

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

---



---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
**CHIHUAHUA**

**COMPARACIÓN DE INTEGRONES Y GENES DE RESISTENCIA A  
ANTIBIÓTICOS EN BACTERIAS Y SEDIMENTOS DE UN SITIO  
CONSERVADO Y OTRO PERTURBADO DE UN MANGLAR DE BAJA  
CALIFORNIA SUR**

POR:

**STEPHANY GARCÍA MARTÍNEZ**

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

**CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO**

**JULIO DE 2021**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
CHIHUAHUA

Chihuahua, Chih., a 11 de agosto de 2021.

Oficio: 77/CA/SIP/21

**Dr. Ildebrando Pérez Reyes**  
Secretario de Investigación y Posgrado  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de Chihuahua  
**Presente:**

Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la tesis intitulada: **"COMPARACIÓN DE INTEGRONES Y GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN BACTERIAS Y SEDIMENTOS DE UN SITIO CONSERVADO Y OTRO PERTURBADO DE UN MANGLAR DE BAJA CALIFORNIA SUR"**, presentada por la estudiante **Q.B.P. Stephany García Martínez**, alumna del programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología.

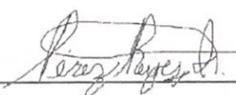
Después de la revisión, indicamos a la tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

**Atentamente**  
**"Por la ciencia para bien del hombre"**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Oskar Alejandro Palacios López**  
Asesor de tesis

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Jaime Raúl Adame Gallegos**  
Asesor de tesis

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Guadalupe Virginia Nevárez Moorillón**  
Directora de tesis

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Ildebrando Pérez Reyes**  
Secretario de Investigación y Posgrado



\*\*\*El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
Circuito Universitario  
Campus Universitario #2 C.P. 31125  
Tel. +52 (614) 236 6000  
Chihuahua, Chihuahua, México  
<http://www.fcq.uach.mx>

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Blanca Estela Rivera Chavira, por su apoyo y consejos que contribuyeron a mi formación. Porque nunca dejó de confiar en mí y exigir todo mi potencial, por ayudarme a descubrir de todo lo que soy capaz y sobre todo por las enseñanzas durante el desarrollo de mi proyecto

A mis asesores de tesis porque siempre tuvieron la disposición de guiarme y apoyarme; Dr. Jaime Raúl Adame Gallegos, Dra. Guadalupe Virginia Nevárez Moorillón y el Dr. Oskar Palacios López.

A mis compañeras de la maestría, Ilse Corral Durán y Arely Zapién Chavarría.

A la Lic. Alicia Lorena Soto Cueto por apoyarme en todo momento y ayudarme con mi crecimiento personal.

A la Universidad Autónoma de Chihuahua a través de la Facultad de Ciencias Químicas; al director Dr. Pedro Javier Martínez Ramos por todo el apoyo brindado.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), a mis compañeros de estancia, Larissa Gaxiola Beltrán, Valeria Monroy, a la Dra. Luz Estela González de Bashan, a la Dra. Blanca Estela Romero López, al Dr. Alfonso Medel Narváez, a la Dra. Getzabeth González, a la Dra. Bárbara González porque me recibieron con los brazos abiertos y en todo momento me hicieron sentir en casa. Nunca terminaré de agradecer lo que viví con ellos y lo que me enseñaron.

Y, por último, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por darme la oportunidad de desarrollarme como profesionista a través de sus programas y financiamiento durante estos dos años.

## DEDICATORIAS

A mi abuela †



## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	II
DEDICATORIAS .....	III
ÍNDICE DE TABLAS .....	VI
INDICE DE FIGURAS .....	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN .....	X
ABSTRACT .....	XI
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1 Generalidades de manglares.....	3
2.2 Distribución de manglares en México .....	3
2.3 Distribución y características de manglares de Baja California Sur .....	5
2.3.1 Bahía Magdalena.....	7
2.4 Programas de protección a los manglares.....	9
2.5 Impacto antropogénico .....	10
2.5.1 Resistencia a antibióticos .....	11
2.6 Genes de resistencia a antibióticos (ARGs) .....	13
2.7 Contexto genético y difusión ambiental de los ARGs .....	16
2.7.1 Resistencia a las sulfonamidas .....	16
2.7.2 Resistencia a betalactámicos .....	16
2.7.3 Resistencia a trimetoprima.....	17
2.7.4 Resistencia a las quinolonas.....	17
2.7.5 Resistencia a la tetraciclina.....	17
2.7.6 Resistencia a la vancomicina .....	18
2.7.7 Resistencia a los macrólidos.....	18
2.8 Integrones.....	18
2.9. Genes de resistencia a antibióticos en manglares.....	21
2.10 Factores que contribuyen a la dispersión de ARGs .....	23
3. JUSTIFICACIÓN .....	25
4. HIPÓTESIS .....	26
5. OBJETIVOS .....	27
5.1 Objetivo general.....	27



5.2 Objetivos particulares .....	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
6.1 Materiales .....	28
6.2 Equipo.....	28
6.3 Métodos .....	30
6.3.1. Áreas de estudio .....	30
6.3.2 Recolección de muestras de sedimentos.....	30
6.3.3 Aislamiento primario de cepas basado en el grado de tolerancia a la salinidad .....	31
6.3.4. Extracción de ADN de cepas bacterianas .....	32
6.3.5. Tinción de Gram.....	32
6.3.6. Extracción de ADN de sedimentos.....	32
6.3.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de diferentes genes. ....	33
6.3.8. Análisis estadístico .....	35
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
7.1.1 Descripción de las áreas de estudio .....	36
7.1.2 Puerto San Carlos “concheros” .....	36
7.1.3 San Carlos, Termoeléctrica .....	37
7.2 Resultados del muestreo .....	37
7.3 Selección de genes de resistencia a antibióticos.....	38
7.4 Abundancia de <i>int1</i> y ARGs en sedimentos de manglar en un sitio conservado y perturbado.....	39
7.5 Correlación entre la profundidad, grado de conservación, presencia de <i>int1</i> y ARGs en sedimentos de manglar. ....	48
7.6 Análisis de Componentes Principales de los Genes de Resistencia a Antibióticos y la profundidad, en sedimentos de manglares .....	51
7.7 Abundancia de Int y ARGs en bacterias de manglar en un sitio conservado y perturbado .....	52
7.8 Correlación entre la profundidad, grado de conservación y salinidad en la diseminación de Int 1 y ARGs en bacterias .....	57
7.9 Análisis de Componentes Principales de los Genes de Resistencia a Antibióticos y profundidad en bacterias .....	59
8. CONCLUSIONES.....	62
9. REFERENCIAS .....	63
10. ANEXOS .....	77



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencias de los primers y las condiciones de reacción.....	33
Tabla 2: Sitios muestreados.....	38
Tabla 3: Características microscópicas de las cepas bacterianas de sitio perturbado y conservado.....	38



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Principales áreas donde se encuentran manglares en Baja California Sur..	6
Figura 2. Manglares de Bahía Magdalena y Puerto San Carlos, Baja California Sur..	8
Figura 3. Rutas de migración de antibióticos y residuos al medio ambiente .....	13
Figura 4. Tres clases de integrones implicados en la mayoría de casos de diseminación de resistencia. (Rowe y Mazel, 2002) .....	19
Figura 5: Localización de los sitios de muestreo en Baja California Sur .....	30
Figura 6. Recolección de las muestras de sedimento .....	31
Figura 7. Mapa geográfico de los sitios de muestreo del sitio conservado .....	36
Figura 8. Mapa geográfico de los sitios de muestreo del sitio perturbado.....	37
Figura 9: Abundancia de los genes de resistencia: .....	41
Figura 10: Detección de genes <i>blaVIM</i> y <i>blaNDM</i> mediante PCR múltiple. ....	44
Figura 11: Genes productores de carbapenemasas en distintos reservorios ambientales.....	45
Figura 12: Correlograma de muestras de sedimento .....	49
Figura 13: Análisis de Componentes principales (PCA) de los genes de resistencia frente a la profundidad de las muestras de sedimento.....	52
Figura 14: Análisis de Componentes principales (PCA) de los genes de resistencia frente al sitio conservado y sitio perturbado de las muestras de sedimento .....	52
Figura 15: Abundancias de genes de resistencia en bacterias .....	54
Figura 16: Correlograma de muestras de bacterias .....	59
Figura 17: Análisis de Componentes principales (PCA) de los genes de resistencia frente a la profundidad de las bacterias .....	60
Figura 18: Análisis de Componentes principales (PCA) de los genes de resistencia frente al sitio conservado y sitio perturbado de las bacterias .....	61



## ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
Abs	Absorbancia
AmpC	Serín betalactamasas
ANP	Área Natural Protegida
ARB	Bacterias resistentes a antibióticos
ARGs	Genes de resistencia a antibióticos
attC	Sitio de recombinación del casete genético
attI	Sitio de recombinación proximal
BLEEs	$\beta$ -lactamasas de espectro extendido
CFE	Comisión Federal de Electricidad
cm	Centímetro
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
dfr	Dihidrofolato reductasa
dfrA1	Dihidrofolato reductasa codificada por Integrón
dsDNA	DNA bicatenario
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>ermA</i>	Gen de resistencia a la eritromicina tipo A.
<i>ermB</i>	Gen de resistencia a la eritromicina tipo B
GC1	Casete de genes clase 1
GC2	Casete de genes clase 2
GC3	Casete de genes clase 3
GTC	Tiocianato de guanidina
Ha	Hectárea
ICE	Elemento genético, conjugativo e integrado al cromosoma
incQ	Plásmidos del grupo de incompatibilidad de <i>Escherichia coli</i> Q
INECC	Instituto Nacional de Ecología
IntI	Gen integrasa
km <sup>2</sup>	Kilómetros cuadrados
MBL	Metallo- $\beta$ -lactamasas



mg	Miligramos
MGE	Elementos genéticos móviles
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
NDM	Metallo- $\beta$ -lactamasa de Nueva Delhi
nm	Nanómetro
Pc	Promotor
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PPT	Partes por trillón
<i>qacED1</i>	Gen de resistencia al amonio cuaternario
<i>qacE<math>\Delta</math>1</i>	Gen de resistencia antiséptica
<i>qnrA</i>	Genes de resistencia a las quinolonas clase A
<i>qnrB</i>	Genes de resistencia a las quinolonas clase B
<i>qnrS</i>	Genes de resistencia a las quinolonas clase S
<i>rpoB</i>	Gen universal en bacterias
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SMMN	Sistema de Monitoreo de Manglares de México
<i>sul1</i>	Gen de resistencia a la sulfonamida Clase 1
<i>sul2</i>	Gen de resistencia a la sulfonamida Clase 2
<i>sul3</i>	Gen de resistencia a la sulfonamida Clase 3
TM	Temperatura de fusión
Tn916	Transposones conjugativos
UABCS	Universidad Autónoma de Baja California Sur
UACH	Universidad Autónoma de Chihuahua
VIM	Metalobetalactamasas con codificación integrón de Verona
VRE	<i>Enterococos</i> resistentes a vancomicina



## RESUMEN

Los genes de resistencia a antibióticos (ARGs) son contaminantes emergentes que se encuentran presentes en diversos entornos ambientales, como en los manglares. Estos son ecosistemas que poseen características distintivas que hacen posible la presencia de comunidades microbianas particulares, como resultado de actividades antropogénicas. Los estudios sobre la presencia y dispersión de estos genes en los manglares son necesarios para poder evaluar el impacto de las actividades humanas en la integridad de dichos ecosistemas y la creación de estrategias para su conservación, así como estrategias de salud pública. Por lo tanto, este proyecto tiene como objetivo comparar la presencia de genes de resistencia a antibióticos e integrones, en bacterias y sedimentos de un sitio conservado y otro perturbado con 5 subsitios de cada uno, de un manglar de Baja California Sur, por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional (PCR).

Se examinó la presencia del integrón clase 1 (*int1*) y varios ARGs (*sul1*, *sul2*, *qnrS*, *blaCTX-M*, *blaKPC*, *blaVIM*, *blaNDM*, *tetA*, *vanA*) en 30 muestras de sedimento y en 113 cepas multirresistentes aisladas de los mismos sitios. La abundancia del gen *blaKPC* fue la más baja en sedimentos con porcentajes de 3% y 8% en sitio conservado y perturbado respectivamente y en cepas bacterianas con 0% en el sitio perturbado y 1% en el sitio conservado. En el caso de *int1* y de los ARG, *sul1*, *sul2* y *blaCTX-M* fueron los genes con mayor prevalencia en bacterias y sedimentos tanto en el sitio perturbado como conservado y además se encontraron presentes en los 5 subsitios de muestreo. El integrón se detectó en todos los subsitios de muestreo lo que demuestra que juega un papel muy importante en la diseminación de ARGs. El análisis de correlación mostró que la profundidad y la salinidad son de los factores más influyentes que intervienen en la distribución de ARGs y se observó una buena correlación entre la abundancia del *int1* y el gen *sul1*. Estos resultados demuestran que los ARGs desempeñan un papel importante bajo alto estrés selectivo en manglares impactados por actividades antropogénicas.

**Palabras clave:** Genes de resistencia a antibióticos; integrón; manglares; sedimentos; bacterias multirresistentes



## ABSTRACT

Antibiotic resistance genes (ARGs) are present in environmental settings such as mangroves and are considered emerging pollutants. These are ecosystems that possess distinctive characteristics that make possible the presence of particular microbial communities, as a result of anthropogenic activities. Such is the case of ARGs, as well as genetic elements such as integrons that help their dispersal towards human pathogens. The lack of studies on the presence and dispersal of these genes in mangroves is necessary to be able to evaluate the impact of human activities on the integrity of these ecosystems and the creation of strategies for their conservation and the preservation of public health. Therefore, this project aims to compare the presence of ARGs and integrons, in bacteria and sediments from a conserved site and another disturbed site with 5 subsites of each, from a mangrove swamp in Baja California Sur, by means of the Polymerase Chain Reaction conventional (PCR). The presence of the integron class 1 (*int1*) and several ARGs (*sul1*, *sul2*, *qnrS*, *blaCTX-M*, *blaKPC*, *blaVIM*, *blaNDM*, *tetA*, *vanA*) were examined in 30 sediments and in 113 multiresistant strains isolated from the same sites. The abundance of the *blaKPC* gene was the lowest in sediments with percentages of 3% and 8% in the conserved and disturbed site, respectively, and in bacterial strains with 0% in the disturbed site and 1% in the conserved site. In the case of *int1* and the ARGs, *sul1*, *sul2* and *blaCTX-M*, were the genes with the highest prevalence in bacteria and sediments both in the disturbed and conserved site and they were also present in the 5 sampling subsites. The integron was detected in all the sampling subsites, which shows that it plays a very important role in the spread of ARGs. The correlation analysis showed that depth and salinity are the most influential factors involved in the distribution of ARGs and a good correlation was observed between the abundance of *int1* and *sul1*. These results demonstrate ARGs play an important role under high selective stress in mangroves impacted by anthropogenic activities. This work provides a paradigm for the study of prevalence and ARGs dissemination in mangrove ecosystems.

**Keywords:** Antibiotic resistance genes; integron; mangrove; sediments; Multiresistant bacteria.



## 1. INTRODUCCIÓN

Con el descubrimiento de la penicilina contra enfermedades infecciosas, realizado por Alexander Fleming en 1928, se inició la era de los antibióticos. Desde entonces han surgido nuevos agentes terapéuticos que iniciaron un cambio para el tratamiento de enfermedades. Además, la disponibilidad de antibióticos permitió una mayor posibilidad para realizar diferentes tipos de intervenciones quirúrgicas. Sin embargo, se incrementó su uso y con ello la resistencia a antimicrobianos, por lo que actualmente existen bacterias resistentes a uno o más antibióticos. Este es un grave problema de salud pública en todo el mundo, se tiene estimado que alrededor de 700,000 personas mueren al año a causa de infecciones por microorganismos resistentes y se prevé que para el año 2050 habrá aproximadamente 10 millones de muertes al año (O'Neill, 2016). En México se ha reportado que el 40% de antibióticos vendidos son sin receta médica y que estos se liberan de manera directa o indirecta en aguas naturales lo que trae como consecuencia una mayor presencia de resistencia a antibióticos en ecosistemas acuáticos (INSP, 2020).

La presencia de antibióticos, bacterias resistentes o de elementos genéticos que confieren resistencia a los antibióticos es diferente en cada ecosistema, ya sea en plantas de tratamiento de aguas residuales (Munir et al., 2011), ríos, lagos, humedales artificiales, entre otros, donde unos no pueden eliminarlos mientras que otros sí. Durante los últimos años se ha señalado que las bacterias ambientales tienen capacidad para portar y adquirir genes de resistencia a antibióticos (Che et al., 2019). Se ha establecido que la presencia de resistencia a antimicrobianos y genes en ambientes previos al uso terapéutico de antibióticos. Debido a que existen diferentes comunidades de microorganismos en algún ambiente, y estos microorganismos producen antimicrobianos que matan a sus competidores. Por lo tanto, es natural que los organismos que producen antibióticos tengan mecanismos de auto resistencia contra sus propios antibióticos y que la coexistencia de bacterias productoras da lugar a una evolución conjunta de los mecanismos de resistencia en bacterias ambientales no productoras. Por ende, este problema ha tenido una mayor atención estos últimos



años, por el vínculo con la aparición de resistencias en aislados clínicos patógenos (Peterson y Kaur, 2018).

Los Genes de Resistencia a Antibióticos (ARGs) se diseminan gracias a la Transferencia Horizontal de Genes (HGT), donde se le ha prestado mayor atención en los manglares, que son ecosistemas altamente productivos, cuya importancia se refleja en los diversos servicios ambientales que proporcionan (Pico et al., 2011). En la actualidad se sabe que los manglares se encuentran entre los bosques tropicales más productivos del mundo, almacenando en promedio 1,023 mg de carbono por hectárea (Donato et al., 2011). Se ha demostrado que los microorganismos en sedimentos de estos ecosistemas desempeñan funciones esenciales relacionadas con fijación del nitrógeno y metabolismo del azufre. Sin embargo, estos ecosistemas pueden estar constantemente expuestos a descargas de aguas residuales domésticas o de actividades como la acuicultura, por lo que se consideran como reservorios potenciales de genes de resistencia (Su et al., 2014). Si bien existen algunas publicaciones de nuevos antibióticos que se producen de *Actinobacterias* en sedimentos de manglares, son pocos los estudios que hablan sobre la diseminación de ARGs en estos ecosistemas (Zhao et al., 2019).

La valoración de los servicios ambientales de los sistemas de manglar conlleva a su protección y a la suma de esfuerzos de diversas instancias para el mantenimiento y restauración de su integridad funcional. Esta situación pone de manifiesto la necesidad de contar con los indicadores adecuados del estado de los manglares, que faciliten la toma de decisiones oportuna y la disminución de costos de restauración.

Por lo tanto, en este trabajo, se analizó la presencia de integrones y genes de resistencia a antibióticos en cepas aisladas y en sedimentos de manglar con diferentes grados de afectación por urbanización en La Paz Baja California Sur, lo que proporcionará un nuevo enfoque de investigación para el análisis de prevalencia de ARGs en ecosistemas de manglar.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de manglares

Los manglares son una transición entre los ecosistemas terrestres y marinos, conociéndose como una zona intermareal, caracterizándose por su dinamismo y por la presencia de árboles tolerantes a diferentes concentraciones de salinidad. Estos se encuentran distribuidos en zonas intermareales de las costas tropicales y subtropicales. Están conformados por plantas de manglares, animales y de microorganismos que tienen gran importancia no solamente por el valor económico sino ecológico. Participan en la fijación y degradación de carbono, fijación de nitrógeno, metabolismo del azufre y estabilización de sedimentos entre otras características (Zhao et al., 2019). Proveen de beneficios ambientales como el control de inundaciones, protección contra huracanes, fuente de nutrientes para ecosistemas vecinos. Tienen además una alta productividad, en donde comunidades microbianas de los manglares juegan un papel muy importante y participan en el reciclaje de nutrientes (CONABIO 2020).

Los manglares son considerados uno de los ecosistemas más productivos del mundo (Cabral et al., 2016), cubren aproximadamente un área de 150,000 km<sup>2</sup>, se encuentran en 123 países, con 73 especies de plantas que se agrupan en 21 familias y 28 géneros, donde Australia e Indonesia reportan 40 y 45 especies respectivamente. Se ha reportado que Brasil cuenta con 8 especies mangle y México solamente con 3. Específicamente en el continente americano existen 4 tipos principales de mangle, el mangle blanco (*Laguncularia racemosa*), el mangle rojo (*Rhizophora mangle*), mangle negro (*Avicennia germinans*) y el mangle botón (*Conocarpus erectus*). La distribución de los manglares se encuentra influenciada por factores como temperatura, precipitación. En el sudeste asiático se encuentran los que presentan la mayor diversidad de especies (Lucas y Lugo, 2014).

### 2.2 Distribución de manglares en México

México es un país megadiverso, ubicado entre los primeros cinco lugares a nivel mundial. Es un país rico en cuanto a las especies vegetales y animales que representa casi tres cuartas partes de la diversidad mundial. Ocupa el cuarto lugar en el mundo



en superficie de manglar, representando un 6.7% de la extensión global de manglares y al 0.46% del territorio nacional (CONABIO, 2020).

En el territorio nacional estos ecosistemas se encuentran en el Atlántico y Pacífico, cubren el 60% de la línea costera nacional y algunos de ellos se encuentran en sitios de reservas ecológicas. En la región noroeste, se encuentra la cuenca del Golfo de California y la península de Baja California, donde las condiciones ecológicas son más limitativas que en el ambiente tropical, lo cual hace frágiles a las localidades. Esto se debe a que se localiza en el límite de su distribución en el litoral Pacífico nororiental (Cervantes et al., 2020).

Los manglares de México cubren una extensión de 7,755.55 km<sup>2</sup> y representan el 5.1% de los manglares del mundo, siendo reconocido junto con Indonesia, Brasil, Nigeria, Australia y Malasia quienes tienen mayor superficie de manglares, que en conjunto tienen 50% de la superficie mundial de manglares. Indonesia es quien tiene menor superficie territorial, pero tiene el 20.9% de los manglares del mundo, es decir, representa el 1.7% de su territorio. En Brasil representa solamente el 0.15% de su territorio, en Australia representa el 0.12% de su superficie y México cubre el 0.04% de dos millones de kilómetros cuadrados del total de territorio. A nivel nacional, Campeche es quien tiene una mayor superficie de manglar, seguido por Quintana Roo, Yucatán, Sinaloa y Nayarit. Quienes tienen una menor superficie son Michoacán, Jalisco y Baja California (Pico et al., 2011).

A nivel regional hay diferencias entre los manglares que se distribuyen desde el sur de Chiapas hasta Baja California, manglares del Golfo de México y el Caribe. Por ejemplo, en el estado de Tamaulipas puede estar presente solamente una especie de mangle y alcanzar alturas relativamente altas; mientras que en Veracruz predominan el mangle rojo, prieto y el blanco con una altura de hasta 30 metros (CONABIO, 2017).

Cabe mencionar que algunas especies se encuentran amenazadas debido a condiciones y factores ambientales negativos que ponen en riesgo su integridad. Debido a esto, Baja California Sur posee manglares considerados como humedales Ramsar (un tratado que funciona como marco para la acción nacional y cooperación



internacional en pro de la conservación y uso de los humedales) (CONABIO 2019). Es un estado en el que existen 11 sitios Ramsar (Breceda et al., 2016), aunque se han reconocido pocas especies de manglar en México, existe una gran variabilidad en cuanto a su composición, estructura y la función que juegan. Estas características dependen de aspectos como gradientes ambientales, relieve, tipo de sustrato, niveles de salinidad, actividades antropogénicas (CONABIO, 2020).

### **2.3 Distribución y características de manglares de Baja California Sur**

En la península de Baja California principalmente en la región sur, se encuentra la mayor extensión de manglar en zonas áridas. En las costas del municipio de Comondú se encuentran Llanos de Magdalena y el complejo lagunar Bahía Magdalena Almejas (Breceda et al., 2016). En la ensenada de La Paz se encuentra el manglar Mogote y el manglar Carretera Aeropuerto La Paz Cola de la Ballena-Marina Sur y en el Puerto de San Carlos se encuentra el manglar Bahía Magdalena (Figura 1).

En Bahía Magdalena en la costa del pacífico la península, se encuentran manglares robustos, y es un área denominada como este manglar tiene las características de ser Área Natural Protegida (ANP), que se encuentra cercano a la zona de producción de bivalvos. En Bahía Concepción se encuentra el manglar Santispac en la costa del Golfo, esta se encuentra asociada a las corrientes de agua dulce. El manglar de Balandra hasta hace unos años se consideraba el menos impactado por los visitantes, pero actualmente se encuentra amenazado. Al igual que el manglar de Zacatecas, que se caracteriza por ser un manglar no lagunar como el de Enfermería (CONABIO, 2020; Pico et al., 2011), pero que, debido una mala disposición de basura por parte de la población, ya se encuentra en peligro. En el caso de Enfermería el agua de la laguna se renueva durante periodos cortos con mareas vivas por lo que generalmente permanece lleno, sin descubrir el sedimento y esto ocasiona que no haya árboles y domine el mangle viejo. Ensenada de Aripes es un ejemplo de impacto por actividades humanas como lo es la tala. Así como estos existen el manglar Mogote el cual aparentemente se encuentra en una condición estable, pero con obstrucción del canal principal debido al arrastre de sedimentos provocados por el huracán Odile en 2014. Por último, está el manglar Cola de la Ballena el cual está

desarrollado y en condición estable, pero que durante décadas ha sido alimentado por descargas de aguas residuales (Lucas y Lugo, 2014).

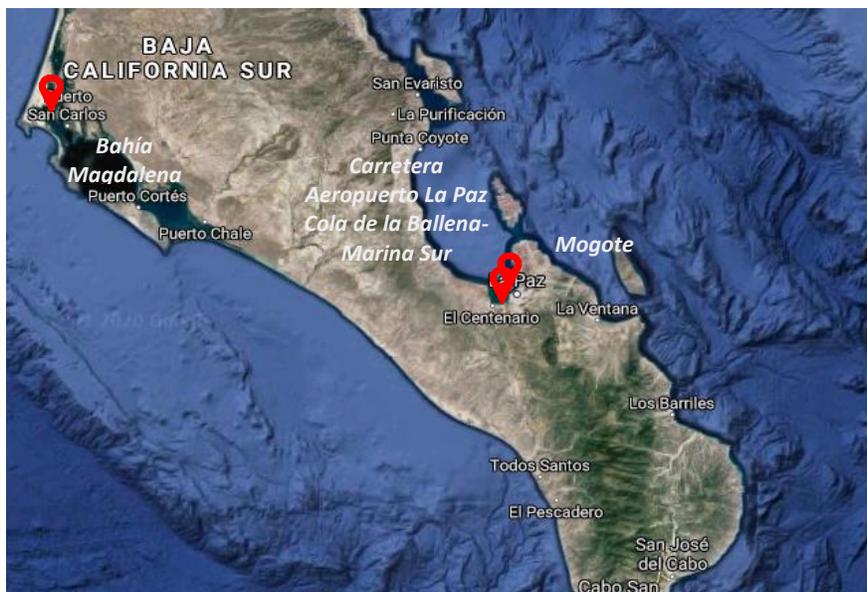


Figura 1: Principales áreas donde se encuentran manglares en Baja California Sur, Bahía Magdalena, Mogote y Carretera Aeropuerto La Paz Cola de la Ballena-Marina Sur (CONABIO, 2020).

De acuerdo con la Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO, 2020), en Baja California Sur se encuentran los manglares más excéntricos de México. Estos son manglares desérticos, tienen características que los hacen únicos, como una tasa de fijación de carbono superior a manglares de zonas tropicales, se desarrollan en masas fragmentadas de arbustos, además de tener en las raíces altas concentraciones de sal y poca disposición de nutrientes por la baja contribución de agua dulce.

Más del 50% de los manglares en México son costeros. Su superficie en el territorio nacional es de 51,610 km<sup>2</sup> y la deforestación de manglares genera 10% de las emisiones globales de carbono por año (SEMARNAT, 2016). Baja California Sur ocupa el noveno lugar nacional en cuanto a extensión de manglares con una superficie de 26,597 km<sup>2</sup> en el año 2015.

Estos manglares tienen menos cobertura que los de las zonas húmedas (Pico et al., 2011). Los sitios cobran gran importancia en la actualidad, debido a las



evidencias de la desaparición de las superficies que se ven afectadas de diversas maneras, ya sea por acciones destructivas como tala, o por fines recreativos o industriales. Estas actividades antropogénicas causan desequilibrios en diferentes ecosistemas, algunos de ellos pueden provocar cambios en la supervivencia y dispersión de patógenos, que impactan en la salud de plantas, animales y humanos.

Los manglares poseen características distintivas que hacen posible la presencia de comunidades microbianas específicas. El crecimiento poblacional, en particular en las regiones cercanas a los manglares, además de la acuicultura como la actividad primaria principal en Baja California Sur, han provocado un aumento en la carga de contaminantes, estableciéndose un ambiente adecuado para la sobrevivencia de microorganismos y propiciando el crecimiento de patógenos humanos (Aburto et al., 2008).

### **2.3.1 Bahía Magdalena**

El ecosistema costero de Bahía Magdalena se localiza en los municipios de La Paz y Comondú. Comprende 187,500 hectáreas y se encuentra a lo largo de la costa occidental del estado de Baja California (Figura 2). Es considerado un sitio Ramsar de importancia internacional, siendo un corredor biológico de aves, tiene 24 especies de aves (Breceda et al., 2016). Es bien conocida por la migración de la ballena gris, además de las actividades comerciales y deportivas como pesca. En Bahía Magdalena se encuentran el puerto pesquero de López Mateos, por lo que el 30% de la producción pesquera del país se encuentra en este lugar. Existen diversos elementos que hacen único a este sitio, a nivel global: debido a su gran cobertura se encuentra a una latitud cercana al límite norte de la distribución de manglar en el mundo. A nivel regional: los manglares de Bahía Magdalena son los de mayor extensión en el noroeste de México, es un sitio de refugio para las fragatas (*Fregata magnificens*) y aves como el águila calva (*Haliaeetus leucocephalus*) (WHSRN, 2009). Dentro de la iniciativa del Programa de Conservación Marina la cual tiene por objetivo determinar los espacios de especies que son de importancia comercial y ecológica, es uno de los sitios piloto. A nivel local es la bahía más grande con manglares. El 50% de las actividades pesqueras se

realizan en esta zona y proporciona una alta productividad por lo que es llamada la “Chesapeake del Pacífico” (Pico et al., 2011).

En cuanto a su importancia biológica, proporciona diversos servicios ambientales como protección de las poblaciones contra ciclones, contribuye a la producción de materia orgánica depositada en sedimentos. Existen especies endémicas como *Rhizophora mangle*, *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa* las que se encuentran bajo la categoría de especies amenazadas en la NOM-059-SEMARNAT-201027 (DOF, 2009). Dentro de los impactos directos se encuentra la tala del manglar, remoción del hábitat gracias al crecimiento urbano; en impactos indirectos se habla de contaminación por residuos pesqueros, desarrollo urbano, deterioro ambiental y cambios en patrones hidrológicos. También fenómenos naturales juegan un papel muy importante como fue la presencia del fenómeno “El Niño”. El complejo tiene condiciones antiestuarinas debido a una baja tasa de precipitación y debido al poco aporte de agua dulce. Es importante mencionar que las principales amenazas que afectan a esta zona son la explotación de recursos renovables y el crecimiento de asentamientos (CONABIO, 2020; Rodríguez, 2007).



Figura 2. Manglares de Bahía Magdalena y Puerto San Carlos, Baja California Sur (CONABIO, 2008).

Fotografía aérea panorámica.



## 2.4 Programas de protección a los manglares

Debido a la importancia de estos ecosistemas, se han implementado sistemas de monitoreo como la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (International Union for Conservation of Nature) o la Alianza Global de Manglares (Global Mangrove Alliance) (Adame et al., 2020). En México existe el Sistema de Monitoreo de Manglares de México (SMMN) (CONABIO, 2020), que tiene el objetivo de determinar el estado, deterioro o recuperación, así como identificar amenazas y prevenir los cambios en el manglar. Además, dirigir algunas líneas de acción a la protección de algunas especies amenazadas como, por ejemplo, *Rhizophora mangle*. Asimismo, se realizan trabajos en conjunto, ya sean de instituciones federales y estatales, donde se realizan evaluaciones de políticas públicas y del impacto que ha tenido en el ecosistema. De esta manera, se reportan las amenazas que tienen algunos manglares, como el caso reportado por la CONABIO en el Pacífico Norte, donde se produjo la pérdida de manglares debido a las granjas acuícolas.

Así como este, hay muchos efectos negativos de la actividad humana sobre los manglares, desde inundaciones en regiones costeras hasta contaminación ambiental. Esto afecta a la salud de la población aledaña a estos ecosistemas, por lo que para entender las consecuencias que se generan se deben evaluar y tomar medidas que permitan una valoración en diferentes periodos de tiempo. Por ende, desde 1991 se han realizado aportes para la restauración de los manglares de Baja California Sur, en donde se han determinado aspectos importantes con el objetivo de mantener el equilibrio de manglares áridos (Brenner et al., 2018). Particularmente en Bahía Magdalena se han realizado estrategias de conservación y restauración como el caso del establecimiento de un vivero temporal de manglares, reforestación, evaluación del crecimiento, además de implementar talleres sobre concientización ambiental. Además de otros proyectos donde ha participado el Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza, Centro Mexicano del Derecho ambiental, la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), con apoyo económico de la CONABIO (CONABIO, 2020). Cabe mencionar que a lo largo de las últimas décadas en nuestro país se incluyeron, en el marco jurídico de protección a manglares de la Norma Oficial Mexicana, cuatro de las seis especies de manglares, colocándolas como



“protección especial” y prohibiendo alterar la integralidad del ecosistema (CONABIO, 2017).

Aunque legalmente protegidos en México como humedales, actualmente están desapareciendo a una velocidad alarmante (Holguin et al., 2006). Una pérdida de manglares a escala regional tendrá efectos negativos tanto en la transferencia de nutrientes, como en la actividad pesquera costera y en la mitigación del cambio climático. Se ha determinado que la tasa de pérdida de superficie de manglar cada año, entre 1976 y 2000 fue de 2.5% (INECC, 2012). Se ha estimado que el país ha perdido aproximadamente 70,000 hectáreas de manglares, que eventualmente no solamente tendrá consecuencias negativas en el aspecto económico, sino ecológico (Holguin et al., 2006).

Por eso se han planteado varias medidas para su protección: una de las medidas para la recuperación y protección de manglares es el establecimiento de áreas protegidas. Existen 285 de estos sitios reconocidos internacionalmente, que poseen aproximadamente 41% de los manglares que existen en todo el mundo y que solo unos pocos están legalmente protegidos (Pico et al., 2011). Si no se llevan a cabo acciones de preservación, por las presiones y amenazas actuales, se estaría destruyendo a uno de los ecosistemas más importantes del planeta.

## **2.5 Impacto antropogénico**

A pesar de los programas de protección, la importancia social, ecológica y económica que representan los manglares, más de la mitad de la superficie de los manglares a nivel mundial se encuentran amenazados y en peligro de extinción. Por ello, la conservación y restauración se ha convertido en uno de los principales objetivos en varios países (Alatorre et al., 2016).

En las dos últimas décadas estos ecosistemas han sido expuestos y afectados negativamente (Cabral et al., 2016), por lo que están desapareciendo rápidamente por varios motivos, uno de ellos es que no hay vinculación de los procesos ecológicos y sus beneficios sociales, lo que ha originado la destrucción de algunos manglares. Las actividades antropogénicas pueden provocar desequilibrios en los ecosistemas,



causando un daño directo a la población, cambios en la supervivencia y dispersión de microorganismos patógenos (Aburto et al., 2008). También, los derrames accidentales de petróleo han llevado a que las comunidades microbianas que habitan en el suelo desarrollen mecanismos para adaptarse (CONABIO, 2017). Se ha reportado que el 35% de los manglares en todo el mundo, han sido destruidos y que muchos de ellos se ven afectados por distintas actividades humanas con fines económicos y agrícolas (Lucas y Lugo, 2014).

Existen indicadores microbiológicos de calidad del agua, que incluyen la identificación de microorganismos coliformes, algunos patógenos intestinales y también se ha propuesto la identificación de microorganismos resistentes a antimicrobianos (Kraemer et al., 2019). La presencia de microorganismos resistentes a antimicrobianos se ha utilizado como un indicador de urbanización, ya que la resistencia a antimicrobianos está relacionada con el uso excesivo de los mismos en actividades humanas, incluyendo en medicina, así como otras actividades productivas tales como la acuicultura. La dispersión de genes de resistencia a antibióticos al microbioma de ecosistemas impactados por la contaminación propicia la aparición de cepas patógenas multirresistentes, con el consecuente riesgo a la salud pública (Cabral et al., 2016).

### **2.5.1 Resistencia a antibióticos**

La disposición de desechos sólidos, contaminantes industriales, fertilizantes agrícolas, entre otras actividades humanas, afectan gravemente a los manglares generando, un incremento en la carga de contaminantes. En especial, las descargas de aguas residuales crean un nicho favorable para la sobrevivencia de microorganismos y propician el crecimiento de patógenos humanos (Hu, 2017). Los desechos depositados de los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales son una fuente importante de bacterias resistentes, genes de resistencia y antibióticos. El proceso que se lleva a cabo en las plantas de tratamiento de aguas residuales no logra la completa eliminación de las bacterias, ni están diseñadas para eliminar antibióticos y genes. Por ende, la resistencia a los antibióticos representa un serio problema de salud pública en constante incremento (Berendonk et al., 2015). De acuerdo con el número de



antibióticos a los que resisten, las bacterias se clasifican como monoresistentes cuando solo resisten a la acción de un antibiótico, multiresistentes cuando resisten a 3 o más grupos de antibióticos, extremadamente resistentes cuando se presenta resistencia a todos los antibióticos excepto a 2 grupos, y panresistentes cuando hay resistencia a todos los antibióticos existentes (Li et al., 2018). Hay dos tipos de resistencia, la primera se presenta de manera natural y la segunda es la adquirida la cual se debe a mutaciones o por la transferencia de genes de resistencia presentes en elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones o integrones (OMS, 2020; González et al., 2018). Por otra parte, las bacterias pueden poseer uno o más mecanismos para sobrevivir a la presencia del antibiótico, dentro de los que destacan: 1) la eliminación del antibiótico antes de que pueda ejercer su acción, 2) modificando el sitio de unión del antibiótico o, 3) alterando la permeabilidad de su membrana.

Otras fuentes de bacterias resistentes, genes de resistencia y/o antibióticos son la basura doméstica o drenaje, el uso de estiércol (el cual eventualmente a través de la lluvia y por escorrentía llega hasta los mantos acuíferos). De esta forma, se reporta la presencia de antibióticos en arroyos, lagos, ríos, mares, océanos, sedimentos y hasta en animales y plantas. Aunque se ha documentado que en el ambiente las concentraciones de antibióticos deben ser subletales, son concentraciones suficientes para promover la resistencia sin eliminar bacterias (Gullberg et al., 2011).

La presencia de microorganismos resistentes a antimicrobianos, tanto en humanos, medicina veterinaria, alimentos, control de plagas, la acuicultura, es un gran problema (Figura 3). Además, la dispersión de ARGs al microbioma de ecosistemas que se encuentran afectados por la contaminación, ocasiona la aparición de cepas patógenas multiresistentes que son un riesgo para la salud pública (FAO, 2017). De acuerdo con la OMS mueren aproximadamente cerca de 700,000 personas por infecciones relacionadas a infecciones por microorganismos resistentes por lo que se tienen que tomar medidas porque de no ser así, se estima que para el 2050 las muertes relacionadas con la resistencia antimicrobiana superarán las muertes por cáncer (OMS, 2020).

En el estudio realizado por Zhao y colaboradores (2019) reportan que en los sedimentos de manglar hay una disminución de genes de resistencia a antibióticos. Sin embargo, aún no se ha descrito los mecanismos por los que se eliminan los genes de resistencia y antibióticos.

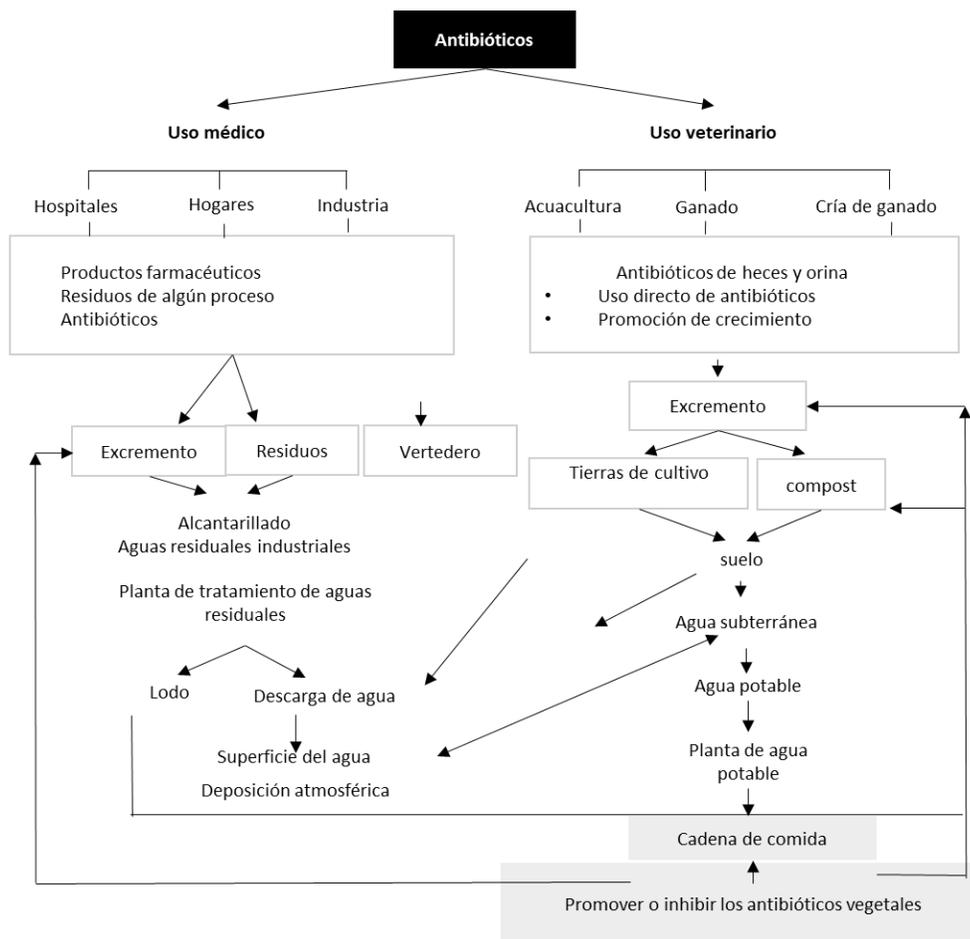


Figura 3. Rutas de migración de antibióticos y residuos al medio ambiente (Shao et al., 2018).

## 2.6 Genes de resistencia a antibióticos (ARGs)

Los ARGs como contaminantes emergentes, se han convertido en un problema de salud mundial (Rowe y Mazel, 2002) debido a la extensa aplicación de antibióticos en salud humana, veterinaria o en la agricultura. Esto ha generado la presencia de residuos de antibióticos, bacterias resistentes a antibióticos (ARB) y ARGs, en aguas residuales (Su et al., 2014), lagos de meseta y humedales artificiales entre otros ecosistemas (Zhao et al., 2019). Es importante mencionar que el 30% de los antibióticos que se producen, se aplican en la salud humana o se utilizan como



promotores de crecimiento (Pérez, 2018). Actualmente se ha puesto más atención al medio ambiente en la resistencia a antimicrobianos. En comunidades microbianas, hay bacterias que adquieren genes de resistencia que provienen de bacterias resistentes que llegan gracias a las actividades antropogénicas y lo que eventualmente ocurre es una presión selectiva.

La resistencia a antibióticos es un problema para la salud humana y animal en todo el mundo, por lo que se requieren tomar medidas para reducirlos, incluyendo la identificación de puntos de control, evaluación de riesgo de vigilancia, soluciones tecnológicas para prevenir la contaminación de bacterias resistentes y genes de resistencia y eventualmente al minimizar la evolución de ARGs preparar terreno para que los nuevos fármacos sean eficaces durante mucho más tiempo (Rowe y Mazel, 2002). Si bien, la mayor frecuencia de ARB y los mecanismos de resistencia a los antibióticos en el medio ambiente es llamado “contaminación por resistencia a los antibióticos”, son de especial importancia bacterias como *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA), *Enterococcus* resistentes a vancomicina (VRE) y *Escherichia coli* productora de beta-lactamasas de espectro extendido (Zhanel et al., 2008).

El uso indebido de antibióticos y la contaminación antibiótica es la causa de mayor frecuencia de bacterias que albergan ARGs en diferentes entornos. Se ha observado un aumento de genes de resistencia a los antibióticos en muestras ambientales, donde bacterias ambientales pueden adquirir genes de bacterias resistentes que llegan como consecuencia de las actividades antropogénicas. Las plantas de tratamiento de aguas residuales son una fuente potencial de bacterias resistentes, genes de resistencia y antibióticos. Durante el tratamiento aerobio de aguas residuales no se elimina por completo a las bacterias y no se eliminan los residuos de antibióticos. Existe evidencia de la presencia de antibióticos en arroyos, lagos, ríos, mares y océanos, sedimentos y que las concentraciones de antibióticos deben ser subletales para poder llevarse a cabo la resistencia, pero sin que se eliminen las bacterias (Alatorre et al., 2016; Pruden et al., 2006). Lo interesante es que además existen algunos vectores de transmisión desde puntos críticos de evolución de



resistencia a lugares prístinos, a través de transportes potenciales como aguas superficiales que son contaminadas por diversas fuentes antropogénicas, donde los perfiles de ARGs en ríos se encuentran afectados por la contaminación.

Otro vector de transmisión es el aire, que es donde se le ha puesto más atención debido al potencial de dispersión de ARGs y que gracias a ello, se presentan diversos riesgos para la salud asociados con la exposición de ARGs en el aire. Recientemente se realizó un estudio donde se detectó la presencia de 7 ARGs en el aire de todo el mundo, donde la abundancia de cada uno variaba mucho y con la presencia del smog se enriquecen aún más estos contaminantes emergentes (Li et al., 2018). Se menciona que los ARGs se encuentran asociados con una gran cantidad de bacterias que se adhieren a partículas del aire y que gracias al viento se dispersan. Diversas especies de *Pseudomonas*, que alojan resistencia a múltiples antibióticos se asocian con la precipitación y eventualmente pone en riesgo a trabajadores (Langelier et al., 2019).

Por último, se encuentran los vectores animales. Son ricos en nutrientes, por tanto, los ARGs modifican los antecedentes genéticos de estos vectores, lo que resulta en un reservorio de resistencia. Las personas que trabajan directamente con ganado desarrollan una mayor resistencia, aunque el riesgo es relativamente bajo (contacto directo) (Kraemer et al., 2019). Aún no se ha estudiado la prevalencia de ARGs de origen animal que se transfieren a patógenos humanos dentro de los microbiomas de personas que tienen contacto con animales (Bengtsson et al., 2015). También sería interesante evaluar el resistoma de los trabajadores de plantas de tratamiento de aguas residuales. Otros animales se consideran como potenciales vectores, incluyendo moscas domésticas, cucarachas, vertebrados, roedores y gaviotas, que portan *E. coli* con  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs), por un contacto previo con lugares contaminados. Resulta relevante considerar evaluar estos vectores, por la importancia y el riesgo que representan, ya que pueden ayudar en la multiplicación y recombinación de ARB y ARGs. Eventualmente, contribuyen a crear condiciones selectivas únicas, siendo fundamental para poder comprender el flujo de resistencia entre diversos ambientes (Tripathi y Cytryn, 2017).



Además, el uso no regularizado y la falta de programas para la disposición adecuada de antibióticos residuales ha provocado que estos lleguen al medio ambiente a través de efluentes de aguas residuales o bien, en la basura y así alcanzar los mantos freáticos, afectando a plantas y animales acuáticos. La presencia de antibióticos en el ambiente es una presión selectiva sobre las bacterias que lo habitan, por lo que para no ser afectadas por los mismos, las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia (Hoa et al., 2011). Por otra parte, el antibiótico administrado al paciente durante un tratamiento farmacológico es excretado en orina, y las plantas de tratamiento no eliminan estos antibióticos (Berendonk et al., 2015).

En cuanto a la presión selectiva, no solamente hay un incremento de ARB específicos, sino también de elementos genéticos móviles (MGE) y que eventualmente tienen ARGs lo que ocasiona que haya un aumento de comunidades bacterianas resistentes (Tripathi y Cytryn, 2017). Los genes de resistencia a antibióticos se han detectado en varios entornos de agua, por lo que la eliminación y reducción de los determinantes de resistencia a antibióticos son necesarios (Wen et al., 2016).

## **2.7 Contexto genético y difusión ambiental de los ARGs**

Los ARGs se encuentran en diversos ambientes acuáticos y su trascendencia depende del contexto genético de la información que contenga.

### **2.7.1 Resistencia a las sulfonamidas**

Los genes de resistencia a las sulfonamidas se encuentran ampliamente en el ambiente, específicamente *sul1* y *sul2*. *Sul1* se encuentra relacionado con los integrones clase 1, en cuanto a *sul2* se encuentra relacionado con los plásmidos del grupo *incQ*. En algunas investigaciones queda claro el importante papel que juegan, debido a que se le designó como un indicador de contaminación, encontrándose en aguas residuales, agua dulce, ríos y en manglares (Zhang et al., 2014; Chen et al., 2015; Zhao et al., 2019).

### **2.7.2 Resistencia a betalactámicos**

Son un amplio grupo de antibióticos que contienen un anillo  $\beta$ -lactámico en su estructura, se incluyen lo que son las cefalosporinas, monobactamas, penicilinas y



carbapenémicos. Estos son los más utilizados y por ende las bacterias han desarrollado resistencia contra estos antibióticos mediados por enzimas  $\beta$ -lactamasas (Zango et al., 2019). En bacterias Gram negativas la resistencia se origina principalmente por su frecuencia y eficacia. Los genes que codifican a las  $\beta$ -lactamasas se encuentran en el cromosoma bacteriano o en los plásmidos, las que son de mayor importancia clínica son BLEEs, las cefalosporinas de tipo AmpC y las carbapenemasas (Castellanos, 2014).

### **2.7.3 Resistencia a trimetoprima**

Estos genes de resistencia se encuentran como casetes en integrones clase 1. Por ejemplo, *dfrA1* se encuentra como un gen en integrones de clase 1 y 2. La predisposición de los genes *dfr* a transportarse en integrones facilitó su diseminación en el medio ambiente (Brolund et al., 2010).

### **2.7.4 Resistencia a las quinolonas**

Se han encontrado que genes de resistencia a la quinolona se encuentran en integrones de clase 1, lo que ocasiona que la resistencia sea un rasgo asociado con otros determinantes de resistencia que se transportan en el integrón. Se han aislado de varias fuentes ambientales estos genes, incluyendo lodos, lagos, ríos, pero *qnrB* se ha encontrado en aguas residuales. En cuanto a *qnrB* y *qnrS* se han encontrado en suelos mexicanos que previamente son tratados con aguas residuales. Se han encontrado *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* en humedales que se encuentran en la frontera de México-Estados Unidos (Berglund, 2015).

### **2.7.5 Resistencia a la tetraciclina**

La mayoría de los genes *tet* se encuentra en elementos genéticos móviles como los plásmidos y transposones. Algunos portan genes *tet* que son conjugativos y portan genes que codifican resistencia a otros compuestos. Esta gran diversidad y movilización de elementos móviles pueden contribuir en la diseminación entre distintos géneros bacterianos. Por ejemplo, en tratamientos de aguas residuales se ha encontrado *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetM*, *tetO*, *tetS* y *tetQ* (Berglund, 2015).



### 2.7.6 Resistencia a la vancomicina

El operón *vanA* codifica la resistencia a la vancomicina, se encuentra en Tn1546 y se cree que la diseminación del operón *vanB* es gracias a la diseminación de ICE iguales a TN916. Se han encontrado estos genes de resistencia a la vancomicina en aguas residuales, además en ríos y mares. Se ha sugerido que la resistencia a la vancomicina se encuentra presente desde hace muchos años (Berglund, 2015).

### 2.7.7 Resistencia a los macrólidos

Se relaciona con diversos elementos genéticos móviles como los ICE que se localizan en plásmidos y transposones. Se han encontrado en diversos ambientes, sobre todo *ermA* y *ermB* (Berglund, 2015), *ermB* es la más extendida de las resistencias a macrólidos y se relaciona con otros determinantes de resistencia.

## 2.8 Integrones

La acumulación de genes de resistencia a menudo se relaciona con la presencia de integrones, que son estructuras genéticas móviles que actúan como sistemas naturales de captura de genes. Pueden integrar casetes genéticos individuales como los genes de resistencia. La combinación de diferentes genes de resistencia en un solo integrón puede dirigir a patrones complejos de selección cruzada (Kraemer et al., 2019). Los integrones están formados por un gen integrasa (*intI*) y un sitio de recombinación proximal (*attI*). A partir de secuencias de aminoácidos de *intI* se dividen distintas clases de integrones, clase 1, 2, 3, 4, 5, y 6. Sin embargo, las más estudiadas son los integrones clase 1, 2 y 3 (Figura 4) debido a que son las más implicadas en la diseminación de resistencia. Los integrones clase 1 son los más estudiados y caracterizados, por su alta distribución y debido a que se encuentra en entornos hospitalarios (Che et al., 2019). Lo que caracteriza a esta clase es que tienen un segmento conservado en el extremo 3', que es donde se encuentran los genes *qacED1* y *sul1* que codifican resistencia a sulfonamidas y a compuestos cuaternarios. Los integrones clase 2 se ubican en la familia Tn7 de los transposones, estos se caracterizan porque tienen tres casetes genéticos como *dhfrI*, *sat*, *aadA1* que confieren resistencia a trimetoprima, estreptomicina y espectinomicina. Por último, el integrón clase 3 codifica la integrasa *intI3*, la cual se ha observado únicamente en plásmidos

(Akrami et al., 2019). La recombinación catalizada por *IntI* entre *sitios attI* y/o *attC* da como resultado la inserción o escisión de casetes que otorgan resistencia a gran cantidad de antibióticos (Deng et al., 2015).

Se ha reportado que en cepas hospitalarias multirresistentes de enterobacterias portan genes que le confieren resistencia al cloranfenicol, estreptomina o la espectinomina en el integrón, pero estos antibióticos no se habían utilizado en los hospitales durante muchos años. Otra característica importante de estos elementos genéticos es que combinan ARGs y genes que se encuentran implicados en la desintoxicación de metales pesados lo que resulta en una co-selección (Rowe y Mazel, 2002; Deng et al., 2015).

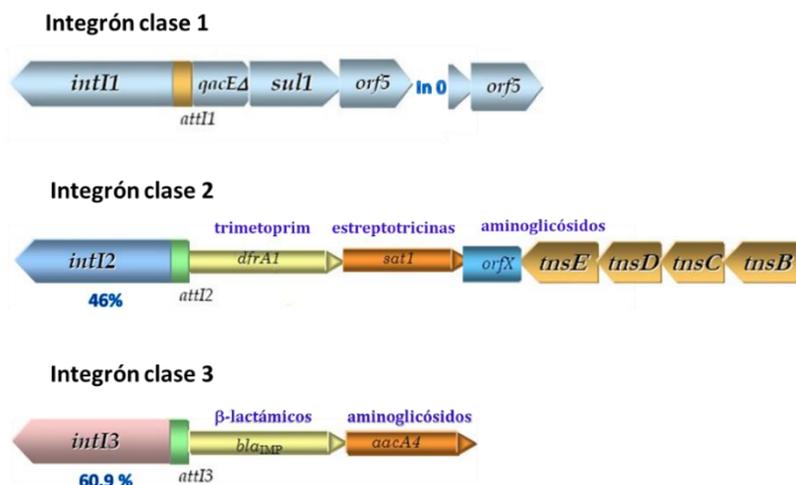


Figura 4. Tres clases de integrones implicados en la mayoría de casos de diseminación de resistencia. (Rowe y Mazel, 2002)

Los integrones son sistemas de recombinación que actúan de manera determinada y son responsables del reconocimiento de casetes de resistencia. Estos forman parte de transposones y plásmidos y contienen genes de resistencia a antibióticos (Akrami et al., 2019). Además, funcionan como una base de evolución bacteriana, intercambio de genes entre el resistoma del medio ambiente y de especies comensales y patógenas. El examinar la relación que tiene el integrón *int1* y los ARGs permite dilucidar cual es el papel que juegan los integrones en la propagación de ARGs en el medio ambiente (Rowe y Mazel, 2002).



Durante los últimos años se ha demostrado que las bacterias ambientales poseen también las capacidades para portar, adquirir y diseminar ARGs, por lo cual adquieren gran importancia no solo en el estudio de la transferencia genética en el ambiente, sino en el área clínica humana, en la veterinaria y en la agricultura. Además, hay que tener presente que muchos de los microorganismos que se encuentran en la naturaleza producen antimicrobianos (Adame et al., 2020) . Estos microorganismos deben ser resistentes a los antimicrobianos que ellos mismos producen y los genes que otorgan esta característica pueden ser transferidos a microorganismos no resistentes: problema que se agudiza por la presencia de antibióticos en el ambiente, que puede proporcionar una presión selectiva a largo plazo para la aparición y transmisión de genes de resistencia a organismos que no los producen (Rowe y Mazel, 2002).

Estos elementos genéticos móviles son importantes y ya se ha estudiado mucho acerca de ellos (Akrami et al., 2019), pero en los últimos años se le ha prestado más atención a los integrones pues ellos pueden ser portados en transposones y plásmidos por lo que es de suma importancia revisar su estructura, función e importancia. En varios estudios realizados se ha reportado la estrecha relación de integrones clase 1 con varios genes de resistencia en especial *sul1* y *sul2*, en entornos como humedales y manglares (Chen et al., 2015; Li et al., 2016; Zhao et al., 2019). No solamente en ecosistemas de manglar, sino que se ha estudiado sobre todo en ríos y lagos donde queda demostrado el papel clave que desempeña en la difusión de ARGs y que además tiene una relación mucho más fuerte con el gen *sul1* en la región conservada del integrón clase 1 (Zhang et al., 2014). Se reportó recientemente que en algunos humedales se encontraban los integrones de clase 1 y 2 en el 72% y 11.4% de 79 bacterias de humedales con cinco juegos de casetes de genes que se encuentran en alrededor del 59.6% de los integrones clase 1 y que es muy poco probable detectar casete génico en los integrones clase 2 (Adelowo et al., 2018).

Por estas razones se ha propuesto como un indicador de contaminación por ARGs la presencia de los genes de integrasa y de resistencia a sulfonamida en integrones de clase 1 en bacterias resistentes a antibióticos que por lo tanto podrían



estar relacionados con la transferencia horizontal y la propagación de resistencia en reservorios ambientales (Chen et al., 2015). Además, es fundamental que cuando se investiga la resistencia a los antibióticos en el ambiente, se examinen otros genes de resistencia que se encuentran asociados con integrones (Adelowo et al., 2018).

## **2.9. Genes de resistencia a antibióticos en manglares**

En las regulaciones actuales no se presta la atención suficiente para la protección de humedales de manglares, estos se encuentran constantemente expuestos a contaminación de diversas fuentes, lo que ocasiona que los manglares sean reservorios potenciales de ARB que transportan ARGs que se transmiten a otras bacterias (Adelowo et al., 2018).

Es importante mencionar que la presencia de ARB, o de elementos génicos, puede variar en diferentes ecosistemas, pero los manglares pueden ser sitios de acumulación de antibióticos y bacterias resistentes. En una investigación realizada por Zhao y colaboradores (2019) se estudió la diversidad de genes de resistencia en un estuario donde había áreas de manglar y lugares donde no existía la presencia de manglares y se reportó un total de 163 ARGs. Además, se estudió el tipo de resistencia, mecanismos de resistencia y se demostró que las propiedades del sedimento juegan el papel más importante para la distribución gracias a varios factores como el pH, metales pesados, carbono orgánico total y arsénico. Estos eran mucho más altos en las áreas con manglar, en el caso de los metales, pueden compartir ciertos mecanismos con la resistencia a antibióticos y en específico, el carbono orgánico total y el pH afectan a los ARGs dependiendo del entorno ambiental específico. El factor menos influyente era la comunidad microbiana y concluyeron que los manglares reducían la acumulación de residuos de antibióticos y ARGs (Zhao et al., 2019).

Existen diversas investigaciones que hablan sobre la abundancia y distribución de los genes de resistencia en diversos entornos acuáticos, donde se demuestra el papel que juegan los ARGs en el medio ambiente (Gullberg et al., 2011; Hu et al., 2017; Tripathi y Cytryn, 2017; Zhao et al., 2019). Un ejemplo es el que realizó Chen y colaboradores (2015), en un estuario del río Pearl en China, donde se medían varios



genes de resistencia *sul1*, *sul2*, *sul3*, *qnrS* y *ermB*, Los resultados mostraron que los genes *sul1* y *sul2* se encontraban en todas las muestras tanto de agua como de sedimento, pero estas disminuían su concentración constante con el impacto antropogénico. También se han detectado en varios entornos como lagos, escalas de captación y ríos. Por esta razón, no solo es importante evaluar la dinámica y diseminación de los ARGs en el medio ambiente, sino también aquellos que se originan en pacientes. Se reconoce que existe una asociación entre ARGs y ARB humanas y de animales, pero no se comprende mucho con respecto a la adquisición de ARGs del medio ambiente en general, se ha descrito que ecosistemas acuáticos y terrestres adquieren ARGs de fuentes antropogénicas que albergan diversos ARGs nativos. Aunque sea difícil estimar la relevancia epidemiológica de este fenómeno, gracias a la complejidad de microbiomas ambientales (Tripathi y Cytryn, 2017).

En el caso de los manglares, se consideran como un biofiltro a las plantas de tratamiento de aguas residuales por su capacidad de eliminar y tolerar la contaminación (Zhao et al., 2019). Sin embargo, no se han hecho investigaciones sobre su potencial para eliminar las ARGs y son pocas las investigaciones que hablan sobre el destino que tienen los ARGs en manglares (Li et al., 2016; Zhao et al., 2019; Wallace et al., 2019; Imchen y Kumavath, 2021). Se ha demostrado que estos ecosistemas las plantas de mangle reducen la acumulación de residuos de antibióticos (Li et al., 2016).

La distribución y propagación de genes de resistencia a fármacos en manglares son importantes desde el punto de vista de la transferencia génica y salud pública (Hoa, et al., 2008). Las ARB tienen la capacidad de propagar los genes de resistencia a otras bacterias de su mismo o diferentes géneros y especies.

La transferencia de ARGs entre bacterias puede darse por medio de un puente entre los citoplasmas de las bacterias por donde pasan los genes de resistencia que se encuentran en plásmidos conjugativo, de una bacteria donadora a la receptora lo que sería la conjugación (Kraemer et al., 2019). Otra forma en la toma de ADN del ambiente lo que sería la transformación y finalmente a través de virus que infectan bacterias y portan genes de resistencia a antibióticos. Finalmente, a través de la



transducción cuando los fagos introducen su genoma en la célula huésped luego lo insertan en el cromosoma bacteriano. Otros elementos genéticos móviles son los transposones, que son secuencias de ADN que migran entre plásmidos y cromosomas y estos tienen la capacidad de llevar genes de resistencia. Los plásmidos son dsDNA circulares extracromosómicos, estos alojan genes que codifican toxinas, productos metabólicos, factores de virulencia y resistencia a antibióticos y metales pesados, estos facilitan la transferencia horizontal de genes (HGT), por lo que se convierten en impulsores de resistencia a antibióticos (Tripathi y Cytryn, 2017; Akrami et al., 2019). Existen también los integrones, quienes juegan un papel importante en la resistencia a múltiples antibióticos y da origen a las llamadas “superbacterias” (Akrami et al., 2019).

## **2.10 Factores que contribuyen a la dispersión de ARGs**

Los antimicrobianos utilizados tanto en la industria ganadera como en la medicina y los residuos de éstos, al igual que metales pesados derivados de sus aplicaciones se consideran como las presiones selectivas sobre los ARGs. Sin embargo, estas presiones selectivas no pueden explicar completamente la ocurrencia generalizada de ARGs en ambientes con un mínimo de perturbación (Ohore et al., 2020).

Se sabe que la resistencia a antimicrobianos ha estado siempre, antes de la era de los antibióticos, por lo que se considera que existen factores ambientales, ya sean bióticos o abióticos que contribuyen a su mantenimiento y proliferación en ecosistemas como manglares (Liu et al., 2018). Por eso es muy importante comprender estos factores que impulsan la resistencia para poder tener un mejor entendimiento y desarrollar estrategias de manejo. Se encuentra muy bien documentado el papel de los metales pesados (Cabral et al., 2016; Tan et al., 2019; Ohore et al., 2020) pero se tiene muy poco estudiado otros factores ambientales en cuanto a los perfiles de ARGs. Existe evidencia de que las alteraciones en las concentraciones del suelo, pH, entre otros nutrientes participan activamente en la presión selectiva sobre la evolución de la comunidad microbiana (Mavi et al., 2012).

Un microorganismo no puede desarrollar una resistencia independiente de cada estrés que se presenta, por lo que se requiere realizarse varios mecanismos en cuenta



a material genético y producción de proteínas y estas bacterias tienen que evolucionar frente a distintos tipos de estrés (Shen, 2020). Los entornos del suelo de océanos donde hay presencia de actividades humanas es una matriz importante en cuanto al resistoma ambiental y humano. Aun así, el estudio de los perfiles de genes de resistencia ha sido poco estudiado, este se caracteriza por su alta salinidad, este factor se ha demostrado que influye en la estructura de la comunidad microbiana (Chen et al., 2017).

Esta acumulación de sal en los sedimentos es gracias a una fuerte evaporación que ocurre en la superficie y en la estación seca. Si bien se han hecho algunos estudios sobre la salinidad en sedimentos de manglar y otros ecosistemas, este aún no está del todo claro sobre todo en las profundidades. Pero se ha demostrado que la salinidad como estrés reforma la distribución de ARGs y por ende su diseminación en entornos acuáticos (Tan et al., 2019).



### 3. JUSTIFICACIÓN

Las actividades antropogénicas que involucran el uso de antibióticos para la salud humana y animal, así como su aplicación en la agricultura y la industria alimentaria, entre otras, han provocado que las bacterias desarrollen resistencia a estos. Cuando estas bacterias y/o sus genes de resistencia llegan al medio ambiente, también encuentran un nicho en el que la contaminación por antibióticos ejerce la presión selectiva suficiente para que la resistencia persista y los genes de resistencia puedan diseminarse entre bacterias, incluso ambientales, complicando aún más la situación. La presencia de genes de resistencia a antibióticos y sus unidades de dispersión, no sólo representan riesgos importantes para la salud humana, sino para diversos ecosistemas, como es el caso de los manglares, en los que se ha visto comprometida su integridad.

Para poder evaluar el impacto que tiene la presencia de ARGs y sus unidades de dispersión en ecosistemas como los manglares, es necesario realizar la caracterización previa de dichos determinantes genéticos. Con base en lo anterior, este estudio pretende servir de base para futuras investigaciones sobre los genes de resistencia a antibióticos presentes en los manglares de Baja California Sur.



#### **4. HIPÓTESIS**

Los sedimentos y bacterias de un manglar de Baja California Sur con diferentes grados de afectación por urbanización contienen genes de resistencia a antibióticos e integrones.



## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Comparar la presencia de genes de resistencia a antibióticos e integrones, en bacterias y sedimentos de un sitio conservado y otro perturbado de un manglar de Baja California Sur.

### 5.2 Objetivos particulares

- Determinar la presencia de integrones en las bacterias y en los sedimentos.
- Identificar los genes de resistencia a antibióticos en bacterias y en los sedimentos.
- Comparar las características de las bacterias y sedimentos de los sitios conservados y perturbados.
- Establecer la relación entre genes de resistencia y factores abióticos como la salinidad y la profundidad en bacterias.
- Establecer los perfiles de genes de resistencia a antibióticos, en bacterias y sedimentos de un sitio perturbado y otro conservado de un manglar de Baja California Sur.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Materiales

- Muestras de sedimento de manglar
- Cepas control: *E. coli* 37 Hz, *E. coli* 22 Hc, *E. coli* 61 HC, *E. coli* 2 HZ y la cepa 29 (1.5% NaCl) proveniente de un sitio perturbado.
- Oligonucleótidos: *int1*, *tetA*, *sul1*, *sul2*, *qnrS*, *blaCTX-M*, *blaKPC*, *blaVIM*, *blaNDM*, *vanA*. (Oligo T4).
- Agar TSA (Trypticasína soya agar)
- Solución salina
- Reactivos para tinción de Gram
- dNTPs (Promega)
- Cloruro de magnesio (Promega)
- Buffer PCR (5X) (Promega)
- kit FastDNA SPIN para suelo (MP Biomedicals)
- Kit ZymoBIOMIC DNA miniprep (Zymo research)
- Kit NucleoSpin® TriPrep (Macherey-Nagel)
- Agarosa (Promega)
- Tiocianato de Guanidina 4 M (Life technologies)
- TAE 1X
- Etanol absoluto (Sigma)
- Etanol 70%
- DNA  $\lambda$  Hind III 0.51  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Invitrogen)
- 100 bp ladder (Promega)
- Syber safe DNA gel stain (Thermo Fisher Scientific)
- Bromuro de etidio 1X
- $\beta$ - mercaptoetanol
- Lisozima (Sigma)

### 6.2 Equipo

- Centrifuga refrigerada (GenFuge, Progen, UK)



- Microcentrífuga (Eppendorf 5804 R)
- Autoclave (Barnstead International)
- Balanza analítica (Denver Instrument XP-600)
- Congelador Isotemp de -20°C (Fischer Scientific)
- Cámara de electroforesis (RunOne Electrophoresis cell, CA, USA).
- Termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, UK)
- Fotodocumentador (Kodak)
- Vórtex (Sigma aldrich)
- Campana (Thermo Fisher)
- Microscopio óptico (Olympus CX32)
- Potenciómetro (Hanna instrument, 209, México)
- Espectrómetro (BioSpectrometer basic, SW-Version: 4.2.3.0)

## 6.3 Métodos

### 6.3.1. Áreas de estudio

Dos sitios de manglares diferentes en Bahía Magdalena, Baja California Sur ( $24^{\circ}35'00''\text{N } 112^{\circ}00'00''\text{O}$ ) fueron seleccionados para el muestreo de sedimentos en función del nivel de contaminación. El primer sitio fue un área altamente impactada por efluentes de contaminantes cerca de la CFE considerado sitio perturbado, el segundo sitio de muestreo, ubicado en el puerto San Carlos, considerado como un sitio conservado (Figura 5).

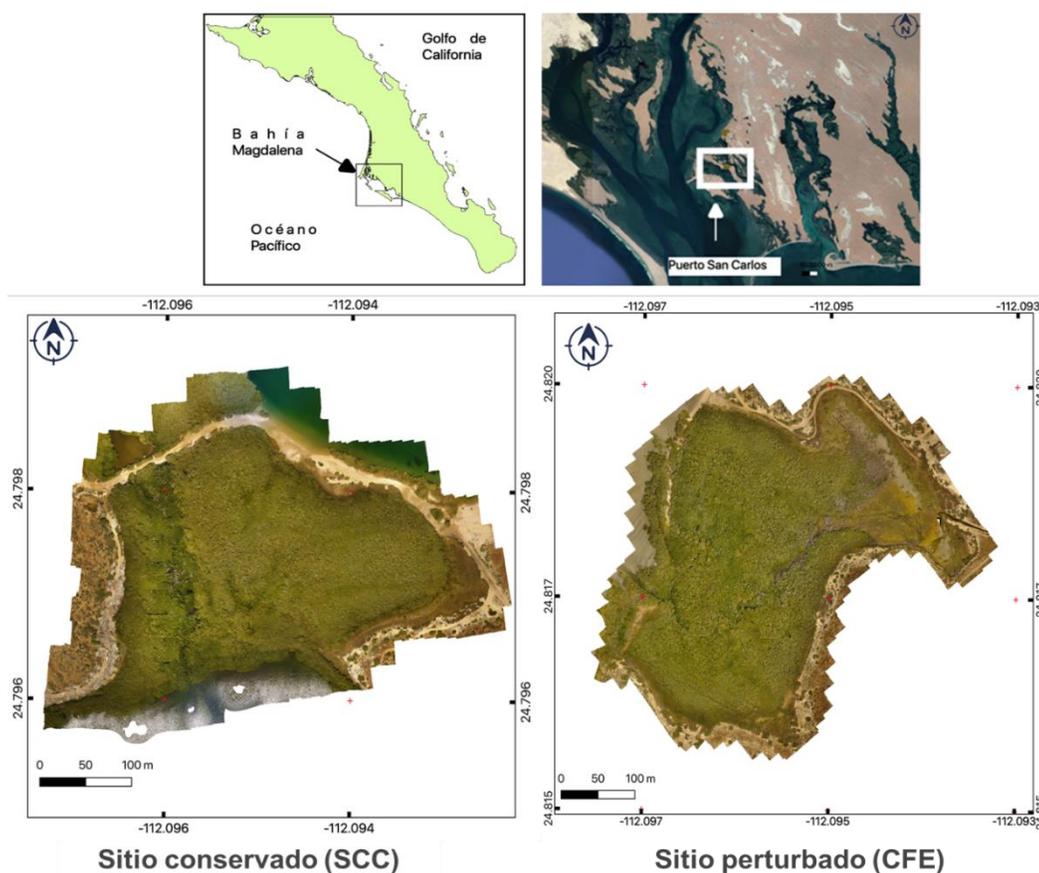


Figura 5: Localización de los sitios de muestreo en Baja California Sur, en sitio conservado (SCC) y sitio perturbado (CFE).

### 6.3.2 Recolección de muestras de sedimentos

Todas las muestras de sedimento se recolectaron en noviembre del 2019. Para la recolección se utilizó un nucleador metálico semicilíndrico de 6.5 cm de diámetro y aproximadamente 1 m de longitud. La muestra de suelo se fraccionó en diferentes

profundidades (Figura 6). Se recolectaron 30 muestras de sedimento de todos los sitios, tomándose a diferentes profundidades en cada sitio de muestreo (0-15, 15-30, 30-50 cm, respectivamente). Posteriormente fueron colocadas en bolsas estériles dentro de una hielera con hielo. Todas las muestras se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  el mismo día. Eventualmente fueron transportadas a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH) para secar las muestras al medio ambiente de acuerdo con la norma NOM-021-RECNAT-2000 (DOF, 2003).



Figura 6. Recolección de las muestras de sedimento. a) Nucleador metálico de 1 m de largo; b) extracción de muestra de sedimento; (c) corte de cada profundidad; d) resguardo de la muestra.

### 6.3.3 Aislamiento primario de cepas basado en el grado de tolerancia a la salinidad

Se prepararon 4 diluciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ ) de las muestras de sedimentos utilizando 1g de sedimento en 9 ml de solución salina estéril. Las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  se cultivaron mediante el método de extensión en placa en medio TSA



(Tripcaseína de soya) suplementado con 0, 1.5 y 3% p/v de NaCl y se incubaron durante 48 horas a  $36 \pm 0,2$  °C. Aquellas cepas que presentaran diferentes características en su morfología colonial fueron seleccionadas y aisladas en medio TSA de acuerdo con la concentración de salinidad del medio en el que se produjo el crecimiento (Palacios et al., 2017). Estas cepas aisladas fueron proporcionadas por miembros del grupo de trabajo el cual estudió el aislamiento e identificación de cepas resistentes a antibióticos en manglares árido-tropicales (Zapién, 2021).

#### **6.3.4. Extracción de ADN de cepas bacterianas**

Las cepas se sometieron a extracción de ADN usando el kit ZymoBiomics Miniprep y el núcleo spin triprep, siguiendo el protocolo (Anexo I y II). La concentración y purezas se determinó con un espectrómetro, donde se obtuvo la absorbancia de ácidos nucleicos (Abs 260 nm) y el cociente de la absorbancia de ácidos nucleicos y proteínas (Abs260/Abs280), respectivamente, mientras que la integridad del ADN se verificó en un gel de agarosa al 1%.

#### **6.3.5. Tinción de Gram**

Se tomó una colonia de cada aislado y se realizó el frotis en portaobjetos de vidrio con una gota de solución salina 0.85%. Se dejó secar y se fijó sobre la flama de un mechero pasando dos o tres veces. Posteriormente se cubrió con cristal violeta por 1 min y luego yodo-lugol por 1 min enjuagando entre cada solución. Después se agregó alcohol acetona, por 20 seg, se enjuago y se tiñó con safranina por 1 min como colorante de contraste. Finalmente, se enjuagó, se dejó secar y se observó en el microscopio óptico para evaluar las características morfológicas.

#### **6.3.6. Extracción de ADN de sedimentos**

El ADN se extrajo de los sedimentos utilizando el kit FastDNA SPIN para suelo (MP Biomedicals) de acuerdo con los protocolos del fabricante (ANEXO III) y con algunas modificaciones, como el uso de GTC (hasta 4 lavados), el cual elimina los niveles de contaminación por ácidos húmicos, así como el tiempo de vórtex a 20 minutos, el tiempo en el buffer de lisis a 5 minutos. La calidad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

### 6.3.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de diferentes genes.

Para la determinación de ARGs en los sedimentos se utilizó PCR tradicional. Los primers y condiciones ya habían sido reportados por Berendonk y colaboradores (2015), donde estos determinantes genéticos se sugieren como posibles indicadores para evaluar el estado de resistencia a antibióticos en los entornos ambientales. Para la selección de estos determinantes (Tabla 1) se tomaron criterios como la relevancia clínica, la prevalencia en el medio ambiente, la asociación con los elementos genéticos móviles y/o el potencial que tienen para ser adquiridos por cualquier modo de transferencia horizontal (conjugación, transformación o transducción).

El ADN extraído de los aislamientos y sedimentos fueron probados para detectar la presencia del *int1* y genes de resistencia a sulfonamida (*sul1*, *sul2*, *blaCTX-M*, *blaKPC*, *blaNDM*, *blaVIM*, *qnrS*, *vanA*, *tetA*). Los oligonucleótidos se sintetizaron en T4 oligo (Irapuato, Gto., México), y sus secuencias fueron (5' → 3'). Las reacciones de PCR se realizaron en una solución de 20 µL que contenía un dNTP de 10 mM, 5x PCR buffer, cebadores 10 mM, Taq polimerasa (5 U/L) (GoTaq Flexi DNA polimerase), y 20 ng de plantilla de ADN. Los oligonucleótidos utilizados se especifican en la Tabla 1, donde se muestran las condiciones de temperatura y tiempo de las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión, así como los ciclos correspondientes a cada una de las parejas de oligonucleótidos utilizados.

Tabla 1: Secuencias de los primers y las condiciones de reacción.

Integrón			
	TM	CONDICIONES	REFERENCIA
Clave oligo : <i>int1</i> F923pb Longitud: 18 Secuencia: GTT CGG TCA AGG TTC TGG	TM: 64°C	94°C 5 min 94°C 60 seg 67°C 60 seg 72°C 60 seg	(Cergole et al., 2011)
Clave oligo : <i>int1</i> R923pb Longitud: 18 Secuencia: GTA GAG ACG TCG GAA TGG	TM: 64°C	35 ciclos	
Sulfonamidas			
Clave oligo: <i>sul1</i> F433pb Longitud: 20 Secuencia: CGG CGT GGG CTA CCT GAA CG	TM: 72°C	94°C 60 seg 55°C 60 seg 72°C 60 seg	(Hoa et al., 2008)
Clave oligo: <i>sul1</i> R433pb Longitud: 20 Secuencia: GCC GAT CGC GTG AAG TTC CG	TM: 70°C	30 ciclos	



Clave oligo: <i>sul2F293pb</i> Longitud: 21 Secuencia: GCG CTC AAG GCA GAT GGC ATT	TM: 68°C		
Clave oligo: <i>sul2R293pb</i> Longitud: 21 Secuencia: GCG TTT GAT ACC GGC ACC CGT	TM: 70°C		
<b>β - lactamasas</b>			
Clave oligo: <i>blaCTXMF593</i> Longitud: 20 Secuencia: ATG TGC AGY ACC AGT AAR GT	TM: 63°C	94°C 60 seg 58°C 120 seg 72°C 180 seg	(Shahid, 2010)
Clave oligo: <i>blaCTXMR593</i> Longitud: 21 Secuencia: TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA	TM: 64°C	35 ciclos	
<b>Carbapenemasas</b>			
Clave oligo: <i>blaVIMF</i> Longitud: 20 Secuencia: GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC	TM: 65°C	94°C 10 min 94°C 30 seg 52°C 40 seg 72°C 50 seg 72°C 5 min  36 ciclos	(Poirel et al., 2011)
Clave oligo: <i>blaVIMR</i> Longitud: 20 Secuencia: AAT GCG CAG CAC CAG GAT AG	TM: 66°C		
<b>Nueva Delhi β-lactamasa</b>			
Clave oligo: <i>blaNDMF</i> Longitud: 20 Secuencia: GGT TTG GCG ATC TGG TTT TC	TM: 65°C		
Clave oligo: <i>blaNDMR</i> Longitud: 20 Secuencia: CGG AAT GGC TCA TCA CGA TC	TM: 66°C		
<b>Carbapenemasa</b>			
Clave oligo: <i>blaKPCF880pb</i> Longitud: 21 Secuencia: TGT CAC TGT ATC GCC GTC TAG	TM: 66°C	94°C 3 min 94°C 60 seg 52°C 60 seg 72°C 60 seg 72°C 10 min	(Gootz et al., 2009)
Clave oligo: <i>blaKPCR880pb</i> Longitud: 24 Secuencia: TTA CTG CCC GTT GAC GCC CAA TCC	TM: 71°C	30 ciclos	
<b>Quinolonas</b>			
Clave oligo: <i>qnrSF</i> Longitud: 20 Secuencia: GCA AGT TCA TTG AAC AGG GT	TM: 63°C	95°C 60 seg 54°C 60 seg 72°C 60 seg	(Matsumura et al., 2017)
Clave oligo: <i>qnrSR</i> Longitud: 21 Secuencia: TCT AAA CCG TCG AGT TCG GCG	TM: 68°C	35 ciclos	
<b>Vancomicina</b>			
Clave oligo: <i>vanAF</i> Longitud: 19 Secuencia: CTG TGA GGT CGG TTG TGC G	TM: 68°C	96°C 5 min 55°C 5 seg	(Volkman et al., 2004)



Clave oligo: <i>vanAR</i> Longitud: 17 Secuencia: TTT GGT CCA CCT CGC CA	TM: 64°C	60°C 60 seg  25 ciclos	
<b>Tetraciclinas</b>			
Clave oligo: <i>tetAF158pb</i> Longitud: 18 Secuencia: AGT GGA GCG ATT ACA GAA	TM: 61°C	94°C 30 seg 55°C 30 seg 72°C 30 seg	(Strommenger, et al., 2003)
Clave oligo: <i>tetAR158pbb</i> Longitud: 20 Secuencia: CAT ATG TCC TGG CGT GTC TA	TM: 65°C	30 ciclos	

«Continuación»

Los amplicones obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2.5% en TAE IX (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8) durante 60 min a 90 V. Como controles se utilizaron las cepas clínicas identificadas como portadoras de los genes de resistencia en trabajos de tesis previos: *E. coli* 37 Hz, *E. coli* 22 Hc, *E. coli* 61 HC, *E. coli* 2 HZ y la cepa 29 (1.5% NaCl) proveniente de un sitio perturbado (Anexo IV). Para visualizar el ADN se tiñeron los geles de agarosa con bromuro de etidio 0,5 µg/mL, y finalmente las bandas se visualizaron y fotografiaron en un fotodocumentador.

### 6.3.8. Análisis estadístico

Los datos y gráficas de barras se organizaron en Microsoft Excel 2015. El análisis se realizó con el software estadístico Minitab (versión 20.0) donde se realizó el análisis de componentes principales (PCA) para evaluar las relaciones entre los genes de resistencia y la profundidad, considerando además el grado de conservación del sitio analizado. Se realizó también un análisis de correlación entre las variables de identificación del sitio analizado y la presencia o no de los diferentes genes analizados. El grado de correlación de los pares de variables, se presentó gráficamente en un correlograma.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1.1 Descripción de las áreas de estudio

El muestreo se realizó en noviembre del 2019, en la península de Baja California Sur, el cual se encuentra en una línea litoral con una gran extensión de manglar con más de 100 km de longitud (Pico et al., 2011). Los 2 sitios muestreados son, el Puerto de San Carlos “concheros” y la termoeléctrica.

### 7.1.2 Puerto San Carlos “concheros”

Se encuentra en Bahía Magdalena, constituido por grandes lagunas, en este sitio se da el avistamiento de ballenas, es una zona de mucho manglar. Además, hay importantes puertos pesqueros como López Mateos y San Carlos, por lo cual es muy común encontrar conchas. En esta zona se tiene un mal manejo de disposición de desechos, se realizan actividades como pesca y captura de bivalvos. Representaba una condición de no perturbado, pero se denominó con contaminación antrópica, porque no se tiene una forma de disposición formal de desechos. Lo característico son matorrales y se observa mangle blanco, tienen humedad relativa, en el sitio 2, 3 y 4 se observa mucha hojarasca (Figura 7).

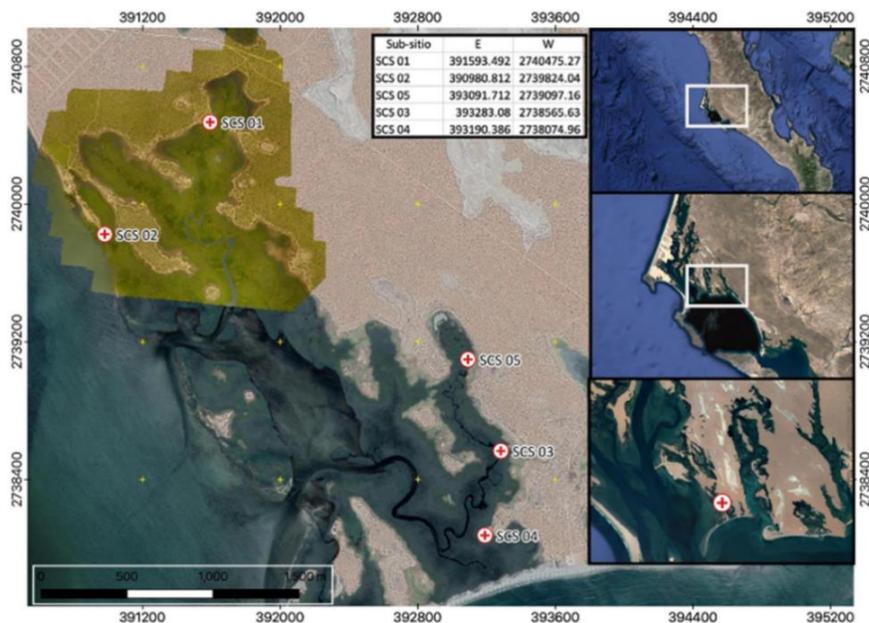


Figura 7. Mapa geográfico de los sitios de muestreo del sitio conservado. Las etiquetas rojas son los subsitios de muestreo, SCS 01, SCS 02, SCS 03, SCS 04, SCS 05. Todos ellos son sitios de playas de arena.

### 7.1.3 San Carlos, Termoeléctrica

En la parte sur se encuentra la planta de la CFE, ahí se localiza un canal donde se vierten los desechos del agua de enfriamiento de la maquinaria o de las chimeneas y se arrojan en esa zona. En algunas zonas ya no crecen manglares en ese sitio y tiene un olor a azufre. En el extremo Oeste, está el límite de la planta de tratamiento y ahí sale el canal del efluente de la planta de tratamiento. Hay presencia de *Avicennia* que cubre y ocupa el borde de ese manglar (Figura 8).

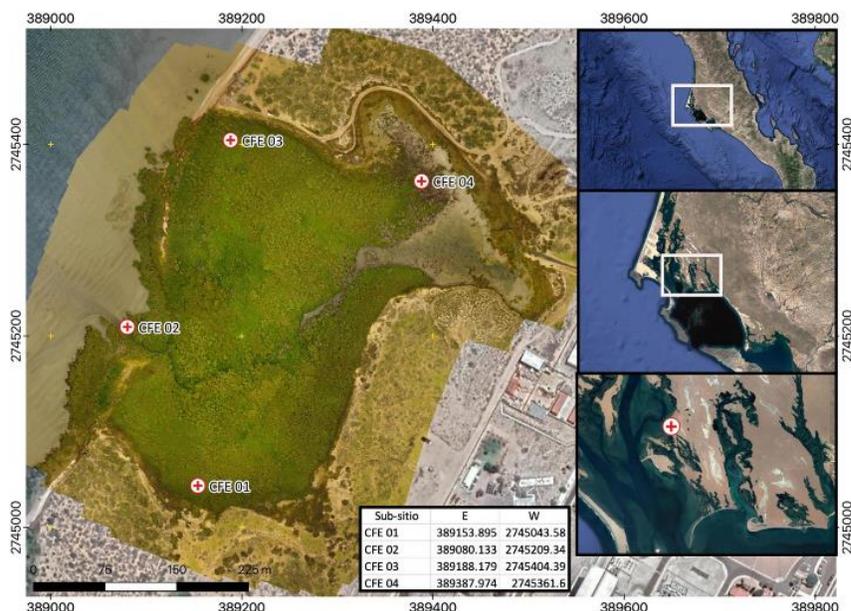


Figura 8. Mapa geográfico de los sitios de muestreo del sitio perturbado. Las etiquetas rojas son los subsitios de muestreo, CFE 01, CFE 02, CFE 03, CFE 04. Todos ellos son sitios de playas de arena.

### 7.2 Resultados del muestreo

En el muestreo realizado en noviembre del 2019 en Baja California Sur se recolectaron 30 muestras, 15 del sitio perturbado (CFE) y 15 del sitio conservado (SCC), en los 5 diferentes subsitios de cada uno y a 3 diferentes profundidades, tal como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Sitios muestreados

Sitios	Subsitios	Profundidades (cm)	Cantidad	
CFE	Bahía Magdalena (Perturbado)	5	30-50	5
			15-30	5
			0-15	5
SCC	Bahía Magdalena (Conservado)	5	30-50	5
			0-15	5
			15-30	5

Con base en esto se realizaron los aislamientos para realizar una descripción de sus características microscópicas y macroscópicas mediante la tinción de Gram y el cultivo en medio TSA, respectivamente. De los 113 aislados bacterianos, 52% procedían del manglar perturbado y 48% del manglar conservado. En ambos sitios predominaron los bacilos sobre los cocos, observándose con mayor frecuencia los bacilos Gram + que bacilos Gram - en el sitio perturbado, mientras que los resultados fueron muy parecidos para ambos tipos de bacilos en el sitio conservado. Un total de 61 aislados fueron bacterias Gram positivas y 52 bacterias Gram negativas, encontrándose cocos y bacilos, ya sean Gram positivos o negativos para ambos sitios (Tabla 3).

Tabla 3: Características microscópicas de las cepas bacterianas de sitio perturbado y conservado.

CEPAS	SITIO	COCOS	BG-	BG+
48%	Conservado	10	24	20
52%	Perturbado	5	22	32

### 7.3 Selección de genes de resistencia a antibióticos

Inicialmente, se realizó una selección de genes que se encuentran comúnmente en el ambiente. La selección se basó en cinco criterios: 1) genes que representan un riesgo para la salud pública y que previamente fueron encontrados en manglares; 2) genes presentes en elementos genéticos móviles; 3) antibióticos de alto consumo: como lo son sulfonamidas, tetraciclina y betalactámicos; 4) antibióticos de uso prolongado



como lo son la tetraciclina y sulfonamida; 5) betalactámicos de uso extendido como son los carbapenémicos y sus ARGs.

En total se incluyeron 10 genes: gen para integrón 1 (*int1*), dos genes de resistencia a sulfonamida (*sul1* y *sul2*), un gen de resistencia a la  $\beta$ -lactamasas (*bla*CTX-M), tres genes de resistencia a las carbapenemasas (*bla*VIM, *bla*NDM y *bla*KPC), un gen de resistencia a las tetraciclinas (*tetA*), un gen de resistencia a las quinolonas (*qnrS*) y un gen de resistencia a la vancomicina (*vanA*). Estos genes se buscaron en las muestras de sedimentos y cepas bacterianas de los 10 subsitios de muestreo, tanto en el sitio perturbado (CFE) como en el conservado (SCC).

#### **7.4 Abundancia de *int1* y ARGs en sedimentos de manglar en un sitio conservado y perturbado**

Cada una de las PCR se optimizó utilizando las muestras de ADN y siguiendo los principios generales para amplificar. Se probaron diferentes concentraciones de oligonucleótidos y  $MgCl_2$  hasta ajustar las condiciones óptimas, como se describe en el apartado de materiales y métodos. Primero se realizó una PCR múltiple para la detección de genes de resistencia a las sulfonamidas, en sedimentos de manglar de un sitio conservado y otro perturbado, después se analizó el *int1* y eventualmente los demás ARGs.

Los porcentajes obtenidos y que se muestran en la Figura 9 donde de los 10 genes determinados *int1*, *sul1* y *sul2* fueron los que predominaron en ambos sitios, con prevalencias de 12%, 14%, 17%, en el sitio perturbado, sin embargo, no se observa mucha diferencia respecto al sitio conservado. Esto es consistente con algunos informes anteriores donde se menciona que la detección de ARGs en los sedimentos que aparentemente no se encuentran afectados por la intervención humana. Podría atribuirse a las múltiples funciones de los antibióticos, como modulaciones de la transcripción y también a las variaciones en aspectos como el consumo de antibióticos, clima y otros factores (Imchen y Kumavath, 2021).

Se considera que los niveles de estos genes se encuentran estrechamente relacionados con el impacto antropogénico, tal es el caso reportado por Adelowo y



colaboradores (2018), donde señala que en los cuatro humedales estudiados existía una tasa de prevalencia del 42% de integrones clase 1. Se demuestra entonces, que las diferencias entre las abundancias de ARGs de los cuatro humedales se correlacionaban con las diferentes actividades antropogénicas asociadas con los humedales.

La resistencia a las sulfonamidas es codificada por *sul1* y *sul2*, se encuentra muy extendido en varios ambientes acuáticos que son impactados por contaminación, siendo estos ampliamente estudiados tanto en agua como en sedimentos. Se ha reportado que llegan a ser al menos 100 veces más abundantes que otros genes, incluso se ha demostrado que la abundancia del gen se correlaciona significativamente con la concentración total de antibióticos ( $p < 0.01$ ), en muestras de agua y sedimento (Cabral et al., 2016). Por lo que se señala que existe una asociación inherente entre antibióticos y genes *sul*. Además, en el estudio de Chen y colaboradores (2015) menciona que el gen *sul1* y ARGs de los cuales algunos fueron analizados en este estudio se encontraron en mayores concentraciones en sedimentos que en el agua, lo que era consistente con una mayor población bacteriana en sedimentos según indicado por 16S rRNA.

La presencia del gen *int1* contribuye a la diseminación de los genes de resistencia a antibióticos, esto al facilitar la transferencia horizontal de ARGs y al incorporar estos genes en los cromosomas. Estos han sido estudiados tanto en ecosistemas de manglares como en otros entornos acuáticos, donde se ha establecido el papel en la propagación de ARGs en el ambiente (Rowe y Mazel, 2002; Hoa et al., 2008; Gao et al., 2012; Chen et al., 2015).

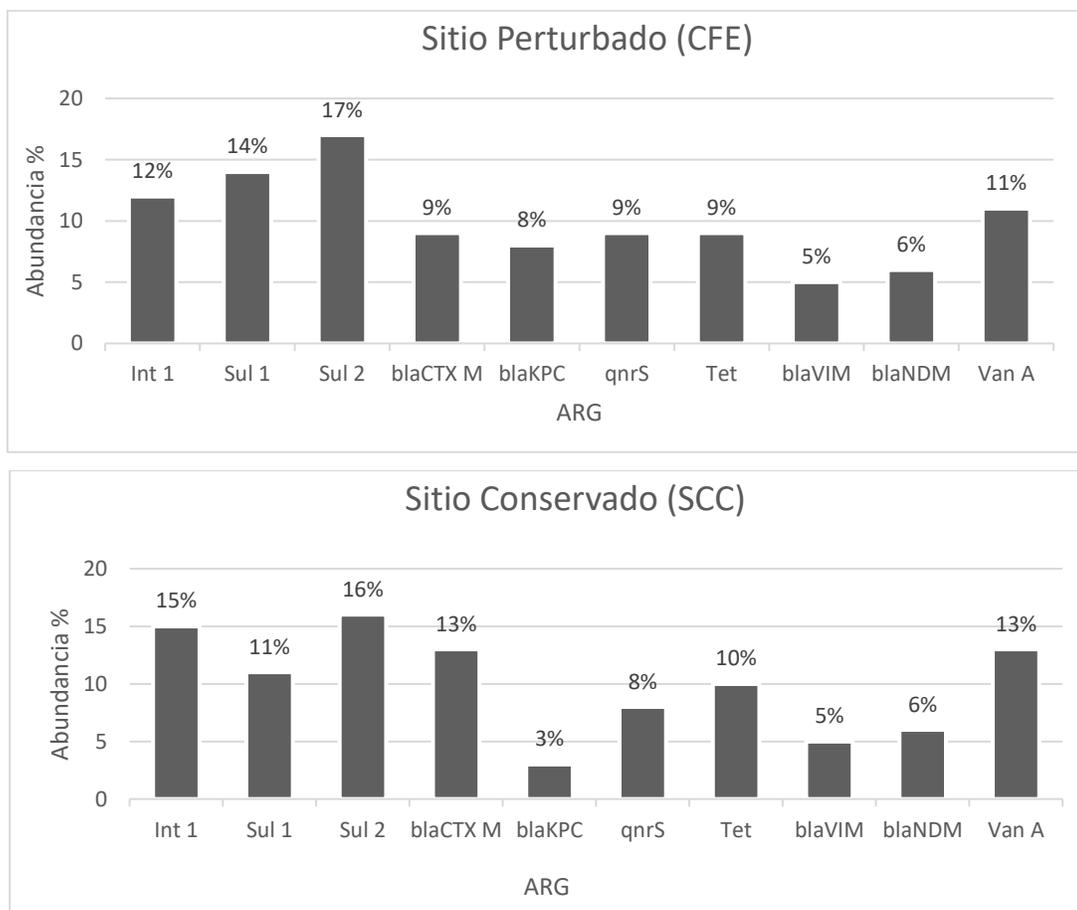


Figura 9: Abundancia de los genes de resistencia: *sul1*, *sul2*, *blaCTX-M*, *blaKPC*, *qnrS*, *tetM*, *blaVIM*, *blaNDM*, *vanA* y el integrón clase 1 (*int1*), en sedimentos de manglar con diferente grado de conservación.

En el sitio perturbado, el *int1* se esperaba que tuviera una relación subyacente con el impacto antropogénico. Según se puede observar, se obtuvo un porcentaje del 12%. Comparado con otros estudios donde se considera que el *int1* identificado con mayor frecuencia y su abundancia en manglares se ve estrechamente relacionada con los niveles de contaminación y de antibióticos residuales que ejercen una presión selectiva sobre los microorganismos. Por ejemplo, en el caso reportado por Su y colaboradores (2014) se muestra que en los sedimentos de un manglar prístino y uno afectado por actividades antropogénicas, el integrón fue de los genes de resistencia más prevalentes con un 80% en los manglares. Se presentó una gran diferencia con respecto a los manglares de este estudio, puesto que otros ARGs fueron más prevalentes.



Se encontró que donde había una mayor presencia de *Int1* fue en los subsitios 1, 2 y 3, esto se explica por la descarga de la salida de aguas residuales, sobre todo en el subsitio 1 que se encuentra la boca del manglar. Ahí son depositados los residuos de la pesca directamente, además de la posible contaminación de derrames de petróleo y que existen embarcaciones en las que se transportan hidrocarburos para la Termoeléctrica de la CFE, donde existen descargas de residuos por esto se considera como una fuente potencialmente significativa de genes de resistencia e *int1*.

En cuanto al sitio conservado (SCC) no se esperaba la presencia de ARGs e *int1*, sin embargo, se encontraron ampliamente diseminados en los 5 subsitios de muestreo. Esto se puede explicar por los impactos tanto directos como indirectos que tiene el manglar de SCC, como el desarrollo urbano y sobre todo por el crecimiento de asentamientos humanos asociados, con aprovechamientos pesqueros y en sistemas de cultivo de especies comerciales. Además, es una zona turística en donde se aprovecha para el avistamiento de aves y mamíferos marinos (Breceda et al., 2016).

Se encontró que los ARGs en los sedimentos eran más abundantes en el sitio perturbado, lo que sugiere que es un mayor reservorio de ARGs y que la abundancia se encuentra relacionado con el impacto antropogénico. Esto indica que el sedimento es un importante depósito de diversos genes de resistencia a antibióticos y juega un papel muy importante en el almacenamiento y difusión de varios ARGs específicamente en ecosistemas de manglares. Cabe mencionar que se han realizado diversos estudios donde se ha comparado la aparición de varios ARG en varios entornos ambientales (lagunas, sedimentos de ríos, efluentes, plantas de tratamiento de aguas residuales) en diversas partes del mundo y se ha encontrado que los sedimentos contenían las mayores concentraciones de ARGs (Yin et al., 2019).

La presencia de ARGs en entornos clínicos (se define como un concepto que no se limita a espacios físicos donde se llevan a cabo prácticas médicas, sino que además se desarrollan interacciones sociales con el fin de obtener un aprendizaje en la clínica), sobre todo en las que confieren resistencia a antibióticos de último recurso como son los *carbapenémicos*, tienen la característica de ser de mayor espectro (Moreno, 2013). En este estudio, buscar estos genes productores de carbapenemasas

como *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemasa (KPC), Nueva Delhi metalo  $\beta$  lactamasa (NDM), metalo  $\beta$  lactamasa codificada por integrones de Verona (VIM) en entornos impactados, es de gran importancia para comprender el surgimiento de la resistencia moderna a los antibióticos. Además tienen la característica de que confieren resistencia total con una sola mutación, lo cual no es común entre los genes de resistencia a antibióticos y se encuentran en el medio ambiente, tanto en bacterias como en sedimentos donde se encuentra poco estudiada (Mills y Lee, 2019).

Para la detección de los genes *bla*VIM y NDM se realizó una técnica basada en PCR, donde se desarrolló una mezcla de reacción múltiple usando condiciones optimizadas, que permitió identificar los genes respectivos, con distintos tamaños de amplicón correspondientes a los 2 diferentes genes (Figura 10). Se muestra los resultados positivos de 2 muestras correspondientes al sitio perturbado, con un amplicón de 621 pb para el gen *bla*VIM y 400 pb para el gen *bla*NDM.

En la Figura 9 se observa que de las tres carbapenemasas probadas, *bla*NDM y *bla*VIM se encontraron con frecuencia similar tanto en el sitio conservado como perturbado (5% y 6% respectivamente), mientras que *bla*KPC se encontró con menor frecuencia en el sitio conservado (3%) que en el sitio perturbado (8%). Estos resultados mostraron que hay una acumulación de estos genes en el puerto de San Carlos debido a la falta de instalaciones de saneamiento y esto debido la diseminación de estos contaminantes a través de las varias actividades antropogénicas que se desarrollan. Es alarmante detectar la presencia de carbapenemasas sobre todo *bla*KPC y *bla*VIM en estos ecosistemas. Se han reportado en entornos como aguas residuales, ríos, lagos en algunas partes del mundo, donde se han detectado *bla*KPC, *bla*OXA y *bla*VIM con una prevalencia del 22% (Figura 11). Sin embargo, en algunos países la situación de los carbapenémicos no es monitoreado, mientras que en otros países se ha reportado que son los genes que más predominan, como en Marruecos, Kenia y Sudáfrica. En México se ha reportado con base a información de algunas instituciones que en la mayoría el consumo de cefalosporinas y carbapenémicos es sobresaliente, además de que se ha demostrado la presencia de cepas de *Escherichia coli* productora de estas enzimas en aguas negras de la Ciudad de México (Ponce de León et al.,

2018). Esto habla de la difusión global que tienen estos genes en el ambiente y muestra un panorama crítico para la salud (Matsumura et al., 2017).

La diseminación de estos genes de resistencia se ha evaluado en estudios clínicos en diversos continentes, pero muy pocos centrados en compartimentos ambientales, sobre todo en manglares. Por ende, se le está tomando mayor atención a la difusión de ARGs tanto en sedimentos como en agua en países desarrollados bajo la perspectiva del enfoque de OneHealth (Subirats, 2017).

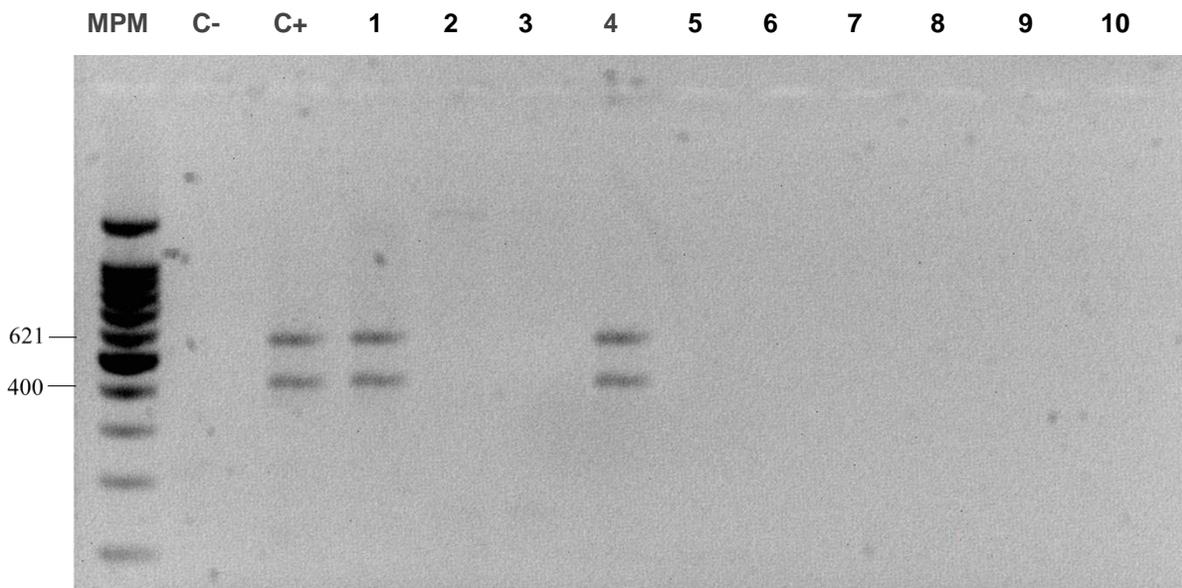


Figura 10: Detección de genes *blaVIM* y *blaNDM* mediante PCR múltiple. MPM: marcador de peso molecular 100 bp; C-: control negativo; C+ control positivo; carril 1: subsitio CF5, 15-30 cm de profundidad, 2: CF4 0-15 cm, 3: CF1 0-15 cm, 4: CF4 30-50 cm, 5: CF4 0-15 cm, 6: CF1 0-15 cm, 7: CF3 0-15 cm, 8 CF3 0-15 cm, 9: CF3 0-15, 10: CF3 15-30. El tamaño de cada amplicón se indica a la izquierda. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5%.

En cuanto al gen *blaKPC* ha sido poco reportado en ecosistemas de manglar, pero se han realizado varios estudios con enfoques moleculares para la detección de *blaKPC* de aislamientos ambientales, es común encontrarlo en entornos clínicos y por lo tanto se relaciona con los que se encuentran en el medio ambiente.

Estos resultados se explican porque se utilizan con más frecuencia para tratar enfermedades infecciosas y los residuos de excretas llegan a las aguas residuales.

Después puede existir una presión selectiva o un aumento de la materia orgánica, provocando un aumento en la diversidad, contribuyendo al aumento de microorganismos y facilitando el intercambio de elementos genéticos móviles y que se relaciona con los ARGs como *blaKPC* (Subirats, 2017). El encontrar la presencia de estos genes indica que existe una rápida diseminación de los mismos a partir de aguas residuales de hospitales o de hogares, lo que representa riesgos para la población local. Sin embargo han sido pocos los estudios hasta ahora donde se determina la presencia de carbapenemasas como parte de sistemas de vigilancia (Mills y Lee, 2019).

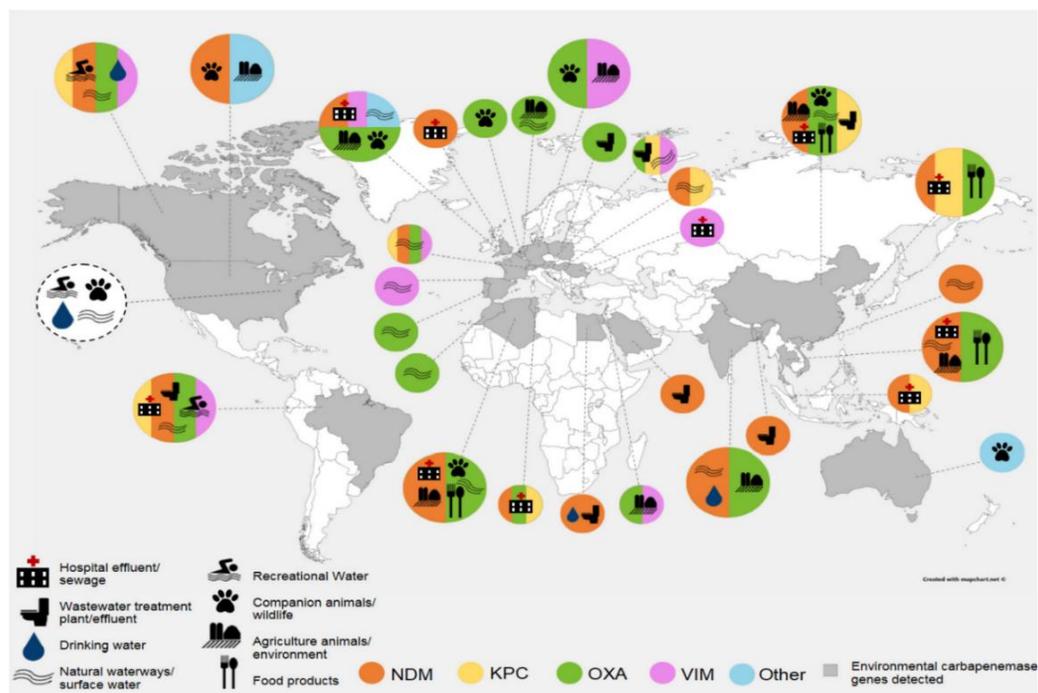


Figura 11: Genes productores de carbapenemasas en distintos reservorios ambientales. Se muestra específicamente la presencia del gen en cada país (Mills y Lee, 2019).

En cuanto a la betalactamasa de espectro extendido tipo CTX-M. Se muestra en la Figura 9 que se encontró con mayor frecuencia en el sitio conservado (13%), a diferencia del sitio perturbado (9%), siendo comúnmente encontrada en ambientes clínicos. Cada vez se detecta con más frecuencia en entornos acuáticos como ríos, lagos, aguas superficiales y en ecosistemas como manglares, este gen se detecta



fácilmente y en altas concentraciones lo cual es consistente con los resultados mostrados. Estos entornos se encuentran ligados a actividades humanas que son productores de BLEEs, por lo tanto, los manglares juegan un rol en la diseminación de *bla*CTX-M, el cual es considerado como omnipresente en entornos acuáticos. Este gen fue encontrado en 4 subsitios de muestreo, pero en el identificado como subsitio 2 tanto del sitio perturbado como del conservado, no se encontró presencia del gen. En estudios anteriores se menciona que estos se encontraban en el 62% de las muestras de sedimentos (Wallace et al., 2019).

Las quinolonas son antibióticos ampliamente utilizados y en estos se encuentran compuestos de segunda generación como ciprofloxacina, que tiene la característica de ser estable tanto en sedimentos como en agua. Puede adsorberse a las partículas de sedimento, por lo que el ácido oxolínico y la flumequina que se retienen en el sedimento hasta por 15 días esto trae como consecuencia una presión selectiva en el ambiente (Lai y Lin, 2009).

En la Figura 9 se puede observar que la presencia del gen *qnrS* en ambos sitios con muy ligera diferencia en cuanto a los porcentajes (8% y 9% en sitios conservado y perturbado respectivamente). Hay información limitada de este gen en medios ambientales, pero se ha encontrado mayormente en sedimentos de humedales costeros urbanos, en aguas residuales y suelos adyacentes a animales de engorda (Chen et al., 2015). El gen *qnrS* se adsorbe en los sedimentos y estos se acumulan en lodos y partículas del suelo, evitando con esto la fotodegradación por el sol y ejerciendo presión selectiva sobre la comunidad microbiana e induciendo la expresión de ARGs. Una disminución en la aplicación de medicamentos además de una dilución explica la situación de contaminación en entornos donde se cuenta con actividades como la acuicultura (Martí et al., 2013).

Mientras que genes como *tetA* y *vanA* también tuvieron alta prevalencia en ambos sitios lo cual es consistente con reportes ya realizados en ecosistemas como los manglares y su distribución es buena. Estos se encontraron principalmente en los tres primeros sitios (CFE1, CFE2, CFE3, SCC1, SCC2, SCC3). Si se comparan otros genes de resistencia a la tetraciclina como lo son *tetX*, *tetO*, *tetW*, *tetS*, estos se



encuentran rara vez en manglares. En un estudio realizado por Seyfried y colaboradores (2010) demostraron que el gen *tetA* tenía una mayor prevalencia en las muestras analizadas, además que se compara la frecuencia de este gen resistente a la tetraciclina con muestras de agua.

Los resultados mostrados en este estudio y los reportes acerca del aumento de ARGs en manglares confirman la asociación de su presencia con las descargas de efluentes. Se han desarrollado estudios independientes de cultivos para explorar el impacto de los antibióticos en el ambiente, pero gran parte de estos estudios se limitan a pocos genes de resistencia a antibióticos (Kristiansson et al., 2011). Aunque los efluentes se diluyen por la marea y las concentraciones de antibióticos en el medio ambiente son bajas, por debajo de la concentración mínima inhibitoria para casi todas las bacterias, aun así, se ejerce una presión selectiva y eventualmente impacta la comunidad microbiana (Marti et al., 2013).

En el caso de la presencia del *Int1* y los 9 ARGs se identificaron en todas las muestras de sedimentos, lo que indica que se encuentran ampliamente distribuidos en el manglar de San Carlos. Estos resultados solo refuerzan la opinión de diversos reportes (Chen et al., 2015; Li et al., 2016; Zhao et al., 2019; Tan et al., 2019) de que los manglares que se encuentran directamente afectados por actividades antropogénicas. En este caso, el manglar perturbado el cual recibe descargas de la CFE tiene una mayor concentración que el manglar conservado.

Se ha mencionado que no solamente los manglares pueden ser reservorios de ARGs y ARB, y esto se encuentra muy bien documentado (Su et al., 2014; Chen et al., 2015, Li et al., 2016), incluso hay mayores reportes en otros ambientes acuáticos, donde estos entornos representan una matriz importante en la cual ocurre la transferencia horizontal de genes. LaPara y colaboradores (2011) reportaron que, en muestras de sedimentos analizados, se detectaron ARGs que codifican resistencia a la tetraciclina, evidentemente influenciados por efluentes de contaminantes y considerado de los genes más comunes en el ambiente acuático. No solamente se analiza los sedimentos sino también muestras de agua, estos arrojan que en los sedimentos hay mayor presencia de ARGs en ambientes acuáticos y que existe una



gran riqueza de especies y abundancia del sedimento que se comparan a la comunidad planctónica de la capa superior. Esta diferencia radica en que existe una gran cantidad de microorganismos en sedimentos gracias a la riqueza de nutrientes lo que lleva a una mayor cantidad de biomasa por g de suelo que por ml de agua (Huang et al., 2019). Se ha demostrado que el ADN se adsorbe a los componentes del suelo. En el caso del suelo arenoso, las sustancias húmicas lo protegen contra la degradación facilitando la dispersión de ARGs prologando su persistencia en los sedimentos. En suelos arcillosos, se adsorben ADNAsas y por lo tanto lo vuelve un reservorio ideal para los ARGs (Tan et al., 2019).

En la detección de la presencia de estos genes intervienen otros factores como la temporada y periodo en que se realizó el muestreo. En este caso fue en noviembre en el que según se ha reportado es cuando hay una mayor prevalencia de genes de resistencia (Adelowo et al., 2018). Otro factor que puede intervenir es la ubicación geográfica, las condiciones hidrodinámicas, precipitación, así como los metales pesados que comparten o sustituyen el papel del antibiótico y contribuyen a la propagación de ARGs cuando la concentración de antibióticos es inferior a un punto en particular como son los manglares (Imchen y Kumavath, 2021).

### **7.5 Correlación entre la profundidad, grado de conservación, presencia de *int1* y ARGs en sedimentos de manglar.**

Se realizó un análisis de correlación de las muestras de sedimento, el grado de conservación y la profundidad de las muestras (Figura 12). Primeramente, se observa que no existe una correlación entre el grado de conservación y la muestra.

En cuanto al *int1* y la profundidad, se observa un índice de correlación de 0.85, esto indica que cuando una variable aumenta otra disminuye, es decir, que cuando más profundo sea menor es la presencia del *int1* ( $p < 0.05$ ). Esto es consistente con estudios previos, donde se reportó que los ARGs pueden migrar a capas de sedimentos más profundas. Especialmente *int1*, *sul1* y *qnrS* se enriquecieron en sedimentos de las capas superior, media e inferior y esto se puede explicar por la presión selectiva de las clases de antibióticos de sulfonamida y fluoroquinolonas que migran a los sedimentos a una mayor profundidad (Deng et al., 2020).

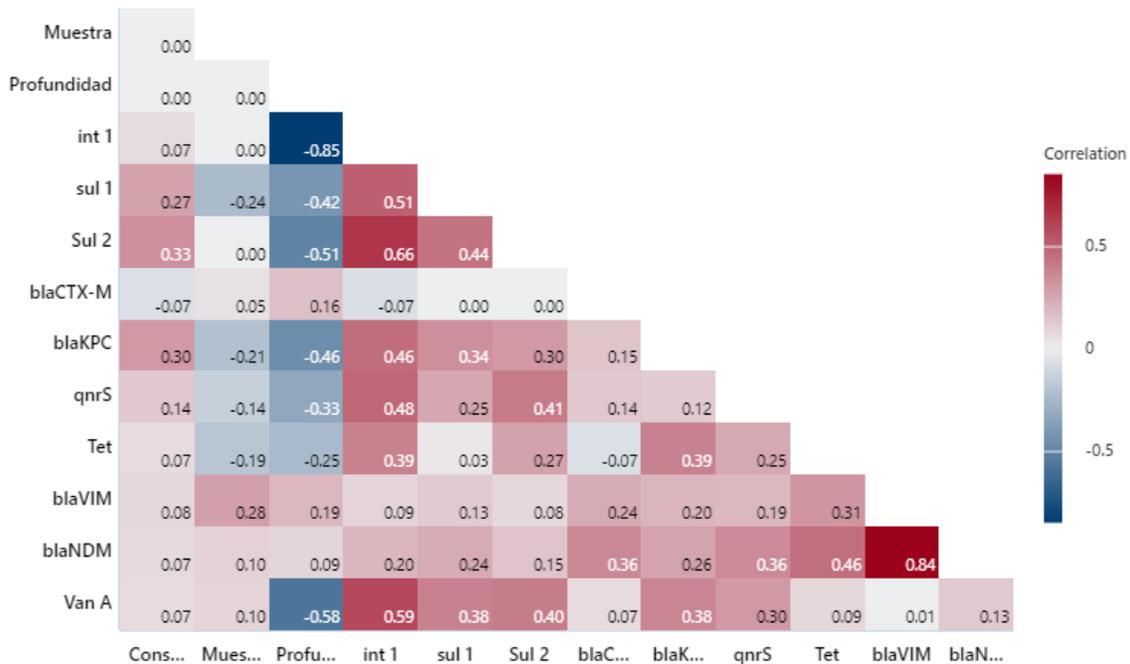


Figura 12: Correlograma de muestras de sedimento, considerando el grado de conservación, la profundidad y los genes de resistencia a antibióticos.

Los resultados de correlación entre la profundidad con *su1*, fueron significativos ( $p < 0.05$ ), específicamente *su1* y *su2*, se observó que existe una mayor presencia de estos genes en las muestras de sedimentos menos profundos. El integrón tiene una relación mucho más fuerte con el gen *su1*, incluso en distintas estaciones del año (Chen et al., 2015). Esto se explica por la presencia de *su1* en la región conservada del *int1*, por ende, existe una diseminación entre bacterias usando al integrón como portador en el ambiente. Esto implica que los materiales genéticos intra o extracelular que portan estos genes se distribuyen dinámicamente entre entornos medioambientales, por lo que no es sorprendente que exista una correlación positiva.

El gen *tetA* muestra una correlación significativa con *int1*. Algunos estudios de resistencia antimicrobiana han mostrado que no solamente el gen para *Int1* tiene una correlación significativa con las sulfonamidas, sino también con otros genes, pero en menor medida, en este caso con *vanA*, *blaKPC* y *qnrS* (Huang et al., 2019).

En el caso de las carbapenemasas específicamente de *blaKPC* también tiene una correlación significativa con la profundidad ( $p < 0.05$ ). Al igual que *vanA*, lo que



significa que, a una mayor profundidad, menor es la presencia de ARGs. Sin embargo, son escasos los estudios donde se reporta la diseminación de genes con base a la profundidad. En el caso de *bla*NDM y *bla*VIM existe una correlación positiva, es decir que se encuentran asociados debido a los elementos genéticos móviles (casetes de integrones). Esto es preocupante debido a que la asociación de otros determinantes adquiere el fenotipo para volverse resistente a la gran mayoría de antibióticos.

En estudios realizados en ecosistemas acuáticos, se ha reportado la presencia de distintos ARGs a una profundidad que va desde 0 hasta 15 cm (Cabral et al., 2016; Chen et al., 2015). Son pocos los que estudian una profundidad mayor a los 20 cm. Esto se debe a que a una mayor profundidad hay una menor persistencia y migración de ARGs (Zhang et al., 2014) esto es por los efectos selectivos de antibióticos y también a la transformación de ARGs. En el resto de los genes no existe una relación significativa en cuanto a la profundidad. La existencia de ARGs en sedimentos profundos como en el caso de algunos genes como *bla*CTX-M apoya a un creciente cuerpo de evidencia de que la resistencia a antibióticos se encuentra muy extendido, incluso en entornos no perturbados (Cabral et al., 2016).

Actualmente los estudios realizados se centran en relacionar los ARGs, concentraciones de antibióticos y comunidad bacteriana en varios ambientes acuáticos incluidos los manglares (Zhao et al., 2019). Sin embargo, son poco los estudios donde se reportan la dinámica dependiente del tiempo de los ARGs. La ventaja de estudiar esto da una idea del proceso evolutivo de genes de resistencia un poco más eficaz. Por tal motivo es necesario explorar el grado de variación dinámica de los ARGs y de los demás factores que se relacionan. Además, sobre todo el intercambio material de la parte superficial y profundas a través de las capas de sedimentos por eso es muy importante estudiar la transmisión de ARGs de la capa superficial comparada con la más profunda para comprender un poco más la dinámica de transmisión y la fuente (Tan et al., 2019).



## **7.6 Análisis de Componentes Principales de los Genes de Resistencia a Antibióticos y la profundidad, en sedimentos de manglares**

Con el fin de identificar mejor la relación entre diseminación de los genes de resistencia en los sitios de los manglares y la profundidad en la que fueron tomadas las muestras de sedimento, se realizó un análisis de componentes principales.

La relación de la distribución de los ARGs de las muestras analizadas y su profundidad con los tres primeros componentes identificado por PCA, se muestran en la Figura 13. La metodología de componentes principales permite crear nuevas variables a partir de un grupo de variables, en donde cada uno de los datos presenta una relación positiva o negativa, de mayor o menor valor, con respecto a los PCA. En el análisis de distribución de ARGs y profundidad, los tres primeros componentes explicaron el 67.8% de la variación de los datos; PC1 explicó 35.1% de la variación, mientras que PC2 consideró el 18.3% y PC3 el 12.4% de la variación de los datos. El componente PC1 tiene puntuaciones negativas relacionadas con la profundidad de 30-50 cm, mientras que las puntuaciones fueran positivas para las profundidades de 0-15 cm y de 15-30 cm. Con respecto al PC2, la profundidad 30-50 cm tuvo una carga positiva pero no de manera homogénea, mientras que la profundidad 15-30 cm mostró una carga negativa y la profundidad 0-15 cm mostró una carga positiva. Finalmente, PC3 tuvo una carga positiva para profundidad de 30-50 cm. El análisis demostró que los datos se agruparon estrechamente, y se ve muy poco la agrupación de cada una de las profundidades.

La Figura 14 muestra las puntuaciones de los tres primeros componentes considerando el grado de conservación de las muestras analizadas. Los primeros tres explicaron el 65.8 % de la variabilidad de los datos. El PC1 explicó el 35.1% de las variaciones, mientras que el PC2 explicó el 18.3% y el PC3 el 12.4% de la variación total. En cuanto a las puntuaciones de los compuestos en PC3 el punto del sitio perturbado esta casi al cero con PC3, casi al 0 con PC2 y casi 0 con PC1. Si se observa una relacion pero no muy clara, por lo que no hay una clara separación de las muestras del sitio perturbado y conservado. No se puede decir que existe diferencia entre la presencia de genes entre los sitios perturbado y conservado.

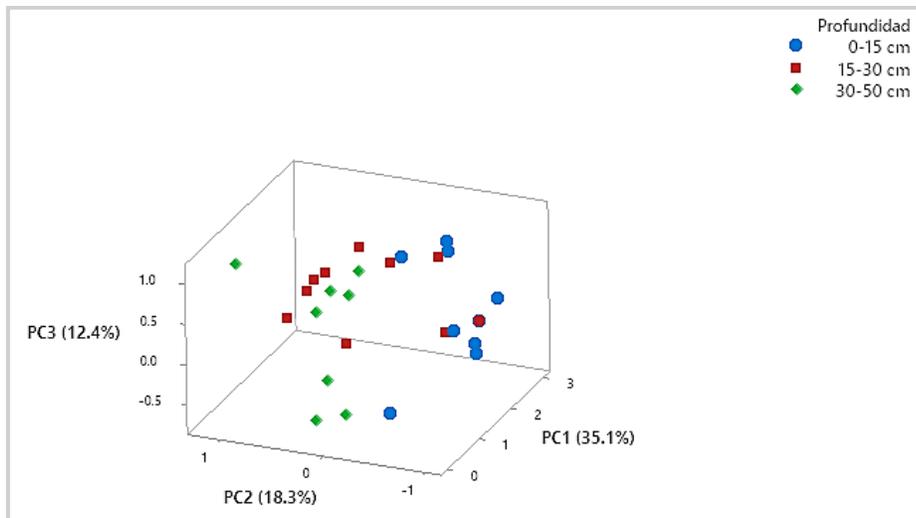


Figura 13: Análisis de Componentes principales (PCA) de los genes de resistencia frente a la profundidad de las muestras de sedimento analizadas. Se muestran las puntuaciones de cada profundidad para los tres primeros PCA.

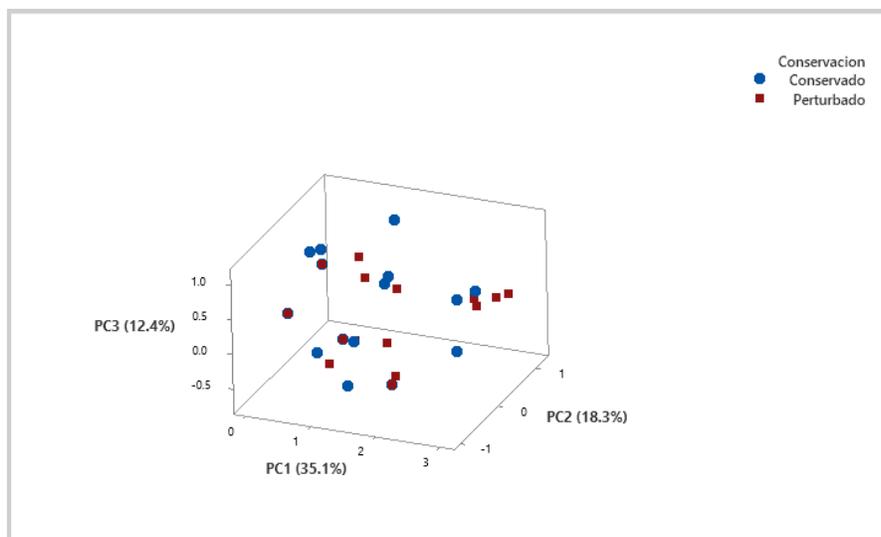


Figura 14: Análisis de Componentes principales (PCA) de los genes de resistencia frente al sitio conservado y sitio perturbado de las muestras de sedimento analizadas. Se muestran las puntuaciones de cada profundidad para los tres primeros PCA.

## 7.7 Abundancia de Int y ARGs en bacterias de manglar en un sitio conservado y perturbado

Se procesaron un total de 113 aislamientos de 10 muestras de sedimentos en el manglar de San Carlos, Baja California Sur, para determinar la presencia de algunos genes de resistencia antibióticos. Los resultados de esta investigación demuestran que



el perfil de resistencia a los ARGs de las bacterias aisladas de estas muestras es muy similar a las que ya se han reportado previamente en algunos manglares y estuarios de China (Su et al., 2014; Chen et al., 2015; Li et al., 2016).

Se muestra que en el caso del gen *int1* (Figura 15) se detectó en mayor porcentaje en el sitio perturbado, a diferencia del sitio conservado donde tuvo una prevalencia del 2%. Los genes se presentaron más en bacterias Gram positivas, aunque en reportes anteriores se reportó que se presenta con mayor frecuencia en bacterias Gram negativas (Singh et al., 2021). La presencia de este gen en el estudio donde se analizaba la presencia de *int1* en India, arrojó que el *int1* estuvo presente en el 75% de los aislamientos, lo que denotaba su alta prevalencia. Estas prevalencias se encuentran en el rango reportado para bacterias aisladas en ambientes acuáticos en otras regiones del mundo (Chen et al., 2015). Es decir, se encuentran asociadas a los gradientes de impacto antropogénico, se presentaron en mayor medida en el subsitio 2 (SCC2 y CFE2). Los integrones muestran su diversidad en entornos distintos al clínico.

Los genes de resistencia a las sulfonamidas 1 y 2, mostraron una abundancia muy alta, sobre todo en el sitio conservado, en el sitio perturbado el *su12* predominó muy poco. Esto gracias al patrón de uso en la acuicultura, al igual que el *int1* predominó en los subsitios 2 de cada sitio. Estos se detectaron en bacterias Gram positivas y negativas, aunque normalmente se detectan en Gram negativas y prevalecen entre patógenos humanos y animales, pero se distribuye de forma diferente en las poblaciones bacterianas. En estudios previos se reporta que alrededor de 63% de las muestras portaban al menos uno de los genes de resistencia a las sulfonamidas (Adelowo et al., 2018).

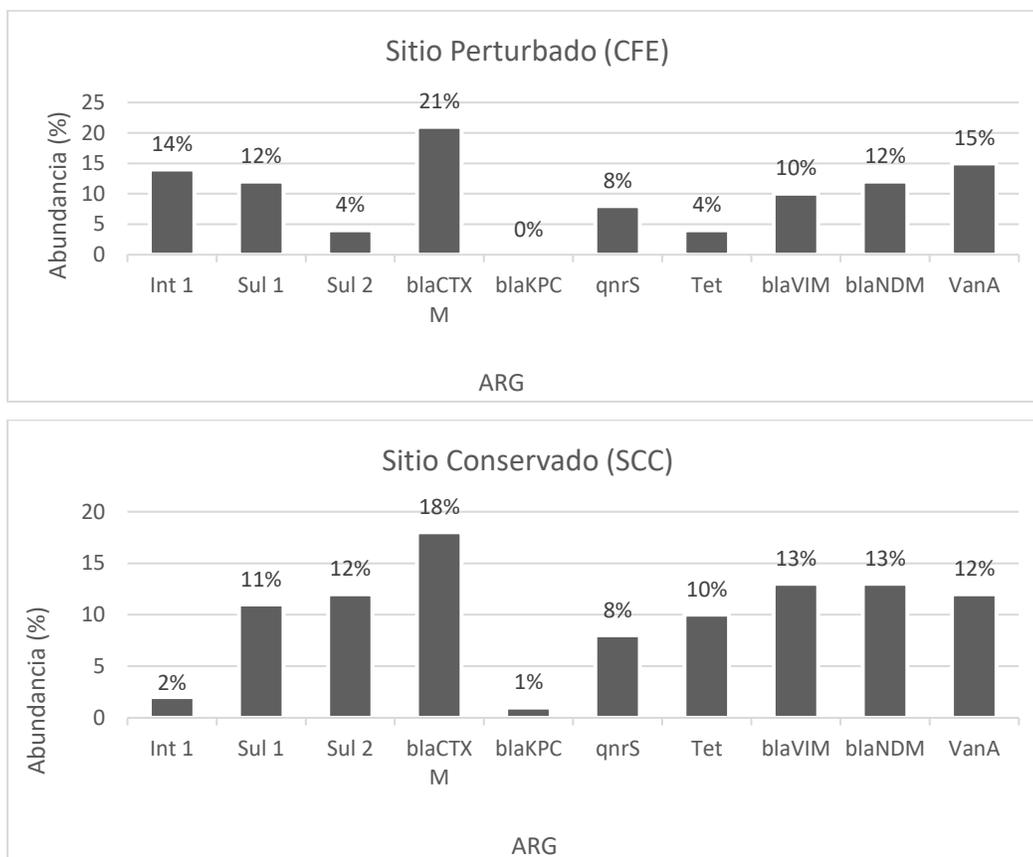


Figura 15: Abundancias de genes de resistencia en bacterias, a las sulfonamidas (*sul1* y *sul2*), *blaCTX-M*, *blaKPC*, *qnrS*, *tetA*, *blaVIM*, *blaNDM*, *vanA* y el integrón clase 1 (Int 1).

En cuanto a *tetA*, se encuentra sobre todo en bacilos Gram negativos, consistente con lo reportado en este estudio, donde prevalecieron en ambos sitios. Se ha informado una incidencia muy alta en *Salmonella*, *Enterococcus* y *E. coli* en distintos lugares con resultados similares. Se considera un gen que se encuentra en distintos sitios de acuicultura, en sitios prístinos, pero sin la necesidad de presión selectiva (Deng et al., 2020). Por eso no es raro haber sido encontrado en SCC.

El gen *blaCTX-M* fue el que tuvo una mayor prevalencia tanto en el sitio perturbado como conservado y prevalecieron en bacterias Gram positivas para el sitio de la CFE y en SCC prevalecieron las Gram negativas. Estos hallazgos al igual que otras (Bevan et al., 2017; Zango et al., 2019) donde se indica que la resistencia a antibióticos  $\beta$  lactámicos y sulfonamida 1 y 2, quinolonas y tetraciclinas se encuentra muy extendido en manglares y en entornos acuáticos como estanques de acuicultura



y planta de tratamiento de aguas residuales. En el caso de los  $\beta$ -lactámicos y sulfonamidas se han utilizado ampliamente en Bahía Magdalena, debido a sus principales actividades económicas como lo es la acuicultura y granjas de camarones, que se encuentran cerca de los manglares. Además, es una de las principales preocupaciones según la OMS (2020), porque antes se asociaba con entornos hospitalarios y este se encontraba muy extendido. De hecho, es la más diseminada a nivel mundial y su principal anfitrión es *E. coli*, donde ha tenido grandes porcentajes reportados en aislamientos tanto en Europa, Asia y América (Bevan et al., 2017).

Al presentarse en bacterias Gram negativas se toma como un marcador importante para poder estudiar la diseminación que tiene en el medio ambiente y así eventualmente determinar los riesgos asociados, debido a que ya es muy limitado las alternativas terapéuticas. En bacilos Gram negativos indica que existe una gran capacidad de diseminación y de transferencia horizontal. Esto es debido al cuidado deficiente por lo que se permite un mayor ciclo de *E. coli* productora de CTX-M. Se encontraron en los 5 subsitios, esto es de acuerdo con las proximidades que tenían algunos sitios. Para comprender la dimensión de este problema se tiene estimado que diariamente se liberan millones de *E. coli* que son productoras de BLEEs a aguas residuales en algunos países, por medio de instalaciones sanitarias e industrias; sin embargo, la comunidad en general es la que más descarga (Singh et al., 2021).

En cuanto a las carbapenemasas, han causado alarma debido a los patógenos que pueden acarrearla. Al igual que *bla*CTX-M se encuentra en entornos nosocomiales, pero este se puede diseminar. Por ejemplo, se ha detectado que el gen Nueva Delhi metalo- $\beta$ -lactamasa-1 (*bla*NDM-1) es muy abundante en muestras de aguas residuales como en sedimentos esto se comprueba porque fue de los genes en donde hubo una mayor presencia en estos sitios de manglar y en bacterias Gram positivas. Este gen se ha asociado a 11 especies en donde se incluye a *Vibrio cholerae*, y *Shigella boydii* y que algunos aislamientos que portan este gen son altamente resistentes a todos los antibióticos. Además de que se ha reportado que el 22% de las bacterias cultivadas se identificaron como bacterias portadoras de *bla*NDM, *bla*VIM y *bla*OXA (Mills y Lee, 2019). Estos tienen el potencial para transmitirse por



todo el mundo, sin embargo, no se encuentra bien documentados y estos se describen sobre todo en bacterias Gram positivas como *Bacillus*. Entre las más diseminadas son KPC, OXA, VIM y NDM (Yin et al., 2019). Se tiene estimado que las bacterias Gram negativas acumulan genes que codifican carbapenemasas, provocando un aumento de concentraciones inhibitorias de estos genes y por lo tanto un tratamiento más difícil (Mills y Lee, 2019). Es por esto que es necesario conocer el estudio actual sobre las carbapenemasas para que no siga persistiendo esta amenaza para la salud.

El gen menos prevalente fue *blaKPC* tanto en ambos sitios, esto pudo deberse a que bajo las condiciones de cultivo es posible que se seleccionen solo un grupo de microorganismos. Por ende, la evaluación de la presencia de ARGs basado en bacterias no generará resultados no representativos. Este es el gen que causa más problemáticas por la asociación que tiene con los plásmidos y con *Klebsiella pneumoniae*, el cual tiene la capacidad de diseminar los ARGs gracias a que se encuentra vinculado con el clon (secuencia ST-258).

En cuanto a las MBL predominan en bacterias Gram negativas. VIM es frecuente en enterobacterias y en *Pseudomonas aeruginosa*. Es un gen muy importante, se aisló en Nueva Delhi, pero fue adquirido por bacterias y transportado a otros países. Son dominantes principalmente en *K. pneumoniae* y *E. coli*, además de *Acinetobacter baumannii* y *P. aeruginosa*. En un estudio publicado por Wallace y colaboradores (2019) investigaron acerca de bacterias portadoras del gen *blaKPC* en sedimentos de manglares a lo largo del Río Aníll donde las muestras fueron tomadas a los primeros 10 cm de profundidad. En ese lugar recibe una liberación de efluentes domésticos sin tratar y se determinó que la mayoría de las bacterias Gram negativas portaban el gen *blaKPC*.

En el presente estudio el gen *qnrS* tuvo una prevalencia del 8% para ambos sitios. Este gen se distribuyó dinámicamente entre los 5 subsitios, sobre todo en el SCC2 en el sitio conservado. Estos resultados son diferentes a lo que se ha reportado previamente, puesto que en manglares estudiados en China, se encuentran como uno de los genes de mayor prevalencia y que se encuentran en la mayoría de las bacterias con frecuencias de hasta 71% (Gao et al., 2012).

Se han descrito 9 genes que confieren resistencia a la vancomicina, pero el más preocupante en cuanto a la salud pública es el gen *vanA*, la cual se relaciona con infecciones por enterococos. En la Figura 14 se observa que tiene una prevalencia de 12 y 15% en el sitio conservado y perturbado respectivamente, presentándose en gran medida en bacterias Gram positivas. El gen *vanA* rara vez se ha encontrado en entornos ambientales, estos se encuentran presentes en bacterias Gram positivas y sobre todo *Staphylococcus aureus*. Es considerado una gran amenaza para la salud pública (Kraemer et al., 2019; Berendonk et al., 2015) debido a que existen estudios que no los han encontrado en entornos prístinos y otros estudios informan que se ha encontrado muy poco en aislamientos de aguas residuales y en manglares. Su monitoreo es necesario para comprender su propagación (Young et al., 2016).

La presión selectiva se ve favorecida por distintas condiciones ambientales y una mayor cantidad de compuestos aumentan la biomasa y diversidad se ve aminorada por una competencia, lo cual trae como consecuencia adaptaciones por medio de mecanismos genéticos que favorecen la transmisión de genes de resistencia. Esto muestra una diversidad biológica que se encuentra después de las liberaciones de efluentes, se esperaba esto debido a las descargas provenientes de la termoeléctrica. La evidencia de la presencia de estos genes en bacterias Gram negativas y positivas indica que existe una propagación de estos genes y que tiene su origen en entornos tanto perturbado como conservado y que traerá como consecuencia una diseminación entre la población.

### **7.8 Correlación entre la profundidad, grado de conservación y salinidad en la diseminación de Int 1 y ARGs en bacterias**

Se realizó un análisis de correlación de las bacterias, tomando en cuenta el grado de conservación, la profundidad de las muestras y la salinidad del medio en el que se aisló (0, 1.5 y 3% p/v de NaCl) (Figura 16). En la cual podemos observar que existe la presencia del gen *int1* en sitios perturbados. Las cepas aisladas en sitios perturbados tienen una mayor proporción de cepas con Int por eso es positiva esa correlación. Claramente se observan que los valores de correlación son muy pequeños. Al igual que en los resultados de sedimentos, la profundidad sigue teniendo un papel muy



importante en la diseminación de genes, como en el caso de *sul2*, *blaCTX-M*, *qnrS*, *blaVIM*, *vanA*, *sul1* tiene una correlación significativa ( $p < 0.05$ ), a una mayor profundidad menor es la presencia de estos genes.

Otro constituyente altamente relevante en este caso es la salinidad, es uno de los factores abióticos más importantes, pues se tiene documentado que ejerce una gran influencia en la propagación de ARGs (Tan et al., 2019). Se utilizó como un factor para el aislamiento de las cepas bacterianas para poder determinar la capacidad de bacterias para crecer en diferente porcentaje de salinidad, de donde se tomaron distintas concentraciones de NaCl, para poder determinar la correlación que existe con la abundancia de los genes de resistencia.

El gen *sul1* se correlaciona con la salinidad, es decir que a una alta salinidad menor es la prevalencia de ARGs, por lo tanto, podría ser un factor importante que module la distribución de ARGs (Yin et al., 2019). Previamente se ha reportado que el gen *sul1* había disminuido drásticamente su concentración, gracias a que se agregó salinidad de 20 a 45 ppt, pero también hay que tomar en consideración que *sul1* tanto en agua como en sedimentos disminuye la salinidad cuando se promueve la eliminación de plásmidos (Shen, 2020). En cuanto a los demás genes, no existe una buena correlación en cuanto a este factor. Incluso en algunos genes como *blaKPC*, solo se presentó en el sitio perturbado y fue a una profundidad de 30 a 50 cm. Se observa que en el caso de *blaNDM* y *blaVIM*, tienen alta correlación, cuando esta uno está el otro, como se mencionó en resultado de sedimentos.

Existe evidencia que, entre distintos factores del suelo, la salinidad impone una presión selectiva sobre la evolución de las comunidades bacterianas. La literatura actual nos habla de distintas direcciones que tiene la salinidad, por ejemplo, se ha encontrado que la salinidad no afecta la existencia de bacterias resistentes, pero si de genes de resistencia (Shen, 2020).

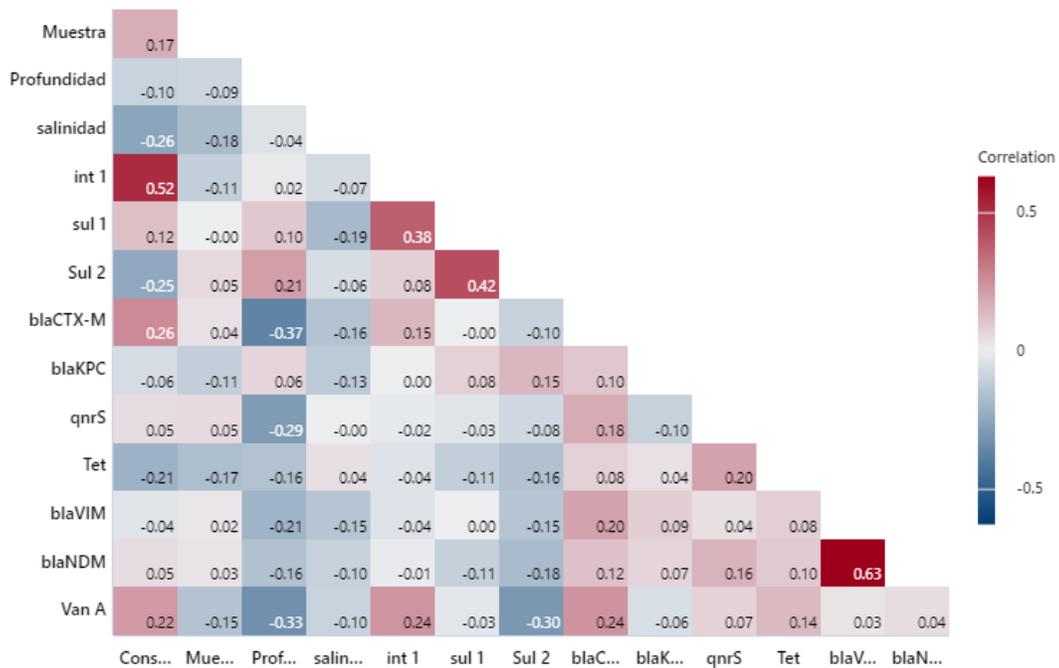


Figura 16: Correlograma de muestras de bacterias, considerando el grado de conservación, la profundidad y los genes de resistencia a antibióticos.

### 7.9 Análisis de Componentes Principales de los Genes de Resistencia a Antibióticos y profundidad en bacterias

Con el fin de identificar mejor la relación entre diseminación de los genes de resistencia en los sitios de los manglares y la profundidad de los aislamientos bacterianos, los datos fueron analizados mediante análisis de componentes principales, que ayuda a identificar asociaciones que son difíciles de ver a simple vista, como se muestra en la Figura 16.

La relación de la distribución de los genes de resistencia a antibióticos de las muestras analizadas y su profundidad con los tres primeros componentes identificado por PCA, se muestran en la Figura 17. Los tres primeros componentes explicaron el 56.7% de la variación de los datos; PC1 explicó 23.2% de la variación, mientras que PC2 consideró el 17.6% y PC3 el 15.9% de la variación de los datos. El análisis demostró que los datos no se agruparon estrechamente, se ve muy poco la agrupación de cada una de las profundidades, en especial la profundidad de 15-30 cm.

Con el fin de comparar la presencia de los ARGs en los sitios perturbado y conservado se muestra el análisis de PCA de tal manera que con el análisis anterior se pueda observar si existe una diferencia en la agrupación (Figura 18). Se muestra las puntuaciones de los tres primeros componentes considerando el grado de conservación de las muestras analizadas. Los primeros tres explicaron el 56.7% de la variabilidad de los datos. El PC1 explicó el 23.2% de las variaciones, mientras que el PC2 explicó el 17.6% y el PC3 el 15.9% de la variación total. Si se ve una relación pero no hay una clara separación de las muestras del sitio perturbado y conservado. No se puede decir que en el sitio perturbado hay unos genes y en el conservado no existe.

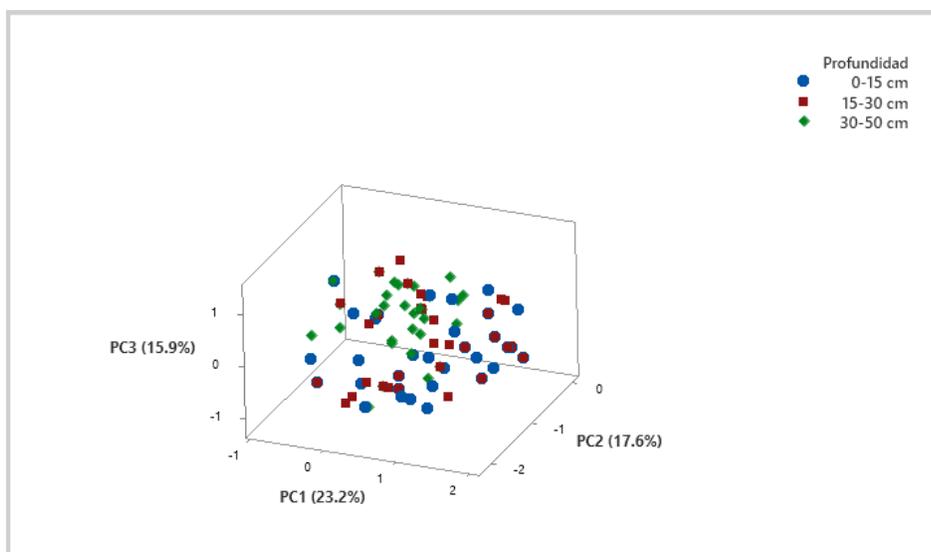


Figura 17: Análisis de Componentes principales (PCA) de los genes de resistencia frente a la profundidad de las bacterias aisladas. Se muestran las puntuaciones de cada profundidad para los tres primeros PCA.

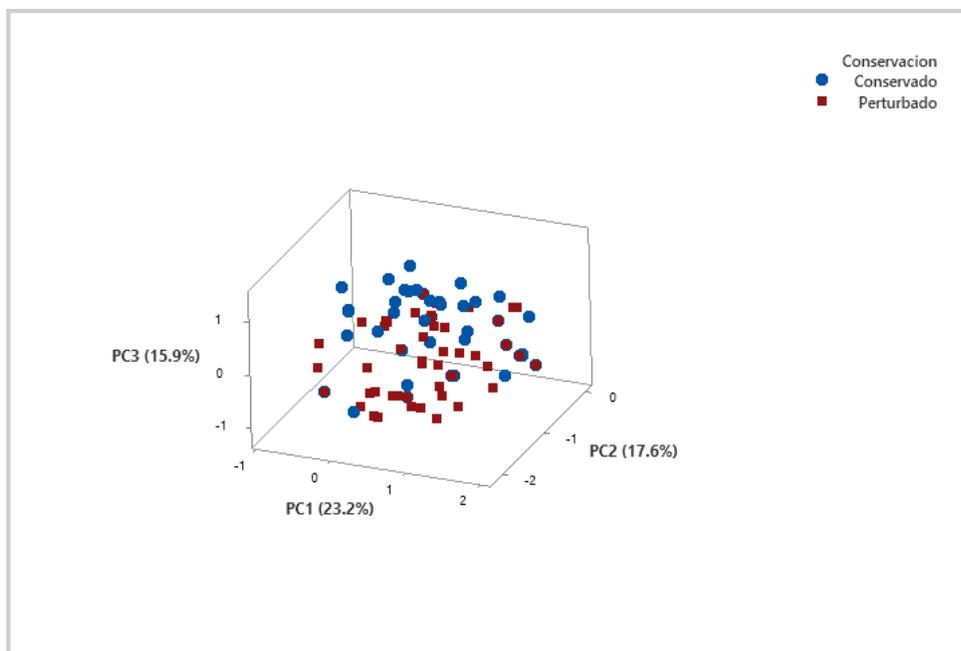


Figura 18: Análisis de Componentes principales (PCA) de los genes de resistencia frente al sitio conservado y sitio perturbado de las bacterias aisladas. Se muestran las puntuaciones de cada profundidad para los tres primeros PCA.



## 8. CONCLUSIONES

El presente estudio proporcionó datos sobre la prevalencia de diversos genes de resistencia a antibióticos en los sedimentos y bacterias de un manglar de Baja California Sur. De todos los genes evaluados, *int1*, *sul1*, *sul2*, *blaCTX-M* y *vanA* fueron los más prevalentes en sedimentos y bacterias, con tendencia creciente al impacto antropogénico, siendo el gen menos prevalente *blaKPC*. Factores como la salinidad del medio en el que se aislaron y la profundidad mostraron fuertes correlaciones con la distribución de ARGs, además de que el integrón tuvo una correlación significativa en cuanto a *sul1*, tanto en sedimentos como en bacterias. Estos hallazgos tienen implicaciones para la salud pública considerando la posible transmisión de ARGs ambientales a patógenos humanos o comensales en condiciones de estrés. Comprender las tensiones ambientales que mantienen el resistoma ambiental es esencial para el desarrollo de estrategias efectivas para minimizar la diseminación de ARGs.



## 9. REFERENCIAS

Aburto O., Ezcurra, E., Danemann, G., Valdez, V., Murray, J., & Sala, E. (2008). Mangroves in the Gulf of California increase fishery yields. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(30), 10456–10459. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804601105>

Adame Gallegos, J., Nevárez Moorillón, G., Palacios López, O., & Rivera Chavira, B. (2020). Monitoreo e impacto antropogénico en manglares de México. *CienciAcierta*, 64, 1–8: 2683-1848

Adelowo, O. O., Helbig, T., Knecht, C., Reincke, F., Mäusezahl, I., & Müller, J. A. (2018). High abundances of class 1 integrase and sulfonamide resistance genes, and characterisation of class 1 integron gene cassettes in four urban wetlands in Nigeria. *PLOS ONE*, 13(11), e0208269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208269>

Akrami, F., Rajabnia, M., & Pournajaf, A. (2019). Resistance integrons; A mini review. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 10, 370–376. <https://doi.org/10.22088/cjim.10.4.370>

Alatorre, L. C., Sánchez-Carrillo, S., Miramontes-Beltrán, S., Medina, R. J., Torres-Olave, M. E., Bravo, L. C., & Sánchez. (2016). Temporal changes of NDVI for qualitative environmental assessment of mangroves: Shrimp farming impact on the health decline of the arid mangroves in the Gulf of California (1990-2010). *Journal of Arid Environments*, 125, 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2015.10.010>

Bengtsson Palme, J., Angelin, M., Huss, M., Kjellqvist, S., Kristiansson, E., Palmgren, H., & Johansson, A. (2015). The human gut microbiome as a transporter of antibiotic resistance genes between continents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(10), 6551–6560. <https://doi.org/10.1128/AAC.00933-15>



Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., & Martinez, J. L. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 310–317. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>

Berglund, B. (2015). Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Infection Ecology & Epidemiology*, 5(1), 28564. <https://doi.org/10.3402/iee.v5.28564>

Bevan ER, Jones AM, & Hawkey PM, (2017). Global epidemiology of CTX-M  $\beta$ -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *The journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1;72(8):2145-2155. doi: 10.1093/jac/dkx146. PMID: 28541467.

Breceda, A., Galina, P., & Bermúdez, B. (2016). Los sitios Ramsar de Baja California Sur, México: Problemática y Perspectivas. *Áreas Naturales Protegidas SCRIPTA*, 2(2), 127–144. <https://doi.org/10.18242/anpscripta.2016.02.02.02.0007>

Brenner, L., Engelbauer, M., & Job, H. (2018). Mitigating tourism-driven impacts on mangroves in Cancún and the Riviera Maya, Mexico: an evaluation of conservation policy strategies and environmental planning instruments. *Journal of Coastal Conservation*, 22(4), 755–767. <https://doi.org/10.1007/s11852-018-0606-0>

Brolund, A., Sundqvist, M., Kahlmeter, G., & Grape, M. (2010). Molecular characterisation of trimethoprim resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during a two-year intervention on trimethoprim use. *PLoS ONE*, 5(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009233>

Cabral, L., Júnior, G. V. L., Pereira de Sousa, S. T., Dias, A. C. F., Lira Cadete, L., Andreote, F. D., & de Oliveira, V. M. (2016). Anthropogenic impact on mangrove sediments triggers differential responses in the heavy metals and antibiotic resistomes of microbial communities. *Environmental Pollution*, 216, 460–469. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.078>



Castellanos G. T. (2014). Mecanismos de resistencia a betalactámicos en bacterias gramnegativas. *Revista Cubana de Salud Pública*. 40(1), 129-135. <https://doi.org/0864-34663>

Cergole Novella, M. C., Pignatari, A. C. C., Castanheira, M., & Guth, B. E. C. (2011). Molecular typing of antimicrobial-resistant Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains (STEC) in Brazil. *Research in Microbiology*, 162(2), 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.09.022>

Cervantes Duarte, R., Santos-Echeandía, J., Rodríguez-Herrera, J. J., & Marmolejo-Rodríguez, A. J. (2020). Holistic study of water quality in the littoral of puerto San Carlos, Baja California Sur, Mexico. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 36(4), 927–943. <https://doi.org/10.20937/RICA.53776>

Che, Y., Xia, Y., Liu, L., Li, A. D., Yang, Y., & Zhang, T. (2019). Mobile antibiotic resistome in wastewater treatment plants revealed by Nanopore metagenomic sequencing. *Microbiome*, 7, 44 (2019). <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0663-0>

Chen, B., Liang, X., Nie, X., Huang, X., Zou, S., & Li, X. (2015). The role of class I integrons in the dissemination of sulfonamide resistance genes in the Pearl River and Pearl River Estuary, South China. *Journal of Hazardous Materials*, 282, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.06.010>

Chen, L., Li, C., Feng, Q., Wei, Y., Zheng, H., Zhao, Y., & Li, H. (2017). Shifts in soil microbial metabolic activities and community structures along a salinity gradient of irrigation water in a typical arid region of China. *Science of the Total Environment*, 598, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.105>

CONABIO, Comisión Nacional de Biodiversidad (2008). Sitios de manglar con relevancia biológica y con necesidades de rehabilitación ecológica. [En línea].



Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/manglares/doctos> Fecha de consulta: 26 de junio de 2020.

CONABIO, Comisión Nacional de Biodiversidad (2017). Manglares de México. [En línea]. Disponible en: <https://www.biodiversidad.gob.mx/ecosistemas/manglares>. Fecha de consulta: 27 de junio de 2020.

CONABIO, Comisión Nacional de Biodiversidad (2020). Sitios prioritarios. [En línea]. Disponible en: <https://www.biodiversidad.gob.mx/monitoreo/smmm/sitiosPrioritarios> Fecha de consulta: 27 de junio de 2020.

Deng, C., Liu, X., Li, L., Shi, J., Guo, W., & Xue, J. (2020). Temporal dynamics of antibiotic resistant genes and their association with the bacterial community in a water-sediment mesocosm under selection by 14 antibiotics. *Environment International*, 137, 105554. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105554>

Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., & Yu, G. (2015). Resistance integrons: Class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14, 45 (2015). 141–160 <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0100-6>

DOF. Diario Oficial de la Federación. (2003). NOM-021-SEMARNAT-2000. [En línea]. Disponible en: <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69255.pdf>. Fecha de consulta: 23 de junio de 2021

DOF. Diario Oficial de la Federación. (2009). NOM-059-SEMARNAT-201027. [En línea]. Disponible en: [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle\\_popup.php?codigo=5173091](https://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5173091). Fecha de consulta: 23 de junio de 2021

Donato, D. C., Kauffman, J. B., Murdiyarso, D., Kurnianto, S., Stidham, M., & Kanninen, M. (2011). Mangroves among the most carbon-rich forests in the tropics. *Nature Geoscience*, 4(5), 293–297. <https://doi.org/10.1038/ngeo1123>



FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2017). Resistencia a los antimicrobianos: lo que necesitas saber. [En línea]. Disponible en: <http://www.fao.org/zhc/detail-events/es/c/452719/> Fecha de consulta: 23 de junio de 2021

Gao, P., Mao, D., Luo, Y., Wang, L., Xu, B., & Xu, L. (2012). Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment. *Water Research*, 46(7), 2355–2364. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.02.004>

González A. C., & Cardona J. A. (2018). Revisión sistemática sobre elementos genéticos móviles portadores de genes de resistencia a antibióticos en aguas residuales, 2000-2017. *IMedPub Journals*.14 (2), 1698-9465. <https://doi.org/10.3823/1387>

Gootz, T. D., Lescoe, M. K., Dib-Hajj, F., Dougherty, B. A., He, W., Della-Latta, P., & Huard, R. C. (2009). Genetic organization of transposase regions surrounding *bla*KPC carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City Hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(5), 1998–2004. <https://doi.org/10.1128/AAC.01355-08>

Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., & Andersson, D. I. (2011). Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathogens*, 7(7), e1002158. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002158>

Hoang, P., Managaki, S., Nakada, N., Takada, H., Shimizu, A., Anh, D. H., ... Suzuki, S. (2011). Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. *Science of The Total Environment*, 409(15), 2894–2901. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.04.030>

Hoang Phuong, P. T., Nonaka, L., Hung Viet, P., & Suzuki, S. (2008). Detection of the *su1*, *su2*, and *su3* genes in sulfonamide-resistant bacteria from wastewater and



shrimp ponds of north Vietnam. *Science of The Total Environment*, 405(1–3), 377–384. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.023>

Holguin, G., Gonzalez Z, P., de-Bashan, L. E., Mendoza, R., Amador, E., & Bashan, Y. (2006). Mangrove health in an arid environment encroached by urban development-a case study. *Science of the Total Environment*, 363(1–3), 260–274. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.05.026>

Hu, Y., Gao, G. F., & Zhu, B. (2017). The antibiotic resistome: gene flow in environments, animals and human beings. *Frontiers of Medicine*, Vol. 11, pp. 161–168. <https://doi.org/10.1007/s11684-017-0531-x>

Huang, Z., Zhao, W., Xu, T., Zheng, B., & Yin, D. (2019). Occurrence and distribution of antibiotic resistance genes in the water and sediments of Qingcaosha Reservoir, Shanghai, China. *Environmental Sciences Europe*, 31(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0265-2>

Imchen, M., & Kumavath, R. (2021). Metagenomic insights into the antibiotic resistome of mangrove sediments and their association to socioeconomic status. *Environmental Pollution*, 268, 115795. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115795>

INECC. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. (2012). Adaptación al cambio climático en México: Visión, elementos y criterios para la toma de decisiones. México. Programas de las Naciones Unidas para el Desarrollo. [En línea]. Disponible en: <https://www.gob.mx/inecc/acciones-y-programas/adaptacion-al-cambio-climatico-78748>. Fecha de consulta: 23 de junio de 2021.

INSP. Instituto Nacional de Salud Pública. (2020). 40% de antibióticos vendidos en México, sin receta médica. [En línea]. Disponible en: <https://www.insp.mx/noticias/sistemas-de-salud>. Fecha de consulta: 23 de junio de 2021



Kraemer, S. A., Ramachandran, A., & Perron, G. G. (2019). Antibiotic pollution in the environment: From microbial ecology to public policy. *Microorganisms*, 7(6), 180. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060180>

Kristiansson, E., Fick, J., Janzon, A., Grabic, R., Rutgersson, C., & Weijdegård, B., Joakim Larsson, D. G. (2011). Pyrosequencing of antibiotic-contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer elements. *PLoS ONE*, 6(2), 17038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017038>

Lai, H. T., & Lin, J. J. (2009). Degradation of oxolinic acid and flumequine in aquaculture pond waters and sediments. *Chemosphere*, 75(4), 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.12.060>

Langelier, C., Graves, M., Kalantar, K., Caldera, S., Durrant, R., Fisher, M., & Leung, D. T. (2019). Microbiome and antimicrobial resistance gene dynamics in international travelers. *Emerging Infectious Diseases*, 25(7), 1380–1383. <https://doi.org/10.3201/eid2507.181492>

LaPara TM, Burch TR, McNamara PJ, Tan DT, Yan M, & Eichmiller JJ. (2011). Tertiary-treated municipal wastewater is a significant point source of antibiotic resistance genes into Duluth-Superior Harbor. *Environmental Science & Technology*, 45(22), 9543–9549. <https://doi.org/10.1021/ES202775R>

Li, J., Cao, J., Zhu, Y. G., Chen, Q. L., Shen, F., Wu, Y., & Yao, M. (2018). Global survey of antibiotic resistance genes in air. *Environmental Science and Technology*, 52(19), 10975–10984. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02204>

Li, Y., Li, Q., Zhou, K., Sun, X. L., Zhao, L. R., & Zhang, Y. Bin. (2016). Occurrence and distribution of the environmental pollutant antibiotics in Gaoqiao mangrove area, China. *Chemosphere*, 147, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.107>



Liu, M., Li, Q., Sun, H., Jia, S., He, X., Li, M., & Ye, L. (2018). Impact of salinity on antibiotic resistance genes in wastewater treatment bioreactors. *Chemical Engineering Journal*, 338, 557–563. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.01.066>

Lucas, R., & Lugo, N. M. T. A. (2014). The importance of mangroves to people: a call to action. Nairobi, Kenya: IUCN. <https://doi.org/978-92-807-33976>

Marti, E., Jofre, J., & Balcazar, J. L. (2013). Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in a river influenced by a wastewater treatment plant. *PLoS ONE*, 8(10), 78906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078906>

Matsumura, Y., Peirano, G., Devinney, R., Bradford, P. A., Motyl, M. R., Adams, M. D., & Pitout, J.D.D. (2017). Genomic epidemiology of global VIM-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(8), 2249–2258. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx148>

Mavi, M. S., Sanderman, J., Chittleborough, D. J., Cox, J. W., & Marschner, P. (2012). Sorption of dissolved organic matter in salt-affected soils: Effect of salinity, sodicity and texture. *Science of the Total Environment*, 435–436, 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.009>

Mills, M. C., & Lee, J. (2019). The threat of carbapenem-resistant bacteria in the environment: Evidence of widespread contamination of reservoirs at a global scale. *Environmental Pollution*, 113143, 0269-7491. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113143>

Moreno K. M., (2013). Carbapenémicos: tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. *Revista médica de costa rica y centroamerica LXX*, 70 (608). <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmedcoscen/rmc-2013/rmc134i.pdf>



Munir, M., Wong, K., & Xagorarakis, I. (2011). Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water Research*, 45(2), 681–693. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.033>

O'Neill. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *Antimicrobial resistance*, 84(17). <https://doi.org/10.1093/cid/ciw678>

Ohore, O. E., Addo, F. G., Han, N., Li, X., & Zhang, S. (2020). Profiles of ARGs and their relationships with antibiotics, metals and environmental parameters in vertical sediment layers of three lakes in China. *Journal of Environmental Management*, 255. 109583, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109583>

OMS. Organización Mundial de la Salud. (2020). Resistencia a los antimicrobianos. [En línea]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Fecha de consulta: 22 de junio de 2020.

Palacios, O. A., Zavala-Díaz de la Serna, F. J., Ballinas-Casarrubias, M., Espino-Valdés, M. S., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2017). Microbiological impact of the use of reclaimed wastewater in recreational parks. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(9), 1009. <https://doi.org/10.3390/ijerph14091009>

Pérez, D. (2018). Cultivando al enemigo. Los animales de granja como fábricas de bacterias resistentes a antibióticos. *Ciencia y cultura*. 15. 14–17.

Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 105(1–3), 357–584. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02928>



Pico, E. F., Serviere Zaragoza, E., Riosmena Rodríguez R., & De La Luz, J. L., (2011). Los Manglares de la Península de Baja California. 7(12). <https://doi.org/678>. 978-607-7634-06-5

Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(1), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>

Ponce de León, S. et. al., (2018). Programa Universitario de Investigación en Salud. Estado Actual de la Resistencia Antimicrobiana en México Reporte de los Hospitales de la Red del PUCRA: Resistencia antimicrobiana y Consumo de antibióticos. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México

Pruden, A., Pei, R., Storteboom, H., & Carlson, K. H. (2006). Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in northern Colorado. *Environmental Science and Technology*, 40(23), 7445–7450. <https://doi.org/10.1021/es060413l>

Rodríguez F, R. (2007). Estudios ecológicos en Bahía Magdalena. México: ISBN [http://148.204.122.250/boletin/wp-content/uploads/2009/03/tabla\\_contenidos.pdf](http://148.204.122.250/boletin/wp-content/uploads/2009/03/tabla_contenidos.pdf)

Rowe Magnus, D. A., & Mazel, D. (2002). The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(2), 115–125. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00197>

SEMARNAT. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2016). Los manglares mexicanos [En línea]. Disponible en <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/manglares-mexicanos>: Fecha de consulta: 15 de octubre.

Seyfried, E. E., Newton, R. J., Rubert IV, K. F., Pedersen, J. A., & McMahon, K. D. (2010). Occurrence of tetracycline resistance genes in aquaculture facilities with



varying use of oxytetracycline. *Microbial Ecology*, 59(4), 799–807. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9624-7>

Shahid, M. (2010). *Citrobacter* spp. simultaneously harboring blaCTX-M, blaTEM, blaSHV, blaampC, and insertion sequences IS26 and orf513: An evolutionary phenomenon of recent concern for antibiotic resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(5), 1833–1838. <https://doi.org/10.1128/JCM.01467-09>

Shao, S., Hu, Y., Cheng, J., & Chen, Y. (2018). Research progress on distribution, migration, transformation of antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs) in aquatic environment. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38, 1195–1208. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1471038>

Shen, S. (2020). Antibiotic Resistant Bacteria, Antibiotic Resistance Genes and Antibiotic Resistant Bacteria, Antibiotic Resistance Genes and Potential Drivers in the Aquatic Environments. *Dissertations*. 1746. <https://aquila.usm.edu/dissertations/1746>

Singh, N. S., Singhal, N., Kumar, M., & Viridi, J. S. (2021). High prevalence of drug resistance and class 1 integrons in *Escherichia coli* isolated from river Yamuna, India: A Serious Public Health Risk. *Frontiers in Microbiology*, 12, 35. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.621564>

Strommenger, B., Kettlitz, C., Werner, G., & Witte, W. (2003). Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4089–4094. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4089-4094.2003>

Su, H. C., Pan, C. G., Ying, G. G., Zhao, J. L., Zhou, L. J., Liu, Y. S., ... He, L. Y. (2014). Contamination profiles of antibiotic resistance genes in the sediments at a catchment scale. *Science of the Total Environment*, 490, 708–714. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.060>



Subirats, J. (2017). Real-time PCR assays for the detection and quantification of carbapenemase genes (*blaKPC*, *blaNDM*, and *blaOXA-48*) in environmental samples. *Environmental Science and Pollution Research International*. 48:3014–3020. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8426-6>

Tan, L., Wang, F., Liang, M., Wang, X., Das, R., Mao, D., & Luo, Y. (2019). Antibiotic resistance genes attenuated with salt accumulation in saline soil. *Journal of Hazardous Materials*, 374, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.04.020>

Tripathi, V., & Cytryn, E. (2017). Impact of anthropogenic activities on the dissemination of antibiotic resistance across ecological boundaries. *Essays in Biochemistry*, 61(1):11-21. <https://doi.org/10.1042/EBC20160054>

Volkman, H., Schwartz, T., Bischoff, P., Kirchen, S., & Obst, U. (2004). Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *Journal of Microbiological Methods*, 56(2), 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.10.014>

Wallace Ribeiro N. N., Mendes Araujo J. M., Ferreira da Silva, Melo Monteiro J., Borges Pachêco W., Nascimento Santos J. R., Souza Monteiro A. (2019). Detection of Gram-Negative bacteria carrying the *blaKPC-2* gene from mangrove sediments. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7 (8): 485-492. <https://doi.org/10.17265/2328-2150/2019.08.004>

Wen, Q., Yang, L., Duan, R., & Chen, Z. (2016). Monitoring and evaluation of antibiotic resistance genes in four municipal wastewater treatment plants in Harbin, Northeast China. *Environmental Pollution*, 34-40, 0269-7491 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.043>



WHSRN. Red hemisférica de reservas para aves playeras. (2009). Bahía Magdalena [En línea]. Disponible en [https://whsrn.org/es/whsrn\\_sites/bahia-magdalena/](https://whsrn.org/es/whsrn_sites/bahia-magdalena/): Fecha de consulta: 23 de junio de 2021

Yin, X., Deng, Y., Ma, L., Wang, Y., Chan, L. Y. L., & Zhang, T. (2019). Exploration of the antibiotic resistome in a wastewater treatment plant by a nine-year longitudinal metagenomic study. *Environment International*, 133, 105270 <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105270>

Young, S., Nayak, B., Sun, S., Badgley, B. D., Rohr, J. R., & Harwood, V. J. (2016). Vancomycin-resistant *enterococci* and bacterial community structure following a sewage spill into an aquatic environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(18), 5653–5660. <https://doi.org/10.1128/AEM.01927-16>

Zango U., Ibrahim, M., Shawai, S.A.A., & Shamsuddin, M. I. (2019). A review on  $\beta$ -lactam antibiotic drug resistance. *Drug Design, Development and Therapy*. 3(2):5258. <https://doi.org/10.15406/mojddt.2019.03.00080>

Zapién Chavarría A. K. (2021). Aislamiento e identificación de cepas resistentes a antibióticos en manglares árido-tropicales. (Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, México).

Zhanel, G. G., DeCorby, M., Nichol, K. A., Baudry, P. J., Karlowsky, J. A., Lagace-Wiens, P. R. S., & Hoban, D. J. (2008). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant *enterococci* and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in intensive care units in Canada: Results of the Canadian National Intensive Care Unit (CAN-ICU) study (2005-2006). *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 19(3), 243–249. <https://doi.org/10.1155/2008/714846>



Zhang, Z. W., Xu, X. R., Sun, Y. X., Yu, S., Chen, Y. S., & Peng, J. X. (2014). Heavy metal and organic contaminants in mangrove ecosystems of China: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(20), 11938–11950. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3100-8>

Zhao, H., Yan, B., Mo, X., Li, P., Li, B., Li, Q., & Jiang, C. (2019). Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in the subtropical mangrove wetland ecosystem of South China Sea. *MicrobiologyOpen*, 8, e871 <https://doi.org/10.1002/mbo3.871>

## 10. ANEXOS

### Anexo I. Protocolo de extracción de ADN de cepas bacterianas

PROTOCOLO: ZymoBIOMICSTM DNA Miniprep Kit

1. Añada la muestra a un tubo ZR BashingBead lysis tubes (0.1 y 0.5 mm). Añada 750 µl de ZymoBIOMICS lysis solution al tubo y ciérralo bien.

Tipo de muestra	Cantidad máxima
Heces	200 mg
Suelo	250 mg
Muestras líquidas	250 µL
Células	50-100 mg
Muestras en DNA/RNA	< 1ml

2. Dar vortex a máxima velocidad por  $\geq 5$  min dependiendo el tipo de muestra. (Nota: El tiempo de procesamiento variará en función de la muestra y del mezclador utilizado).

3. Centrifugar los tubos ZR BashingBead lysis tubes (0.1 y 0.5 mm) en una microcentrífuga a  $\geq 10.000 \times g$  durante 1 min.

4. Transfiera hasta 400 µl del sobrenadante al filtro Zymo-Spin III-F filter en un tubo de recolección y centrifugue a  $8,000 \times g$  durante 1

5. Preparación de la “unión”.

Heces y muestras que no son de suelo	Muestras de suelo
Añade 1,200 µl de <b>ZymoBIOMICS DNA binding buffer</b> al filtrado en el tubo de recolección del paso 4. <u>Mezclar bien.</u>	Añada 800 µl de <b>ZymoBIOMICS DNA Binding buffer</b> y 400 µl de etanol 95% al filtrado en el tubo de recolección del paso 4. <u>Mezclar bien.</u>

6. Transfiera 800 µl de la mezcla del paso 5 a una columna Zymo-Spin IICR Column en un tubo de recolección y centrifugue a  $10,000 \times g$  durante 1 min.

7. Descarte el flujo a través del tubo de recolección y repita el paso 6.

8. Añada 400µl de ZymoBIOMICS DNA Wash buffer 1 a la columna Zymo-Spin IICR column en un nuevo tubo de recolección y centrifugue a  $10,000 \times g$  durante 1 min. Descarte el flujo.



9. Añada 700µl de ZymoBIOMICS DNA Wash Buffer 2 a la columna Zymo-Spin™ IICR Column en un tubo de recolección y centrifugue a 10,000 x g durante 1 min. Descarte el flujo.

10. Añada 200µl de ZymoBIOMICS DNA Wash Buffer 2 a la columna Zymo-Spin™ IICR Column en un tubo de recolección y centrifugue a 10.000 x g durante 1 min.

11. Transfiera la columna Zymo-Spin IICR column a un tubo limpio de 1.5 ml y añada 100 µl (50 µl mínimo) de agua ZymoBIOMICS DNase/RNase Free Water directamente a la matriz de la columna e incube durante 1 min. Centrifugar a 10,000 x g durante 1 minuto para eluir el ADN.<sup>5,6</sup>

<sup>5</sup> En algunos casos se puede formar un pellet de color marrón en el fondo del tubo después de la centrifugación. Evite este pellet cuando recoja el ADN eluido.

<sup>6</sup> Si se procesaron cultivos de hongos o bacterias, el ADN es ahora adecuado para todas las aplicaciones posteriores.

12. Colocar un filtro Zymo-Spin™ III-HRC filter en un nuevo tubo de recogida y añadir 600 µl Solución ZymoBIOMICS HRC prep solution. Centrifugar a 8,000 x g durante 3 min.

13. Transfiera el ADN eluido (Paso 11) a un filtro Zymo-Spin III-HRC filter preparado en un tubo limpio de 1.5 ml y centrifugue a 16.000 x g exactamente durante 3 min.

El ADN filtrado es ahora adecuado para la PCR y otras aplicaciones posteriores.

Para revisar con mayor detalle, video del protocolo: ZymoBIOMICS DNA

Miniprep Protocol <https://www.youtube.com/watch?v=qqi4JU8mmJo>

## **Anexo II. Segundo protocolo de extracción de ADN (cepas)**

PROTOCOLO: Núcleo spin triprep

Antes de iniciar la preparación:

- Compruebe si Buffer DNA Wash, Wash Buffer RA3, rDNase y Reducing Agent TCEP

1. Homogeneizar muestra

Romper hasta 30 mg de tejido humano / animal o hasta 100 mg de tejido vegetal (para métodos de homogeneización ver sección 2.3). Hasta 5 x 10<sup>6</sup>. Las células eucariotas cultivadas son recolectadas por centrifugación y lisado mediante la adición de tampón RP1 directamente.

2. Muestra de Lisis

Añada 350 µL de tampón RP1 y 3,5 µL de β-mercaptoetanol (β-ME) al sedimento celular o al tejido molido y al vórtice vigorosamente.



Nota: Como alternativa a  $\beta$ -ME, el agente reductor DTT o Se puede utilizar TCEP. Utilice una concentración final de 10 a 20 mM DTT o TCEP dentro del Lysis Buffer RP1 (p. Ej., Ad 7–14  $\mu$ L de una solución de DTT o TCEP de 500 mM). + 350  $\mu$ L RP1 + 3,5  $\mu$ L de  $\beta$ -ME

### 3. Filtrado lisado

Reducir la viscosidad y aclarar el lisado mediante filtración

Filtro NucleoSpin®: Coloque el filtro NucleoSpin® (violeta anillo) en un tubo recolector (2 mL), aplique la mezcla y centrifugar durante 1 min a 11.000 x g.

El lisado se puede pasar alternativamente  $\geq 5$  veces a través una aguja de 0,9 mm (calibre 20) colocada en una jeringa.

En caso de formación de gránulos visible (dependiendo de la muestra cantidad y naturaleza), transfiera el sobrenadante sin sedimento formado a un nuevo tubo de centrifuga de 2 ml (no incluido).

Importante: Para procesar mayores cantidades de células ( $> 1 \times 10^6$ ) o tejido ( $> 10$  mg), primero se debe homogeneizar el lisado utilizando la aguja de 0,9 mm (calibre 20), seguido de filtración a través del filtro NucleoSpin®. 1 minuto 11.000 x g MACHEREY-NAGEL - 04/2018, Rev.06 19 NucleoSpin® TriPrep

### 4. Ajustar las condiciones de unión de ADN y ARN

Deseche el filtro NucleoSpin® y agregue 350  $\mu$ L de etanol (70%) al lisado homogeneizado y mezclar pipeteando y hacia abajo (aproximadamente 5 veces).

Alternativamente, transfiera el flujo a un nuevo filtro de 1,5 ml. tubo de microcentrifuga (no incluido), agregue 350  $\mu$ L de etanol (70%) y mezclar con vórtex (2 x 5 s).

Después de la adición de etanol, puede formarse un precipitado fibroso. visible que no afectará el aislamiento del ARN. Cerciorarse para desagregar cualquier precipitado mezclando y cargando todos los el precipitado desagregado en la columna como se describe en el paso 5. No centrifugue en esta etapa para evitar sedimentación de cualquier precipitado. + 350  $\mu$ L EtOH al 70%

Mezcla

### 5. Unir ADN y ARN



Para cada preparación, tome un NucleoSpin® TriPrep Columna (anillo azul claro) colocada en un tubo colector y cargar el lisado. Centrifugar durante 30 sa 11.000 x g. Sitio la columna NucleoSpin® TriPrep en un nuevo tubo de recolección (2 ml).

El ARN y el ADN están unidos a la membrana de la columna. La proteína está fluyendo. Capacidad de carga máxima de las columnas NucleoSpin® TriPrep es de 750 µl. Repita el procedimiento si se van a estar procesado.

Para el aislamiento de ADN y ARN, continúe con el paso 6. Se recomienda continuar con el aislamiento de ADN y ARN. protocolo primero y para realizar la purificación de proteínas después. Para el aislamiento de proteínas, recupere el flujo y continúe con el paso 12.

La proteína que contiene el flujo continuo es estable durante varios horas a 4-8 ° C

### Anexo III. Protocolo de extracción de ADN (sedimentos)

Kit: Fast DNA Spin Kit for soils  
(cat #; 6560-200, Q Bio gene)

Liquids to UV  
Binding matrix  
SP Buffer  
PPS Diw <- new  
SWES en congelador  
después de UV

**Note:**  
Autoclave y UV antes de  
usar

\*Únicamente UV

#### Materiales para muestra de suelo:

Materiales por muestra de suelo:  
Pesar papel (puede que no se use para polvo simple)  
1 tubo de lisis de matriz (contiene perlas)  
2 tubos con tapón de rosca (2 ml)  
1 tubo colector con tubo filtrante \*  
Agua inyectable previamente uv, luego uv nuevamente antes de usar  
1 tubo (2 ml)

**Note:**  
Papel de pesaje para  
autoclave

#### Suelo

Peso de aproximadamente 0,5 g de suelo (puede utilizar hasta 0,6 g, especialmente si el suelo está húmedo)

Pesar tubo matriz. Tome el tubo de matriz, transfiera el polvo al tubo de matriz. Tubo de matriz de peso

Transferir la muestra de suelo al tubo de lisis de matriz

UV todos los reactivos del kit excepto lisozima, tampón MT y GTC  
Abridores de microtubos UV

#### Extracción de DNA

1) Agregue 978 µl de fosfato de sodio al tubo matriz que contiene el suelo.



- 2) Agregue 122  $\mu$ l de tampón MT (no UV este reactivo)
- 3) Agite en el vórtex durante 10 min de ajuste alto utilizando un adaptador de vórtice de 15 '
- 4) Centrifugue 15 min (asegúrese de que la arcilla esté en una buena pastilla) a 14, 000 rpm.
- 5) Coloque el sobrenadante y pipetee en un tubo con tapón de rosca (deje 100  $\mu$ l para evitar que se ensucie) deseche las perlas  $\approx$  800  $\mu$ l
- 6) Agregue 250  $\mu$ l de PPS y mezcle invirtiendo el tubo 10 veces
- 7) Centrifugar 5 min a 14.000 rpm
- 8) Tomar el sobrenadante (repetir el paso 5) transferir el sobrenadante a un nuevo tubo con tapón de rosca desechar las proteínas del sedimento  $\approx$  800  $\mu$ l
- 9) Agregar 800  $\mu$ l (o menos si está arriba de la línea del microtubo) de suspensión de matriz de unión (resuspendió la solución antes de usarla y mezclar frecuentemente mientras se usa) y mezclar invirtiendo el tubo durante 2 min.
- 10) Centrifugar durante 5 s (presionar rápido y dejar subir para orinar y contar 5 segundos) o dejar reposar durante 30 min.
- 11) Retirar el sobrenadante y desechar en un sistema de eliminación de residuos especiales (botella GTC). El ADN está en pellet. Si está sobrenadante, agregue 1 ml de GTC al sedimento, mezcle (toque para resuspender) y centrifugue durante 5 s. repita hasta que el sobrenadante se vea claro (elimine el sobrenadante).
- 12) Añada 500  $\mu$ l de SWES-M a la matriz de unión y mezcle. Deslice para resuspender el gránulo
- 13) Transfiera a tubos de filtro
- 14) Centrifugar durante 1 min.
- 15) Sacar el filtro, verter el líquido (poner el filtro de nuevo en el tubo) desechar el líquido (frasco de GTC).
- 16) Centrifugar 2 min (solo el filtro en el tubo colector vacío)
- 17) Transfiera el filtro a un tubo nuevo, déjelo abierto y déjelo reposar durante 5 min -> 7 - 10 min
- 18) Añada 50  $\mu$ l de agua molecular (no utilice la que viene con el kit) justo antes de usarla (40  $\mu$ l).
- 19) Vortex útil las perlas ya no se pegan al costado de la columna
- 20) Centrifugar durante 1 min a 14.000 rpm
- 21) Tire el filtro
- 22) Transfiera agua (+ ADN) a un nuevo microtubo  $\approx$  35  $\mu$ l
- 23) Almacenar a -20 ° C

### Kit prices

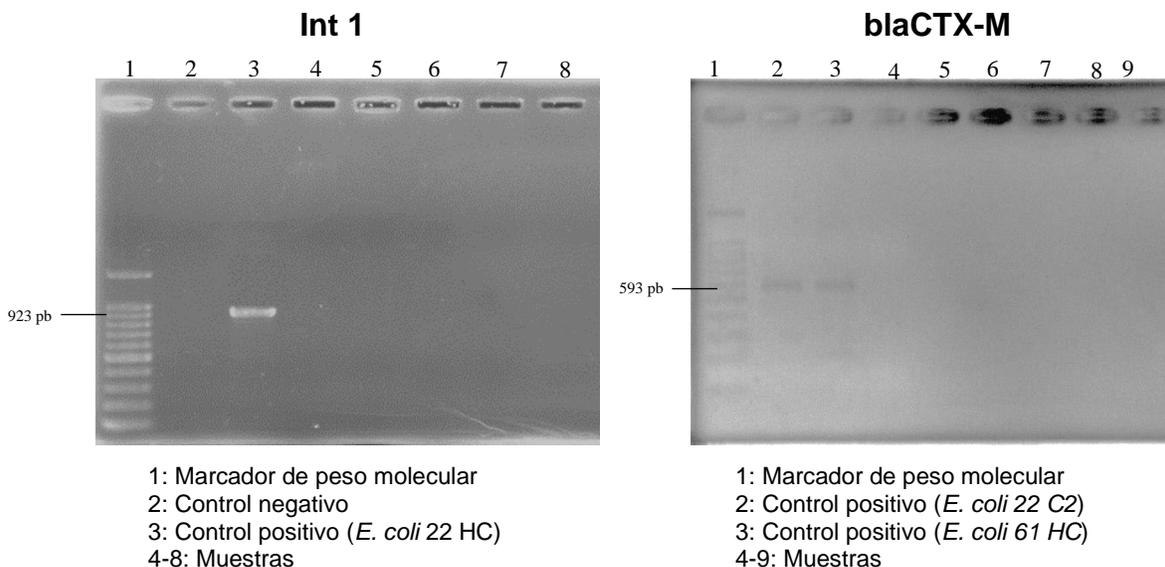
product	Cat #	Price
Spin filters	6560-201	51.00
Catch tubes	6560-211	Come with spin filters
Lysing matrix tubes	6914-050	116.00
Sodium phosphate buffer	6560-205	24.00
MT buffer	6511-202	15.00
kit	6560-200	198.00

### Anexo IV. Resultados de los controles positivos en la detección de genes de resistencia a antibióticos en bacterias y sedimentos de un manglar de Baja California Sur.

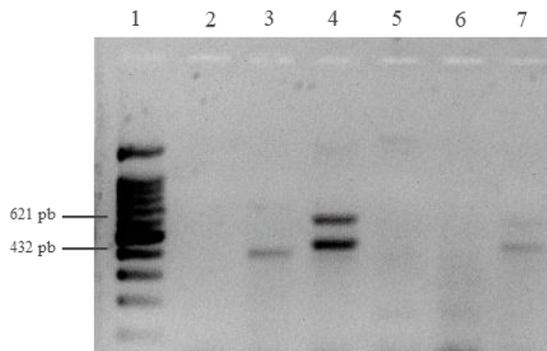
Las fuentes de controles positivos incluyen aislados bacterianos previamente analizados en otras investigaciones. Fueron 4 aislados que se utilizaron como controles de todos los ARGs.

#### Controles positivos

<i>E. coli</i> 61 HC	<i>qnrS</i>
<i>E. coli</i> 22 HC	<i>int1, sul1, sul2, blaCTX-M, blaKPC</i>
<i>E. coli</i> 2 HZ	<i>vanA</i>
<i>E. coli</i> 37 HC	<i>blaVIM, blaKNDM</i>
Cepa 29 (1.5% NaCl), sitio perturbado	<i>tetA</i>

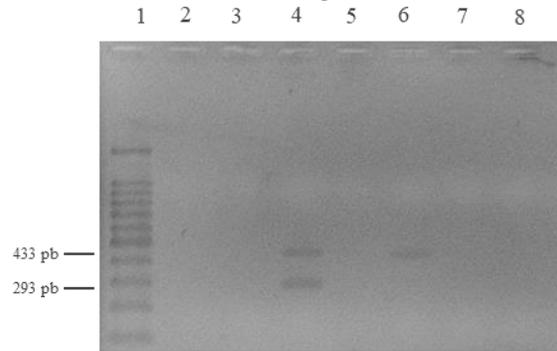


### blaVIM y blaNDM



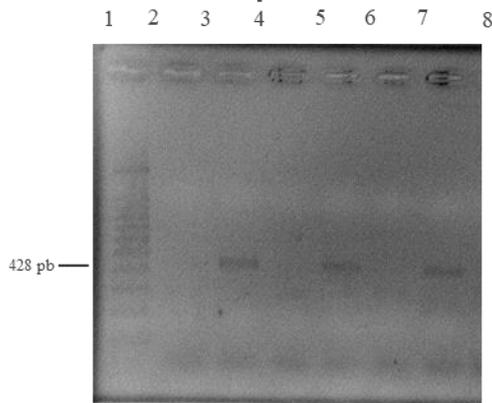
- 1: Marcador de peso molecular
- 2: Control negativo
- 3: *E. coli* 61 HC
- 4: Control positivo (*E. coli* 37 HC)
- 5: *E. coli* 22 HZ
- 6: *E. coli* 15 HZ
- 7: *E. coli* 2 HZ

### sul 1 y sul 2



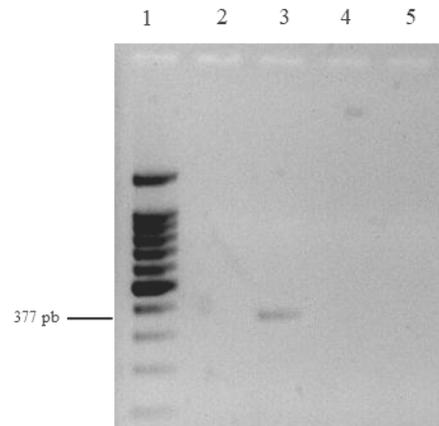
- 1: Marcador de peso molecular
- 2: Control negativo
- 3: Muestra
- 4: Control positivo (*E. coli* 22 HC)
- 5-8: Muestras

### qnrS



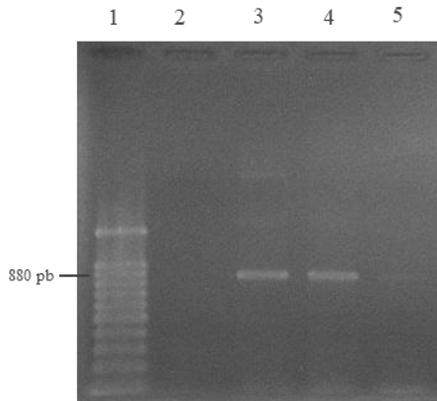
- 1: Marcador de peso molecular
- 2: Control negativo
- 3: Control positivo (*E. coli* 61 HC)
- 4-8: Muestras

### Van A



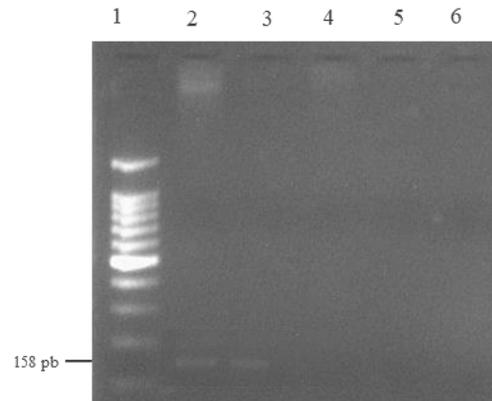
- 1: Marcador de peso molecular
- 2: Control negativo
- 3: Control positivo (*E. coli* 2 HZ)

### blaKPC



- 1: Marcador de peso molecular
- 2: Control negativo
- 3: Control positivo (*E. coli* 22 HC)
- 4-5: Muestras

### tet A



- 1: Marcador de peso molecular
- 2: Control positivo cepa 29 (1.5% NaCl), sitio perturbado
- 3-6: Muestras

### Anexo V :Resultado del análisis de la presencia de ARGs en sedimentos del sitio perturbado (CFE)

Sitio Perturbado (CFE) SEDIMENTOS											
Sitio	Profundidad	int 1	sul 1	sul 2	blaCTXM	blaKPC	qnrS	Tet A	blaVIM	blaNDM	Van A
CFE 4	0-15	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1
CFE 1	0-15	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1
CFE 2	0-15	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
CFE 3	0-15	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1
CFE 5	0-15	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
CFE 4	15-30	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
CFE 5	15-30	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
CFE 3	15-30	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
CEF 2	15-30	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
CFE 1	15-30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CFE 2	30-50	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
CFE 4	30-50	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1
CFE 1	30-50	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
CFE 5	30-50	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
CFE 3	30-50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total +</b>		<b>10</b>	<b>11</b>	<b>14</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>9</b>
<b>Total -</b>		<b>5</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>6</b>

### Anexo VI: Resultado del análisis de la presencia de ARGs en sedimentos del sitio conservado (SCC)

Sitio Conservado (SCC) SEDIMENTOS											
Sitio	Profundidad	int 1	sul 1	sul 2	blaCTXM	blaKPC	qnrS	Tet A	blaVIM	blaNDM	Van A
SCC1	0-15	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1
SCC5	0-15	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1
SCC2	0-15	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1
SCC3	0-15	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
SCC4	0-15	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1
SCC4	15-30	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
SCC2	15-30	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0
SCC1	15-30	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
SCC3	15-30	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
SCC5	15-30	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
SCC4	30-50	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
SCC3	30-50	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
SCC1	30-50	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

SCC5	30-50	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0
SCC2	30-50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total +</b>		<b>9</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
<b>Total -</b>		<b>6</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>11</b>	<b>7</b>

### Anexo VII. Resultados de la presencia de genes de resistencia a antibióticos y características microscópicas y macroscópicas de las bacterias aisladas en el sitio perturbado (CFE)

#### Sitio perturbado (CFE)

Cepa	Sitio	<i>int 1</i>	<i>sul 1</i>	<i>sul 2</i>	<i>blaCTXM</i>	<i>blaKPC</i>	<i>qnrS</i>	<i>Tet A</i>	<i>blaVIM</i>	<i>blaNDM</i>	<i>Van A</i>	Gram	Colonias	Bacilos	cocos
17	CFE1 15-30 10 <sup>4</sup> 1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	+	amarillo	Bacilos	
21	CFE1 30-50 10 <sup>4</sup> 1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	+	amarillo	Bacilos	
26	CFE2 15-30 10 <sup>3</sup> 1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	-	amarillo		cocos
28	CFE2 30-50 10 <sup>3</sup> 1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	-	amarillo	Bacilos	
29	CFE2 30-50 10 <sup>3</sup> 2	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	-	amarillo	Bacilos	
30	CFE2 30-50 10 <sup>3</sup> 3	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	+	amarillo	Bacilos	
32	CFE3 0-15 10 <sup>4</sup> 1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	+	amarillo	Bacilos	
37	CFE3 15-30 10 <sup>3</sup> 1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	-	rosa	Bacilos	
38	CFE3 15-30 10 <sup>3</sup> 2	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	+	amarillo	Bacilos	
42	CFE3 15-30 10 <sup>3</sup> 6	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	-	amarillo	Bacilos	
44	CFE3 15-30 10 <sup>3</sup> 8	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	+	amarillo	Bacilos	
52	CFE3 30-50 10 <sup>3</sup> 1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	+	amarillo	Bacilos	
57	CFE4 0-15 10 <sup>3</sup> 3	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	+	amarillo	Bacilos	
59	CFE4 0-15 10 <sup>3</sup> 5	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	-	rosa	Bacilos	
65	CFE4 15-30 10 <sup>3</sup> 1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	-	rosa	Bacilos	
75	CFE4 15-30 10 <sup>4</sup> 5	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	+	amarillo	Bacilos	
82	CFE4 30-50 10 <sup>4</sup> 3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	+	amarillo	Bacilos	
89	CFE5 0-15 10 <sup>3</sup> 4B	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	+	amarillo	Bacilos	
98	CFE5 0-15 10 <sup>4</sup> 5	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	-	rosa	Bacilos	
101	CFE5 15-30 10 <sup>3</sup> 1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	+	amarillo	Bacilos	
105	CFE5 15-30 10 <sup>3</sup> 5	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	+	amarillo	Bacilos	
116	CFE5 15-30 10 <sup>4</sup> 8B	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	+	amarillo	Bacilos	
124	CFE5 30-50 10 <sup>3</sup> 7	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	+	amarillo		cocos



119	CFE5 30-50 10 <sup>3</sup> 2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	+	amarillo	Bacilos	
47	CFE3 15-30 10 <sup>4</sup> 3	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	-	amarillo	Bacilos	
97	CFE5 0-15 10 <sup>4</sup> 4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	-	amarillo	Bacilos	
1.50%															
3	CFE1 0-15 10 <sup>3</sup> 1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	-	rosa	Bacilos	
5	CFE1 0-15 10 <sup>4</sup> 1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	+	amarillo	Bacilos	
8	CFE1 15-30 10 <sup>3</sup> 2	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	-	rosa	Bacilos	
10	CFE1 15-30 10 <sup>3</sup> 3B	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	-	amarillo	Bacilos	
15	CFE2 0-15 10 <sup>3</sup> 1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	-	amarillo	Bacilos	
16	CFE2 0-15 10 <sup>3</sup> 2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	+	amarillo	Bacilos	
20	CFE2 15-30 10 <sup>4</sup> 3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	+	amarillo	Bacilos	
21	CFE2 30-50 10 <sup>3</sup> 1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	-	amarillo	Bacilos	
24	CFE2 30-50 10 <sup>4</sup> 1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	+	amarillo	Bacilos	
29	CFE3 0-15 10 <sup>3</sup> 3	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	-	rosa	Bacilos	
33	CFE3 0-15 10 <sup>4</sup> 2	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	-	amarillo		cocos
46	CFE3 30-50 10 <sup>3</sup> 1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	+	amarillo	Bacilos	
43	CFE3 15-30 10 <sup>4</sup> 4	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	+	amarillo	Bacilos	
36	CFE3 15-30 10 <sup>3</sup> 2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	-	amarillo	Bacilos	
48	CFE4 0-15 10 <sup>3</sup> 1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	+	amarillo	Bacilos	
49	CFE4 0-15 10 <sup>3</sup> 2	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	+	amarillo	Bacilos	
59	CFE4 15-30 10 <sup>4</sup> 3	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	-	amarillo	Bacilos	
62	CFE4 30-50 10 <sup>3</sup> 3	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	+	amarillo	Bacilos	
69	CFE5 0-15 10 <sup>3</sup> 3	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	+	amarillo		cocos
85	CFE5 15-30 10 <sup>4</sup> 4A	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	+	amarillo		cocos
92	CFE5 30-50 10 <sup>3</sup> 3A	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	-	amarillo	Bacilos	
41	CFE3 15-30 10 <sup>4</sup> 2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-	rosa	Bacilos	
28	CFE3 0-15 10 <sup>3</sup> 2	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	+	amarillo	Bacilos	
3%															
22	CFE1 0-15 10 <sup>4</sup> 1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	+	amarillo	Bacilos	
26	CFE1 15-30 10 <sup>4</sup> 1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	-	amarillo	Bacilos	



32	CFE2 0-15 10 <sup>3</sup> 3	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	+	amarillo	Bacilos
41	CFE2 30-50 10 <sup>4</sup> 1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	+	amarillo	Bacilos
43	CFE2 30-50 10 <sup>3</sup> 2A	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	+	amarillo	Bacilos
51	CFE3 0-15 10 <sup>3</sup> 6	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	-	amarillo	Bacilos
57	CFE3 30-50 10 <sup>4</sup> 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	amarillo	Bacilos
60	CFE4 15-30 10 <sup>3</sup> 1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	+	amarillo	Bacilos
63	CFE5 0-15 10 <sup>3</sup> 2	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	+	amarillo	Bacilos
66	CFE5 15-30 10 <sup>4</sup> 2	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	+	amarillo	Bacilos
<b>Total +</b>		<b>33</b>	<b>29</b>	<b>10</b>	<b>49</b>	<b>1</b>	<b>18</b>	<b>9</b>	<b>23</b>	<b>29</b>	<b>36</b>			
<b>Total -</b>		<b>26</b>	<b>30</b>	<b>49</b>	<b>10</b>	<b>58</b>	<b>41</b>	<b>50</b>	<b>36</b>	<b>30</b>	<b>23</b>			

**Anexo VIII. Resultados de la presencia de genes de resistencia a antibióticos y características microscópicas de las bacterias aisladas en el sitio conservado (SCC).**

Sitio Conservado (SCC)															
Cepa	Sitio	int 1	sul 1	Sul 2	blaCTX-M	blaKPC	qnrS	Tet A	blaVIM	blaNDM	Van A	Gram	Colonias	Bacilos	Cocos
0%															
5	SCC1 0-15 10 <sup>3</sup> 5	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	-	amarillo	Bacilos	
16	SCC2 0-15 10 <sup>3</sup> 4	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	+	amarillo	Bacilos	
27	SCC2 15-30 10 <sup>3</sup> 4	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	-	amarillo	Bacilos	
42	SCC2 30-50 10 <sup>3</sup> 7	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	+	rosas	Bacilos	
43	SCC2 30-50 10 <sup>4</sup> 1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	-	amarillo		Cocos
52	SCC3 30-50 10 <sup>4</sup> 1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	+	amarillo		Cocos
54	SCC4 0-15 10 <sup>3</sup> 2	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	-	amarillo	Bacilos	
56	SCC4 0-15 10 <sup>4</sup> 1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	-	amarillo	Bacilos	
57	SCC4 30-50 10 <sup>3</sup> 1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	+	amarillo		Cocos
69	SCC5 15-30 10 <sup>4</sup> 1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	+	amarillo	Bacilos	
1.50%															
12	SCC1 15-30 10 <sup>3</sup> 5	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	-	amarillo	Bacilos	



49	SCC2 30-50 10 <sup>4</sup> 2	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	-	amarillo	Bacilos	
59	SCC3 0-15 10 <sup>4</sup> 1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	-	rosas	Bacilos	
6	SCC1 0-15 10 <sup>3</sup> 6	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	-	amarillo	Bacilos	
7	SCC1 0-15 10 <sup>3</sup> 7	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	+	rosas		Cocos
17	SCC1 30-50 10 <sup>3</sup> 3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	+	amarillo	Bacilos	
10	SCC1 15-30 10 <sup>3</sup> 3	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	-	amarillo	Bacilos	
23	SCC2 0-15 10 <sup>3</sup> 2	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	-	amarillo		Cocos
27	SCC2 0-15 10 <sup>4</sup> 2	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	-	amarillo	Bacilos	
28	SCC2 0-15 10 <sup>4</sup> 3	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	-	amarillo	Bacilos	
34	SCC2 15-30 10 <sup>3</sup> 3	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	-	amarillo		Cocos
36	SCC2 15-30 10 <sup>3</sup> 5	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	+	rosas	Bacilos	
42	SCC2 30-50 10 <sup>3</sup> 1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	+	amarillo		Cocos
44	SCC2 30-50 10 <sup>3</sup> 3	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	-	amarillo	Bacilos	
47	SCC2 30-50 10 <sup>3</sup> 6	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	+	amarillo	Bacilos	
48	SCC2 30-50 10 <sup>4</sup> 1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	+	amarillo	Bacilos	
51	SCC2 30-50 10 <sup>4</sup> 4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	+	amarillo	Bacilos	
66	SCC3 30-50 10 <sup>3</sup> 3	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	+	amarillo	Bacilos	
63	SCC3 15-30 10 <sup>4</sup> 1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	-	amarillo	Bacilos	
65	SCC3 30-50 10 <sup>3</sup> 2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	-	amarillo	Bacilos	
68	SCC3 30-50 10 <sup>4</sup> 2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	+	amarillo		Cocos
73	SCC4 0-15 10 <sup>4</sup> 1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	-	amarillo	Bacilos	
75	SCC4 15-30 10 <sup>4</sup> 1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	+	amarillo	Bacilos	
80	SCC4 30-50 10 <sup>4</sup> 1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	-	amarillo		Cocos
81	SCC4 30-50 10 <sup>4</sup> 2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	+	amarillo	Bacilos	
82	SCC5 0-15 10 <sup>3</sup> 1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	-	amarillo	Bacilos	
93	SCC5 15-30 10 <sup>3</sup> 6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	+	amarillo	Bacilos	
94	SCC5 30-50 10 <sup>3</sup> 1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	+	amarillo	Bacilos	
<b>3%</b>															
13	SCC1 15-30 10 <sup>4</sup> 3	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	+	amarillo	Bacilos	
10	SCC1 15-30 10 <sup>3</sup> 3	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	-	amarillo	Bacilos	



12	SCC1 15-30 10 <sup>4</sup> 2	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	+	amarillo		cocos
24	SCC2 0-15 10 <sup>4</sup> 2	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	-	amarillo	Bacilos	
25	SCC2 0-15 10 <sup>4</sup> 3	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	-	amarillo	Bacilos	
26	SCC2 0-15 10 <sup>4</sup> 4	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	-	amarillo	Bacilos	
36	SCC2 30-50 10 <sup>3</sup> 2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	+	amarillo	Bacilos	
38	SCC2 30-50 10 <sup>3</sup> 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	amarillo	Bacilos	
41	SCC2 30-50 10 <sup>4</sup> 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	amarillo	Bacilos	
44	SCC2 30-50 10 <sup>4</sup> 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	amarillo	Bacilos	
59	SCC3 30-50 10 <sup>3</sup> 4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	+	amarillo	Bacilos	
61	SCC4 0-15 10 <sup>3</sup> 2	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	-	amarillo	Bacilos	
65	SCC4 30-50 10 <sup>3</sup> 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	+	amarillo	Bacilos	
67	SCC5 0-15 10 <sup>3</sup> 2	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	+	amarillo	Bacilos	
68	SCC5 0-15 10 <sup>3</sup> 3	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	+	amarillo	Bacilos	
77	SCC5 15-30 10 <sup>4</sup> 3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	-	amarillo	Bacilos	
<b>Total +</b>		4	20	21	32	2	14	19	23	24	21				
<b>Total -</b>		50	34	33	22	52	40	35	31	30	33				

0: No existe la presencia del gen

1: Existe la presencia del gen

+: Bacteria Gram positiva

-: Bacteria Gram negativa