

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA"

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

Facultad de Ciencias Biológicas



Marcadores moleculares *rpoB*, *rpoD* y *gyrB* en la identificación y filogenia de bacterias resistentes a mercurio aisladas de ambientes acuáticos, Ica-Perú.

Línea de Investigación

Salud pública y conservación del medio ambiente

INFORME FINAL DE TESIS

AUTOR

CADILLO KURODA JOSE MANUEL

Ica, Perú

2024

DEDICATORIA

A mis padres Frank y Emilia, por sus sabios consejos, amor y comprensión a lo largo de mi vida.
A Karla y a mis amigos, por la confianza y el aliento continuo para no desistir y seguir alcanzando mis metas. A todas las personas que me apoyaron y contribuyeron de alguna manera para la culminación de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, en especial a mis padres Frank Cadillo y Emilia Kuroda, por su amor permanente, respaldo y apoyo incondicional a lo largo de mi carrera profesional.

A mis asesores, Dr. Juan Carlos Tantaleán Vásquez y la Dra. Rosa Altamirano Díaz, por sus enseñanzas, orientación y ayuda en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al Dr. Ronnie Gavilán Chávez, quién me brindó su apoyo y la oportunidad para realizar parte de este estudio en las instalaciones del Instituto Nacional de Salud.

Al laboratorio BioSLab y al laboratorio de Bacteriología Clínica de INS, por permitir realizar algunos procedimientos durante el desarrollo de esta tesis.

A la Universidad Nacional San Luis Gonzaga (UNICA) y de manera particular a la Facultad de Ciencias Biológicas, por brindarme las instalaciones para realizar el presente trabajo de investigación.

Al Vicerrectorado de Investigación de la UNICA por el financiamiento de la tesis según RESOLUCIÓN VICERRECTORAL N°083-VRI-UNICA-2022.

A mis profesores de la UNICA que contribuyeron en mi formación profesional durante los 5 años de estudios y a todas las personas que de alguna manera contribuyeron e influyeron para lograr culminar esta tesis.

INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE CONTENIDOS	iv
INDICE DE TABLAS	v
INDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCION	1
II. ESTRATEGIA METODOLOGICA	5
2.1 Material Biológico.	5
2.2 Condiciones de crecimiento e incubación	5
2.3 Extracción y visualización de ADN genómico	5
2.4 Amplificación de marcadores moleculares mediante PCR.	6
2.5 Verificación de amplicones de PCR en gel de agarosa	7
2.6 Secuenciación de amplicones de PCR	7
2.7 Análisis in silico de secuencias nucleotídicas	8
2.8 Secuenciación y análisis de datos genómicos bacterianos.	10
III. RESULTADOS	13
IV. DISCUSION	30
V. CONCLUSIONES	38
VI. RECOMENDACIONES	39
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	40
VII. ANEXOS	47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores y condiciones de hibridación en PCR.	6
Tabla 2. Componentes de reacción de PCR para genes marcadores.	7
Tabla 3. Similitud de secuencias del gen 16S ARNr en <i>Pseudomonas</i> resistentes a mercurio.	13
Tabla 4. Similitud de secuencias del gen <i>gyrB</i> en <i>Pseudomonas</i> resistentes a mercurio.	14
Tabla 5. Similitud de secuencias del gen <i>rpoB</i> en <i>Pseudomonas</i> resistentes a mercurio.	15
Tabla 6. Similitud de secuencias del gen <i>rpoD</i> en <i>Pseudomonas</i> resistentes a mercurio.	16
Tabla 7. Similitud de secuencias de genes concatenados <i>16S-gyrB-rpoB-rpoD</i> (MLSA) en <i>Pseudomonas</i> resistentes a mercurio.	17
Tabla 8. Similitud de secuencias del gen 16S ARNr en enterobacterias resistentes a mercurio.	18
Tabla 9. Similitud de secuencias del gen <i>gyrB</i> en enterobacterias resistentes a mercurio.	18
Tabla 10. Relación genómica mediante ANIb de 12 cepas bacterianas resistentes a mercurio en comparación con cepas tipo de <i>Pseudomonas</i> .	26
Tabla 11. Nombre asignado a las cepas resistentes a mercurio por comparación genética con cepas tipo de <i>Pseudomonas</i> .	28
Tabla 12. Nombre asignado a las cepas resistentes a mercurio por comparación genética con cepas tipo de <i>Enterobacteriaceae</i> .	29
Tabla 13. Matriz de identidad del gen <i>gyrB</i> relacionadas a especies del género <i>Pseudomonas</i> .	60
Tabla 14. Matriz de identidad del gen <i>rpoB</i> relacionadas a especies del género <i>Pseudomonas</i> .	61
Tabla 15. Matriz de identidad del gen <i>rpoD</i> relacionadas a especies del género <i>Pseudomonas</i> .	62
Tabla 16. Matriz de identidad de genes concatenados (MLSA) relacionadas a especies del género <i>Pseudomonas</i> .	63
Tabla 17. Matriz de identidad del gen <i>gyrB</i> relacionadas a enterobacterias.	64
Tabla 18. Características genómicas de 12 cepas de <i>Pseudomonas</i> resistentes a mercurio.	69

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético del gen 16S ARNr en <i>Pseudomonas</i> .	19
Figura 2. Árbol filogenético del gen <i>gyrB</i> en <i>Pseudomonas</i> .	20
Figura 3. Árbol filogenético del gen <i>rpoB</i> en <i>Pseudomonas</i> .	21
Figura 4. Árbol filogenético del gen <i>rpoD</i> en <i>Pseudomonas</i> .	22
Figura 5. Árbol filogenético concatenado de los genes <i>16S-gyrB-rpoB-rpoD</i> en <i>Pseudomonas</i> .	23
Figura 6. Árbol filogenético del gen 16S ARNr en enterobacterias.	24
Figura 7. Árbol filogenético del gen <i>gyrB</i> en enterobacterias.	25
Figura 8. Árbol filogenómico de cepas resistentes en <i>Pseudomonas</i> .	27
Figura 9. Flujograma de extracción de ADN genómico de las cepas resistentes a mercurio.	47
Figura 10. Gel de agarosa de ADN genómico de cepas de <i>Pseudomonas</i> y <i>Enterobacteriaceae</i> .	48
Figura 11. Flujograma de protocolo de amplificación mediante PCR convencional.	49
Figura 12. Gel de agarosa de PCR de los genes 16S ARNr, <i>gyrB</i> , <i>rpoB</i> y <i>rpoD</i> de <i>Pseudomonas</i> .	50
Figura 13. Gel de agarosa de PCR de los genes 16S ARNr y <i>gyrB</i> de enterobacterias.	50
Figura 14. Gel de agarosa de PCR del gen 16S ARNr de <i>Pseudomonas</i> resistentes a mercurio.	51
Figura 15. Gel de agarosa de PCR del gen <i>gyrB</i> de <i>Pseudomonas</i> resistentes a mercurio.	52
Figura 16. Gel de agarosa de PCR del gen <i>rpoB</i> de <i>Pseudomonas</i> resistentes a mercurio.	53
Figura 17. Gel de agarosa de PCR del gen <i>rpoD</i> de <i>Pseudomonas</i> resistentes a mercurio.	54
Figura 18. Gel de agarosa de PCR del gen 16S ARNr de enterobacterias resistentes a mercurio.	55
Figura 19. Gel de agarosa de PCR del gen <i>gyrB</i> de enterobacterias resistentes a mercurio.	55
Figura 20. Flujograma del análisis in silico de secuencias nucleotídicas.	56
Figura 21. Visualización de cromatogramas producto de secuenciación por método Sanger.	57
Figura 22. Interfaz del programa Bioedit para procesamiento de secuencias.	57
Figura 23. Interfaz de búsqueda del gen 16S ARNr en la página web EzBioCloud.	58
Figura 24. Interfaz del algoritmo BLASTn en la página web del NCBI.	58
Figura 25. Interfaz del programa Clustal Omega en la página web del EMBL-EBI.	59
Figura 26. Interfaz del programa Mega- X para realizar el análisis de árboles filogenéticos.	59
Figura 27. Flujograma de secuenciación y análisis genómico de cepas de <i>Pseudomonas</i> .	65
Figura 28. Secuenciador genómico de próxima generación MiSeq Illumina.	66
Figura 29. Interfaz del programa FastQC para ver la calidad de secuenciación genómico.	66
Figura 30. Interfaz del programa QUAST para observar calidad de ensamblaje genómico.	67
Figura 31. Listado de genes generado por el anotamiento de genes mediante Prokka.	67
Figura 32. Interfaz de la herramienta ANI calculator en la página web JSpecies.	68
Figura 33. Interfaz del servidor de genomas (TYGS) para los análisis filogenómicos.	68

RESUMEN

La identificación y clasificación tradicional de las bacterias se realiza mediante pruebas microbiológicas fenotípicas. Actualmente, el análisis de secuencias de genes marcadores moleculares, análisis de secuencias multilocus (MLSA) o del genoma completo permiten una identificación precisa de especies. El presente estudio tuvo como objetivo identificar y determinar la relación filogenética de especies bacterianas resistentes al mercurio aisladas de ambientes acuáticos en la región de Ica pertenecientes al Laboratorio de Biotecnología, Biología Molecular y Microbiología Industrial de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga mediante el análisis de secuencias de los marcadores moleculares *rpoB*, *rpoD* y *gyrB*. De 18 cepas bacterianas, 15 se identificaron mediante el análisis de similitud de secuencias de nucleótidos de los genes. La relación filogenética se determinó a través del análisis de cada uno de los genes y el concatenado de ellos (MLSA). El análisis se complementó con la secuenciación del genoma de las cepas relacionadas al género *Pseudomonas*, por su relevancia ecológica. El análisis de similitud y filogenético revelaron que las cepas están relacionadas con cepas tipo de los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Citrobacter*. Se identificaron las especies *Pseudomonas monteilii*, *Pseudomonas juntendi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas asiatica*, *Pseudomonas allopuntida*, *Enterobacter mori*, *Enterobacter hormaechei*, *Citrobacter freundii* y *Citrobacter portucalensis*. El análisis de los genes *gyrB*, *rpoB* y *rpoD* son eficaces para la identificación y determinación filogenética de cepas resistentes a mercurio.

Palabras clave: identificación bacteriana, filogenia, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter*.

ABSTRACT

Traditional identification and classification of bacteria is performed by phenotypic microbiological tests. Currently, the analysis of molecular marker gene sequences, multilocus sequence analysis (MLSA) or the entire genome allow for accurate species identification. The present study aimed to identify and determine the phylogenetic relationship of mercury-resistant bacterial species isolated from aquatic environments in the Ica region belonging to the Laboratory of Biotechnology, Molecular Biology and Industrial Microbiology of the National University of San Luis Gonzaga by analyzing the sequences of the molecular markers *rpoB*, *rpoD* and *gyrB*. Of 18 bacterial strains, 15 were identified by nucleotide sequence similarity analysis of the genes. The phylogenetic relationship was determined through the analysis of each of the genes and their concatenation (MLSA). The analysis was complemented by the sequencing of the genome of strains related to the *Pseudomonas* genus, due to its ecological relevance. Similarity and phylogenetic analysis revealed that the strains are related to type strains of the genera *Pseudomonas*, *Enterobacter* and *Citrobacter*. The species *Pseudomonas monteilii*, *Pseudomonas juntendi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas asiatica*, *Pseudomonas alloputida*, *Enterobacter mori*, *Enterobacter hormaechei*, *Citrobacter freundii* and *Citrobacter portucalensis* were identified. The analysis of the *gyrB*, *rpoB* and *rpoD* genes is effective for the identification and phylogenetic determination of mercury-resistant strains.

Keywords: bacterial identification, phylogeny, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter*.

I. INTRODUCCIÓN

La identificación de las bacterias es un paso importante para comprender su epidemiología, patogénesis, biodiversidad y distribución. Asimismo, la detección sistemática es clave en el área clínica, en la industria farmacéutica, en el control de calidad de alimentos y en la investigación medioambiental (1). A través de los años, esta ha ido cambiando según los avances de la ciencia. Inicialmente, se realizaba por métodos basados en características fenotípicas; tales como morfología, propiedades bioquímicas y fisiológicas (2). Sin embargo, estos métodos microbiológicos requieren mucho tiempo y son laboriosos (3). Las mayores dificultades ocurren durante el aislamiento, por el crecimiento lento de las cepas, la variabilidad de las respuestas en las pruebas bioquímicas y fisiológicas, entre otras. Por lo que, los resultados no siempre son claros o concluyentes para identificar sin ambigüedades a las especies (4).

Los problemas relacionados con la identificación bacteriana clásica han sido superados con los métodos modernos de fundamento molecular y de mayor aceptación por la comunidad científica (5). Estos brindan resultados confiables, reproducibles y rápidos permitiendo un mejor entendimiento de la abundancia, diversidad y función de las bacterias (6). Entre estos avances, la adopción de marcadores moleculares ha sido fundamental para la identificación precisa de géneros y especies bacterianas, incluso en ausencia de cultivos iniciales o información extensa sobre el entorno (7).

Desde hace algún tiempo se ha adoptado como “marcador universal” el análisis del gen 16S ARNr debido a que se encuentra en todos los organismos procariontes actualmente conocidos y tiene fragmentos altamente conservados e hipervariables (8). Este marcador se ha utilizado ampliamente, aunque en algunos casos su poder discriminativo se limita a inferir hasta nivel de género (9), debido a que algunas especies comparten un alto nivel de homología en la secuencia del gen ribosomal (10). Asimismo, varían en el número de copias del gen por especie debido a las transferencias génicas laterales (11). Sin embargo, diversos autores aún recomiendan el uso necesario de este gen como referente básico para la taxonomía procariótica, ya que reflejan sus relaciones generales, permiten la ubicación filogenética de bacterias tanto cultivadas como no cultivadas, proporcionan una asignación de género inicial en la mayoría de casos y pueden reflejar la diversidad filogenética general (12,13).

El uso de otros marcadores moleculares entre los que se encuentran los genes *gyrB*, *rpoB* y *rpoD* (14-16), llamados de mantenimiento celular o genes “housekeeping”, ha brindado buenos resultados como marcadores taxonómicos adicionales (5). Estos han evolucionado de manera más rápida y tienen mayor resolución que el gen 16S ARNr. El gen *rpoB*, codifica para la subunidad

β de la ARN polimerasa, que solo ocurre en una copia (17) y es capaz de revelar la variación molecular hasta el nivel de poblaciones. Las secuencias de los genes *rpoB* se han utilizado para identificar y clasificar varias especies de los géneros *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Vibrio* y *Bacillus* (18). El gen *rpoD*, codifica para el factor σ_{70} , componente de la holoenzima ARN polimerasa bacteriana, es responsable de reconocer los promotores de genes involucrados en la mayoría de funciones celulares (19). Este gen esencial evoluciona más rápido que los genes ribosomales y el análisis de su secuencia genera una resolución más alta que las secuencias del gen 16S ARNr (20,21). El gen *gyrB*, codifica la subunidad β de la enzima ADN girasa o topoisomerasa II, involucrada en la replicación del ADN bacteriano y su secuencia es utilizada en taxonomía (22) debido a que presenta una tasa de sustituciones silentes cuatro veces mayor que el 16S ARNr y está en monocopia. Esto ha permitido la discriminación e identificación de especies relacionadas a *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Vibrio* y también enterobacterias, micobacterias y bacterias ácido lácticas (5). Diversos estudios han reportado el uso individual y combinado de los genes *gyrB*, *rpoB* y *rpoD* para inferir la identificación y filogenia en el género *Pseudomonas* (16,23). De igual manera, se ha documentado el uso de los genes *gyrB* y *rpoB* como marcadores taxonómicos para la identificación y caracterización molecular de enterobacterias, tal es el caso de los géneros *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, así como también en miembros pertenecientes a la especie *Bacillus thuringiensis* (24,25).

La información de los genes individuales proporciona información valiosa; sin embargo, no reflejan relaciones filogenéticas generales, ya que solo demuestran la evolución específica de cada gen (12). En este contexto, el enfoque de análisis de múltiples genes o multilocus, MLSA, es útil para superar estas limitaciones, debido a que puede proporcionar una visión más detallada y robusta de las relaciones evolutivas entre cepas bacterianas. Esto genera una mejora en la precisión de identificación y clasificación taxonómica. Por lo que, ayuda a resolver ambigüedades y obtener una comprensión más completa de la diversidad bacteriana. (26).

La secuenciación del genoma completo ha surgido como una herramienta complementaria e importante para obtener una visión más precisa de la identificación y taxonomía bacteriana (27). La genómica permite una evaluación amplia y exhaustiva de la variabilidad genética y de las relaciones evolutivas entre las cepas, ofreciendo una base sólida para validar y afinar los resultados obtenidos mediante el análisis de genes individuales y concatenados (28). Esta proporciona una resolución aún mayor, al identificar variaciones genéticas adicionales y establecer relaciones taxonómicas más precisas que podrían no ser evidentes a partir de análisis basados en genes específicos y concatenados (29).

Existen muchas especies bacterianas que poseen una potencial aplicación en la industria biotecnológica; como aquellas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, entre otros (30-32). El género *Pseudomonas* presenta especies capaces de colonizar diferentes nichos ecológicos (33). Si bien existen patógenos como la especie, *Pseudomonas aeruginosa*, la mayoría de las especies pertenecientes a este género son comensales y muchas se han reportado como agentes de biorremediación, usados en ingeniería metabólica, así como promotores de crecimiento vegetal (34-36). La familia *Enterobacteriaceae* incluye a bacterias conocidas por fermentar azúcares para producir ácido láctico y algunas por generar enfermedades como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, entre otras (37). Dentro de ellas también se pueden encontrar especies ambientales que tienen potencial biotecnológico. En el género *Enterobacter* y *Citrobacter* se han comunicado como especies con potencial uso en la biorremediación de hidrocarburos, de metales pesados y en la promoción de crecimiento vegetal (38-43).

En la región de Ica, donde las fuentes acuáticas pueden estar expuestas a la contaminación por actividades industriales y mineras, la identificación precisa de bacterias resistentes a mercurio es de gran importancia por su potencial aplicación. Esta identificación permite comprender la diversidad de estas bacterias y determinar a qué grupos pertenecen filogenéticamente, lo que proporciona información básica sobre su rol ambiental y su capacidad de resistencia, adaptación y detoxificación del mercurio (44). Esta información permite seleccionar de manera más efectiva las cepas con el mayor potencial para aplicaciones prácticas en biorremediación, ya que conocer la diversidad y clasificación taxonómica de las bacterias resistentes, permite diseñar estrategias de biorremediación efectivas, optimizando la recuperación de ecosistemas contaminados y promoviendo la salud ambiental de manera más efectiva (45).

En la actualidad, las bacterias requieren ser adecuadamente identificadas o caracterizadas, lo que implica también conocer su diversidad funcional y potenciales aplicaciones. Por lo tanto, la identificación precisa de bacterias ambientales puede conducir al descubrimiento de nuevas especies y comprender sus roles biológicos. Asimismo, la diversidad genética y la distribución de las cepas en el ambiente ofrece una comprensión más profunda de su interacción con otros organismos y su entorno. En el laboratorio de Biotecnología, Biología Molecular y Microbiología Industrial de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga se cuenta con una colección de bacterias resistentes a mercurio aisladas de fuentes acuáticas, las cuales no han sido identificadas mediante métodos moleculares y se requiere además conocer sus relaciones filogenéticas para evaluar su potencial aplicación biotecnológico.

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la identificación y filogenia de bacterias resistentes a mercurio aisladas de diferentes ambientes acuáticos de la región de Ica, mediante el

análisis de secuencias de los genes *gyrB*, *rpoB* y *rpoD*. Esto permitió la identificación y clasificación precisa de especies de *Pseudomonas* y enterobacterias, proporcionando una confirmación robusta de la afiliación y filogenia. Se complementó la identificación mediante la secuenciación del gen 16S ARNr, enfoque MLSA e información genómica completa.

II. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

2.1 Material Biológico

2.1.1 Cepas bacterianas

En el estudio se utilizaron 18 cepas bacterianas aisladas a partir de muestras de ambientes acuáticos de diferentes zonas de la región de Ica y que pertenecen a la colección del Laboratorio de Biotecnología, Biología Molecular y Microbiología Industrial de la UNICA. El código de las cepas se indica a continuación: I3-2, I3-3, I4-1, I4-2, S1-1, S2-1, Y1-E, Y1-F, Y1-G1, Y1H-2, C1-G1, C1-J1, N1A-1, N1A-2, M1C-3, EL2-2, 4E y Y-01.

Se utilizaron como controles las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Escherichia coli* BW 25113 proporcionado por el laboratorio BioSlab.

2.2 Condiciones de crecimiento e incubación

Las cepas fueron conservadas a -20 °C en caldo Luria Bertani (LB) suplementado con glicerol al 30%. Estas se reactivaron en agar o caldo Luria Bertani (LB) y cuando fue necesario se adicionó HgCl₂ hasta una concentración de 10 µg/mL. Las incubaciones se realizaron a 35 °C durante 24 h.

2.3 Extracción y visualización de ADN genómico

El ADN genómico se extrajo utilizando el kit comercial Gene JET (Thermo Scientific, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante (ANEXO, Figura 9). Se extrajo 100 µL de cultivo conservado y se inoculó en 1.5 mL de medio LB. Este se incubó a 35 °C durante 18 h. El cultivo se centrifugó a 8000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 180 µL de solución de digestión, con ayuda de micropipeta. Se añadió 20 µL de proteinasa K y se mezcló brevemente en vórtex hasta obtener una suspensión uniforme. La mezcla se incubó en baño María a 56 °C por 30 min, mezclando por inversión cada 10 min, hasta obtener el lisado celular. Posteriormente, se añadió 20 µL de RNasa, se mezcló brevemente en vórtex y se incubó a temperatura ambiente por 10 min, luego se adicionó 200 µL de solución de lisis y se aplicó vórtex por 15 s hasta obtener una mezcla homogénea. Luego, se adicionó 400 µL de etanol al 50% y se mezcló por vórtex. El lisado se transfirió a una columna de purificación insertada en un tubo colector de 2 mL. Este se llevó a centrifugar a 8000 rpm por 1 min, se descartó el líquido pasado y el tubo colector y luego se reemplazó por uno nuevo. Se adicionó a la columna 500 µL de tampón de lavado 1 y se centrifugó a 8000 rpm por 1 min. Se descartó el líquido pasado y se repitió el lavado con 500 µL de tampón de lavado 2. En seguida, se centrifugó a máxima velocidad (14000 rpm) por 3 min, se descartó el líquido pasado y se repitió la centrifugación a máxima velocidad por 1 min. Se descartó el tubo colector que tenía el líquido pasado y se colocó la columna en un microtubo Eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente, se adicionó 100 µL de tampón de elución en el centro de la columna. Se dejó incubar por 2 min a temperatura ambiente y luego

se centrifugó a 12000 rpm por 1 min. Para obtener mayor cantidad de ADN, se adicionó 100 µL de tampón de elución y se repitió el paso anterior. Finalmente, el ADN se almacenó a -20 °C. La verificación de la extracción de ADN genómico se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE) a 50 V durante 1 h. Las muestras se prepararon mezclando 1 µL de tampón de carga con 5 µL de solución de ADN. La visualización de ADN se realizó por tinción del gel con bromuro de etidio (0.1 µg/mL) por 3 min y lavado con agua destilada por 30 min. Finalmente, el gel se observó en un transiluminador Biotop a 320 nm (ANEXO, Figura 10).

2.4 Amplificación de marcadores moleculares mediante PCR.

La amplificación de los genes 16S rRNA, *gyrB*, *rpoB* y *rpoD* (ANEXO, Figura 11), utilizados como marcadores moleculares se realizó mediante PCR en un termociclador TC 1000-G DLAB utilizando los programas y partidores indicados en la Tabla 1. El volumen de reacción fue de 20 µL y los componentes de la reacción se detallan en la Tabla 2.

Tabla 1. Partidores y condiciones de hibridación utilizados en las reacciones de PCR

Gen	Partidor	Secuencia (5' - 3')	Longitud (bp)	Temperatura hibridación (°C)	Ref.
16S ARNr	16S-F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	20	57	(46)
	16S-R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	22		
<i>gyrB</i>	gyrB1-F	TAARTTYGAYGAYAACTCYTAYAAAAGT	27	59	(14)
	gyrB1-R	CMCCYTCCACCARGTAMAGTTC	22		
	gyrB2-F	GTGTCGGTKGTRAACGCC C	19	53	(21)
	gyrB2-R	GCYTCRTTSGGRTTYTCCAGCAGG	24		
<i>rpoB</i>	rpoB-F	TGGCCGAGAACCAGTTCCGCGT	22	64	(47)
	rpoB-R	CGGCTTCGTCCAGCTTGTTCAG	22		
<i>rpoD</i>	rpoD-F	ATYGAAATCGCCAARCG	17	46	(21)
	rpoD-R	CGGTTGATKTCCTTGA	16		

Tabla 2. Componentes de reacción de PCR para amplificar genes marcadores

Componente	Volumen (μL)
H ₂ O libre de nucleasas	8.5
PCR master Mix (2x) de Thermo Scientific	10
Partidor directo-F (40 pmol/ μL)	0.5
Partidor reverso- R (40 pmol/ μL)	0.5
ADN molde (100 ng/ μL)	0.5
Volumen final	20

2.4.1 Amplificación del gen 16S ARNr.

La amplificación del marcador universal 16S ARNr se realizó con base al protocolo siguiente: desnaturalización inicial a 96 °C por 4 min, seguido por 30 ciclos de PCR (desnaturalización a 94 °C por 30 s; hibridación de partidores a 57 °C por 30 s; extensión a 72 °C por 1 min) y extensión final a 72 °C por 10 min (46).

2.4.2 Amplificación de los genes *gyrB*, *rpoB* y *rpoD*.

Para la amplificación del gen *gyrB*, se utilizaron los partidores *gyrB1* (14) y *gyrB2* (21). Para la reacción de PCR con los partidores *gyrB1* se utilizó el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos de PCR (desnaturalización a 94 °C por 1 min; hibridación de partidores a 59 °C por 1 min; extensión a 72 °C por 2 min) y extensión final a 72 °C por 10 min.

En el caso de la amplificación de los genes los *rpoB*, *rpoD* y el uso de partidores *gyrB2*, se realizó el programa siguiente: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido por 30 ciclos de PCR (desnaturalización a 94 °C por 1 min; hibridación según se describe en la Tabla 1 para cada partidor; extensión a 72 °C por 90 s) y extensión final a 72 °C por 10 min (23).

2.5 Verificación de amplicones de PCR en gel de agarosa

Para verificar la obtención de amplicones, alícuotas de 5 μL de producto de cada reacción de PCR fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en tampón TAE. Para comparar el tamaño de los amplicones se utilizó el marcador de peso molecular Gene ruler 1kb DNA Lader de Thermo Scientific, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito para la visualización de ADN (ANEXO, Figuras 12 a Figura 19).

2.6 Secuenciación de amplicones de PCR

Luego de verificar el tamaño de los productos de PCR, los amplificados fueron almacenados a -20 °C hasta su remisión a secuenciación a la empresa Macrogen USA (<https://lims.psomagen.com/>), según las indicaciones y la información solicitada en los formatos

de remisión (<https://lims.psomagen.com/support/seq/down.jsp>). De cada producto de amplificación se remitió 20 µL (50 µg/µL) y de cada partidor 50 µL (40 pmol/µL).

2.7 Análisis *in silico* de secuencias nucleotídicas

Para la identificación de las cepas bacterianas, primero se realizó el análisis y edición de las secuencias nucleotídicas con el programa Bioedit. Luego, se realizó una búsqueda de similitud del gen ribosomal *16S* y los genes de mantenimiento en la base de datos EzBioCloud y GenBank. Para obtener un alineamiento múltiple, las secuencias obtenidas fueron alineadas con secuencias tipo relacionadas mediante el programa MEGA-X y a su vez se eligió el mejor modelo de sustitución nucleotídica para la construcción de árboles filogenéticos. Los árboles filogenéticos de cada gen fueron realizados de manera individual y concatenados (ANEXO, Figura 20).

2.7.1 Procesamiento y edición de secuencias nucleotídicas

Las secuencias nucleotídicas de los amplificadores de PCR fueron recibidas en formato texto y los cromatogramas en formato ab1 y PDF (ANEXO, Figura 21). El análisis, limpieza y procesamiento de cada una de las secuencias se realizó con el programa Bioedit (48) (ANEXO, Figura 22). Para ello, se ejecutó la opción “Open file” y se seleccionó los cromatogramas en formato ab1, luego se analizó la calidad de las secuencias directa y reversa, cuando fue necesario, se realizaron correcciones a las secuencias por errores de secuenciamiento. Se exportó con la opción “copy sequence as raw text” y se guardó en formato FASTA. Para el alineamiento de secuencias, se inició eligiendo la opción “new alignment” y se seleccionaron las secuencias previamente corregidas, luego se generó la secuencia directa adicional utilizando “Nucleic acid” seguido de “Reverse Complement”, “pairwise alignment” y “align two sequence” el cual se usó como paso final para obtener el alineamiento. Finalmente, para obtener la secuencia consenso se utilizó la opción “create consensus sequence”. Este último se importó y se guardó en formato FASTA para análisis posteriores.

2.7.2 Búsqueda de secuencias homologas

La búsqueda de secuencias homólogas del gen *16S ARNr* se realizó con ayuda de la base de datos de secuencias curadas de EzBioCloud (49) usando el programa de búsqueda de similitud de nucleótidos disponible en: <https://www.ezbiocloud.net/> (ANEXO, Figura 23). Se seleccionó la opción “16S-based ID” y se ingresó la secuencia consenso obtenida. Las cepas de estudio se compararon con las cepas tipo de especies estrechamente relacionadas con base a la mayor similitud de identidad de secuencias. Para la búsqueda de secuencias de los genes *gyrB*, *rpoB* y *rpoD*, se utilizó la base de datos GenBank mediante el algoritmo de búsqueda “Basic Local Alignment Search Tool” BLAST, con el programa BLASTn de

“National Center for Biotechnology Information” NCBI, disponible en https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch. (ANEXO, Figura 24). Se seleccionó en el conjunto de búsqueda de la base de datos las opciones “nucleotide collection (nr/nt)” y “Sequences from type material”. Además, se optimizó la programación con “Highly similar sequences (megablast)”.

2.7.3 Construcción de matriz de identidad

Los datos en porcentaje de similitud de secuencias se obtuvieron mediante la comparación de pares con el programa “Clustal W” disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (50) (ANEXO, Figura 25). Para ello, se seleccionó el tipo de secuencia “DNA” y se cargó las secuencias nucleotídicas obtenidas previamente. Para descargar la data procesada, se ingresó en la opción “Result files” y luego en “Percent Identity Matrix”.

2.7.4 Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas.

Las secuencias obtenidas de cada uno de los genes en estudio fueron procesadas en el programa MEGA-X versión 11.0.13 (51). Se creó un alineamiento ingresando en el apartado ALIGN seguido de “edit./build alignment” y con la opción “retrieve a sequence from a file” se ingresaron las secuencias previamente guardadas en formato FASTA. El alineamiento múltiple se procesó usando el subprograma MUSCLE (52) contenido en el programa MEGA-X (ANEXO, Figura 26). Los valores de configuración se utilizaron de manera predeterminada. La data de alineamiento se guardó en formato MAS, extensión generada compatible por el programa para análisis posteriores.

2.7.5 Concatenado de secuencias génicas

La data de alineamiento múltiple obtenida se utilizó para concatenar el gen *16S ARNr* con los genes de mantenimiento *gyrB*, *rpoB* y *rpoD* y así formar una secuencia supergénica. Para ello se usó el programa MEGA-X, seleccionando en la opción “Concatenate Sequence Alignments” y ubicando la carpeta que contiene exclusivamente los datos de alineamiento de cada uno de los genes. Una vez concatenado, la data se exportó en formato FASTA y se guardó para la posterior construcción de árboles filogenéticos.

2.7.6 Elección de modelo de sustitución nucleotídica

El mejor modelo evolutivo para el análisis filogenético se determinó utilizando la data de alineamiento previamente obtenida. Se utilizó el programa MEGA-X, ingresando en el apartado “Models” en la opción “Find Best DNA/Proteins Models (ML)”, los parámetros se

definieron por defecto. Se eligió utilizar el modelo "Kimura 2-parameter" (K2) para cada uno de los genes de estudio.

2.7.7 Construcción de árboles filogenéticos mediante análisis multilocus de secuencias (MLSA)

Para la construcción de los árboles filogenéticos de cada uno de los genes de estudio de manera individual y concatenados se utilizó el programa MEGA-X. Se inició en la opción "Phylogeny" y se seleccionó "Construct/Test Maximun Likelihood Tree". En los parámetros de preferencia, se eligieron 1000 repeticiones para el número de replicaciones "Bootstrap". Además, para cada uno de los genes, se seleccionó el modelo de sustitución nucleotídica "Kimura 2-parameter".

2.8 Secuenciación y análisis de datos genómicos bacterianos.

Para afiliar la identificación precisa de los genes de estudio, se realizó el secuenciamiento y análisis de datos del genoma completo de las cepas (ANEXO, Figura 27). La calidad de secuencias y el ensamblaje de genoma se realizaron con los programas A5, miSeq y QUAST. Con el programa Prokka se hizo la anotación de genes. Para respaldar la identificación y filogenia se comparó los genomas mediante la identidad de promedio nucleótidos (ANI), hibridación digital DNA-DNA (dDDH) y la distancia de genoma a genoma (GBDP).

2.8.1 Secuenciamiento de nueva generación (NGS) de cepas de *Pseudomonas*.

La extracción de ADN genómico de las cepas C1-G1, C1-J1, EL2-2, I3-3, I4-1, I4-2, M1C-3, N1A-2, S2-1, Y1-E, Y1-F, Y1H-2, se realizó utilizando el kit comercial QIAamp DNA Mini siguiendo los pasos indicados por el fabricante.

Para la secuenciación de los genomas, la concentración de ADN fue determinada utilizando el kit de ensayo Qubit 1X dsDNA (Invitrogen). Se utilizó 0.2 ng/ μ L en un volumen final de 10 μ L de cada muestra de ADN. Las genotecas de secuenciamiento se prepararon usando el kit library Nextera XT. Inicialmente, se realizó la marcación (tagmentación) del ADN con la finalidad de obtener fragmentos de 300 bp. Luego se realizó una PCR para la ver la amplificación de ADN tagmentado seguido de la adición de adaptadores de índices Nextera. El DNA resultante se purificó mediante perlas magnéticas AMPure XP y luego fue eluído en 25 μ L de buffer de resuspensión. Para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN de la genoteca, éstos se visualizaron en un gel de agarosa al 2% y cuantificada por el equipo Qubit. Finalmente, se tomó 5 μ g de cada ADN a secuenciar, se preparó a una concentración de 4nM en buffer de resuspensión y se cargó el cartucho de secuenciamiento. Los procesos de secuenciamiento fueron realizados en el secuenciador MiSeq de la marca Illumina (California, Estados Unidos) perteneciente al Instituto Nacional de Salud, Lima (INS) (ANEXO, Figura 28).

2.8.2 Control de calidad y ensamblaje de genomas

El control de calidad y ensamblaje de genomas se realizó utilizando el programa FastQC v0.11.8 (53), aplicable mediante el sistema operativo Linux Ubuntu 22.04 LTS. Los datos obtenidos de la secuenciación fueron evaluados y ensamblados con la estrategia de novo, mediante el programa A5-miseq v20160825 (54), que contiene el programa de limpieza de adaptadores Trimmomatic V0.36. En seguida, se evaluó la calidad de los ensamblajes con QUAST (55) (ANEXO, Figura 29 y Figura 30).

2.8.3 Anotación y características de los genomas

Las regiones codificantes de proteínas en las secuencias de ADN (cds) se predijeron y anotaron funcionalmente (genes y nombres de productos) usando el programa Prokka versión 1.11 (56), que coordina un conjunto de herramientas bioinformáticas y bases de datos existentes para la anotación de secuencias del genoma procariótico, incorporando BLAST+ (57) y Hmmer (58). Para ello, se preparó una base de datos personalizada con los genomas disponibles en la base de datos de acceso libre en Genbank de NCBI. Para crear la base de datos se utilizó la siguiente herramienta: `prokka-genbank_to_fasta_db`. Seguido de los siguientes comandos: `prokka-genbank_to_fasta_db Coccus1.gbkcoccus2.gbkcoccus3.gbkcoccus4.gbkcoccus.faa > Coccus.faa, cd-hit -i Coccus.faa -o Coccus -T 0 -M 0 -g 1 -s 0.8 -c 0.9, rm -fv Coccus.faa Coccus.bak.clstr Coccus.clstr, makeblastdb -dbtype prot -in Coccus, mv Coccus.p* /path/to/prokka/db/genus/. El anotamiento se realizó utilizando el siguiente comando, prokka --outdir mydir --prefix mygenome contigs.faa, con el cual se obtuvieron diferentes archivos que fueron utilizados en análisis posteriores (ANEXO, Figura 31).`

2.8.4 Identidad promedio de nucleótidos (ANI)

La identidad promedio de nucleótidos basados en BLAST+ (ANIb) de cada genoma, se calculó usando la herramienta ANI calculator disponible en: <https://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/> (59) (ANEXO, Figura 32). Los genomas en formato FASTA, se subieron junto con cada uno de los genomas tipo para determinar el parentesco de identidad.

2.8.5 Hibridación digital DNA-DNA (dDDH)

El desarrollo de la hibridación DNA-DNA de forma digital se realizó usando el servidor de genoma cepa tipo ("Type (Strain) Genome Server 3.0", TYGS) disponible en: <https://tygs.dsmz.de/> (60) (ANEXO, Figura 33), Primero, se seleccionó en la opción "Submit your query", seguida de la carga de los archivos de ensamblaje genómico en formato FASTA

generados previamente. Después, se seleccionaron las secuencias tipo de genoma de miembros estrechamente relacionados existentes en la base de datos, a su vez se introdujeron los números de acceso GenBank de los genomas que no se encuentran en dicha base. Los resultados proporcionados por el servidor TYGS, fueron remitidos por correo electrónico. Una vez en el servidor, en el apartado "Pairwise comparisons of user genomes vs type Strain genomes" se descargaron los resultados de hibridación. Se seleccionaron los valores de hibridación recomendados por el servidor como resultado.

2.8.6 Construcción de árbol filogenómicos mediante la filogenia basada en la distancia BLAST del genoma (GBDP)

La construcción del árbol filogenómicos se basó en los resultados proporcionados por el servidor TYGS, conforme a la metodología de hibridación digital (dDDH) anteriormente descrita. Para visualizar el árbol filogenómico, se accedió al apartado "Phylogenies" en el servidor, seguido de la opción "view tree". El árbol se descargó en formato PNG para su posterior interpretación.

III. RESULTADOS

Tabla 3. Similitud de secuencias del gen 16S ARNr entre cepas resistentes a mercurio aisladas de ambientes acuáticos y cepas tipo de *Pseudomonas*.

Cepa	Cepa tipo relacionada	Acceso	Identidad (%)
C1-G1	<i>Pseudomonas monteilii</i>	BBIS01000088	100.00
C1-J1	<i>Pseudomonas juntendi</i>	MK680061	99.69
EL2-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BAMA01000316	100.00
I3-3	<i>Pseudomonas putida</i>	AP013070	99.59
I4-1	<i>Pseudomonas knackmussii</i>	HG322950	99.91*
I4-2	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	BBIV01000080	99.87
M1C-3	<i>Pseudomonas laurentiana</i>	KY471137	100.00*
N1A-2	<i>Pseudomonas monteilii</i>	BBIS01000088	100.00
S2-1	<i>Pseudomonas laurentiana</i>	KY471137	99.93
Y1-E	<i>Pseudomonas laurentiana</i>	KY471137	99.86
Y1-F	<i>Pseudomonas juntendi</i>	MK680061	99.87
Y1H-2	<i>Pseudomonas knackmussii</i>	HG322950	99.35

* Cepa que posee más de una similitud. Valor de corte: 16S ARNr - 99% (10).

Tabla 4. Similitud de secuencias del gen *gyrB* entre cepas resistentes a mercurio aisladas de ambientes acuáticos y cepas tipo de *Pseudomonas*.

Cepa	Cepa tipo relacionada	Acceso	Identidad (%)
C1-G1	<i>Pseudomonas monteilii</i>	JHYV01000019: 112180-114600	99.96
C1-J1	<i>Pseudomonas juntendi</i>	BLJG01000089.1: 30173-32591	97.27
EL2-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NZ_CP012001.1: 4275-6695	99.75
I3-3	<i>Pseudomonas ceruminis</i>	BLXP01000045.1 : 1251-3671	92.11
I4-1	<i>Pseudomonas asiatica</i>	BLJF01000003.1 : 120644-123064	100.00
I4-2	<i>Pseudomonas asiatica</i>	BLJF01000003.1 : 120644-123064	98.55
M1C-3	<i>Pseudomonas alloputida</i>	OPYN01000001.1: 156768-159188	97.00
N1A-2	<i>Pseudomonas monteilii</i>	JHYV01000019: 112180-114600	99.96
S2-1	<i>Pseudomonas alloputida</i>	OPYN01000001.1: 156768-159188	97.00
Y1-E	<i>Pseudomonas alloputida</i>	OPYN01000001.1: 156768-159188	97.00
Y1-F	<i>Pseudomonas juntendi</i>	BLJG01000089.1: 30173-32593	98.72
Y1H-2	<i>Pseudomonas humi</i>	BDGS01000001.1: 2214068-2216488	95.62

Valor de corte: No asignada (es variable)

Tabla 5. Similitud de secuencias del gen *rpoB* entre cepas resistentes a mercurio aisladas de ambientes acuáticos y cepas tipo de *Pseudomonas*.

Cepa	Cepa tipo relacionada	Acceso	Identidad (%)
C1-G1	<i>Pseudomonas monteilii</i>	JHYV01000049.1: 7740-11813	99.98
C1-J1	<i>Pseudomonas juntendi</i>	BLJG01000130.1: 7935-12008	99.44
EL2-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CP012001.1 : 710052-714125	99.48
I3-3	<i>Pseudomonas ceruminis</i>	BLXP01000072.1: 3972-8045	95.95
I4-1	<i>Pseudomonas asiatica</i>	BLJF01000002.1: 373707-377780	99.98
I4-2	<i>Pseudomonas asiatica</i>	BLJF01000002.1: 373707-377780	98.94
M1C-3	<i>Pseudomonas alloputida</i>	JHYV01000049.1: 7740-11813	98.60
N1A-2	<i>Pseudomonas monteilii</i>	JHYV01000049.1: 7740-11813	99.98
S2-1	<i>Pseudomonas alloputida</i>	JHYV01000049.1: 7740-11813	98.60
Y1-E	<i>Pseudomonas alloputida</i>	JHYV01000049.1: 7740-11813	98.60
Y1-F	<i>Pseudomonas juntendi</i>	BLJG01000130.1: 7935-12008	99.56
Y1H-2	<i>Pseudomonas delhiensis</i>	FNEC01000074.1:107300-111373	96.20

Valor de corte: *rpoB* >97.7 % (61).

Tabla 6. Similitud de secuencias del gen *rpoD* entre cepas resistentes a mercurio aisladas de ambientes acuáticos y cepas tipo de *Pseudomonas*.

Cepa	Cepa tipo relacionada	Acceso	Identidad (%)
C1-G1	<i>Pseudomonas monteilii</i>	JHYV01000010.1: 51262-53112	99.78
C1-J1	<i>Pseudomonas juntendi</i>	BLJG01000199.1: 5717-7567	98.43
EL2-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CP012001.1: 568631-570484	99.89
I3-3	<i>Pseudomonas faucium</i>	BQIP01000041.1:10921-12771	94.87
I4-1	<i>Pseudomonas asiatica</i>	BLJF01000002.1: 306771-308621	99.95
I4-2	<i>Pseudomonas asiatica</i>	BLJF01000002.1: 306771-308621	98.33
M1C-3	<i>Pseudomonas allopitida</i>	JHYV01000010.1:51262-53112	98.30
N1A-2	<i>Pseudomonas monteilii</i>	JHYV01000010.1:51262-53112	99.78
S2-1	<i>Pseudomonas allopitida</i>	JHYV01000010.1:51262-53112	98.20
Y1-E	<i>Pseudomonas allopitida</i>	JHYV01000010.1:51262-53112	98.40
Y1-F	<i>Pseudomonas juntendi</i>	BLJG01000199.1:5717-7567	99.41
Y1H-2	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	FOLS01000032.1:68745-70595	96.60

Valor de corte: *rpoD* >98% (16).

Tabla 7. Similitud de secuencias de genes concatenados *16S-gyrB-rpoB-rpoD* (MLSA) entre cepas resistentes a mercurio aisladas de ambientes acuáticos y cepas tipo de *Pseudomonas*.

Cepa	Cepa tipo relacionada	Acceso	Identidad (%)
C1-G1	<i>Pseudomonas monteilii</i>	JHYV00000000	99.78
C1-J1	<i>Pseudomonas juntendi</i>	BLJG00000000	98.60
EL2-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	JYLC00000000	99.89
I3-3	<i>Pseudomonas ceruminis</i>	BLXP00000000	94.50
I4-1	<i>Pseudomonas asiatica</i>	BLJF00000000	99.95
I4-2	<i>Pseudomonas asiatica</i>	BLJF00000000	98.33
M1C-3	<i>Pseudomonas alloputida</i>	OLKK00000000	98.00
N1A-2	<i>Pseudomonas monteilii</i>	JHYV00000000	99.78
S2-1	<i>Pseudomonas alloputida</i>	OLKK00000000	98.00
Y1-E	<i>Pseudomonas alloputida</i>	OLKK00000000	98.00
Y1-F	<i>Pseudomonas juntendi</i>	BLJG00000000	99.30
Y1H-2	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	FOLS00000000	96.10

Valor de corte: MLSA >97 % (23).

Tabla 8. Similitud de secuencias del gen 16S ARNr entre 6 cepas resistentes a mercurio aisladas de ambientes acuáticos y cepas tipo de enterobacterias.

Cepa	Cepa tipo relacionada	Acceso	Identidad (%)
I3-2	<i>Enterobacter chengduensis</i>	KY979142	99.41
N1A-1	<i>Citrobacter freundii</i>	AJ233408	99.93
S1-1	<i>Enterobacter chengduensis</i>	KY979142	99.41
Y-01	<i>Escherichia coli</i>	X80725	99.72
Y1-G1	<i>Enterobacter hormaechei subsp. xiangfangensis</i>	FYBF01000083	99.73
4E	<i>Citrobacter portucalensis</i>	MVFY0100035	99.86

Valor de corte: 16S ARNr - 99% (10).

Tabla 9. Similitud de secuencias del gen *gyrB* entre cepas resistentes a mercurio aisladas de ambientes acuáticos y cepas tipo de enterobacterias.

Cepa	Cepa tipo relacionada	Acceso	Identidad (%)
I3-2	<i>Enterobacter mori</i>	AEXB00000000.1: 205751- 208162	98.35
N1A-1	<i>Citrobacter freundii</i>	CP049015.1: 3611- 6025	97.63
S1-1	<i>Enterobacter mori</i>	AEXB00000000.1: 205751- 208162	98.66
Y-01	<i>Shigella sonnei</i>	CP026802.1: 4030695- 4033109	99.59
Y1-G1	<i>Enterobacter hormaechei subsp. xiangfangensis</i>	CP017183.1: 3941- 6352	97.42*
4E	<i>Citrobacter portucalensis</i>	MVFY00000000.1: 374805-377219	97.94

*Cepa que posee más de una similitud

Valor de corte: No asignada (es variable)

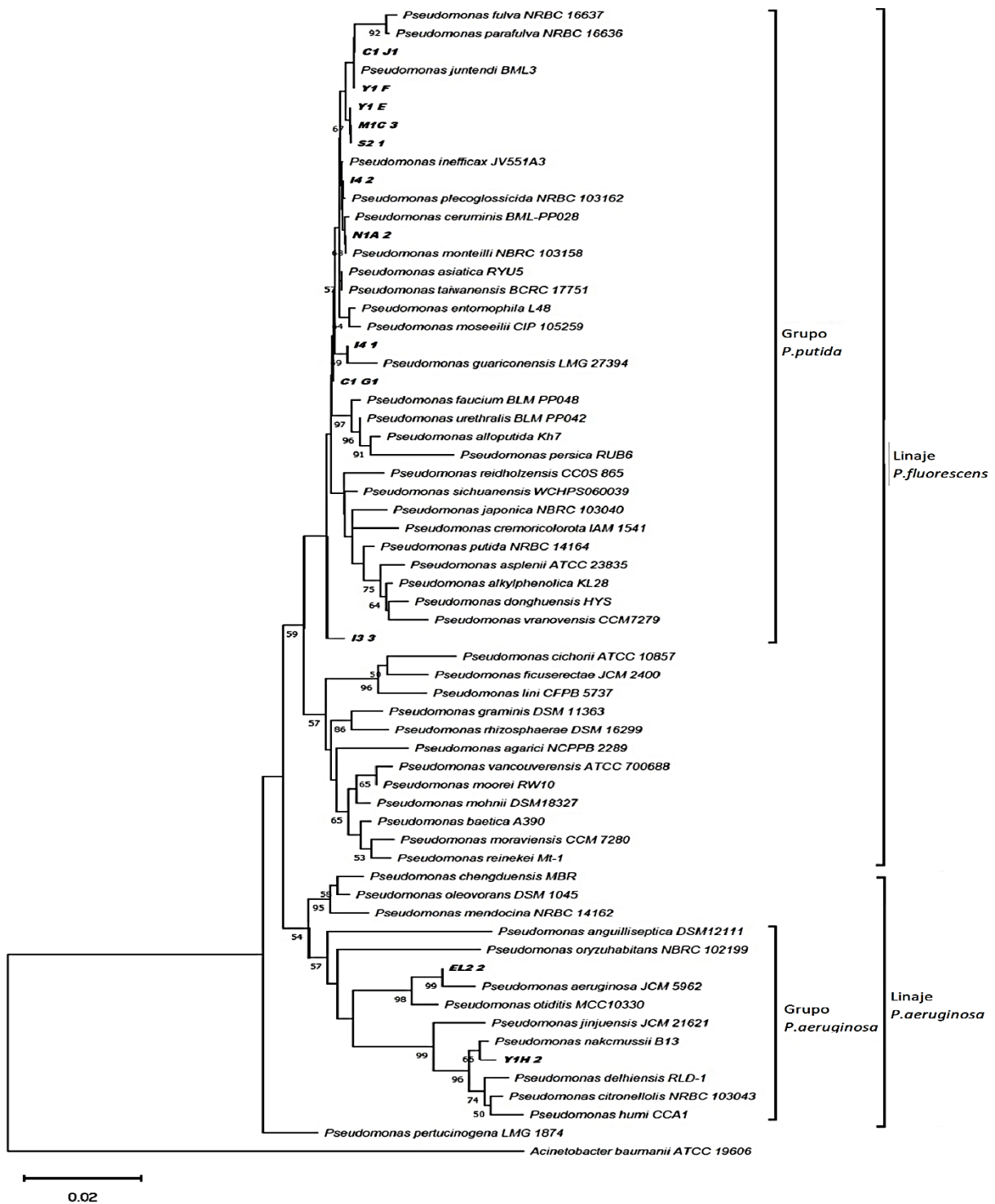


Figura 1. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias del gen 16S ARNr que muestra la relación entre las cepas aisladas de ambientes acuáticos y taxones dentro del género *Pseudomonas*. Los valores de Bootstrap (≥ 50) se muestran en los puntos de ramificación con porcentajes de 1000 réplicas. Se utilizó como grupo externo la cepa tipo de *Acinetobacter baumannii*. La barra de sustituciones por posición de nucleótidos es 0,02.

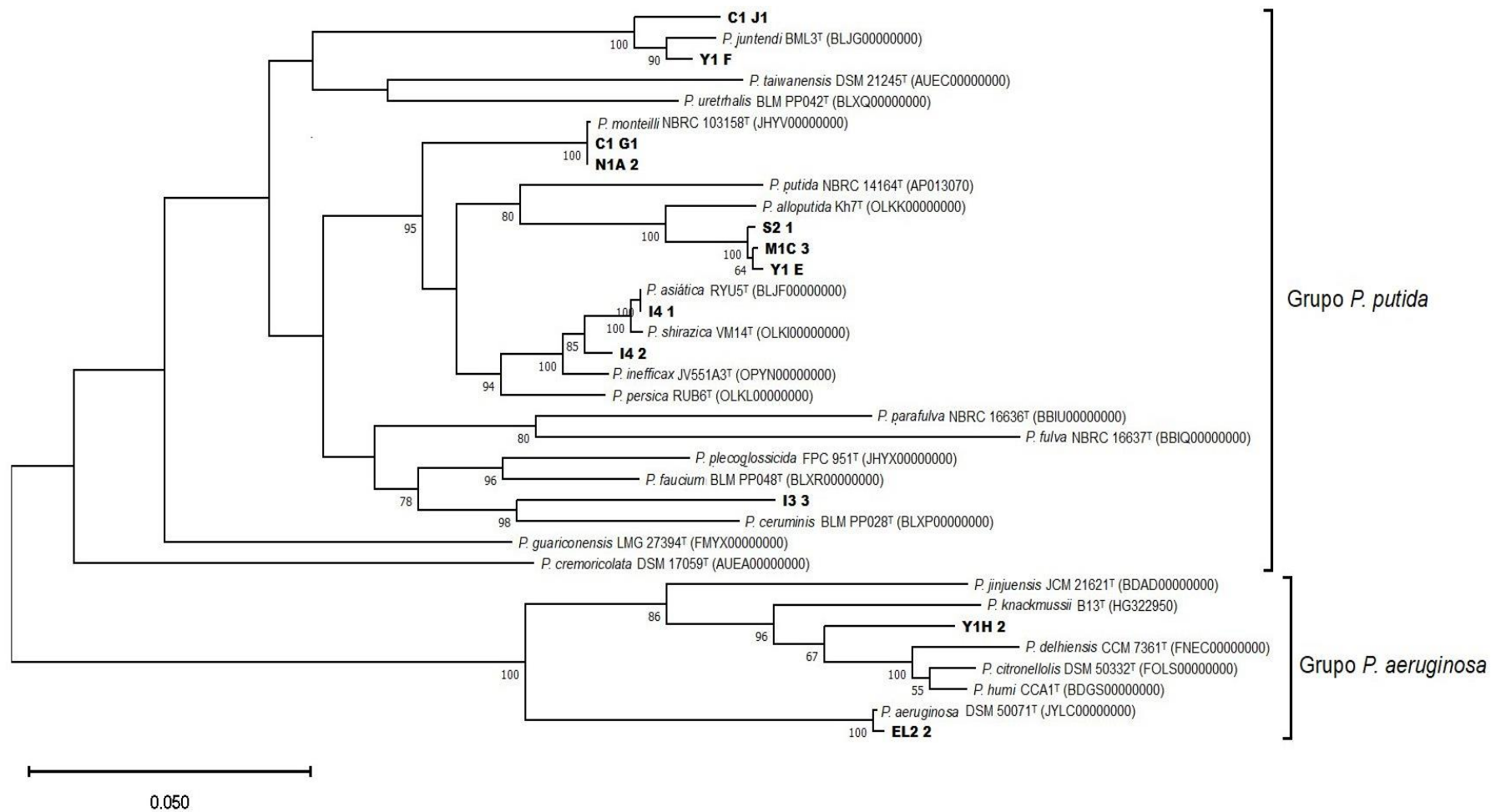


Figura 2. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias del gen *gyrB* que muestra la relación entre las cepas aisladas de ambientes acuáticos y taxones estrechamente relacionados dentro del género *Pseudomonas*. Los valores de Bootstrap (≥ 50) se muestran en los puntos de ramificación con porcentajes de 1000 réplicas. Los números de acceso del NCBI se muestran en paréntesis. La barra de sustituciones por posición de nucleótidos es 0,05.

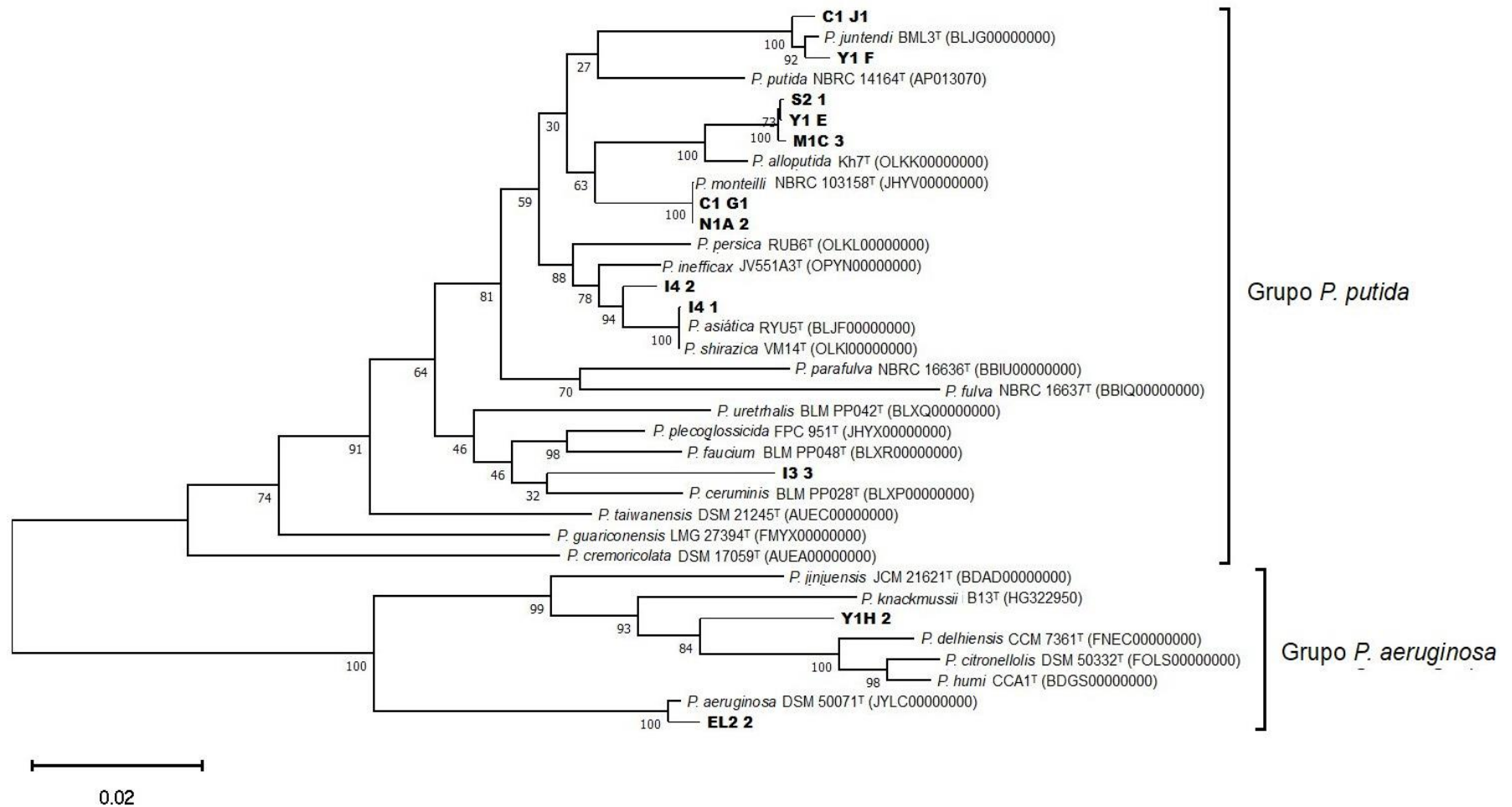


Figura 3. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias del gen *rpoB* que muestra la relación entre las cepas aisladas de ambientes acuáticos y taxones estrechamente relacionados dentro del género *Pseudomonas*. Los valores de Bootstrap (≥ 50) se muestran en los puntos de ramificación con porcentajes de 1000 réplicas. Los números de acceso del NCBI se muestran en paréntesis. La barra de sustituciones por posición de nucleótidos es 0.02

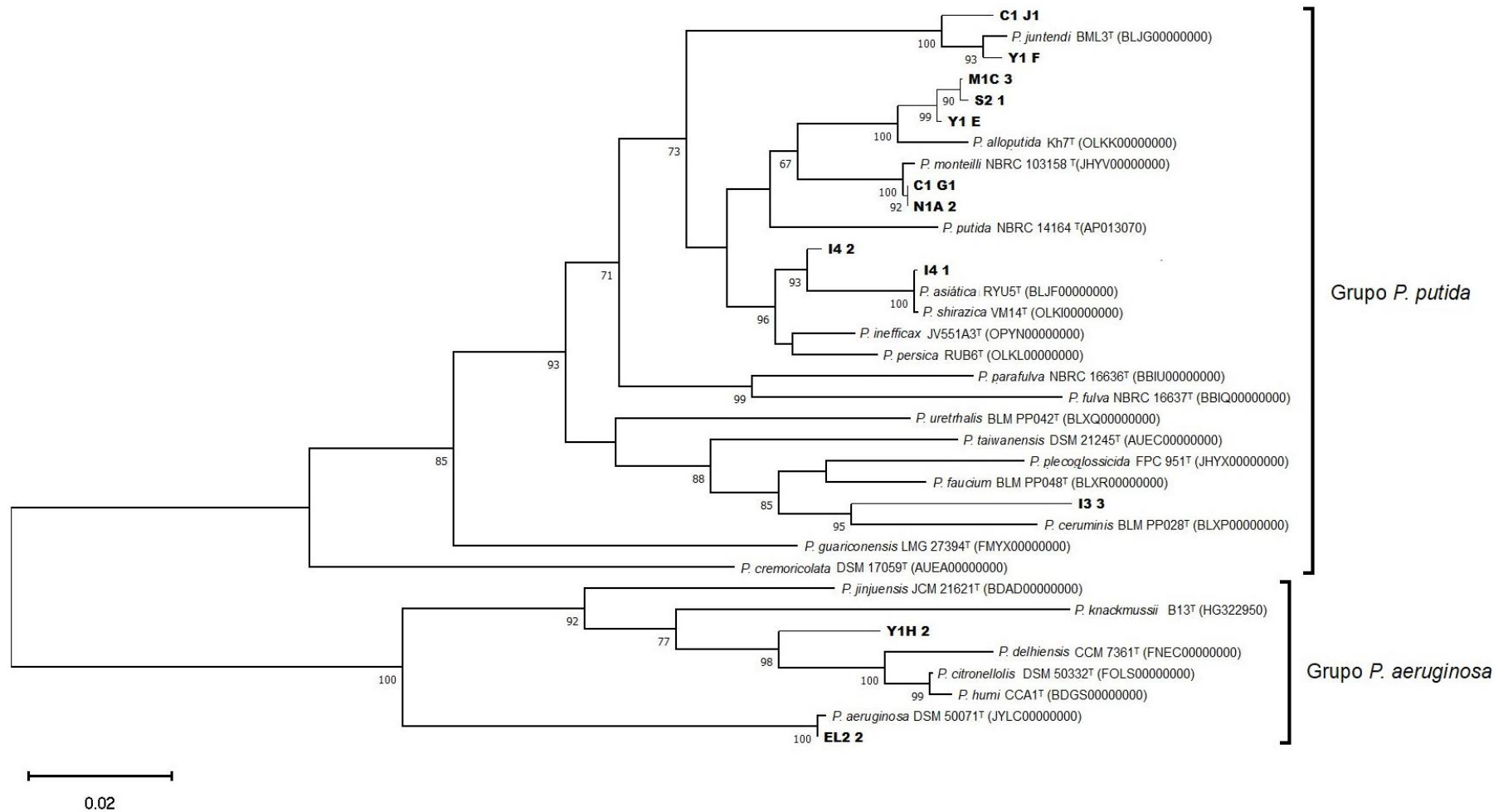


Figura 4. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias del gen *rpoD* que muestra la relación entre las cepas aisladas de ambientes acuáticos y taxones estrechamente relacionados dentro del género *Pseudomonas*. Los valores de Bootstrap (≥ 50) se muestran en los puntos de ramificación con porcentajes de 1000 réplicas. Los números de acceso del NCBI se muestran en paréntesis. La barra de sustituciones por posición de nucleótidos es 0.02

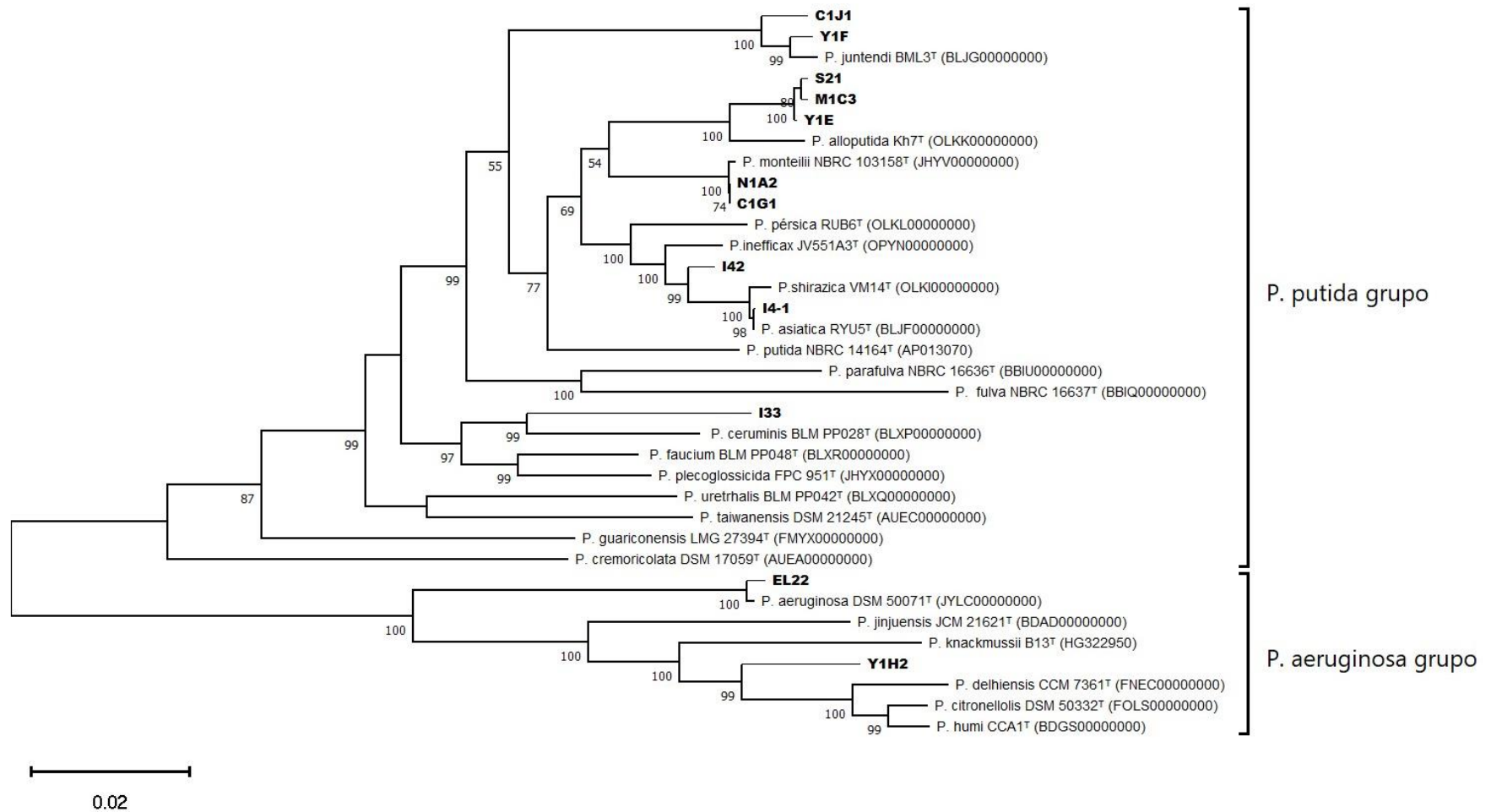


Figura 5. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias concatenadas de los genes *16S-gyrB-rpoB-rpoD* que muestra la relación entre las cepas aisladas de ambientes acuáticos y taxones estrechamente relacionados dentro del género *Pseudomonas*. Los valores de Bootstrap (≥ 50) se muestran en los puntos de ramificación con porcentajes de 1000 réplicas. Los números de acceso del NCBI se muestran en paréntesis. La barra de sustituciones por posición de nucleótidos es 0.02.

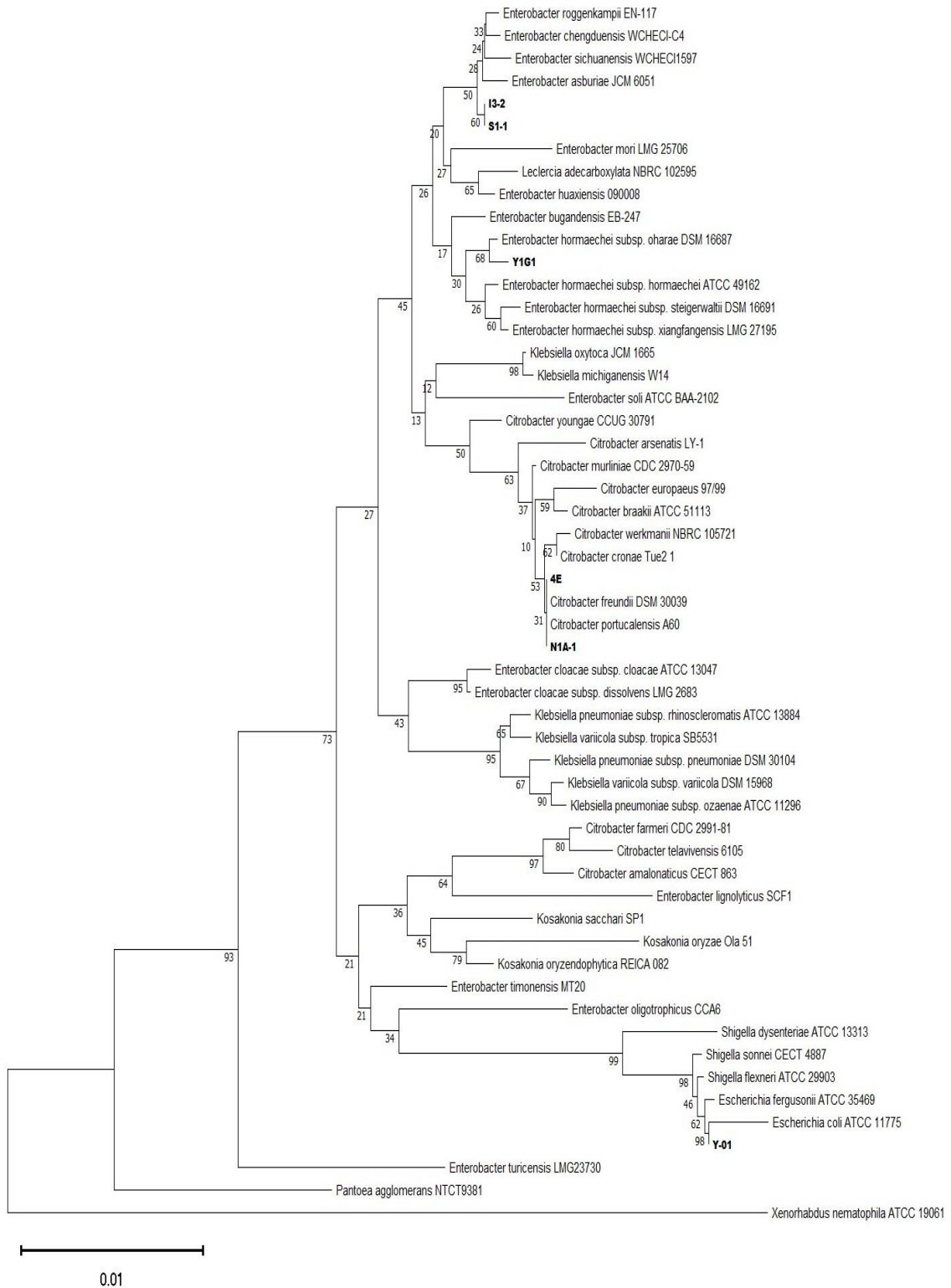


Figura 6. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias del gen 16S ARNr que muestra la relación entre las cepas aisladas de ambientes acuáticos y taxones estrechamente relacionados dentro de la familia *Enterobacteriaceae*. Los valores de Bootstrap se muestran en los puntos de ramificación con porcentajes de 1000 réplicas. Se utilizó como grupo externo la cepa tipo de *X. nematophila*. La barra de sustituciones por posición de nucleótidos es 0,01.

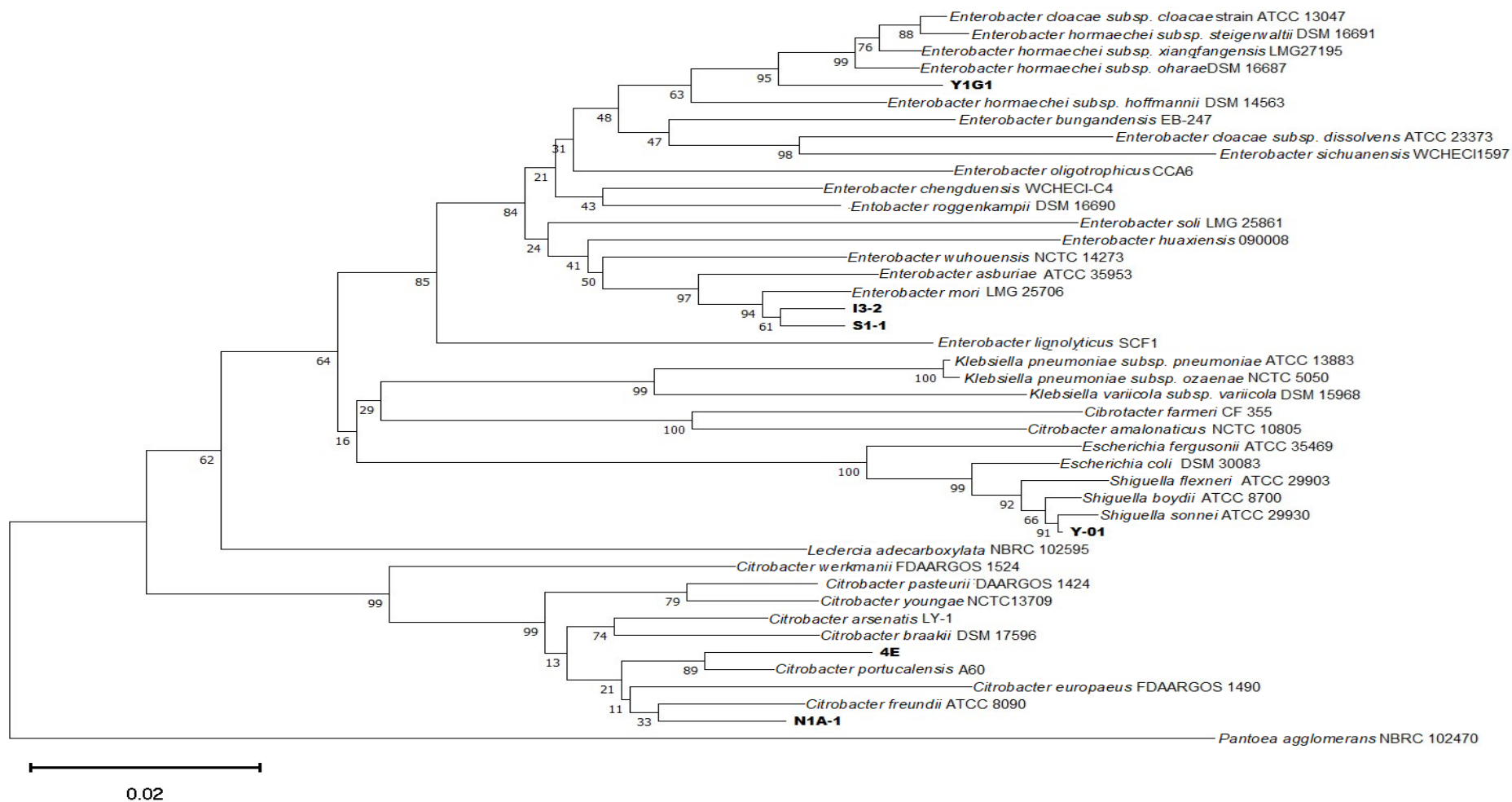


Figura 7. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias del gen *gyrB* que muestra la relación entre las cepas aisladas de ambientes acuáticos y taxones estrechamente relacionados dentro de la familia *Enterobacteriaceae*. Los valores de Bootstrap (≥ 50) se muestran en los puntos de ramificación con porcentajes de 1000 réplicas. La barra de sustituciones por posición de nucleótidos es 0,02

Tabla 10. Relación genómica mediante ANIb de 12 cepas bacterianas resistentes a mercurio en comparación con cepas tipo estrechamente relacionadas del género *Pseudomonas*.

Especies	Cepa	Anib (%)	Alineado (%)	Alineado (bp)	Total (bp)	Cepa tipo	Acceso
<i>Pseudomonas monteillii</i>	C1-G1	98.8	84.76	5347240	6308428	<i>Pseudomonas monteillii</i>	JHYV00000000.1
<i>Pseudomonas juntendi</i>	C1-J1	96.7	80.96	4639992	5731217	<i>Pseudomonas juntendi</i>	BLJG00000000.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EL2-2	98.9	85.66	4357718	5087378	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	JYLC00000000.1
<i>Pseudomonas sp.</i>	I3-3	86.4	66.32	3903007	5884931	<i>Pseudomonas ceruminis</i>	BLXP00000000.1
<i>Pseudomonas asiatica</i>	I4-1	98.6	88.18	5263530	5969036	<i>Pseudomonas asiatica</i>	BLJF00000000.1
<i>Pseudomonas asiatica</i>	I4-2	95.5	78.67	4696111	5969036	<i>Pseudomonas asiatica</i>	BLJF00000000.1
<i>Pseudomonas sp.</i>	M1C-3	94.7	80.12	4649501	4649501	<i>Pseudomonas alloputida</i>	OLKK00000000.1
<i>Pseudomonas monteillii</i>	N1A-2	98.7	84.28	5316951	6308428	<i>Pseudomonas monteillii</i>	JHYV00000000.1
<i>Pseudomonas sp.</i>	S2-1	94.6	79.71	4625703	4625703	<i>Pseudomonas alloputida</i>	OLKK00000000.1
<i>Pseudomonas sp.</i>	Y1-E	94.5	80.33	4662067	5803405	<i>Pseudomonas alloputida</i>	OLKK00000000.1
<i>Pseudomonas juntendi</i>	Y1-F	97.5	82.16	4708762	5731217	<i>Pseudomonas juntendi</i>	BLJG00000000.1
<i>Pseudomonas sp.</i>	Y1H-2	89.70	69.90	4802542	6870102	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	FOLS00000000.1

Valor de corte ANIb: 95%-96.5% (59).

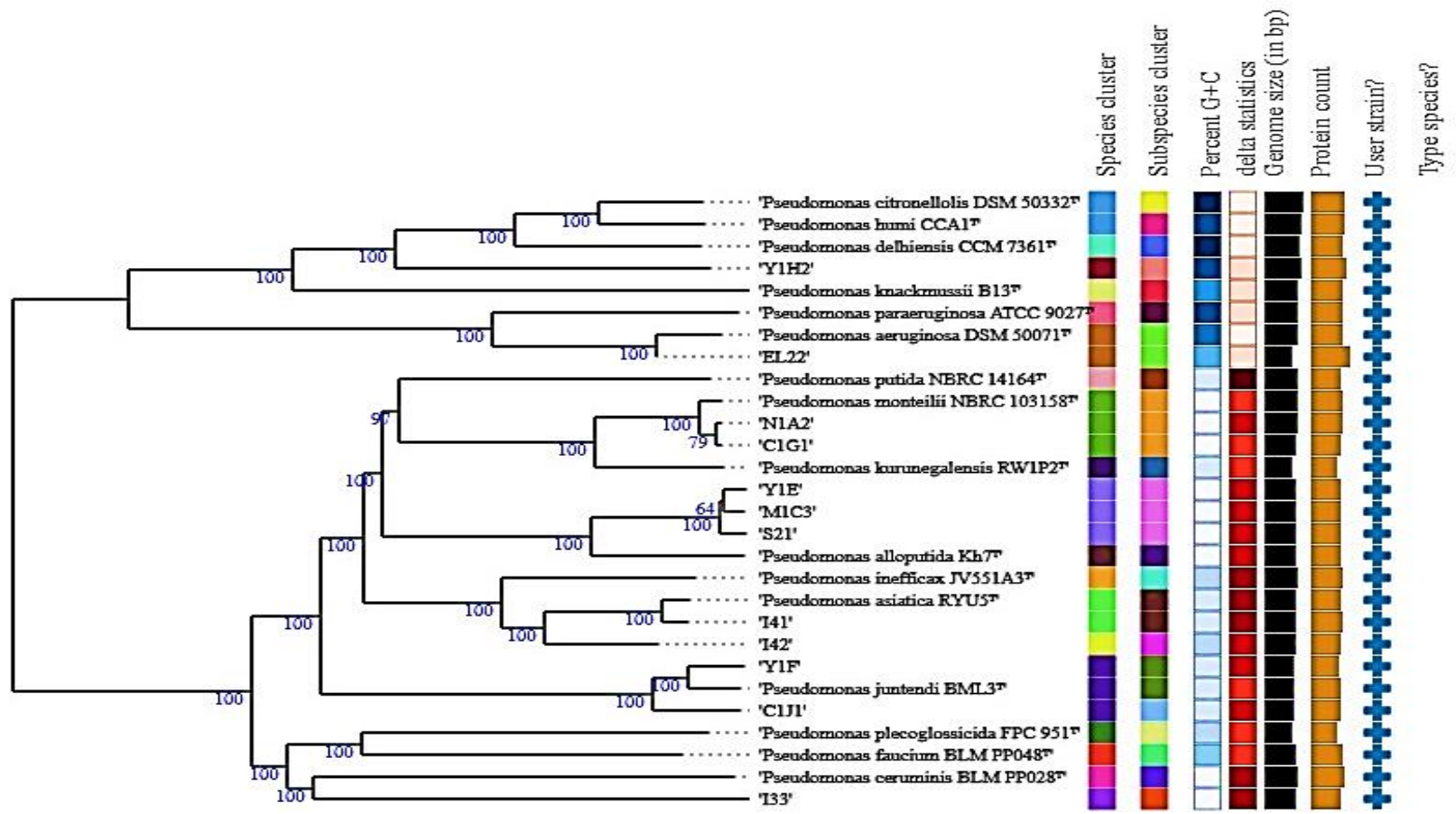


Figura 8. Árbol filogenómico de cepas bacterianas resistentes a mercurio aisladas de ambientes acuáticos y cepas tipo de especies genero *Pseudomonas*. Los valores de Bootstrap (≥ 50) se muestran en los puntos de ramificación con porcentajes de 1000 réplicas. Los análisis evolutivos se generaron utilizando Type (Strain) Genome server 3.

Tabla 11. Nombre asignado a las cepas resistentes a mercurio por comparación genética con cepas tipo estrechamente relacionadas del género *Pseudomonas*.

Cepa	Cepa tipo	Acceso	16S ARNr (%)	MLSA (%)	ANiB (%)	dDDH (%)	Nombre asignado
C1-G1	<i>Pseudomonas monteilii</i> NBRC 103158 ^T	JHYV00000000	100.00	99.78	98.8	94.7	<i>P. monteilii</i>
C1-J1	<i>Pseudomonas juntendi</i> BML3 ^T	BLJG00000000	99.69	98.6	96.7	76.8	<i>P. juntendi</i>
EL2-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071 ^T	JYLC00000000	100.00	99.89	98.9	94.4	<i>P. aeruginosa</i>
I3-3	<i>Pseudomonas ceruminis</i> BLM PP028 ^T	BLXP00000000	99.59	94.5	86.4	33.6	<i>Pseudomonas</i> sp.
I4-1	<i>Pseudomonas asiatica</i> RYU5 ^T	BLJF00000000	99.91*	99.95	98.6	93.5	<i>P. asiatica</i>
I4-2	<i>Pseudomonas asiatica</i> RYU5 ^T	BLJF00000000	99.87	98.33	95.5	67.6 ²	<i>P. asiatica</i>
M1C-3	<i>Pseudomonas alloputida</i> Kh7 ^T	OLKK00000000	100.00*	98.0	94.7 ¹	63.4 ²	<i>P. alloputida</i>
N1A-2	<i>Pseudomonas monteilii</i> NBRC 103158 ^T	JHYV00000000	100.00	99.78	98.7	94.6	<i>P. monteilii</i>
S2-1	<i>Pseudomonas alloputida</i> Kh7 ^T	OLKK00000000	99.93	98.01	94.6 ¹	63.5 ²	<i>P. alloputida</i>
Y1-E	<i>Pseudomonas alloputida</i> Kh7 ^T	OLKK00000000	99.86	98.0	94.5 ¹	63.2 ²	<i>P. alloputida</i>
Y1-F	<i>Pseudomonas juntendi</i> BML3 ^T	BLJG00000000	99.87	99.3	97.5	81.2	<i>P. juntendi</i>
Y1H-2	<i>Pseudomonas citronellolis</i> DSM 50332 ^T	FOLS00000000	99.35	96.1	89.70	41.8	<i>Pseudomonas</i> sp.

¹ Resultado ambiguo en ANiB; ²Resultado ambiguo en dDDH *: Valor de identidad con más de una similitud

Valores de corte: 16S ARNr- 99%, MLSA-97%, ANiB-95%-96.5%, dDDH-70%

Tabla 12. Nombre asignado a las cepas resistentes a mercurio por comparación genética con cepas tipo estrechamente relacionadas a la familia *Enterobacteriaceae*.

Cepa	Cepa tipo	16S ARNr (%)	Acceso	Cepa tipo	<i>gyrB</i> (%)	Acceso	Nombre asignado
I3-2	<i>Enterobacter chengduensis</i> WCHECL-C4	99.41*	KY979142	<i>Enterobacter mori</i> LMG 25706	98.35	AEXB00000000.1: 205751- 208162	<i>E. mori</i>
N1A-1	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	99.93	AJ233408	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	97.63	CP049015.1: 3611-6025	<i>C. freundii</i>
S1-1	<i>Enterobacter chengduensis</i> WCHECL-C4	99.41*	KY979142	<i>Enterobacter mori</i> LMG 25706	98.66	AEXB00000000.1: 205751- 208162	<i>E. mori</i>
Y-01	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	99.72*	X80725	<i>Shigella sonnei</i> ATCC 8700	99.59	CP026802.1: 4030695- 4033109	No determinado
Y1-G1	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i> LMG 27195	99.73	FYBF0100008 3	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i> LMG 27195	97.42*	CP017183.1: 3941-6352	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i>
4E	<i>Citrobacter portucalensis</i> A60	99.86	MVIFY010003 5	<i>Citrobacter portucalensis</i> A60	97.94	MVIFY00000000.1: 374805-377219	<i>C. portucalensis</i>

*: Valor de identidad con más de una similitud.

IV. DISCUSIÓN

En el presente estudio se amplificaron y secuenciaron los marcadores moleculares 16s ARNr, *gyrB*, *rpoB* y *rpoD* de 18 cepas bacterianas gram negativas resistentes a mercurio aisladas de fuentes acuáticas de Ica (ANEXO, Figuras 12 a Figura 19). Según el análisis de similitud de secuencias de forma individual y concatenada, 12 de ellas correspondieron a especies del género *Pseudomonas* y 6 a enterobacterias.

En el caso de las especies del género *Pseudomonas*, éstas mostraron variaciones en el porcentaje de similitud respecto las cepas tipo de referencia. Para el gen 16S ARNr, 6 de las secuencias obtenidas estuvieron completas (1532 nt) y 6 incompletas (1176 -1374 nt), por el tipo de secuenciación utilizada. Sin embargo, este marcador permitió identificar cepas tipo estrechamente relacionadas con una similitud mayor al 99 % (Tabla 3), lo cual nos indicaría una posible identidad de las cepas.

El análisis de las secuencias del gen *gyrB*, se confirmó que todas las cepas corresponden a especies de *Pseudomonas*. Sin embargo, dos de ellas (I3-3 y Y1H-2) mostraron un valor de similitud menor al de corte (>96 %). Estos valores, al estar por debajo del valor de corte preestablecido ponen en duda la identidad asignada como *P. ceruminis* y *P. humi*, respectivamente (Tabla 4).

El gen *rpoB* determinó que todas las cepas pertenecen a especies de *Pseudomonas*. Sin embargo, las cepas I3-3 y Y1H-2 no superaron el valor de corte (>97.7 %). El nombre asignado fue *P. ceruminis* para I3-3 y *P. delhiensis* para Y1H-2 (Tabla 5), coincidiendo solo en el caso de I3-3 con el resultado anterior.

En el análisis de las secuencias del gen *rpoD* se determinó que las cepas I3-3 y Y1H-2 tampoco superaron el valor de corte (>98 %) de similitud. Siendo asignados como *P. faucium* y *P. citronellolis*, respectivamente (Tabla 6). En este caso se asignaron nombres diferentes a los casos anteriores. Las diferencias en las identidades asignadas en algunas de las cepas mediante los diferentes marcadores genéticos indicarían el poder discriminante de cada marcador, así como las variantes nucleotídicas en los mismos (ANEXO, Tablas 13 a Tabla 15). Estudios similares sugieren que la elección de cada marcador genético puede influir considerablemente en la precisión de la identificación de cepas a nivel de especie o sub grupos de un mismo género (23).

Mediante el análisis de similitud de las secuencias concatenadas de los genes 16S ARNr, *gyrB*, *rpoB* y *rpoD* (MLSA), de igual manera se confirmó que las cepas I3-3 y Y1H-2 no superaron el valor de corte de similitud (>97%) (Tabla 7). Estas fueron asignadas como *P. ceruminis* y *P.*

citronellolis. Este análisis confirmó los resultados obtenidos con cada gen y dio una mayor robustez en la identificación de las cepas. Asimismo, como sus variaciones genéticas entre las mismas cepas con relación a su cepa de referencia cercana (ANEXO, Tabla 16). El análisis de secuencias concatenadas de varios genes proporciona una mayor resolución y precisión en la identificación de las especies de *Pseudomonas* debido a que al considerar múltiples genes, disminuye la posibilidad de errores en la identificación causado por variaciones de un solo marcador (62,63)

Comparando todos los marcadores utilizados, se observó que los genes *gyrB*, *rpoB* y *rpoD* y sus secuencias concatenadas coinciden en la identificación de la mayoría de las cepas, con excepción de I3-3 y Y1H-2. Asimismo, mediante el marcador 16S ARNr solo en el caso de 4 cepas coincidió con los otros marcadores moleculares. Esto explica por qué este marcador ya no se puede utilizar como el único en la identificación bacteriana, debido a que las discrepancias en la identificación mediante el gen 16S ARNr podrían estar relacionadas a la alta diversidad genética presente dentro del género *Pseudomonas* y la posible existencia de cepas aun no caracterizadas en la base de datos. Las diferencias genéticas en las bacterias son el fundamento de la variabilidad de especies por su exposición a agentes de movilidad genética en el ambiente y de manera particular en medios acuáticos (64). Estos son promovidos por fagos (65), transposones (66), plásmidos (67), entre otros. Por lo tanto, se requiere el uso de más de un marcador e incluso otros marcadores diferentes a los utilizados como 23S ARNr (68), región intergénica *16S-23S* (69), para conseguir una identificación confiable.

En el caso de las 6 cepas bacterianas restantes, con base al análisis de secuencias del gen 16S ARNr, éstas pertenecieron a especies de enterobacterias (Tabla 8). Todos los porcentajes de identidad superaron el 99 % de similitud con 2 o más especies; por lo que fue difícil asignar un nombre en particular a las cepas. Solo se asignaron nombres de especies estrechamente relacionadas dentro de los géneros *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Escherichia*. Esto sustenta que la secuencia 16S ARNr proporciona baja resolución para discriminar especies de la familia *Enterobacteriaceae*, pertenecientes a los géneros, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, entre otros (24,70).

Con el marcador *gyrB*, los porcentajes de similitud oscilaron entre el 97% y 99% (Tabla 9). Las cepas I3-2 y S1-1 fueron asignados como *Enterobacter mori* difiriendo de los resultados con el gen 16S ARNr. Además, la cepa Y-01 asignada como especie dentro del género *Escherichia* correspondería al género *Shigella*, según el análisis del gen *gyrB*. Se ha documentado la dificultad que existe para diferenciar entre *E. coli* y *Shigella* spp. basándose en el análisis de secuencias 16S ARNr, esto debido a su alta similitud de regiones genéticas (71). Además, algunos estudios han

demostrado que el análisis del gen *gyrB* muestra mayor divergencia entre *E. coli* y *Shigella* spp. con valores de similitud inferiores a los obtenidos en el análisis del gen 16S ARNr (72) el cual coincide con este estudio (ANEXO, Tabla 17). A pesar que muchos estudios han indicado mejores resultados con el uso de gen *gyrB* en comparación con la información del gen 16S ARNr (73,74), aún se reportan casos en los que existe ambigüedad en la identificación de especies de estos géneros con este marcador (75). Esto sugiere el uso de otros marcadores moleculares adicionales (76).

En el presente estudio, no se utilizaron los marcadores *rpoB* ni *rpoD* para la identificación de especies de enterobacterias debido a que su uso no es común en este grupo bacteriano. El gen *rpoB*, por lo general se emplea con menos frecuencia debido a su menor variabilidad filogenética con respecto al gen *gyrB* (77). Esta baja variabilidad genera una menor resolución taxonómica y dificulta discriminar correctamente entre especies dentro de la familia *Enterobacteriaceae*. Numerosos estudios respaldan el uso del gen *gyrB* lo que refuerza su uso y eficacia en la identificación de enterobacterias (78). En el caso del gen *rpoD*, si bien ha sido validado como un marcador útil para la identificación de *Pseudomonas* (16), su utilidad para la identificación de enterobacterias no ha sido reportada. Esto podría deberse a la presencia de regiones altamente variables en regiones específicas capaces de distinguir especies de *Pseudomonas*, las cuales no existirían en el caso de las enterobacterias.

Mediante el análisis filogenético con base a las secuencias del gen ribosomal 16S ARNr, se demostró que las cepas en estudio presentan una identidad estrechamente relacionada a miembros del género *Pseudomonas* ubicándose en los linajes representativos *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*, a su vez relacionadas a los miembros del grupo *P. putida* y grupo *P. aeruginosa* (Figura 1). Al consultar las secuencias de las cepas se reveló que las identidades de secuencias prevalecen en un 99%-100% de similitud, superando el nivel de corte preestablecido para la identificación de especies bacterianas ($\geq 99\%$), el cual podría indicar que pertenecen a las cepas tipo relacionadas (79). La posición filogenética si bien se distribuye en los grupos *P. putida* y *P. aeruginosa*, la predominancia de bajos valores de bootstrap del árbol y su topología inestable no permite delimitar de manera confiable a nivel de grupos o subgrupos en el género *Pseudomonas* (80) por lo que la información obtenida no es lo suficientemente sólida.

El análisis de secuencias del gen 16S ARNr en bacterias continúa siendo fundamental en los estudios filogenéticos debido a que presenta regiones altamente conservadas y su poder discriminativo delimita grupos o clados dentro de un género específico (9). Sin embargo, en el caso del género *Pseudomonas*, el gen 16S ARNr solo permite la diferenciación y delimitación de los linajes principales: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *P. pertucinogena* (81). Aunque este gen es

importante para la asignación taxonómica de organismos bacterianos ambientales, no discrimina a nivel de especies (20). Esto debido a la heterogeneidad intraespecies que se origina por la presencia de múltiples copias variables del gen, transferencias génicas laterales (11) y a menudo su filogenia no es precisa generando clasificaciones erróneas, en algunos casos (47).

En el análisis filogenético con base a los genes *gyrB*, *rpoB* y *rpoD*, se determinó la relación de las cepas del género *Pseudomonas*, con un mejor valor de bootstrap y topología con respecto al gen 16S ARNr. Los dos grupos observados corresponden a *P. putida* y *P. aeruginosa* (Figuras 2 a Figura 4). Con respecto a las cepas ubicadas filogenéticamente en el grupo *P. putida*. Las cepas C1-J1 y Y1-F se agrupan estrechamente con la cepa tipo *P. juntendi*. C1-J1 se agrupa en una rama independiente con un valor de bootstrap de 100 respecto a Y1-F y *P. juntendi*, mientras que Y1-F se agrupa cercanamente con la cepa tipo, aunque con variaciones de bootstrap en cada uno de los genes (90 en *gyrB*, 92 en *rpoB* y 93 en *rpoD*). Lo que indicaría que, si bien presentan una relación filogenética cercana, existen variaciones genéticas entre ambas cepas.

En el caso de las cepas C1-G1 y NIA-2, éstas se relacionan con la cepa *P. monteilii* agrupándose de manera consistente con un valor de bootstrap de 100 en todos los árboles. Además, en el caso del gen *rpoD*, existe una ligera variación en la ramificación entre ambas cepas de estudio (bootstrap de 92), lo que puede indicar que si bien están respaldadas estadísticamente con la cepa tipo, entre ellas existe pequeñas variaciones filogenéticas con la cepa de referencia.

Las cepas S2-1, M1C-3 y Y1-E están relacionadas filogenéticamente en todos los árboles con un valor de 100 de bootstrap con cepa tipo más cercana *P. allopütida*. En el uso de algunos marcadores existe algunas variaciones entre ellas, pero todas superan el valor 90 de bootstrap. Esto podría indicar que, aunque este agrupado dentro de un clúster específico, presenta una divergencia evolutiva.

Respecto a las cepas I4-1 e I4-2, la cepa I4-1 está muy bien soportada con un valor de 100 bootstrap relacionada a la cepa tipo *P. asiatica* y *P. shirazica* en todos los árboles. En el caso de la cepa I4-2, si bien se encuentra posicionada dentro del clado de las cepas mencionadas, se encuentra en una rama independiente, lo que indicaría la existencia de variabilidad filogenética considerable entre las cepas.

La cepa I3-3 fue la más diferenciada en relación a las cepas tipo del grupo *P. putida*, si bien su posición filogenética se ubica relacionada a la cepa *P. ceruminis* en los tres árboles filogenéticos, sus valores de bootstrap presentan variabilidad en los 3 genes (98 en *gyrB*, 32 en *rpoB* y 95 en *rpoD*) además de que la rama en la que se encuentra presenta mayor distancia filogenética que las

demás cepas de estudio. Esto indicaría variabilidad en su secuencia y mayor divergencia evolutiva con respecto a su cepa tipo más cercana.

En el grupo *P. aeruginosa* se incluyeron 2 cepas. La cepa EL2-2 mostró mayor consistencia en el estudio, gracias a su estabilidad topológica en los 3 árboles, así como sus valores de bootstrap de 100 ubicándose cercanamente a la cepa *P. aeruginosa*. En el caso de la cepa Y1H-2, si bien sus valores de bootstrap son considerados altos (67 en *gyrB*, 84 en *rpoB* y 98 en *rpoD*), la posición filogenética de esta cepa en cada gen varía. Además, se observa una distancia filogenética considerable lo que indicaría un alto grado de variabilidad filogenética con sus cepas tipo cercanas.

Entre los 3 genes analizados, *rpoD* ha sido el gen con el que se obtuvo mejores resultados en los análisis filogenéticos, esto debido a su alta consistencia en la topología de los árboles, así como valores de bootstrap elevados en cada ramificación, permitiendo una clara separación entre las cepas de estudio y sus cepas tipo (16). En segundo lugar, el uso del gen *gyrB* presentó una buena resolución filogenética y estabilidad en la mayoría de agrupaciones, siendo claro para diferenciar relaciones evolutivas (20). Por último, en el gen *rpoB*, si bien termina siendo más confiable que el gen 16S rRNA, presenta menor consistencia en la topología de su árbol respecto a los otros genes, así como bajos valores de bootstrap en las ramificaciones, lo que no permite determinar con claridad todas las relaciones evolutivas.

Mediante el análisis filogenético MLSA, se observó una mayor resolución filogenética en comparación con los árboles individuales de los genes *gyrB*, *rpoB* y *rpoD* (Figura 5). En el caso de las cepas C1-J1 y Y1-F se reafirma la relación filogenética con la cepa tipo *P. juntendi*, con una mayor robustez en el árbol. En el caso de las cepas N1A-2 y C1-G1, se redujo la variabilidad filogenética de éstas, ya que con el gen *rpoB* se observó algunas divergencias con respecto a la cepa tipo *P. monteilii*, además de obtener valores de 100 bootstrap. En las cepas I4-1 e I4-2, si bien la cepa I4-2 está separada de I4-1 y *P. asiatica*, en todos los genes, con MLSA se mantiene esta separación, pero con valores de 99 y 100 de bootstrap, lo que proporciona mayor soporte estadístico en sus relaciones filogenéticas. La cepa I3-3 sigue manteniendo la misma distancia filogenética que en los genes individuales, ubicándose con *P. ceruminis*, pero con un valor de Bootstrap de 99. Por lo que, aún persiste una diferencia filogenética considerable con su cepa tipo más cercana. Por otra parte, la cepa EL2-2 sigue agrupándose consistentemente con *P. aeruginosa* con un valor bootstrap de 100, al igual que en el análisis de los genes individuales, pero con una relación más fuerte al integrar varios genes. Mientras que Y1H-2 mantiene su relación igual que en los genes individuales, pero con un bootstrap más alto, lo que mantendría su consistencia en el clado.

El árbol filogenético generado por MLSA, demostró una mayor robustez y soporte filogenético, ya que presenta altos valores de bootstrap en comparación con los árboles de genes individuales. Además, proporciona mejor confiabilidad y precisión para la clasificación de las cepas de estudio. Si bien, el gen *rpoD* mostró ser el mejor marcador filogenético para *Pseudomonas* (16), el análisis de los genes concatenados presenta mejores resultados en relación a valores de bootstrap más elevados, así como con la claridad al diferenciar grupos en sus relaciones filogenéticas; además de mostrar una topología del árbol más estable. Esto indica mayor confiabilidad del análisis y mayor precisión para definir las relaciones evolutivas de las cepas de este estudio (82).

En el caso de las enterobacterias, el análisis filogenético se basó solo en las secuencias de los genes 16S ARNr y *gyrB*. Con el primero de ellos, las cepas se agruparon en los géneros *Citrobacter* (N1A-1 y 4E), *Enterobacter* (I3-2, S1-1 y Y1G-1) y *Escherichia* (Y-01), (Figura 6). Sin embargo, se encontró que algunas de las especies de *Enterobacter* y *Citrobacter* están agrupadas en diferentes clados y algunos de estos incluyen miembros de otros géneros con mucha variabilidad en sus valores de bootstrap en cada ramificación. Por lo que, las asignaciones taxonómicas no son concluyentes. Con el marcador *gyrB*, las cepas se agruparon dentro de los géneros *Citrobacter* (N1A-1 y 4E), *Enterobacter* (I3-2, S1-1 y Y1G-1) y *Shigella* (Figura 7). Además, la topología del árbol filogenético presentó mayor robustez en comparación al gen 16S ARNr, proporcionando una agrupación monofilética a nivel de especie para todas las especies de *Enterobacter*. En el caso de las cepas estrechamente relacionadas del género *Citrobacter*, casi todas se agruparon en un solo clado, con algunas excepciones. Estas diferencias observadas indican la necesidad de utilizar otros marcadores moleculares para una identificación confiable.

Debido a las limitaciones del gen 16S ARNr, algunas secuencias genéticas constitutivas o “housekeeping” han sido estudiadas como marcadores moleculares bacterianos gracias a que presentan mejor resolución (83). Como objetivo de este estudio, se realizó el análisis de identidad y filogenia en base a las secuencias de los genes de mantenimiento *gyrB*, *rpoB* y *rpoD*, los cuales permitieron confirmar la afiliación de especies bacterianas tentativas pertenecientes al género *Pseudomonas* y la familia *Enterobacteriaceae*. Los valores de similitud de identidad obtenidos mediante el análisis de cada uno de los 3 genes de mantenimiento, tuvieron una buena correlación en la identidad en 10 de las 12 cepas relacionadas a *Pseudomonas* en este estudio, ya que superaron el valor de corte preestablecido para considerar la identificación de especie relacionada al género *Pseudomonas*. Si bien el gen *rpoD* presenta mayor resolución para la identificación de especies de *Pseudomonas* (23), los genes *gyrB* y *rpoB* determinaron la misma identidad. En el caso de las cepas I3-3 e Y1H-2 los bajos valores similitud de secuencia en los 3 genes ($\geq 96\%$) indicaría que son candidatas para ser clasificadas como nuevas especies del género *Pseudomonas*. Asimismo, para delimitar la identificación sólida de las cepas, se utilizó la técnica MLSA, ya que

varios estudios demostraron que al analizar secuencias concatenadas de genes de mantenimiento seleccionados cuidadosamente se puede considerar como una herramienta fiable y potente para identificar nuevas especies dentro de un género (23,84,85). Por lo que, se analizaron los genes concatenados *16S ARNr*, *gyrB*, *rpoB* y *rpoD*, dando como resultado la confirmación de la identidad proporcionada por el análisis de los genes de mantenimiento de manera individual, superando el valor de corte para MLSA ($\leq 97\%$), con excepción de las cepas I3-3 e Y1H-2. De igual manera, el análisis filogenético ubicó a las cepas como miembros del grupo *P. putida* y grupo *P. aeruginosa*, generando una topología del árbol muy estable junto con los valores de arranque. Teniendo en claro que el análisis del gen 16S ARNr es suficiente para separar géneros bacterianos, este no es suficiente para delimitar a nivel de especies, por lo que el estudio mediante MLSA sigue siendo una herramienta confiable para la delimitación de especies (12).

De igual manera, mediante el análisis de secuencias del gen *gyrB*, 5 de 6 cepas relacionadas a la familia *Enterobacteriaceae* tuvieron una buena correlación de identidad con un porcentaje de identidad oscilando entre el 97% y 98% de similitud. Con excepción de la cepa Y-01 ya que según estudios existe dificultades para definir con exactitud el género *Shigella spp* (75). En el análisis filogenético de las cepas también determinó una mejor topología del árbol *gyrB*, comparado con el gen 16S ARNr, aunque con algunas excepciones respecto a cepas tipo de *Citrobacter* ubicadas filogenéticamente en diferentes clados.

En la actualidad, la expansión de la genómica y los precios más accesibles han permitido el uso del secuenciamiento de genoma completo en la taxonomía bacteriana de muchos aislamientos ambientales de *Pseudomonas* (84-86). Debido a la importancia ecológica de las especies de este género, se realizó la secuenciación de los genomas de las 12 cepas. Estas tienen un genoma de aproximadamente 6 Mb, un contenido de G+C entre 61.2 % y 67.2 %, número de genes entre 5166 y 6313, características típicas de los miembros de este género (ANEXO, Tabla 18). La información genómica permitió realizar el análisis de ANIb, donde los resultados respaldaron las afiliaciones taxonómicas de las cepas en estudio con las cepas tipo estrechamente relacionadas del género *Pseudomonas*. De 10 cepas identificadas mediante MLSA, 7 llevaron a la misma identificación de especie mediante ANIb superando el valor de corte de $>95\%$ (Tabla 7 y Tabla 10). Esto indica la alta correlación que tiene ANIb con los análisis de secuencias de mantenimiento (23). Sin embargo, se observó ambigüedades en 3 cepas estrechamente relacionadas a *Pseudomonas alloputida*, ya que la diferenciación de similitud se observó mediante un valor mínimo en comparación al corte preestablecido. Si bien la correlación de ANIb y MLSA es alta en varios estudios de *Pseudomonas* (23,80,87), se ha reportado casos en donde se puede presentar algunas limitaciones en relación a la identificación con MLSA y ANIb (16). De igual manera, se compararon los árboles filogenéticos MLSA y filogenómico GBDP (Figura 5 y Figura

8), obteniendo las mismas posiciones filogenéticas para las cepas de estudio en ambos árboles. Además, GBDP mostró una topología y variabilidad entre las cepas de estudio en relación a sus cepas tipo cercanas muy similares al árbol MLSA. Sin embargo, el árbol filogenómico presentó un mayor soporte estadístico gracias a sus altos valores de bootstrap. Para confirmar la identificación de resultados ambiguos, se realizó la hibridación digital dDDH. Las cepas relacionadas a *Pseudomonas allopütida* presentaron valores por debajo del umbral de hibridación, al igual que la cepa I4-2, que resultó en un valor debajo del umbral del 70% (Tabla 11) (88). Estos resultados se correlacionan con los árboles filogenéticos generados por los genes de mantenimiento y el árbol filogenómico.

A través del uso de *gyrB*, *rpoB*, *rpoD* y junto con el análisis similitud y filogenia de los genomas de las cepas relacionadas a *Pseudomonas* se logró asignar de manera precisa el nombre la mayoría de cepas aisladas (Tabla 11), como C1-G1 y N1A-2 a *P. monteilii*, especie muy conocida por su capacidad de resistencia y volatilización a mercurio, así como a diferentes metales (89,90). C1-J1 y Y1-F a *P. juntendi*, especie reportada en varios estudios como resistente a múltiples fármacos relacionado al ámbito de salud pública, así como resistente a algunos metales pesados (91,92). I4-1 e I4-2 a *P. asiatica*, también en diversos estudios relacionada con resistencia a metales pesados y a antibióticos (93,94). M1C-3, S2-1 y Y1-E a *P. allopütida*, especie reportada en varios estudios en la resistencia a diferentes metales pesados y algunos antibióticos. En el caso de las cepas I3-3 y Y1H-2 al mostrar diferencias significativas en los análisis de este estudio, sugiere que podrían representarse potencialmente como nuevas especies detectadas en la región.

En relación a la ubicuidad de las cepas identificadas de manera precisa en este estudio, las especies *P. monteilii* y *P. aeruginosa* se encuentran ampliamente distribuidas a nivel mundial. Estas especies son conocidas por su papel clave en la biorremediación de entornos contaminados, así como a su notable resistencia antibióticos respectivamente. En Perú, se ha reportado varios estudios de estas cepas, particularmente *P. aeruginosa*, en el ámbito clínico (95,96). Por otro lado, la especie *P. asiatica*, descubierta recientemente en Japón en 2019 (97), ha sido reportada en varios países asiáticos. En Sudamérica solo se ha documentado su presencia en Brasil (93). Hasta la fecha no existen registros sobre la identificación de esta especie en Perú, lo que resulta novedoso el hallazgo de esta especie en nuestra región. De igual manera la especie *P. juntendi*, identificada inicialmente en Japón (2019) y China (98,99), tampoco ha sido reportada en Perú, por lo que la importancia de este estudio para ampliar el rango de distribución de esta especie. Finalmente, la especie *P. allopütida* descrita primeramente en Europa en 2020. No ha sido reportada en Perú. Si bien hasta ahora no se ha reportado hallazgos específicos de *P. allopütida*, su relación muy cercana a *P. putida* gracias a su reciente reclasificación es posible que pueda estar distribuida en la región (87,100).

V. CONCLUSIONES

Al término del estudio se llegó a las siguientes conclusiones:

1. El análisis de similitud y filogenético revelaron que las cepas del estudio están estrechamente relacionadas con cepas tipo de los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Citrobacter*.
2. Los genes de mantenimiento *gyrB*, *rpoB* y *rpoD* brindan una mayor resolución en la identificación de especies en comparación con el gen 16S ARNr, siendo los genes *rpoD* y *gyrB* los de mejor resolución para *Pseudomonas* y enterobacterias, respectivamente.
3. El análisis multilocus de secuencias de los genes *gyrB*, *rpoB* y *rpoD* proporciona mejor resolución y precisión en la identificación de especies de *Pseudomonas* en comparación al análisis de genes individuales.
4. El análisis de genoma completo, junto con ANIb y dDDH, respaldan las identidades obtenidas mediante los genes de mantenimiento en las especies relacionadas a *Pseudomonas*.

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar una identificación polifásica de las cepas I3-3 e Y1H-2 que estuvieron muy alejadas de los valores preestablecidos mediante el análisis genético, para proponerlas como nuevas especies aisladas en la Región Ica.
2. Llevar a cabo un análisis multilocus de secuencias (MLSA) para la identificación de cepas relacionadas a la familia *Enterobacteriaceae*, mediante genes conservados específicos para delimitar especies de los géneros *Enterobacter* y *Citrobacter*.
3. Mejorar la información genómica de las cepas bacterianas, mediante secuenciamiento de cadenas largas para cerrar el genoma.
4. Realizar estudios pangenómicos de las cepas identificadas como especies del género *Pseudomonas* para entender su diversidad genética y conocer sus usos potenciales y aplicaciones biotecnológicas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Buszewski B, Rogowska A, Pomastowski P, Złoch M, Railean-Plugaru V. Identification of microorganisms by modern analytical techniques. *J AOAC Int.* 2017 Nov 1;100(6):1607-1623
2. Gobernado M, López-Hontangas J. Identificación bacteriana. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003 Nov;21(Suppl 2):54-60
3. Rodríguez-Lázaro D, Hernández M. Molecular methodology in food microbiology diagnostics: trends and current challenges [Internet]. In: 13th World Congress of Food Science & Technology; 2006 Sep 17-21; Nantes, France. Les Ulis (France): EDP Sciences; 2006 [citado 2023 Oct 20]. Disponible en: <https://iufost.edpsciences.org/articles/iufost/abs/2006/01/iufost06000643/t06000643.html>
4. Bochner B. Global phenotypic characterization of bacteria. *J Microbiol Methods.* 2009 Jan 15;78(1):69-75.
5. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto J, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011 Nov;29(Suppl 4):29-37.
6. Angarita M, Torres M, Díaz A. Técnicas de biología molecular en el desarrollo de la investigación: revisión de la literatura [Internet]. *Rev Haban Cienc Méd.* 2017 [citado 2023 Oct 20];16(5):796-807. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/1651>
7. Clarridge J 3rd. Impact of *16S rRNA* gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2004 Oct;17(4):840-862.
8. Valenzuela-González F, Casillas-Hernández R, Villalpando E, Vargas-Albores F. El gen *16S rRNA* en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Hidrobiológica.* 2015;25(3):297-310
9. Mende D, Sunagawa S, Zeller G, Bork P. Accurate and universal delineation of prokaryotic species. *Nat Methods.* 2013 Sep 28;10(9):881-884. doi: 10.1038/nmeth.2575
10. Kim M, Oh H, Park S, Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and *16S rRNA* gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014 Feb;64(Pt 2):346-351.
11. Bodilis J, Nsigue-Meilo S, Besaury L, Quillet L. Variable copy number, intra-genomic heterogeneities and lateral transfers of the *16S rRNA* gene in *Pseudomonas* [Internet]. *PLoS One.* 2012 Apr 23 [citado 2023 Oct 20];7(4). Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035647>
12. Glaeser S, Kämpfer P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst Appl Microbiol.* 2015 Jun;38(4):237-245.
13. Kim O, Cho Y, Lee K, Yoon S, Kim M, Na H, et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic *16S rRNA* gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012 Mar;62(Pt 3):716-721.

14. Dauga C. Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of *Enterobacteriaceae*: a model molecule for molecular systematic studies. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002 Jan;52(2):531-547.
15. Ogier J, Pagès S, Galan M, Barret M, Gaudriault S. *rpoB*, a promising marker for analyzing the diversity of bacterial communities by amplicon sequencing. *BMC Microbiol* [Internet]. 2019 Dec 29 [citado 2023 Oct 20];19(1):171. Disponible en: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-019-1546-z>
16. Girard L, Lood C, Rokni-Zadeh H, van Noort V, Lavigne R, De Mot R. Reliable identification of environmental *Pseudomonas* isolates using the *rpoD* gene. *Microorganisms*. 2020 Jul 31;8(8):1166.
17. Santos S, Ochman H. Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. *Environ Microbiol*. 2004 Jul 15;6(7):754–9.
18. Ki J, Zhang W, Qian P. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and *rpoB* comparisons and their usefulness for species identification. *J Microbiol Methods*. 2009 Apr;77(1):48–57.
19. Ramírez Santos J, Solís Guzmán G, Gómez Eichelmann M. Regulación genética en la respuesta al estrés calórico en *Escherichia coli*. Vol. 43, *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2001.
20. Yamamoto S, Harayama S. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. *Int J Syst Bacteriol*. 1998 Jul 1;48(3):813–9.
21. Mulet M, Bennasar A, Lalucat J, García-Valdés E. An *rpoD*-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples. *Mol Cell Probes*. 2009 Jun;23(3–4):140–7.
22. Everest G, Meyers P. The use of *gyrB* sequence analysis in the phylogeny of the genus *Amycolatopsis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2009 Jan 21;95(1):1–11.
23. Mulet M, Lalucat J, García-Valdés E. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ Microbiol*. 2010 Jun 3;12(6):1513–30.
24. Cho G, Stein M, Fiedler G, Igbinsola E, Koll L, Brinks E, et al. Polyphasic study of antibiotic-resistant enterobacteria isolated from fresh produce in Germany and description of *Enterobacter vonholyi* sp. nov. isolated from marjoram and *Enterobacter dykesii* sp. nov. isolated from mung bean sprout. *Syst Appl Microbiol*. 2021 Jan;44(1):126174.
25. Es-sahm I, Esserti S, Dich J, Smaili A, Rifai LA, Faize L, et al. Common *Bacillus* mitigate tomato verticillium wilt and bacterial specks when combined with an essential oil extract [Internet]. *Rhizosphere*. 2024 Mar 15 [citado 2024 Oct 12];29:100865. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2024.100865>
26. Bennasar A, Mulet M, Lalucat J, García-Valdés E. PseudoMLSA: a database for multigenic sequence analysis of *Pseudomonas* species [Internet]. *BMC Microbiol*. 2010 Apr 21 [citado 2024 Oct 12];10(1):118. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/147-10-118>
27. Zhang J, Chiodini R, Badr A, Zhang G. The impact of next-generation sequencing on genomics. *J Genet Genomics*. 2011 Mar 20;38(3):95-109.

28. Fraser C, Alm E, Polz M, Spratt B, Hanage W. The bacterial species challenge: making sense of genetic and ecological diversity. *Science*. 2009 Feb 6;323(5915):741-6.
29. Bennett J, Jolley K, Earle S, Corton C, Bentley S, Parkhill J, et al. A genomic approach to bacterial taxonomy: an examination and proposed reclassification of species within the genus *Neisseria*. *Microbiology*. 2012 Jul 12;158(7):1570-1580.
30. Naz T, Khan M, Ahmed I, Ur Rehman S, Rha E, Malook I, et al. Biosorption of heavy metals by *Pseudomonas* species isolated from sugar industry. *Toxicol Ind Health*. 2016 Sep 10;32(9):1619-1627.
31. Skariyachan S, Taskeen N, Kishore A, Krishna B, Naidu G. Novel consortia of *Enterobacter* and *Pseudomonas* formulated from cow dung exhibited enhanced biodegradation of polyethylene and polypropylene. *J Environ Manage*. 2021 Apr 15;284:112030.
32. Sibanda T, Selvarajan R, Tekere M. Synthetic extreme environments: overlooked sources of potential biotechnologically relevant microorganisms. *Microb Biotechnol*. 2017 May 22;10(3):570-585.
33. Hesse C, Schulz F, Bull C, Shaffer B, Yan Q, Shapiro N, et al. Genome-based evolutionary history of *Pseudomonas spp*. *Environ Microbiol*. 2018 Jun 22;20(6):2142–59.
34. Vélez J, Martínez J, Ospina J, Agudelo S. Bioremediation potential of *Pseudomonas* genus isolates from residual water, capable of tolerating lead through mechanisms of exopolysaccharide production and biosorption [Internet]. *Biotechnol Rep*. 2021 Oct 29 [citado 2024 Oct 12];32. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00685>
35. Nikel PI, de Lorenzo V. *Pseudomonas putida* as a functional chassis for industrial biocatalysis: From native biochemistry to trans-metabolism. *Metab Eng*. 2018 Nov;50:142–55.
36. Pandey S, Gupta S. Evaluation of *Pseudomonas* sp. for its multifarious plant growth promoting potential and its ability to alleviate biotic and abiotic stress in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants [Internet]. *Sci Rep*. 2020 Dec 1 [citado 2024 Oct 12];10(1):20951. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-77850-0>
37. Pérez P, Galán F, Gutiérrez D, Guerrero I. Infecciones por enterobacterias. *Medicine*. 2014 May 22;11(55):3276-3282.
38. Nawaz M, Xu C, Qaria M, Zeeshan S, Rameez H, Ahmed Alghamdi H, et al. Genomic and biotechnological potential of a novel oil-degrading strain *Enterobacter kobei* DH7 isolated from petroleum-contaminated soil. *Chemosphere*. 2023 Nov 5;340:139815.
39. Ghoreishi G, Alemzadeh A, Mojarrad M, Djavaheri M. Bioremediation capability and characterization of bacteria isolated from petroleum contaminated soils in Iran. *Sustain Environ Res*. 2017 Jul 1;27(4):195-202.
40. Kelany M, El-sawy M, El-Gendy A, Beltagy E. Bioremediation of industrial wastewater heavy metals using solo and consortium *Enterobacter spp*. *Environ Monit Assess*. 2023 Nov 23;195(11):1357.
41. Gomaa E, El-Meihy R. Bacterial biosurfactant from *Citrobacter freundii* MG812314.1 as a bioremoval tool of heavy metals from wastewater [Internet]. *Bull Natl Res Cent*. 2019 Dec 24 [citado 2024 Oct 12];43(1):69. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0088-8>

42. Ranawat B, Bachani P, Singh A, Mishra S. *Enterobacter hormaechei* as plant growth-promoting bacteria for improvement in *Lycopersicon esculentum*. *Curr Microbiol*. 2021 Apr 24;78(4):1208-1217.
43. Ajmal A, Yasmin H, Hassan M, Khan N, Jan B, Mumtaz S. Heavy metal-resistant plant growth-promoting *Citrobacter werkmanii* strain WWN1 and *Enterobacter cloacae* strain JWM6 enhance wheat (*Triticum aestivum* L.) growth by modulating physiological attributes and some key antioxidants under multi-metal stress [Internet]. *Front Microbiol*. 2022 May 6[citado 2024 Oct 12];13:815704. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.815704/full>
44. Dash H, Das S. Diversity, community structure, and bioremediation potential of mercury-resistant marine bacteria of estuarine and coastal environments of Odisha, India. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016 Apr 15;23(7):6960-6971.
45. Chlebek D, Płociniczak T, Gobetti S, Kumor A, Hupert-Kocurek K, Pacwa-Płociniczak M. Analysis of the genome of the heavy metal resistant and hydrocarbon-degrading rhizospheric *Pseudomonas qingdaonensis* ZCR6 strain and assessment of its plant-growth-promoting traits. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 25;23(1):214.
46. Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: Wiley; 1991. Chapter 2, p. 115-175.
47. Ait Tayeb L, Ageron E, Grimont F, Grimont P. Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. *Res Microbiol*. 2005 Jun 5;156(5-6):763-73.
48. Hall T, Biosciences I, Carlsbad C. BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*. 2011 Jun;2:60-61.
49. Yoon S, Ha S, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, et al. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017 May 1;67(5):1613-7.
50. Thompson J, Higgins D, Gibson T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994 Nov 11;22(22):4673-80.
51. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 2018 Jun 1;35(6):1547-9.
52. Edgar R. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004 Mar 8;32(5):1792-7.
53. Simon A. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Internet], Cambridge: Brabraham Institute; 2010 [cited 2024 Apr 9] Disponible en: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
54. Coil D, Jospin G, Darling AE. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics*. 2015 Feb 15;31(4):587-9.
55. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013 Apr 15;29(8):1072-5.
56. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014 Jul 15;30(14):2068-9.

57. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009 Dec 15;10(1):421.
58. Finn R, Clements J, Eddy S. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res*. 2011 Jul 1;39(suppl):W29–37.
59. Richter M, Rosselló-Móra R, Glöckner F, Peplies J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*. 2016 Mar 15;32(6):929–31.
60. Meier-Kolthoff J, Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat Commun*. 2019 May 16;10(1):2182.
61. Adékambi T, Drancourt M, Raoult D. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends Microbiol*. 2009 Jan;17(1):37–45.
62. Gomila M, Peña A, Mulet M, Lalucat J, García-Valdés E. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front Microbiol* [Internet]. 2015 Mar 18 [cited 2024 Oct 17];6:214. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00214/full>.
63. Mukhia S, Kumar A, Kumari P, Kumar R, Kumar S. Multilocus sequence based identification and adaptational strategies of *Pseudomonas sp.* from the supraglacial site of Sikkim Himalaya. *PLoS One* [Internet]. 2022 Jan 24 [cited 2024 Oct 17];17(1):e0261178. Disponible en: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0261178>
64. Aminov RI. Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front Microbiol* [Internet]. 2011 Jul 26 [cited 2024 Oct 17];2:158. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00158>.
65. Díaz-Muñoz S, Koskella B. Bacteria–Phage interactions in natural environments. *Adv Appl Microbiol*. 2014 Jan 3;89:135–83.
66. Domingues S, Harms K, Fricke W, Johnsen P, da Silva G, Nielsen KM. Natural transformation facilitates transfer of transposons, integrons and gene cassettes between bacterial species. *PLoS Pathog* [Internet]. 2012 Aug 2 [cited 2024 Oct 17];8(8):e1002837. Disponible en: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002837>
67. Lorenz M, Wackernagel W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev*. 1994 Sep 15;58(3):563–602.
68. Hunt D, Klepac-Ceraj V, Acinas S, Gautier C, Bertilsson S, Polz M. Evaluation of 23S *rRNA* pcr primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Mar 8;72(3):2221–5.
69. Hu S, Li X, Yin X, Li R, Zhang R, Zang J, et al. Species-specific identification of *Pseudomonas* based on 16S–23S *rRNA* gene internal transcribed spacer (ITS) and its combined application with next-generation sequencing. *BMC Microbiol*. 2022 Dec 1;22(1):188.
70. Davin-Regli A, Lavigne J, Pagès J. *Enterobacter spp.*: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Sep 18;32(4).
71. Cilia V, Lafay B, Christen R. Sequence heterogeneities among 16S ribosomal *RNA* sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Mol Biol Evol*. 1996 Mar 1;13(3):451–61.

72. Fukushima M, Kakinuma K, Kawaguchi R. Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence. *J Clin Microbiol*. 2002 Aug;40(8):2779–85.
73. Dhiviya M, Naveen D, Yesurajan I, Anandan S, Kamini W, Balaji V. Identification of nonserotypeable *Shigella* spp. using genome sequencing: a step forward. *Future Sci OA*. 2017 Jul 7;3(4):FSO229.
74. Nochi Z, Sahebkhitiari N, Kharaziha P, Chiani M, Motavaze K, Dabiri H, et al. Comparison of *16S rRNA*, *23S rRNA* and *gyrB* genes sequences in phylogenetic relationships of *Shigella* isolates from Iran. *Ann Microbiol*. 2009 Sep;59(3):615–22.
75. Halimeh F, Rafei R, Diene S, Mikhael M, Mallat H, Achkar M, et al. Challenges in identification of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2020 Mar 30;67(2):100–6.
76. Devanga N, Muthuirulandi D, Inbanathan F, Veeraraghavan B. Accurate differentiation of *Escherichia coli* and *Shigella* serogroups: challenges and strategies. *New Microbes New Infect*. 2018 Jan 2;21:58–62.
77. Delmas J, Breyse F, Devulder G, Flandrois JP, Chomarat M. Rapid identification of *Enterobacteriaceae* by sequencing dna gyrase subunit B encoding gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006 Aug ;55(4):263-8.
78. Li X, Wang X, Yang H, Gao X, Cui Z. Application of *gyrB* in the identification of closely related bacteria: a review. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 2008 May;48(5):701-6.
79. Gevers D, Cohan F, Lawrence J, Spratt B, Coenye T, Feil E, et al. Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Sep 10;3(9):733–9.
80. Lalucat J, Mulet M, Gomila M, García-Valdés E. Genomics in bacterial taxonomy: impact on the genus *Pseudomonas*. *Genes (Basel)*. 2020 Jan 29;11(2):139.
81. Moore E, Mau M, Arnscheidt A, Böttger E, Hutson R, Collins M, et al. The determination and comparison of the *16S rRNA* gene sequences of species of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto and Estimation of the Natural Intrageneric Relationships. *Syst Appl Microbiol*. 1996 Dec 19;19(4):478–92.
82. Vásquez-Ponce F, Higuera-Llantén S, Pavlov MS, Marshall SH, Olivares-Pacheco J. Phylogenetic MLSA and phenotypic analysis identification of three probable novel *Pseudomonas* species isolated on King George Island, South Shetland, Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2018 Oct 18;49(4):695–702.
83. Konstantinidis K, Ramette A, Tiedje J. The bacterial species definition in the genomic era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006 Nov 29;361(1475):1929–40.
84. Passarelli-Araujo H, Franco G, Venancio T. Network analysis of ten thousand genomes shed light on *Pseudomonas* diversity and classification. *Microbiol Res [Internet]*. 2022 Jan;254:126919.
85. Girard L, Lood C, De Mot R, van Noort V, Baudart J. Genomic diversity and metabolic potential of marine *Pseudomonadaceae*. *Front Microbiol [Internet]*. 2023 Apr 6 [cited 2024 Oct 17];14:1071039. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1071039/full>

86. Girard L, Lood C, Höfte M, Vandamme P, Rokni-Zadeh H, van Noort V, et al. The ever-expanding *Pseudomonas* genus: description of 43 new species and partition of the *Pseudomonas putida* group. *Microorganisms* . 2021 Aug 18;9(8):1766.
87. Keshavarz-Tohid V, Vacheron J, Dubost A, Prigent-Combaret C, Taheri P, Tarighi S, et al. Genomic, phylogenetic and catabolic re-assessment of the *Pseudomonas putida* clade supports the delineation of *Pseudomonas alloputida* sp. nov., *Pseudomonas inefficax* sp. nov., *Pseudomonas persica* sp. nov., and *Pseudomonas shirazica* sp. nov. *Syst Appl Microbiol*. 2019 Jul 14;42(4):468–80.
88. Auch A, von Jan , Klenk H, Göker M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Stand Genomic Sci*. 2010 Jan 28;2(1):117–34.
89. Choque R. Detección de genes *merA* y *merB* en *Pseudomonas* spp. resistentes a mercurio aisladas de ambientes acuáticos. Universidad Nacional “San Luis Gonzaga.” 2019;1–68.
90. Jain S, Bhatt A. Molecular and in situ characterization of cadmium-resistant diversified extremophilic strains of *Pseudomonas*. *3 Biotech*. 2014 Jun 4;4(3):297-304.
91. Zheng L, Zhang X, Zhu L, Lu G, Guan J, Liu M, et al. A clinical *Pseudomonas juntendi* strain with blaIMP-1. *Front Microbiol*. 2022 Jul 29;13:929800.
92. Urbanowicz P, Izdebski R, Biedrzycka M, Literacka E, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Genomic epidemiology of mbl-producing *Pseudomonas putida* group isolates in Poland. *Infect Dis Ther*. 2022 Aug 11;11(4):1725-40.
93. Ramos M, Furlan J, Gallo I, dos Santos L, de Campos T, Savazzi E, et al. High level of resistance to antimicrobials and heavy metals in multidrug-resistant *Pseudomonas* sp. isolated from water sources. *Curr Microbiol*. 2020 Oct;77(10):2694-2701.
94. Tohya M, Tada T, Watanabe S, Kuwahara-Arai K, Zin K, Zaw N, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Pseudomonas asiatica* producing NDM-1 and VIM-2 Metallo-Lactamases in Myanmar. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(8):e00575-19.
95. Zarate M, Barrantes Salinas D, Cuicapuza D, Velasquez J, Fernández N, Salvatierra G, et al. Frecuencia de resistencia a la colistina en *Pseudomonas aeruginosa*: primer reporte en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2021;38(2):308-12.
96. Horna G, Amaro C, Palacios A, Guerra H, Ruiz J. High frequency of the *exoU*⁺/*exoS*⁺ genotype associated with multidrug-resistant “high-risk clones” of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Peruvian hospitals. *Sci Rep*. 2019 Jul 26;9(1):10874.
97. Tohya M, Watanabe S, Teramoto K, Uechi K, Tada T, Kuwahara-Arai K, et al. *Pseudomonas asiatica* sp. nov., isolated from hospitalized patients in Japan and Myanmar. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2019 May 12;69(5):1361-68.
98. Tohya M, Watanabe S, Teramoto K, Shimojima M, Tada T, Kuwahara-Arai K, et al. *Pseudomonas juntendi* sp. nov., isolated from patients in Japan and Myanmar. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2019 Nov 1;69(11):3377-84.
99. Khadka S, Nshimiyimana JB, Zou P, Koirala N, Xiong. Biodegradation kinetics of diethyl phthalate by three newly isolated strains of *Pseudomonas*. *Sci Afr*. 2020 Jul 2;8:e00380.
100. Passarelli-Araujo H, Jacobs SH, Franco GR, Venancio TM. Phylogenetic analysis and population structure of *Pseudomonas alloputida*. *Genomics*. 2021 Nov;113(6):3762-73.

VIII. ANEXOS

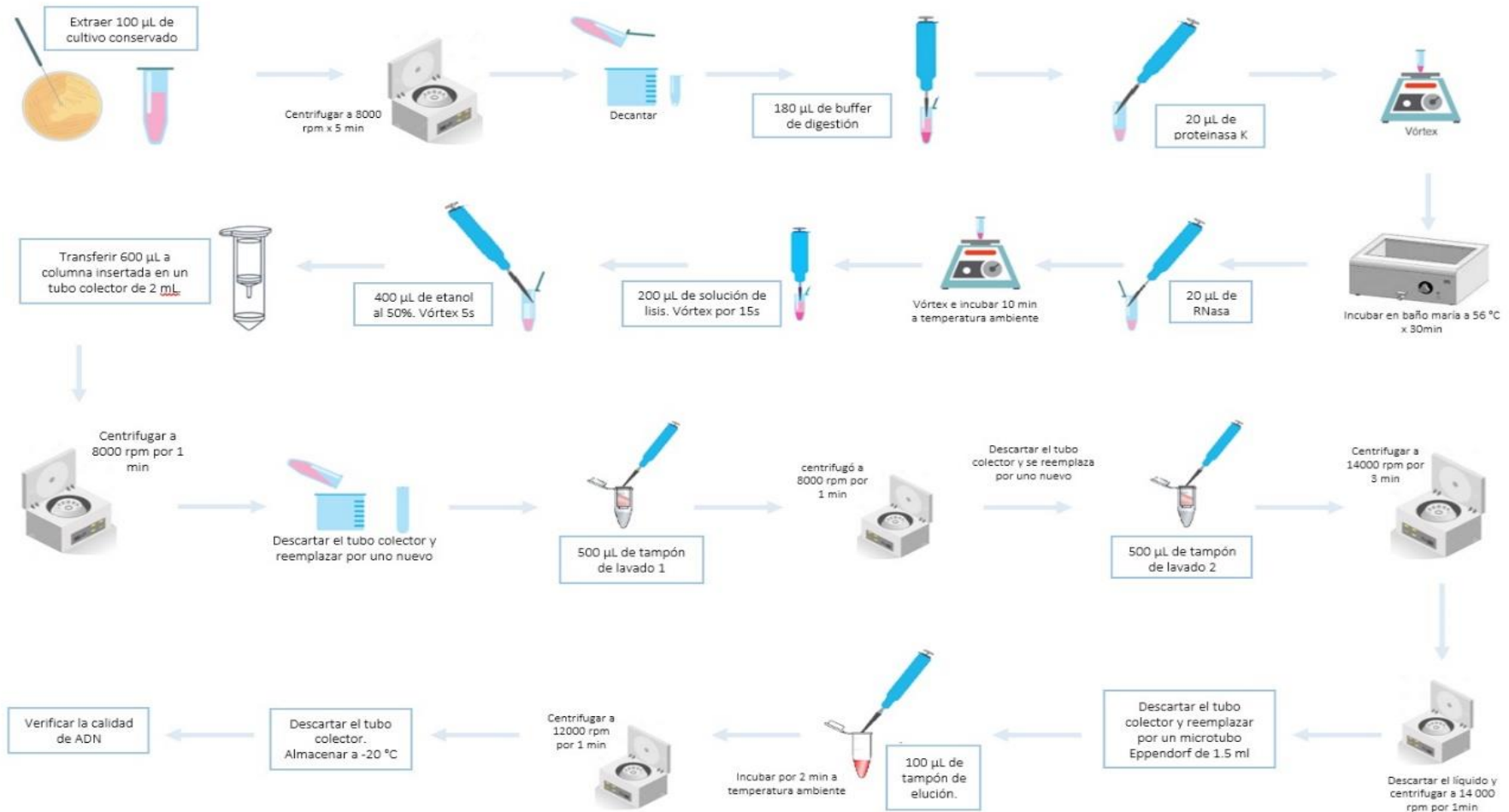


Figura 9. Flujograma de extracción de ADN genómico de las cepas resistentes a mercurio usando el kit comercial Gene JET (Thermo Scientific, USA).

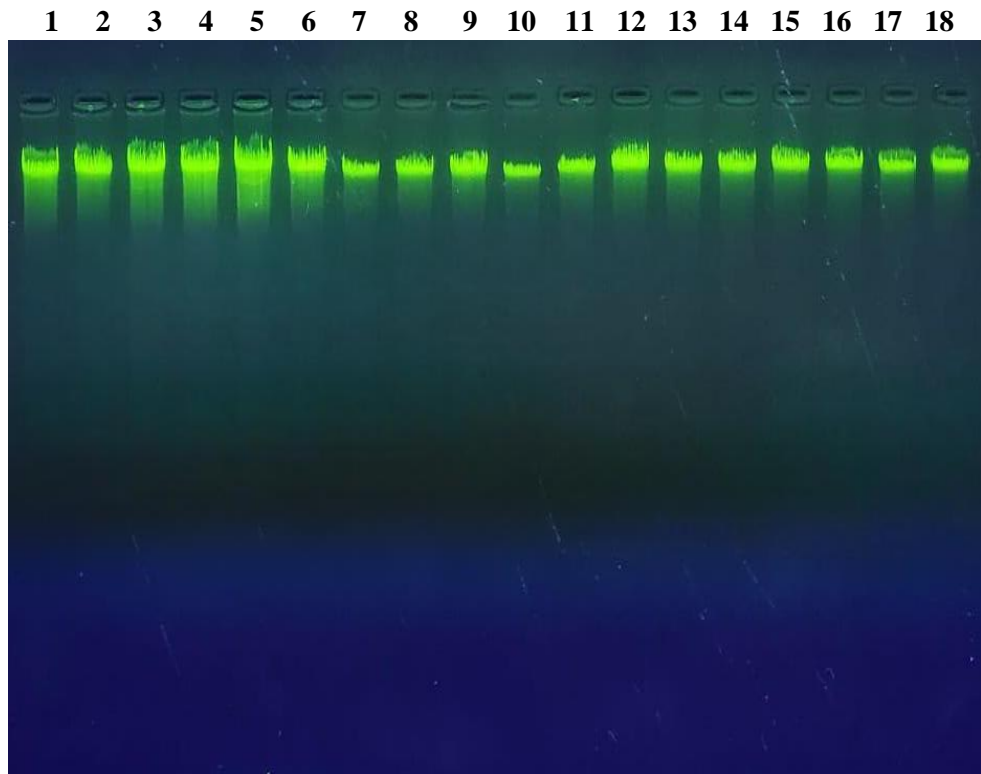


Figura 10. Separación electroforética en gel de agarosa (1% en TAE) de ADN genómico de cepas de *Pseudomonas* y *Enterobacteriácea*. Carriles: 1. C1-G1. 2. C1-J. 3. EL2-2. 4. I3-2. 5. I3-3. 6. I4-1. 7. I4-2. 8. N1A-1. 9. N1A-2. 10. M1C-3. 11. S1-1. 12. S2-1. 13. Y1-E. 14. Y1-F. 15. Y1-G1. 16. Y1H-2. 17. Y-01. 18. 4E.

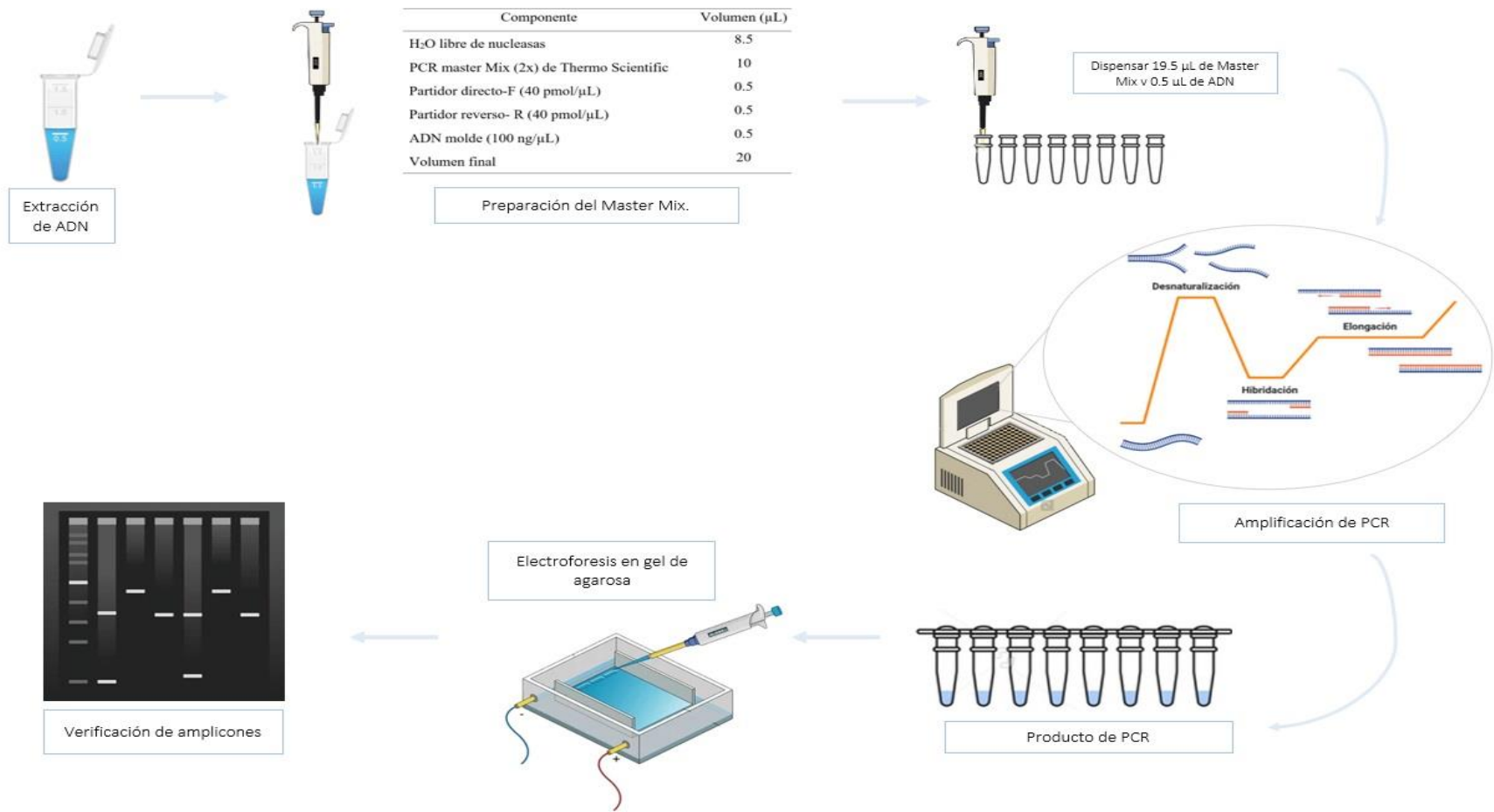


Figura 11. Flujo de protocolo de amplificación mediante PCR convencional.

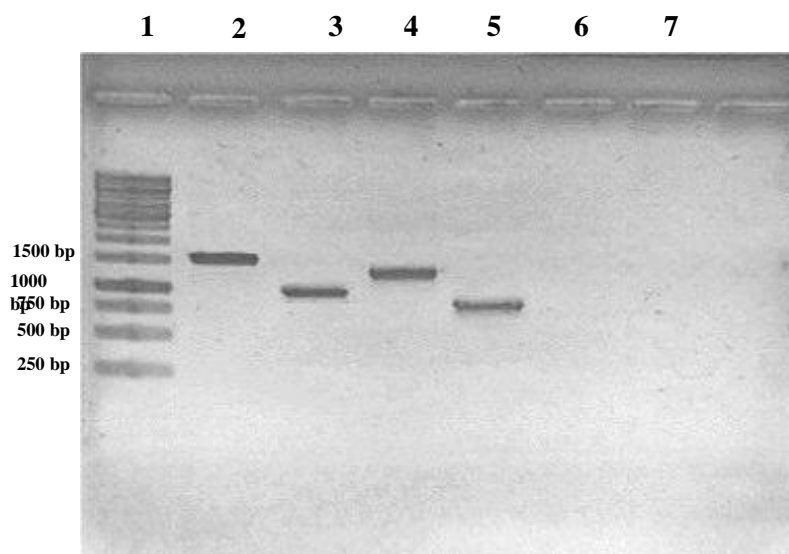


Figura 12. Separación electroforética en gel de agarosa (1.5% en TAE) de productos amplificados por PCR convencional para los genes 16S ARNr, *gyrB*, *rpoB* y *rpoD* en cepa control *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9017 carriles: 1. Marcador de tamaño molecular de 1 kb. 2. 16S ARNr. 3. *gyrB*. 4. *rpoB*. 5. *rpoD*. 6. Control negativo. 7. Blanco.

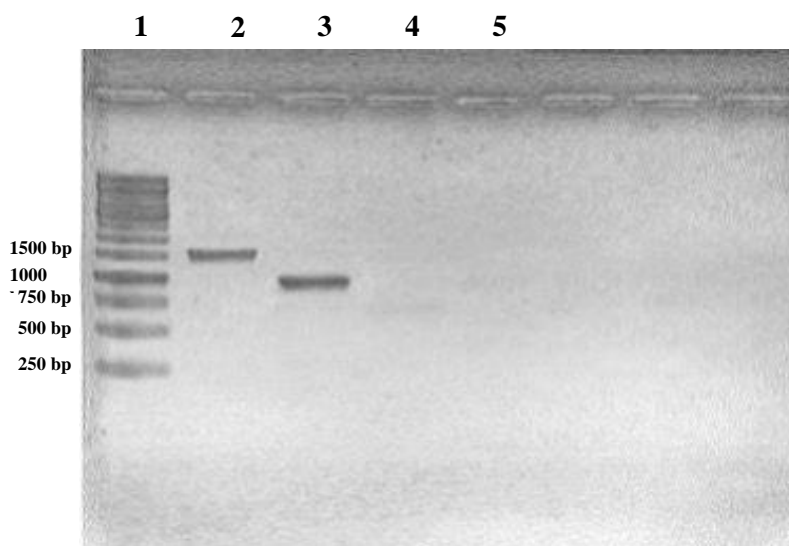
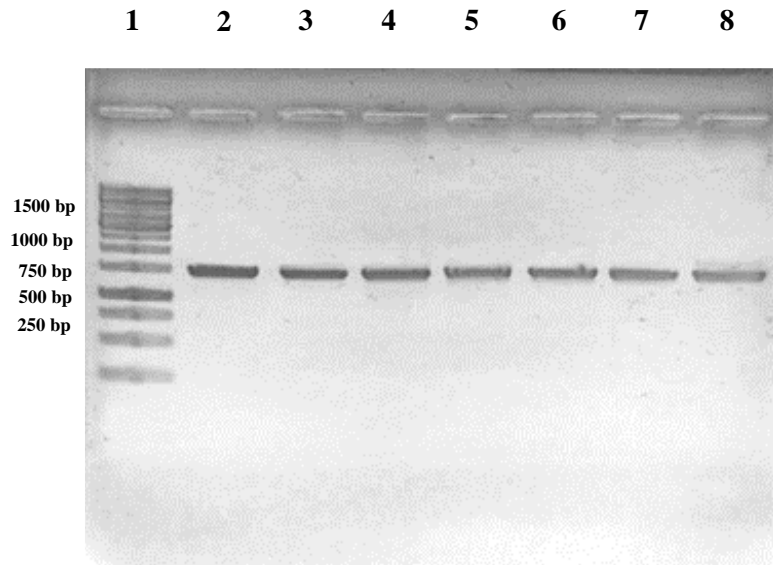
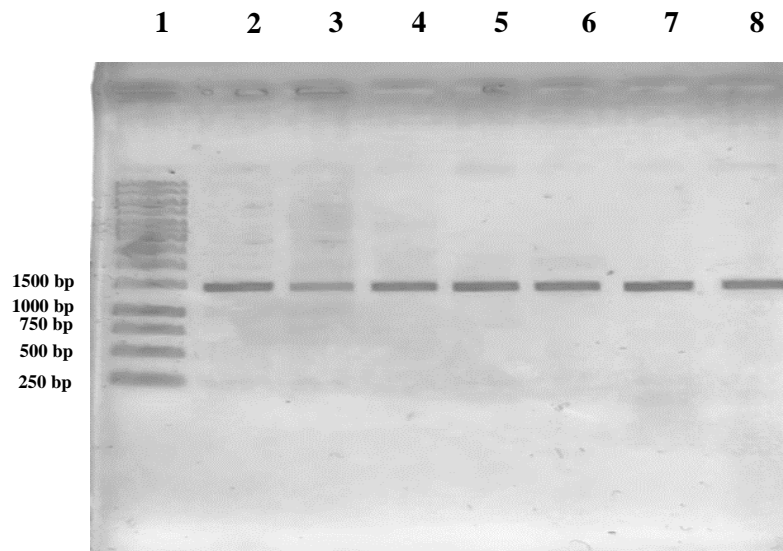


Figura 13. Separación electroforética en gel de agarosa (1.5% en TAE) de productos amplificados por PCR convencional para los genes 16S ARNr y *gyrB* en cepa control *Escherichia coli* ATCC BW25113. carriles: 1. Marcador de tamaño molecular de 1 kb. 2. 16S ARNr. 3. *GyrB*. 4. Control negativo. 5. Blanco

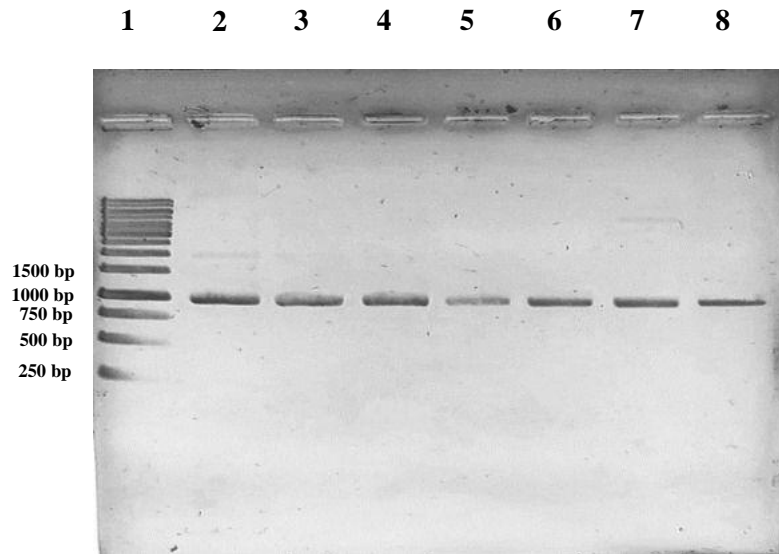


A

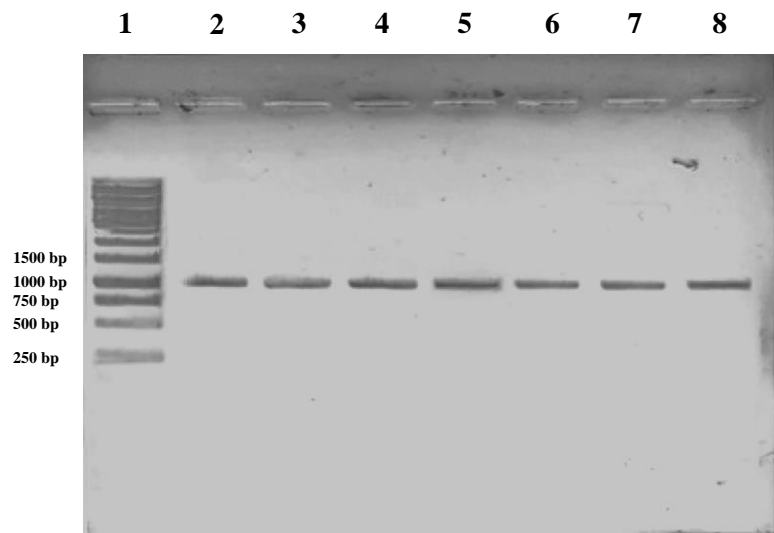


B

Figura 14. Separación electroforética en gel de agarosa (1.5% en TAE) de productos amplificados por PCR para el gen 16S ARNr de especies de *Pseudomonas*. A, carriles: 1. Marcador de tamaño molecular de 1 kb. 2. C1-G1. 3. C1-J1. 4. EI2-2. 5. I3-3. 6. I4-1. 7. I4-2. 8. Control positivo. B, carriles: 1. Marcador de tamaño molecular de 1 kb. 2. M1C-3. 3. N1A-2. 4. S2-1. 5. Y1-E. 6. Y1-F. 7. Y1H-2. 8. Control positivo.

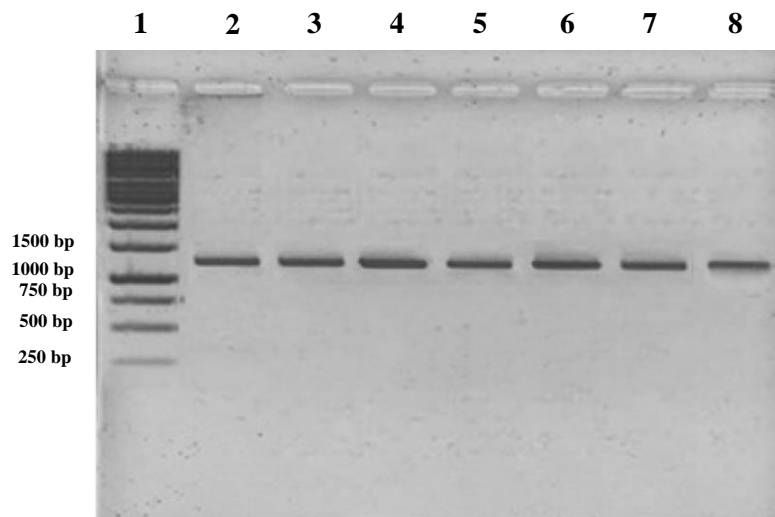


A

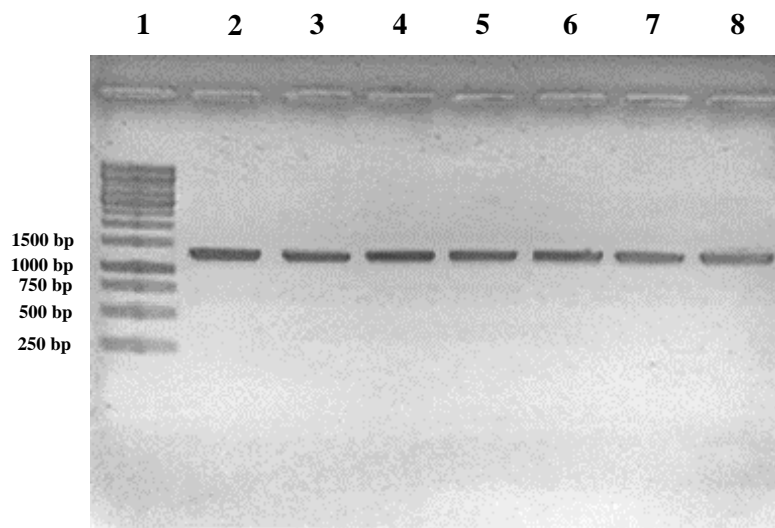


B

Figura 15. Separación electroforética en gel de agarosa (1.5% en TAE) de productos amplificados por PCR para el gen *gyrB* de especies de *Pseudomonas*. A, carriles: 1. Marcador de tamaño molecular de 1 kb. 2. C1-G1. 3. C1-J1. 4. E12-2. 5. I3-3. 6. I4-1. 7. I4-2. 8. Control positivo. B, carriles: 1. Marcador de tamaño molecular de 1 kb. 2. M1C-3. 3. N1A-2. 4. S2-1. 5. Y1-E. 6. Y1-F. 7. Y1H-2. 8. Control positivo.

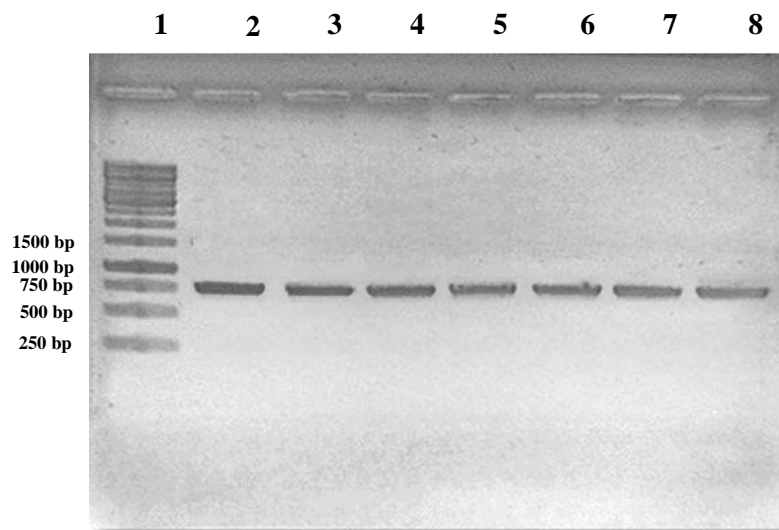


A

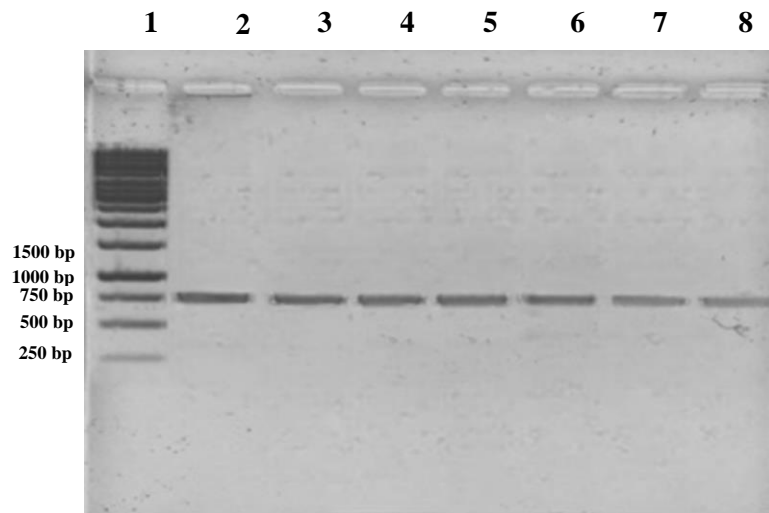


B

Figura 16. Separación electroforética en gel de agarosa (1.5% en TAE) de productos amplificados por PCR para el gen *rpoB* de especies de *Pseudomonas*. A) Carriles: 1. Marcador de tamaño molecular de 1 kb. 2. C1-G1. 3. C1-J1. 4. EI2-2. 5. I3-3. 6. I4-1. 7. I4-2. 8. Control positivo. B) Carriles: 1. Marcador de tamaño molecular de 1 kb. 2. M1C-3. 3. N1A-2. 4. S2-1. 5. Y1-E. 6. Y1-F. 7. Y1H-2. 8. Control positivo.



A



B

Figura 17. Separación electroforética en gel de agarosa (1.5% en TAE) de productos amplificados por PCR para el gen *rpoD* de especies de *Pseudomonas*. A) Carriles: 1. Marcador de tamaño molecular de 1 kb. 2. C1-G1. 3. C1-J1. 4. E12-2. 5. I3-3. 6. I4-1. 7. I4-2. 8. Control positivo. B) Carriles: 1. Marcador de tamaño molecular de 1 kb. 2. M1C-3. 3. N1A-2. 4. S2-1. 5. Y1-E. 6. Y1-F. 7. Y1H-2. 8. Control positivo.

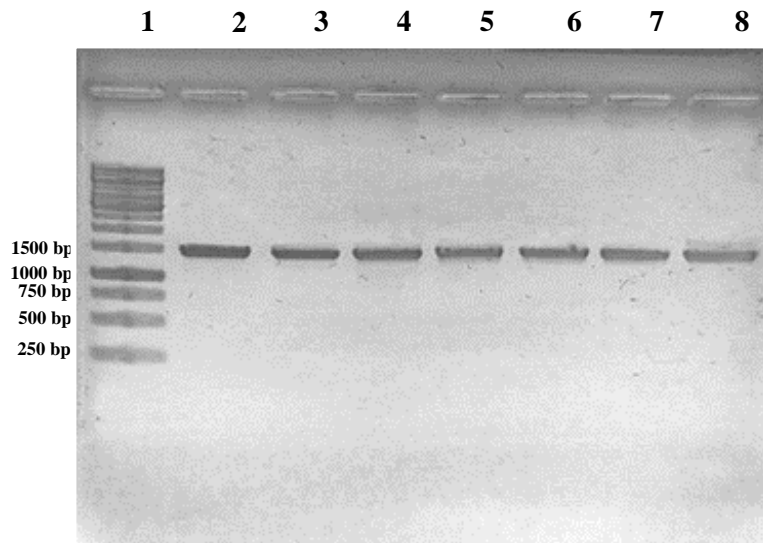


Figura 18. Separación electroforética en gel de agarosa (1.5% en TAE) de productos amplificados por PCR para el gen 16S ARNr de enterobacterias. Carriles: 1. Marcador de tamaño molecular de 1 kb. 2. I3-2. 3. N1A-1. 4. S1-1. 5. Y-01. 6. Y1G-1. 7. 4E. 8. Control positivo.

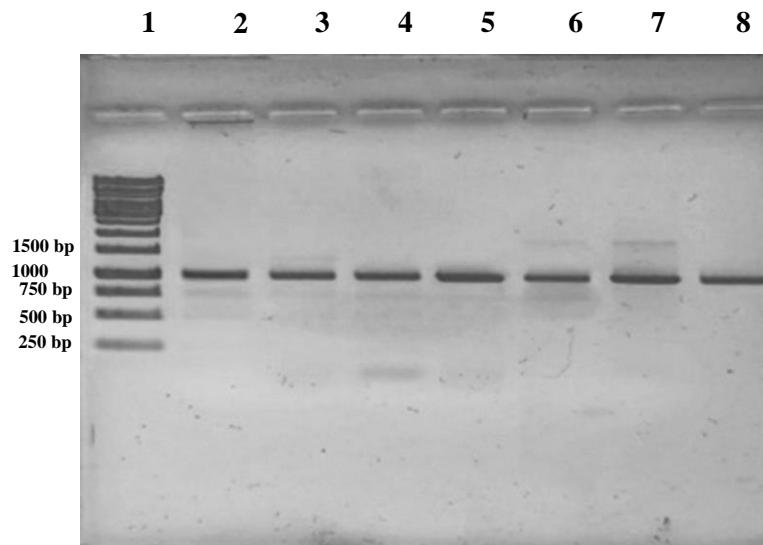


Figura 19. Separación electroforética en gel de agarosa (1.5% en TAE) de productos amplificados por PCR para el gen *gyrB* de enterobacterias. Carriles: 1. Marcador de tamaño molecular de 1 kb. 2. I3-2. 3. N1A-1. 4. S1-1. 5. Y-01. 6. Y1G-1. 7. 4E. 8. Control positivo.

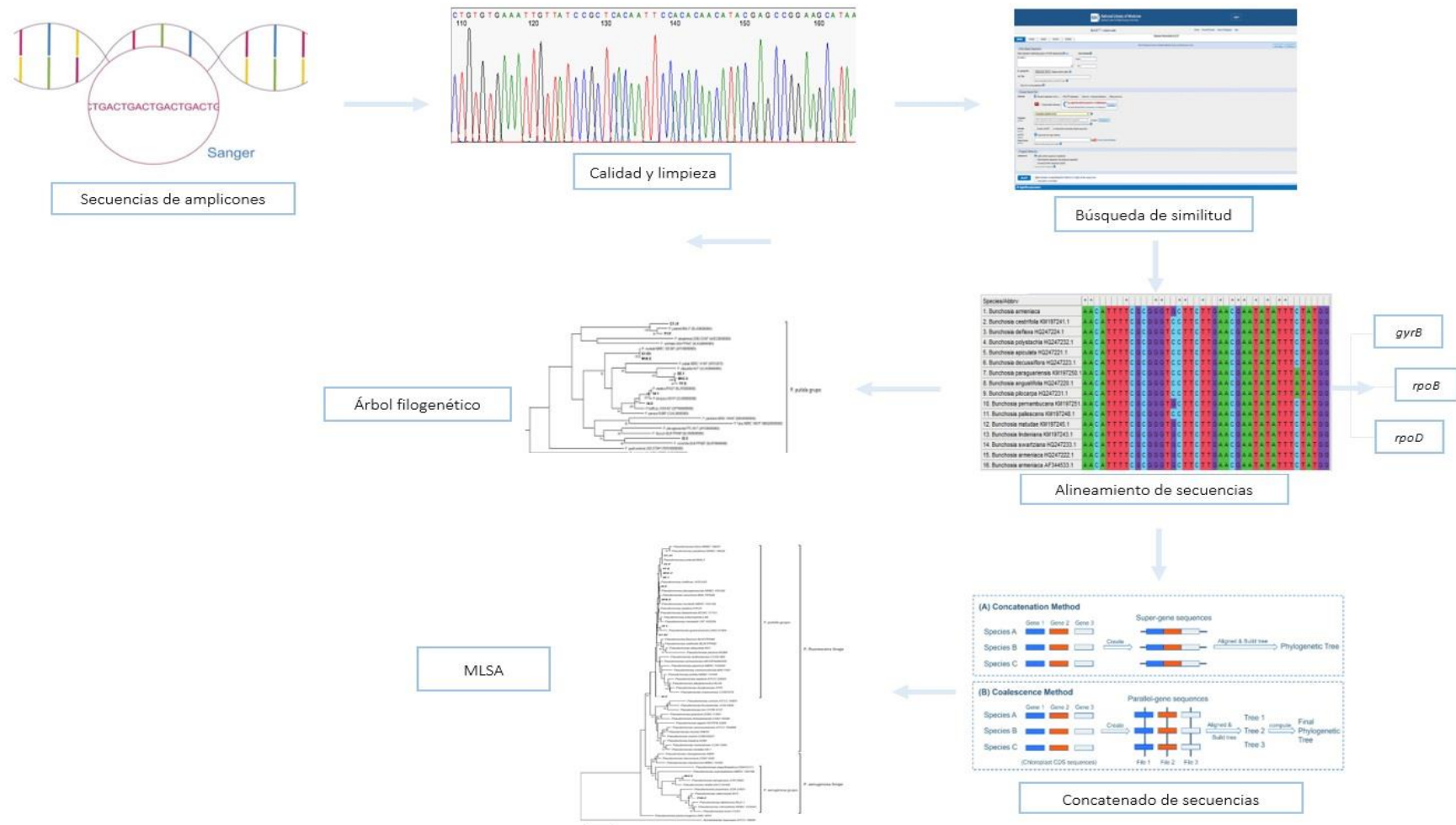


Figura 20. Flujo de trabajo del proceso de análisis in silico de secuencias nucleotídicas.

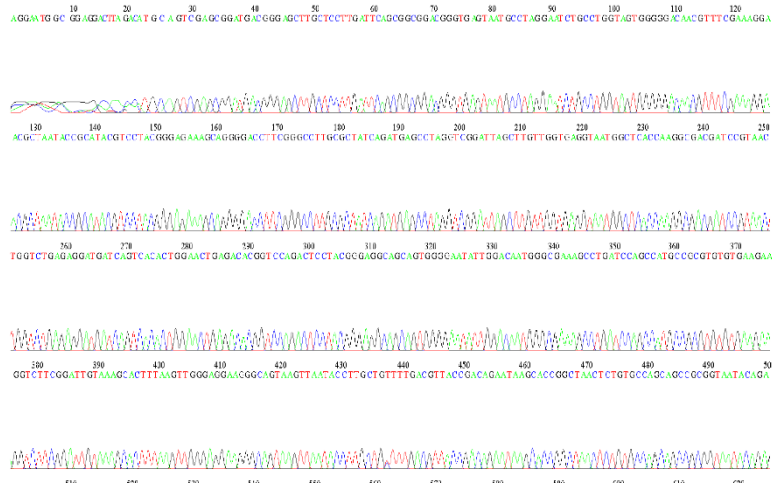


Figura 21. Visualización de cromatogramas producto de secuenciamiento por método Sanger.

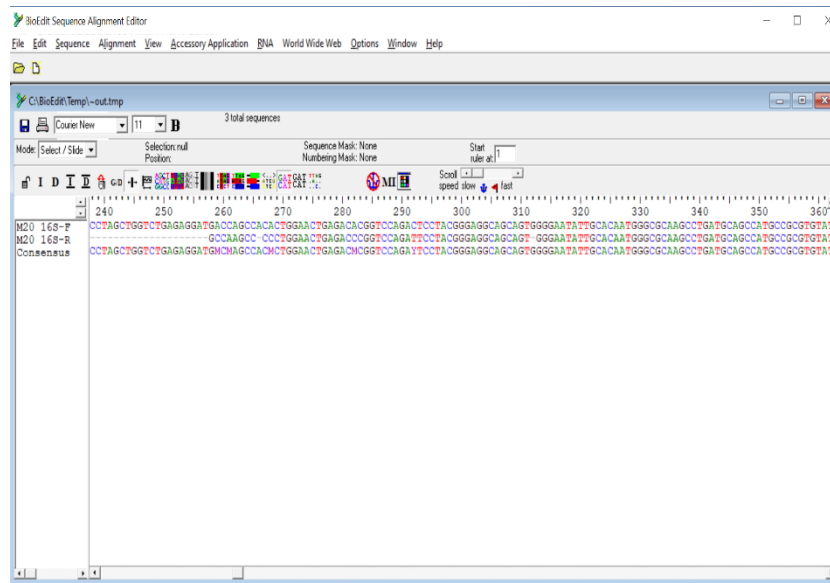


Figura 22. Interfaz del programa Bioedit usado para el procesamiento y edición de secuencias nucleotídicas.

My Identifications: 6

EzBioCloud's identification service provides proven similarity-based searches against quality-controlled databases of 16S rRNA sequences. The top-hit information for each identification is the top hit against all prokaryotic names. Hits against only valid prokaryotic names can be viewed in the details page, which can be accessed by clicking the detail icon for each Identify Job.

Tasks	Name	Top-hit taxon	Top-hit strain	Similarity (%)	Top-hit taxonomy	Completeness (%)
	N1A_2	Pseudomonas montelli	NBRC 103158	100.00	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Pseudomonadaceae;Pseudomonas	92.6
	I4_2	Pseudomonas plecoglossicida	NBRC 103162	100.00	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Pseudomonadaceae;Pseudomonas	100.0
	I4_1	Pseudomonas plecoglossicida	NBRC 103162	100.00	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Pseudomonadaceae;Pseudomonas	77.2
	I3_3	LBME_s	ATH-43	99.73	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Pseudomonadaceae;Pseudomonas	100.0
	C1_J1	Pseudomonas jurendi	BML3	100.00	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Pseudomonadaceae;Pseudomonas	85.7

Figura 23. Interfaz de la herramienta de búsqueda de secuencias de la base de datos del gen 16S ARNr en la página web EzBioCloud.

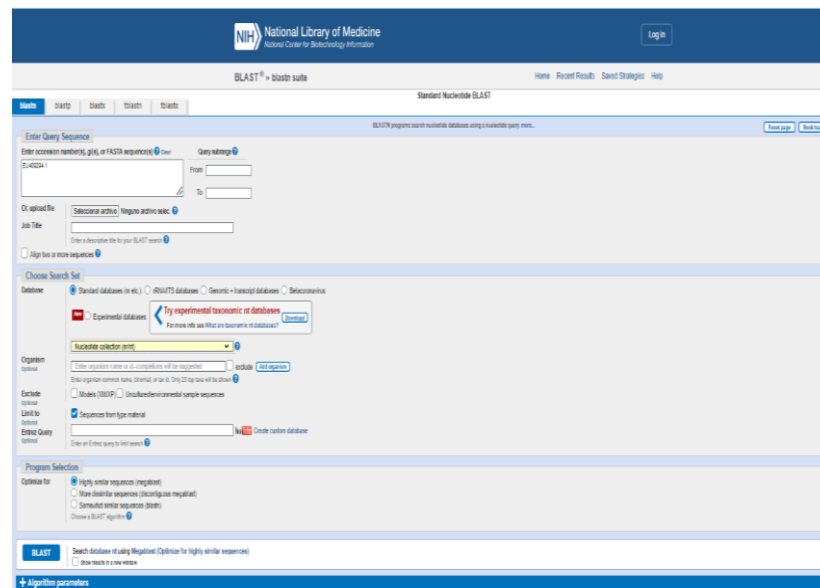


Figura 24. Interfaz del algoritmo BLASTn en la página web de National Center for Biotechnology Information (NCBI).

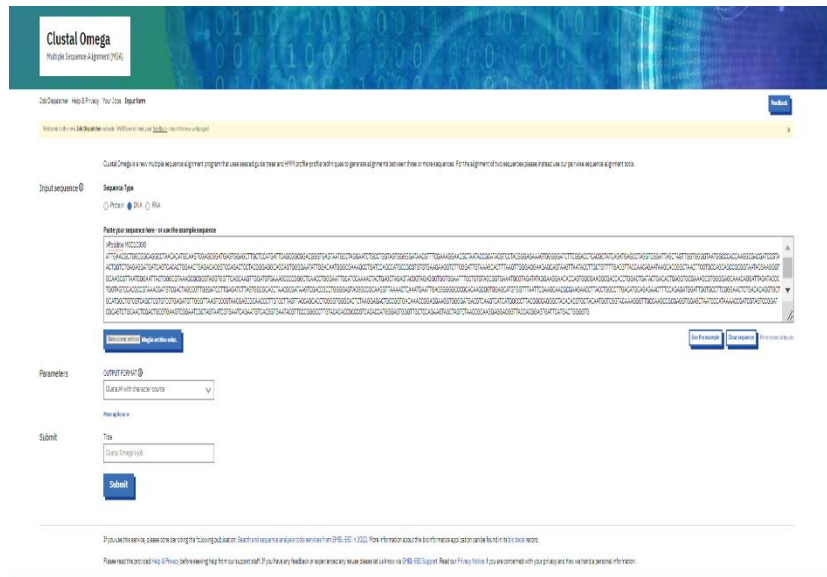


Figura 25. Interfaz del programa Clustal Omega en la página web de The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI).

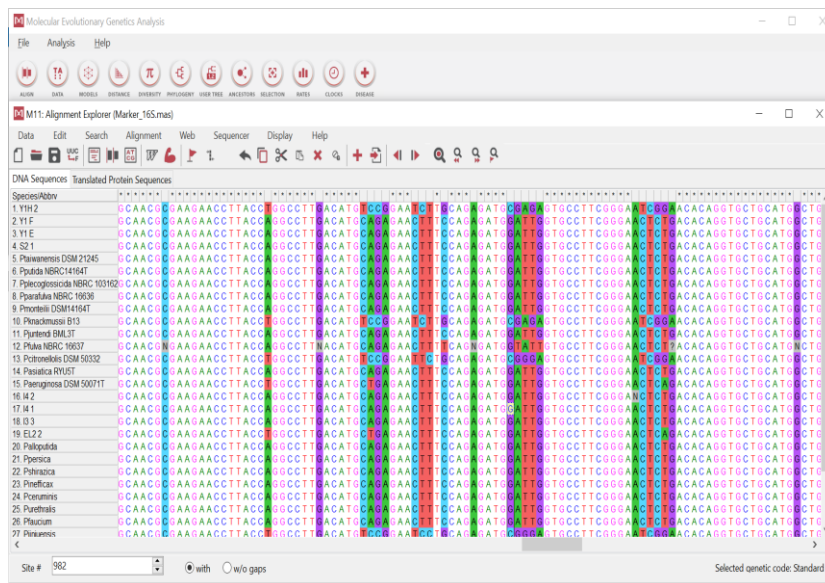


Figura 26. Interfaz del programa Mega- X para realizar el análisis de árboles filogenéticos.

Tabla 13. Matriz de identidad de porcentajes de similitud generados por la comparación de pares de secuencias nucleotídicas del gen *gyrB* relacionadas a especies del género *Pseudomonas*.

Cepa	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)
(1) C1J1	100	97.2	97.6	89.7	88.9	89.1	88.9	88.9	89.0	90.6	90.6	90.6	89.9	89.9	90.2	88.3	88.5	81.4	81.4	82.1	81.4	81.8	81.6
(2) <i>P. juntendi</i>	97.2	100	98.7	89.7	89.2	89.4	89.3	89.3	89.4	90.6	90.6	90.6	90.4	90.4	90.8	88.6	89.0	81.3	81.2	82.3	81.4	81.8	81.6
(3) Y1F	97.6	98.7	100	89.8	89.0	89.4	89.3	89.3	89.4	90.7	90.8	90.8	90.2	90.2	90.6	88.5	89.0	81.3	81.2	82.3	81.3	81.6	81.5
(4) <i>P. faucium</i>	89.7	89.7	89.8	100	91.5	90.6	90.6	90.5	90.6	91.9	91.9	91.9	92.4	92.4	92.5	92.0	92.0	82.5	82.3	83.9	83.5	83.8	83.9
(5) <i>P. putida</i>	88.9	89.2	89.0	91.5	100	92.5	92.3	92.4	92.4	92.6	92.7	92.7	92.5	92.5	92.9	89.8	90.4	81.2	81.0	82.0	81.6	81.6	81.4
(6) <i>P. alloputida</i>	89.1	89.4	89.4	90.6	92.5	100	97.0	97.0	97.0	92.7	92.8	92.8	93.0	93.0	93.2	89.4	89.4	81.0	80.9	81.8	81.4	81.6	81.3
(7) M1C3	88.9	89.3	89.3	90.6	92.3	97.0	100	99.7	99.6	93.0	93.0	93.0	93.2	93.2	93.2	89.3	89.5	81.2	81.1	81.6	81.4	81.6	81.4
(8) S21	88.9	89.3	89.3	90.5	92.4	97.0	99.7	100	99.8	93.0	93.0	93.0	93.2	93.2	93.2	89.4	89.5	81.2	81.1	81.6	81.4	81.6	81.3
(9) Y1E	89.0	89.4	89.4	90.6	92.4	97.0	99.6	99.8	100	93.0	93.1	93.1	93.3	93.3	93.3	89.4	89.6	81.3	81.2	81.7	81.4	81.6	81.4
(10) <i>P. monteilii</i>	90.6	90.6	90.7	91.9	92.6	92.7	93.0	93.0	93.0	100	99.9	99.9	94.6	94.6	94.9	90.1	90.7	82.1	81.9	82.9	81.7	82.1	81.9
(11) C1G1	90.6	90.6	90.8	91.9	92.7	92.8	93.0	93.0	93.1	99.9	100	100	94.7	94.7	94.9	90.1	90.8	82.1	81.9	83.0	81.8	82.1	82.0
(12) N1A2	90.6	90.6	90.8	91.9	92.7	92.8	93.0	93.0	93.1	99.6	100	100	94.7	94.7	94.9	90.1	90.8	82.1	81.9	83.0	81.8	82.1	82.0
(13) <i>P. asiatica</i>	89.9	90.4	90.2	92.4	92.5	93.0	93.2	93.2	93.3	94.6	94.7	94.7	100	100	98.6	90.3	90.9	81.8	81.7	82.6	82.0	82.2	82.0
(14) I41	89.9	90.4	90.2	92.4	92.5	93.0	93.2	93.2	93.3	94.6	94.7	94.7	100	100	98.6	90.3	90.9	81.8	81.7	82.6	82.0	82.2	82.0
(15) I42	90.2	90.8	90.6	92.5	92.9	93.2	93.2	93.2	93.3	94.9	94.9	94.9	98.6	98.6	100	90.6	91.2	82.3	82.2	83.0	82.3	82.5	82.3
(16) I33	88.3	88.6	88.5	92.0	89.8	89.4	89.3	89.4	89.4	90.1	90.1	90.1	90.3	90.3	90.6	100	92.1	81.1	81.0	81.9	81.4	81.2	81.4
(17) <i>P. ceruminis</i>	88.5	89.0	89.0	92.0	90.4	89.4	89.5	89.5	89.6	90.7	90.8	90.8	90.9	90.9	91.2	92.1	100	81.5	81.3	82.8	82.0	82.2	82.1
(18) <i>P. aeruginosa</i>	81.4	81.3	81.3	82.5	81.2	81.0	81.2	81.2	81.3	82.1	82.1	82.1	81.8	81.8	82.3	81.1	81.5	100	99.8	89.5	88.6	89.1	89.4
(19) EL22	81.4	81.2	81.2	82.3	81.0	80.9	81.1	81.1	81.2	81.9	81.9	81.9	81.7	81.7	82.2	81.0	81.3	99.8	100	89.4	88.5	89.0	89.4
(20) Y1H2	82.1	82.3	82.3	83.9	82.0	81.8	81.6	81.6	81.7	82.9	83.0	83.0	82.6	82.6	83.0	81.9	82.8	89.5	89.4	100	95.0	95.5	95.6
(21) <i>P. delhiensis</i>	81.4	81.4	81.3	83.5	81.6	81.4	81.4	81.4	81.4	81.7	81.8	81.8	82.0	82.0	82.3	81.4	82.0	88.6	88.5	95.0	100	97.2	97.3
(22) <i>P. citronellolis</i>	81.8	81.8	81.6	83.8	81.6	81.6	81.6	81.6	81.6	82.1	82.1	82.1	82.2	82.2	82.5	81.2	82.2	89.1	89.0	95.5	97.2	100	98.6
(23) <i>P. humi</i>	81.6	81.6	81.5	83.9	81.4	81.3	81.4	81.3	81.4	81.9	82.0	82.0	82.0	82.0	82.3	81.4	82.1	89.4	89.4	95.6	97.3	98.6	100

Tabla 14. Matriz de identidad de porcentajes de similitud generados por la comparación de pares de secuencias nucleotídicas del gen *rpoB* relacionadas a especies del género *Pseudomonas*.

Cepa	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)
(1) C1J1	100	99.4	99.3	95.9	95.9	95.5	95.5	95.6	96.4	96.5	96.5	96.4	96.1	96.1	94.6	94.9	95.7	87.9	87.8	88.4	87.8	87.8	87.7
(2) <i>P. juntendi</i>	99.4	100	99.6	95.9	95.9	95.5	95.5	95.6	96.4	96.4	96.4	96.4	96.1	96.1	94.6	94.9	95.8	87.8	87.7	88.5	88.0	87.9	87.8
(3) Y1F	99.3	99.6	100	95.9	95.9	95.5	95.5	95.6	96.3	96.3	96.3	96.4	96.2	96.2	94.5	94.9	95.8	87.8	87.7	88.5	88.0	87.9	87.9
(4) <i>P. putida</i>	95.9	95.9	95.9	100	96.4	96.2	96.2	96.3	97.0	97.1	97.1	96.9	96.8	96.8	95.2	95.1	95.5	88.0	87.9	88.4	87.8	87.9	87.6
(5) <i>P. alloputida</i>	95.9	95.9	95.9	96.4	100	98.6	98.6	98.6	97.2	97.2	97.2	97.2	96.9	96.9	95.2	95.1	95.4	88.1	88.1	88.4	87.9	88.1	87.8
(6) M1C3	95.5	95.5	95.5	96.2	98.6	100	99.8	99.9	96.8	96.9	96.9	96.8	96.6	96.5	94.8	94.8	95.1	87.8	87.8	88.1	87.4	87.6	87.3
(7) S21	95.5	95.5	95.5	96.2	98.6	99.8	100	99.9	96.9	96.9	96.9	96.8	96.6	96.6	94.8	94.8	95.1	87.8	87.7	88.1	87.4	87.6	87.2
(8) Y1E	95.6	95.6	95.6	96.3	98.6	99.9	99.9	100	96.9	97.0	97.0	96.9	96.7	96.6	94.9	94.9	95.2	87.8	87.8	88.1	87.4	87.6	87.2
(9) <i>P. monteilli</i>	96.4	96.4	96.3	97.0	97.2	96.8	96.9	96.9	100	99.9	99.9	97.5	97.4	97.4	95.1	95.4	95.9	88.2	88.2	88.7	87.9	88.0	87.6
(10) C1G1	96.5	96.4	96.3	97.1	97.2	96.9	96.9	97.0	99.9	100	100	97.5	97.4	97.4	95.1	95.4	95.9	88.2	88.2	88.7	87.9	88.0	87.7
(11) N1A2	96.5	96.4	96.3	97.1	97.2	96.9	96.9	97.0	99.9	100	100	97.5	97.4	97.4	95.1	95.4	95.9	88.2	88.2	88.7	87.9	88.0	87.7
(12) I42	96.4	96.4	96.4	96.9	97.2	96.8	96.8	96.9	97.5	97.5	97.5	100	98.9	98.9	95.5	95.9	96.3	88.5	88.3	89.0	88.3	88.7	88.3
(13) <i>P. asiatica</i>	96.1	96.1	96.2	96.8	96.9	96.6	96.6	96.7	97.4	97.4	97.4	98.9	100	99.9	95.5	95.6	96.0	88.3	88.2	88.9	88.1	88.4	88.1
(14) I41	96.1	96.1	96.2	96.8	96.9	96.5	96.6	96.6	97.4	97.4	97.4	98.9	99.9	100	95.4	95.6	96.0	88.2	88.1	88.9	88.1	88.4	88.1
(15) I33	94.6	94.6	94.5	95.2	95.2	94.8	94.8	94.9	95.1	95.1	95.1	95.5	95.5	95.4	100	95.9	95.7	88.2	88.1	88.5	88.0	88.2	88.0
(16) <i>P. ceruminis</i>	94.9	94.9	94.9	95.1	95.1	94.8	94.8	94.9	95.4	95.4	95.4	95.9	95.6	95.6	95.9	100	96.7	88.1	88.0	88.7	88.3	88.5	88.3
(17) <i>P. faucium</i>	95.7	95.8	95.8	95.5	95.4	95.1	95.1	95.2	95.9	95.9	95.9	96.3	96.0	96.0	95.7	96.7	100	88.9	88.8	89.1	88.6	88.7	88.5
(18) <i>P. aeruginosa</i>	87.9	87.8	87.8	88.0	88.1	87.8	87.8	87.8	88.2	88.2	88.2	88.5	88.3	88.2	88.2	88.1	88.9	100	99.5	92.9	93.0	92.8	92.8
(19) EL22	87.8	87.7	87.7	87.9	88.1	87.8	87.7	87.8	88.2	88.2	88.2	88.3	88.2	88.1	88.1	88.0	88.8	99.5	100	92.7	92.9	92.6	92.7
(20) Y1H2	88.4	88.5	88.5	88.4	88.4	88.1	88.1	88.1	88.7	88.7	88.7	89.0	88.9	88.9	88.5	88.7	89.1	92.9	92.7	100	96.2	96.2	96.0
(21) <i>P. delhiensis</i>	87.8	88.0	88.0	87.8	87.9	87.4	87.4	87.4	87.9	87.9	87.9	88.3	88.1	88.1	88.0	88.3	88.6	93.0	92.9	96.2	100	98.0	98.2
(22) <i>P. citronellolis</i>	87.8	87.9	87.9	87.9	88.1	87.6	87.6	87.6	88.0	88.0	88.0	88.7	88.4	88.4	88.2	88.5	88.7	92.8	92.6	96.2	98.0	100	98.9
(23) <i>P. humi</i>	87.7	87.8	87.9	87.6	87.8	87.3	87.2	87.2	87.6	87.7	87.7	88.3	88.1	88.1	88.0	88.3	88.5	92.8	92.7	96.0	98.2	98.9	100

Tabla 15. Matriz de identidad de porcentajes de similitud generados por la comparación de pares de secuencias nucleotídicas del gen *rpoD* relacionadas a especies del género *Pseudomonas*.

Cepa	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)
(1) I33	100	94.8	94.6	91.7	91.7	91.6	92.7	92.7	92.7	92.1	92.3	92.4	92.4	93.0	92.8	92.1	92.1	82.6	82.6	82.9	82.3	82.3	82.2
(2) <i>P. faucium</i>	94.8	100	95.5	92.8	92.8	92.8	94.2	94.3	94.3	93.8	94.0	94.2	94.1	94.3	94.9	94.1	94.0	82.7	82.8	83.3	82.7	83.1	82.9
(3) <i>P. ceruminis</i>	94.6	95.5	100	91.8	91.5	91.5	93.0	92.9	92.9	92.6	92.7	92.8	92.9	92.8	93.2	92.7	92.8	81.7	81.8	82.3	81.4	82.1	81.9
(4) C1J1	91.7	92.8	91.8	100	98.4	98.5	94.3	94.3	94.3	93.7	94.2	94.2	94.1	93.8	94.9	94.0	93.9	81.5	81.5	82.3	81.7	82.1	81.9
(5) <i>P. juntendi</i>	91.7	92.8	91.5	98.4	100	99.4	94.4	94.4	94.4	93.8	94.3	94.3	94.2	94.0	94.7	94.1	94.0	81.7	81.7	82.8	82.0	82.4	82.2
(6) Y1F	91.6	92.8	91.5	98.5	99.4	100	94.4	94.4	94.4	93.7	94.1	94.1	94.0	93.9	94.8	94.0	94.0	81.7	81.7	82.4	81.8	82.2	82.0
(7) <i>P. monteilii</i>	92.7	94.2	93.0	94.3	94.4	94.4	100	99.8	99.8	96.3	96.7	96.7	96.7	96.0	96.7	95.7	95.6	82.3	82.4	83.0	82.2	82.6	82.4
(8) C1G1	92.7	94.3	92.9	94.3	94.4	94.4	99.8	100	100	96.4	96.7	96.8	96.7	96.0	96.6	95.6	95.6	82.3	82.3	82.8	82.0	82.4	82.3
(9) N1A2	92.7	94.3	92.9	94.3	94.4	94.4	99.8	100	100	96.4	96.7	96.8	96.7	96.0	96.6	95.6	95.6	82.3	82.3	82.8	82.0	82.4	82.3
(10) <i>P. alloputida</i>	92.1	93.8	92.6	93.7	93.8	93.7	96.3	96.4	96.4	100	98.4	98.3	98.2	95.7	96.1	95.5	95.5	82.2	82.2	82.7	81.9	82.1	81.9
(11) Y1E	92.3	94.0	92.7	94.2	94.3	94.1	96.7	96.7	96.7	98.4	100	99.6	99.5	95.8	96.3	95.6	95.6	82.0	82.0	82.5	81.7	81.9	81.7
(12) M1C3	92.4	94.2	92.8	94.2	94.3	94.1	96.7	96.8	96.8	98.3	99.6	100	99.8	95.8	96.3	95.6	95.6	82.1	82.1	82.8	81.8	82.0	81.9
(13) S21	92.4	94.1	92.9	94.1	94.2	94.0	96.7	96.7	96.7	98.2	99.5	99.8	100	95.7	96.2	95.6	95.5	82.0	82.1	82.8	81.9	82.1	82.0
(14) <i>P. putida</i>	93.0	94.3	92.8	93.8	94.0	93.9	96.0	96.0	96.0	95.7	95.8	95.8	95.7	100	96.4	95.7	95.6	82.5	82.6	82.9	82.3	82.5	82.4
(15) I42	92.8	94.9	93.2	94.9	94.7	94.8	96.7	96.6	96.6	96.1	96.3	96.3	96.2	96.4	100	98.3	98.3	83.5	83.5	83.6	82.7	83.3	83.1
(16) <i>P. asiatica</i>	92.1	94.1	92.7	94.0	94.1	94.0	95.7	95.6	95.6	95.5	95.6	95.6	95.6	95.7	98.3	100	99.95	82.7	82.7	83.1	82.1	82.8	82.7
(17) I41	92.1	94.0	92.8	93.9	94.0	94.0	95.6	95.6	95.6	95.5	95.6	95.6	95.5	95.6	98.3	99.95	100	82.6	82.7	83.0	82.0	82.7	82.6
(18) <i>P. aeruginosa</i>	82.6	82.7	81.7	81.5	81.7	81.7	82.3	82.3	82.3	82.2	82.0	82.1	82.0	82.5	83.5	82.7	82.6	100	99.9	89.4	89.3	89.3	89.3
(19) EL22	82.6	82.8	81.8	81.5	81.7	81.7	82.4	82.3	82.3	82.2	82.0	82.1	82.1	82.6	83.5	82.7	82.7	99.9	100	89.5	89.3	89.3	89.3
(20) Y1H2	82.9	83.3	82.3	82.3	82.8	82.4	83.0	82.8	82.8	82.7	82.5	82.8	82.8	82.9	83.6	83.1	83.0	89.4	89.5	100	95.9	96.6	96.4
(21) <i>P. delhiensis</i>	82.3	82.7	81.4	81.7	82.0	81.8	82.2	82.0	82.0	81.9	81.7	81.8	81.9	82.3	82.7	82.1	82.0	89.3	89.3	95.9	100	97.7	97.6
(22) <i>P. citronellolis</i>	82.3	83.1	82.1	82.1	82.4	82.2	82.6	82.4	82.4	82.1	81.9	82.0	82.1	82.5	83.3	82.8	82.7	89.3	89.3	96.6	97.7	100	99.6
(23) <i>P. humi</i>	82.2	82.9	81.9	81.9	82.2	82.0	82.4	82.3	82.3	81.9	81.7	81.9	82.0	82.4	83.1	82.7	82.6	89.3	89.3	96.4	97.6	99.6	100

Tabla 16. Matriz de identidad de porcentajes de similitud generados por la comparación de pares de secuencias nucleotídicas de los genes concatenados (MLSA) relacionadas a especies del género *Pseudomonas*.

Cepa	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)
(1) I33	100	94.4	94.5	92.1	92.1	92.2	93.1	92.8	92.7	92.7	92.7	93.1	93.1	93.1	93.5	93.2	93.2	84.7	84.7	85.4	84.9	84.9	84.9
(2) <i>P. faucium</i>	94.4	100	95.0	93.3	93.4	93.4	94.1	93.7	93.6	93.6	93.6	94.4	94.4	94.4	94.9	94.5	94.5	85.5	85.6	86.3	85.8	86.0	85.9
(3) <i>P. ceruminis</i>	94.5	95.0	100	92.4	92.5	92.5	93.2	92.9	92.9	92.9	92.8	93.5	93.5	93.5	93.9	93.6	93.6	84.5	84.6	85.6	85.0	85.2	85.1
(4) C1J1	92.1	93.3	92.4	100	98.6	98.6	93.4	93.5	93.4	93.3	93.3	94.3	94.3	94.3	94.3	93.8	93.8	84.5	84.5	85.2	84.6	84.8	84.6
(5) Y1F	92.1	93.4	92.5	98.6	100	99.3	93.4	93.5	93.5	93.4	93.4	94.3	94.3	94.3	94.4	93.9	94.0	84.4	84.5	85.4	84.6	84.8	84.7
(6) <i>P. juntendi</i>	92.2	93.4	92.5	98.6	99.3	100	93.5	93.6	93.5	93.4	93.4	94.3	94.3	94.3	94.4	94.0	94.0	84.4	84.5	85.4	84.7	84.9	84.7
(7) <i>P. putida</i>	93.1	94.1	93.2	93.4	93.4	93.5	100	95.1	95.1	95.0	95.0	95.6	95.6	95.5	95.7	95.3	95.3	84.6	84.7	85.3	84.8	84.9	84.6
(8) <i>P. alloputida</i>	92.8	93.7	92.9	93.5	93.5	93.6	95.1	100	98.1	98.0	98.1	95.7	95.7	95.7	95.8	95.4	95.5	84.6	84.7	85.3	84.7	84.9	84.6
(9) Y1E	92.7	93.6	92.9	93.4	93.5	93.5	95.1	98.1	100	99.8	99.8	95.8	95.8	95.7	95.7	95.4	95.5	84.5	84.6	85.0	84.5	84.6	84.3
(10) S21	92.7	93.6	92.9	93.3	93.4	93.4	95.0	98.0	99.8	100	99.8	95.7	95.7	95.7	95.6	95.4	95.4	84.5	84.5	85.1	84.5	84.7	84.4
(11) M1C3	92.7	93.6	92.8	93.3	93.4	93.4	95.0	98.1	99.8	99.8	100	95.7	95.7	95.7	95.6	95.4	95.4	84.5	84.6	85.1	84.5	84.6	84.4
(12) N1A2	93.1	94.4	93.5	94.3	94.3	94.3	95.6	95.7	95.8	95.7	95.7	100	100	99.9	96.6	96.2	96.2	85.0	85.1	85.8	84.8	85.0	84.8
(13) C1G1	93.1	94.4	93.5	94.3	94.3	94.3	95.6	95.7	95.8	95.7	95.7	100	100	99.9	96.6	96.2	96.2	85.0	85.1	85.8	84.8	85.0	84.8
(14) <i>P. monteilii</i>	93.1	94.4	93.5	94.3	94.3	94.3	95.5	95.7	95.7	95.7	95.7	99.9	99.9	100	96.6	96.2	96.2	85.0	85.1	85.8	84.8	85.0	84.8
(15) I42	93.5	94.9	93.9	94.3	94.4	94.4	95.7	95.8	95.7	95.6	95.6	96.6	96.6	96.6	100	98.7	98.7	85.4	85.5	86.1	85.3	85.7	85.4
(16) I41	93.2	94.5	93.6	93.8	93.9	94.0	95.3	95.4	95.4	95.4	95.4	96.2	96.2	96.2	98.7	100	100	85.0	85.1	85.7	85.0	85.3	85.1
(17) <i>P. asiatica</i>	93.2	94.5	93.6	93.8	94.0	94.0	95.3	95.5	95.5	95.4	95.4	96.2	96.2	96.2	98.7	100	100	85.0	85.1	85.8	85.0	85.4	85.1
(18) EL22	84.7	85.5	84.5	84.5	84.4	84.4	84.6	84.6	84.5	84.5	84.5	85.0	85.0	85.0	85.4	85.0	85.0	100	99.7	91.0	90.8	90.9	91.0
(19) <i>P. aeruginosa</i>	84.7	85.6	84.6	84.5	84.5	84.5	84.7	84.7	84.6	84.5	84.6	85.1	85.1	85.1	85.5	85.1	85.1	99.7	100	91.1	90.9	90.9	91.0
(20) Y1H2	85.4	86.3	85.6	85.2	85.4	85.4	85.3	85.3	85.0	85.1	85.1	85.8	85.8	85.8	86.1	85.7	85.8	91.0	91.1	100	95.8	96.1	96.0
(21) <i>P. delhiensis</i>	84.9	85.8	85.0	84.6	84.6	84.7	84.8	84.7	84.5	84.5	84.5	84.8	84.8	84.8	85.3	85.0	85.0	90.8	90.9	95.8	100	97.7	97.8
(22) <i>P. citronnellolis</i>	84.9	86.0	85.2	84.8	84.8	84.9	84.9	84.9	84.6	84.7	84.6	85.0	85.0	85.0	85.7	85.3	85.4	90.9	90.9	96.1	97.7	100	99.0
(23) <i>P. humi</i>	84.9	85.9	85.1	84.6	84.7	84.7	84.6	84.6	84.3	84.4	84.4	84.8	84.8	84.8	85.4	85.1	85.1	91.0	91.0	96.0	97.8	99.0	100

Tabla 17. Matriz de identidad de porcentajes de similitud generados por la comparación de pares de secuencias nucleotídicas del gen *gyrB* relacionadas a Enterobacterias.

Cepa	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)
(1) <i>C.europaeus</i>	100	94.5	95.3	95.6	96.0	95.4	87.9	87.9	87.7	87.6	87.7	88.0	86.6	86.5	87.1	86.5	87.3	86.9	87.3	86.2	87.0	86.6	86.9
(2) <i>C.braakii</i>	94.5	100	95.2	96.1	95.9	95.3	89.3	89.5	89.4	89.4	89.3	89.6	88.0	87.7	88.3	87.6	88.3	87.8	87.6	87.5	88.3	87.9	88.0
(3) 4E	95.3	95.2	100	97.9	96.6	96.6	88.1	88.0	88.0	87.9	87.6	87.9	87.8	87.3	87.9	87.1	87.7	87.5	88.1	87.4	88.0	88.0	88.1
(4) <i>C.portucalensis</i>	95.6	96.1	97.9	100	96.6	96.9	88.8	89.0	88.6	88.6	88.5	88.8	88.4	88.0	88.8	88.0	88.7	88.5	88.8	88.3	89.0	88.7	88.8
(5) <i>C.freundii</i>	96.0	95.9	96.6	96.6	100	97.6	89.0	88.9	88.6	88.6	88.7	89.0	88.1	87.9	88.5	87.6	88.5	88.0	87.7	87.5	88.3	87.7	88.0
(6) N1A-1	95.4	95.3	96.6	96.9	97.6	100	89.0	88.9	88.5	88.5	88.4	88.7	88.5	87.9	88.8	88.0	88.7	88.5	87.7	88.3	88.7	88.3	88.6
(7) <i>E.fergusonii</i>	87.9	89.3	88.1	88.8	89.0	89.0	100	96.6	95.8	96.5	96.1	96.4	89.2	89.6	90.2	89.8	89.8	89.6	87.9	88.3	88.3	88.4	88.3
(8) <i>E.coli</i>	87.9	89.5	88.0	89.0	88.9	88.9	96.6	100	97.8	98.4	98.3	98.7	89.6	90.1	90.3	89.4	89.9	89.7	88.3	88.8	89.0	89.0	88.9
(9) <i>S.flexneri</i>	87.7	89.4	88.0	88.6	88.6	88.5	95.8	97.8	100	98.9	98.3	98.6	88.8	89.5	89.4	88.8	89.0	88.8	88.1	88.6	88.9	88.9	88.8
(10) <i>S.boydii</i>	87.6	89.4	87.9	88.6	88.6	88.5	96.5	98.4	98.9	100	99.2	99.5	89.0	89.9	89.7	89.4	89.6	89.4	88.4	88.8	88.9	88.9	88.8
(11) <i>S.sonnei</i>	87.7	89.3	87.6	88.5	88.7	88.4	96.1	98.3	98.3	99.2	100	99.6	88.9	90.1	89.6	89.4	89.7	89.5	88.3	88.6	88.7	88.6	88.5
(12) Y-01	88.0	89.6	87.9	88.8	89.0	88.7	96.4	98.7	98.6	99.5	99.6	100	89.3	90.3	90.0	89.7	90.0	89.8	88.5	88.8	88.9	89.0	88.9
(13) <i>E.bugandensis</i>	86.6	88.0	87.8	88.4	88.1	88.5	89.2	89.6	88.8	89.0	88.9	89.3	100	94.3	95.3	95.0	95.5	95.5	92.1	94.0	94.2	94.1	94.4
(14) <i>E.hormaechei. subsp. hoffmannii</i>	86.5	87.7	87.3	88.0	87.9	87.9	89.6	90.1	89.5	89.9	90.1	90.3	94.3	100	95.9	96.1	96.6	96.6	93.4	93.5	94.0	94.3	94.2
(15) Y1G1	87.1	88.3	87.9	88.8	88.5	88.8	90.2	90.3	89.4	89.7	89.6	90.0	95.3	95.9	100	96.9	97.4	97.4	92.6	93.0	93.3	93.4	93.6
(16) <i>E.hormaechei. subsp. hormaechei</i>	86.5	87.6	87.1	88.0	87.6	88.0	89.8	89.4	88.8	89.4	89.4	89.7	95.0	96.1	96.9	100	98.0	98.7	92.2	92.9	93.6	93.6	93.7
(17) <i>E.hormaechei. subsp. oharae</i>	87.3	88.3	87.7	88.7	88.5	88.7	89.8	89.9	89.0	89.6	89.7	90.0	95.5	96.6	97.4	98.0	100	99.0	92.7	93.2	93.7	93.9	93.8
(18) <i>E. hormaechei. subsp. xiangfangensis</i>	86.9	87.8	87.5	88.5	88.0	88.5	89.6	89.7	88.8	89.4	89.5	89.8	95.5	96.6	97.4	98.7	99.0	100	92.7	93.4	93.9	94.3	94.2
(19) <i>E. huaxiensis</i>	87.3	87.6	88.1	88.8	87.7	87.7	87.9	88.3	88.1	88.4	88.3	88.5	92.1	93.4	92.6	92.2	92.7	92.7	100	93.3	94.0	94.0	94.3
(20) <i>E. asburiae</i>	86.2	87.5	87.4	88.3	87.5	88.3	88.3	88.8	88.6	88.8	88.6	88.8	94.0	93.5	93.0	92.9	93.2	93.4	93.3	100	97.3	97.0	96.9
(21) <i>E.mori</i>	87.0	88.3	88.0	89.0	88.3	88.7	88.3	89.0	88.9	88.9	88.7	88.9	94.2	94.0	93.3	93.6	93.7	93.9	94.0	97.3	100	98.4	98.7
(22) I3-2	86.6	87.9	88.0	88.7	87.7	88.3	88.4	89.0	88.9	88.9	88.6	89.0	94.1	94.3	93.4	93.6	93.9	94.3	94.0	97.0	98.4	100	98.9
(23) S1-1	86.9	88.0	88.1	88.8	88.0	88.6	88.3	88.9	88.8	88.8	88.5	88.9	94.4	94.2	93.6	93.7	93.8	94.2	94.3	96.9	98.7	98.9	100

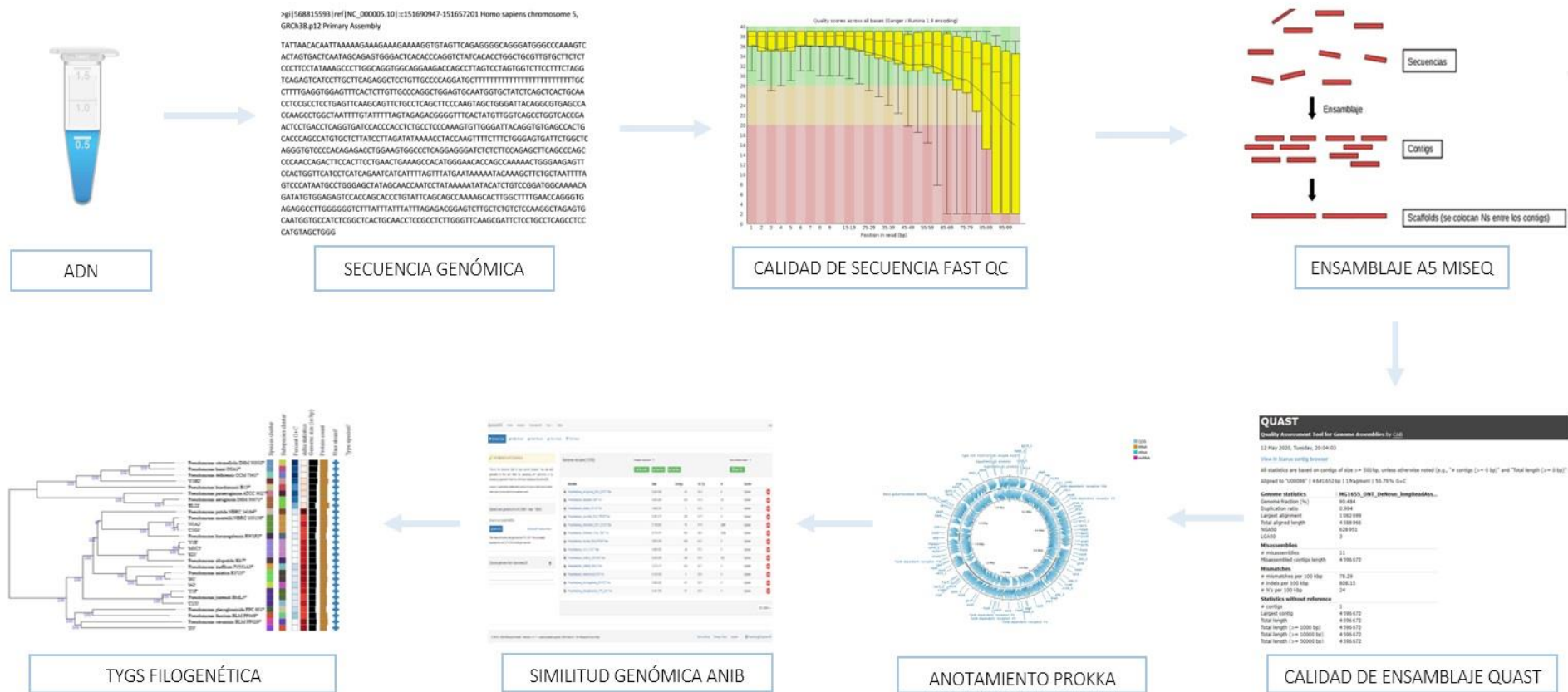


Figura 27. Flujo de trabajo del proceso de secuenciación y análisis de datos genómicos de cepas de *Pseudomonas* resistentes a mercurio.



Figura 28. Secuenciador genómico de próxima generación MiSeq Illumina.

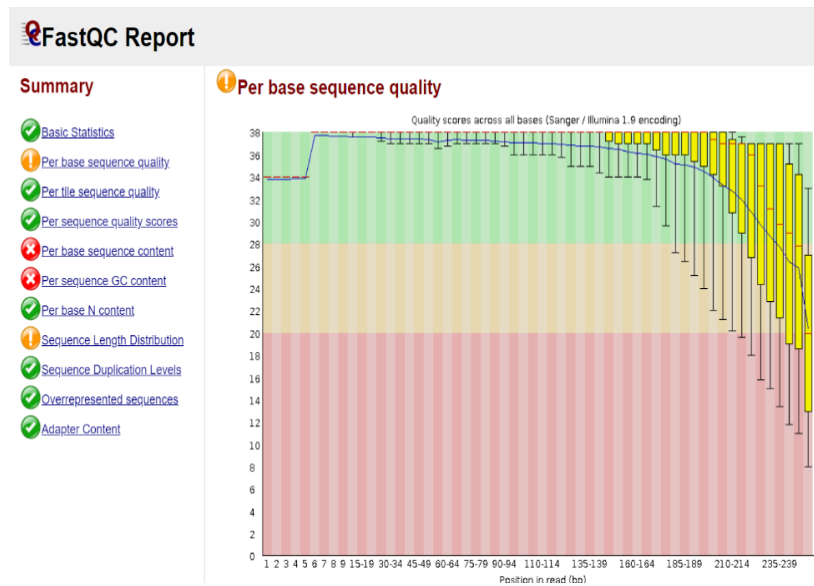


Figura 29. Interfaz del programa FastQC para ver la calidad de secuenciamiento genómico.

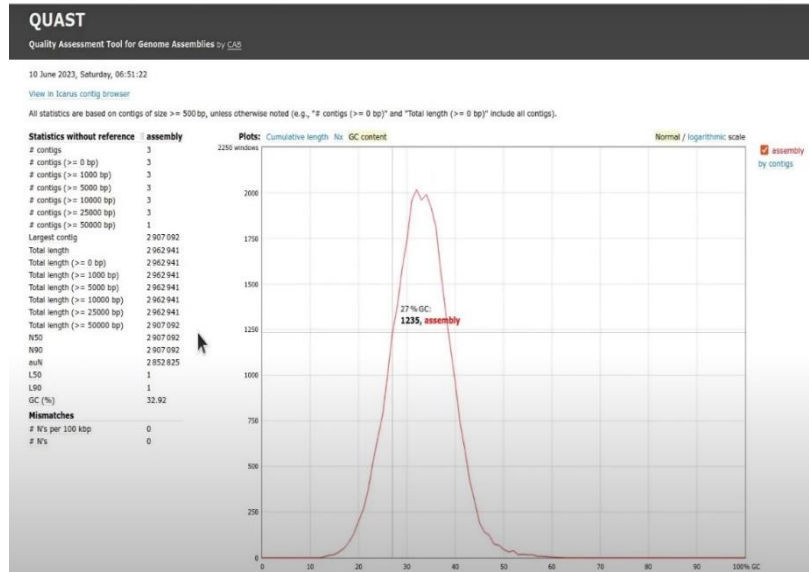


Figura 30. Interfaz del programa QUASt para observar calidad de ensamblaje genómico

#	A	B	C	D	E	F	G
locus_tag	type	length_bp	gene	EC_number	COG	product	
1	JLOGLDH_00001	CDS	1221	uctC_1	2.8.3.19		Acetyl-CoA:oxalate CoA-transferase
2	JLOGLDH_00002	CDS	1182	mmgC_1	1.3.99.-	COG1960	Acyl-CoA dehydrogenase
3	JLOGLDH_00003	CDS	906	gcmA_1			Glycine cleavage system transcriptional activator
4	JLOGLDH_00004	CDS	1122	pmtA	7.1.1.1	COG3288	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha part 1
5	JLOGLDH_00005	CDS	915	pmtA	7.1.1.1	COG3288	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha
6	JLOGLDH_00006	CDS	1437	pmtB	7.1.1.1	COG1282	NAD(P) transhydrogenase subunit beta
7	JLOGLDH_00007	CDS	1494	cat1	2.8.3.-	COG0427	Succinyl-CoA:coenzyme A transferase
8	JLOGLDH_00008	CDS	216				hypothetical protein
9	JLOGLDH_00009	CDS	318				hypothetical protein
10	JLOGLDH_00010	CDS	294				hypothetical protein
11	JLOGLDH_00011	CDS	321				hypothetical protein
12	JLOGLDH_00012	CDS	1956				hypothetical protein
13	JLOGLDH_00013	CDS	402				hypothetical protein
14	JLOGLDH_00014	CDS	1308	citN_1		COG2851	Citrate transporter
15	JLOGLDH_00015	CDS	771				hypothetical protein
16	JLOGLDH_00016	CDS	1059				hypothetical protein
17	JLOGLDH_00017	CDS	1407		3.4.24.-	COG0612	putative zinc protease
18	JLOGLDH_00018	CDS	1023				hypothetical protein
19	JLOGLDH_00019	CDS	1134				hypothetical protein
20	JLOGLDH_00020	CDS	792	mki		COG1127	putative ribonucleotide transport ATP-binding protein mki
21	JLOGLDH_00021	CDS	939				hypothetical protein
22	JLOGLDH_00022	CDS	636				hypothetical protein
23	JLOGLDH_00023	CDS	1230				hypothetical protein
24	JLOGLDH_00024	CDS	1329	gtpP		COG1301	Proton/glutamate-aspartate symporter
25	JLOGLDH_00025	CDS	471	lvy			inhibitor of vertebrate lysozyme
26	JLOGLDH_00026	CDS	162				hypothetical protein
27	JLOGLDH_00027	CDS	291				hypothetical protein
28	JLOGLDH_00028	CDS	822				hypothetical protein
29	JLOGLDH_00029	CDS	1347	algB		COG2204	Alginate biosynthesis transcriptional regulatory protein AlgB
30	JLOGLDH_00030	CDS	1782	kinB	2.7.13.3	COG5000	Alginate biosynthesis sensor protein KinB
31	JLOGLDH_00031	CDS	1605	pdeB_1	3.1.4.52	COG4943	putative cyclic di-GMP phosphodiesterase PdeB
32	JLOGLDH_00032	CDS	789	amiD	3.5.1.28	COG3023	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase AmiD
33	JLOGLDH_00033	CDS	1929				hypothetical protein
34	JLOGLDH_00034	CDS	855				hypothetical protein
35	JLOGLDH_00035	CDS	633	dsbA		COG0526	Thiol disulfide interchange protein DsbA
36	JLOGLDH_00036	CDS	618	ccd		COG2863	Cytochrome cd
37	JLOGLDH_00037	CDS	303				hypothetical protein
38	JLOGLDH_00038	CDS	633	engB		COG0218	putative GTP-binding protein EngB

Figura 31. Listado de genes generado por el anotamiento de genes mediante Prokka.

SpeciesWS Home Analyze GenomesDB Help News

Genome Cart ANI Result ANI Result Tetra Result TCS Result

01F9883A1C47C309F8C3

This is the Genome Cart of your current session. You can add genomes to this cart either by uploading your genomes or by choosing a genome from the reference database GenomesDB.

Upload own genome (min 0.02MB - max 15MB)

Genome as (multi)-FASTA

File Pseudomonas piezophilica FPC 9511.fna uploaded successfully at 5.274.632 kbitol per second

Choose genome from GenomesDB

Genomes included (13/30)

Favorite comparisons 7 Total correlation search 7

Genome	Size	Contigs	GC [%]	N	Source
Pseudomonas_aeruginosa_DSX_50211.fna	6,283,452	65	66.5	0	Upblast
Pseudomonas_altpaludis_K917.fna	5,903,485	426	61.9	36	Upblast
Pseudomonas_aeruginosa_RV107.fna	5,969,026	3	62.5	0	Upblast
Pseudomonas_corumensis_BLM_PP0287.fna	6,251,217	283	61.7	0	Upblast
Pseudomonas_stroehlii_DSX_50332.fna	7,196,503	76	67.5	2800	Upblast
Pseudomonas_kilhamensis_CCM_72617.fna	6,710,571	811	68.0	3264	Upblast
Pseudomonas_bacterium_BLM_PP0487.fna	5,923,263	666	64.2	0	Upblast
Pseudomonas_lumi_CCA17.fna	6,995,952	24	67.2	0	Upblast
Pseudomonas_inefficax_JV551A3.fna	6,240,038	246	62.8	125	Upblast
Pseudomonas_lutensis_BLM_3.fna	5,721,217	525	62.7	0	Upblast
Pseudomonas_aeruginosa_B137.fna	6,162,905	1	66.6	0	Upblast
Pseudomonas_aeruginosa_JV1121.fna	5,964,230	61	62.1	0	Upblast
Pseudomonas_piezophilica_FPC_9511.fna	5,341,766	97	63.0	0	Upblast

Cart action

© 2014 - 2014 Ribocoon GmbH - Version: 4.1.1 - Latest system update: 2023-Dec-21 - For Research Use Only

Terms of Use Privacy Policy Imprint Taxonomy@SpeciesWS

Figura 32. Interfaz de la herramienta ANI calculator para calcular la identidad promedio de nucleótidos genómicos en la página web Jspecies.

TYGS (STRAIN) GENOME SERVER

Submit your query News Examples Background FAQ Feedback API

Submit Your TYGS query

Tip #3 Did you know that there is usually a big difference between a type strain and some arbitrary reference strain? (see FAQ?)

Queries in queue 0 Queries done 44418 Queries done last 24h 415 Type strains in database 2098

Specify up to 50 genomes (via FASTA/GenBank files or GenBank accession IDs) or see FAQ on large uploads.

Choose archives: Ninguno archivo selec.

Add your GenBank accession numbers here.

Quick guide:

- 1) put all accessions of a specific genome in a single line.
- 2) accessions should be either separated by spaces or hyphens (in case of accession ranges).

Go to the FAQ for a detailed guide on how to specify accessions.

Restrict query to above data (genome files plus accessions?)

Optional: Add up to 10 manually selected type strains (is not normally needed as the TYGS already finds closely related strains)

Select up to ten OPTIONAL species

Figura 33. Interfaz del servidor de genomas de cepas tipo (TYGS) para los análisis filogenómicos.

Tabla 18. Características genómicas de 12 cepas de *Pseudomonas* resistentes a mercurio.

Cepa	Tamaño del genoma (pb)	Valor N50	Número de contigs	G+C contenido (%)	Genes	ARNt
C1-G1	6,005,978	141164	129	61.6	5501	71
C1-J1	5,568,852	31058	351	62.1	5244	78
EL2-2	5,387,378	56370	236	64.4	5432	65
I3-3	5,884,931	158084	86	61.6	5423	71
I4-1	6,083,510	50501	225	62.4	5620	77
I4-2	5,783,125	22395	498	63.3	5233	78
M1C-3	5,879,436	68230	195	61.4	5349	86
N1A-2	6,137,259	56000	223	61.5	5619	72
S2-1	5,933,297	61830	217	61.2	5460	79
Y1-E	5,944,363	75296	187	61.2	5461	81
Y1-F	5,519,384	56266	202	62.4	5166	77
Y1H-2	6,870,102	43394	287	67.2	6313	76

Fuente: programas QUAST y Prokka

