



UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIAN
VOCACIÓN POR LA EXCELENCIA

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

**MODIFICACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA BACTERIAS DE
RELEVANCIA EN MEDICINA VETERINARIA OBTENIDAS DESDE
HUMEDALES URBANOS DE LA REGIÓN DE LOS LAGOS**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE MÉDICA VETERINARIA

Profesor guía: Dr. Daniel Alejandro Medina Salas

Copatrocinadora: MV. Catherine Paola Opitz Ríos

Estudiante: Francisca Belén Paredes Cárcamo

Puerto Montt, Chile

2024

® Francisca Belén Paredes Cárcamo. 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

2024

HOJA DE CALIFICACIÓN

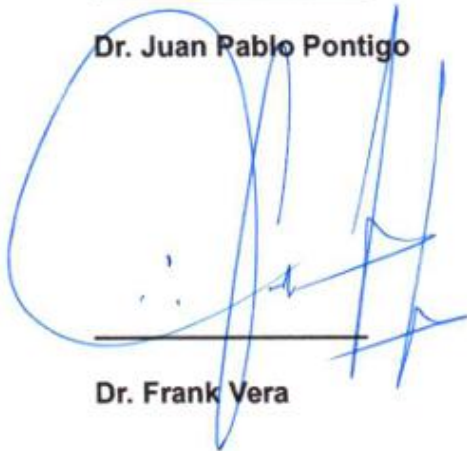
En Puerto Montt, el 22 de julio de 2024, los abajo firmantes dejan constancia que el (la) estudiante Francisca Belén Paredes Cárcamo de la carrera de Medicina Veterinaria ha aprobado su memoria de título para optar al grado de Médico Veterinario con una nota de 6,6



Dr. Daniel Medina



Dr. Juan Pablo Pontigo



Dr. Frank Vera

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos a mi profesor patrocinante Dr. Daniel Medina Salas, y a mí copatrocinadora, MV. Catherine Opitz Ríos, por brindarme la oportunidad de formar parte de este proyecto de investigación. Su profesionalismo, apoyo y guía no solo hicieron posible el desarrollo de este proyecto, sino que también han contribuido significativamente a mi crecimiento personal y académico.

Extiendo mi agradecimiento a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), ya que, a través del proyecto FONDECYT INICIACIÓN N°11230295 fue posible financiar esta memoria de título. Asimismo, agradezco el apoyo del Fondo de Vinculación Internacional N°FOVI220211, que fomentó desarrollo de este estudio.

Quiero agradecer al Laboratorio Nacional de Computación de Alto Rendimiento (NLHPC) por facilitar el desarrollo de este proyecto.

Finalmente, quiero agradecer a mis padres por la confianza y amor que siempre me han transmitido. Agradezco también a Alvaro Burgos, quien me ha acompañado y apoyado durante todo este proceso de formación académica.

Tabla de contenido

	Pág.
Índice de tablas	v
Índice de figuras	vi
Resumen	vii
1. Introducción	1
1.1 Una salud: origen y fundamentos.....	1
1.2 Humedales	2
1.3 Microorganismos bacterianos de relevancia en Medicina Veterinaria presentes en cuerpos de agua.....	3
1.4 Medios de cultivos y criterios para su modificación	6
2. Hipótesis.....	8
3. Objetivos.....	8
3.1 Objetivo General	8
3.2 Objetivos Específicos	8
4. Materiales y métodos	9
4.1 Tipo de estudio	9
4.2 Selección de microorganismos bacterianos	9
4.2.1 Muestras	9
4.2.2 Aislamiento de cepas bacterianas.....	10
4.2.3 Identificación de bacterias.....	10
4.3 Modificación del medio de cultivo.....	12
4.4 Crecimiento bacteriano en medio de cultivo.....	13
4.5 Representación de datos	13
4.6 Resumen del flujo de trabajo a realizar	14

5. Resultados.....	16
5.1 Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas obtenidas desde humedales urbanos de la región de Los Lagos	16
5.2 Identificación de bacterias aisladas desde humedales urbanos de la Región de Los Lagos.....	17
5.2.1 Confirmación de amplificación gen 16s para la identificación bacteriana	17
5.2.2 Secuenciación de ADNr 16s y análisis.....	18
5.3 Modificación del medio de cultivo y evaluación de crecimiento bacteriano	19
5.4 Visualización microscópica de bacterias seleccionadas.	22
6. Discusión	26
7. Conclusiones	31
8. Referencias	32
9. Anexos.....	43
9.1 Anexo 1. Vitaminas, minerales y otros componentes utilizados en la elaboración del medio de cultivo modificado (MOP).....	43
9.2 Anexo 2. Géneros bacterianos obtenidos tras análisis BLASTn.....	44
9.3 Anexo 3. Curvas de crecimiento para bacterias de relevancia en medicina veterinaria sembradas en medio modificado (MOP).	46
9.4 Anexo 4. Densidad óptica (OD ₆₀₀) en medios de cultivos MOP medido cada 30 minutos durante 12 horas continuas.	47

Índice de tablas

Tabla 1. Lista de patologías de carácter bacteriano presentes en el territorio nacional de denuncia obligatoria al Servicio Agrícola y Ganadero (2019).....	4
Tabla 2. Volúmenes de PCR Universal: Partidores universales para amplificación de gen 16s.....	10
Tabla 3. Etapas para la amplificación por PCR en un termociclador	11

Tabla 4. Composición de medio de cultivo modificado (MOP) para un volumen total de 50 mL	13
Tabla 5. Géneros bacterianos de relevancia en medicina veterinaria seleccionados para inoculación en medio modificado (MOP)	18
Tabla 6. Tasa de crecimiento en fase exponencial y tiempo de duplicación	22

Índice de figuras

Figura 1. Humedales urbanos seleccionados para la obtención y aislamiento de microorganismos.	9
Figura 2. Flujograma metodología.....	15
Figura 3. Colonias bacterianas aisladas desde muestras de agua en medios selectivos y diferenciales	16
Figura 4. Confirmación de amplificación gen 16S a través de electroforesis en gel de agarosa.....	17
Figura 5. Potencial de hidrógeno en medio modificado (MOP)	19
Figura 6. Visualización macroscópica de crecimiento de bacterias seleccionadas en medio MOP.....	20
Figura 7. Densidad óptica (OD ₆₀₀) en medios de cultivos a través del tiempo.....	21
Figura 8. Visualización microscópica <i>E. coli</i>	23
Figura 9. Visualización microscópica <i>C. freundii</i>	23
Figura 10. Visualización microscópica <i>A. salmonicida</i>	23
Figura 11. Visualización microscópica <i>Yersinia spp</i>	24
Figura 12. Visualización microscópica <i>Flavobacterium spp</i>	24
Figura 13. Visualización microscópica <i>Pseudomona spp</i>	24
Figura 14. Visualización microscópica <i>Staphylococcus spp</i>	25
Figura 15. Visualización microscópica <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	25

Resumen

Los humedales urbanos son ecosistemas complejos, capaces de albergar una gran biodiversidad y prestar múltiples servicios ecosistémicos. Sin embargo, también pueden actuar como reservorio de diversos agentes bacterianos capaces de afectar la salud humana, animal y ambiental. Con la finalidad de profundizar en bacterias patógenas en sanidad animal, se aislaron un total de 72 cepas bacterianas de muestras de agua recolectadas en varios humedales urbanos de la Región de Los Lagos, las cuales se cultivaron en medios selectivos y diferenciales. Mediante la visualización microscópica y PCR de colonia que amplifica para el gen 16S, se identificaron y seleccionaron aquellas bacterias de relevancia en Medicina Veterinaria, tales como *Pseudomonas spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Aeromonas salmonicida*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Yersinia spp.*, *Staphylococcus spp.*, y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Con el objetivo de facilitar el crecimiento de diversas bacterias de relevancia en Medicina Veterinaria, se desarrolló un medio de cultivo modificado, a partir del medio ZMB1, el cual fue nombrado MOP. Los resultados del estudio mostraron que el medio modificado permitió un crecimiento óptimo de todas las bacterias seleccionadas, demostrando que es una herramienta útil para el monitoreo de cuerpos de aguas y la caracterización de diversos patógenos que impactan a nivel de una salud.

Palabras Clave: *Humedales urbanos, una salud, bacterias patógenas, ARNr 16S, medio de cultivo.*

Abstract

Urban wetlands are complex ecosystems, capable of hosting great biodiversity and providing multiple ecosystem services. However, they can also act as a reservoir for various bacterial agents capable of affecting human, animal and environmental health. To delve deeper into pathogenic bacteria in animal health, a total of 72 bacterial strains were isolated from water samples collected in several urban wetlands in the Lagos Region, which were cultured in selective and differential media. Through microscopic visualization and colony PCR that amplifies the 16S gene, those bacteria of relevance in Veterinary Medicine are identified and selected, such as *Pseudomona spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Aeromona salmonicida*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Yersinia spp.*, *Staphylococuss spp.*, and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

With the aim of facilitating the growth of various bacteria of relevance in Veterinary Medicine, a modified culture medium was developed from the ZMB1 medium, which was called MOP. The results of the study showed that the modified medium allowed optimal growth of all the selected bacteria, demonstrating that it is a useful tool for monitoring water bodies and the characterization of various pathogens that impact health.

Keywords: *Urban wetlands, one health, pathogenic bacteria, 16S rRNA, culture media.*

1. Introducción

1.1 Una salud: origen y fundamentos

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 ideas en torno a este concepto nacen con Hipócrates (460-370 AC), quien planteó una estrecha relación entre la salud, ambiente y prevalencia de enfermedades infecciosas (Zunino, 2018). En el año 1855, Rudolf Virchow, introduce el término “zoonosis”, sosteniendo que no existen líneas divisorias entre la medicina animal y humana. Un siglo más tarde, Calvin Schwabe en su libro “Medicina Veterinaria y Salud Humana” propuso el concepto de una medicina, indicando que existen similitudes entre la medicina humana y veterinaria, y que, para poder hacer frente a las enfermedades compartidas, es necesario realizar estudios colaborativos (Sánchez et al., 2022).

En la actualidad varios factores son considerados responsables del aumento de frecuencia e intensidad de transmisión de enfermedades infecciosas entre humanos y animales. Dentro de estos se pueden mencionar ciertas actividades de carácter antrópico, como la fragmentación de hábitat, contaminación e introducción de especies, todos aquellos potenciados por el cambio climático (Medina, 2010). Bajo ese contexto, en el año 2021 se publicó la “Guía tripartita para hacer frente a las enfermedades zoonóticas” a cargo del trabajo colaborativo entre la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), con el objetivo de proporcionar orientación y herramientas a los países para enfrentar las enfermedades de carácter zoonóticas, además de otras emergencias sanitarias de relevancia en la salud humana, animal y ambiental (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2019).

Diversos temas son abordados desde la perspectiva de una salud. Entre ellos se mencionan las zoonosis emergentes y endémicas, resistencia a los antimicrobianos y seguridad alimentaria (Mackenzie y Jeggo, 2019). Para el manejo de estos problemas, es fundamental el reconocimiento de la interconexión entre la salud humana, animal y de

vida silvestre. Además de la inversión en políticas públicas, investigación y educación, que permitan generar acciones concretas a nivel mundial (Wildlife Conservation Society [WCS], 2020).

1.2 Humedales

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). Se consideran indispensables para la sobrevivencia humana, ya que albergan gran diversidad biológica y brindan múltiples servicios ecosistémicos (Fundación Aquae, 2019). Según el Millennium Ecosystem Assessment (2005) dentro de las funciones ecosistémicas de los humedales se encuentra la purificación del agua, desintoxicación de residuos, regulación del clima, y mitigación del cambio climático. Pese a su importancia, estimaciones científicas indican que desde 1900 han desaparecido el 64% de los humedales a nivel mundial (Davidson, 2014). Es por tal razón, que en el año 1975 entró en vigor la convención sobre los Humedales, un tratado intergubernamental, que tiene como objetivo proteger estos cuerpos de agua (Wetlands International, 2021).

Bajo su resguardo, 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 (p.9).

Según RAMSAR en “La Perspectiva mundial sobre los humedales” (2021) la extensión de humedales a nivel mundial comprende entre 1.500 a 1.600 millones de hectáreas, pero en comparación al año 2018 esta cifra ha disminuido. Frente a ello, cada vez son más países que implementan planes estratégicos para la monitorización y vigilancia de humedales y, mediante indicadores de alerta temprana les es posible identificar dónde están, cuál es su condición, cuales necesitan restauración o protección y que actividades están influyendo en sus características ecológicas (Ministerio del Medio Ambiente [MMA], 2013).

En el caso particular de Chile, debido a sus características biogeográficas, es posible encontrar todos los tipos de humedales, a excepción de arrecifes de coral y manglares (WCS, 2019). Con el fin de protegerlos, Chile se suscribió a la Convención de Ramsar en el año 1981 y, actualmente se encuentran declarados 16 sitios Ramsar, que corresponden a 363.927 hectáreas del territorio nacional (RAMSAR, 2018). A esto se suma que en el año 2020 se promulgó la Ley 21.202 “Ley de Humedales Urbanos”, que establece el marco legal para la protección de humedales ubicados dentro del área urbana (Ley N° 21.202, 2020). En base a los datos entregados por el Ministerio del Medio Ambiente en la plataforma de distribución de humedales, hasta el año 2023 se han reconocido a nivel nacional 5,59 millones de hectáreas, siendo el 9,5% correspondiente a humedales urbanos. En relación con la Región de los Lagos, estos representan el 46% del total de humedales (MMA, 2023).

1.3 Microorganismos bacterianos de relevancia en Medicina Veterinaria presentes en cuerpos de agua

El ambiente desempeña un papel esencial en el desarrollo de las enfermedades. Ciertos factores como la higiene, temperatura, contaminación atmosférica y calidad del agua pueden influir en la propagación de agentes infecciosos (Bonita et al., 2019). Desde el punto de vista bacteriológico, los agentes que son transmitidos por fuentes de contaminación, tales como el agua, representan un problema a nivel mundial, debido a que se les relaciona a la presentación de múltiples enfermedades. Algunas especies de bacterias tales como *Bacillus anthracis*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani* y *Clostridium difficile*, se han logrado aislar desde fuentes hídricas subterráneas. Ambos géneros poseen especies patógenas que pueden amenazar la salud animal y humana (Ríos et al., 2017). Sin embargo, aquellas bacterias no patógenas también revisten importancia en cuanto a salud pública, debido a que muchas de ellas poseen capacidad de almacenar genes de virulencia y resistencia a antimicrobianos en elementos móviles tales como los plásmidos (Ruiz, 2018).

Múltiples géneros bacterianos inciden en la salud animal. Frente a diversas situaciones sanitarias, en Medicina Veterinaria surge la necesidad de implementar acciones de vigilancia epidemiológica. Estas medidas permiten determinar la ausencia o presencia de enfermedades, distribución e impacto sanitario, mediante el desarrollo de programas de

control y erradicación (OIE, 2010). Con tales fines, el Servicio Agrícola y Ganadero desarrolló una lista de enfermedades de denuncia obligatoria en Chile en la que se mencionan ciertas patologías de carácter bacteriano.

Tabla 1. Lista de patologías de carácter bacteriano presentes en el territorio nacional de denuncia obligatoria al Servicio Agrícola y Ganadero (2019).

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

Fuente: Elaboración propia. Datos tomados de lista de enfermedades de denuncia obligatoria (EDO) al SAG (2019).

Dentro de las enfermedades de notificación obligatoria al SAG se encuentra el ántrax o carbunco bacteridiano, causada por *Bacillus anthracis*, una bacteria bacilar grampositiva que forma esporas. Afecta principalmente a herbívoros, sin embargo, todos los mamíferos, incluidos los humanos, y algunas especies de aves, pueden contraerlo. Los animales se infectan por ingestión de esporas o picadura de insectos hematófagos, las esporas penetran en el cuerpo de un animal por ingestión, inhalación o a través de heridas en la piel, allí germinan y causan la enfermedad. El cuadro clínico puede estar acompañado de fiebre progresiva, inapetencia, debilidad, y muerte en menos de 24 horas (OIE, 2023). El carbunco es de distribución mundial y cursa con una alta mortalidad en los rumiantes (SAG, 2018).

Otro género bacteriano capaz de impactar en la salud humana y animal es *Salmonella* spp., un bacilo móvil gramnegativo no esporulado. Se comprende de 2 especies, *S. bongori* y *S. entérica*, la cual a su vez se clasifica en seis subespecies. Hoy en día se conocen más de 2600 serovariedades, que se diferencian en el tipo de hospederos que infectan y manifestaciones clínicas que producen (Instituto de Salud Pública de Chile [ISPCH], 2019). En equinos la serovariedad más importante es *S. typhimurium*, la cual se encuentra en ambientes contaminados y portadores sanos. Frente a situaciones de estrés se pueden desencadenar cuadros de septicemia o afecciones entéricas. En el caso de rumiantes, la mayoría de las infecciones están dadas por *S. typhimurium* y *S. Dublin*, siendo los terneros los más afectados. Al igual que en equinos se describen dos formas de presentación, una forma entérica y otra septicémica. El cuadro digestivo se caracteriza por la presentación de enteritis fibrinosa/hemorrágica, la cual puede llevar a la muerte en los tres días posteriores iniciados los signos clínicos (Paredes et al., 2021). En la industria avícola se reconocen dos serovariedades de *S. entérica*: *S. pullorum* y *S. gallinarum*, que pueden producir la pullorosis y la tifosis aviar, respectivamente. Si bien ambas enfermedades son semejantes, las aves jóvenes son más afectadas por la pullorosis mientras que las aves en crecimiento son más susceptibles a la tifosis aviar. Los signos clínicos comprenden fiebre tifoidea, diarrea blanquecina, distensión abdominal y retraso de crecimiento, además del establecimiento de estado portador en el 60% de las aves infectadas (Dávila y Ortiz, 2022).

Existen otros agentes bacterianos que no se mencionan en la lista, pero que se eventualmente se encuentran en cuerpos de agua y podrían impactar en la salud animal, estos son *Leptospira spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp.*, *Escherichia coli*, *Rickettsia spp.*, *Aeromonas spp.*, *Listeria monocytogenes* y *Clostridium spp.* (Rahman et al., 2020).

Las fuentes hídricas, tanto superficiales como subterráneas, son muy susceptibles a la contaminación. En su mayoría presentan patógenos intestinales procedentes de heces humanas y animales (Olivas et al., 2011). Debido a eso, el estudio del agua mediante bioindicadores de contaminación resulta determinante en el área de salud pública. Respecto a lo anterior, durante el año 2021, con el fin de identificar microorganismos bacterianos de interés en medicina veterinaria en cuerpos de agua, se muestrearon los humedales urbanos de Llanquihue (El Loto, Las Ranas y Baquedano) y Puerto Varas (Cerro Calvario, Colon, Doña Ema, Gramado, Mirador Volcanes y Quebrada Parque), determinándose la presencia de *Mycobacterium spp.*, *Brucella spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Leptospira spp.*, *Flavobacterium spp.* y *Microcystis spp.* (Cárdenas, 2023).

1.4 Medios de cultivos y criterios para su modificación

Los medios de cultivos son preparados químicos, artificiales y estériles, que bajo condiciones controladas permiten el crecimiento y desarrollo de microorganismos. Se utilizan para aislar especies de interés científico, que luego, mediante otras técnicas de laboratorio, son identificadas y caracterizadas. Si bien existen diversos tipos de medios, la elección depende de los requerimientos del microorganismo (Serrano y Gutiérrez, 2018). A modo general los medios de cultivos se clasifican en sólidos, semisólidos o semilíquidos y líquidos. Dependiendo la finalidad del medio de cultivo, pueden ser especiales (favorece el desarrollo de tan solo un tipo de microorganismo) o comunes (favorecen el desarrollo de gran variedad de microorganismos) (Rodríguez y Zhurbenko, 2018a). Sin embargo, aun cuando se espera obtener varios tipos de bacterias en un medio nutritivo, existe un amplio grupo que no se desarrolla óptimamente, y otros que simplemente no crecen. En relación con lo anterior, podría haber una serie de factores asociados, como la estricta dependencia de otros microorganismos para vivir, desconocimiento de sus requerimientos nutricionales o la imposibilidad de reproducir las

condiciones que permitan su desarrollo (Caycedo et al., 2021). Para lograr el enriquecimiento de un medio, se pueden incorporar ciertos elementos, como fuentes de carbono y nitrógeno, carbohidratos, sales minerales, factores de crecimiento, antioxidantes, entre otros. Adicional a esto, se deben controlar parámetros térmicos y atmosféricos (Bonnet et al., 2020)

Para el estudio y caracterización de una especie bacteriana, es necesario conocer las condiciones que permiten su crecimiento y la relación que mantienen con otras especies, ya sean de tipo sinérgica o antagónica. Por consiguiente, se requiere de un medio de cultivo modificado que permita el desarrollo de varias especies de manera simultánea. En cuanto a la modificación de un medio de cultivo, consiste en adaptar variables independientes, como las concentraciones y/o tipos sustratos, para luego cuantificar las variables dependientes, como producción de biomasa, tasa de crecimiento, cantidad de especies capaces de desarrollarse en un mismo medio, entre otros.

En el presente estudio se modificará un medio de cultivo tomando como referencia el medio Zhang Mills Block 1 (ZMB1), que permite el crecimiento de diferentes tipos de bacterias de manera simultánea (Medina et al., 2017). Se modificará con el fin de permitir el crecimiento y desarrollo de aislados bacterianos obtenidos desde humedales urbanos de la Región de los Lagos, que puedan representar un riesgo sanitario para salud animal. En el área de Medicina Veterinaria, contar con un medio que tenga estas características permitirá estudiar en mayor profundidad agentes microbiológicos ubicuitarios de relevancia en salud pública. Además, posibilitará conocer las condiciones fisicoquímicas que propician el crecimiento de estas bacterias bajo condiciones de laboratorio.

2. Hipótesis

El desarrollo de un medio de cultivo mediante la modificación de sustratos permitirá el crecimiento de bacterias de relevancia en Medicina Veterinaria obtenidas desde humedales urbanos de la Región de los Lagos.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Modificar un medio de cultivo que permita el crecimiento de diversas bacterias de relevancia veterinaria aisladas en humedales urbanos de la Región de los Lagos.

3.2 Objetivos Específicos

- I. Aislar bacterias desde humedales urbanos de la Región de los lagos y seleccionar aquellas de interés veterinario.
- II. Modificar el medio de cultivo Zhang-Mills-Block 1 (ZMB1) Media, para que permita la proliferación de las bacterias seleccionadas.
- III. Evaluar crecimiento de las bacterias seleccionadas en el medio de cultivo modificado.

4. Materiales y métodos

4.1 Tipo de estudio

Este estudio es de tipo experimental descriptivo (Hernández et al., 2014). Se llevó a cabo bajo condiciones controladas en el Laboratorio Institucional de la Universidad San Sebastián, Sede de la Patagonia, ubicado en la Ciudad de Puerto Montt, Chile. Para ello, se utilizaron metodologías en el área de microbiología y biología molecular.

4.2 Selección de microorganismos bacterianos

4.2.1 Muestras

Las muestras de agua, a partir de las cuales se aislaron los microorganismos, fueron recolectadas en humedales urbanos de la Región de los Lagos, específicamente en la ciudad de Osorno (Las Quemadas y Ovejería), Llanquihue (El Loto, Baquedano, Teodosio Sarao y Las Ranas), Puerto Varas (Marina, Quebrada Parque y lago Llanquihue) y Puerto Montt (Luis Ebel, Antiñir, Rupalán, Mirasol).



Figura 1. Humedales urbanos seleccionados para la obtención y aislamiento de microorganismos.

De cada humedal se recolectó un litro de agua en frascos estériles, los cuales fueron trasladados al Laboratorio Institucional de la Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia, con el propósito de aislar microorganismos bacterianos.

4.2.2 Aislamiento de cepas bacterianas

Para la obtención de las cepas, de cada frasco se extrajeron 0,3 mL de agua con una micropipeta, los cuales se sembraron en placas Petri con medios selectivos y diferenciales, como el agar tripticosa soya, agar MacConkey, agar Müeller Hinton, agar BHI y agar EMB, todos ellos comúnmente utilizados en el campo de la Medicina Veterinaria (Rodríguez y Zhurbenko, 2018b). Los cultivos se incubaron a 25°C durante 24-48 horas en condiciones aerobias, hasta obtener colonias bacterianas que fueron nuevamente aisladas en los medios de cultivo previamente mencionados.

4.2.3 Identificación de bacterias

Para la identificación de bacterias de relevancia en Medicina Veterinaria, se amplificó el ADN de las bacterias aisladas mediante la aproximación conocida como PCR de colonia, la que amplifica el gen 16S-rRNA utilizando los cebadores 27F y 1492R (Weisburg et al., 1991). Las bacterias se colocaron en tubos eppendorf de 0,2 mL, los cuales en su interior contenían agua libre de nucleasa. Las muestras fueron previamente homogenizadas y centrifugadas, al igual que los reactivos de PCR. A continuación, se detallan los volúmenes utilizados para la preparación de la premezcla.

Tabla 2. Volúmenes de PCR Universal: Partidores universales para amplificación de gen 16s.

Volúmenes de reacciones	30 µl	50 µl
Buffer blanco	6 µl	10 µl
MgCl ₂ (25mM)	4,8 µl	8 µl
dNTP's µM	1,5 µl	1 µl
P F µM	1 µl	0,85 µl
Primer R µM	1 µl	0,67 µl
Gotaq	0,2 µl	0,3 µl

Agua	14,5 µl	28,2 µl
DMSO 5%	3 µl	5 µl
DNA	1 µl	2 µl

Fuente: Elaboración propia a partir de protocolo laboratorio institucional Universidad San Sebastián (Opitz, S/f). Los dNTP's corresponden a una mezcla de nucleótidos compuestas de adenina, guanina, citosina y timina, mientras que los Primers 27F y 1492R pertenecen a los cebadores específicos para amplificar el gen 16S rRNA.

Una vez obtenida la mezcla, se repartió el volumen y se añadieron las bacterias a cada microtubo. Luego, se centrifugaron e introdujeron en un termociclador para iniciar el programa de PCR. Las amplificaciones se llevaron a cabo bajo las condiciones descritas en la tabla 3. Finalmente, el proceso de amplificación se confirmó mediante electroforesis con gel agarosa 1,5%, siguiendo los pasos y recomendaciones descritas en la plataforma web Conogasi (Checa, 2020).

Tabla 3. Etapas para la amplificación por PCR en un termociclador.

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	95° C	10 minutos
Ciclos sucesivos de PCR	30	Desnaturalización a 94°C	30 segundos
		Alineamiento a 55°C	60 segundos
		Extensión a 72°C	90 segundos
Extensión final	1	72°C	5 minutos

Fuente: Elaboración propia a partir de protocolo de PCR: reacción en cadena de la polimerasa (Serrato et al., 2014). Un ciclo de amplificación compuesto por: separación de las hebras de ADN (desnaturalización), unión de los cebadores a una secuencia complementaria del ADN molde (alineamiento) y síntesis semiconservativa de una nueva cadena por acción de la ADN polimerasa (extensión).

Para la identificación de la especie bacteriana, el ADN obtenido fue enviado en tubos Eppendorf al laboratorio biotecnológico Macrogen, donde se amplificó y secuenció mediante el método de secuenciación de Sanger. Este método utiliza nucleótidos modificados (ddNTP) para detener el proceso de replicación y obtener fragmentos de distintas longitudes, cuyos patrones, obtenidos mediante electroforesis, permiten interpretar las secuencias de ADN (Estrada, 2017). Una vez obtenidas las secuencias de ADNr 16S, se compararon con las disponibles en la base bioinformática BLASTn, que, a través de un alineamiento basado en el score, permitió determinar las especies presentes en las muestras (Altschul et al., 1990).

Por otro lado, se utilizó microscopia óptica para identificar a los géneros bacterianos presentes. Para ello, se depositó una gota de agua destilada en un portaobjetos y, con un asa de siembra, se extrajo el inóculo desde un cultivo bacteriano, el cual se distribuyó uniformemente en el portaobjeto. Posteriormente, se realizó la fijación con el calor de un mechero, lo que permitió matar las bacterias y adherirlas al portaobjeto. A cada muestra se le realizó una tinción de Gram, que proporcionó información sobre el tipo celular y morfología, observándose al objetivo 100x del microscopio (Reynoso et al., 2015).

Para describir el género presente en cada muestra, se consultó como material bibliográfico el libro “Diagnóstico microbiológico” (2009), que contiene información específica sobre las características morfológicas de géneros bacterianos relevantes en el área de medicina veterinaria.

4.3 Modificación del medio de cultivo

Para la modificación del medio de cultivo, se aplicó una metodología empírica (Gómez y Batista, 2006). En este caso se tomó como referencia el medio de cultivo Zhang Mills Block 1 modificado, una modificación que se llevó a cabo por Medina et. (2017b), que tiene la particularidad de permitir el crecimiento simultáneo de múltiples géneros bacterianos. Con el objetivo de reducir los grupos químicos, se seleccionaron aquellos reactivos esenciales para el crecimiento bacteriano, los cuales se agruparon en un grupo fijo compuesto por vitaminas y minerales (véase en el anexo 1). Además, se añadió tripticasa de soya y agua previamente auto clavada. Los volúmenes utilizados se detallan a continuación.

Tabla 4. Composición de medio de cultivo modificado (MOP) para un volumen total de 50 mL.

Componentes	Volumen
Grupo fijo	11 mL
Tripticasa soya	13 mL
H ₂ O	26 mL

Fuente: Elaboración propia. Las concentraciones de los grupos fijos mantuvieron las descritas por Medina et., 2017.

El nuevo medio de cultivo conservó ciertas características fisicoquímicas, como pH 7,0 y una temperatura de 20°C. Los géneros bacterianos previamente aislados y seleccionados fueron inoculados en el medio modificado. Para ello se repartió el volumen final del medio de cultivo en nueve tubos falcon, en los cuales se añadieron las bacterias de manera asincrónica, con el fin de describir sus tasas de crecimiento.

4.4 Crecimiento bacteriano en medio de cultivo

El crecimiento celular se monitoreó de manera indirecta mediante la cuantificación de absorbancia a 630 nm, utilizando el microespectrofotómetro Nano-400A (ALLSHENG®). Las mediciones se realizaron en un rango de absorbancia de 600-630 nm de longitud de onda (Kittiborwornku et al., 2021), y se efectuaron cada 3 horas durante 30 horas, lo que permitió obtener curvas de crecimiento. Estas curvas permitieron modelar el número de microorganismos en función del tiempo y la identificación de las fases de adaptación, crecimiento exponencial y periodo estacionario (Garre et al., 2016). La viabilidad bacteriana no fue evaluada, siendo la observación de densidad óptica el método indicador de crecimiento bacteriano.

4.5 Representación de datos

Los resultados se registraron en tablas de Microsoft Excel ® versión 2309, ya que esta herramienta facilita la representación de los datos mediante ilustraciones y gráficos. Para

ello, se utilizaron gráficos lineales que permitieron modelar las tasas de crecimiento bacteriano en función del tiempo.

4.6 Resumen del flujo de trabajo a realizar

Las muestras provenientes desde humedales urbanos en la Región de Los Lagos fueron sembradas en medios selectivos y diferenciales. Una vez obtenidas las colonias, se realizó PCR de colonia y se procedió a la visualización microscópica con el fin de identificar los géneros bacterianos presentes en las muestras. Se seleccionaron aquellos géneros de relevancia en Medicina Veterinaria, y posteriormente se sembraron en el medio de cultivo modificado. El crecimiento bacteriano se midió mediante espectrofotometría hasta obtener curvas de crecimiento. En la siguiente figura se observa el flujo de trabajo realizado para el desarrollo experimental de este estudio.

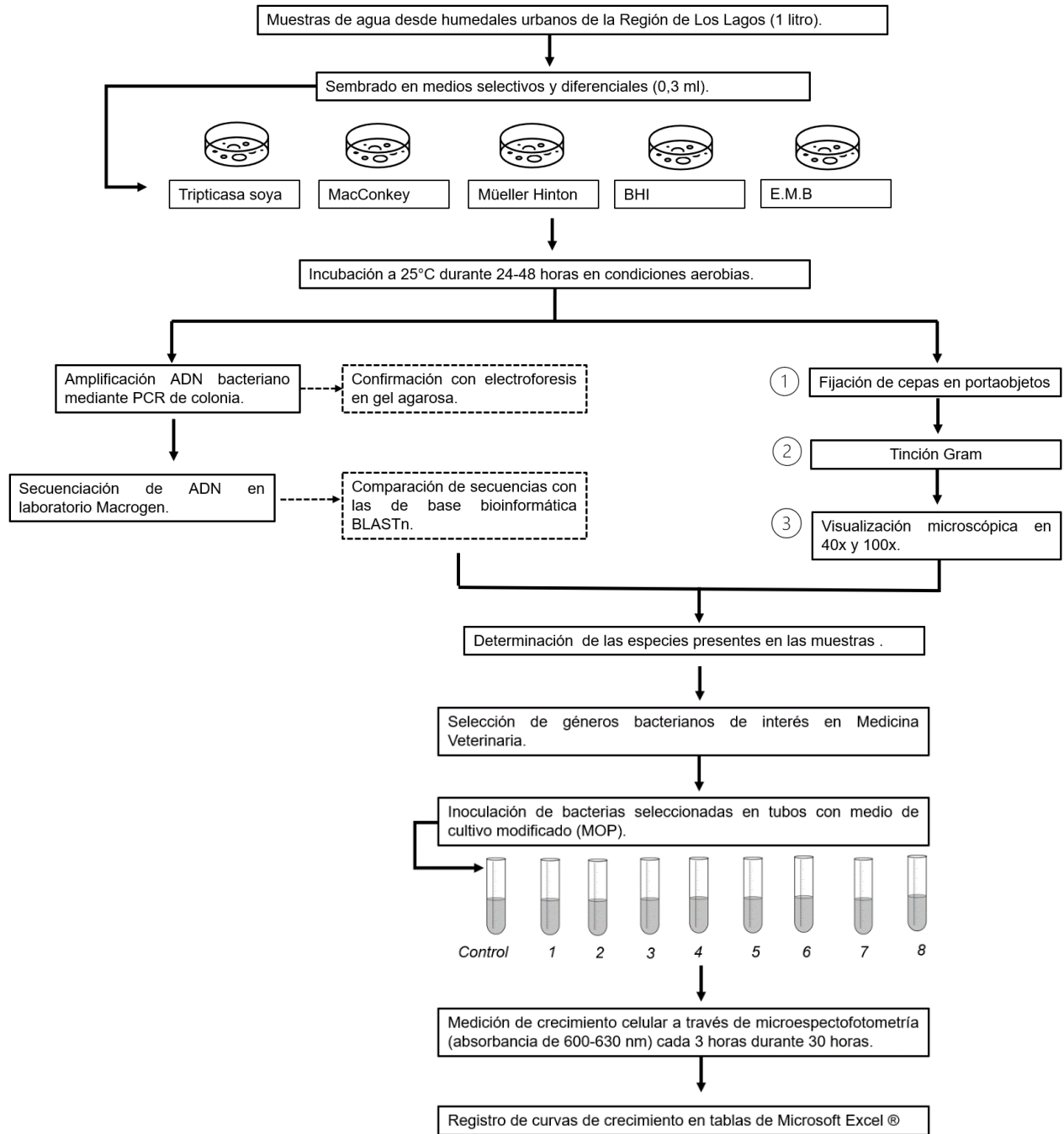


Figura 2. Flujograma metodología. En donde se observan las etapas de obtención de colonias bacterianas, selección de aquellos géneros de relevancia en Medicina Veterinaria y evaluación de crecimiento en el medio de cultivo modificado. *Fuente: elaboración propia.*

5. Resultados

5.1 Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas obtenidas desde humedales urbanos de la región de Los Lagos

Se aislaron 72 cepas bacterianas a partir de muestras de agua recolectadas en diversos humedales urbanos de la Región de Los Lagos. En la siguiente figura se observan y describen algunas de las colonias obtenidas en medios selectivos y diferenciales, las cuales fueron utilizadas para la realización de PCR colonia (Figura 2).

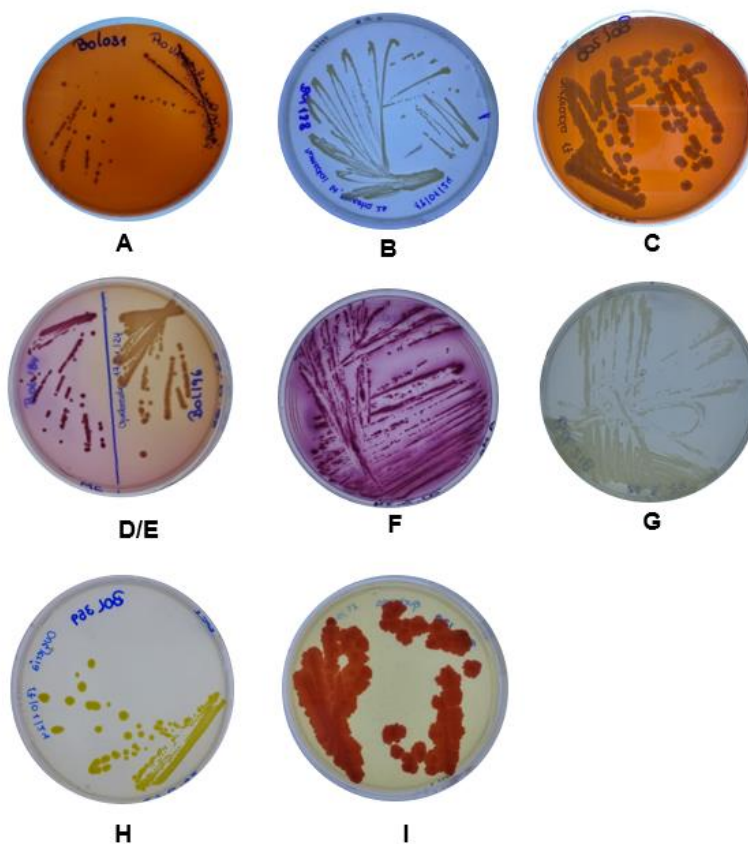


Figura 3. Colonias bacterianas aisladas desde muestras de agua en medios selectivos y diferenciales. (A) Colonias puntiformes color negro con reflejo verdoso en agar eosina y azul de metileno; (B) Colonias puntiformes e incoloras en agar Müller Hinton; (C) Colonias circulares redondeadas, mucosas y color rosado pálido en agar eosina y azul de metileno; (D) Colonias puntiformes color rosado, lactosa positiva en agar MacConkey; (E) colonias puntiformes e incoloras, lactosa negativa en agar macconkey; (F) Colonias puntiformes color rosado, lactosa positiva en agar MacConkey; (G) Colonias puntiforme incoloras en agar tripticasa soya ;(H) Colonias puntiformes y circulares de color amarillo en agar tripticasa soya; (I) Colonias planas e irregulares color rojo en agar BHI. *Fuente: elaboración propia.*

5.2 Identificación de bacterias aisladas desde humedales urbanos de la Región de Los Lagos

5.2.1 Confirmación de amplificación gen 16s para la identificación bacteriana

Se obtuvo masa bacteriana de todos los aislados bacterianos en medios selectivos y diferenciales previamente mencionados. Posteriormente, se amplificó el gen 16S en las 72 cepas bacterianas obtenidas utilizando la técnica PCR colonia en un termociclador. Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% TAE. De las muestras 48 de 72 (66,67%) obtuvieron un tamaño molecular similar y atribuibles a una calidad suficiente para ser enviados a secuenciar, siendo de un tamaño alrededor de 1500 pb en los 48 casos. La movilidad electroforética se asoció a un alto tamaño molecular en 24 de 72 (33,33%) de las muestras, encontrándose en el extremo superior del gel. En la siguiente figura se muestra la confirmación en gel agarosa 1,5% del gen 16S en algunas de las muestras obtenidas tras la realización de PCR colonia.

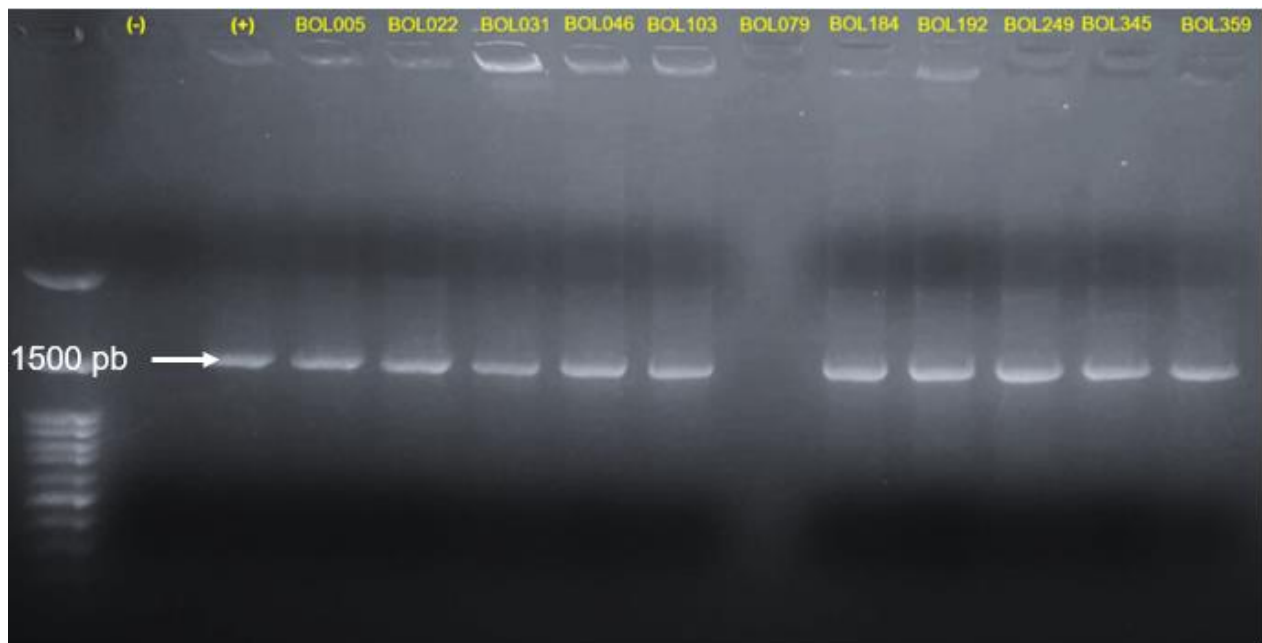


Figura 4. Confirmación de amplificación gen 16S a través de electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para la identificación bacteriana. Se observan las bandas fluorescentes de ADN separadas según su peso molecular, en donde (-) es control negativo y (+) control positivo. Todas las muestras de la figura, a excepción de BOL079 presentaron movilidad electroforética. *Fuente: elaboración propia.*

5.2.2 Secuenciación de ADNr 16s y análisis

De las 48 muestras que presentaron un tamaño similar a 1500 pb, todas fueron enviadas a secuenciar. Sin embargo, tras obtener las secuencias y compararlas con las reportadas en la base de datos de NCBI, se observó que 3 de ellas no presentaron similitud significativa con las secuencias de la base de datos. Las secuencias obtenidas y comparadas (ver anexo 2) presentaron, en su mayoría, altos porcentajes de identidad, siendo los géneros aislados con mayor frecuencia *Pseudomona spp.*, *Serratia spp.*, *Aeromona spp.*, y *E. coli*. En la siguiente tabla se presentan los 8 géneros bacterianos relevantes en Medicina Veterinaria que fueron seleccionados a partir del análisis bioinformático BLASTn para ser sembrados en medio modificado (MOP).

Tabla 5. Géneros bacterianos de relevancia en medicina veterinaria seleccionados para inoculación en medio modificado (MOP).

Identificación	Nombre científico	Valor E	(%) de identidad	N° Acceso NCBI
BOL022	<i>Escherichia coli</i>	0,0	97,51	MN094125.1
BOL046	<i>Citrobacter freundii</i>	0,0	94,76	OP903425.1
BOL192	<i>Aeromona salmonicida</i>	0,0	99,13	CP122987.1
BOL199	<i>Yersinia spp.</i>	0,0	97,05	MN737200.1
BOL249	<i>Flavobacterium spp.</i>	0,0	96,83	AM934670.1
BOL103	<i>Pseudomona spp.</i>	0,0	72,68	JN873160.1
BOL073	<i>Staphylococcus spp.</i>	0,0	95,74	CP150682.1

Fuente: Elaboración propia. El porcentaje de identidad (%) representa la proporción de nucleótidos que coinciden entre la secuencia consultada y la secuencia de referencia en una alineación. La sigla BOL hace referencia al código que utilizamos en el cepario del Laboratorio institucional para la identificación de los aislados.

Además, se seleccionó la cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603, la cual, al ser cultivada y almacenada bajo estrictos controles de calidad, permitió comparar y evaluar el crecimiento de cepas aisladas con una cepa de laboratorio certificada.

5.3 Modificación del medio de cultivo y evaluación de crecimiento bacteriano

Se prepararon los 13 grupos químicos de manera independiente, siguiendo las concentraciones descritas por Medina et al., (2017) y Zhang et al., (2009). De estos, solo los minerales presentaron precipitación, por lo que fue necesario agitar los grupos antes de preparar el grupo final. Una vez obtenido el medio de cultivo modificado, al cual nombramos MOP (Medina, Optiz y Paredes, 2024), se midió el potencial de hidrógeno, el cual resultó en 7 sin modificaciones en equilibrio ácido-base (Figura 12).



Figura 5. Potencial de hidrógeno en medio modificado (MOP). El pH obtenido fue de 7,0 a temperatura ambiental 21,9 °C. *Fuente: elaboración propia.*

Las bacterias seleccionadas y aisladas se inocularon por separado en tubos falcon de 15 mL que contenían 13 mL de medio MOP. Luego de 12 horas de incubación, se observó un evidente crecimiento en 8 de 8 (100%) de los cultivos mediante visualización macroscópica, mientras que el control resultó negativo. La muestra que presentó mayor

turbidez a las 12 horas correspondió a la cepa *K. pneumoniae* ATCC 700603, lo que indicó un crecimiento favorable en aquellas cepas puras.

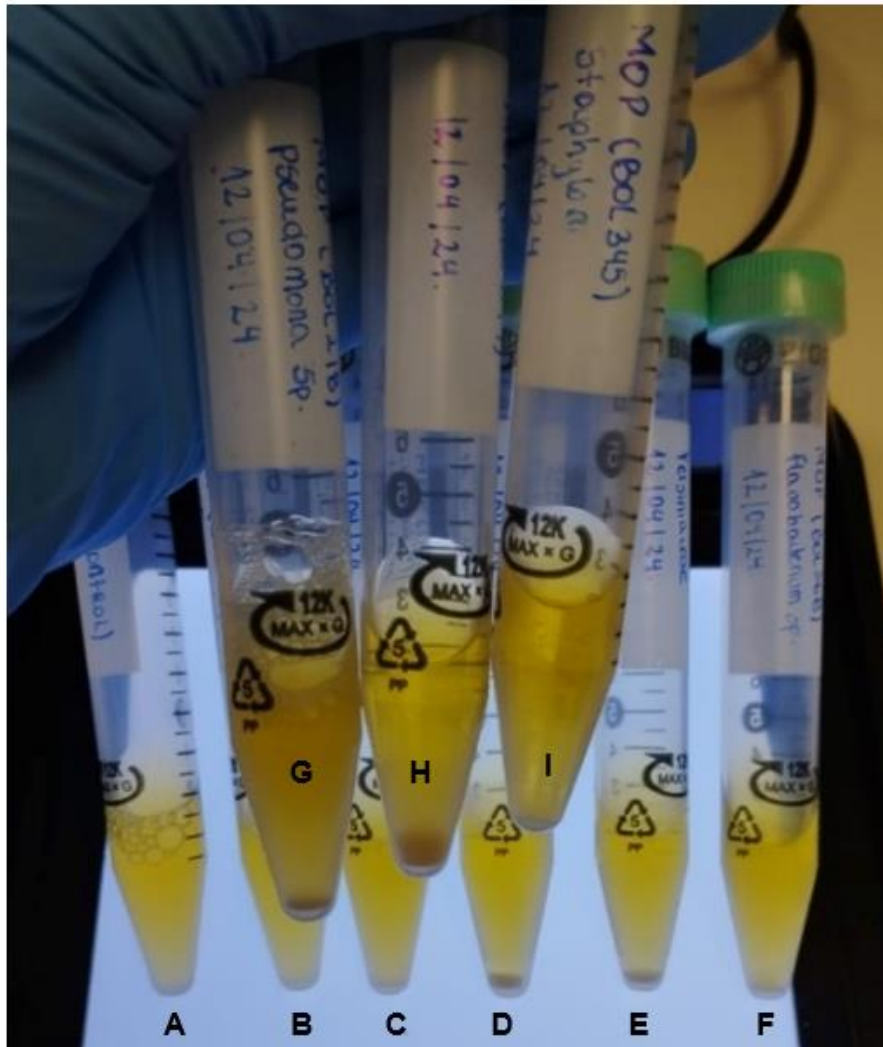


Figura 6. Visualización macroscópica de crecimiento de bacterias seleccionadas en medio MOP. Siendo (A) Control negativo; (B) *E.coli*; (C) *C. freundii*; (D) *A. salmonicida*; (E) *Yersinia spp.*; (F) *Flavobacterium spp.*; (G) *Pseudomonas spp.*; (H) *K. pneumoniae* ATCC 700603; (I) *Staphylococcus spp.*

El crecimiento bacteriano se cuantificó a través de la densidad óptica (OD_{600}) en un micro espectrofotómetro, donde los valores oscilaron entre 1 y 4 unidades de desviación óptica durante 30 horas de cultivo a 25 °C. El valor OD_{600} aumento progresivamente a lo largo del tiempo en los 8 géneros bacterianos, lo que fue atribuible a su crecimiento. Con los datos obtenidos, se determinaron las curvas de crecimiento de cada una de las cepas en

función del tiempo (anexo 3). La mayoría de los géneros bacterianos presentaron un crecimiento exponencial, seguido de una fase estacionaria. *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *C. freundii* se destacaron por su rápido crecimiento y la ausencia de fases adaptativas, mientras que *Pseudomona spp.* mostró dos etapas adaptativas previas a un crecimiento exponencial poco pronunciado. Por otro lado, *A. salmonicida* presentó una fase de declive a partir de las 27 horas. En la siguiente figura se observan, de manera detallada, las curvas de crecimiento de cada una de las bacterias seleccionadas y sembradas en el medio modificado.

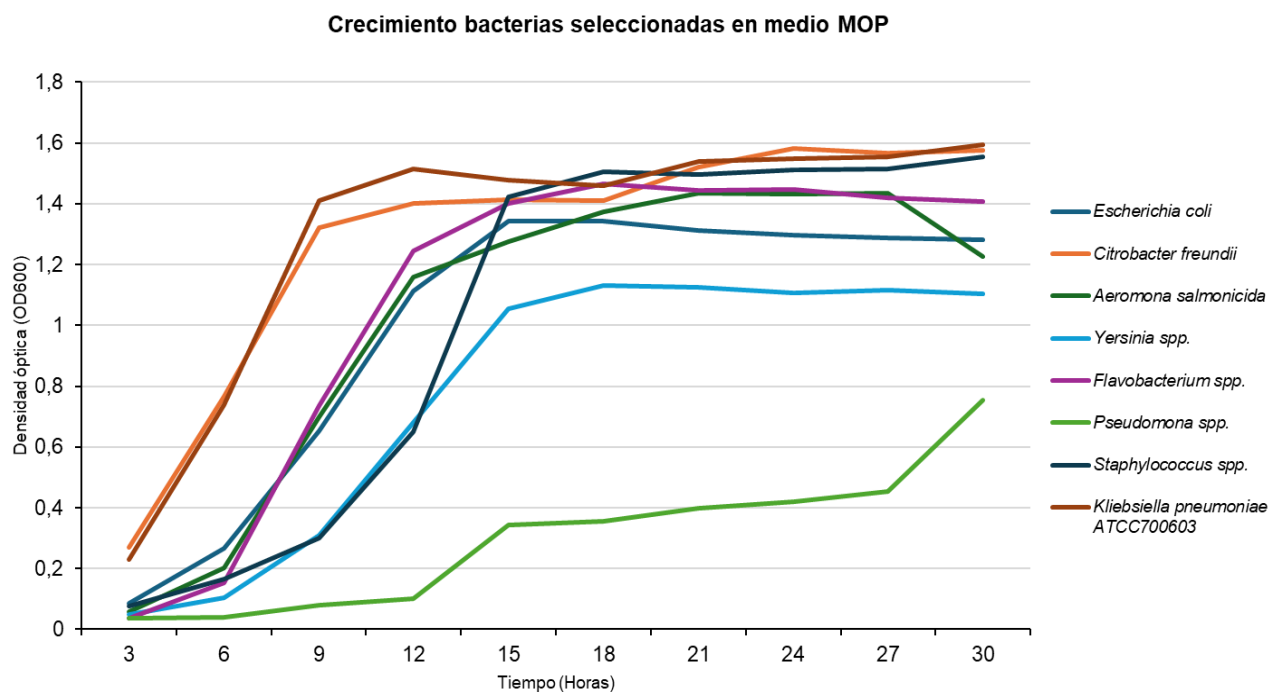


Figura 7. Densidad óptica (OD₆₀₀) en medios de cultivos a través del tiempo. Se observa un aumento progresivo de densidad óptica en el medio MOP para las bacterias seleccionadas.

Con la información obtenida, se calcularon las tasas de crecimiento en Microsoft Excel, considerando la fase de crecimiento exponencial de cada gráfico según cepa, como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 6. Tasa de crecimiento en fase exponencial y tiempo de duplicación.

Cepa	μ (Tasa de crecimiento)	Tiempo duplicación (horas)
<i>E. coli</i>	0,382	1,82
<i>C. freundii</i>	0,497	1,40
<i>A. salmonicida</i>	0,463	1,50
<i>Yersinia spp.</i>	0,181	3,83
<i>Flavobacterium spp.</i>	0,532	1,30
<i>Pseudomona spp.</i>	0	0
<i>Staphylococcus spp.</i>	0,454	1,53
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	0,589	1,18

Fuente: Elaboración propia en Microsoft Excel a partir de curvas de crecimiento de bacterias en medio MOP.

Según la tabla anterior, *K. pneumoniae* ATCC 700603 mostró la mayor tasa de crecimiento y el menor tiempo de duplicación, lo que indica un crecimiento muy rápido en comparación a las otras cepas. En cambio, *Yersinia spp.* presentó la tasa de crecimiento más baja y el mayor tiempo de duplicación. *Pseudomona spp.* no obtuvo fase exponencial en esta tabla, lo que sugiere un retraso en el inicio de esta.

Con el fin de comparar los resultados obtenidos, se realizó una segunda prueba de crecimiento en el medio MOP (Anexo 4), utilizando los mismos géneros bacterianos seleccionados previamente. Durante esta fase, se cuantificó la densidad óptica a 600 nm (OD600) en intervalos de 30 minutos durante un período de 12 horas. Los resultados mostraron que todos los géneros seleccionados presentaron etapas de crecimiento similares a las observadas en la primera prueba.

5.4 Visualización microscópica de bacterias seleccionadas.

La morfología bacteriana de los aislados coincidió con las reportadas en la literatura. La visualización microscópica se realizó antes de la inoculación en medio de cultivo modificado (MOP) y tras la obtención de curvas de crecimiento, observándose en todas las cepas una morfología y tipo celular idénticos. En las siguientes figuras se muestran

los géneros bacterianos identificados mediante microscopía óptica con objetivo de 100x y tinción de Gram. La figura (A) corresponde a la visualización antes de la inoculación en medio MOP, y la figura (B) muestra la visualización posterior a la obtención de las curvas de crecimiento.

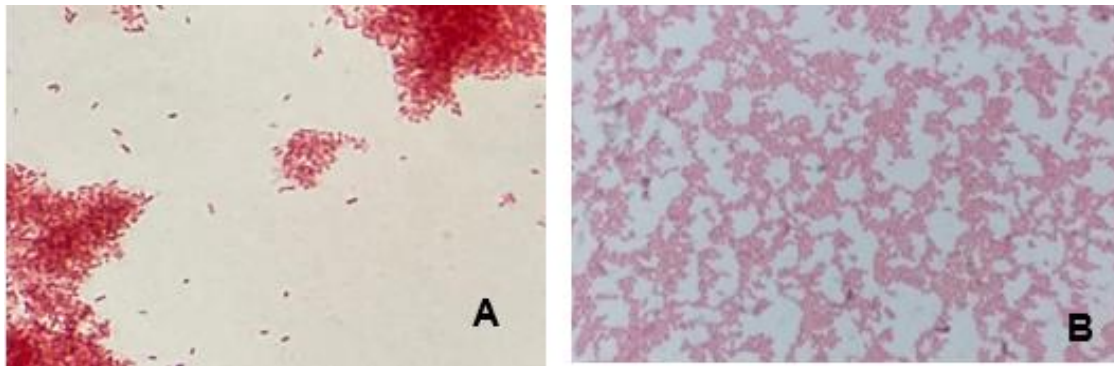


Figura 8. Visualización microscópica *E. coli*. (A) Bacilos gramnegativos; (B) Bacilos gramnegativos. Tinción Gram, objetivo 100x (aumento total 1000).

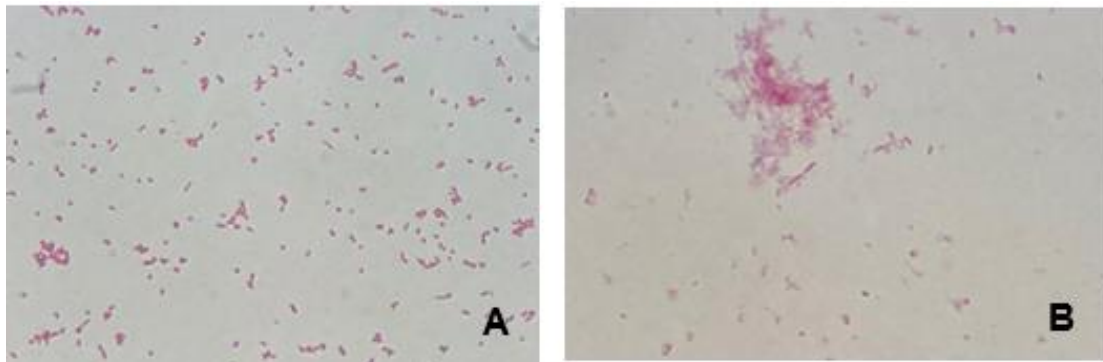


Figura 9. Visualización microscópica *C. freundii*. (A) Bacilos gramnegativos; (B) Bacilos gramnegativos. Tinción Gram, objetivo 100x (aumento total 1000).

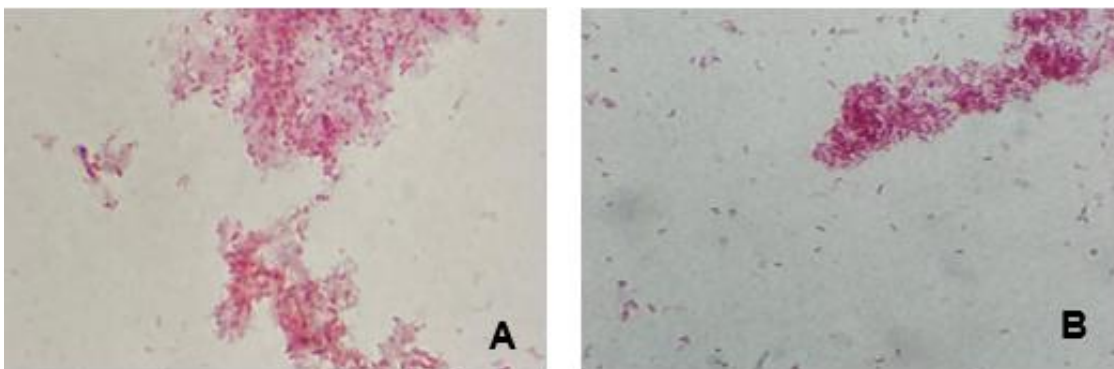


Figura 10. Visualización microscópica *A. salmonicida*. (A) Bacilos gramnegativos; (B) Bacilos gramnegativos. Tinción Gram, objetivo 100x (aumento total 1000).

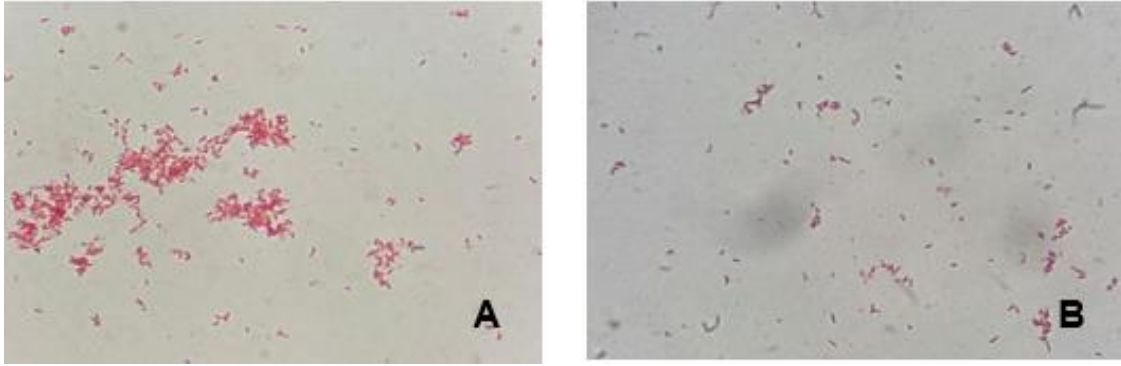


Figura 11. Visualización microscópica *Yersinia spp.* (A) Bacilos gramnegativos; (B) Bacilos gramnegativos. Tinción Gram, objetivo 100x (aumento total 1000).

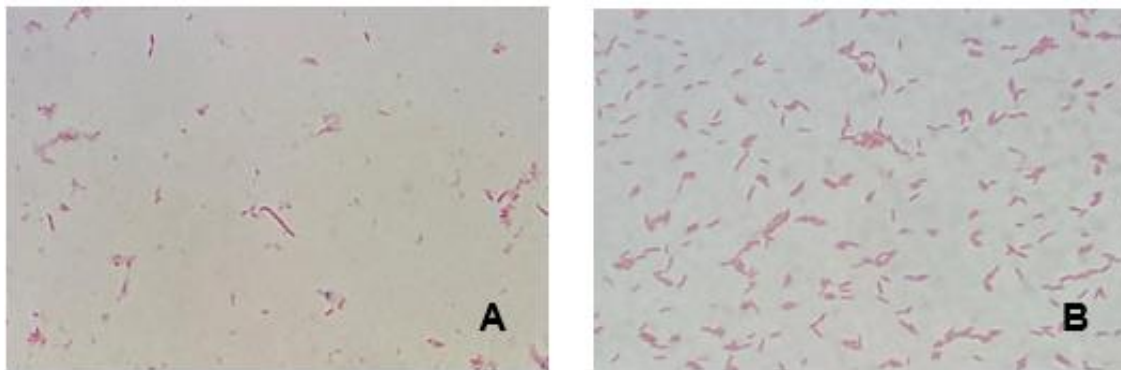


Figura 12. Visualización microscópica *Flavobacterium spp.* (A) Bacilos gramnegativos; (B) Bacilos gramnegativos. Tinción Gram, objetivo 100x (aumento total 1000).

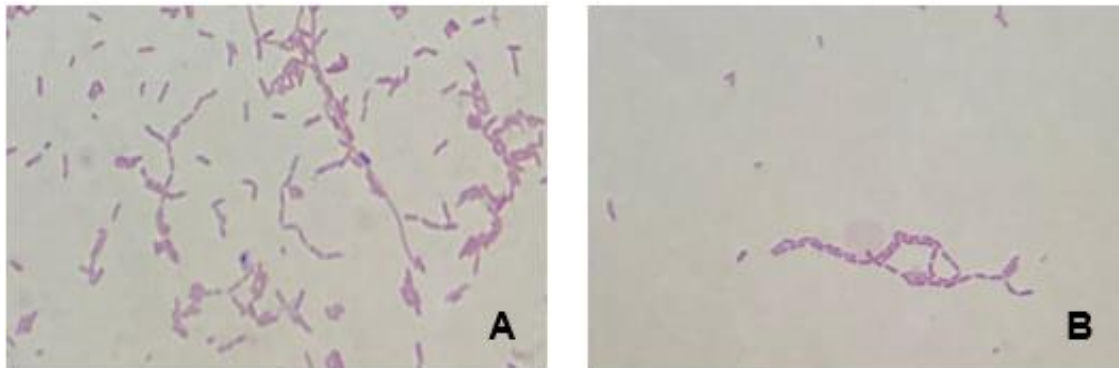


Figura 13. Visualización microscópica *Pseudomonas spp.* (A) Bacilos gramnegativos; (B) Bacilos gramnegativos. Tinción Gram, objetivo 100x (aumento total 1000).

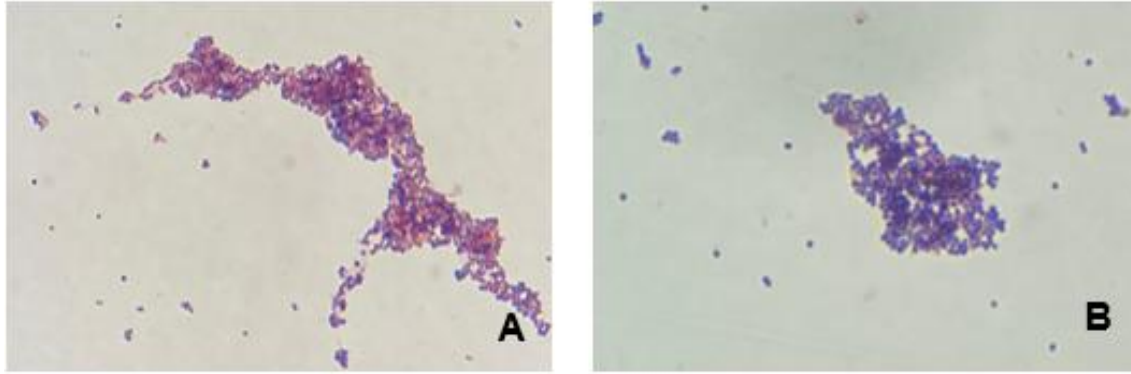


Figura 14. Visualización microscópica *Staphylococcus spp.* (A) Cocos grampositivos; (B) Cocos grampositivos. Tinción Gram, objetivo 100x (aumento total 1000).

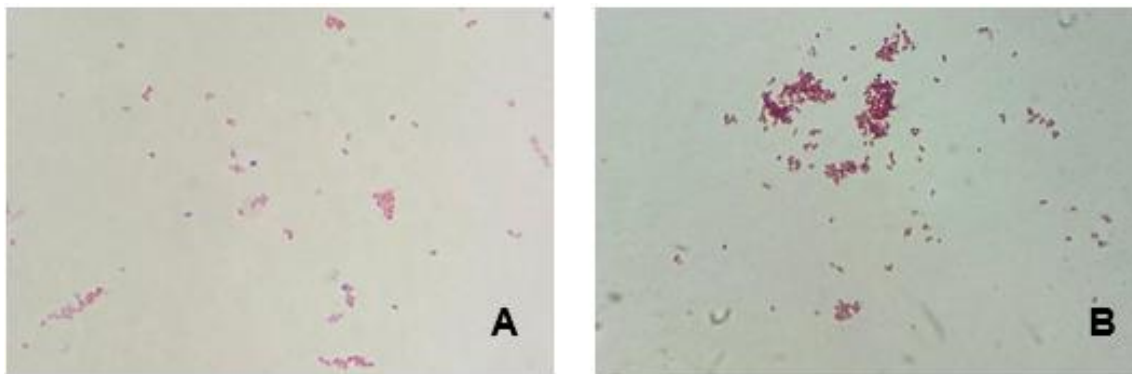


Figura 15. Visualización microscópica *K. pneumoniae* ATCC 700603. (A) Bacilos gramnegativos; (B) Bacilos gramnegativos. Tinción Gram, objetivo 100x (aumento total 1000).

6. Discusión

Este estudio experimental demostró que el medio de cultivo modificado (MOP) favorece el crecimiento de diversas bacterias relevantes en el ámbito de la Medicina Veterinaria, aisladas desde humedales urbanos de la Región de los Lagos. Entre las bacterias aisladas y cultivadas en el medio se incluyeron *E. Coli*, *C. freundii*, *A. salmonicida*, *Yersinia spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Pseudomona spp.*, *Staphylococcus spp.*, y *K. pneumoniae* ATCC 700603, lo que resalta la versatilidad del medio. La modificación del medio de cultivo ZMB-1, mediante la reducción de grupos químicos, permitió obtener curvas de crecimiento para todos los géneros bacterianos seleccionados. Este resultado podría atribuirse a la alta capacidad de adaptación de las bacterias a diversos ambientes, que no siempre resultan beneficiosos para su crecimiento y desarrollo (Troncoso et al., 2017), pero también puede deberse al amplio espectro nutricional que el medio MOP entrega. Otro aspecto observado fue la variabilidad en las curvas de crecimiento entre las diferentes especies bacterianas, lo cual puede explicarse a diversos factores, como diferencias en rutas metabólicas, adaptaciones a nutrientes específicos, o efectos de la dinámica entre bacterias. Para abordar esta variabilidad y obtener una comprensión más precisa de las dinámicas de crecimiento, se recomienda incorporar mediciones de viabilidad bacteriana en futuros estudios. La utilización de métodos basados en cultivo, actividad metabólica e integridad de la membrana permitirían evaluar la proporción de bacterias viables y activas en distintas fases del crecimiento (Tring y Lee, 2022), lo cual proporcionaría datos complementarios a las curvas de crecimiento obtenidas, mejorando la interpretación de los resultados y ayudando a identificar posibles limitantes del medio para cada especie.

El medio ZMB-1 fue diseñado en un inicio para el cultivo de géneros específicos como *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus* (Zhang et al., 2009; Fultz et al., 2022). En otros estudios, ha sido modificado para trabajar con un amplio espectro de géneros bacterianos (Medina et al., 2017). Aunque este medio ha sido utilizado en estudios previos para la caracterización de microbiota intestinal humana, no existen reportes sobre su aplicación en Medicina Veterinaria. Su capacidad para facilitar el crecimiento simultáneo de múltiples especies bacterianas ofrece una ventaja frente a otros medios para el estudio de dinámicas e interacciones bacterianas, un aspecto crítico según Ticer

et al. (2022), quien indica que muchas veces los medios de cultivos tradicionales no cumplen con los requisitos nutricionales de todos los microorganismos que habitan en un nicho y que, la interacción entre especies bacterianas puede influir significativamente en su comportamiento y crecimiento. De hecho, en su estudio demostró que la presencia de *K. pneumoniae* mejora significativamente el crecimiento de *C. difficile* en un medio ZMB-1, destacando la importancia de considerar las interacciones bacterianas en el estudio del microbiota.

A través de la identificación de géneros bacterianos presentes en los humedales urbanos de la Región de los Lagos, se reconoció mayoritariamente la presencia de patógenos oportunistas de origen antropogénico. Según Pavan et al. (2022) la contaminación de aguas superficiales se debe principalmente al vertido de afluentes domésticos, industriales y agropecuarios, que al contener altas concentraciones de nutrientes como fosforo, nitritos y nitratos, favorecen el desarrollo de microorganismos capaces de afectar la salud humana, ambiental y animal. El aislamiento de *E. coli*, y *Citrobacter spp.* en estos cuerpos de agua refuerza la idea de que los humedales urbanos pueden actuar como reservorios de enterobacterias patógenas oportunistas, asociadas principalmente a la contaminación fecal de origen humano y animal (Ríos et al., 2017). La presencia de *E. coli* en humedales urbanos constituye un riesgo significativo para la salud pública, especialmente en aquellas áreas donde estas aguas tienen contacto directo con poblaciones humanas y animales. Según Martínez et al. (2020) *E. coli* es el patógeno intestinal transmitido por agua más frecuente, junto a *salmonella spp.*, y se clasifica en diversos patotipos en función de sus propiedades de virulencia: enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC), enterohemorrágica (EHEC) y de adherencia difusa (DAEC). De acuerdo con lo señalado por Ramos et al., (2020), este patógeno se asocia prominentemente con cuadros entéricos en animales de abasto, como terneros, cerdos y aves. En terneros recién nacidos, el patotipo ETEC reviste de gran importancia por los genes de virulencia que presenta, que le permiten colonizar el intestino delgado y producir una enterotoxina que provoca la hipersecreción de líquido en el lumen intestinal, provocando cuadros de diarrea con altas tasas de morbilidad y mortalidad (Acres, 1985; Awad et al., 2020; Barreto y Rodríguez, 2021). En sistemas de producción avícola, *E. coli* patogénica aviar (APEC)

está relacionada con cuadros de salpingitis, peritonitis, salpingoperitonitis, que impactan negativamente en la en la producción de huevos fértiles, aumentan la contaminación en la incubadora y elevan la tasa de mortalidad embrionaria (Pilar y Gratiniano, 2018). En sistemas de producción porcina, *E. coli* representa un problema sanitario y económico significativo, siendo la colibacilosis porcina una de las infecciones de mayor incidencia en cerdos durante los primeros 21 días de vida, con una morbilidad del 50% y una mortalidad del 5% en Chile (Tichy, 2018; Barreto et al., 2020).

En el caso de *Citrobacter freundii*, se considera principalmente un patógeno de peces de agua dulce. Aunque puede ser aislada del microbiota intestinal de peces sanos, su presencia puede alterar la diversidad y estructura del microbiota intestinal, además de activar el sistema inmunológico innato de la mucosa intestinal (Xiong et al., 2020). Esta bacteria también se ha asociado a cuadros de septicemia y hemorragia en órganos internos y piel en varias especies de peces (Bandeira et al., 2018). Estudios recientes (Cortés et al., 2023) señalan que es común encontrar esta especie en aguas dulceacuícolas eutróficas, desde donde es posible propagarse e infectar a peces, crustáceos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, resultando en cuadros gastrointestinales. Por otro lado, el aislamiento de *A. salmonicida* en humedales urbanos es un hallazgo relevante, ya que su presencia en ambientes acuáticos, especialmente en aguas frías, resulta ser patógena para diversas especies de peces. Según Álvarez et al. (2016), *A. salmonicida* ingresa al pez por lesiones en la piel, branquias o intestino, generando lesiones en tejidos y formación de furúnculos, e incluso cuadros de septicemia. Otros agentes considerados patógenos en peces incluyen varias especies de la familia *Flavobacteriaceae*, como *F. psychrophilum* y *F. columnare*, asociados con cuadros de necrosis ulcerativa en piel e infecciones sistémicas (León et al., 2008; Avendaño et al., 2024). La presencia de microorganismos patógenos puede resultar perjudicial para especies acuáticas y semiacuáticas que se encuentran presentes en humedales. El hallazgo de bacterias relacionadas con enfermedades de peces que no son propias de los humedales podría atribuirse a la acción de vectores como las aves migratorias, que frecuentan estos ecosistemas. De hecho, según Gallardo et al. (2018), los humedales urbanos del sur de Chile albergan una gran diversidad de aves, tanto

residentes como migratorias, convirtiéndolos en puntos ideales para la transmisión de patógenos.

El género *Yersinia spp.* incluye varias especies patógenas de gran relevancia en salud pública debido a su carácter zoonótico. Entre ellas se encuentran *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica*. Los animales desempeñan un papel importante en la transmisión de estos patógenos, por ejemplo, los roedores y aves actúan como portadores de *Y. pseudotuberculosis*, mientras que los cerdos son reservorios importantes de *Y. enterocolitica* (Hordofa,2021). La presencia de *Yersinia spp.* en humedales puede representar un riesgo significativo, ya que su capacidad de persistir en el ambiente facilita su dispersión a través del agua y animales. Según Chlebicz y Śliżewska (2018), los humanos pueden infectarse principalmente por el consumo de alimentos y agua contaminados, aunque también es posible la transmisión por contacto directo con animales domésticos o silvestres que son portadores. En el caso de algunas especies de salmónidos, como las truchas, puede desarrollarse la enfermedad de la boca roja entérica (ERM, por sus siglas en inglés), una infección bacteriana septicémica causada por *Y. ruckeri*. Diversas especies pueden verse afectadas o actuar como vectores, incluyendo esturión, rodaballo, carpín dorado, anguila, carpa común, gaviotas, abadejo, rata de agua, entre otros.

Dentro del género *Pseudomonas spp.*, la especie *P. aeruginosa* tiene una gran relevancia en el área de Medicina Veterinaria. Según Haenni et al. (2015), esta bacteria puede estar presente tanto en animales de abasto como en los animales de compañía, y se ha asociado con infecciones del tracto urinario y cuadros de otitis en perros, mastitis en vacas, endometritis en caballos, y neumonía en zorros y visones. Un aspecto relevante de *P. aeruginosa* es su alta capacidad para desarrollar multirresistencia a antimicrobianos. Estudios recientes en Chile indican que *P. aeruginosa* no solo presenta factores de resistencia intrínseca, sino que también es capaz de adquirir mecanismos adicionales de resistencia a una amplia variedad de antimicrobianos (Espinoza y Esparza, 2021). Durante el cultivo de *Pseudomona spp.* en el medio modificado (MOP), se observó una fase de crecimiento exponencial poco marcada y la presencia de dos etapas de adaptación. Según Sánchez y Guerra (2022), la adición de glucosa favorece

significativamente el metabolismo de *Pseudomonas spp.*, mientras que la suplementación del medio con fosfatos lo reprimen. Cabe destacar que el medio MOP incluye tampones de fosfato, los cuales podrían ser responsables del crecimiento retardado observado en este género bacteriano.

El género *Staphylococcus spp.* se caracteriza por ser un patógeno oportunista con potencial carácter zoonótico. Se ha identificado en mamíferos y aves sanos, colonizando piel, mucosas, aparato respiratorio superior y tracto gastrointestinal (Cotaquispe et al., 2021). Una especie que en los últimos años ha sido reconocida como agente zoonótico, es *S. pseudintermedius*, la cual coloniza la piel y mucosas de animales. En la especie canina, predomina como agente causal de infecciones cutáneas piógenas que afectan distintos estratos de la piel (Giacoboni y Gagetti, 2020). Por otro lado, en vacas lecheras, *S. aureus* se reconoce como una de las principales causas de mastitis clínica y subclínica. Estudios realizados en el sur de Chile en vacas con mastitis identificaron con mayor frecuencia *S. haemolyticus* y *S. aureus*, ambas portadoras de genes de resistencia a antibióticos (Salvadores et al., 2024).

De todos los géneros estudiados, ninguno cuenta con planes de control y erradicación en nuestro país, debido a que son bacterias ubicuarias y de amplia distribución. Sin embargo, estos patógenos se encuentran presentes en ecosistemas urbanos y generan patologías en humanos, animales silvestres y domésticos. Para la detección temprana de patógenos e implementación de medidas sanitarias, es fundamental establecer planes de vigilancia y monitorización en cuerpos de agua. En ese contexto, disponer de un medio de cultivo modificado que permita el crecimiento simultáneo de diversas bacterias, proporciona una herramienta de gran utilidad para lograr comprender como interactúan y se comportan estos microorganismos en conjunto. Asimismo, este medio puede ser utilizado directamente en experimentos que evalúen el impacto de diferentes factores ambientales en la proliferación bacteriana, lo que a su vez podría contribuir al desarrollo de nuevas estrategias de control y prevención de enfermedades infecciosas emergentes de cuerpos de agua, como los humedales urbanos.

7. Conclusiones

La modificación del medio de cultivo, basada en el medio Zhang Mills Block 1 (ZMB1) modificado inicialmente por Medina et al. (2017), demostró ser efectiva para el crecimiento de diversas bacterias de relevancia en Medicina Veterinaria, aisladas desde humedales urbanos de la región de los Lagos. Para aquello se lograron aislar y caracterizar 72 cepas bacterianas de muestras de agua de humedales urbanos. Estas cepas fueron identificadas mediante técnicas de PCR de colonia y secuenciación del gen 16S, confirmando la presencia de diversos géneros bacterianos de interés veterinario. El incremento en la densidad óptica (OD_{600}) en el medio modificado (MOP) resultó para cada una de las bacterias seleccionadas, indicando que este medio proporciona un entorno favorable para su crecimiento y que, la adición de nutrientes específicos en el medio de cultivo favorecería el desarrollo de estos microorganismos.

8. Referencias

- Acres, E. (1985). Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infections in Newborn Calves: A Review. *Journal of Dairy Science*, 68(1), 229–256. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(85\)80814-6](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(85)80814-6)
- Altschul, S., Gish W., Miller, W., Myers, E., y Lipman, D. (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)
- Avendaño, R., Saldarriga, M., Poblete, M., y Irgang, R. (2024). *Flavobacterium psychraquaticum* sp. nov., isolated from water system of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts cultured in Chile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 74(4). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006309>
- Awad, W. S., El-Sayed, A., Mohammed, F., Bakry, N., Abdou, N., y Kamel, M. (2020). Molecular characterization of pathogenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic and in-contact cattle and buffalo calves. *Tropical Animal Health and Production*, 52(6), 3173–3185. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02343-1>
- Bandeira, G., Santos, A., Souza, C., Baldissera, M., Moreira, K., Veiga, M., Rocha, M., Vargas, A., Cunha, M., y Baldisserotto, B. (2018). *Citrobacter freundii* infection in silver catfish (*Rhamdia quelen*): Hematological and histological alterations. *Microbial Pathogenesis*, 125, 276–280. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.09.038>
- Barreto, G., Rodríguez, H., Vázquez, R., y Junco, Y. (2020). Mortalidad por colibacilosis y salmonelosis en crías y precebas porcinas en una unidad especializada. *Revista de producción animal*, 32(1), 113–122. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-79202020000100113
- Barreto, G., y Rodríguez, H. (2021). *E. coli* diarrogénicos y comensales en bovinos, implicaciones en la salud y la antibioterapia contemporánea. *Revista de*

producción animal, 33(2), 55–71.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-79202021000200055

Bastardo, A., Ravelo, C. y Romalde, J.L. (2012). Highly sensitive detection and quantification of the pathogen *Yersinia ruckeri* in fish tissues by using real-time PCR. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 511–520. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4328-1>

Bergamini, K., Martínez, C., Mollenhauer, K., Pérez, C., Hernández, J., y Gutiérrez, P. (2020). *Guía práctica para el conocimiento de humedales e identificación de conductas denunciadas*. <https://politicaspUBLICAS.uc.cl/wp-content/uploads/2020/03/Gui%CC%81a-V1.pdf>

Bonita R., Beaglehole R. y Kjellström T. (2008). *Epidemiología básica* (2ª ed.). Organización Mundial de la Salud. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/3153>

Bonnet, M., Lagier, J.C., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes and New Infections*, 34(100622). <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622>

Cárdenas, V. (2023). *Descripción de microorganismos con interés veterinario identificados desde cuerpos de agua en la Región de los Lagos* [Memoria para optar al Título de Médico Veterinario]. Universidad San Sebastián.

Caycedo, L., Corrales, L., & Trujillo, D. (2021). Bacteria, nutrition and growth: a look from chemistry. *Revista Nova*, 19(36), 49-94. <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>

Checa, A. (2020). Método: Gel de electroforesis Agarosa. Conogasi. Consultado el 02 de noviembre de 2023, de <https://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-electroforesis-agarosa/>

Chlebicz, A., y Śliżewska, K. (2018). Campylobacteriosis, salmonellosis, yersiniosis, and listeriosis as zoonotic foodborne diseases: A review. *International Journal of*

Environmental Research and Public Health, 15(5), 863.
<https://doi.org/10.3390/ijerph15050863>

Convención sobre los Humedales. (2014). *Chile*. Consultado el 10 de septiembre de 2023, de <https://www.ramsar.org/es/country-profile/chile>

Convención sobre los Humedales. (2021). *Perspectiva mundial sobre los humedales: Edición especial de 2021*.
https://www.ramsar.org/sites/default/files/documents/library/gwo_2021_s.pdf

Cortés, A., Salgado, M., Díaz, M., Torres, E., y Espinosa, L. (2023). A Review on Food Safety: The Case of *Citrobacter* sp., Fish and Fish Products. *Applied Sciences*, 13(12), 6907–6907. <https://doi.org/10.3390/app13126907>

Cotaquispe, R., Sarmiento, R., Lovón, S., y Rodriguez, J. (2021). Caracterización fenotípica y genotípica de *Staphylococcus* spp con resistencia a meticilina en pollos comerciales. *Revista de investigaciones veterinarias del Peru*, 32(3), e20395. <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i3.20395>

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>

Dávila, R., Ortiz, V. (2022). Influencia de *Salmonella pullorum* y *S. gallinarum* en la producción avícola y la salud pública. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 62(4), 623-630. <https://doi.org/10.52808/bmsa.7e6.624.002>

Espinoza, D., y Esparza, G. (2021). Resistencia enzimática en *Pseudomonas aeruginosa*, aspectos clínicos y de laboratorio. *Revista Chilena de Infectología*, 38(1), 69–80. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182021000100069>

Estrada, D. (2017). Sanger sequencing. *The febs journal*, 284(24), 4174-4174. <https://doi-org.bdigitaluss.remotexs.co/10.1111/febs.14319>

- Fernández, C., Gijón, D., Álvarez, M., y Santos, Y. (2016). First isolation of *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* from diseased sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), cultured in Spain. *Aquaculture Reports*, 4, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.05.006>
- Forbes, B., Sahm, D., Weissfeld, A., Bailey, R. (2009). *Diagnóstico microbiológico* (12ª ed.). Panamericana. https://digital-uss-cl.bdigitaluss.remotexs.co/ebooks/40431-Bailey_y_Scott_diagnostico_microbiologico/
- Fultz, R., Ticer, T., Glover, J., Stripe, L., y Engevik, M. (2022). Select streptococci can degrade *Candida* Mannan to facilitate growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(4). <https://doi.org/10.1128/aem.02237-21>
- Fundación Aquae. (2019). *¿Qué es un humedal y por qué son importantes?* Consultado el 10 de septiembre de 2023. <https://www.fundacionaquae.org/wiki/los-humedales-vitales-para-la-supervivencia-humana/>
- Gallardo, J., Rau, J., de la Fuente, A., Marinkovic, F., y Teutsch, C. (2018). Variación estacional de la riqueza, frecuencia relativa y diversidad de aves en humedales urbanos de Llanquihue, sur de Chile. *Revista Chilena de Ornitología*, 24(1), 27-36. <https://aveschile.cl/revista-chilena-de-ornitologia-volumen-24-numero-1-2018/>
- Garre, A., Egea, J.A., y Fernández, P.S. (2016). Modelos matemáticos para la descripción del crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos. *Universidad Politécnica de Cartagena*, 9, 160-163. <http://hdl.handle.net/10317/5909>
- Giacoboni, G. I., y Gagetti, P. (2020). *Staphylococcus pseudintermedius* y el enfoque de Una Salud. *Analecta veterinaria*, 40(2), 052. <https://doi.org/10.24215/15142590e052>
- Gómez, G., y Batista, C. (2006). Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola. *Cultivos Tropicales*, 27(3), 17-24. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215825002>

- Haenni, M., Hocquet, D., Ponsin, C., Cholley, P., Guyeux, C., Madec, J.-Y., y Bertrand, X. (2015). Population structure and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from animal infections in France. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0324-x>
- Hernández, R., Mendoza, C., y Baptista, P. (2014). *Metodología de la investigación* (6ª ed.). McGraw-Hill.
- Hordofa, D. (2021). Review on yersiniosis and its public health importance. *International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry*, 6(6), 37–41. <https://doi.org/10.22271/veterinary.2021.v6.i6a.449>
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2019). Salmonella spp. 2014-2018. *Boletín de vigilancia de laboratorio*, 9(13), 3-4. <https://acesse.dev/1RFsG>
- Kittiborwornkul, N., Sahithi, A., Phetsom, J., Phusantisampan, T., Pongprayoon, W., Sriariyanun, M. (2021). Comparative evaluation of DNA extraction from rice's root-associated bacterial consortium for population structure study. *E3S Web of Conferences*, 302, 02014. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202130202014>
- Kumar, G., Menanteau, S., Saleh, M., y Matbouli, M. (2015). *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Veterinary Research*, 46(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0238-4>
- León, J., Ávalos, R., y Ponce, M. (2008). *Flavobacterium psychrophilum* y su patología en alevines de *Onchorhynchus mykiss* del centro piscícola El Ingenio, Huancayo. *Revista peruana de biología*, 15(2), 117–124. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332008000200019
- Ley N° 21.202. Modifica diversos cuerpos legales con el objetivo de proteger los humedales urbanos. (23 de enero de 2020). En biblioteca del Congreso Nacional. <https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=1141461>

- Mackenzie, J., & Jeggo M. (2019). The One Health Approach—Why Is It So Important? *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(2), 88. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4020088>
- Martínez, A., Garza, U., Sampedro, M., González, J., Nava, G., y Toribio, J. (2020). Patotipos y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* en agua residual. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 36(4). <https://doi.org/10.20937/rica.53711>
- Medina, D., Pinto, F., Ovalle, A., Thomson, P., & Garrido, D. (2017). Prebiotics Mediate Microbial Interactions in a Consortium of the Infant Gut Microbiome. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2095. <https://doi.org/10.3390/ijms18102095>
- Medina, D., Pinto, F., Ovalle, A., Thomson, P., & Garrido, D. (2017). Prebiotics Mediate Microbial Interactions in a Consortium of the Infant Gut Microbiome. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2095. <https://doi.org/10.3390/ijms18102095>
- Medina-Vogel, G. (2010). Ecología de enfermedades infecciosas emergentes y conservación de especies silvestres. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42(1), 12-24. <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2010000100003>
- Millennium Ecosystem Assessment. (2005). *Ecosystems and human well-being: wetlands and water synthesis*. https://www.researchgate.net/publication/40117503_Millennium_Ecosystem_Assessment_Ecosystems_and_human_well-being_wetlands_and_water_synthesis
- Ministerio del Medio Ambiente. (2013). *Monitoreo y seguimiento ambiental*. Consultado el 10 de septiembre del 2023, de <https://humedaleschile.mma.gob.cl/seguimiento-ambiental/>
- Ministerio del Medio Ambiente. (2023). Humedales de Chile: distribución superficie según división político-administrativa. Microsoft Power Bi. Consultado el 15 de septiembre de 2023, de <http://rb.gy/ijhoo>

- Olivas, E., Flores, J.P., Serrano, M., Soto, E., Iglesias, J., Salazar, E. y Fortis, M. (2011). Indicadores fecales y patógenos en agua descargada al río Bravo. *Terra Latinoamericana*, 29(4), 449-457. <https://www.terralatinoamericana.org.mx/index.php/terra/article/view/1167>
- Opitz, C. (s/f). *Protocolo de PCR bacteriano*. Universidad San Sebastián.
- Organización Mundial de la Salud, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y Organización Mundial de Sanidad Animal. (2019). *Guía tripartita para hacer frente a las enfermedades zoonóticas en los países*. <https://www.fao.org/3/ca2942es/CA2942ES.pdf>
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2010). Vigilancia sanitaria de los animales terrestres. En OIE (19ª ed.). *Código Sanitario para los Animales Terrestres* (pp. 14-17). <http://rb.gy/6uwnu>
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2023). Carbunco 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/E_summry.htm
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2023). *Una sola salud*. Consultado el 7 de agosto de 2023, de <https://www.woah.org/es/que-hacemos/iniciativas-mundiales/una-sola-salud/>
- Paredes, E., Leyán, V., Moroni, M., Navarro, M., Romero, A. (2021). *Patología especial e inmunopatología*. Instituto de patología animal, Universidad Austral de Chile.
- Pavan, J. V., Masachessi, G., Prez, V., Di Cola, G., Re, V., y Nates, S. (2022). Evaluación de la calidad de aguas superficiales en espacios recreacionales, una propuesta integradora de marcadores químicos y microbiológicos. *Revista de La Facultad de Ciencias Médicas de Córdoba*, 79(2), 210–214. <https://doi.org/10.31053/1853.0605.v79.n2.33403>

- Pilar, M., y Gratiniano, G. (2018). Colibacilosis en gallinas reproductoras. *Revista Sistemas de Producción Agroecológicos*, 9(2), 52–76. <https://doi.org/10.22579/22484817.717>
- Rahman, T., Sobur, A., Islam, S., Levy, S., Hossain, J., Zowalaty, M., Rahman, T., & Ashour, H. (2020). Zoonotic Diseases: Etiology, Impact, and Control. *Microorganisms*, 8(9), 1405. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091405>
- Ramos, S., Silva, V., Caniça, M., Tejedor, M., Igrejas, G., y Poeta, P. (2020). *Escherichia coli* as Commensal and Pathogenic Bacteria among Food-Producing Animals: Health Implications of Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) Production. *Animals*, 10(12), 2239–2239. <https://doi.org/10.3390/ani10122239>
- Rathsack, K., Böllmann, J., y Martienssen, M. (2014). Comparative Study of Different Methods for Analyzing Denitrifying Bacteria in Fresh Water Ecosystems. *Journal of Water Resource and Protection*, 6(6), 609-617. <http://dx.doi.org/10.4236/jwarp.2014.66059>
- Reynoso, M., Magnoli, C., Barros, G., y Demo, M. (2015). Manual de Microbiología General. UniRío editora. <https://www.unirioeditora.com.ar/producto/manual-microbiologia-general/>
- Ríos, S., Agudelo, R. y Gutiérrez, L. (2017). Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 35(2), 236-247. <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08>
- Rodríguez, C. y Zhurbenko, R. (2018a). *Manual de medios de cultivo 2018* (4ª ed.). Centro nacional de biopreparados. <https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.pdf>
- Rodríguez, C. y Zhurbenko, R. (2018b). *Manual de medios de cultivo 2018* (4ª ed.). Centro nacional de biopreparados. <https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.pdf>

- Ruiz, J. (2018). A reflection on the concept of «One Health». *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 35(4), 657-662. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.354.3821>
- Salvadores, N., Jaramillo, T., Aguila, L., Norambuena, J., Zaror, L., Venegas, V., Arriagada, C., Arce, K., y Treulen, F. (2024). *Identification and antimicrobial susceptibility of bacterial species isolated from cows with mastitis in southern Chile*. <https://doi.org/10.22541/au.171671648.87264501/v1>
- Sánchez, A., Contreras, A., Corrales, J. C. y de la Fe, C. (2022). En el principio fue la zoonosis: One Health para combatir esta y futuras pandemias. *Gaceta Sanitaria*, 36(1), 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2022.01.012>
- Sánchez, R., y Guerra, P. (2022). Pseudomonas spp. benéficas en la agricultura. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 13(4), 715–725. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i4.2799>
- Secretaría de la Convención de Ramsar. (2016). *Introducción a la convención sobre los humedales*. https://www.ramsar.org/sites/default/files/documents/library/handbook1_5ed_introductiontoconvention_s_final.pdf
- Serrano, C. y Gutiérrez, R. (2018). *Manual de microbiología* (1ª ed.). Ediciones UC. https://uss-primo.hosted.exlibrisgroup.com/permalink/f/1r09n3m/TN_cdi_jstor_books_j_ctvkj_b56f
- Serrato, A., Flores, Ll., Aportela, J. y Sierra, E. (2014). PCR: reacción en cadena de la polimerasa. En *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (1ª ed., pp. 53-73). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México. <https://n9.cl/546qb>
- Servicio Agrícola y Ganadero. (2018). *Ficha técnica carbunco bacteridiano (ántrax)*. https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/antrax-carbunco_bacteridiano_2018.pdf

- Servicio Agrícola y Ganadero. (2019). *Lista de enfermedades de denuncia obligatoria (EDO)* al SAG. https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/enfermedades_denuncia_obligatoria_sag_9-10-2019.pdf
- Ticer, T., Stine, R., Ellis, T., Horvath, T., Haidacher, S., Hoch, K., Haag, A., Engevik, A., y Engevik, M. (2022). *Klebsiella pneumoniae* Cross-feeds *Clostridioides difficile* and Enhances Colonic Pro-inflammatory Responses. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 36(S1). <https://doi.org/10.1096/fasebj.2022.36.S1.R5979>
- Tichy, D. (2018). Caracterización genómica de una colección de cepas de *escherichia coli* enterotoxigénicas obtenidas desde granjas de producción industrial de cerdos en Chile [Trabajo de Titulación Postgrado]. Universidad Andrés Bello.
- Trinh, K, y Lee, N. (2022). Recent Methods for the Viability Assessment of Bacterial Pathogens: Advances, Challenges, and Future Perspectives. *Pathogens*, 11(9), 1057. <https://doi.org/10.3390/pathogens11091057>
- Troncoso, C., Pavez, M., Santos, A., Salazar, R., y Barrientos, L. (2017). Implicancias Estructurales y Fisiológicas de la Célula Bacteriana en los Mecanismos de Resistencia Antibiótica. *International Journal of Morphology*, 35(4), 1214–1223. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022017000401214>
- Weisburg, W., Barns, S., Pelletier, D., y Lane, D. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- Wetlands International (2021). *Ramsar Convention*. Consultado el 10 de septiembre del 2023, de <https://www.wetlands.org/wetlands/ramsar-convention/>
- 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>

Wildlife Conservation Society. (2020). *The Manhattan principles*. Consultado el 15 de septiembre de 2023, de <https://oneworldonehealth.wcs.org/About-Us/Mission/The-Manhattan-Principles.aspx>

Xiong, F., Qin, L., Hao, Y.-T., Zhao, D., Li, W.-X., Zou, H., Li, M., Wu, S.-G., y Wang, G.-T. (2020). Gut microbiota modulation and immunity response induced by *Citrobacter freundii* strain GC01 in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 521(735015), 735015. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735015>

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

9. Anexos

9.1 Anexo 1. Vitaminas, minerales y otros componentes utilizados en la elaboración del medio de cultivo modificado (MOP).

Grupo	Tipo de grupo	Reactivo	Concentración
Grp. 8	Vitaminas	Mio-Inositol	0,1 g/L
Grp. 9	Tampones de fosfato	KH ₂ PO ₄	52,4 g/L
		K ₂ HPO ₄	107,1 g/L
Grp. 11	Vitaminas	Pantotenato de calcio	0,1 g/L
		Niacina	0,075 g/L
		Piridoxina HCl	0,4 g/L
Grp. 12	Minerales importantes	MgSO ₄ .7H ₂ O	50 g/L
		FeSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g/L
		ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g/L
Grp. 13	Vitaminas	Ácido fólico	0,075 g/L
		Ácido paraaminobenzoico	0,0075 g/L
Grp. 14	Ácidos grasos	Acetato de potasio	90,1 g/L
		Ácido lipoico	0,1 g/L
		Tween 80	50 g/L
Grp. 15	ADN	Adenina	1,5 g/L
		Guanina	0,75 g/L
		Uracilo	3 g/L
		Xantina	0,5 g/L
Grp. 17	Minerales	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,025 g/L
		MnSO ₄ .4H ₂ O	0,05 g/L
		CaCl ₂ .2H ₂ O	5 g/L
		CoSO ₄ .6H ₂ O	0,03 g/L
		CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 g/L
		H ₃ BO ₃	0,1 g/L
		K ₂ SO ₄	3 g/L

		KI	0,015 g/L
Grp. 18	Quelantes	EDTA	1,0 g/L
		Ácido nitrilotriacético	1,0 g/L
Grp. 19	Otros componentes	Glutación	0,75 g/L
		(NH ₄) ₂ SO ₂	50 g/L
		NaCl	150 g/L
Grp. 21		Biotina	0,5 g/L
Grp. 22		Tiamina HCl	0,075 g/L
Grp. 23		Riboflavina	0,075 g/L

Fuente: Elaboración propia a partir de medio de cultivo Zhang Mills Block 1 modificado en Medina et al., (2017).

9.2 Anexo 2. Géneros bacterianos obtenidos tras análisis BLASTn

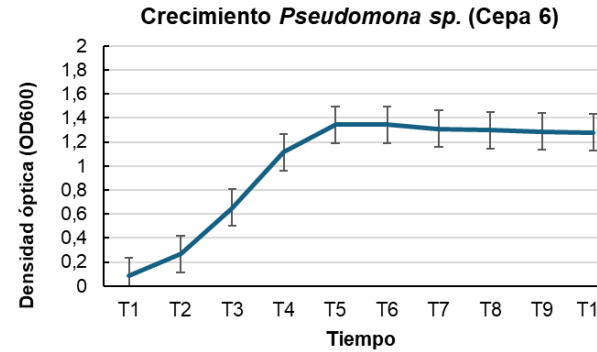
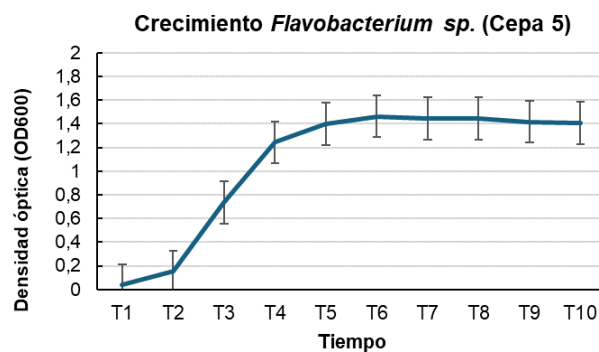
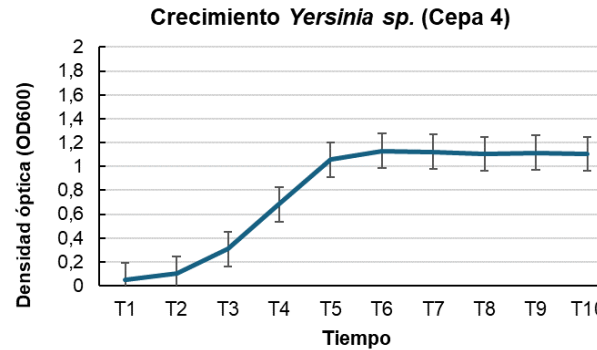
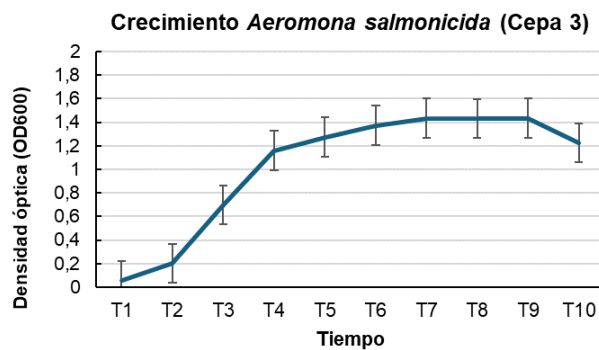
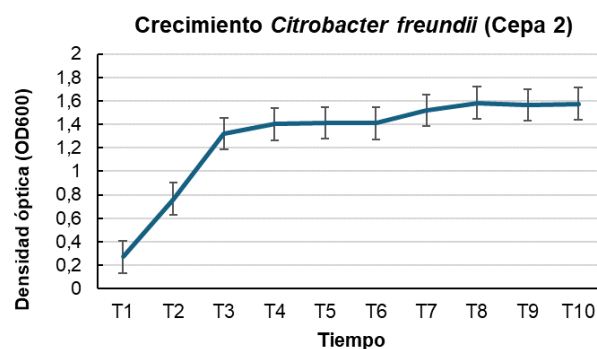
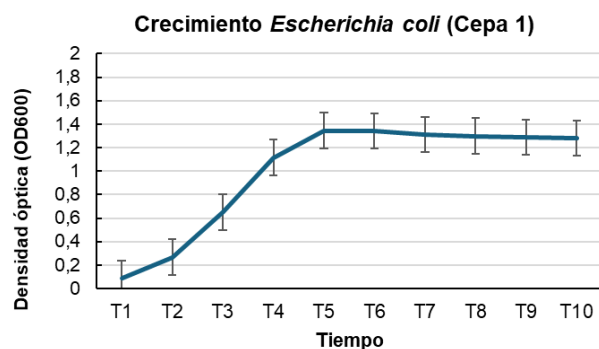
Identificación	Nombre científico	Identidad	N° Acceso NCBI
1_27F	<i>Pseudomona spp.</i>	87,79%	MW548984.1
2_27F	<i>Alcaligenes spp.</i>	92,24%	MG594838.1
3_27F	<i>Pseudomona antarctica</i>	82,40%	MK070165.1
4_27F	<i>Pseudomona spp.</i>	95,66%	KX378938.1
5_27F	<i>Pseudomonas lundensis</i>	91,01%	OQ472453.1
6_27F	<i>Pseudomona fragi</i>	89,28%	KP236254.1
8_27F	<i>Pseudomona spp.</i>	72,68%	JN873160.1
9_27F	<i>Pseudomona spp.</i>	87,49%	KY623381.1
10_27F	<i>Erwinia rhapontici</i>	95,52%	AP024329.1
11_27F	<i>Pseudomona spp.</i>	98,75%	MN177125.1
12_27F	<i>Shewanella baltica</i>	92,00%	MH304331.1
13_27F	<i>Serratia plymuthica</i>	95,45%	MK883169.1
14_27F	<i>Pseudomonas reidholzensis</i>	97,59%	MK883119.1
15_27F	<i>Serratia quinivorans</i>	92,29%	MK883139.1

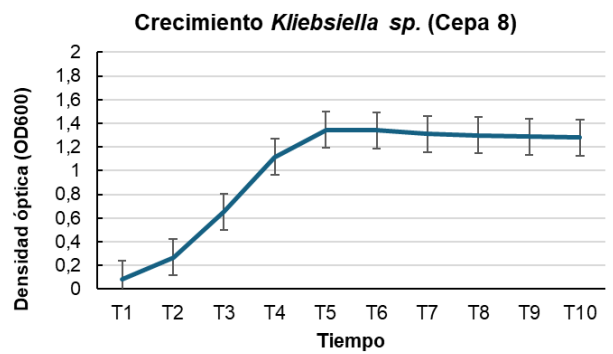
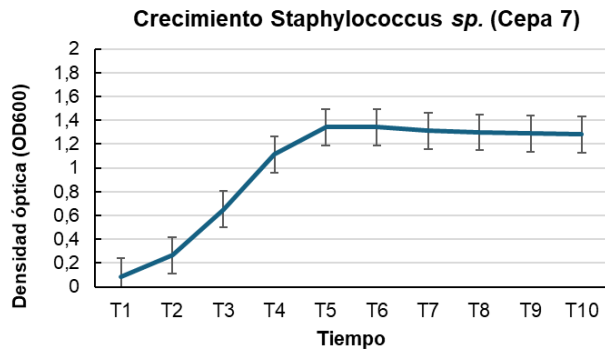
16_27F	<i>Pseudomonas teessidea</i>	92,97%	KC108719.1
17_27F	<i>Pseudomona spp.</i>	97,12%	MT793093.1
19_27F	<i>Serratia spp.</i>	72,09%	MH767070.1
20_27F	<i>Pseudomona spp.</i>	97,37%	MT387208.1
21_27F	<i>Escherichia coli</i>	96,57%	ON054383.1
22_27F	<i>Acinetobacter spp.</i>	95,87%	MH688767.1
23_27F	<i>Pseudomonas reinekei</i>	89,49%	MT825612.1
24_27F	<i>Leuconostoc citreum</i>	93,95%	OQ848169.1
25_27F	<i>Acinetobacter spp.</i>	97,14%	MH688767.1
26_27F	<i>Flavobacterium spp.</i>	96,83%	DQ778316.1
27_27F	<i>Aeromona salmonicida</i>	99,13%	CP122987.1
28_27F	<i>Flavobacterium spp.</i>	96,97%	OQ221802.1
29_27F	<i>Aeromona sobria</i>	96,20%	MK548526.1
30_27F	<i>Serratia spp.</i>	99,35%	CP033055.1
31_27F	<i>Aeromona spp.</i>	92,52%	MG822762.1
32_27F	<i>Aeromona popoffii</i>	93,09%	CP149129.1
33_27F	<i>Acinetobacter spp.</i>	90,82%	KJ726594.1
34_27F	<i>Yersiniaceae bacterium</i>	97,05%	MN737200.1
35_27F	<i>Aeromona salmonicida</i>	96,09%	MW138105.1
36_27F	<i>Serratia quinivorans</i>	96,91%	OQ381191.1
37_27F	<i>Bacillus cereus</i>	97,87%	OP903925.1
38_27F	<i>Escherichia coli</i>	95,27%	MW600390.1
39_27F	<i>Escherichia coli</i>	97,51%	MN094125.1
40_27F	<i>Escherichia coli</i>	96,25%	ON054407.1
41_27F	<i>Citrobacter freundii</i>	94,76%	OP903425.1
42_27F	<i>Pseudomona spp.</i>	96.46%	PP294749.1
43_27F	<i>Staphylococcus spp.</i>	95,56%	CP150682.1
45_27F	<i>Rahnella aquatilis</i>	97,11%	MF083083.1
46_27F	<i>Pseudomona spp.</i>	96,81%	MF774133.1
47_27F	<i>Bacillus spp.</i>	96,36%	LC763405.1

48_27F	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	97,05%	KP898898.1
--------	--------------------------------------	--------	------------

Fuente: Elaboración propia a partir de datos obtenidos en base bioinformática NCBI.

9.3 Anexo 3. Curvas de crecimiento para bacterias de relevancia en medicina veterinaria sembradas en medio modificado (MOP).





9.4 Anexo 4. Densidad óptica (OD₆₀₀) en medios de cultivos MOP medido cada 30 minutos durante 12 horas continuas.

