nilsson, R. H. (2015). METAXA2: improved identification and taxonomic classification of small and large subunit rRNA in metagenomic data. *Molecular ecology resources*, 15(6), 1403–1414. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12399>
- Bergamini, K., Martínez, C., Mollenhauer, K., Pérez, C., Hernández, J., & Gutiérrez, P. (2020). Guía práctica para el conocimiento de humedales e identificación de 31 conductas denunciabes. Pontificia Universidad Católica de Chile. <https://politicaspUBLICAS.uc.cl/wp-content/uploads/2020/03/Gu%C3%ADa-V1.pdf>
- Bhardwaj, S., Mehra, P., Dhanjal, D. S., Sharma, P., Sharma, V., Singh, R.,

- Nepovimova, E., Chopra, C., & Kuča, K. (2022). Antibiotics and Antibiotic Resistance- Flipsides of the Same Coin. *Current pharmaceutical design*, 28(28), 2312–2329. <https://doi.org/10.2174/1381612828666220608120238>
- Bowers, R. M., Kyrpides, N. C., Stepanauskas, R., Harmon-Smith, M., Doud, D., Reddy, T. B. K., Schulz, F., Jarett, J., Rivers, A. R., Eloie-Fadrosch, E. A., Tringe, S. G., Ivanova, N. N., Copeland, A., Clum, A., Becraft, E. D., Malmstrom, R. R., Birren, B., Podar, M., Bork, P., ... Woyke, T. (2017). Minimum information about a single amplified genome (MISAG) and a metagenome-assembled genome (MIMAG) of bacteria and archaea. *Nature Biotechnology*, 35(8), 725–731. <https://doi.org/10.1038/nbt.3893>
- Breitwieser, F. P., Baker, D. N., & Salzberg, S. L. (2018). KrakenUniq: Confident and fast metagenomics classification using unique k-mer counts. *Genome Biology*, 19(1), 198. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1568-0>
- Burgos, A. (2024). Análisis metagenómico de microorganismos de relevancia en medicina veterinaria identificados en humedales urbanos de la región de Los Lagos, [Memoria para optar a licenciado en Medicina Veterinaria]. Universidad San Sebastián.
- Cabrera, C. E., Gómez, R. F., & Zúñiga, A. E. (1994). Colombia médica. *Colombia Médica*, 38(2), 149–158. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1657-95342007000200008&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95342007000200008&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
- CAEME Innovación para la Salud. (2021). Bacterias: qué son y por qué menos del 1% causa enfermedades. <https://t.ly/1bmJq>
- Campanini-Salinas, J., Opitz-Ríos, C., Sagredo-Mella, J. A., Contreras-Sanchez, D., Giménez, M., Páez, P., Tarifa, M. C., Rubio, N. D., & Medina, D. A. (2024). Antimicrobial Resistance Elements in Coastal Water of Llanquihue Lake, Chile. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 13(7), 679. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13070>
- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Voldby Larsen, M., Lund, O.,

- Villa, L., Møller Aarestrup, F., y Hasman, H. (2014). In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(7), 3895–3903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>
- Chakrawarti, A., Eckstrom, K., Laaguiby, P., & Barlow, J. W. (2024). Hybrid Illumina-Nanopore assembly improves identification of multilocus sequence types and antimicrobial resistance genes of *Staphylococcus aureus* isolated from Vermont dairy farms: Comparison to Illumina-only and R9.4.1 nanopore-only assemblies. *Access Microbiology*, 6(3), Article 000766.v3. <https://doi.org/10.1099/ACMI.0.000766.V3>
- Chaumeil, P.-A., Mussig, A. J., Hugenholtz, P., & Parks, D. H. (2020). GTDB-Tk: A toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics*, 36(6), 1925-1927. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz848>
- Chaumeil, P.-A., Mussig, A. J., Hugenholtz, P., & Parks, D. H. (2022). GTDBTk v2: Memory friendly classification with the genome taxonomy database. *Bioinformatics*, 38(23), 5315-5316. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac672>
- Chen, L., Zheng, D., Liu, B., Yang, J., y Jin, Q. (2016). VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D694-D697. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1239>
- Chen, H., Jing, L., Yao, Z., Meng, F., & Teng, Y. (2019). Prevalence, source and risk of antibiotic resistance genes in the sediments of Lake Tai (China) deciphered by metagenomic assembly: A comparison with other global lakes. *Environment international*, 127, 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.048>
- Clínico San Carlos Madrid, H., & Suárez Moya, A. (2017). Microbiome and next generation sequencing Microbioma y secuenciación masiva. En *Secuenciación masiva Rev Esp Quimioter* (Vol. 30, Número 5). <https://seq.es/wp-content/uploads/2017/09/suarez17jul2017.pdf>

- Davidson, N. (2014). How much wetland has the world lost? Long-term and recent trends in global wetland area. *Marine and Freshwater Research*, 65(10), 934-941. <https://doi.org/10.1071/MF14173>
- Di Cesare, A., Sabatino, R., Sbaffi, T., Fontaneto, D., Brambilla, D., Beghi, A., Pandolfi, F., Borlandelli, C., Fortino, D., Biccai, G., Genoni, P., & Corno, G. (2023). Anthropogenic pollution drives the bacterial resistome in a complex freshwater ecosystem. *Chemosphere*, 331, 138800. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138800>
- Eddy S. R. (2011). Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS computational biology*, 7(10), e1002195. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002195>
- Feldgarden, M., Brover, V., Haft, D. H., Prasad, A. B., Slotta, D. J., Tolstoy, I., Tyson, G. H., Zhao, S., Hsu, C.-H., McDermott, P. F., Tadesse, D. A., Morales, C., Simmons, M., Tillman, G., Wasilenko, J., Folster, J. P., y Klimke, W. (2019). Validating the AMRFinder tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance genotype-phenotype correlations in a collection of isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(11). <https://doi.org/10.1128/aac.00483-19>
- Fernández, R., López, J., Ponce, L., & Machado, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 32 (1). 1561-3046. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0138-65572003000100007&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572003000100007&lng=es&tlng=es)
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., & Merrick, J. M. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5223), 496–512. <https://doi.org/10.1126/science.7542800>
- Florensa, A. F., Kaas, R. S., Clausen, P. T. L. C., Aytan-Aktug, D., & Aarestrup, F. M. (2022). ResFinder - an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microbial genomics*, 8(1), 000748. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000748>

- Garg, S. G., Kapust, N., Lin, W., Knopp, M., Tria, F. D. K., Nelson-Sathi, S., Gould, S. B., Fan, L., Zhu, R., Zhang, C., & Martin, W. F. (2021). Anomalous Phylogenetic Behavior of Ribosomal Proteins in Metagenome-Assembled Asgard Archaea. *Genome biology and evolution*, 13(1), evaa238. <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa238>
- Giménez, M., Ferrés, I., & Iraola, G. (2022). Improved detection and classification of plasmids from circularized and fragmented assemblies (p. 2022.08.04.502827). *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.08.04.502827>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., y Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* (Oxford, England), 29(8), 1072-1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., & Eiros, J. M. (2020). Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 150–161. <https://doi.org/10.1016/J.RAM.2019.06.003>
- Higa, T., Andrea Rueda Peña, P., Agrónoma, I., & en Ciencias Agrícolas, L. (s. f.). Microorganismos benéficos y efectivos para una agricultura y medio ambiente sostenible. [https://www.academia.edu/3530557/microorg\\_benef\\_efect](https://www.academia.edu/3530557/microorg_benef_efect)
- Humedales de Chiloé. (2018). Humedales de Chiloé-amenazas. Humedales de Chiloé. <http://humedaleschiloe.cl/amenazas/>
- Hyatt, D., Chen, G. L., Locascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC bioinformatics*, 11, 119. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119>
- Kaattari, S. L., & Piganelli, J. D. (1996). The specific immune system: Humoral defense. In *Fish Physiology* (Vol. 15, pp. 207–254). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60275-7](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60275-7)
- Kang, D. D., Froula, J., Egan, R., & Wang, Z. (2015). MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial

- communities. PeerJ, 3, e1165. <https://doi.org/10.7717/peerj.1165>
- Kang, D. D., Li, F., Kirton, E., Thomas, A., Egan, R., An, H., & Wang, Z. (2019). MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. PeerJ, 7, e7359. <https://doi.org/10.7717/peerj.7359>
- Kim, J. J., Seong, H. J., Johnson, T. A., Cha, C. J., Sul, W. J., & Chae, J. C. (2023). Persistence of antibiotic resistance from animal agricultural effluents to surface water revealed by genome-centric metagenomics. Journal of hazardous materials, 457, 131761. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131761>
- Krakau, S., Straub, D., Gourelé, H., Gabernet, G., & Nahnsen, S. (2022). nf-core/mag: A best-practice pipeline for metagenome hybrid assembly and binning. NAR Genomics and Bioinformatics, 4(1), Article Iqac007. <https://doi.org/10.1093/nargab/lqac007>
- Krueger, F. (2011). Trimmomatic Manual: V0.32. Usadellab.org. [http://www.usadellab.org/cms/uploads/supplementary/Trimmomatic/TrimmomaticManual\\_V0.32.pdf](http://www.usadellab.org/cms/uploads/supplementary/Trimmomatic/TrimmomaticManual_V0.32.pdf)
- Lapidus, A. L. (2009). Genome Sequence Databases: Sequencing and Assembly. Encyclopedia of Microbiology, Third Edition, 196–210. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00028-6>
- La Rosa, M. C., Maugeri, A., Favara, G., La Mastra, C., Magnano San Lio, R., Barchitta, M., & Agodi, A. (2025). The Impact of Wastewater on Antimicrobial Resistance: A Scoping Review of Transmission Pathways and Contributing Factors. Antibiotics (Basel, Switzerland), 14(2), 131. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14020131>
- Li, D., Liu, C.-M., Luo, R., Sadakane, K., & Lam, T.-W. (2015). MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. Bioinformatics (Oxford, England), 31(10), 1674-1676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033>
- Liu, B., Zheng, D., Zhou, S., Chen, L., & Yang, J. (2022). VFDB 2022: a general

- classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic acids research*, 50(D1), D912–D917. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1107>
- López, C., Candelas, F., Carmona, M., y Palomo., A. (2021). Aplicaciones de las técnicas de secuenciación masiva en la Microbiología Clínica. *Seimc.org*. <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento71.pdf>
- Mackenzie JS, Jeggo M. The One Health Approach—Why Is It So Important? *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 2019; 4(2), 88. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4020088>
- Madrid, H (2023). Tabla De Frecuencia En Excel: Analiza Tus Datos Cualitativos. Hojas y datos. Consultado el 25 de noviembre de 2024. [https://hojasydatos.com/tablas-de-frecuencia-en-excel-analiza-tus-datos-cualitativos/#google\\_vignette](https://hojasydatos.com/tablas-de-frecuencia-en-excel-analiza-tus-datos-cualitativos/#google_vignette)
- Manterola, C. & Otzen, T. (2014). Estudios Observacionales: Los Diseños Utilizados con Mayor Frecuencia en Investigación Clínica. *International Journal of Morphology*, 32(2), 634-645. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022014000200042>
- Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>
- Mao, X., Yin, X., Yang, Y., Gao, F., Li, S., Shi, X., Deng, Y., Li, L., Leung, K. M. Y., & Zhang, T. (2025). Longitudinal metagenomic analysis on antibiotic resistome, mobilome, and microbiome of river ecosystems in a subtropical metropolitan city. *Water research*, 274, 123102. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2025.123102>
- Markowitz, V. M., Chen, I. M., Palaniappan, K., Chu, K., Szeto, E., Pillay, M., Ratner, A., Huang, J., Woyke, T., Huntemann, M., Anderson, I., Billis, K., Varghese, N., Mavromatis, K., Pati, A., Ivanova, N. N., & Kyrpides, N. C. (2014). IMG 4 version of the integrated microbial genomes comparative analysis system. *Nucleic acids research*, 42(Database issue), D560–D567. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt963>

- Martino, F., Petroni, A., Menocal, M. A., Corso, A., Melano, R., Faccione, D., ... Faccione, D. (2024). New insights on mcr-1-harboring plasmids from human clinical Escherichia coli isolates. PLoS ONE, 19(2), e0294820. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294820>
- Mavrici, D., Yambao, J. C., Lee, B. G., Quiñones, B., & He, X. (2017). Screening for the presence of mcr-1/mcr-2 genes in Shiga toxin-producing Escherichia coli recovered from a major produce-production region in California. PLoS ONE, 12(11), e0187827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187827>
- Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H. P., & Göker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. BMC bioinformatics, 14, 60. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>
- Montaño Arias, N. M., Sandoval Pérez, A. L., Camargo Ricalde, S. L., & Sánchez Yáñez, J. M. (2010). Los microorganismos: pequeños gigantes. Elementos: Ciencia y cultura, 17(77), 15–23. <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=29411989003>
- Navgire, G. S., Goel, N., Sawhney, G., Sharma, M., Kaushik, P., Mohanta, Y. K., Mohanta, T. K., y Al-Harrasi, A. (2022). Analysis and Interpretation of metagenomics data: an approach. Biological Procedures Online, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12575-022-00179-7>
- Novogene. (2021). Shotgun metagenomic sequencing. Novogene. Consultado el 05 de octubre de 2024, de <https://www.novogene.com/us-en/services/researchservices/metagenome-sequencing/shotgun-metagenomic-sequencing/>
- Opitz C., Burgos A., Paredes F., Campanini J., Medina D. Metagenomics Insight into Veterinary and Zoonotic Pathogens Identified in Urban Wetlands of Los Lagos, Chile. Pathogens. 2024; 13(9):788. <https://doi.org/10.3390/pathogens13090788>
- Organización Mundial de la Salud. (2021). Resistencia a los antimicrobianos.

Who. int. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

Organización Mundial de la Salud. (2024). PATHOGENS PRIORITIZATION, A Scientific Framework For Epidemic And Pandemic Research Preparedness. Health Emergencies Programme. <https://cdn.who.int/media/docs/default-source/consultation-rdb/prioritization-pathogens-v6final.pdf?sfv>

Organización Mundial de Sanidad Animal. (2011). Una sola salud. Consultado el 28 de septiembre de 2024, de <https://www.woah.org/es/que-hacemos/iniciativas-mundiales/una-sola-salud/#:~:text=Salud%20Mundial,bioterrorismo%20son%20de%20origen%20animal>

Organización Mundial de Sanidad Animal. (2023). Carunco bacteridiano. En OIE (12a ed.). Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (pp. 1-3). [https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/Esu\\_mmy.htm](https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/Esu_mmy.htm)

Organización Panamericana de la Salud. (2023). Día Mundial de las Zoonosis: protegerla salud animal ayuda a preservar la salud humana. Paho.org. <https://n9.cl/se614>

Organización Panamericana de la Salud & Organización Mundial de la Salud. (2016). Alerta epidemiológica: Enterobacterias con resistencia transferible a colistina, implicaciones para la salud pública en las Américas (10 de junio de 2016). OPS/OMS. <https://www.paho.org>

Osburn, B., Scott, C., y Gibbs, P. (2009). One world--one medicine--one health: emerging veterinary challenges and opportunities. *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics), 28(2), 481–486. <https://doi.org/10.20506/rst.28.2.1884>

Page, R., & Peti, W. (2016). Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nature chemical biology*, 12(4), 208–214.

<https://doi.org/10.1038/nchembio.2044>

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. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>

Pechlivanis, N., & Psomopoulos, F. E. (2023) 46:44. Binning of metagenomic sequencing data [Text]. Galaxy Training Network; Galaxy Training Network. Consultado el 29 de Mayo del 2025 <https://training.galaxyproject.org/training-material/topics/microbiome/tutorials/metagenomics-binning/tutorial.html>

Quiñones Pérez, D. (2017). Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque “Una salud” Antimicrobial resistance: evolution and current perspectives in the context of the “One health” approach. En *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69(3). <http://scielo.sld.cuhttp://scielo.sld.cu>

Richardson, E. J., & Watson, M. (2013). The automatic annotation of bacterial genomes. *Briefings in bioinformatics*, 14(1), 1–12. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs007>

Rodríguez, A., Olivero, S., Ortiz, F., y Medina, D. (2023). Propuesta de estrategias y acciones «One Health» para la zona austral de Chile y Argentina. *Unasalud.cl*. <https://n9.cl/485ym>

Rojas-Villalta, D., Benavides-Villegas, D., Angulo-Hidalgo, B., Muñoz-Solorzano, L., & Consumi-Tubito, C. (2024). Caracterización de las tecnologías de secuenciación genética de segunda y tercera generación. *Tecnología en Marcha*, 37(2), 70–81. <https://doi.org/10.18845/tm.v37i2.6494>

Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D. J., & Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 73(5), 1121–1137. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx488>

- Sanger, F. Coulson, A.R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase, *Journal of Molecular Biology*, 94(3), 441-448. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)
- Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Ostell, J., Pruitt, K. D., & Karsch-Mizrachi, I. (2019). GenBank. *Nucleic acids research*, 47(D1), D94–D99. <https://doi.org/10.1093/nar/gky989>
- Seemann T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Seemann, T. (2020). ABRicate: :mag\_right: Mass screening of contigs for antimicrobial and virulence genes. Consultado el 05 de octubre de 2024 <https://github.com/tseemann/abricate>
- Setubal J. C. (2021). Metagenome-assembled genomes: concepts, analogies, and challenges. *Biophysical reviews*, 13(6), 905–909. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00865-y>
- Sivalingam, P., Sabatino, R., Sbaffi, T., Corno, G., Fontaneto, D., Borgomaneiro, G., Rogora, M., Crotti, E., Mapelli, F., Borin, S., Pilar, A. L., Eckert, E. M., & Di Cesare, A. (2024). Anthropogenic pollution may enhance natural transformation in water, favouring the spread of antibiotic resistance genes. *Journal of hazardous materials*, 475, 134885. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.134885>
- Sotohy, S. A., Diab, M. S., Ewida, R. M., El-Shafey, Y. M., Mohamed, A. H., & Abdelkhalek, A. (2024). Research study on *Yersinia enterocolitica* in animals, humans, and milk powder in the New Valley Governorate, Egypt. *BMC Microbiology*, 24, 395. <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03527-7>
- Tan, J. H., Liew, K. J., & Goh, K. M. (2024). Dataset of 313 metagenome-assemble genomes from streamer hot spring water. *Data in brief*, 56, 110829. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2024.110829>
- Tatusov, R. L., Koonin, E. V., & Lipman, D. J. (1997). A genomic perspective on protein families. *Science (New York, N.Y.)*, 278(5338), 631–637.

<https://doi.org/10.1126/science.278.5338.631>

Tun, T., Baleivannualala, S. C., Erdmann, M. B., Gimenez, G., & Aung, H. L. (2024). An extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Myanmar. *Journal of global antimicrobial resistance*, 36, 1–3.

<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.11.004>

Urrea, V., Páez-Triana, L., Velásquez-Ortiz, N., Camargo, M., Patiño, L. H., Vega, L., Ballesteros, N., Hidalgo-Troya, A., Galeano, L. A., Ramírez, J. D., & Muñoz, M. (2025). Metagenomic Analysis of Surface Waters and Wastewater in the Colombian Andean Highlands: Implications for Health and Disease. *Current microbiology*, 82(4), 162.

<https://doi.org/10.1007/s00284-024-04019-7>

Uritskiy, G. V., DiRuggiero, J., & Taylor, J. (2018). MetaWRAP-a flexible pipeline for genome-resolved metagenomic data analysis. *Microbiome*, 6(1), 158.

<https://doi.org/10.1186/s40168-018-0541-1>

Utturkar, S., Dassanayake, A., Nagaraju, S., & Brown, S. D. (2020). Bacterial Differential Expression Analysis Methods. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2096, 89–112.

[https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0195-2\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0195-2_8)

Wang, Y., Lu, S., Liu, X., Chen, J., Han, M., Wang, Z., & Guo, W. (2021). Profiles of antibiotic resistance genes in an inland salt-lake Ebinur Lake, Xinjiang, China: The relationship with antibiotics, environmental factors, and microbial communities. *Ecotoxicology and environmental safety*, 221, 112427.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112427>

Wildlife Conservation Society. (2019). Chile, país de humedales: 40 mil reservas de vida.

<https://chile.wcs.org/Portals/134/Libro%20Humedales%20WCS.pdf?ver=2019-02-08-203952-653>

Wood, DE, Lu, J. y Langmead, B. Análisis metagenómico mejorado con Kraken 2. *Genome Biol* 20, 257 (2019).

<https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>

- World Organisation for Animal Health. (2022). *Yersinia enterocolitica* (Infection with). <https://www.woah.org/app/uploads/2022/02/yersinia-enterocolitica-infection-with.pdf>
- Wu, J., Danko, D., Afshinnekoo, E., Bezdán, D., Bhattacharyya, M., Castro-Nallar, E., Chmielarczyk, A., Hazrin-Chong, N. H., Deng, Y., Dias-Neto, E., Frolova, A., Mason-Buck, G., Iraola, G., Jang, S., Łabaj, P., Lee, P. K. H., Nieto-Caballero, M., Osuolale, O. O., Ouzounis, C. A., ... Shi, T. (2022). Annotating unknown species of urban microorganisms on a global scale unveils novel functional diversity and local environment association. *Environmental Research*, 207. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112183>
- Wu, Y.-W., Simmons, B. A., & Singer, S. W. (2016). MaxBin 2.0: An automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 32(4), 605-607. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv638>
- Yang, C., Chowdhury, D., Zhang, Z., Cheung, W. K., Lu, A., Bian, Z., & Zhang, L. (2021). A review of computational tools for generating metagenome-assembled genomes from metagenomic sequencing data. *En Computational and Structural Biotechnology Journal* (Vol. 19, pp. 6301–6314). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.11.028>
- Yang, D., Qiu, Z., Shen, Z., Zhao, H., Jin, M., Li, H., Liu, W., & Li, J.-W. (2017). The occurrence of the colistin resistance gene *mcr-1* in the Haihe River (China). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6), Article 576. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060576>
- Ye, L., Dong, N., Xiong, W., Li, J., Li, R., Heng, H., Chan, E. W. C., & Chen, S. (2022). High-resolution metagenomics of human gut microbiota generated by Nanopore and Illumina hybrid metagenome assembly. *Frontiers in Microbiology*, 13, Article 801587. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.801587>
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F. M., & Larsen, M. V. (2012). Identification of acquired

- antimicrobial resistance genes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2640-2644. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>
- Zhang, Y., Ding, G., Gao, Y., Li, Y., Zhou, P., Wu, L., Zhou, M., Wang, J., & Tang, J. (2025). Distribution status and influencing factors of antibiotic resistance genes in the Chaohu Lake, China. *PeerJ*, 13, e19384. <https://doi.org/10.7717/peerj.19384>
- Zhong, L.-L., Phan, H. T. T., Shen, C., Vihta, K.-D., Sheppard, A. E., Huang, X., Zeng, K.-J., Li, H.-Y., Zhang, X.-F., Patil, S., Crook, D. W., Walker, A. S., Xing, Y., Lin, J.-L., Feng, L.-Q., Doi, Y., Xia, Y., Stoesser, N., & Tian, G.-B. (2018). High rates of human fecal carriage of mcr-1-positive multidrug-resistant Enterobacteriaceae emerge in China in association with successful plasmid families. *Clinical Infectious Diseases*, 66(5), 676–685. <https://doi.org/10.1093/cid/cix885>
- Zunino, P. (2018). Historia y perspectivas del enfoque “Una Salud”. *Veterinaria* (Montevideo), 54(210), 46-51. [http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1688-48092018000200046](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-48092018000200046)
- Zurfluh, K., Stephan, R., Widmer, A., Poirel, L., Nordmann, P., Nüesch, H.-J., Hächler, H., & Nüesch-Inderbilen, M. (2017). Screening for fecal carriage of MCR-producing Enterobacteriaceae in healthy humans and primary care patients. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 6(1), Article 28. <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0186-z>

## 9. Anexos

### 9.1 Anexo 1. Lista de software comúnmente utilizados en bioinformática para el estudio de secuencias genómicas.

Acción	Programa	Sitio web
Asignación taxonómica	RDP	<a href="https://rdp.cme.msu.edu/">https://rdp.cme.msu.edu/</a>
	Greengenes	<a href="http://greengenes.secondgenome.com/">http://greengenes.secondgenome.com/</a>
	Silva	<a href="http://www.arb-silva.de">www.arb-silva.de</a>
Calidad de secuencia	FastQC	<a href="http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk">www.bioinformatics.babraham.ac.uk</a>
	TRIMMOMATIC	<a href="http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic">http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic</a>
	PRINSEQ	<a href="http://prinseq.sourceforge.net/">http://prinseq.sourceforge.net/</a>
Identificación	K-merFinder	<a href="http://www.genomicepidemiology.org">www.genomicepidemiology.org</a>
	BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast">www.ncbi.nlm.nih.gov/blast</a>
	MEGAN	<a href="http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/malt">http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/malt</a>
	Kraken	<a href="https://ccb.jhu.edu/software/kraken/">https://ccb.jhu.edu/software/kraken/</a>
Ensamblado	SPAdes	<a href="http://bioinf.spbau.ru/spades">http://bioinf.spbau.ru/spades</a>
	Velvet	<a href="http://www.ebi.ac.uk/~zerbino/velvet">www.ebi.ac.uk/~zerbino/velvet</a>
	MIRA	<a href="http://www.chevreux.org/projects.mira.html">www.chevreux.org/projects.mira.html</a>
Alineamiento	Mauve	<a href="http://darlinglab.org/mauve/mauve.html">http://darlinglab.org/mauve/mauve.html</a>
Visualización	ACT	<a href="http://www.sanger.ac.uk/science/tools">www.sanger.ac.uk/science/tools</a>
	Artemis	<a href="http://www.sanger.ac.uk/science/tools">www.sanger.ac.uk/science/tools</a>
	ClustalW	<a href="http://www.genome.jp/tools/clustalw">www.genome.jp/tools/clustalw</a>
	BRIG	<a href="http://brig.sourceforge.net/">http://brig.sourceforge.net/</a>
	Prokka	<a href="https://github.com/tseemann/prokka">https://github.com/tseemann/prokka</a>
Anotación	RAST	<a href="http://rast.nmpdr.org">http://rast.nmpdr.org</a>
	Prodigal	<a href="https://github.com/hyattprodigal/prodigal/wiki">https://github.com/hyattprodigal/prodigal/wiki</a>
	Bowtie	<a href="http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml">http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml</a>
Mapeado	BWA	<a href="http://bio-bwa.sourceforge.net/">http://bio-bwa.sourceforge.net/</a>
Filogenia	FastTree	<a href="http://www.microbesonline.org/fasttree/">www.microbesonline.org/fasttree/</a>
	SNPTree	<a href="http://www.genomicepidemiology.org">www.genomicepidemiology.org</a>
	iTOL	<a href="http://itol.embl.de/">http://itol.embl.de/</a>
Resistencia	ARDB	<a href="https://ardb.cbc.umd.edu">https://ardb.cbc.umd.edu</a>
	CARD	<a href="https://card.mcmaster.ca">https://card.mcmaster.ca</a>
	ResFinder	<a href="https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/">https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/</a>
	Abricate	<a href="https://github.com/tseemann/abricate">https://github.com/tseemann/abricate</a>
	ARG-ANNOT	<a href="http://www.mediterranee-infection.com/article.php?laref=282&amp;titre=arg-annot">http://www.mediterranee-infection.com/article.php?laref=282&amp;titre=arg-annot</a>
	PointFinder	<a href="https://bitbucket.org/genomicepidemiology/pointfinder">https://bitbucket.org/genomicepidemiology/pointfinder</a>
SNP	Samtools	<a href="http://www.htslib.org">www.htslib.org</a>
	VarScan	<a href="http://dkoboldt.github.io/varscan/">http://dkoboldt.github.io/varscan/</a>
	GATK	<a href="https://software.broadinstitute.org/gatk/">https://software.broadinstitute.org/gatk/</a>
	Snippy	<a href="https://github.com/tseemann/snippy">https://github.com/tseemann/snippy</a>
	Plásmidos	PlasmidFinder
Tipado	PlasmidSPAdes	<a href="http://cab.spbau.ru/software/plasmid-spades/">http://cab.spbau.ru/software/plasmid-spades/</a>
	PLACNETw	<a href="https://castillo.dicom.unican.es/upload/">https://castillo.dicom.unican.es/upload/</a>
	Plasmid MLST	<a href="https://pubmlst.org/plasmid/">https://pubmlst.org/plasmid/</a>
	BIGSdb	<a href="http://bigsdb.readthedocs.io">http://bigsdb.readthedocs.io</a>
Virulencia	Enterobase	<a href="https://enterobase.warwick.ac.uk">https://enterobase.warwick.ac.uk</a>
	MLST	<a href="http://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/">http://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/</a>
	VFDB	<a href="http://www.mgc.ac.cn/VFs">www.mgc.ac.cn/VFs</a>
	VirulenceFinder	<a href="http://www.genomicepidemiology.org">www.genomicepidemiology.org</a>

*Nota.* Adaptado de: “Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico”, por M Hernández, 2020, *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), p. 156, (<https://doi.org/10.1016/J.RAM.2019.06.003>). Derechos reservados 2020 para Asociación Argentina de Microbiología.

**9.2 Anexo 2.** Ejemplo de un archivo “.stats” en las salidas de MetaWRAP después de su módulo de refinamiento. A continuación, se muestran las estadísticas genómicas de los bin obtenidos previo al proceso de selección de los mejores en términos de completitud y contaminación. Con esta información se realiza la selección de los mejores bins.

bin	completitud	contaminación	GC	linaje	N50	tamaño
bin.5	100.0	1.6	0.311	Euryarchaeota	12686	1705532
bin.4	99.32	1.3	0.408	Clostridiales	58825	2083650
bin.14	86.69	5.9	0.293	Bacteria	3754	2199676
bin.6	86.22	2.348	0.371	Clostridiales	4283	2055792
bin.8	83.16	2.516	0.446	Clostridiales	2723	1467846
bin.2	80.34	0.0	0.469	Bacteria	11936	3579466
bin.9	76.57	2.648	0.425	Selenomonadales	3155	1796524
bin.13	74.82	1.710	0.435	Bacteroidales	7456	3643185
bin.3	74.53	0.377	0.284	Clostridiales	10440	1241933
bin.10	65.78	0.0	0.263	Bacteria	3045	1159966
bin.11	64.85	3.776	0.417	Bacteroidales	2086	3103352
bin.1	57.36	0.0	0.430	Bacteria	4628	2673426
bin.7	52.94	1.724	0.501	Bacteria	3614	1465011

*Nota:* Adaptado de *MetaWRAP: un proceso flexible para el análisis de datos metagenómicos resueltos por genoma* (Uritskiy et al., 2018).