

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

PROYECTO DE T E S I S

PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

ILEANA SARAHÍ RAMOS MENDOZA

Ensenada, Baja California, México

Agosto, 2023

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

Resumen

La diversidad procariota y la presencia de genes marcadores pueden ser utilizados como indicadores de la salud de un ecosistema y la exposición de los microorganismos a diversos tipos de contaminantes. La costa noroeste de Baja California (CNBC) es un área en la que se realizan actividades antropogénicas que pueden ser fuente de diversos contaminantes, entre los que se pueden encontrar los hidrocarburos y los antibióticos. En 2018 se llevó a cabo la campaña Bight, donde se tomaron 33 muestras de sedimentos marinos en diferentes puntos a lo largo de la costa. A cada muestra se le extrajo el ADN ambiental, el cual fue utilizado como templado para amplificar A) la región V4 del gen ribosomal 16S ARNr y B) diferentes genes marcadores funcionales relacionados con la degradación de hidrocarburos y resistencia a antibióticos. Utilizando la plataforma Illumina, se realizó una secuenciación masiva de los amplicones obtenidos de la región V4 del gen ribosomal 16S ARNr. Las secuencias obtenidas fueron procesadas y analizadas con el software QIIME2, revelando que la diversidad procariota presente en la CBC se compone por 68 phyla, donde Pseudomonadota fue el phylum más abundante, seguido por Bacteroidota, Crenarchaeota y Acidobacteriota, entre otros. También se encontraron a los géneros *Nitrosopumilus* (arquea), *Lutimonas* y *Desulfococcus* como los géneros más abundantes dentro de las 33 muestras de sedimentos analizadas. Se realizó una inferencia metabólica de las posibles rutas presentes en cada estación, haciendo uso del software PICRUST2. Este análisis reveló la presencia de 47 rutas implicadas en la degradación de compuestos aromáticos, tres en la degradación de alifáticos y dos rutas implicadas en la resistencia a antibióticos. De los genes funcionales implicados en la degradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, se utilizaron una alcano monooxigenasa (*alkB*) y aldolasa hidratasa (*pahE*), respectivamente. En el caso de los genes de resistencia a antibióticos se utilizaron *sul1*, *CTX* y *qnrS*. Mediante PCR de punto final se buscó la presencia de los genes mencionados en las 33 muestras de sedimentos marinos. Los amplicones de los genes de degradación de hidrocarburos se observaron en 14 estaciones para *alkB* y 21 estaciones en el caso de *pahE*; en el caso de los genes asociados a la resistencia a antibióticos estuvieron presentes en 16 estaciones (*sul1*), 22 (*CTX*) y 8 (*qnrS*). Los resultados permitieron conocer como es la composición procariota presente en los sedimentos marinos de la CNBC, así como inferir si tienen la capacidad de degradar hidrocarburos y resistir antibióticos. Lo descrito anteriormente nos permitió asociar la presencia de estos genes con la microbiota existente, así como elucidar la existencia de una relación entre los genes marcadores funcionales que fueron analizados y las áreas en Baja California en las que existe evidencia de una alta actividad antropogénica.

Palabras clave: Diversidad procariota, genes funcionales, hidrocarburos, antibióticos.

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA

DIVERSIDAD BACTERIANA Y DE GENES MARCADORES ASOCIADOS A LA DEGRADACIÓN DE
HIDROCARBUROS Y A LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN SEDIMENTOS MARINOS DE LA COSTA
NOROESTE DE BAJA CALIFORNIA

TESIS

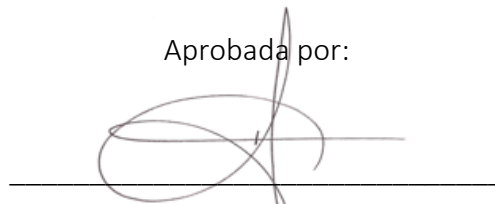
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

ILEANA SARAHI RAMOS MENDOZA

Aprobada por:



Dra. Hortencia Silva Jiménez

Directora de tesis



Dra. Natalie Millán Aguiñaga

Sinodal



Dr. Fernando Amílcar Solís Domínguez

Sinodal

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo de tesis de grado de Maestría

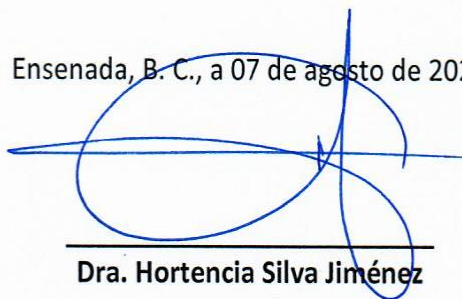
Dra. Adriana G. González Silvera
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Después de haber efectuado una revisión minuciosa sobre el trabajo de tesis presentado por la estudiante **Ileana Sarahi Ramos Mendoza**, para poder presentar la defensa de su examen y obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**, me permito comunicarle que he dado mi voto **Aprobatorio**, sobre su trabajo titulado:

DIVERSIDAD BACTERIANA Y DE GENES MARCADORES ASOCIADOS A LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS Y A LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN SEDIMENTOS MARINOS DE LA COSTA NOROESTE DE BAJA CALIFORNIA.

Esperando reciba el presente de conformidad, quedo de usted.

Ensenada, B. C., a 07 de agosto de 2023



Dra. Hortencia Silva Jiménez
Directora de tesis

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo de tesis de grado de Maestría

Dra. Adriana G. González Silvera
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Después de haber efectuado una revisión minuciosa sobre el trabajo de tesis presentado por la estudiante **Ileana Sarahí Ramos Mendoza**, para poder presentar la defensa de su examen y obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**, me permito comunicarle que he dado mi voto **Aprobatorio**, sobre su trabajo titulado:

DIVERSIDAD BACTERIANA Y DE GENES MARCADORES ASOCIADOS A LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS Y A LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN SEDIMENTOS MARINOS DE LA COSTA NOROESTE DE BAJA CALIFORNIA.

Esperando reciba el presente de conformidad, quedo de usted.

Ensenada, B. C., a 07 de agosto de 2023



Dra. Natalie Millán Aguiñaga
Sinodal

c.c.p. Expediente

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

**Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría**

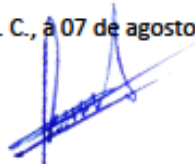
Dra. Adriana G. González Silvera
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Después de haber efectuado una revisión minuciosa sobre el trabajo de tesis presentado por la estudiante Ileana Sarahí Ramos Mendoza, para poder presentar la defensa de su examen y obtener el grado de Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera, me permito comunicarle que he dado mi voto Aprobatorio, sobre su trabajo titulado:

DIVERSIDAD BACTERIANA Y DE GENES MARCADORES ASOCIADOS A LA DEGRADACIÓN
DE HIDROCARBUROS Y A LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN SEDIMENTOS MARINOS
DE LA COSTA NOROESTE DE BAJA CALIFORNIA.

Esperando reciba el presente de conformidad, quedo de usted.

Ensenada, B. C., a 07 de agosto de 2023



Dr. Fernando Amílcar Solís Domínguez
Sinodal

c.c.p. Expediente

Dedicatoria

A mi familia y a Abraham, por todo su apoyo y su amor.

A mí, por demostrarme que si puedo.

*El miedo es inevitable, tengo que aceptarlo,
pero no puedo permitir que me paralice.*

(Isabel Allende)

Agradecimientos

Agradezco a CONACyT por la beca otorgada durante el periodo 2021-2023, que me ayudo a realizar y concluir los estudios de maestría. A la UABC y la Facultad de Ciencias Marinas por aceptarme en el programa.

Durante este periodo fueron muchas las personas que me brindaron su apoyo y me animaron a concluir este proceso, pero quiero destacar a las personas que fueron imprescindibles durante estos dos años.

Principalmente a la **Dra. Hortencia Silva Jiménez**, a quien le tengo un enorme cariño, gracias por aceptarme de nuevo en su grupo de trabajo. Por la confianza, los consejos y ánimos brindados no solo en este proceso, si no a lo largo de los años en los que me ha permitido ser partícipe de sus proyectos. Gracias por motivarme a seguir aprendiendo.

A la **Dra. Natalie Millán Aguiñaga** y al **Dr. Fernando Amílcar Solís** por aceptar ser parte del comité de tesis de este proyecto. Por su apoyo y sus comentarios en cada reunión que fueron de gran ayuda en la formación de este escrito.

A mi familia: mamá, papá, hermano y abuelos. Por el amor, apoyo y confianza que me han brindado para poder vivir mi propia aventura. Los amo.

A Abraham, que me ha brindado todo su apoyo en la realización de este trabajo, gracias por apoyarme y animarme a seguir y cumplir todos mis sueños. Gracias por acompañarme con paciencia en los desvelos y en todas las crisis existenciales.

A cada uno de mis compañeros de laboratorio. Gracias por el apoyo en cada etapa de este proceso, y por dejar que los apoye. Gracias por las pláticas que amenizaban el trabajo. Al Dr. Salvador Embarcadero por ayudarme a entender cada concepto y cada proceso que se me dificultaba.

A mis compañeras del posgrado que se convirtieron en amigas. Gracias por sus palabras de ánimo, por los momentos de estudio, por las comidas y pláticas compartidas. Especial mención a Abril, Mary, Aketzali y Andrea, gracias por sus palabras y sus abrazos que facilitaron este proceso llamado Maestría. Espero continuar con su amistad, y deseo verlas brillando en cada etapa que venga.

Índice

Introducción	1
Diversidad procariota y su relación con el ambiente	1
Efecto de la contaminación por hidrocarburos y antibióticos en las comunidades microbianas	2
Contaminantes prioritarios	2
Contaminantes emergentes	5
Marcadores génicos o genes funcionales	6
Marcador universal	7
Genes metabólicos específicos	7
Antecedentes	13
Justificación	16
Objetivos	17
General	17
Particulares	17
Hipótesis	17
Materiales y metodología	18
Zona de estudio	18
Muestreo	18
Extracción de ADN	22
Construcción de metagenotecas	22
Análisis bioinformático	23
Clasificación taxonómica	25
Inferencias sobre rutas metabólicas	25
Análisis de datos	27
Genes marcadores implicados en la degradación de hidrocarburos	27
Genes marcadores implicados en la resistencia a antibióticos	29
Resultados	31
Diversidad procariota	31
Índices de alfa y beta diversidad	38
Alfa diversidad	39
Beta diversidad	43
Inferencia de rutas metabólicas	46
Genes funcionales de degradación de hidrocarburos y de resistencia a antibióticos	64
Genes marcadores funcionales implicados en la degradación de hidrocarburos	64

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

Genes marcadores funcionales relacionados con la resistencia a antibióticos.	68
<i>Discusión</i>	73
<i>Conclusiones</i>	84
<i>Literatura citada</i>	85
<i>Anexo</i>	96

Lista de figuras

Figura 1. Ejemplos de hidrocarburos: A) alifáticos y B) aromáticos.	3
Figura 2. Estructura química de los 16 HAP considerados contaminantes prioritarios por la U.S. EPA.	4
Figura 3. Ruta metabólica de alcanos, con octano de ejemplo	9
Figura 4. Rutas metabólicas de HAP, con naftaleno como ejemplo	10
Figura 5. Zona de estudio	19
Figura 6. Mapa conceptual del flujo de trabajo en QIIME2	24
Figura 7. Mapa conceptual del flujo de trabajo en PICRUST2	26
Figura 8. Curva de rarefacción obtenida para cada muestra sedimentaria	32
Figura 9. Abundancia relativa de filos más abundantes	34
Figura 10. Mapa de calor de filos con abundancia relativa menor	35
Figura 11. Mapa de calor con los 59 géneros más abundantes	37
Figura 12. Índice de Shannon	40
Figura 13. Índice de Simpson	42
Figura 14. Índice del inverso de Simpson	43
Figura 15. Análisis de coordenadas principales (PCoA) con UniFrac A) no ponderado y B) ponderado	45
Figura 16. Rutas metabólicas inferidas relacionadas con la degradación de hidrocarburos y la resistencia a antibióticos	47
Figura 17. Rutas inferidas de degradación de hidrocarburos alifáticos	50
Figura 18. Rutas inferidas de degradación de hidrocarburos aromáticos en sedimentos marinos de CBC	53
Figura 19. Grupos taxonómicos relacionados a la producción de enzimas implicadas en la resistencia a antibióticos	58
Figura 20. Grupos taxonómicos relacionados a la producción de enzimas implicadas en la degradación de hidrocarburos	60
Figura 21. Predicción de procesos metabólicos por A) profundidad, B) zonación y C) impactos antropogénicos	63
Figura 22. Estaciones con la presencia de los genes de degradación <i>alkB</i> y <i>pahE</i> .	67
Figura 23. Estaciones con la presencia de los genes de resistencia a antibióticos: <i>sul1</i> , <i>CTX</i> y <i>qnrS</i> .	70
Figura 24. Total de genes presentes en cada estación.	72

Lista de tablas

Tabla I. Antibióticos, mecanismo de acción y mecanismo de resistencia _____	11
Tabla II. Características de las estaciones de muestreo _____	20
Tabla III.- Gen marcador alkB _____	28
Tabla IV. Gen marcador pahE _____	28
Tabla V. Genes marcadores _____	29
Tabla VI. Condiciones de amplificación de los genes funcionales de resistencia a antibióticos ____	30
Tabla VII. Microbioma central encontrado para las 33 muestras _____	38
Tabla VIII. Rutas metabólicas inferidas por PICRUST2 implicadas con la resistencia a antibióticos en las muestras provenientes de las 33 estaciones localizadas a lo largo de la CBC _____	48
Tabla IX. Rutas metabólicas inferidas por PICRUST2 implicadas en la degradación de hidrocarburos alifáticos en las muestras provenientes de las 33 estaciones localizadas a lo largo de la CBC _____	50
Tabla X. Rutas metabólicas inferidas por PICRUST2 implicadas en la degradación de hidrocarburos aromáticos en las muestras provenientes de las 33 estaciones localizadas a lo largo de la CBC _	54
Tabla XI. Presencia de genes marcadores con función en la degradación de hidrocarburos ____	65
Tabla XII. Presencia de genes marcadores con función en la resistencia a antibióticos _____	68

Introducción

Diversidad procariota y su relación con el ambiente

Los procariotas son los organismos más abundantes y filogenéticamente más diversos que se conocen, debido a que se encuentran distribuidos en dos de las tres divisiones de los organismos vivos: Bacteria y Arquea. El océano es un ecosistema conocido por poseer una gran cantidad de microorganismos que lo habitan, algunos de forma permanente y otros que son transportados desde los ambientes terrestres (Oren, 2004). La abundancia de microorganismos dentro del ambiente marino es desconocida, pero se tiene la estimación de que la cantidad total de los organismos procariotas se aproxima a 1×10^{29} , mientras que la concentración bacteriana por microlitro de agua superficial es alrededor de 1×10^3 (Flemming y Wuertz, 2019; Quéméneur *et al.*, 2020). En cambio, en los sedimentos marinos es donde se concentra la mayor parte de la biomasa bacteriana, encontrándose abundancias totales que se estiman entre 2.9×10^{29} a 5.4×10^{29} células, y las cuales representan entre el 0.8 al 3.6% de la biomasa total del planeta (Hoshino *et al.*, 2020; Rodgers *et al.*, 2018). Aunque se tienen estas estimaciones de la presencia de organismos dentro del ambiente marino, su abundancia y diversidad puede verse afectada debido a que dependen de las condiciones propias del ambiente, como las propiedades fisicoquímicas, la concentración y calidad de nutrientes, la fuente de carbono y la presencia de contaminantes (Rodgers *et al.*, 2019).

La presencia de los organismos procariotas dentro del ambiente marino y los sedimentos es importante debido a que su diversidad metabólica los vuelve responsables de diversos procesos dentro del mismo como la regulación de ciclos biogeoquímicos, la mineralización de la materia orgánica, la regulación de niveles más altos dentro de las redes tróficas, la degradación de compuestos orgánicos, entre otros (Oren, 2004; Birrer *et al.*, 2019; Quéméneur *et al.*, 2020).

Efecto de la contaminación por hidrocarburos y antibióticos en las comunidades microbianas

El ambiente marino, incluyendo los sedimentos, se encuentra en constante riesgo debido a que se expone a la entrada de diversos contaminantes que provienen tanto de origen natural como antropogénico, convirtiéndolo en uno de los ambientes más frágiles del planeta (Batista *et al.*, 2014; Korpinen y Andersen, 2016; Caballero-Gallardo *et al.*, 2021). Los contaminantes se consideran casi omnipresentes en zonas costeras antropizadas y pueden llegar a generar un deterioro no solo en las condiciones del ambiente y de los sedimentos, si no también, en las comunidades microbianas (Tamburini *et al.*, 2020). Entre los contaminantes que pueden estar afectando al ambiente y las comunidades presentes se encuentran aquellos que han sido clasificados como prioritarios y emergentes.

Contaminantes prioritarios

Los contaminantes prioritarios son aquellos considerados altamente tóxicos, y que, en algunas ocasiones, llegan a tener propiedades carcinogénicas y/o mutagénicas (Xu *et al.*, 2018). Dentro de esta clase de contaminantes se encuentran los hidrocarburos del petróleo, los cuales, son naturalmente persistentes y recalcitrantes, y la mayoría son duraderos y estables dentro del ambiente (Ossai *et al.*, 2020). Los hidrocarburos se dividen en dos grandes grupos: Los alifáticos y los aromáticos (Bamforth y Singleton, 2005).

Los hidrocarburos alifáticos se componen de cadenas de carbono que se pueden encontrar de formas lineales o cíclicas (Fig. 1-A). Los compuestos pueden ser saturados o insaturados con átomos de carbono que oscilan entre C6 a C40 (Tolosa *et al.*, 2004; Sakary *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015). Los compuestos saturados son aquellos que están formados por enlaces simples, mientras que los insaturados tienen enlaces dobles o triples. Los alcanos son hidrocarburos alifáticos que tienen en su estructura enlaces sencillos carbono – carbono, mientras que los alquenos y alquinos poseen enlaces dobles y triples de carbono – carbono, respectivamente (Bhimabhai, 2018). Por su parte, los hidrocarburos aromáticos son una clase de hidrocarburos insaturados que tienen en su

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

estructura, al menos, un anillo de benceno. Algunos ejemplos de compuestos pertenecientes a los hidrocarburos aromáticos son el benceno, tolueno, fenol, entre otros (Fig. 1 – B) (Speight, 2017).

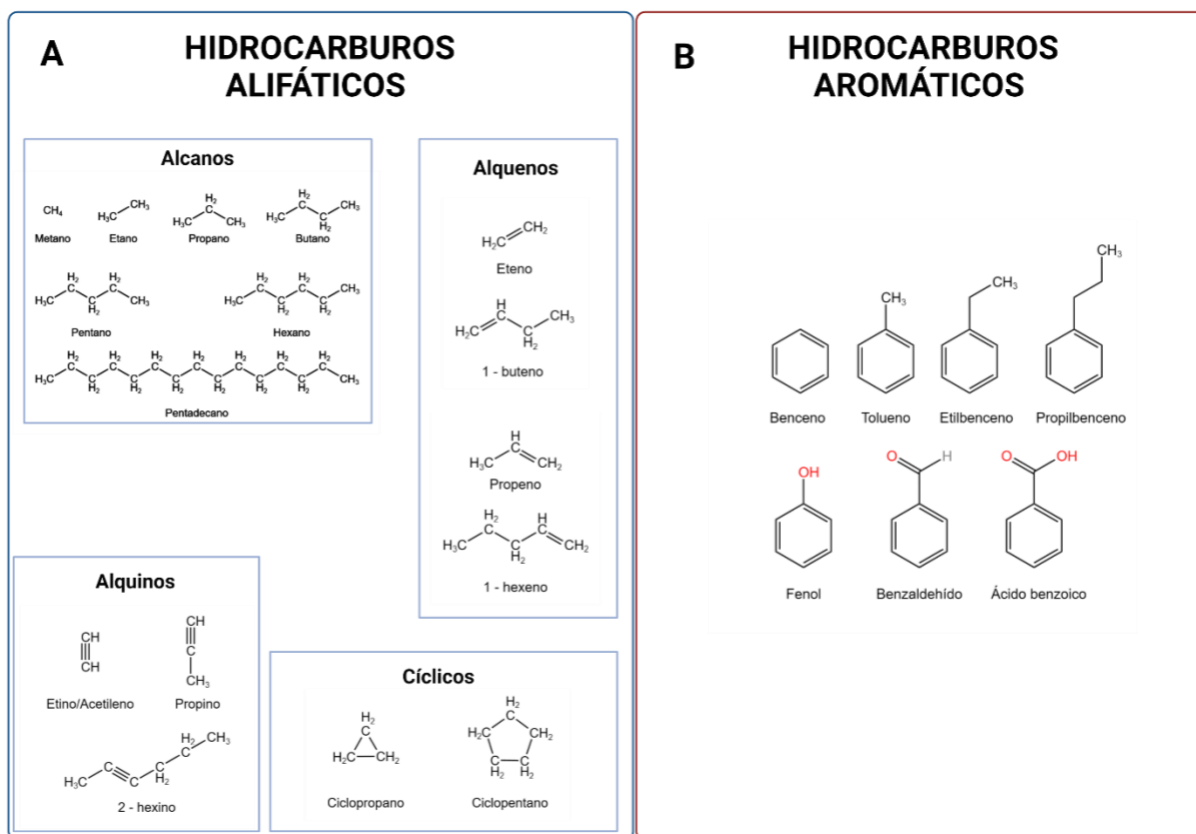


Figura 1. Ejemplos de hidrocarburos: A) alifáticos y B) aromáticos.

Dentro del grupo de los hidrocarburos aromáticos se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), los cuales son contaminantes orgánicos que contienen dos o más anillos de benceno en su estructura y debido a que causan efectos adversos en la salud de los organismos y del ambiente, la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos (U. S. EPA) colocó a 16 HAP en su lista de contaminantes prioritarios para su monitoreo desde 1979 (Fig. 2) (Zhang *et al.*, 2022).

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

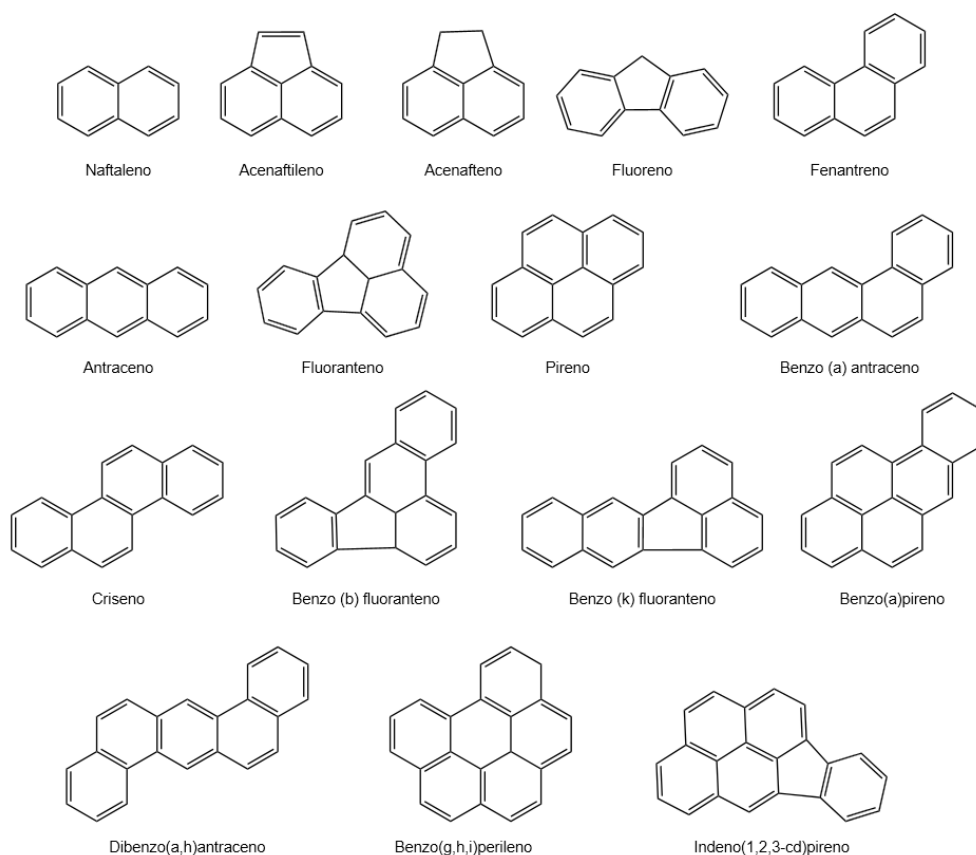


Figura 2. Estructura química de los 16 HAP considerados contaminantes prioritarios por la U.S. EPA.

La presencia de estos contaminantes en los sedimentos marinos causa un impacto de consideración en las comunidades microbianas presentes. Algunos efectos que han sido descritos como consecuencia de su presencia son la disminución o modificación de la riqueza en especies, uniformidad y diversidad filogenética e inhibición de la biomasa microbiana. También se encontró la existencia de una relación entre la presencia de hidrocarburos con la disminución de genes funcionales implicados en procesos importantes dentro del ambiente; un ejemplo estudiado es la disminución de genes funcionales con implicaciones dentro del ciclo del nitrógeno, lo que provoca una interrupción dentro del mismo (Cravo-Laureau y Duran, 2014; Xu *et al.*, 2018).

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

Contaminantes emergentes

Por otro lado, los contaminantes emergentes se describen como aquellos productos químicos, tanto de origen sintético como natural, que provoca efectos adversos sobre la salud humana y ecológica pero que, comúnmente no son controlados o regulados en el medio ambiente (Zandaryaa y Frank-Kamenetsky, 2021). En años recientes se ha dado a conocer que la concentración de estos contaminantes se ha ido incrementando de manera no intencional, y que es posible encontrarlos (de forma directa o residual) en casi todos los ambientes de todos los continentes, incluido el ambiente marino (aus der Beek *et al.*, 2016; Koch *et al.*, 2021). Este tipo de contaminantes entran al ambiente por diversas fuentes en las que se incluyen las aguas residuales, actividades agrícolas, uso de plaguicidas, hormonas y farmacéuticos de uso humano y veterinario (Koch *et al.*, 2021; Zandaryaa y Frank-Kamenetsky, 2021).

Uno de los farmacéuticos más utilizados en diversos países son los antibióticos, que desde su introducción en 1940 han sido empleados para el tratamiento de diversas infecciones bacterianas menores y también potencialmente mortales (Szekeres *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017; Zandaryaa y Frank-Kamenetsky, 2021). Además de su principal uso como tratamiento de enfermedades humanas y animales, también se utilizan para el tratamiento y la prevención de enfermedades en la acuicultura (Zhang *et al.*, 2022). La presencia de antibióticos dentro del ambiente marino provoca un impacto en las comunidades microbianas, uno de los efectos que ha sido estudiado es la reducción de la abundancia bacteriana y las afectaciones en las diversas funciones ecológicas, además de la expansión de la resistencia a estos contaminantes (Ding y He, 2010).

Las actividades antropogénicas que se llevan a cabo en las zonas costeras han provocado que la presencia de ambos contaminantes (hidrocarburos y antibióticos) vaya incrementando, por lo que cada vez es más frecuente encontrarlos (Caballero-Gallardo *et al.*, 2021). La entrada de estos contaminantes a un ambiente tan sensible como lo es el ambiente marino puede provocar grandes cambios. Una de las principales consecuencias de la combinación de hidrocarburos y antibióticos en las comunidades bacterianas es que las bacterias pueden evolucionar o compartir genes entre

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

ellas mismas que las pueden ayudar a sobrevivir al estrés que pueden implicar para ellas mismas (Caballero-Gallardo *et al.*, 2021; Maurya *et al.*, 2021).

Se han realizado estudios en donde se analiza cómo es la presencia y el comportamiento de bacterias resistentes a antibióticos (BRA) y de genes de resistencia a antibióticos (GRA) en zonas contaminadas por hidrocarburos aromáticos policíclicos (Maurya *et al.*, 2021). En ellos se sugiere que la interacción de compuestos mutagénicos a nivel celular es importante en el desarrollo de GRA en bacterias que en un ambiente normal (no contaminado) no desarrollarían, además se ha encontrado que en un ambiente contaminado con HAP, la diseminación de los genes de resistencia en el agua de mar es mayor que en un ambiente no contaminado (Wang y Zhou, 2020; Maurya *et al.*, 2021).

Marcadores génicos o genes funcionales

Los avances realizados en las tecnologías de secuenciación han revolucionado la detección de genes de las comunidades ambientales con la realización de análisis metagenómicos. Estas tecnologías son eficaces para conocer la información genética de las comunidades presentes en una muestra ambiental (Valenzuela-González *et al.*, 2015; Birrer *et al.*, 2019; J. Chen *et al.*, 2019; Navgire *et al.*, 2022). Aunque su función es ayudar a revelar de manera efectiva la composición de la diversidad microbiana de los diferentes ecosistemas, no es posible utilizarlos como identificadores de organismos con potenciales como la degradación de hidrocarburos o de resistencia a antibióticos (Birrer *et al.*, 2019; Liang *et al.*, 2019). Para ello, se pueden utilizar los genes metabólicos específicos o genes funcionales los cuales brindan una descripción directa de la capacidad metabólica de las comunidades microbianas presentes en un ambiente (Thomas *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2019).

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

Marcador universal

El gen ribosomal 16S ARNr es un polirribonucleótido compuesto de aproximadamente 1500 nucleótidos que ha sido reconocido como un marcador universal debido a que se encuentra en todos los organismos procarióticos conocidos y su estructura parece mantenerse por largos periodos. Su secuencia contiene 9 regiones hipervariables de conservación variable (V1 - V9) (Valenzuela-González *et al.*, 2015). Las regiones hipervariables del gen ribosomal 16S ARNr se utilizan de forma regular en el estudio del microbioma, las más conservadas son útiles para determinar los taxones de mayor rango, mientras que las regiones que evolucionan de forma rápida ayudan a identificar el género o la especie (Bukin *et al.*, 2019).

De las regiones hipervariables que componen el 16S ARNr, las regiones V3-V4 son unas de las más utilizadas para la investigación de la diversidad bacteriana en diversos ambientes, incluido el ambiente marino. Además de que algunas plataformas de secuenciación, como Illumina, suelen utilizar la región V3-V4 para obtener la clasificación taxonómica mediante la comparación de estas regiones con algunas conocidas y que están disponibles en bases de datos públicos como NCBI, SILVA, GreenGene, entre otras (Fadeev *et al.*, 2021; Navgire *et al.*, 2022).

Genes metabólicos específicos

Los genes metabólicos específicos o genes funcionales son una herramienta molecular que brindan una descripción directa de cuál es la capacidad metabólica que poseen las comunidades microbianas que se encuentran en un ambiente, por lo que el uso de estos genes puede dar un indicio de cómo se encuentra el estado de salud del ambiente de interés (Thomas *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2019). Existen diversos genes funcionales que codifican para una variedad de enzimas implicadas en diversos procesos, como lo son la degradación de diferentes tipos de hidrocarburos y la resistencia a diversos antibióticos.

Existen genes que codifican para una variedad de enzimas del catabolismo aeróbico de hidrocarburos. Algunos ejemplos son los genes *almA/ladA*, *alkG*, *alkT* y *alkB* que codifican para alcano monoxigenasas implicadas en la degradación de alcanos de cadena corta y larga

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

(hidrocarburos alifáticos). También se tiene el ejemplo de los genes *pheA*, *xylM*, *bphA1*, *Nah* y *pahE* que codifican para la fenol 2-monooxigenasa, xileno monooxigenasa, benceno 1,2-dioxigenasa, bifenilo 1,2-dioxigenasa y naftaleno 1,2-dioxigenasa, que son ejemplos de enzimas que se pueden encontrar en los genomas bacterianos implicados en la degradación de hidrocarburos aromáticos (Liu *et al.*, 2015; Somee *et al.*, 2022).

Estos sistemas enzimáticos tienen papeles importantes en la mineralización aeróbica de hidrocarburos y representan una alternativa prometedora en la caracterización de las capacidades de biorremediación de los microorganismos (Liu *et al.*, 2015).

El gen *alkB* codifica para la alcano monooxigenasa, es un gen predominante y corresponde a las hidroxilasas del primer paso del metabolismo de los alcanos (Fig. 3) (Liu *et al.*, 2015). Esta enzima hidroxila los alcanos a alcoholes, los cuales se oxidan en ácidos grasos y son catabolizados a través de la vía beta bacteriana (Nie *et al.*, 2014).

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

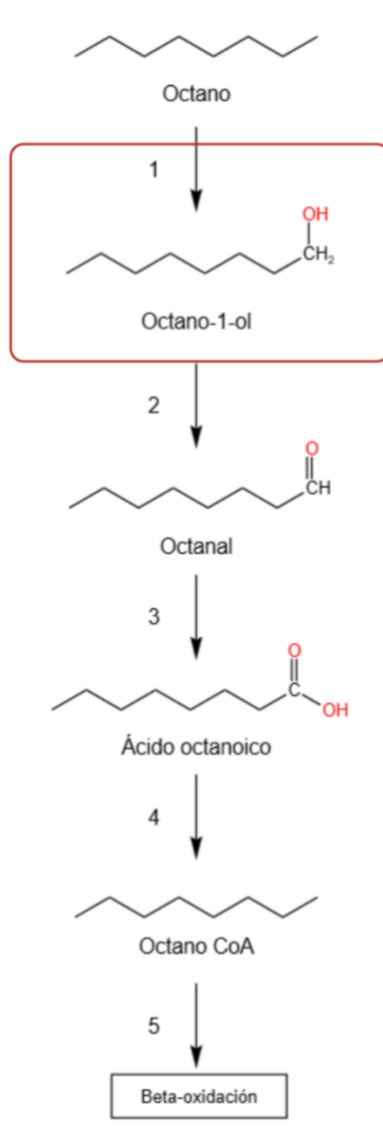


Figura 3. Ruta metabólica de alkanos, con octano de ejemplo. Las enzimas implicadas en la ruta son: 1, alcano monooxigenasa; 2, alcohol deshidrogenasa; 3, aldehído deshidrogenasa; 4, sintetasa; 5, CoA sintetasa (Modificado de Das *et al.*, 2023).

Por su parte, el gen que codifica para la aldolasa hidratasa (*pahE*) es un gen propuesto como gen marcador para analizar la ecología microbiana de la degradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos. El gen *pahE* cataliza el quinto paso del proceso de degradación aeróbica de los HAP (Fig. 4), el cual es un paso importante, ya que es donde las bacterias comienzan a obtener energía de la degradación (Liang *et al.*, 2019).

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

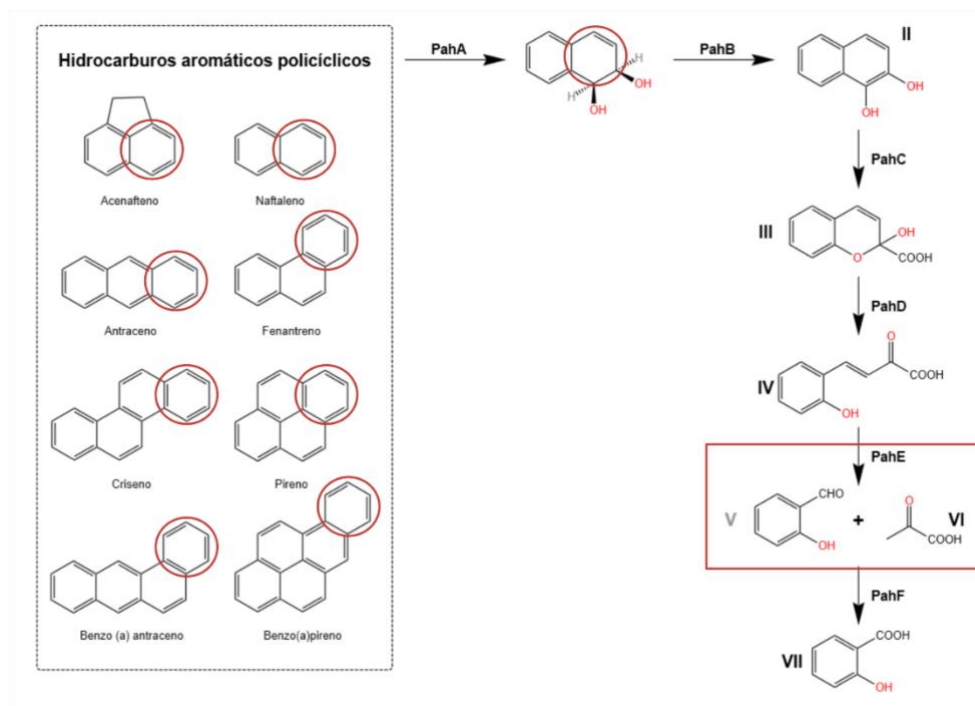


Figura 4. Rutas metabólicas de HAP, con naftaleno como ejemplo. Los productos resultantes son: Los productos químicos son I, cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno; II, 1,2-dihidroxi-naftaleno; III, 2-hidroxi-4-(2-oxo-3,5-ciclohexadienil)-buta-2,4-dienoato; IV, trans-o-hidroxibencilideno-piruvato; V, salicilaldehído; VI, piruvato; VII, salicilato. Las enzimas son PahA, naftaleno dioxigenasa; PahB, cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno deshidrogenasa; PahC, 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenasa; PahD, 2-hidroxi-cromeno-2-carboxilato isomerasa; PahE, trans-o-hidroxi-bencilideno piruvato hidratasa-aldolasa; PahF, salicilaldehído deshidrogenasa. Los círculos rojos indican el anillo aromático activo, el triángulo rojo indica la reacción catalizada por pahE (Modificado de Liang et al., 2019).

Al igual que los genes implicados en la degradación de hidrocarburos, los genes relacionados en la resistencia a antibióticos presentan diversas enzimas o estrategias moleculares en su metabolismo que les ayudan a resistir los efectos que impone cada antibiótico. Además, no solo los productos químicos son catalogados como contaminantes emergentes, si no, también la presencia de GRA en el ambiente natural. Actualmente el ambiente marino es considerado como un gran reservorio de dichos genes, lo que provoca la aparición de bacterias patógenas y la diseminación de GRA entre bacterias (Wang y Zhou, 2020).

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

En la tabla I se describe el mecanismo de acción de seis antibióticos y el mecanismo de resistencia desarrollado por las bacterias, basado en los antibióticos más prescritos y vendidos en Baja California.

Tabla I. Antibióticos, mecanismo de acción y mecanismo de resistencia.

Antibiótico	Mecanismo de acción	Mecanismo de resistencia	Referencias
Amoxicilina	Inhiben la síntesis de la pared celular e inducen la autólisis	Producción de betalactamasas, que hidrolizan el anillo betalactámico e inactivan el antibiótico.	Caroff <i>et al.</i> ,1999; Suárez y Gudío, 2009; van Hoek <i>et al.</i> ,2011
Cefalexina	Inhibición de la pared celular	Producción de betalactamasas, que hidrolizan el anillo betalactámico e inactivan el antibiótico.	Das <i>et al.</i> ,2019; van Hoek <i>et al.</i> ,2011
Sulfametoxazol	Inhibición y sustitución del ácido <i>p</i> -aminobenzoico por sulfonamidas (Fig. 2). Inhiben la replicación celular	Modificación de la forma del ác. <i>p</i> -aminobenzoico para evitar la inhibición por el antibiótico.	Antunes et al.,2005; Ovung y Bhattacharyya, 2021
Trimetoprima	Inhibidor la enzima dihidrofolata reductasa que cataliza la reducción del dihidrofolato a tetrahidrofolato, forma activa del ácido fólico	Modificación de la enzima dihidrofolata reductasa	Gleckman <i>et al.</i> , 1981; van Hoek <i>et al.</i> , 2011
Ciprofloxacino	Evita la replicación del ADN bacteriano mediante la inhibición de la ADN girasa y topoisomerasa IV	Sobreexpresión de bombas de expulsión naturales, modificación de la ADN girasa y la topoisomerasa IV, producción de proteínas que protegen la ADN girasa y la topoisomerasa IV.	van Hoek <i>et al.</i> , 2011

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

Claritromicina	Inhiben la síntesis de proteínas uniéndose a la subunidad ribosómica 50S, impidiendo la traducción del ARN mensajero.	Metilación del ARNr 23S mediante ARNr metiltransferasas. Mutaciones en los ribosomas	Van Hoek <i>et al.</i> , 2011; Lambert, 2012
-----------------------	---	---	---

Los genes presentes en las bacterias (GRA) se pueden dividir basándose en la clase de antibióticos a los que otorgan resistencia, algunos ejemplos de genes son *tet* (tetraciclinas), *erm* (macrólidos), *aac* (aminoglucósidos), *van* (vancomicina), *bla* y *ampC* (betalactámicos), *sul* (sulfonamidas), *qnrS* (fluoroquinolonas), *CTX* (cefalosporinas), entre otros (Caroff *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2022).

Antecedentes

La detección de contaminantes prioritarios como los hidrocarburos en la costa de Baja California (CBC), ha sido estudiada por varias décadas (Macías-Zamora *et al.*, 2002; Macías-Zamora *et al.*, 2014; Silva-Jiménez *et al.*, 2018), y se ha detectado la presencia de hidrocarburos alifáticos y aromáticos policíclicos en concentraciones considerables tanto en agua superficial marina como en sedimentos marinos.

En 2002, realizaron un análisis para determinar la presencia y abundancia de HAP en sedimentos marinos extraídos de distintos puntos de muestreo dentro de la Bahía de Todos Santos (BTS) en Ensenada. Algunos de los HAP que fueron reportados en los sedimentos marinos de BTS fueron fenantreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo[a]antraceno, y benzo[k]fluoreno. De los puntos de muestreo, los autores reportan que las zonas con mayor concentración de HAP total fueron el cañón submarino ubicado entre Punta Banda y la isla Todos Santos sur y sus alrededores (Macías-Zamora *et al.*, 2002).

En otro estudio realizado en 2014 por los mismos autores, se identificó la presencia de hidrocarburos alifáticos y aromáticos policíclicos en sedimentos marinos en la zona de descarga de PEMEX en Rosarito y en la desembocadura del arroyo El Gallo en BTS, Ensenada. Los autores reportaron la presencia de una mayor cantidad de hidrocarburos en la zona de Rosarito. Los resultados que obtuvieron reportan la presencia de hidrocarburos alifáticos de tipo alcanos con cadenas de C14 a C37. Mientras que de hidrocarburos aromáticos policíclicos reportaron que los más abundantes en Rosarito fueron benzo[a]antraceno, pireno, criseno, indeno[1,2,3-cd]pireno y benzo[b]fluoranteno. En cuanto a los hidrocarburos encontrados en sedimentos de BTS, se encontraron alcanos principalmente de C17 a C35, y de hidrocarburos aromáticos policíclicos los más abundantes fueron fluoranteno, benzo[a]pireno, y se destacó la alta concentración de criseno (Macías-Zamora *et al.*, 2014).

En 2018, Silva-Jiménez y colabores realizaron un estudio donde se determinó y cuantificó la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos marinos y en agua superficial en zonas cercanas al puerto de Rosarito. Los resultados obtenidos por los autores describen

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

principalmente la presencia de HAP de bajo peso molecular (naftaleno, fluoreno y fenantreno) en el agua superficial, mientras que en los sedimentos marinos dominó la presencia de HAP de alto peso molecular (fluoranteno, pireno y benzo[a]pireno) (Silva-Jiménez *et al.*, 2018).

También se realizó un análisis de la presencia de contaminantes emergentes como los antibióticos en dos zonas del Pacífico Norte: San Diego, California, USA y Tijuana B.C., México. El estudio se centró en detectar la presencia de distintos genes de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (genes: *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA*, *aac*) en sedimentos marinos superficiales en las zonas mencionadas anteriormente. Los autores realizaron una comparación de cómo la presencia y abundancia de los genes puede ser afectada por las temporadas secas y lluviosas de la región. Los resultados mostraron que la mayor abundancia de los genes se presenta después de la temporada de lluvias, cuando los ríos transportan una mayor cantidad de agua hacia el mar, además encontraron que los sedimentos muestreados en la desembocadura del río de Tijuana se encontraron genes con mayor frecuencia que en el humedal muestreado en San Diego. Se reportó que los genes con mayor presencia tanto en temporada seca como en temporada lluviosa fue *qnrB* y *qepA*. Además, cuantificaron la presencia del gen *qnrA* haciendo uso de la técnica de PCR en tiempo real, encontrando que la concentración del gen en la desembocadura del río de Tijuana es mayor después de las lluvias (Cummings *et al.*, 2011).

Los estudios de la estructura de las comunidades bacterianas son escasos en la Costa de Baja California (CBC). Rosarito es el municipio que cuenta con los únicos análisis de la diversidad procariota marina utilizando métodos dependientes e independientes de cultivo (Silva-Jiménez *et al.*, 2018; Ul-Hasan *et al.*, 2019). En 2018 se realizó un estudio que se centró en identificar bacterias con potencial para degradar pireno (hidrocarburo aromático policíclico de alto peso molecular) en sedimentos marinos y agua superficial en tres puntos de la zona del Puerto de Rosarito, B. C. Como resultado fueron aisladas 52 cepas bacterianas, las cuales pertenecieron a los filos Bacillota (8%), Actinomycetota (28%) y Pseudomonadota (64%) (Silva-Jiménez *et al.*, 2018).

En otro estudio realizado en el mismo municipio de Rosarito, B. C., pero en la zona costera conocida como Puerto Nuevo, los autores estudiaron la diversidad y abundancia de la comunidad procariota

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

presente en la columna de agua y en sedimentos marinos en tres puntos distanciadas entre sí solamente por algunos metros. El procedimiento lo realizaron haciendo uso de la secuenciación masiva del gen ribosomal 16S ARNr en plataforma Illumina MiSeq. Los autores encontraron que la comunidad procariota en la zona está representada por un total de 50 filos, siendo Pseudomonadota el filo más abundante en la columna de agua, mientras que Bacteroidota lo fue en las muestras de sedimentos. Reportaron que la diversidad procariota en los sedimentos es mayor que la encontrada en la columna de agua, y que las muestras sedimentarias presentan patrones de composición similares entre sí, pero diferentes a las de la columna de agua. Este estudio muestra un poco como podría ser la diversidad procariota en sedimentos marinos y en la columna de agua, además de ser un comienzo para conocer cómo se compone la comunidad procariota dentro del ambiente marino de la costa de Baja California (Ul-Hasan *et al*, 2019).

Hasta el momento no se han realizado estudios de la capacidad de utilizar a las comunidades microbianas y la presencia de genes marcadores como indicadores del estado de salud del ambiente marino de la región en cuanto a la presencia de contaminantes emergentes como los antibióticos. En cuanto a su uso como indicadores de la presencia de contaminantes prioritarios, se han encontrado cepas bacterianas con la capacidad de crecer en presencia de pireno, y con un posible potencial como degradadoras de este pero el objetivo del trabajo no fue utilizar a las bacterias como indicadores del estado de salud del ambiente.

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

Justificación

La costa de Baja California es una zona que tiene un alto impacto antropogénico debido a los asentamientos y diversas actividades que se realizan a lo largo de la misma. Existen pocos estudios sobre cómo se encuentra la salud ambiental de la CBC en cuanto a contaminantes prioritarios como los hidrocarburos, y nulos estudios sobre la presencia de contaminantes emergentes como los antibióticos. En cuanto a la estructura y función de las comunidades bacterianas en la costa es muy poca y concentrada en una zona pequeña de toda la costa. Por lo que es importante conocer cómo es la composición estructural de las comunidades bacterianas, y si hay presencia de genes implicados en la degradación de hidrocarburos o en la resistencia a antibióticos. Todo lo anterior puede ser utilizado como una forma de analizar el estado de salud ambiental de la costa de Baja California en cuanto a la presencia de estos contaminantes.

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

Objetivos

General

Conocer la diversidad procariota presente en los sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California (CNBC) e identificar genes marcadores implicados en la degradación de hidrocarburos y resistencia a antibióticos.

Particulares

- Conocer la diversidad procariota mediante la secuenciación del gen ribosomal 16S ARNr en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California
- Realizar inferencias metabólicas hacia hidrocarburos y antibióticos en zonas con mayor impacto antropogénico.
- Identificar la presencia de genes marcadores con funciones en la degradación de hidrocarburos y resistencia a antibióticos en sedimentos marinos en la CNBC.

Hipótesis

Los sedimentos marinos de la CBC presentan una alta diversidad en su composición procariota que presentan genes funcionales implicados en la degradación de diferentes tipos de hidrocarburos y en la resistencia a antibióticos. La diversidad presente en los sedimentos, así como la presencia de los genes funcionales podrán ser utilizados como indicadores de la existencia de estos contaminantes en el ambiente marino de la CBC.

Materiales y metodología

Zona de estudio

Baja California se encuentra en la zona noroeste de México. Colinda al norte con California, E. U. A., al sur con Baja California Sur, al este con el Golfo de California y al oeste con el océano Pacífico.

La circulación oceánica del océano Pacífico en la costa oeste de Baja California es parte del Sistema de la Corriente de California (SCC). La corriente de California (CC) perteneciente al SCC es una corriente marina que proviene de Alaska (origen subártico) hasta la Península de Baja California, es una corriente superficial (0 – 200 m de profundidad), son aguas frías (10 °C – 20 °C) y la salinidad ronda entre los 32.5 – 33.8. Además, la CBC presenta surgencias estacionales (primavera y otoño) que provocan la introducción de una mayor concentración de nutrientes y oxígenos (Durazo, 2015; Kurczyn *et al*, 2019).

Muestreo

En septiembre del año 2018 se llevó a cabo la campaña Bight, donde se recolectaron 33 muestras de sedimentos marinos a lo largo de la costa de Baja California (Fig. 5). Las muestras que fueron analizadas en esta tesis fueron recolectadas desde la zona fronteriza de Estados Unidos-México hasta la zona costera frente a la barra del Estero de Punta Banda (Ensenada, B. C.). A lo largo de la costa oeste de Baja California, se encuentran tres puertos de importancia (Puerto de Rosarito, el Sauzal y el Puerto de Ensenada), también se encuentran diversas plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) las cuales son responsables de sanear el agua. Para el proyecto, se tomaron muestras con cercanía a los diferentes puertos y PTAR presentes en la costa. En la tabla II se describen características de cada punto de muestreo: coordenadas, referencia de la zona, profundidad, entre otras.

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

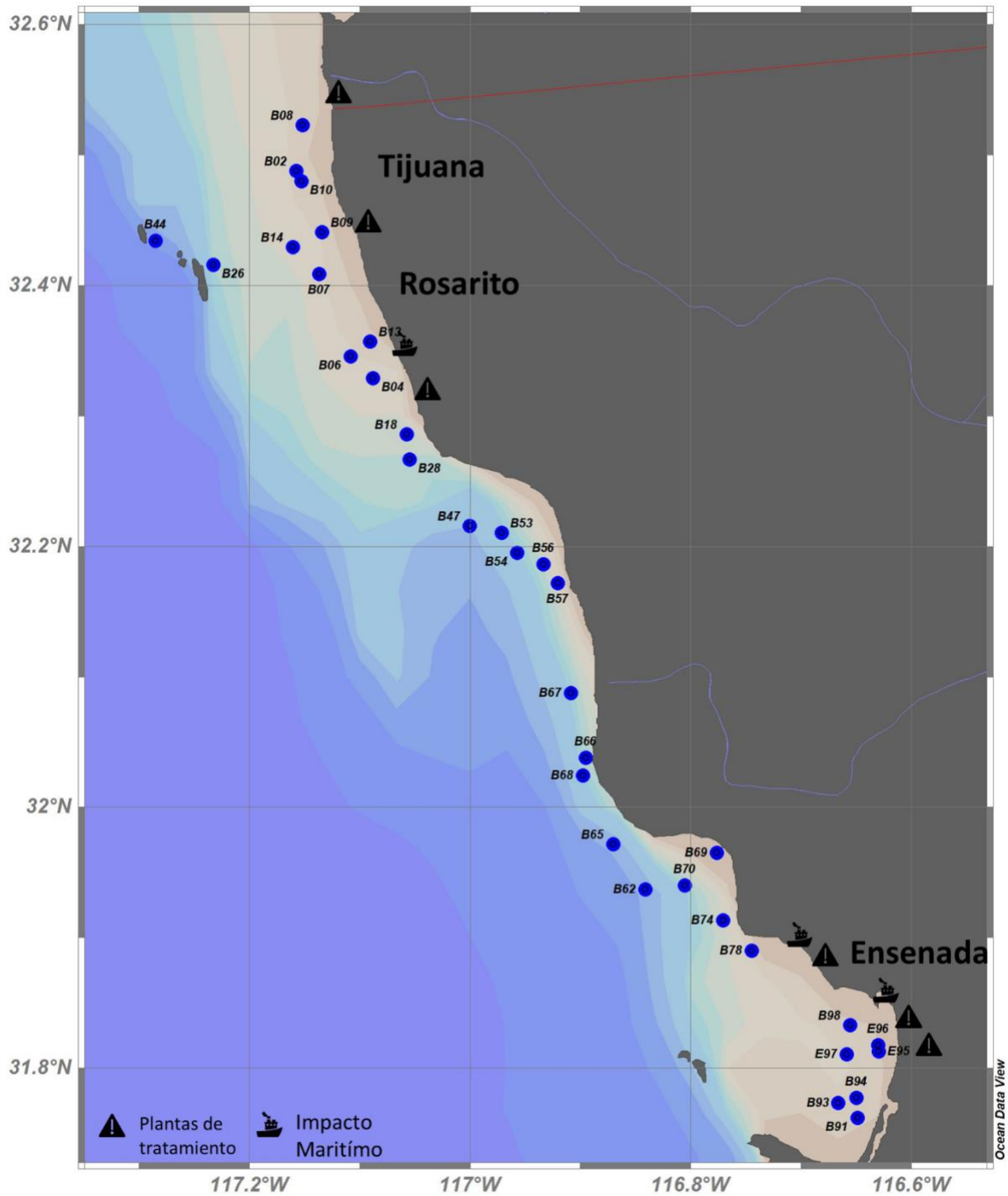


Figura 5. Zona de estudio. En azul se representan las zonas donde se muestreo los sedimentos marinos, con triángulos las zonas donde se encuentran las plantas de tratamiento de aguas residuales y con barco las zonas portuarias con mayor importancia en la CBC.

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

Tabla II. Características de las estaciones de muestreo.

Estación	Coordenadas de la estación		Referencia de ubicación	Zona*	Profundidad* (m)	División de profundidad*
	Latitud	Longitud				
B08	32.523	-117.1516	Playas de Tijuana	Norte	18	Somero
B02	32.4876	-117.1575	Mirador Marlikas La Joya	Norte	24	Somero
B10	32.4797	-117.1525	Sur de Mirador Marlikas La Joya	Norte	21	Somero
B09	32.441	-117.1341	Real del Mar Golf Resort	Norte	19	Somero
B44	32.4341	-117.2847	Este de la Isla Coronado Norte	Norte	54	Intermedio
B14	32.4293	-117.1605	Playa Los buenos, Tijuana	Norte	23	Somero
B26	32.4159	-117.2324	Este de la Isla Coronado Sur	Norte	21	Somero
B07	32.4086	-117.1367		Norte	20	Somero
B13	32.3572	-117.0903	Playa La bardita, Rosarito	Norte	16	Somero
B04	32.329	-117.0877	Muelle de Rosarito	Norte	30	Somero
B18	32.2857	-117.0575	Fox Studio, Rosarito	Norte	50	Intermedio
B28	32.2666	-117.0546	El Descanso, Rosarito	Norte	68	Intermedio
B47	32.2156	-117.0002	Los Arenales, Primo Tapia	Norte	160	Profundo
B53	32.2103	-116.9711	Los Arenales, Primo Tapia	Centro	79	Intermedio
B54	32.195	-116.9574	Misión Viejo Sur, Rosarito	Centro	72	Intermedio
B56	32.1863	-116.9332	Cuenca Lechera	Centro	39	Intermedio
B57	32.1719	-116.9203	Norte de Punta Mezquite (Venus. Carranza)	Centro	24	Somero

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

B67	32.0876	-116.9085	Playa Escondida, La Misión (Ens)	Centro	46	Intermedio
B66	32.0381	-116.8952	Ejido Ensenada	Centro	26	Somero
B68	32.0245	-116.8975	Arroyo al Norte de Bajamar	Centro	30	Somero
B65	31.9719	-116.8701	Mirador Salsipuedes	Centro	157	Profundo
B69	31.9652	-116.7763	Bahía Salsipuedes	Sur	20	Somero
B62	31.9369	-116.8412	Salsipuedes (derrumbe Carretera)	Sur	172	Profundo
B70	31.9402	-116.8056	Salsipuedes (derrumbe) – Cuatro cuatros	Sur	102	Intermedio
B74	31.9132	-116.7705	Sur Playa Saldamando	Sur	46	Intermedio
B78	31.8899	-116.7449	Playa Tres Emes	Sur	31	Intermedio
B98	31.8105	-116.6587	Malecón Playa Hermosa	Sur	23	Somero
E96	31.813	-116.6296	Playa Pacífica (Costco)	Sur	17	Somero
E95	31.833	-116.6554	Playa Pacífica	Sur	17	Somero
E97	31.8176	-116.63	Guarnición Militar	Sur	25	Somero
B94	31.7773	-116.6497	Boca del Estero de Punta Banda	Sur	20	Somero
B93	31.7734	-116.6662	Casi Boca del Estero de Punta Banda	Sur	28	Somero
B91	31.7618	-116.6488	Mitad de Barra Estero de Punta Banda	Sur	15	Somero
* Características tomadas de Valenzuela - Suárez, 2021.						

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

Extracción de ADN

Para realizar la extracción de ADN ambiental de cada muestra, primero se pesaron 0.25 g de sedimento de las muestras por separado y se utilizó el kit comercial Kit DNeasy PowerSoil®(QIAGEN), con algunas modificaciones realizadas y que se describen a continuación.

Se agregaron 0.25 g de sedimento al tubo PowerBead y se agitó de forma suave, posteriormente se añadieron 60 µL de solución C1, se mezcló por inversión y se incubó a 70 °C durante 10 min. Pasado el tiempo se mezcló la muestra durante 5 – 10 min en vórtex a velocidad máxima, después se centrifugó a 10,000xg durante 1 min y se rescató el sobrenadante en un tubo de 2 mL nuevo. Se añadieron 250 µL de solución C2 y se mezcló con vórtex por 5 s para después dejarlo en incubación entre 2 – 8 °C durante 5 min. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó durante 1 min a 10,000xg y se rescató el sobrenadante a un tubo nuevo. Al tubo con el sobrenadante se le agregó 1200 µL de solución C4 (previamente agitada). De la mezcla anterior se tomaron 675 µL y se añadieron a tubo “MB Spin Column” y se centrifugó durante 1 min a 10,000xg, descartando el sobrenadante. Lo obtenido se lavó con 500 µL de solución C5 y se centrifugó durante 30 s a 10,000xg, y se desechó nuevamente el sobrenadante. Se colocó la columna “MB Spin Column” en un tubo de 2 mL nuevo y se añadieron 50 µL de solución C6 (previamente calentado a 65 °C). Se centrifugó a 10,000xg por 30 s y se descartó la columna, quedando el ADN de la muestra en el tubo. El ADN se conservó a -20 °C.

Construcción de metagenotecas

Utilizando los productos obtenidos de las extracciones de ADN ambiental, se realizó una amplificación con PCR punto final de un paso, propuesto por Kozich *et al.*, (2013). Para ello, se utilizaron cebadores compuestos que tenían los cebadores para amplificar la región de interés (V4 del gen ribosomal 16S ARNr) y una secuencia índice (código de barras); además de la combinación de un adaptador para el secuenciador Illumina, un PAD y un ligador (linker) para seguir con el procedimiento de la secuenciación. Como control positivo se utilizó la comunidad microbiana

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

simulada o “mock microbial community” ZymoBIOMICS Microbial Community Standard II (Log Distribution) de Zymo Research.

Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C durante 2 min, 95 °C por 20 s, 55 °C durante 15 s, 72 ° por 5 min (25 – 30 ciclos), y 72 °C durante 7 min. Los productos de las reacciones de PCR tuvieron un tamaño de entre 500 – 550 pares de bases (pb), se realizaron triplicados de cada muestra, y se combinaron los productos para realizar la secuenciación masiva. La secuenciación se realizó en el departamento de innovación biomédica de CICESE en colaboración con la Dra. María Asunción Lago Lestón.

Las combinaciones de los índices por cada muestra se encuentran en la sección de **Anexos** (Anexo I)

Análisis bioinformático

Para realizar el análisis bioinformático de los datos obtenidos de las amplificaciones secuenciadas se utilizó la segunda generación del software especializado *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME 2; Bolyen *et al*, 2019). QIIME 2 es un software de código abierto que hace uso de diversos comandos para realizar alineamientos de secuencias, construcción de gráficos de la taxonomía, inferir árboles filogenéticos y realizar análisis de alfa y beta diversidad (Hernández *et al*, 2020).

En la figura 6 se observa un mapa conceptual del flujo de trabajo a realizar en QIIME2 y los datos que se obtienen como resultado final.

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

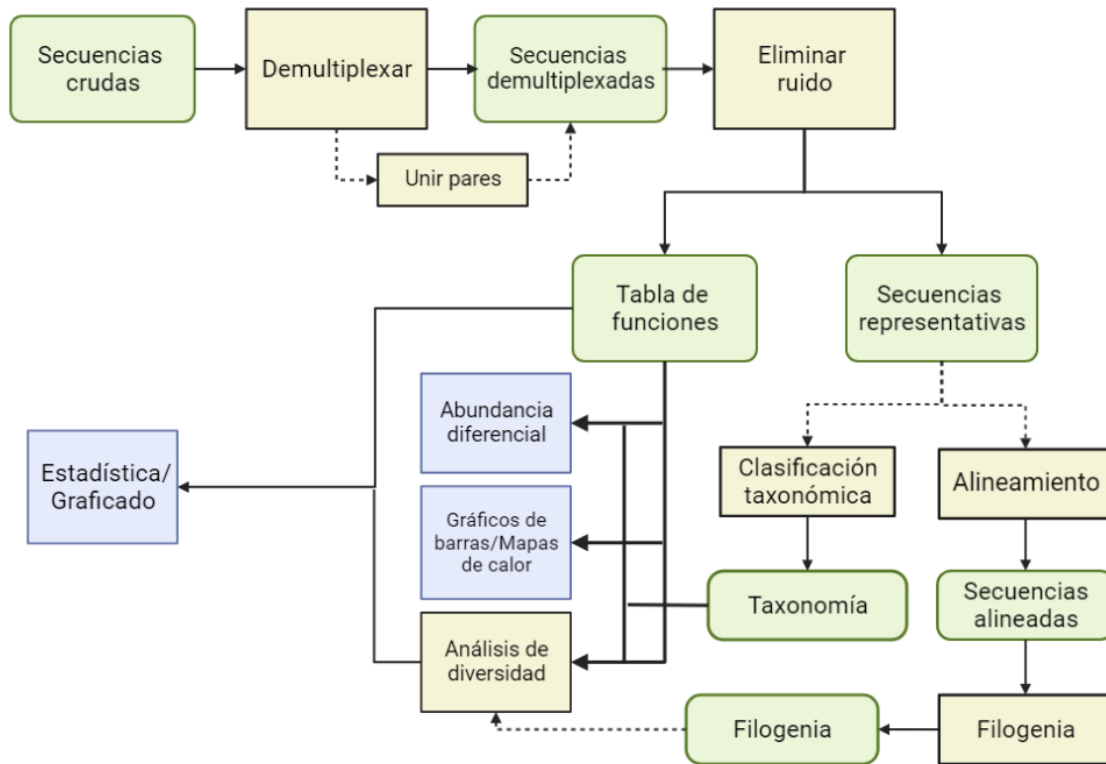


Figura 6. Mapa conceptual del flujo de trabajo en QIIME2 (modificado de: <https://docs.qiime2.org/2019.7/tutorials/overview/>)

Los datos obtenidos de la secuenciación masiva fueron archivos fastq paired end demultiplexadas (dos archivos por muestra) y fueron los datos que se importaron a un artefacto compatible para su análisis en QIIME2.

Una vez obtenido el artefacto con los datos se procedió a eliminar el ruido (denoising), haciendo uso de DADA2 se eliminaron y/o corrigieron las regiones que comprometen los datos por calidad (se limpiaron las lecturas que poseían una calidad de phred menor a 30) y se removieron quimeras.

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

Clasificación taxonómica

Una vez que se limpiaron los datos, y siguiendo el flujo de trabajo de QIIME2, se procedió a realizar la clasificación taxonómica haciendo uso de la base de datos de Greengenes (Greengenes 13_8 99% OTUs full-length sequences) (McDonald *et al.*, 2012). Una vez terminada la clasificación taxonómica, se procedió a obtener la diversidad procariota y su abundancia en cada muestra con la utilización de diversos comandos.

El microbioma central se obtuvo con el comando `core-feature` utilizando como archivo de entrada la tabla de frecuencia de los grupos taxonómicos, dando como resultado un archivo con el microbioma central presentado en una tabla.

Para la obtención de los análisis de coordenadas principales (PCoA, por sus siglas en inglés) se utilizaron las matrices de similitud calculadas con distancia Unifrac ponderada y no ponderada obtenidas durante el trabajo en QIIME2 (análisis de diversidad, Fig. 6), y el archivo de metadatos. Con los archivos mencionados y utilizando la librería de R `make_2d_plots.py`, se obtuvieron archivos de formato HTML para su análisis de forma didáctica y fueron descargados en archivos visualizables con formato SVG (scalable vector graphics).

Inferencias sobre rutas metabólicas

El resultado obtenido del análisis de la diversidad utilizando el gen ribosomal 16S ARNr en QIIME2 fueron variantes de secuencia de amplicón (ASV, por sus siglas en inglés). Los ASV provienen de los métodos utilizados para eliminar el ruido (“denoising”), los cuales generan un modelo de error basado en la calidad de la secuenciación y utilizan un modelo para distinguir la variación biológica predicha y la variación que probablemente fue generada por error en la secuenciación (Chiarello *et al.*, 2022).

Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt2) es una herramienta de código abierto que fue desarrollada para la predicción de funciones mediante la utilización de secuencias del gen marcador 16S ARNr (Douglas *et al.*, 2020). Utilizando el

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

software PICRUST2 y los ASVs, obtenidas previamente con QIIME2, se realizó el proceso bioinformático para inferir cuales son las rutas metabólicas presentes en cada muestra analizada y su abundancia. El proceso descrito por (Douglas *et al.*, 2020), se describe en la figura 7.

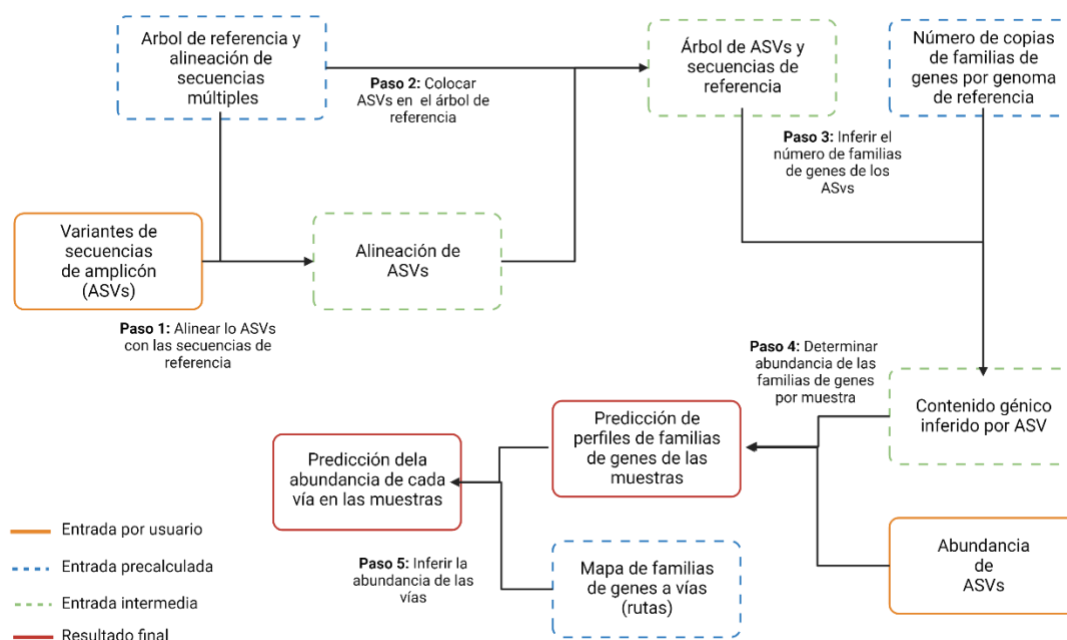


Figura 7. Mapa conceptual del flujo de trabajo en PICRUST2 (modificado de Douglas *et al.*, 2020).

De las rutas metabólicas inferidas, se buscaron aquellas que estuvieran implicadas en los procesos de degradación de hidrocarburos y de resistencia a antibióticos.

Utilizando este mismo software se infirieron las enzimas que catalizan las vías metabólicas que fueron inferidas anteriormente. También se infirieron los ASVs (grupos taxonómicos) que están aportando las enzimas necesarias para llevar a cabo los procesos de interés.

Para corroborar lo obtenido con el software PICRUST, se utilizó el servidor en línea METAGENassist (<http://www.metagenassist.ca/METAGENassist/>), que proporciona herramientas estadísticas para la genómica comparativa. Además, este servidor es capaz de realizar un enriquecimiento fenotípico automatizado (Arndt *et al.*, 2012). Para realizar el análisis con el servidor web solo fue

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

necesario utilizar el archivo de ASVs obtenido durante el análisis realizado con QIIME2 y el archivo de metadatos con la información de cada estación analizada.

Análisis de datos

Los datos obtenidos con QIIME2, fueron importados a archivos de texto CSV (Comma separate values, por sus siglas en inglés) para su graficado.

El lenguaje de programación R es un software libre para computación estadística y gráficos (R Core Team, 2021), por lo que se trabajó en este lenguaje a través de RStudio para la obtención de gráficos. Las librerías utilizadas para el graficado fueron: ggplot2 (Wickham *et al.*, 2016), pheatmap (Kolde, 2016), phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013), grid (R Core Team, 2023) y ggalluvial (Brunson y Read, 2023). Los esquemas de las rutas metabólicas inferidas con PICRUST2 fueron creadas con Biorender.com.

Genes marcadores implicados en la degradación de hidrocarburos

Con el fin de conocer si en las zonas donde fueron tomadas las muestras de sedimentos existen comunidades procariontas hidrocarbonoclastas, se seleccionaron dos genes funcionales implicados en la degradación de hidrocarburos alifáticos (tabla III) y aromáticos (tabla IV). Para ello, se realizaron PCR de cada gen marcador utilizando el ADN obtenido de cada muestra de sedimento recolectada a lo largo de la CBC.

La concentración final de los reactivos utilizados fue de: Buffer 5X GoTaq al 1X, MgCl₂ a 0.25 mM, 0.2 mM de cada dNTP, cebadores (directo y reverso) a 0.2 mM cada uno, ADN ambiental de cada muestra y 1.5 unidades de GoTaq polimerasa (PROMEGA).

El gen implicado en la degradación de hidrocarburos alifáticos es el gen *alkB*, en la tabla III se describe el nombre de la enzima para la que codifica, la secuencia de los cebadores y el tamaño del fragmento amplificado.

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

Tabla III.- Gen marcador *alkB*. Nombre de la enzima, secuencia de los cebadores, tamaño esperado y referencia del gen marcador.

Nombre de enzima	Gen blanco	Primers	Tamaño del gen (pb)	Referencia
Alcano monooxigenasa	<i>alkB</i>	AACTACMTCGARCAYTACGG	100	Liu <i>et al.</i> , 2015
		TGAMGATGTGGTYRCTGTTCC		

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94 °C por 5 minutos, 94 °C por 1 minuto, 59 °C por 2 minutos, 72 °C por 1 minuto (35 ciclos), 72 °C por 7 minutos.

El gen marcador implicado en la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos *pahE*. En la tabla IV se describe la información del gen.

La concentración final de los reactivos utilizados fue de: Buffer 5X GoTaq al 1X, MgCl₂ a 0.25 mM, 0.2 mM de cada dNTP, cebadores (directo y reverso) a 2 mM cada uno, ADN ambiental de cada muestra y 1.5 unidades de GoTaq polimerasa (PROMEGA).

Tabla IV. Gen marcador *pahE*. Nombre de la enzima, secuencias de los cebadores, tamaño esperado y referencia del gen marcador.

Nombre de enzima	Gen blanco	Primers	Tamaño del gen (pb)	Referencia
Aldolasa hidratasa	<i>pahE</i>	TGCGGCGGGTGTNAAYGGNAT	377	Liang <i>et al.</i> , 2019
		CCTGAGGAATCTCGGACATYTSTGCCCARAA		

Las condiciones de amplificación fueron: 94 °C por 5 minutos, 94 °C por 30 segundos, 60 °C durante 45 segundos y 72 °C por 30 segundos (35 ciclos) y 72 °C durante 10 minutos.

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

El tamaño esperado de los productos amplificados se verificó en geles de agarosa al 1.5% por electroforesis horizontal, utilizando SYBR Gold como revelador. Las condiciones utilizadas para realizar la electroforesis fueron: un voltaje de 80 voltios durante 40 minutos.

Genes marcadores implicados en la resistencia a antibióticos

Para la resistencia a antibióticos se utilizaron cuatro genes marcadores para diferentes tipos de antibióticos. Se realizaron reacciones de PCR para cada gen utilizando como ADN templado el material genético obtenido de las muestras de sedimentos colectadas en cada una de las estaciones.

Los genes marcadores se encuentran implicados en la resistencia a: amoxicilina, sulfametoxazol, cefalexina, ciprofloxacino (tabla V).

Para cada reacción de PCR, la concentración final de los reactivos utilizados fue de: Buffer 5X GoTaq al 1X, MgCl₂ a 0.25 mM, 0.2 mM de cada dNTP, cebadores (directo y reverso) a 0.2 mM cada uno, ADN ambiental de cada muestra y 1.5 unidades de GoTaq polimerasa.

Tabla V. Genes marcadores. Nombre del antibiótico al que genera resistencia, gen blanco, secuencia de los cebadores, tamaño esperado y referencia del gen marcador.

Nombre de antibiótico	Gen blanco	Primers	Tamaño del gen (pb)	Referencia
Amoxicilina	<i>ampC</i>	AATGGGTTTTCTACGGTCTG	191	Caroff <i>et al.</i> , 1999 Momna y Deog-Hwan, 2021
		GGGCAGCAAATGTGGAGCAA		
Sulfametoxazol	<i>Sul1</i>	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC	162	Lu <i>et al.</i> , 2019
		TGAAGTTCCGCCCAAGGCTCG		
Cefalexina	<i>CTX</i>	ACCAACGATATCGCGGTGAT	101	Guo <i>et al.</i> , 2018

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

		ACATCGCGACGGCTTCT		
Ciprofloxacino	<i>qnrS</i>	CGACGTGCTAACTTGCCTGA	118	Colomer-Lluch <i>et al.</i> , 2014
		GGCATTGTTGGAACTTGCA		

Las condiciones de amplificación para cada gen se describen en la tabla VI.

Tabla VI. Condiciones de amplificación de los genes funcionales de resistencia a antibióticos

Gen funcional	Condiciones de amplificación
<i>ampC</i>	94 °C por 5 min, 94 °C por 90 s, 57 °C por 30 s, 72 °C por 1 min (30 ciclos) y 72 °C por 10 min.
<i>Sul1</i>	95 °C por 5 min, 95 °C por 1 min, 57 °C por 30 s, 72 °C por 1 min (35 ciclos) y 72 °C por 10 min.
<i>CTX</i>	94 °C por 5 min, 94 °C por 1 min, 60 °C por 30 s, 72 °C por 1 min (35 ciclos) y 72 °C por 6 min.
<i>qnrS</i>	94 °C por 5 min, 94 °C por 30 s, 57 °C por 30s, 72 °C por 45 s (ciclos) y 72 °C por 6 min

El tamaño esperado de todos los productos amplificados se verificó en geles de agarosa al 1.5% por electroforesis horizontal, utilizando SYBR Gold como revelador. Las condiciones utilizadas para realizar las electroforesis fueron: un voltaje de 80 voltios durante 40 minutos.

Resultados

Diversidad procariota

El análisis de los datos de la secuenciación masiva del gen 16S ARNr ribosomal (metabarcoding) de las muestras de sedimentos marinos tomados de las 33 estaciones localizadas a lo largo de la CBC muestran un total de 3,001,623 lecturas, con un promedio de 89,941.68 lecturas por muestra. La estación con el mayor número de lecturas fue E96 (dentro de la bahía de Ensenada) (Fig. 5) con 124,636 lecturas, mientras que la estación con menor cantidad de lecturas fue B44 (isla Coronado Norte) (Fig. 5) con 62,352.

Para evaluar la cobertura de las secuencias obtenidas en cada una de las muestras a través del trazado del número de secuencias observadas en función de la profundidad de secuenciación se llevó a cabo el método de rarefacción. Cuando la curva de rarefacción alcanza una meseta, se podrán detectar solo pocas secuencias nuevas al aumentar nuevamente la profundidad, por lo que se determina, de forma visual, que la muestra cubre de forma suficiente las comunidades de la muestra de origen (Kleine Bardenhorst et al., 2022). Las curvas de rarefacción de las 33 muestras de sedimentos analizadas presentan una meseta (Fig. 8) indicando que el número de datos de la secuenciación fue razonable, es decir, suficiente para un análisis correcto.

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

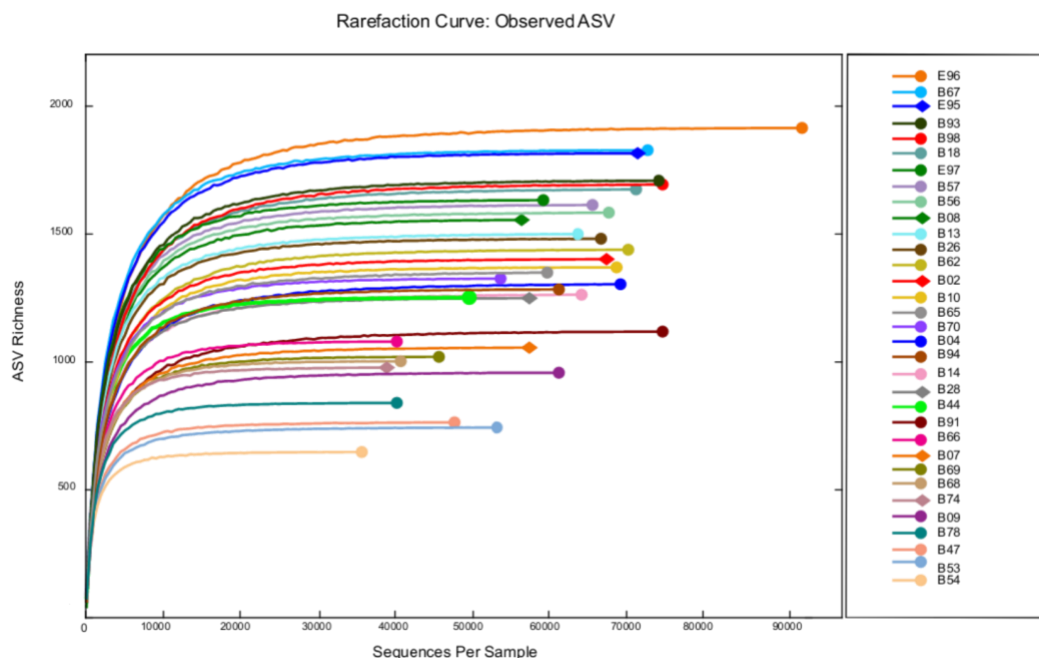


Figura 8. Curva de rarefacción obtenida para cada muestra sedimentaria.

Dado que todas las muestras tuvieron una buena cobertura de secuenciación, se procedió a realizar la clasificación taxonómica. Los análisis indican que hay un total de 68 filis, de los cuales 64 (94.12%) pertenecen al dominio Bacteria y 4 (5.88%) al dominio Arquea (Fig. 9). En cuanto a filis, la muestra de la estación B53 presenta el menor número de éstos, representado por el 54.69% de los filis totales (35 filis); mientras que la muestra que cuenta con mayor cantidad de filis es la que corresponde a la estación B08 con un 83.82% de los filis totales (57 filis).

El filo con mayor abundancia relativa (ASVs) detectado en las muestras fue Proteobacteria (Pseudomonadota), principalmente en las estaciones B04 (suroeste del Puerto de Rosarito) y B54 (Misión Viejo sur en Rosarito; Fig. 5 y tabla II) donde este filo representa, respectivamente, el 59.33 y el 64.94% del porcentaje total. Sin embargo, en los sedimentos de las estaciones E96 y E95 (zona de Ensenada) este filo se encontró representado por un 35.38 y 36.38%, respectivamente (Fig. 5 y Fig. 9).

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

Bacteroidetes (Bacteroidota) es el segundo filo más abundante encontrado en las muestras de sedimentos analizados. Los análisis revelan que la muestra E96 (Ensenada) este filo está representado por el 21.73% del total de filios encontrados. En las estaciones B13 y B04 (Rosarito; Fig. 5) porcentajes cercanos al 20% corresponden a Bacteroidetes (Bacteroidota); por el contrario, las muestras con menor presencia de este filo fueron las de las estaciones B62 (8.8%), E97 (7.46%) y B94 (8.24%), a la altura de Salsipuedes y dentro de la Bahía de Ensenada, respectivamente (Fig. 5, tabla II y Fig. 9).

Planctomycetes (Planctomycetota) se clasificó como el tercer filo con mayor abundancia, teniendo un mayor porcentaje en los sedimentos marinos recolectados en la estación B09 (oeste de la ciudad de Tijuana) (Fig. 5) con 17.39% (Fig. 8); mientras que en las estaciones B53 y B54 (a la altura de Primo Tapia y Rosarito) las muestras están representadas con 1.59 y 1.97% de este filo, respectivamente (Fig. 8). Crenarchaeota es el filo de arqueas y el cuarto filo procariota con mayor abundancia relativa en los 33 sedimentos marinos analizados. Su abundancia máxima fue encontrada en la muestra de la estación B44, al este de la isla Coronado Sur (Fig. 5), representando el 18.19% del total de filios encontrados en la zona (Fig. 9).

Los filios Acidobacteria (Acidobacteriota), Chloroflexi (Chloroflexota), Verrucomicrobia (Verrucomicrobiota) y Cyanobacteria (Cyanobacteriota) cuentan con abundancias relativas con porcentajes similares que se encuentran entre 0.1 y 12% (Fig. 9). La abundancia relativa del resto de los filios encontrados en las muestras presenta porcentajes cercanos o menores al 4% del total de los filios encontrados.

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

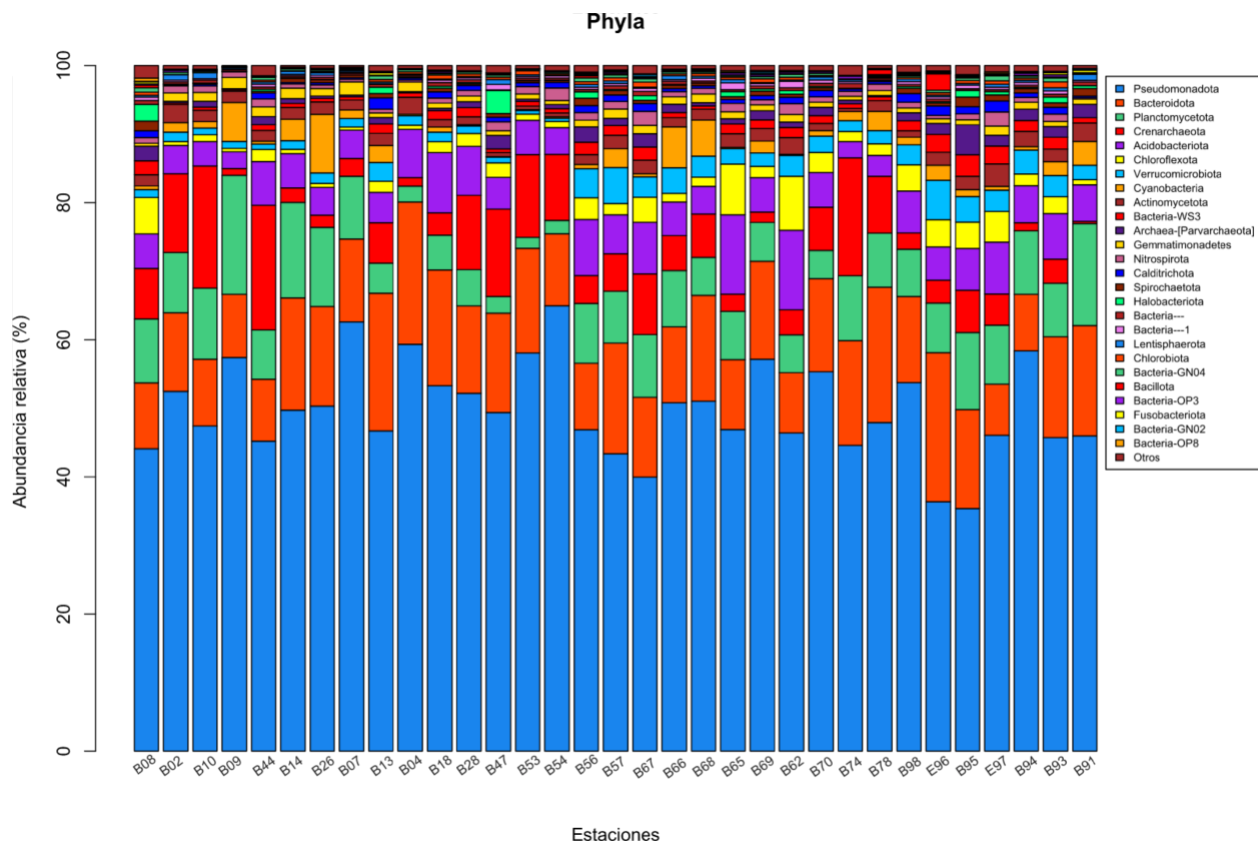


Figura 9. Abundancia relativa de filios más abundantes. En el eje horizontal se representan las estaciones y en el eje vertical la abundancia relativa, los colores representan cada filo encontrado.

Dentro de la casilla “otros” (Fig. 9), están agrupados los filios menos abundantes (<0.1% de abundancia relativa) encontrados en cada una de las estaciones. Estos filios presentan abundancias absolutas menores a 350 ASVs (Fig. 10). La mayoría de los filios representados en la figura 8, tiene una abundancia entre 0 y 100 ASVs, pero hay algunos casos que presentan una mayor abundancia como es el caso de los filios SAR406, Fibrobacteres, BCR1 y un filo de arquea sin asignación taxonómica. Estos filios se encuentran principalmente en las muestras de estaciones cercanas a la zona costera del municipio de Ensenada (desde B91 hasta E97) (Fig. 5). Por otro lado, en algunas muestras se encontraron algunos filios con gran abundancia. Por ejemplo, en los sedimentos de la estación B08 se encontró una arquea sin asignación taxonómica, mientras que en la muestra correspondiente a la estación B44, el filo denominado como SBR1093 está representado por un alto número de ASVs.

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

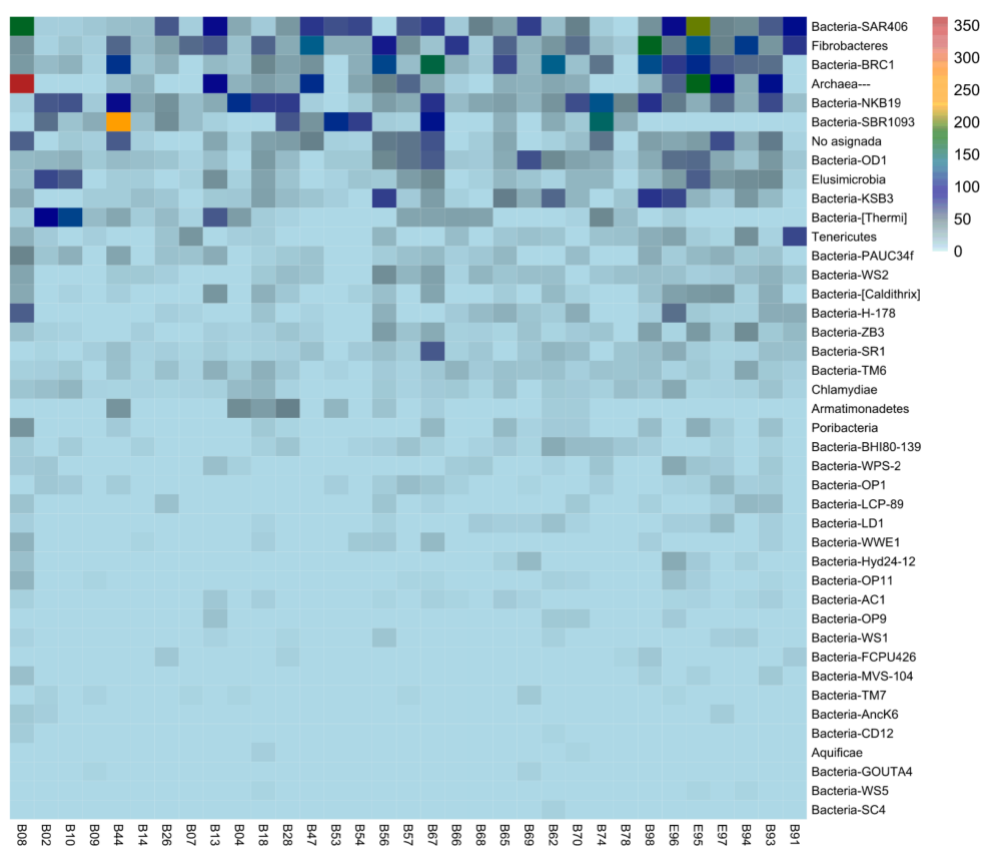


Figura 10. Mapa de calor de filas con abundancia relativa menor. En el eje horizontal se representan los fillos y en el eje vertical las estaciones analizadas, los colores representan la abundancia absoluta de ASVs presentes: en color rojo la mayor abundancia y en color azul claro la abundancia menor.

Después de obtener los datos a nivel de filo de todas las muestras, se realizó un filtrado de los datos obtenidos en QIIME2 para obtener información de la abundancia a nivel de género. En total se obtuvieron 733 géneros, de los cuales 696 son géneros pertenecientes al dominio Bacteria y 37 al dominio Arquea. Se realizó un mapa de calor con los 59 géneros más abundantes (abundancia mayor al 1%) presentes en las muestras (Fig. 11). Los géneros bacterianos más abundantes en las muestras sedimentarias de las 33 estaciones fueron *Lutimonas* (Bacteroidetes/Bacteroidota) y *Desulfococcus* (Proteobacteria/Pseudomonadota), además del género *Nitrosopumilus* (Crenarchaeota) perteneciente al dominio Arquea. Algunos géneros se encontraron con menor abundancia como *Eudoraea*, *Planctomycetes* y *Lutibacter*, además de géneros aún sin asignación

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

taxonómica pero designados como LCP.26 y BD2.6 (Fig. 11). En muestras de algunas estaciones se pudieron encontrar otros géneros con una abundancia alta, comparada con la encontrada en otras estaciones, tales como la muestra de la estación B26 (Fig. 5), donde los ASVs correspondientes a los géneros *Zeaxantibacteria* y *Xenococcus* son similares a los géneros más abundantes que fueron *Nitrosopumilus* y *Desulfococcus*, y en la estación B10 se destaca la abundancia de *Cenarchaeum* en los sedimentos analizados (Fig. 11). La muestra de la estación B98, en comparación con las muestras de las otras estaciones, mostró una composición de géneros diferente, encontrándose en mayor abundancia al género *Desulfobacula*, seguido de los géneros *Lutimonas* y *Desulfococcus* (Fig. 11 y Fig. 5).

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

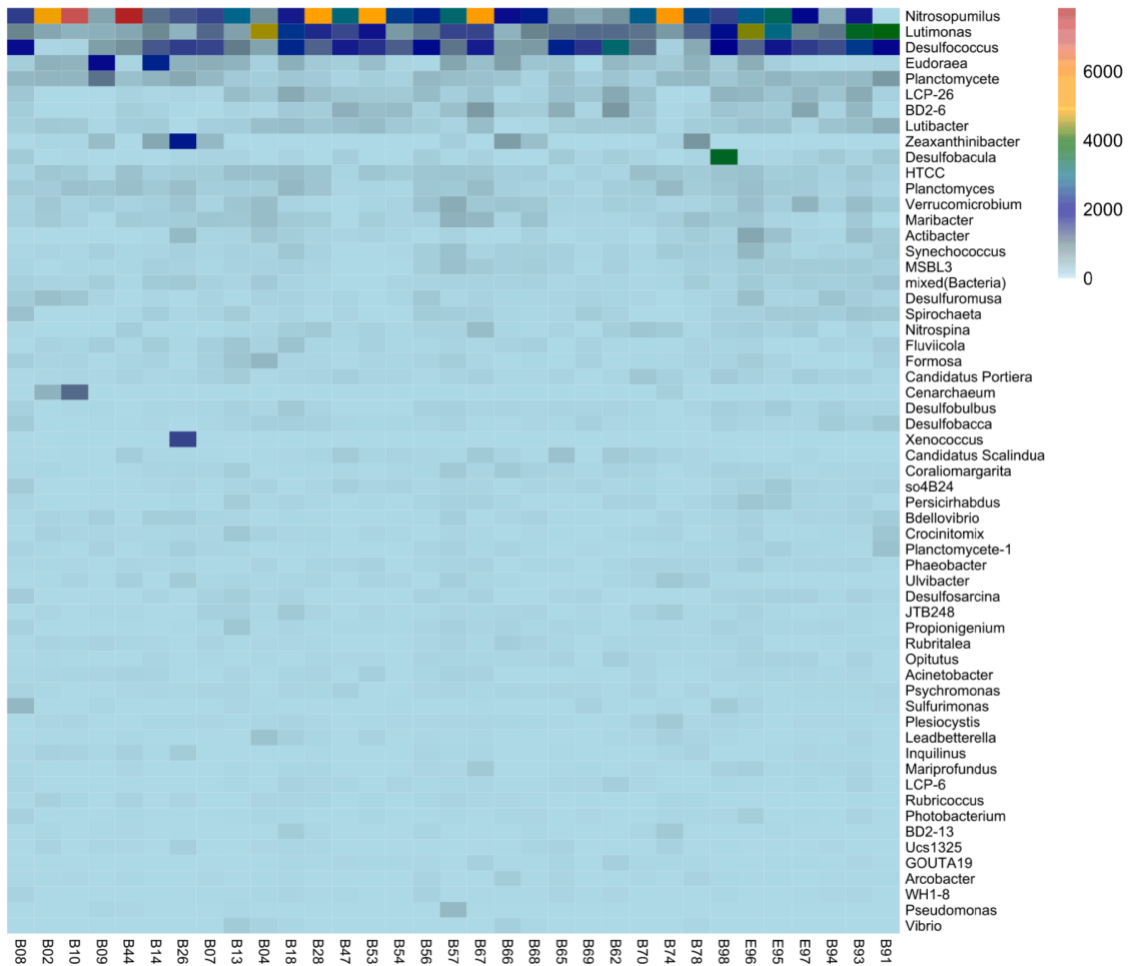


Figura 11. Mapa de calor con los 59 géneros más abundantes. En el eje vertical se encuentran los géneros encontrados y en el eje horizontal las estaciones ordenadas de norte (izquierda) a sur (derecha). Los colores representados en la leyenda de la figura indican la abundancia absoluta de ASVs presentes de cada género: Rojo indica mayor abundancia, azul indica poca abundancia.

De manera general los ocho filos mencionados como lo más abundantes componen aproximadamente el 87% total de los filos. Sumando la abundancia de los 18 filos restantes mencionados como los más abundantes (Fig. 9), suman el 99% del total de filos encontrados. Por lo que, el 1% restante de los filos encontrados, está representado por filos que tienen una abundancia relativa menor a 1% (Fig. 10).

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

El microbioma central se define como un conjunto de taxones microbianos, sus atributos genómicos y/o funcionales que son característicos del entorno de interés (Neu *et al.*, 2021), por lo que es importante conocer cuál es el microbioma central de los sedimentos marinos de la CBC. Como resultado del análisis se encontraron diez ASVs que componen el conjunto de taxones presentes en las 33 muestras de sedimentos analizados en la CBC (Tabla VII), de los cuales dos se describen hasta nivel de género, cinco a nivel de familia, dos hasta el nivel de orden y uno se quedó descrito solo a nivel de filo.

Tabla VII. Microbioma central encontrado para las 33 muestras.

Dominio	Filo	Clase	Orden	Familia	Género
Bacteria	Proteobacteria/ Pseudomonadota	ND	ND	ND	ND
Bacteria	Proteobacteria/ Pseudomonadota	Delta- proteobacteria	Myxococcales	ND	ND
Arquea	Crenarchaeota	Thaumarchaeota	Cenarchaeales	Cenarchaeaceae	<i>Nitrosopumilus</i>
Bacteria	Bacteroidetes/ Bacteroidota	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	ND
Bacteria	Proteobacteria/ Pseudomonadota	Gamma- proteobacteria	Marinicellales	Marinicellaceae	ND
Bacteria	Proteobacteria/ Pseudomonadota	Gamma- proteobacteria	Alteromonadales	OM60	ND
Bacteria	Planctomycetes/ Planctomycetota	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae	<i>Planctomycete</i>
Bacteria	Proteobacteria/ Pseudomonadota	Gamma- proteobacteria	Alteromonadales	OM60	ND
Bacteria	Proteobacteria/ Pseudomonadota	Gamma- proteobacteria	Alteromonadales	ND	ND
Bacteria	Proteobacteria/ Pseudomonadota	Gamma- proteobacteria	Alteromonadales	OM60	ND

Índices de alfa y beta diversidad

Las comunidades microbianas viven en ambientes fluctuantes, y su heterogeneidad influyen en la estructura y diversidad ecológica de las mismas comunidades. Las métricas más utilizadas para la

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

descripción y comparación de las diferentes comunidades están basadas en índices estadísticos de información, como los índices de Shannon y Simpson (diversidad alfa) y las distancias de Unifrac (diversidad beta) (Gibbons *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2023).

Los análisis de los índices estadísticos que se realizaron en este trabajo se basaron en la profundidad a la que se muestro en cada estación. Las profundidades se dividieron en: somera (≤ 30 m), intermedia (31-149 m) y profunda (≥ 120 m).

Alfa diversidad

La alfa diversidad es una medida métrica que resume cómo es la estructura de una comunidad ecológica con respecto a la riqueza (número de grupos taxonómicos) y/o uniformidad (distribución de abundancia de los grupos) de la muestra (Willis, 2019).

Índice de Shannon

El índice de Shannon (H') es un índice que indica que tan alta o baja es la diversidad presente en una muestra. Los valores del índice de Shannon varían dependiendo la diversidad presente en cada muestra. Un valor entre el rango de 2 a 3 se considera un valor normal, mientras que un valor por debajo de 2 indica poca diversidad y un valor mayor a 3 implica una alta diversidad.

Los valores de H' observados en las muestras analizadas se encuentran entre 5 y 6.75, indicando que todas las estaciones poseen una diversidad alta (Fig. 11). Las estaciones con un valor de H' más alto fueron B09, B91, B94 y B65 con valores cercanos a 6.75. Los impactos antropogénicos que influyen en estas estaciones son plantas de tratamiento (B09), transporte marítimo (B94) y zonas con poca actividad (B65 y B91). Por el contrario, las estaciones con los valores de H' más bajos fueron B47, B53 y B54 que no tienen cercanía a zonas impactadas, pero las tres se encuentran cercanas entre sí a la altura de Primo Tapia (sur de Rosarito) (Fig. 5).

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

El resto de las estaciones presentan valores de H' que van entre 5.75 a 6.62, aproximadamente. Las estaciones que son afectadas por el Arroyo "La Misión" (B66 y B67) se encuentran cercanas en cuanto el valor de H' . Las estaciones con influencia de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR; B07, B08 y B09) tienen valores similares que sobrepasan el 6.25, siendo B09 el que muestra un valor de H' mayor.

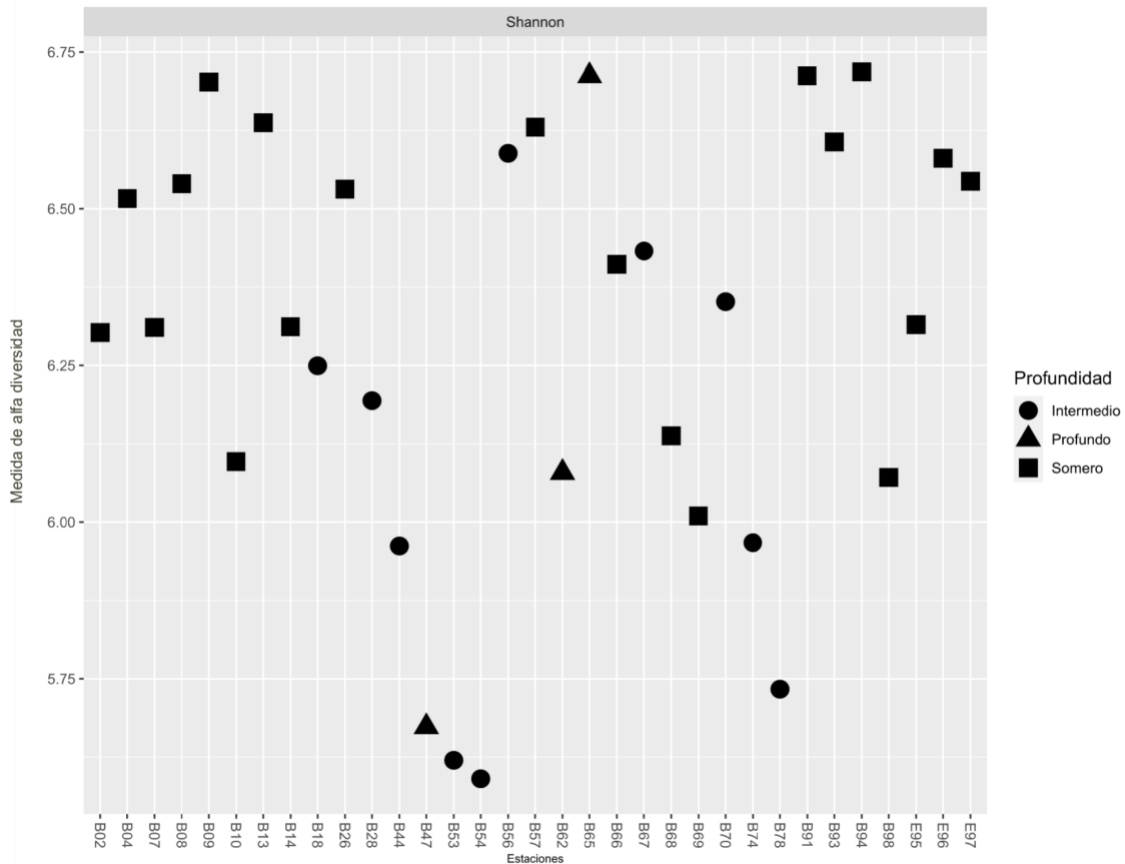


Figura 12. Índice de Shannon. Se obtuvieron los valores de cada muestra del índice de Shannon, y se clasificaron de acuerdo con la división de acuerdo con la profundidad en el punto de muestreo. Simbología de las profundidades: círculo – intermedia, triángulo – profunda y cuadrado – somera.

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

Índice de Simpson

El índice de Simpson (D) se considera principalmente como un índice de dominancia, debido a que indica que tan probable es que al tomar a dos individuos ambos pertenezcan a la misma especie. Los valores de este índice van de 0 a 1; donde un valor cercano a 0 implica que no existe dominancia de alguna especie, mientras que un valor cercano a 1 indica que si hay dominancia dentro de la muestra.

En la figura 9, se encuentra el valor D obtenido para las muestras de cada estación analizada. Todas las muestras presentan valores por encima de 0.990, indicando que en todas existe una dominancia de especies. Al ser *Nitrosopumilus*, *Lutimonas* y *Desulfococcus* los géneros más abundantes, es posible que la dominancia sea de alguna especie perteneciente a estos géneros. Los valores más cercanos a uno (≥ 0.997) se encuentran en las muestras de las estaciones B08, B09, B13 y B91, las cuales presentan una profundidad somera (Fig. 12).

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

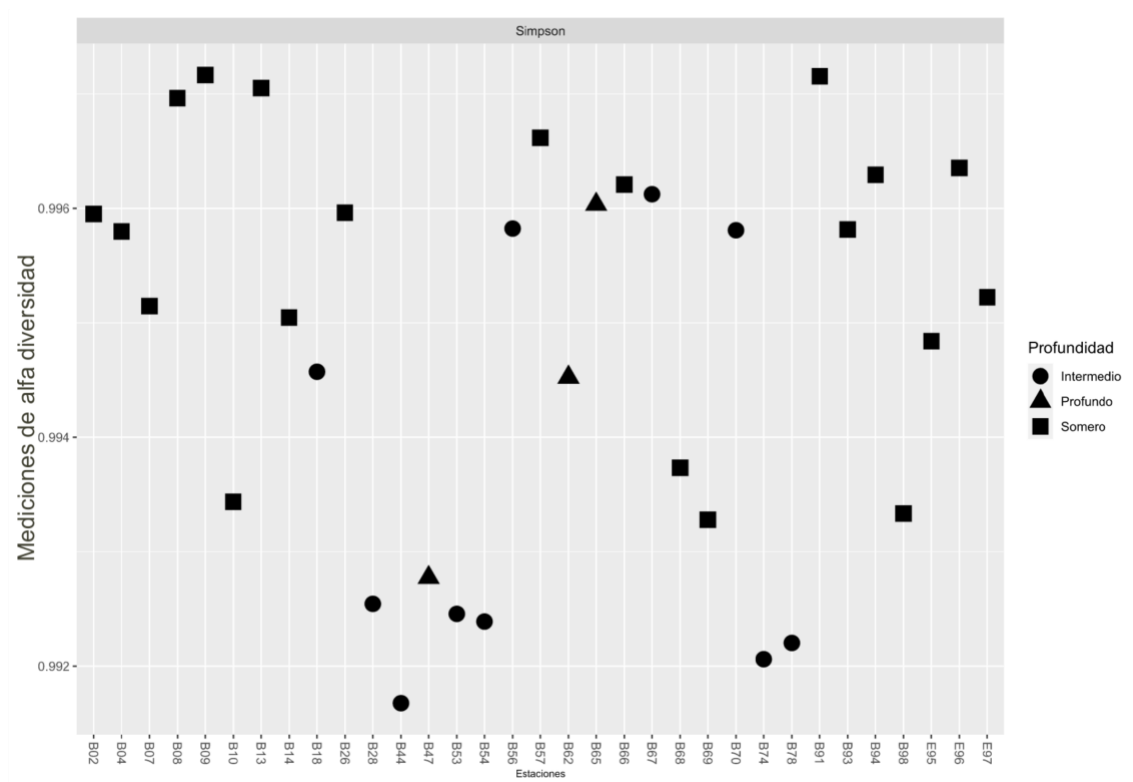


Figura 13. Índice de Simpson. Se obtuvieron los valores de cada muestra del índice de Shannon, y se clasificaron de acuerdo con la división de acuerdo con la profundidad en el punto de muestreo. Simbología de las profundidades: círculo – intermedia, triángulo – profunda y cuadrado – somera.

Índice inverso de Simpson

El índice inverso de Simpson ($1/D$) es un valor teórico que indica cuántas especies se requieren para que el valor del índice de Simpson (D) sea lo más cercano a cero posible.

Las muestras de las estaciones analizadas mostraron diversos valores para el índice inverso de Simpson, las cuales van desde 120 hasta 350 especies (Fig. 14). Las muestras con valores más altos (por arriba de 325) fueron de las estaciones B08, B09, B13 y B91 (Fig. 14). Esto coincide con los valores obtenidos en el índice de Simpson, donde los valores más cercanos a uno fueron encontrados en las mismas estaciones (Fig. 12).

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

También se pueden utilizar los valores obtenidos para este índice como un indicador del estrés causado a un ambiente. Lo anterior debido a que un ambiente bajo los efectos de un estresor como los contaminantes prioritarios y/o emergentes, pueden provocar la dominancia de especies capaces de adaptarse con mayor facilidad a los mismos.

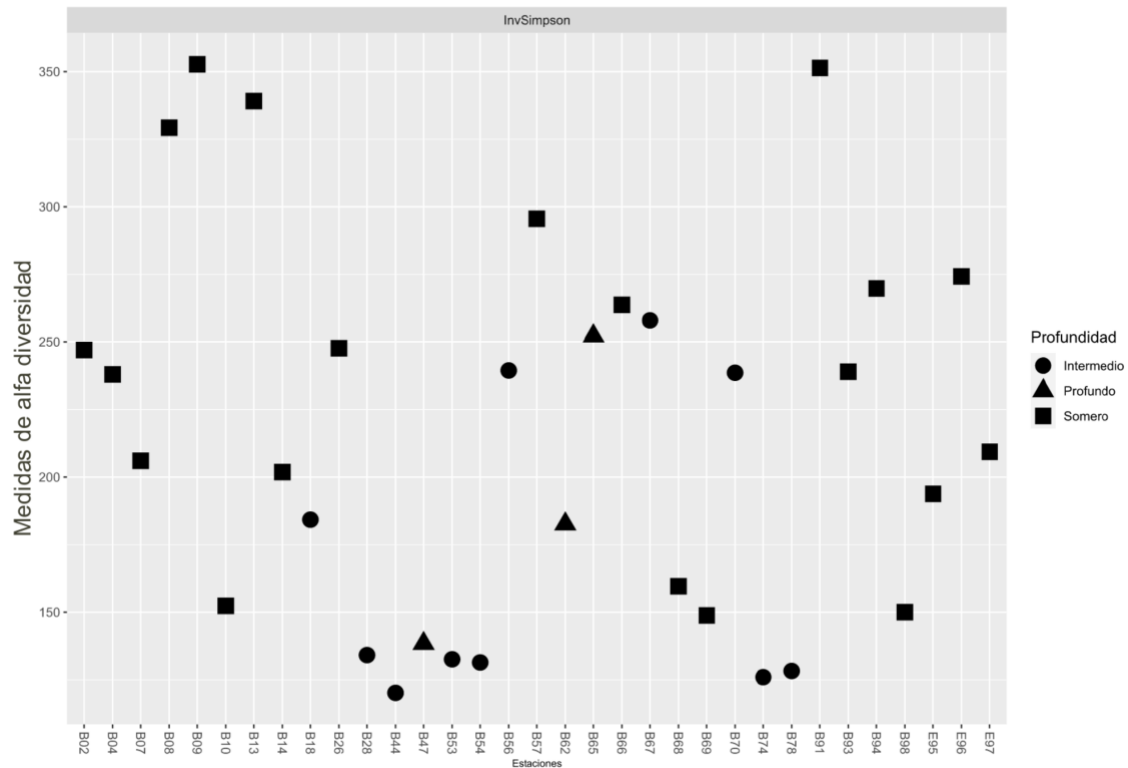


Figura 14. Índice del inverso de Simpson. Se obtuvieron los valores de cada muestra del índice de Shannon, y se clasificaron de acuerdo con la división de acuerdo con la profundidad en el punto de muestreo. Simbología de las profundidades: círculo – intermedia, triángulo – profunda y cuadrado – somera.

Beta diversidad

La diversidad beta es un análisis que cuantifica la similitud o la distancia entre microbiomas. La base del análisis es poder vincular el patrón de la diversidad taxonómica o funcional con las características ambientales, y auxilia en la predicción de las propiedades del ambiente (Su, 2021).

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

Uno de los métodos estadísticos más utilizados son las distancias de Unifrac. Las distancias Unifrac se dividen en no ponderadas (diferencias cualitativas) y ponderadas (diferencias cuantitativas), las cuales pueden ser visualizadas mediante un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA, por sus siglas en inglés), que ayuda a explorar y visualizar las similitudes y disimilitudes entre datos. Unifrac no ponderado (UU, por sus siglas en inglés) mide la distancia filogenética entre comunidades basándose en los linajes que comparten. Por otra parte, el método de distancias Unifrac ponderado (WU) es considerado un método cuantitativo, debido a que además de medir la distancia filogenética también considera los cambios en la abundancia relativa de cada taxón (ASV) presente (Lozupone y Knight, 2005; Su, 2021).

En la figura 15 – A, se muestra la distancia UU que existe entre las comunidades encontradas en los 33 sitios muestreados. El análisis cualitativo mostró que la distancia filogenética se distribuye de manera uniforme, por lo que la mayoría de las estaciones son filogenéticamente similares. Solo en el caso de las estaciones profundas (B53, B65 y B62) si se observa un agrupamiento, siendo las estaciones B62 y B65, más similares filogenéticamente (Fig. 5).

Para obtener el PCoA con la distancia Unifrac cuantitativa, se realizó un segundo PCoA utilizando unifrac ponderado (WU) (Fig. 15 – B). En esta figura se muestra la similitud entre los puntos analizados tomando en cuenta la distancia filogenética junto con la abundancia de los taxones, en el PCoA se observa una menor dispersión entre los puntos, indicando que la abundancia y distancia filogenética es muy similar en las tres profundidades tomadas en cuenta. De nuevo, se encuentra un agrupamiento en las tres estaciones profundas, siendo B62 y B65 las más relacionadas, tanto filogenéticamente como en las abundancias de los taxones presentes.

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

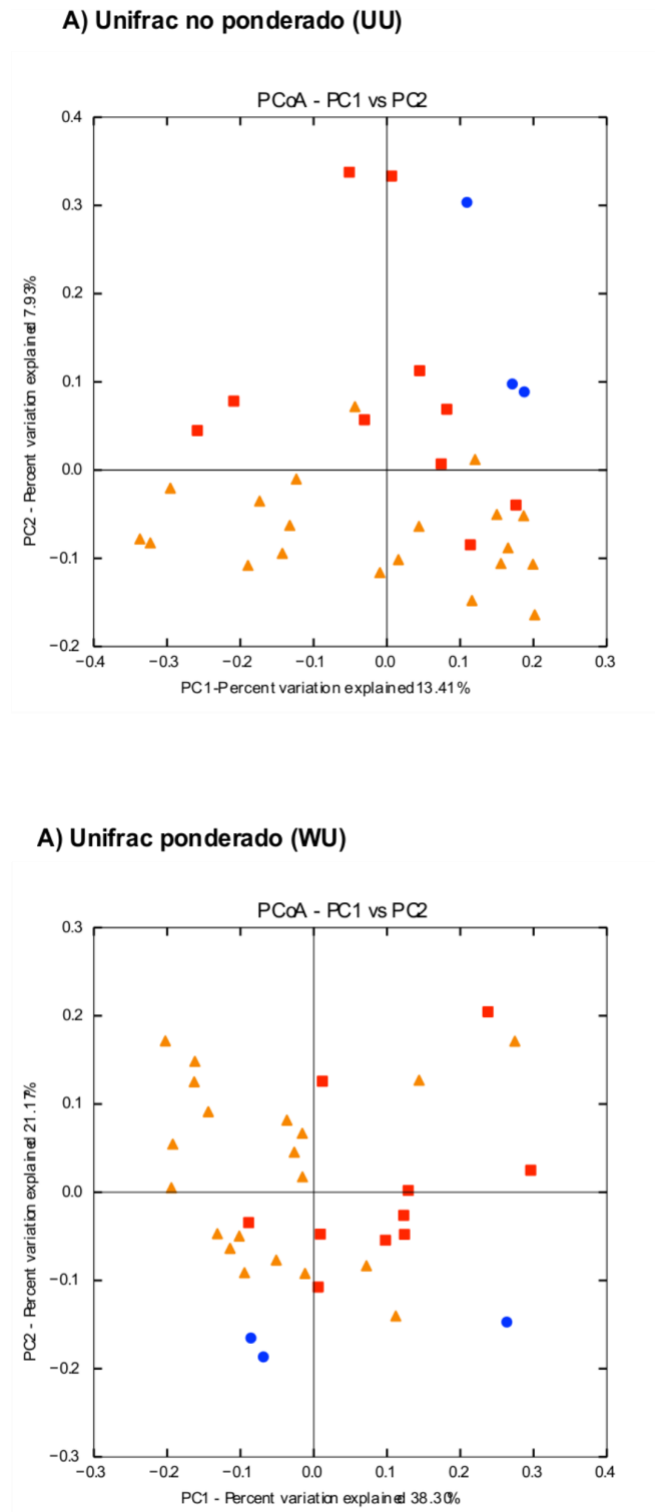


Figura 15. Análisis de coordenadas principales (PCoA) con UniFrac A) no ponderado y B) ponderado. Las estaciones se dividieron según la profundidad presente en cada estación: Profundo – círculo azul, intermedio – cuadrado rojo, y somero – triángulo anaranjado.

Inferencia de rutas metabólicas

La secuenciación del gen ribosomal 16S ARNr provee información del perfil taxonómico de las comunidades presentes en una muestra, pero no proporciona información directa sobre los perfiles funcionales de las cepas. Es por lo anterior que se han desarrollado métodos que ayudan en la predicción de las funciones de las comunidades microbianas a partir de su perfil taxonómico (utilizando las secuencias de amplicón). PICRUST2 es una herramienta algorítmica que predice genomas de muestras ambientales a través de secuencias del gen ribosomal 16S ARNr (Douglas *et al.*, 2020). En este trabajo se utilizó PICRUST2 para analizar los ASVs resultantes de la secuenciación masiva de las muestras para inferir la presencia de rutas implicadas en los procesos de gran interés: la degradación de hidrocarburos y aquellos relacionados con la resistencia a antibióticos.

Como resultado de la inferencia realizada con PICRUST2, se obtuvieron un total de 428 rutas, dentro de las cuales se encontraron rutas metabólicas implicadas en procesos básicos y se buscaron aquellas rutas más específicas relacionadas con los procesos de interés: Degradación de hidrocarburos y en la resistencia a antibióticos.

Se encontraron 47 (aproximadamente el 11%) rutas metabólicas implicadas en la degradación de hidrocarburos aromáticos, de las cuales 18 son rutas centrales y 29 rutas periféricas. De las rutas implicadas en la degradación de hidrocarburos alifáticos se encontraron tres rutas (0.70%), mientras que las relacionadas a la resistencia a antibióticos fueron dos (0.47%) (Fig. 16).

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

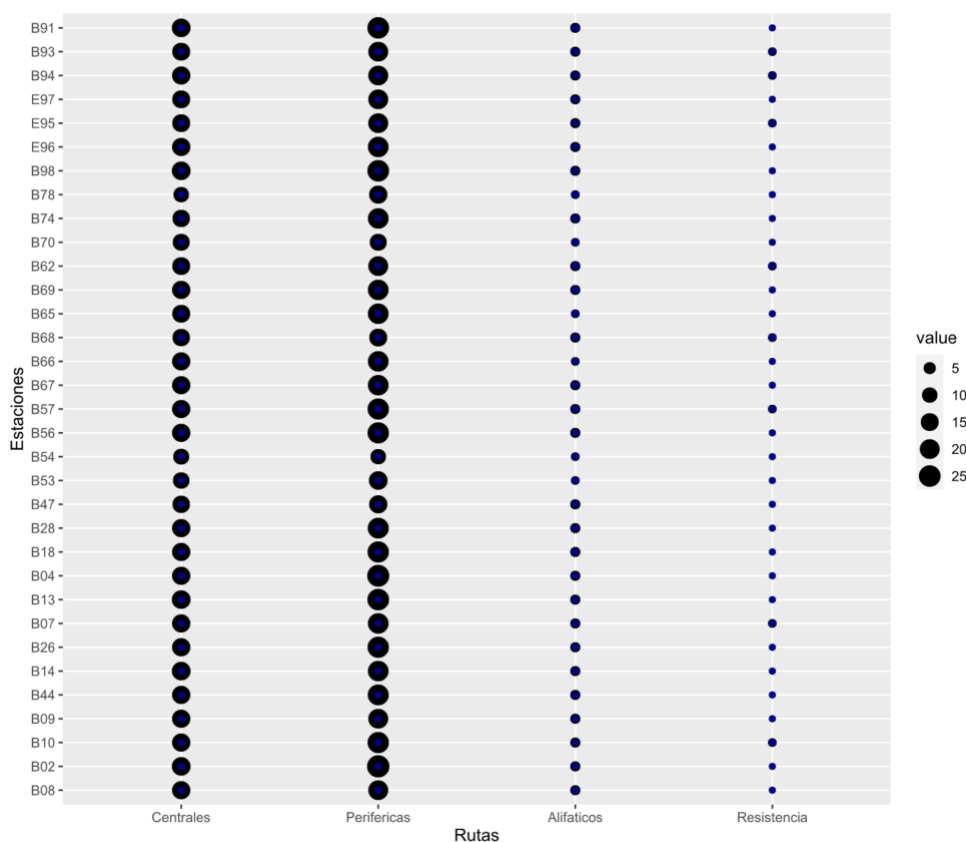


Figura 16. Rutas metabólicas inferidas relacionadas con la degradación de hidrocarburos y la resistencia a antibióticos. Rutas metabólicas encontradas en la inferencia realizada con PICRUST2. En el eje horizontal se encuentran las estaciones, en el eje vertical las rutas metabólicas y el tamaño de los círculos representa la cantidad de rutas presentes en cada estación.

En cuanto a la resistencia a antibióticos, se infirieron dos rutas: A) Biosíntesis de peptidoglicano IV (descrita en *Enterococcus faecium*) y B) resistencia a polimixina (Tabla VIII).

La ruta A se infirió en el 24% de las estaciones (ocho muestras) y la ruta B se infirió en el 100% de las muestras (33 estaciones). Las muestras donde ambas rutas fueron inferidas son de las estaciones: B07 con cercanía a Rosarito y al sur de la PTAR (Tijuana), B10 con cercanía a la ciudad de Tijuana, B57 al sur de Puerto Nuevo en Rosarito y mayor cercanía al Poblado Venustiano Carranza, B62 a la altura de El Mirador de Salsipuedes y con cercanía a los cultivos de atunes, B68 al sur del arroyo La Misión y al norte de un pequeño arroyo cercano a Bajamar, y las estaciones

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

B93, B94 y E95 las cuales se encuentran dentro de la Bahía de Ensenada, las primeras dos con cercanía a la boca de Estero de Punta Banda y la tercera con una gran cercanía a las PTAR “El Gallo” y “El Naranja” (Fig. 5, Fig. 16 y Tabla VIII).

Tabla VIII. Rutas metabólicas inferidas por PICRUST2 implicadas con la resistencia a antibióticos en las muestras provenientes de las 33 estaciones localizadas a lo largo de la CBC. Las columnas representadas son: Estación, Rutas (rutas metabólicas encontradas), Total de rutas encontradas por estación y Referencia de ubicación de las estaciones (a que altura de la CBC se encuentra la estación).

Estación	Rutas	Total de rutas	Referencia de ubicación
B08	B	1	Playas de Tijuana
B02	B	1	Mirador Marlikas La Joya
B10	A, B	2	Sur de Mirador Marlikas La Joya
B09	B	1	Real del Mar Golf Resort
B44	B	1	Este de la Isla Coronado Norte
B14	B	1	Playa Los buenos, Tijuana
B26	B	1	Este de la Isla Coronado Sur
B07	A, B	2	
B13	B	1	Playa La bardita, Rosarito
B04	B	1	Muelle de Rosarito
B18	B	1	Fox Studio, Rosarito
B28	B	1	El Descanso, Rosarito
B47	B	1	Los Arenales, Primo Tapia
B53	B	1	Los Arenales, Primo Tapia
B54	B	1	Misión Viejo Sur, Rosarito
B56	B	1	Cuenca Lechera
B57	A, B	2	Norte de Punta Mezquite (Venus. Carranza)
B67	B	1	Playa Escondida, La Misión (Ens)
B66	B	1	Ejido Ensenada

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

B68	A, B	2	Arroyo al Norte de Bajamar
B65	B	1	Mirador Salsipuedes
B69	B	1	Bahía Salsipuedes
B62	A, B	2	Salsipuedes (derrumbe Carretera)
B70	B	1	Salsipuedes (derrumbe) – Cuatro cuatros
B74	B	1	Sur Playa Saldamando
B78	B	1	Playa Tres Emes
B98	B	1	Malecón Playa Hermosa
E96	B	1	Playa Pacífica (Costco)
E95	A, B	2	Playa Pacífica
E97	B	1	Guarnición Militar
B94	A, B	2	Boca del Estero de Punta Banda
B93	A, B	2	Casi Boca del Estero de Punta Banda
B91	B	1	Mitad de Barra Estero de Punta Banda

De las rutas del catabolismo de hidrocarburos alifáticos, se infirieron tres: A) la ruta de oxidación de octano, B) metanol y C) degradación de acetileno (por la vía anaeróbica) (Fig. 17, tabla IX).

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

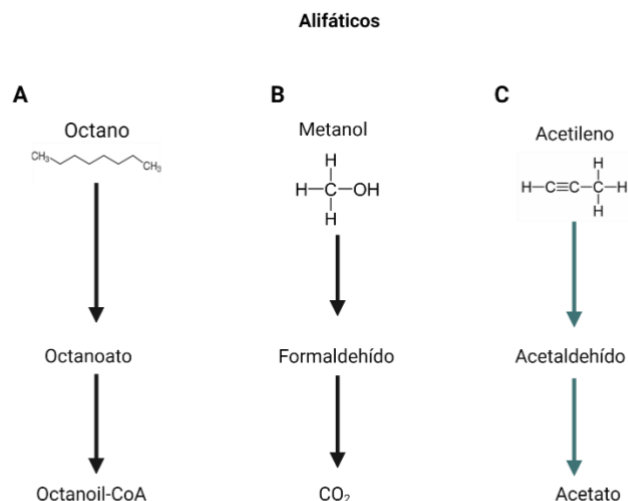


Figura 17. Rutas inferidas de degradación de hidrocarburos alifáticos. La figura se realizó en Biorender.com.

Las rutas A y C se infirieron en el 100% de las muestras, mientras que la ruta B sólo se infirió en el 81.8%. La ausencia de la ruta B se da en muestras de estaciones con menor cercanía a lugares con alto impacto antropogénico: B53, B54 al sur de Puerto Nuevo en Rosarito, B65, B62, B70 y B78 entre el sur de Arroyo La Misión y al norte del Puerto El Sauzal (Fig. 5, tabla IX).

Tabla IX. Rutas metabólicas inferidas por PICRUST2 implicadas en la degradación de hidrocarburos alifáticos en las muestras provenientes de las 33 estaciones localizadas a lo largo de la CBC. Las columnas representadas son: Estación, Rutas (rutas metabólicas encontradas), Total de rutas encontradas por estación y Referencia de ubicación de las estaciones (a que altura de la CBC se encuentra la estación).

Estación	Rutas	Total de rutas	Referencia de ubicación
B08	A, B, C	3	Playas de Tijuana
B02	A, B, C	3	Mirador Marlikas La Joya
B10	A, B, C	3	Sur de Mirador Marlikas La Joya

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

B09	A, B, C	3	Real del Mar Golf Resort
B44	A, B, C	3	Este de la Isla Coronado Norte
B14	A, B, C	3	Playa Los buenos, Tijuana
B26	A, B, C	3	Este de la Isla Coronado Sur
B07	A, B, C	3	
B13	A, B, C	3	Playa La bardita, Rosarito
B04	A, B, C	3	Muelle de Rosarito
B18	A, B, C	3	Fox Studio, Rosarito
B28	A, B, C	3	El Descanso, Rosarito
B47	A, B, C	3	Los Arenales, Primo Tapia
B53	A, C	2	Los Arenales, Primo Tapia
B54	A, C	2	Misión Viejo Sur, Rosarito
B56	A, B, C	3	Cuenca Lechera
B57	A, B, C	3	Norte de Punta Mezquite (Venus. Carranza)
B67	A, B, C	3	Playa Escondida, La Misión (Ens)
B66	A, C	2	Ejido Ensenada
B68	A, B, C	3	Arroyo al Norte de Bajamar
B65	A, C	2	Mirador Salsipuedes
B69	A, B, C	3	Bahía Salsipuedes
B62	A, B, C	3	Salsipuedes (derrumbe Carretera)
B70	A, C	2	Salsipuedes (derrumbe) – Cuatro cuatros
B74	A, B, C	3	Sur Playa Saldamando
B78	A, C	2	Playa Tres Emes
B98	A, B, C	3	Malecón Playa Hermosa
E96	A, B, C	3	Playa Pacífica (Costco)
E95	A, B, C	3	Playa Pacífica
E97	A, B, C	3	Guarnición Militar
B94	A, B, C	3	Boca del Estero de Punta Banda
B93	A, B, C	3	Casi Boca del Estero de Punta Banda
B91	A, B, C	3	Mitad de Barra Estero de Punta Banda

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

La biodegradación de compuestos aromáticos se lleva a cabo a través de rutas periféricas y centrales. Las rutas periféricas se encargan de convertir los compuestos aromáticos en intermediarios específicos (hidroxilados) que son metabolizados en las vías centrales para producir productos intermediarios que son utilizados como sustratos en las vías básicas (ciclo de Krebs, beta-oxidación) (Guevara et al., 2019).

En la figura 18 se representan algunas de las rutas metabólicas (aeróbicas y anaeróbicas) implicadas en la degradación de compuestos monoaromáticos como poliaromáticos que fueron inferidas en las muestras de las estaciones analizadas.

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

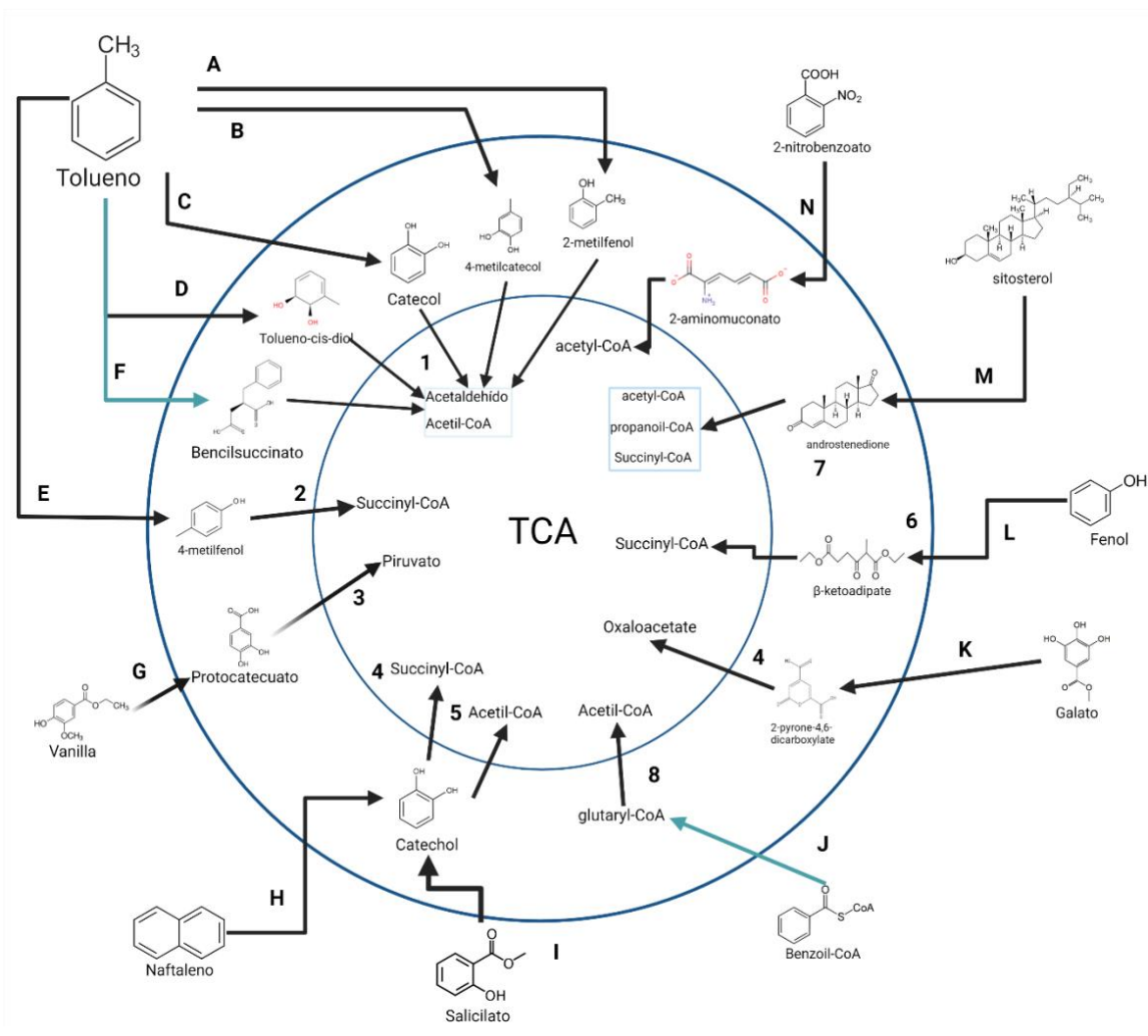


Figura 18. Rutas inferidas de degradación de hidrocarburos aromáticos en sedimentos marinos de CBC. Las vías periféricas (círculo externo) son la hidroxilación del tolueno A) A través de 2-metilfenol, B) A través de 4metilcatecol, C) A través de catecol, D) A través de tolueno-cis-diol y E) A través de 4-metilfenol, F) Degradación anaeróbica de tolueno, G) Degradación de vainilla, H) Degradación de naftaleno, I) Degradación de salicilato, J) Degradación de benzoil-CoA (vía anaeróbica), K) Degradación de galato, L) Degradación de fenol, M) Degradación de sitosterol, N) Degradación de 2-nitrobenzoato. Las vías centrales son 1) Vía acetaldehído, 2) Vía 3-oxoadipil-CoA, 3) Degradación de protocatecuato, 4) Vía de escisión orto, 5) Vía de escisión meta, 6) Vía β-cetoadipato, 7) Vía androstenediona, 8) Vía glutaril-CoA. La figura se realizó en Biorender.com.

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

En la tabla X se muestran las rutas catabólicas de hidrocarburos aromáticos inferidas en las muestras y los datos de la estación de donde se colectó cada muestra. Las rutas designadas para cada letra corresponden a las mismas letras que la figura 18.

Tabla X. Rutas metabólicas inferidas por PICRUST2 implicadas en la degradación de hidrocarburos aromáticos en las muestras provenientes de las 33 estaciones localizadas a lo largo de la CBC. Las columnas representadas son: Estación, Rutas (rutas metabólicas inferidas), Total de rutas encontradas por estación y Referencia de ubicación de las estaciones (a que altura de la CBC se encuentra la estación).

Estación	Rutas		Total de rutas	Referencia de ubicación
	Periféricas	Centrales		
B08	A, B, C, E, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	12	Playas de Tijuana
B02	A, B, C, D, E, G, I, J, L, K, N	4, 5, 8,	14	Mirador Marlikas La Joya
B10	A, B, C, E, G, I, J, K, L, M, N	4, 5, 8,	14	Sur de Mirador Marlikas La Joya
B09	A, B, C, E, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	12	Real del Mar Golf Resort
B44	A, B, C, E, G, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	13	Este de la Isla Coronado Norte
B14	A, B, C, E, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	12	Playa Los buenos, Tijuana
B26	A, B, C, E, G, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	13	Este de la Isla Coronado Sur
B07	A, B, C, E, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	12	
B13	A, B, C, E, G, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	13	Playa La bardita, Rosarito
B04	A, B, C, E, F, G, I, J, K, L, M, N	4, 5, 8,	15	Muelle de Rosarito

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

B18	A, B, C, E, G, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	13	Fox Studio, Rosarito
B28	A, B, C, E, G, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	13	El Descanso, Rosarito
B47	A, B, C, E, I, J, L, N	4, 5, 8,	11	Los Arenales, Primo Tapia
B53	B, C, G, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	11	Los Arenales, Primo Tapia
B54	B, C, I, L, N,	4, 5, 8,	8	Misión Viejo Sur, Rosarito
B56	A, B, C, E, G, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	13	Cuenca Lechera
B57	A, B, C, E, G, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	13	Norte de Punta Mezquite (Venus. Carranza)
B67	A, B, C, E, G, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	13	Playa Escondida, La Misión (Ens)
B66	A, B, C, E, G, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	13	Ejido Ensenada
B68	B, C, I, J, L, N	4, 5, 8,	9	Arroyo al Norte de Bajamar
B65	A, B, C, E, G, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	13	Mirador Salsipuedes
B69	A, B, C, E, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	12	Bahía Salsipuedes
B62	A, B, C, E, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	12	Salsipuedes (derrumbe Carretera)
B70	A, B, C, E, I, J, L, N	4, 5, 8,	11	Salsipuedes (derrumbe) – Cuatro cuatros
B74	A, B, C, D, E, G, H, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	15	Sur Playa Saldamando
B78	B, G, J, K, N	5, 8,	7	Playa Tres Emes
B98	A, B, C, E, G, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	13	Malecón Playa Hermosa
E96	A, B, C, E, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	12	Playa Pacífica (Costco)

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

E95	A, B, C, E, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	12	Playa Pacífica
E97	A, B, C, E, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	12	Guarnición Militar
B94	A, B, C, E, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	12	Boca del Estero de Punta Banda
B93	A, B, C, E, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	12	Casi Boca del Estero de Punta Banda
B91	A, B, C, E, G, I, J, K, L, N	4, 5, 8,	13	Mitad de Barra Estero de Punta Banda

Al hablar de vías metabólicas, se hace referencia a la secuencia de reacciones que son catalizadas por enzimas que dirigen la conversión de una sustancia a un producto final (Blanco y Blanco, 2022). Por lo que es importante conocer cuáles son las enzimas que intervienen en las rutas metabólicas inferidas de los procesos de interés y conocer a qué grupos taxonómicos están relacionadas.

En la figura 19 se muestran los grupos asociados a las enzimas que se infirieron de la resistencia a antibióticos. Se infirió una sola enzima implicada en la biosíntesis de peptidoglicano que es una proteína de unión a la penicilina (K18149) y se asoció a 3 grupos taxonómicos: la familia Peptostreptococcaceae, al orden sin asignación taxonómica WCHB1_41 y al género sin asignación taxonómica WH1-8 (Bacillota). En cuanto a la resistencia a la polimixina se encontraron siete enzimas. La enzima con mayor abundancia es la 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa transferasa (K07264) y se asoció a las familias Saprospiraceae y Syntrophobacteraceae, al orden denominado YLA114 y al género *Lutibacter*, la segunda enzima más abundante fue undecaprenil-fosfato 4-desoxi-a-formamido-L-arabinosa transferasa (K10012) la cual está asociada a 8 grupos taxonómicos que son la clase Lentisphaeria, los órdenes Lentisphaerales, YLA114, Actinomycetales y Thiohalorhabdadales, y las familias Artich95B-10, Victivallaceae y Pirellulaceae. La enzima undecaprenil fosfato-alfa-L-ara4FN deformilasa (K13014) está asociada a 7 grupos taxonómicos en los que se encuentran la clase Lentisphaeria, los órdenes Lentisphaerales, YLA114 y

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

Thiohalorhabdales, y las familias Victivallaceae y Pirellulaceae. La enzima UDP-4-amino-4-desoxi-L-arabinosa formiltransferasa (K10011) está asociada a 7 grupos taxonómicos: la clase Lentisphaeria, los órdenes Lentisphaerales, YLA114 y Thiohalorhabdales, y las familias Articulaceae, Victivallaceae y Pirellulaceae. La enzima undecaprenilo fosfato-alfa-L-ara4N flipasa subunidad ArnF (K12963) solo se asoció a 3 grupos taxonómicos: a los órdenes YLA114, y Thiohalorhabdales, y al género *Roseobacter* (clase Proteobacteria). La subunidad ArnE de la enzima undecaprenilo fosfato-alfa-L-ara4N flipasa (K12962) solo se asoció a los órdenes YLA114 y Thiohalorhabdales. La última enzima, y la de menor abundancia, fue una proteína de exportación de polisacárido capsular (K07265) que solo se asoció a dos géneros bacterianos: *Phaeobacter* y *Roseicyclus* (especie *Mahoneyensis*), ambos pertenecientes a la clase Alphaproteobacteria.

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

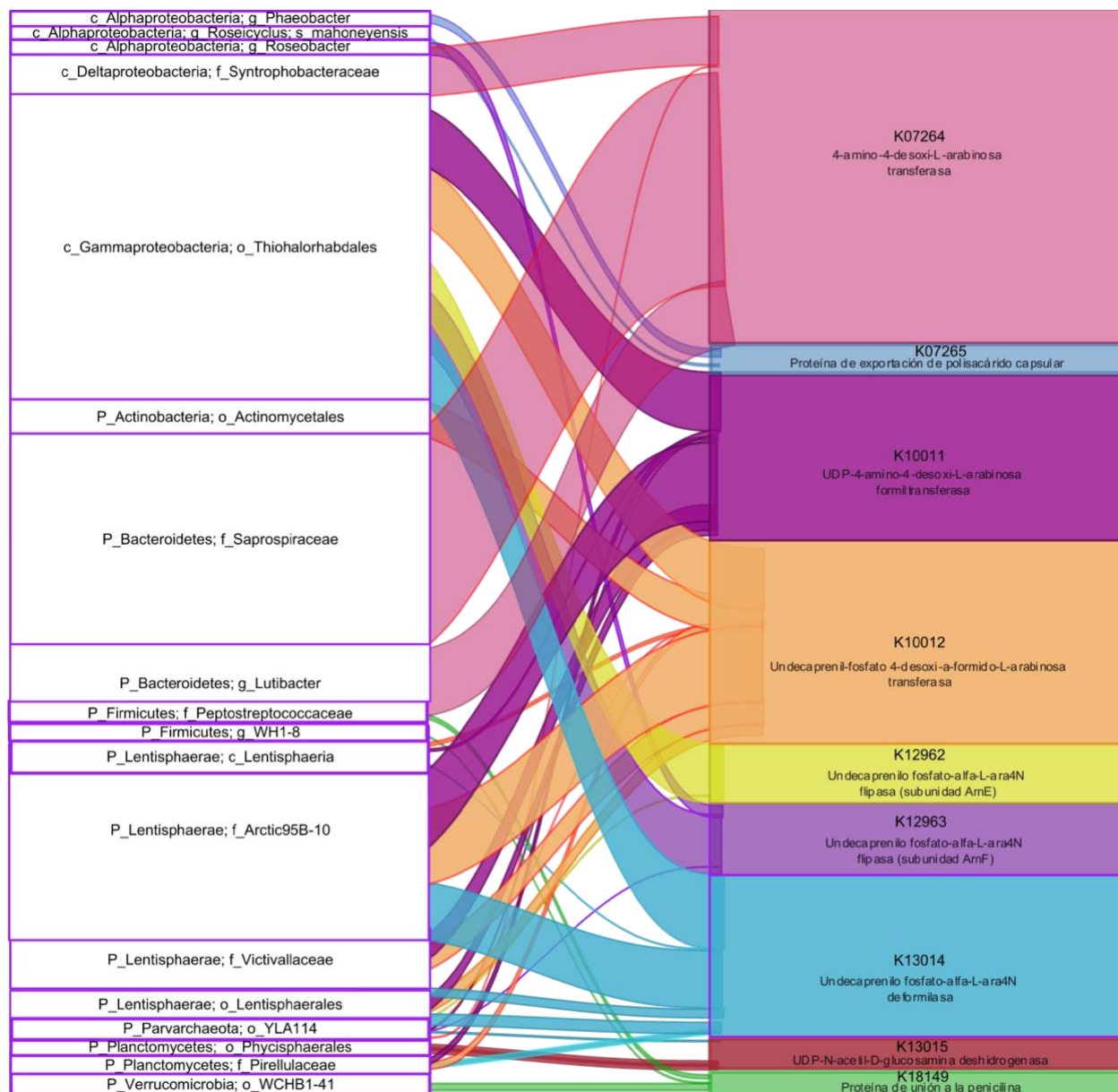


Figura 19. Grupos taxonómicos relacionados a la producción de enzimas implicadas en la resistencia a antibióticos. En la columna de la izquierda se encuentran los grupos taxonómicos, en la columna de la derecha se presentan las enzimas inferidas y el grosor de los conectores indica la cantidad de lecturas encontradas.

En el caso de las enzimas inferidas de la degradación de hidrocarburos y sus grupos taxonómicos asociados (Fig. 20), se infirió que la protocatecuato 3,4 – dioxigenasa (EC.1.13.11.3) es la principal enzima inferida y se asocia a 15 grupos taxonómicos, siendo la familia Pirellulaceae

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

(Planctomycetes/Planctomycetota) y el orden denominado PAC001146 (Proteobacteria/Pseudomonadota) los que se encuentran mayoritariamente relacionados con esta enzima catabólica. La segunda enzima inferida con mayor abundancia es la ferredoxina---NAD⁺ reductasa (EC:1.18.1.3), asociada a 11 grupos taxonómicos, donde el mayor número de lecturas lo presenta el orden PAC002249 (Proteobacteria/Pseudomonadota), seguido de dos grupos pertenecientes a la clase alfa proteobacteria, el género *Aquamicrobium* y a la familia Rhodovibrionaceae. La enzima catecol 2,3 – dioxigenasa (EC:1.13.11.2) está asociada a 7 organismos pertenecientes al orden PAC002249, al género *Aquamicrobium* y a la familia Rhodobacteraceae (clase alfa proteobacteria). Las enzimas 4-hidroxibenzoato 3-monooxigenasa (EC:1.14.13.2) y salicilato hidroxilasa (EC:1.14.13.1) están asociadas al género *Aquamicrobium*, a la familia Rhodobacteraceae, mientras que la enzima 3 – (3-hidroxifenil) propanoato hidroxilasa (EC:1.14.13.127) fue asociada a organismos pertenecientes a la familia Haliaceae. Finalmente, la enzima con menor número de lecturas fue catecol 1,2 – dioxigenasa (EC:1.13.11.1) solamente con dos organismos asociados a su presencia que fueron el género *Aquamicrobium* y organismos que pertenecen a la familia Rhodobacteraceae.

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

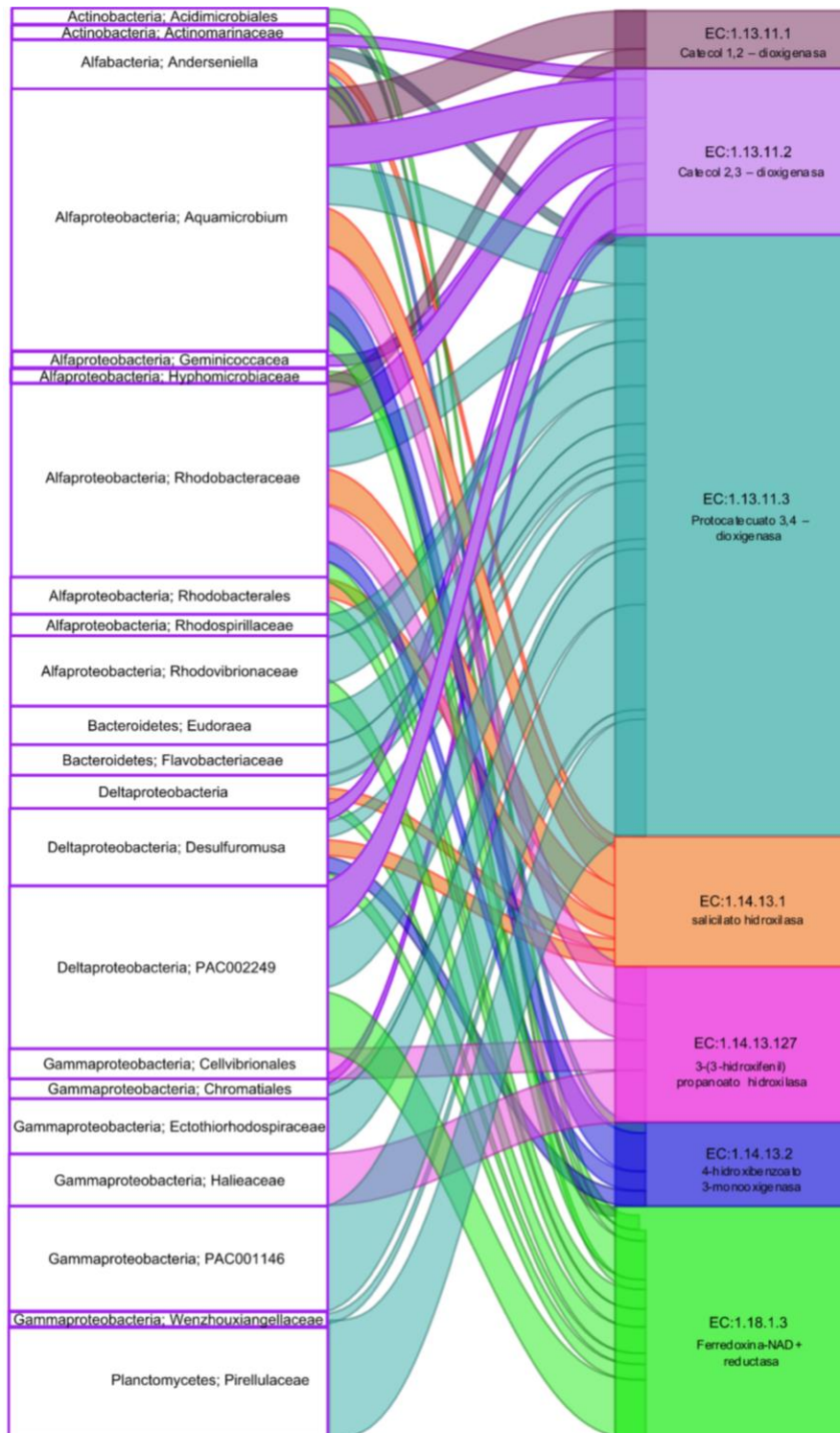


Figura 20. Grupos taxonómicos relacionados a la producción de enzimas implicadas en la degradación de hidrocarburos. En la columna de la izquierda se encuentran los grupos taxonómicos, en la columna de la derecha se presentan las enzimas inferidas y el grosor de los conectores indica la cantidad de lecturas encontradas.

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

También se realizó un análisis comparativo de las capacidades metabólicas hacia hidrocarburos de las comunidades procariotas presentes en las muestras de las 33 estaciones, se utilizó el servidor web METAGENassist, que proporciona herramientas estadísticas para la genómica comparativa. Además, este servidor es capaz de realizar un enriquecimiento fenotípico automatizado (Arndt *et al.*, 2012).

Para ello, la comparación se basó en las características que dividen las estaciones de muestreo:

- a. Profundidad: Somero ($\leq 30\text{m}$), intermedio y profundo ($\geq 120\text{m}$).
- b. Zona: Norte, centro y sur
- c. Impactos antropogénicos directos: Arroyo, transporte marítimo, sin impacto aparente, plantas de tratamiento de aguas residuales y plantas de tratamiento de aguas residuales combinado con el transporte marítimo.

Los resultados obtenidos a través del servidor web se filtraron para obtener los metabolismos que tienen una abundancia mayor a 1% y se muestran en la 21. Las comparaciones se realizaron entre las divisiones mencionadas (A, B, C).

En la primera comparación basada en la profundidad del muestreo (Fig. 21-A), se encontraron procesos metabólicos relacionados con el ciclo del nitrógeno, tales como la fijación del nitrógeno (menos abundante en las estaciones profundas), reducción de nitrito (con mayor abundancia en estaciones profundas) y el proceso más abundante fue la oxidación de amoníaco (Fig. 21-A). Otros procesos metabólicos importantes que fueron encontrados son los involucrados en el ciclo del azufre como la reducción de sulfato, el cual fue el proceso conocido más abundante, así como la oxidación del sulfuro y el azufre (Fig. 21-A). De los procesos metabólicos implicados en la degradación de hidrocarburos (alcanos y aromáticos), la degradación de alcanos tuvo abundancias predichas de 1.9% en las muestras de las estaciones someras, 2.2% en las intermedias y 3.9% en las profundas (Fig. 21-A). En cuanto a la degradación de hidrocarburos aromáticos, ésta fue más abundante que la de alcanos, siendo las muestras de las estaciones costeras en las que se predice

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

mayor abundancia (10.9%), seguido de las muestras de estaciones con una profundidad intermedia (10.4%) y, por último, las muestras de las estaciones profundas (6.6%) (Fig. 21-A).

De la división de las estaciones por zonas (norte, centro y sur) (Fig. 21-B) los procesos implicados en el ciclo del nitrógeno y del azufre fueron los más abundantes, coincidiendo con los resultados obtenidos al realizar el análisis por profundidad (Fig. 21-A). En las muestras de las estaciones de la zona denominada centro, particularmente en las cercanías del Puerto Nuevo se encontró un proceso implicado en el metabolismo de la atrazina (0.1%), un herbicida artificial utilizado en la agricultura. En cuanto a la degradación de alcanos el mayor porcentaje de abundancia fue localizado en la zona centro (2.7%), seguido de la zona del sur (2.3%) y, en menor abundancia, en la zona norte (1.7%). Por su parte, la degradación de hidrocarburos aromáticos fue más abundante en la zona norte (12.2%), seguido de las zonas centro y sur (con 10.2 y 8.6%, respectivamente).

En la división de acuerdo con su cercanía a actividades de alto impacto antropogénico: Plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), Transporte Marítimo (TM), Planta de tratamiento de aguas residuales y transporte marítimo (PTAR/TM), Arroyo y no hay actividades cercanas (Nada) (Fig. 21-C). Los procesos metabólicos asignados más abundantes fueron la reducción de sulfato y la oxidación de amoníaco. Aunque la distribución de ambos procesos es similar en las divisiones, la oxidación de amoníaco es casi 5% más abundante en las estaciones cercanas donde se encuentra un mayor movimiento marítimo. Otros procesos que de igual manera son más abundantes en zonas con gran movimiento marítimo son la oxidación de sulfuro y la deshalogenación. La degradación de hidrocarburos aromáticos se encuentra presente en los puntos con cercanía a las distintas actividades, pero donde se encuentra en mayor abundancia es en los puntos donde se considera hay un mayor movimiento marítimo (TM), en cuanto a la degradación de alcanos es un proceso que también se encuentra en todos los puntos analizados.

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

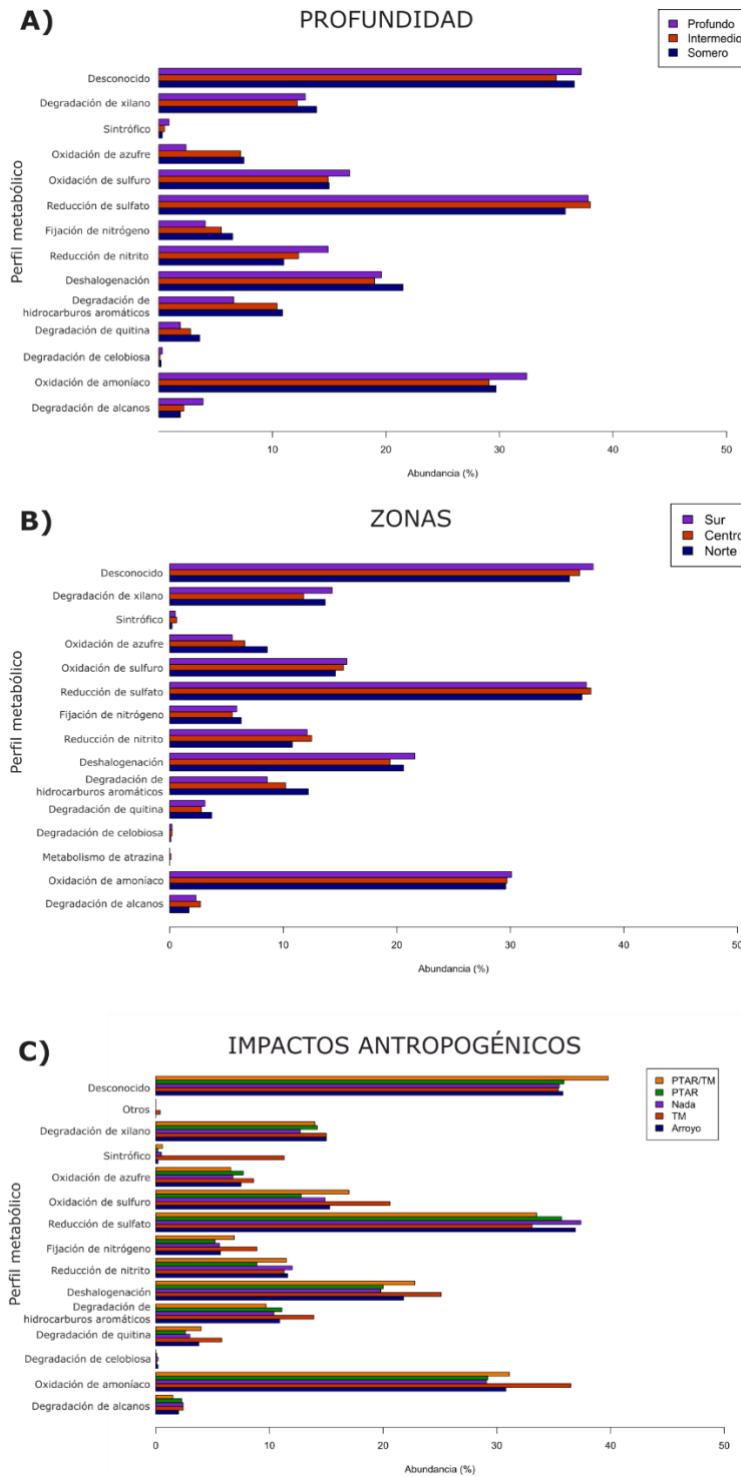


Figura 21. Predicción de procesos metabólicos por A) profundidad, B) zonación y C) impactos antropogénicos. La profundidad se dividió en profundo (morado), intermedio (rojo) y somero (azul); la zonación en sur (morado), centro (rojo) y norte (azul); y los impactos antropogénicos en: Plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) y transporte marítimo (TM) – anaranjado, PTAR – verde, nada – morado, TM – rojo, arroyo – azul.

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

Genes funcionales de degradación de hidrocarburos y de resistencia a antibióticos

Los genes marcadores funcionales son una herramienta molecular que ayudan a inferir la capacidad metabólica de las comunidades microbianas de manera directa. Es por ello, que se utilizaron genes que tienen una función en los procesos de degradación de hidrocarburos (alifáticos y aromáticos policíclicos), como en la resistencia a distintos antibióticos, lo que nos ayudó para analizar su presencia o ausencia en las 33 muestras analizadas.

Genes marcadores funcionales implicados en la degradación de hidrocarburos

Utilizando la técnica de PCR de punto final, se analizó la presencia de dos genes marcadores implicados en la degradación de hidrocarburos alifáticos (*alkB*) y aromáticos policíclicos (*pahE*).

El gen *pahE*, se encontró en 21 de los 33 sitios muestreados y analizados, siendo detectado principalmente en muestras provenientes de las zonas cercanas a las costas de los municipios de Tijuana y Rosarito (B08, B02, B09, B14, B07 Y B13). En las muestras de las tres estaciones con mayor cercanía al arroyo “La Misión” (B67, B66 y B68), así como en las muestras de las estaciones cercanas a la zona conocida como Salsipuedes, donde se pueden encontrar cultivos de maricultura, la amplificación del gen *pahE* fue positiva. En la zona sur de muestreo correspondiente a las muestras de las estaciones cercanas al Puerto del Sauzal de Rodríguez y en las cercanías del Puerto de Ensenada, la detección de *pahE* también fue positiva (Tabla XI y Fig. 22).

En el caso del gen *alkB* se detectó en 14 sitios. En la zona norte, el gen *alkB* amplificó en dos muestras de las estaciones cercanas a la costa de Tijuana (B08 y B09) y en dos muestras de las estaciones cercanas al archipiélago Coronado. En cinco muestras de las estaciones del Puerto de Rosarito y Puerto Nuevo, en dos muestras de las estaciones en Salsipuedes (B69 y B74) y solamente en una muestra tomada en la estación cercana al Puerto de Ensenada (E97), la amplificación del gen *alkB* fue positiva (Tabla XI y Fig. 22).

De manera general, la incidencia de ambos genes fue en las muestras de las estaciones B08, B09, B13, B26, B28, B54, B66, B69 y B74. Estas estaciones están cercanas a zonas con un grado alto de

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

actividades antropogénicas como la ciudad de Tijuana y Rosarito, la zona de Puerto Nuevo y la zona de Salsipuedes, donde existen actividades de maricultura.

En la tabla XI, se enlistan las 33 estaciones y presencia o ausencia de los genes con función en la degradación de hidrocarburos.

Tabla XI. Presencia de genes marcadores con función en la degradación de hidrocarburos. La presencia/ausencia de los genes marcadores se representó con dos colores: azul oscuro – presencia, azul claro – ausencia.

Sitio	Genes			Sitio	Genes	
	<i>pahE</i>	<i>alkB</i>			<i>pahE</i>	<i>alkB</i>
B08	Dark Blue	Dark Blue		B67	Dark Blue	Light Blue
B02	Dark Blue	Light Blue		B66	Dark Blue	Dark Blue
B10	Light Blue	Light Blue		B68	Dark Blue	Light Blue
B09	Dark Blue	Dark Blue		B65	Dark Blue	Light Blue
B44	Light Blue	Dark Blue		B69	Dark Blue	Dark Blue
B14	Dark Blue	Light Blue		B62	Dark Blue	Light Blue
B26	Dark Blue	Dark Blue		B70	Light Blue	Light Blue
B07	Dark Blue	Light Blue		B74	Dark Blue	Dark Blue
B13	Dark Blue	Dark Blue		B78	Light Blue	Light Blue
B04	Light Blue	Dark Blue		B98	Dark Blue	Light Blue
B18	Light Blue	Dark Blue		E96	Light Blue	Light Blue
B28	Dark Blue	Dark Blue		E95	Dark Blue	Light Blue
B47	Light Blue	Dark Blue		E97	Light Blue	Dark Blue
B53	Light Blue	Light Blue		B94	Dark Blue	Light Blue
B54	Dark Blue	Dark Blue		B93	Dark Blue	Light Blue
B56	Light Blue	Light Blue		B91	Dark Blue	Light Blue
B57	Light Blue	Light Blue				

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

En el mapa de la figura 22, se muestra aquellas estaciones en las que se encontró la presencia del gen *pahE* (rojo) y al gen *alkB* (azul) de manera individual, y aquellas en las que se encontró ambos genes marcadores. *pahE* Se encontró en una mayor cantidad de estaciones, principalmente en aquellas cercanas a las zonas costeras de las ciudades de Tijuana y Ensenada, además de las estaciones al sur del arroyo “La Misión” y en la Bahía de Salsipuedes. En cambio, el gen *alkB* se encontró principalmente en sedimentos de los alrededores de la zona costera de Rosarito (principalmente al sur).

De manera general, se muestran que se encontró la presencia de ambos genes en nueve estaciones, cercanas a las costas de Tijuana y Rosarito, principalmente (Fig. 22).

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

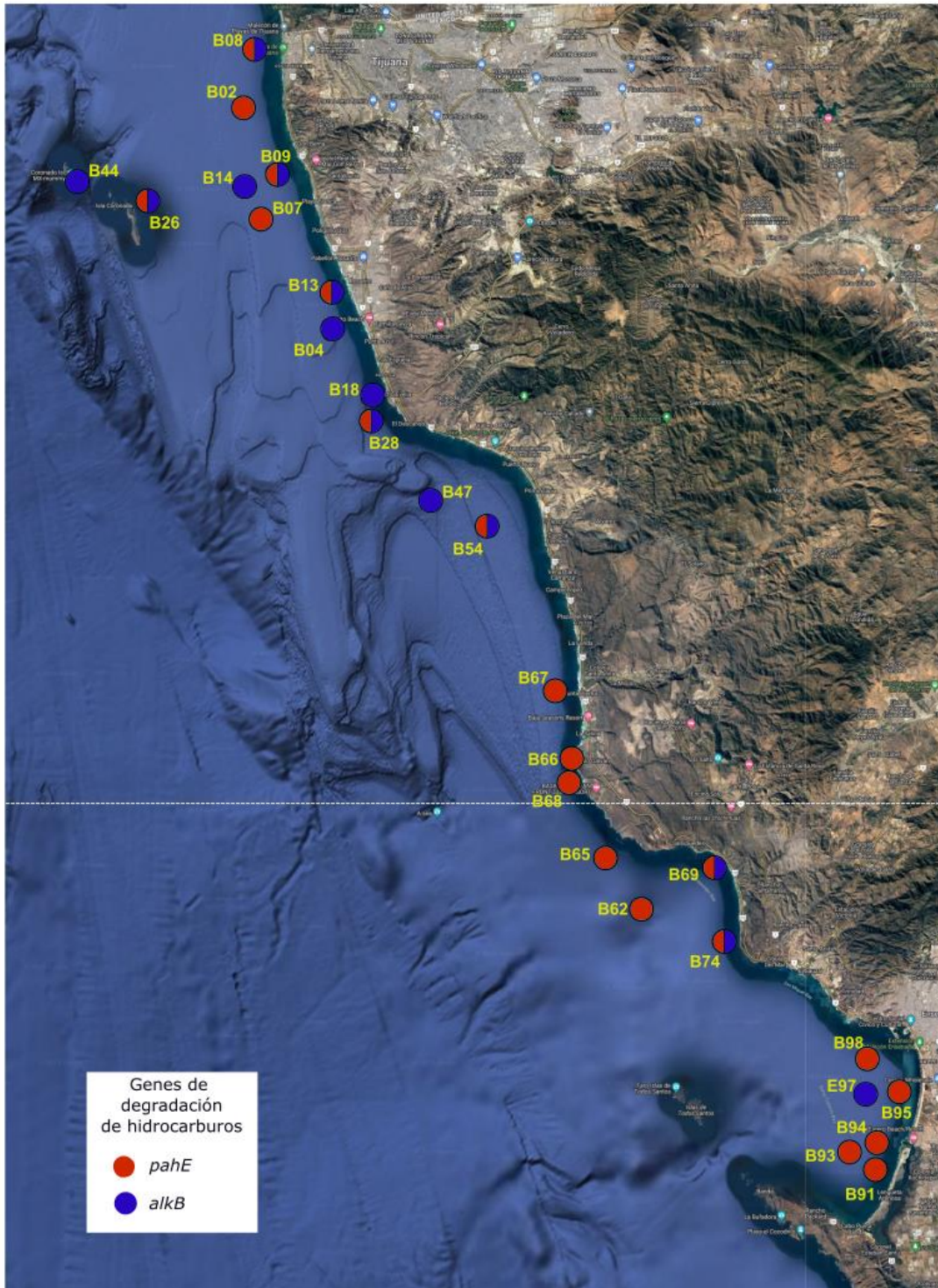


Figura 22. Estaciones con la presencia de los genes de degradación *alkB* y *pahE*.

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

Genes marcadores funcionales relacionados con la resistencia a antibióticos.

La presencia de los genes relacionados con la resistencia a antibióticos analizados en los sedimentos marinos fueron *sul1* (resistencia al sulfametoxazol), *CTX* (resistencia a la cefalexina), *qnrS* (resistencia al ciprofloxacino) y *ampC* (resistencia a la amoxicilina).

El gen *sul1* se detectó en muestras de 16 sitios, el gen *CTX* en 22 y *qnrS* en 8 sitios de los 33, mientras que el gen *ampC* no se detectó en ninguna de las muestras. *Sul1* se detectó en las muestras de las estaciones cercanas a Tijuana, en algunas estaciones cercanas a Rosarito y Puerto Nuevo y en estaciones dentro de la bahía de Ensenada. *CTX* fue detectado en muestras de las estaciones cercanas a Tijuana, en los alrededores de Puerto Nuevo y en las estaciones dentro de la bahía de Ensenada. *qnrS* solo se detectó en estaciones cercanas a las ciudades de Tijuana y Ensenada.

La incidencia de los tres genes que dieron positivo solo se encontró en cuatro muestras correspondientes a las estaciones B07, B10, B53 y E95, las cuales se encuentran en zonas con cercanía a plantas de tratamiento. El mismo patrón se observó en las muestras donde se detectaron dos de los tres genes (Tabla XII y Fig. 23).

Tabla XII. Presencia de genes marcadores con función en la resistencia a antibióticos. La presencia/ausencia de los genes marcadores se representó con dos colores: azul oscuro – presencia, azul claro – ausencia.

Estación	Genes				Estación	Genes			
	<i>Sul1</i>	<i>CTX</i>	<i>qnrS</i>	<i>ampC</i>		<i>Sul1</i>	<i>CTX</i>	<i>qnrS</i>	<i>ampC</i>
B08	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	B67	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
B02	Dark Blue	Light Blue	Dark Blue	Light Blue	B66	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
B10	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	B68	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
B09	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	B65	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
B44	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	B69	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
B14	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	B62	Light Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue
B26	Light Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	B70	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
B07	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	B74	Light Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

B13	■	■	■	■	B78	■	■	■	■
B04	■	■	■	■	B98	■	■	■	■
B18	■	■	■	■	E96	■	■	■	■
B28	■	■	■	■	E95	■	■	■	■
B47	■	■	■	■	E97	■	■	■	■
B53	■	■	■	■	B94	■	■	■	■
B54	■	■	■	■	B93	■	■	■	■
B56	■	■	■	■	B91	■	■	■	■
B57	■	■	■	■					

Además, se observa que la distribución de los genes de resistencia es a lo largo de la costa, pero, en comparación con los genes de degradación, la mayoría de los genes de resistencia a antibióticos se concentran en estaciones con cercanía a zonas con gran actividad antropogénica. Las estaciones donde se detectaron se encuentran cercanas a las ciudades de Tijuana, Rosarito y Ensenada, y en zonas con un menor impacto antropogénico como Puerto Nuevo (B47 y B53) y también es visible la cercanía que tiene la presencia de los genes a las diferentes plantas de tratamiento de las ciudades antes mencionadas (Fig. 23).

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

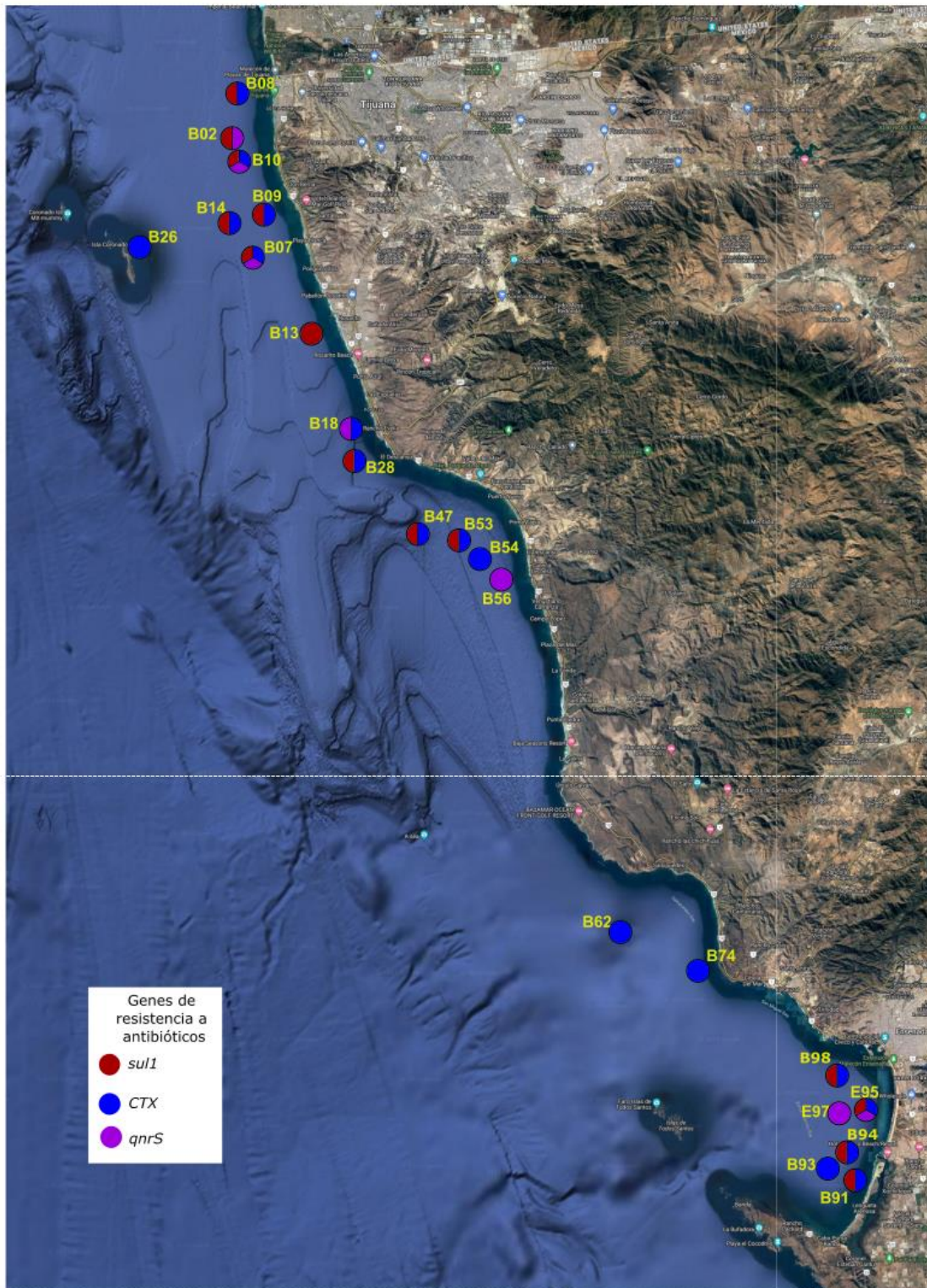


Figura 23. Estaciones con la presencia de los genes de resistencia a antibióticos: *sul1*, *CTX* y *qnrS*.

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

De acuerdo con los datos obtenidos, aquellas estaciones en cuyas muestras sedimentarias se ha detectado una mayor cantidad de genes marcadores, tanto de degradación de hidrocarburos (alifáticos y aromáticos policíclicos) como de resistencia a antibióticos, se localizan en las cercanías a zonas consideradas con un alto impacto antropogénico. Por ejemplo, las estaciones: B07, B08 y B09 tienen cercanía con la ciudad de Tijuana y se encuentran cercanas a distintas PTAR, ya sea al oeste o al suroeste de alguna de ellas, la estación B28 se encuentra al suroeste del municipio de Rosarito, principalmente en la misma dirección de una PTAR, la estación B66 no se encuentra en una zona inferida como de alto impacto antropogénico, pero se encuentra al sur de la desembocadura del arroyo "La Misión". Finalmente, la estación E95 se encuentra dentro de la Bahía de Ensenada, al sur del Puerto de Ensenada y al norte de la boca del Estero de Punta Banda con cercanía a dos PTAR ("El Gallo" y "El Naranja") además de la cercanía al puerto de Ensenada (Fig. 24).

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

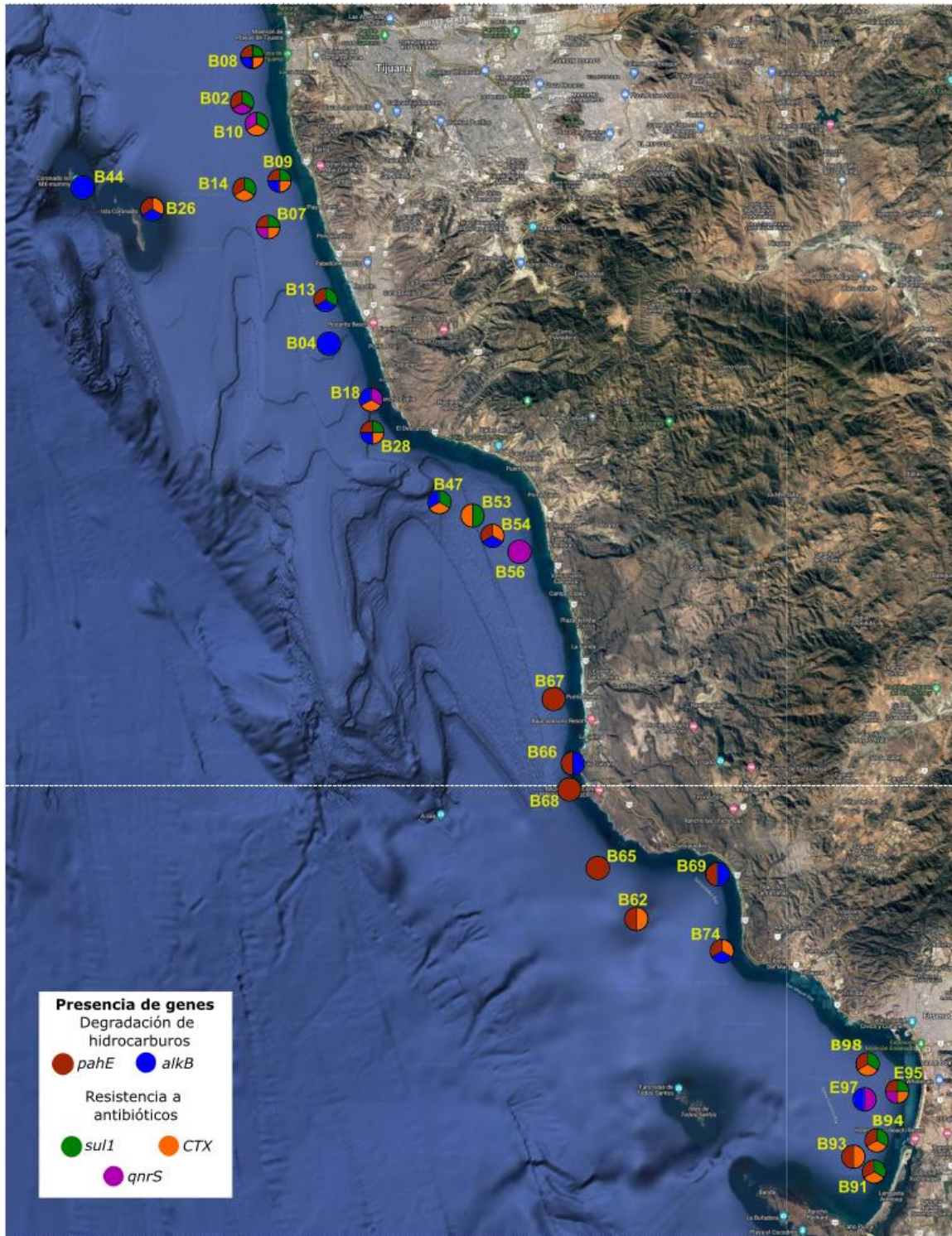


Figura 24. Total de genes presentes en cada estación.

Discusión

La estructura de la comunidad procariota en la costa noroeste de Baja California ha sido estudiada de forma escasa y solo en zonas cercanas a Rosarito, B. C. En 2018, Silva-Jiménez *et al.*, utilizaron métodos dependientes de cultivo para aislar e identificar bacterias con la capacidad de crecer en pireno (hidrocarburo de alto peso molecular), como su única fuente de carbono y energía. Los autores encontraron que las cepas bacterianas aisladas pertenecen a los filos Proteobacteria (Pseudomonadota) (64%), Actinobacteria (Actinomycetota) (28%) y Firmicutes (Bacillota) (8%). En esta tesis, las estaciones B04 y B13 son las más cercanas a la zona analizada por Silva-Jiménez *et al.*, (2018) y, utilizando una aproximación ómica, se encontró que el filo Proteobacteria (Pseudomonadota) es el de mayor abundancia, seguido de Bacteroidetes (Bacteroidota). Mientras que en los filos Actinobacteria (Actinomycetota) y Firmicutes (Bacillota) la abundancia fue mínima (< 3%). Por otro lado, el mismo grupo de investigación (Silva-Jiménez *et al.*, datos sin publicar) aisló varias cepas bacterianas de los géneros *Pseudomonas* y *Vibrio* en los sedimentos marinos de la Bahía de Todos Santos mientras que los resultados obtenidos durante este trabajo mostraron una baja abundancia de estos géneros en los 33 sedimentos marinos analizados (Fig. 11). Las diferencias entre los valores de abundancia entre ambos estudios se pueden deber a diversas razones como la utilización de distintos métodos de análisis (dependientes e independientes de cultivo), los microorganismos aislados por Silva-Jiménez *et al.*, (2018) son fáciles de aislar con los métodos convencionales, y además los objetivos de cada trabajo fueron distintos.

En 2019, Ul – Hasan *et al.* muestrearon sedimentos marinos y agua superficial en tres sitios cercanos a la zona costera de Puerto Nuevo en Rosarito, B. C. y utilizando métodos independientes de cultivo encontraron una diversidad representada por 50 filos. Los puntos de muestreo analizados en este trabajo que tienen una mayor cercanía a los sitios analizados por Ul – Hasan *et al.*, (2019) son: B47, B53, B54 y B56; los primeros tres puntos muestran una cantidad menor de filos presentes (39, 35 y 38 respectivamente) pero la estación B56 presenta una cantidad similar (56 filos) a lo encontrado por los autores. En cuanto a la composición taxonómica, ellos obtuvieron a los filos Bacteroidota y Pseudomonadota como los filos más abundantes seguido por Planctomycetota. En cuanto a la estructura taxonómica de las estaciones con cercanía a estos

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

puntos de muestreo tienen una composición diferente en cuanto a abundancia entre Bacteroidota y Pseudomonadota, siendo el último filo mencionado el más abundante en las cuatro estaciones cercanas. Además de una mayor abundancia del filo Crenarchaeota (dominio Arquea), el cual no fue encontrado por los autores en las muestras de sedimentos. Las diferencias encontradas en la estructura de la diversidad procariota encontrada en ambos trabajos podrían asociarse a la diferencia en los sitios de muestreo (profundidad, cercanía a la costa) así como a las distintas técnicas tanto de extracción de ADN de las muestras ambientales como las regiones de amplificación, debido a que los autores amplificaron la región V4 – V5 del gen ribosomal 16S ARNr mientras que la región amplificada en este trabajo de tesis fue la región V4 del gen ribosomal 16S ARNr.

Además de los estudios sobre la estructura de las comunidades bacterianas antes mencionados, estos se han realizado en sedimentos y en aguas superficiales o profundas, en distintas zonas costeras del mundo utilizando la secuenciación masiva del gen ribosomal 16S ARNr.

En ese sentido, en 2012, Wang *et al.*, realizaron un estudio en sedimentos en Hong Kong y Japón, para comparar la diversidad bacteriana presente en sedimentos de agua dulce, de manglares intermareales y sedimentos marinos. Las muestras tomadas de sedimentos marinos mostraron una diversidad bacteriana compuesta principalmente por los filos Proteobacteria (Pseudomonadota), Planctomycetes (Planctomycetota), Acidobacteria (Acidobacteriota), Verrucomicrobia (Verrucomicrobiota) y Chloroflexi (Chloroflexota), que es una composición similar a lo encontrado en este trabajo. En 2020, Chen *et al.*, realizaron un estudio en el mar de Bohai, China el cuál es conocido por la presencia de contaminantes como metales pesados, y cuyo objetivo de la investigación fue conocer la estructura y la distribución espacial de la comunidad bacteriana. En este trabajo, los autores hacen énfasis en la obtención de cinco filos dominantes de la zona: Proteobacteria (Pseudomonadota), Bacteroidetes (Bacteroidota), Planctomycetes (Planctomycetota), Acidobacteria (Acidobacteriota) y Chloroflexi (Chloroflexota).

A pesar de que los estudios antes mencionados fueron realizados en diferentes zonas costeras, la diversidad encontrada tanto por Wang *et al.*, (2012) y Chang *et al.*, (2020) es muy similar a lo

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

encontrado en los sedimentos de la CBC analizados en este trabajo. Lo anterior nos puede dar un indicio de cómo es el ambiente debido a las capacidades metabólicas que pueden albergar los miembros pertenecientes a cada uno de los filos presentes en los sedimentos de estos ambientes marinos.

Haciendo un filtrado de los metadatos se obtuvo que la arquea *Nitrosopumilus* (Crenarchaeota) y las bacterias *Lutimonas* (Bacteroidota) y *Desulfococcus* (Pseudomonadota-Deltaproteobacteria) fueron los géneros más abundantes.

Las especies pertenecientes al género *Nitrosopumilus* (arquea) son estudiadas por sus diferentes ecotipos, debido a que se pueden encontrar en ambientes marinos con diversas características, aunque usualmente se les asocia a ambientes profundos como chimeneas hidrotermales o ambientes hipersalinos anóxicos. Su mayor potencial metabólico, y el de mayor interés en los procesos biogeoquímicos, es su capacidad de oxidar el amonio, descrito anteriormente solo en bacterias que lo realizaban en dos pasos (Walker *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2020).

El género *Lutimonas* suele ser uno de los más abundantes en sedimentos marinos, su presencia ha sido asociada a diferentes metales pesados como cromo, cobre, plomo, cadmio y zinc. Además, se destaca su habilidad de reducir nitrato a nitrito (Chen *et al.*, 2020). Además de *Lutimonas*, otros géneros miembros de la familia *Flavobacteriaceae* aislados de ambientes marinos participan en la mineralización de la materia orgánica, además se ha estudiado su participación en la degradación de compuestos de alto peso molecular haciendo que los compuestos estén disponibles para otros microorganismos (Ye *et al.*, 2016).

Del género *Desulfococcus* se tiene el conocimiento que están implicadas en la degradación de hidrocarburos alifáticos (alcanos) de forma anaeróbica en filtraciones marinas (Kleindienst *et al.*, 2014). La cepa BuS5 es una cepa aislada en cultivo puro con la capacidad de oxidar anaeróbicamente alcanos de cadena corta, además de crecer en propano y butano (Kniemeyer *et al.*, 2007). Se ha descrito que *Desulfococcus* comprenden especies que dominan la degradación de propano, pentano, alcanos de cadena media y larga, alquenos y compuestos aromáticos como el tolueno o el naftaleno (Kniemeyer *et al.*, 2007; Kleindienst *et al.*, 2014).

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

Además de los principales géneros mencionados, se encontraron una alta abundancia del género *Desulfobacula*, perteneciente a la clase Deltaproteobacteria, este género se encuentra presente en sedimentos marinos con presencia de hidrocarburos, además es posible encontrarlos en la columna de agua con poco oxígeno y donde hay presencia de surgencias marinas. Se han detectado secuencias relacionadas con especies de *Desulfobacula* en zonas marinas contaminadas con hidrocarburos, en sedimentos marinos y de agua dulce, ventilas hidrotermales, zonas de mínimo oxígeno, entre otras (Kuever *et al.*, 2001; Wöhlbrand *et al.*, 2013).

El género *Zeaxanthinibacter*, perteneciente a la clase Flavobacteria, es una cepa aislada principalmente de sedimentos de agua dulce y agua marina, considerado un género aeróbico estricto y de los cuales uno de sus principales roles dentro del ambiente es su capacidad de reducir nitrato a nitrito (Asker *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2016).

En cuanto al microbioma central encontrado en los sedimentos marinos de la CBC, los análisis arrojan que está compuesto por 10 grupos taxonómicos, entre ellos, el género *Nitrosopumilus*, uno de los géneros más abundantes. Al conocer los grupos taxonómicos que componen el microbioma central y su función se puede relacionar con las características del ambiente marino de la CBC. Los grupos taxonómicos del microbioma central se han asociado a distintos procesos biogeoquímicos, además tienen en común que fueron descritos principalmente en ambientes marinos. La característica principal de su importancia dentro del ambiente marino es que todos comparten un rol dentro del ciclo del nitrógeno y/o del azufre (Bowman y McMeekin, 2005; Bernardet y Nakagawa, 2006; Jang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2023).

Los sedimentos marinos son una parte importante del ambiente marino, y se estima que en este ecosistema se concentra la mayor parte de la biomasa de los organismos procariotas (Rodgers *et al.*, 2019). Debido a lo antes mencionado es que se analizaron la alfa y beta diversidad, que nos permiten conocer la riqueza de las muestras analizadas. En las zonas cercanas a los puntos muestreados solo existe el trabajo de Ul – Hasan *et al.*, (2019). Los autores mostraron que, en los sedimentos marinos de la zona de Puerto Nuevo en Rosarito, existe una diversidad alta ($H' > 3$) pero son valores menores a los obtenidos en este trabajo de tesis ($H' > 5$); mientras que en el índice de

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

Simpson se obtuvieron valores ($D > 0.85$) muy similares a los obtenidos en esta tesis ($D > 0.99$), corroborando que en los sedimentos marinos de la CBC existe una dominancia. Al comparar con otros trabajos donde analizaron la riqueza de diversas muestras de sedimentos marinos en otras zonas costeras que reportan que dentro de los mismos existe una alta diversidad: Wang *et al.*, en 2012 analizaron el índice de Shannon encontrando valores mayores a 4. Otro sitio donde se han realizado este tipo de estudios es el Golfo de México, donde, a pesar de encontrar contaminantes prioritarios como metales pesados e hidrocarburos alifáticos, aromáticos y aromáticos policíclicos se ha encontrado una alta diversidad y riqueza, con valores del índice de Shannon mayores a 4 (Godoy-Lozano *et al.*, 2018). Todo lo anterior corrobora que en los sedimentos marinos se concentra una gran biomasa de organismos procariotas, y que, incluso en presencia de contaminantes prioritarios, se puede encontrar una gran riqueza de estos.

Además de conocer cómo se compone la estructura de las comunidades presentes en los sedimentos marinos, se logró inferir la función utilizando herramientas bioinformáticas como PICRUST2 (Douglas *et al.*, 2020).

Una de las rutas de resistencia a antibióticos que fue inferida es la biosíntesis del peptidoglicano IV descrita en la especie *Enterococcus faecium*, pero encontrada también en otras especies de bacterias del tipo Gram positivas. Esta ruta puede ser relacionada a Enterococos que son resistentes a niveles moderados o altos de ampicilina (Ligozzi *et al.*, 1996). Lo anterior coincide con lo descrito de la familia Peptostreptococcaceae (Bacillota/Firmicutes), cuyos géneros descritos pertenecen al grupo de las Gram positivas (Slobodkin, 2014), del mismo filo también se asoció al género sin asignación taxonómica denominado WH1-8, y del cuál no se encontró información; finalmente también se asoció al orden sin asignación taxonómica WCHB1-41, el cual está compuesto por bacterias no cultivadas y de las que tampoco se tiene información.

Por otra parte, también se infirió la ruta metabólica implicada en la resistencia a la polimixina. Esta ruta se ha encontrado en especies del filo Peudomonadota (Proteobacteria), pero fue descrita en la cepa *Escherichia coli* K-12. La polimixina es un antibiótico con efectos tóxicos producido por la bacteria *Paenibacillus polymyxa*, y afecta principalmente a las cepas del tipo Gramnegativo, debido

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

a que tienen especificidad por moléculas de lipopolisacáridos que existen en las membranas externas de las bacterias Gram negativas. La forma en la que funciona la ruta metabólica es a través de la modificación de la estructura de un lípido cambiando su carga y disminuyendo la afinidad de la polimixina (Fu *et al.*, 2007). De los grupos taxonómicos que se asociaron a la resistencia a la polimixina cinco grupos pertenecen a diferentes clases del filo Pseudomonadata, coincidiendo con lo descrito. De los demás grupos taxonómicos, aunque no pertenecen al filo Pseudomonata, son cepas bacterianas descritas como pertenecientes al grupo de las Gram negativas (McIlroy y Nielsen, 2014; Plugge y Zoetendal, 2014; Park *et al.*, 2017), lo que concuerda con el mecanismo de acción de la polimixina, debido a que el antibiótico afecta principalmente a cepas bacterianas pertenecientes a este grupo. Las enzimas inferidas que catalizan la resistencia a polimixina son enzimas asociadas a enfermedades humanas y que fueron descritas principalmente en las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (Yan *et al.*, 2007), pero que posteriormente se ha descrito en otras cepas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii*, las cuales obtuvieron la resistencia de bacterias que son naturalmente resistentes como *Proteus* sp. *Serratia* sp. y *Burkholderia* sp. (Olaitan *et al.*, 2014). Aunque solamente se logró inferir un grupo taxonómico hasta nivel de género y especie, este no coincide con las especies mencionadas anteriormente.

En cuanto a la capacidad de utilizar hidrocarburos como única fuente de carbono y energía, es una función que se ha descrito en diferentes organismos, por lo que es común encontrar rutas implicadas en su degradación. De las rutas implicadas en la degradación de hidrocarburos alifáticos se encontraron tres rutas: oxidación de octano (alcano), oxidación de metanol (alcano) a dióxido de carbono (CO₂) y la degradación del acetileno (alquino) por vía anaeróbica. La vía de oxidación del octano ha sido descrita en especies del género *Pseudomonas*, pero es posible encontrarla en bacterias de diversos grupos sin distinción. La enzima clave de esta vía es la alcano hidroxilasa, que introduce oxígeno molecular en el átomo de carbono terminal de los hidrocarburos y produce alcoholes primarios (Lee y Chandler, 1941; Duque *et al.*, 2022). La oxidación de metanol puede llevarse a cabo por distintas vías, la encontrada en las estaciones fue oxidación de metanol vía formaldehído; esta ruta ha sido descrita principalmente en cepas de *Corynebacterium glutamicum*,

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

la descripción hace mención de que la cepa realiza la oxidación durante la etapa estacionaria del crecimiento. El primer paso de la ruta se lleva a cabo a través de una alcohol deshidrogenasa dependiente de Zn^{2+} , oxidando el metanol a formaldehído, que después es oxidado a formato que finalmente se oxida en CO_2 por una formato deshidrogenasa (Whitthoff *et al.*, 2013). Finalmente, la ruta de degradación anaeróbica del acetileno que se ha descrito en diversas especies como *Syntrophotalea acetylenica*, *Mycobacterium lacticola*, *Rhodococcus opacus* y *Rhodococcus ruber*. En todos los casos de estudio, el único intermediario que se forma es el acetaldehído que posteriormente, se transforma en acetato (Rosner *et al.*, 1997).

Las enzimas que catalizan la degradación de hidrocarburos han sido estudiadas tanto en cepas bacterianas (García-Váldes *et al.*, 1988; Buchan *et al.*, 2000; Rodríguez-Salazar *et al.*, 2020) como en consorcios bacterianos o en muestras ambientales (He *et al.*, 2016; Ley *et al.*, 2023).

Por ejemplo, la enzima catecol 1,2-dioxigenasa, la cual fue purificada de *Pseudomonas* sp. por primera vez, su presencia ha sido reportada principalmente en cepas bacterianas del tipo Gram negativas, pero también en cepas del tipo Gram positivas. De las clases pertenecientes al filo Pseudomonadota, Gammaproteobacteria es donde se ha descrito principalmente la enzima, aunque se ha encontrado en otras clases, como en Alfabroteobacteria (Garrido-Sanz *et al.*, 2019; Setlhare *et al.*, 2019; Dell' Anno *et al.*, 2021; Poyntner *et al.*, 2021). Aunque en este trabajo la enzima no se asoció a ningún grupo taxonómico perteneciente a Gammaproteobacteria, si fue asociada a dos grupos taxonómicos pertenecientes a la clase Alfabroteobacteria (Pseudomonadota): el género *Aquamicrobium* y a la familia Rhodobacteraceae (Fig. 19). En cuanto a la enzima catecol 2,3 dioxigenasa, esta se ha descrito en las clases Alfabroteobacteria, Betaproteobacteria y Gammaproteobacteria (Kasuga *et al.*, 2007; Garrido-Sanz *et al.*, 2019), coincidiendo con lo obtenido en la predicción realizada en esta tesis, donde la enzima se asoció a las clases Alfa- y Betaproteobacteria, además de la clase Deltaproteobacteria, todas pertenecientes al filo Pseudomonadota (Fig. 19).

Por otro lado, la enzima con mayor número de lecturas y grupos taxonómicos asociados fue la protocatecuato 3,4-dioxigenasa. Esta enzima se ha asociado a diversas bacterias marinas, la

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

mayoría pertenecientes al filo Pseudomonadota y mediante técnicas de PCR punto final y comparación con bases de datos, se detectó su presencia en regiones como el Mar de Bohai, Mar Amarillo, España y Dinamarca (Garrido-Sanz *et al.*, 2019; Poyntner *et al.*, 2021; Ley *et al.*, 2023). En este trabajo, la inferencia realizada con PICRUST2 asoció a esta enzima con las clases Alfa-, Delta- y Gammaproteobacteria (del filo Pseudomonadota), además de grupos pertenecientes a los filos Bacteroidota y Planctomycetota, lo que coincide con lo descrito de los resultados obtenidos, debido a que la mayoría de las lecturas fue asociada a grupos taxonómicos pertenecientes al filo Pseudomonadota.

En el caso de la salicilato monooxigenasa, esta enzima se purificó por primera vez de la bacteria *Pseudomonas cepacia* (Ramsay *et al.*, 1992). Su presencia se ha encontrado en cepas pertenecientes a la clase Gammaproteobacteria (Dell' Anno *et al.*, 2021) y Alfaproteobacteria (Grevesse *et al.*, 2022), de esta última clase en la familia Rhodobacteraceae y el orden Rhodobacterales, mismos que coincide con los grupos taxonómicos obtenidos de las inferencias obtenidas a partir de los datos obtenidos de la secuenciación masiva del gen ribosomal 16S ARNr a partir del ADN ambiental de las 33 muestras de sedimentos marinos de la CBC.

Para corroborar los datos inferidos con PICRUST2, se realizó otra predicción con el servidor en línea METAGENassist que arrojó datos de rutas metabólicas implicadas en procesos biogeoquímicos como los ciclos del nitrógeno y el azufre que fueron como los perfiles metabólicos más abundantes, lo que coincide con las propiedades fisicoquímicas de la zona de estudio y con las funciones que cumple los grupos taxonómicos del microbioma central presente en las muestras de sedimentos (tabla VII). La costa oeste de Baja California, esta influenciada por la Corriente de California, una corriente conformada por aguas frías y “viejas” que transportan nutrientes a la superficie debido a las surgencias (Deutsch *et al.*, 2021), lo que influye en los resultados obtenidos en esta tesis. De igual manera, se encontraron los perfiles metabólicos asociados con la degradación de alifáticos e hidrocarburos aromáticos que se pueden relacionar a la presencia de estos contaminantes en los sedimentos marinos, los cuales han sido analizados y detectados en diversos estudios,

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

principalmente en la zona del Puerto de Rosarito y Ensenada (Macías-Zamora *et al.*, 2002; Macías-Zamora *et al.*, 2014; Silva-Jiménez *et al.*, 2018).

Para determinar comunidades microbianas que poseen la capacidad de degradar alcanos y monitorear sitios contaminados con este tipo de hidrocarburos se utiliza el gen funcional *alkB*, el cual codifica para una alcano monooxigenasa. El gen *alkB* ha sido utilizado ampliamente en diversos estudios ambientales. Por ejemplo, en 2009, Wasmund *et al.*, analizaron muestras sedimentarias del mar Timor (Australia) e identificaron diversas secuencias de *alkB* que apuntan a una amplia gama de especies pertenecientes a la clase Gammaproteobacteria, además cuantificaron el número de copias del gen, encontrando un gran número. En 2022, Bagi *et al.*, cuantificaron el gen *alkB* en muestras de agua de mar de una zona contaminada con petróleo, encontrando alrededor de 5000 copias por mililitro de agua de mar en total. También se ha encontrado al gen *alkB* en sedimentos de la zona del Río de la Plata y la Zona de Pesca Común Argentina – uruguay (Peressutti y Zorzoli, 2023). En 2012, Lu *et al.*, encontraron la presencia de secuencias del gen *alkB* en la pluma de petróleo causada por el accidente Deepwater Horizon, las secuencias se asociaron a distintas especies pertenecientes a los filos Proteobacteria (Pseudomonadota) (e.g. *Bdellovibrio*, *Roseobacter* y *Rhodospirillum*), Firmicutes (Bacillota) y a Actinobacteria (Actinomycetota) (e. g. *Gordonia* y *Rhodococcus*). Los filos en que Lu *et al.*, (2012) encontraron secuencias de *alkB* son filos encontrados en las 33 muestras sedimentarias que fueron analizadas. Además, el gen marcador *alkB* se encontró principalmente en sedimentos de estaciones cercanas al puerto de Rosarito, zona en la cual se ha reportado la presencia de hidrocarburos alifáticos con cadenas que van desde 17 hasta 37 carbonos (Macías-Zamora *et al.*, 2014), corroborando que puede ser utilizado para conocer cómo se encuentra el estado de salud de los sedimentos en cuanto a la presencia de este tipo de hidrocarburos.

Para la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos se utilizó el gen funcional *pahE*, un gen que previamente ha sido utilizado como gen marcador de la degradación de HAP en distintos tipos de ambientes (Liang *et al.*, 2019; Liang *et al.*, 2023). Este gen codifica para un aldolasa hidratasa y participa en el quinto paso de la ruta de degradación de HAP (Fig. 4) (Liang *et al.*, 2019).

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

En 2023, Liang *et al.*, analizaron y cuantificaron la abundancia del gen *pahE* en muestras de suelo y sedimento de manglares, encontrando la presencia del gen y cuantificando hasta 1×10^9 copias del gen por gramo de sedimento. La presencia de HAP ha sido analizada y reportada en diversos estudios, principalmente en las zonas cercanas al puerto de Rosarito y en la Bahía de Todos Santos (Ensenada), por lo que, se puede asociar el gen marcador *pahE* con la presencia de hidrocarburos, principalmente con los resultados obtenidos en las muestras sedimentarias dentro de la Bahía de Todos Santos (Ensenada).

En la CBC se ha detectado la presencia de contaminantes prioritarios como los hidrocarburos alifáticos, aromáticos y aromáticos policíclicos en diversas ocasiones, principalmente en la zona del Puerto de Rosarito y en la desembocadura del arroyo “El Gallo” en el Puerto de Ensenada (Macías-Zamora *et al.*, 2002; Macías-Zamora *et al.*, 2014; Silva-Jiménez *et al.*, 2018). Por lo anterior es que se esperaba inferir rutas catabólicas de degradación de hidrocarburos, además de encontrar la presencia de los genes marcadores funcionales *alkB* y *pahE*, principalmente en las zonas costeras aledañas a las ciudades, tales como Tijuana, Rosarito, Ensenada, así como a las PTAR.

La contaminación en ambientes marinos por antibióticos y genes de resistencia a antibióticos es un tema que ha sido poco estudiado, pero que ha ido tomando importancia con los años. Se han realizado estudios en ambientes acuáticos y marinos como el mar de Bohai (Lu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020), el mar Amarillo (Lu *et al.*, 2019), el mar del este de China (Chen *et al.*, 2019), entre otros. En estos estudios se ha reportado la detección y cuantificación de distintos genes de resistencia, entre los que destacan los genes *sul1* y *qnrS*. En esta tesis, el gen *sul1* destacó su presencia en gran parte de las muestras de sedimentos a lo largo de la CBC, como lo reportado en los trabajos anteriores. Mientras que el gen *qnrS* fue el que se detectó en menos muestras de sedimentos analizados en este trabajo de tesis.

Por otro lado, el gen *qnrS* se puede contrastar con lo encontrado en 2011, por Cummings *et al.*, quienes realizaron un estudio en la costa cercana a San Diego, CA y a Tijuana, BC en donde encontraron la presencia de genes de resistencia a quinolonas (genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA* y *aac(6')*). En el estudio se reporta la presencia de los genes analizados, pero principalmente,

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

reportan la detección del gen *qnrS* lo que coincide con lo encontrado en esta tesis, donde el gen fue localizado en dos muestras de estaciones cercanas a la costa de Tijuana, lo que implica que el gen marcador pueda ser utilizado como un indicador de la salud de los sedimentos.

Conclusiones

Los sedimentos marinos de la CBC presentan una alta diversidad de organismos procariotas que son representados tanto por el dominio Arquea como por el dominio Bacteria, y existe una dominancia de especies, posiblemente por especies de los géneros más abundantes (*Nitrosopumilus*, *Lutimonas* y *Desulfococcus*). El microbioma núcleo encontrado en las 33 muestras de sedimentos de la CNBC está compuesto por procariotas que tienen un papel importante en los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno y el azufre.

La inferencia de rutas metabólicas y enzimas permitió conocer algunas rutas implicadas en la resistencia a antibióticos y en la degradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos en las comunidades procariotas que forman parte de los sedimentos marinos de la CBC. Los genes marcadores relacionados con la degradación de hidrocarburos y la resistencia a antibióticos permitieron corroborar parcialmente, de forma experimental, lo que las inferencias metabólicas dieron como resultados. Además, la detección de genes funcionales permitió relacionar su presencia en los sedimentos de zonas con alta actividad antropogénica como las costas de Tijuana y Rosarito, el arroyo “La Misión”, Bahía Salsipuedes y la costa de Ensenada. Lo anterior corrobora que los genes marcadores funcionales utilizados durante este trabajo de tesis pueden ser utilizados para monitorear el estado de salud del ambiente costero de Baja California, así como la presencia de comunidades hidrocarbonoclastas.

Además de proveer información sobre la composición de la diversidad procariota presente en los sedimentos marinos de la CNBC y sus posibles funciones dentro de los mismos, este tipo de estudios son importantes debido a que ayudarán a que las autoridades correspondientes tengan una manera de monitorear el ambiente marino y puedan tomar decisiones que prevengan o disminuyan la presencia de contaminantes prioritarios y emergentes.

Literatura citada

- Antunes, P., Machado, J., Sousa, J. C. y Peixe, L. (2005). Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese Salmonella enterica strains and relation with integrons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49(2). 836–839. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.836-839.2005>
- Asker, D., Beppu, T. y Ueda, K. (2007). *Zeaxanthinibacter enoshimensis* gen. nov., sp. nov., a novel zeaxanthin-producing marine bacterium of the family Flavobacteriaceae, isolated from seawater off Enoshima Island, Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57(4). 37–843. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64682-0>
- aus der Beek, T., Weber, F. A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A. y Küster, A. (2016). Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 35(4). 823–835. <https://doi.org/10.1002/etc.3339>
- Bagi, A., Knapik, K. y Baussant, T. (2022). Abundance and diversity of n-alkane and PAH-degrading bacteria and their functional genes – Potential for use in detection of marine oil pollution. *Science of the Total Environment*. 810. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152238>
- Bamforth, S. M. y Singleton, I. (2005). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Current knowledge and future directions. *In Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 80(7). 723–736. <https://doi.org/10.1002/jctb.1276>
- Batista, M. I., Henriques, S., Pais, M. P. y Cabral, H. N. (2014). Assessment of cumulative human pressures on a coastal area: Integrating information for MPA planning and management. *Ocean and Coastal Management*. 102. 248–257. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2014.09.020>
- Bernardet, J.F. y Nakagawa, Y. (2006). An Introduction to the Family Flavobacteriaceae. *In The Prokaryotes* 455–480. Springer New York. https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8_16
- Bhimabhai, K. S. (2018). Comparative study of aliphatic and aromatic compounds. *The Pharma Innovation Journal*. 7(9). 175–177. <https://doi.org/10.1021/ja00167a011>
- Birrer, S. C., Dafforn, K. A., Sun, M. Y., Williams, R. B. H., Potts, J., Scanes, P., Kelaher, B. P., Simpson, S. L., Kjelleberg, S., Swarup, S., Steinberg, P. y Johnston, E. L. (2019). Using meta-omics of contaminated sediments to monitor changes in pathways relevant to climate regulation. *Environmental Microbiology*. 21(1). 389–401. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14470>
- Blanco, A., y Blanco, G. (2022). Chapter 13 - Metabolism. In A. Blanco & G. Blanco (Eds.), *Medical Biochemistry* (Second Edition). 307–314. Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91599-1.00026-2>

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*. 37(8). 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bowman John P. y McMeekin, T. A. (2005). *Alteromonadales* ord. nov. In N. R. and S. J. T. and G. G. M. and B. D. R. and D. V. P. and G. M. and R. F. A. and S. K.-H. Brenner Don J. and Krieg (Ed.), *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two the Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria*. 443–491. https://doi.org/10.1007/0-387-28022-7_10
- Buchan, A., Collier, L. S., Neidle, E. L. y Moran, M. A. (2000). Key Aromatic-Ring-Cleaving Enzyme, Protocatechuate 3,4-Dioxygenase, in the Ecologically Important Marine *Roseobacter* Lineage. *Applied and environmental microbiology*. 66(11).
- Bukin, Y. S., Galachyants, Y. P., Morozov, I. V., Bukin, S. V., Zakharenko, A. S. y Zemskeya, T. I. (2019). The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Scientific Data*. 6. <https://doi.org/10.1038/sdata.2019.7>
- Caballero-Gallardo, K., Olivero-Verbel, J., Corada-Fernández, C., Lara-Martín, P. A. y Juan-García, A. (2021). Emerging contaminants and priority substances in marine sediments from Cartagena Bay and the Grand Marsh of Santa Marta (Ramsar site), Colombia. *Environmental Monitoring and Assessment*. 193(9), 596. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09392-5>
- Chen, J., McIlroy, S. E., Archana, A., Baker, D. M. y Panagiotou, G. (2019). A pollution gradient contributes to the taxonomic, functional, and resistome diversity of microbial communities in marine sediments. *Microbiome*. 7(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0714-6>
- Chen, Q., Fan, J., Su, J., Ming, H., Sun, Z., Li, M., Zhao, X., Wang, Y., Zhang, Y., Zhang, H., Jin, Y., Ma, X. y Wang, B. (2020). Spatial distribution characteristics of bacterial community structure and gene abundance in sediments of the Bohai Sea. *Acta Oceanologica Sinica*. 39(2). 69–78. <https://doi.org/10.1007/s13131-020-1554-8>
- Chiarello, M., McCauley, M., Villéger, S. y Jackson, C. R. (2022). Ranking the biases: The choice of OTUs vs. ASVs in 16S rRNA amplicon data analysis has stronger effects on diversity measures than rarefaction and OTU identity threshold. *PLoS ONE*. 17(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264443>
- Cravo-Laureau, C. y Duran, R. (2014). Marine coastal sediments microbial hydrocarbon degradation processes: Contribution of experimental ecology in the omics'era. *Frontiers in Microbiology*. 5(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00039>

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

- Cummings, D. E., Archer, K. F., Arriola, D. J., Baker, P. A., Faucett, K. G., Laroya, J. B., Pfeil, K. L., Ryan, C. R., Ryan, K. R. U. y Zuill, D. E. (2011). Broad dissemination of plasmid-mediated quinolone resistance genes in sediments of two urban coastal wetlands. *Environmental Science and Technology*. 45(2). 447–454. <https://doi.org/10.1021/es1029206>
- Das, N., Madhavan, J., Selvi, A. y Das, D. (2019). An overview of cephalosporin antibiotics as emerging contaminants: a serious environmental concern. *Biotech*. 9(6). <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1766-9>
- Dell' Anno, F., Rastelli, E., Sansone, C., Dell' Anno, A., Brunet, C. y Ianora, A. (2021). Bacteria, fungi and microalgae for the bioremediation of marine sediments contaminated by petroleum hydrocarbons in the omics era. *Microorganisms*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081695>
- Deutsch, C., Frenzel, H., McWilliams, J. C., Renault, L., Kessouri, F., Howard, E., Liang, J.-H., Bianchi, D. y Yang, S. (2021). Biogeochemical variability in the California Current System.
- Ding, C. y He, J. (2010). Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87(3). 925–941. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2649-5>
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., Huttenhower, C. y Langille, M. G. I. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology*. 38(6). 685–688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
- Durazo, R. (2015). Seasonality of the transitional region of the California Current System off Baja California. *Journal of Geophysical Research: Oceans*. 120(2). 1173–1196. <https://doi.org/10.1002/2014JC010405>
- Fadeev, E., Cardozo-Mino, M. G., Rapp, J. Z., Bienhold, C., Salter, I., Salman-Carvalho, V., Molari, M., Tegetmeyer, H. E., Buttigieg, P. L. y Boetius, A. (2021). Comparison of Two 16S rRNA Primers (V3–V4 and V4–V5) for Studies of Arctic Microbial Communities. *Frontiers in Microbiology*. 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.637526>
- Flemming, H. C. y Wuertz, S. (2019). Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*. 17(4). 247–260. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0158-9>
- Fu, W., Yang, F., Kang, X., Zhang, X., Li, Y., Xia, B. y Jin, C. (2007). First structure of the polymyxin resistance proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 361(4). 1033–1037. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.144>
- García-Valdes, E., Cozar, E., Rotger, R., Lalucat, J. y Ursing, J. (1988). New Naphthalene-Degrading Marine *Pseudomonas* Strains. *Applied And Environmental Microbiology*. 54(10).

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

- Garrido-Sanz, D., Redondo-Nieto, M., Guirado, M., Jiménez, O. P., Millán, R., Martín, M. y Rivilla, R. (2019). Metagenomic insights into the bacterial functions of a diesel-degrading consortium for the rhizoremediation of diesel-polluted soil. *Genes*. 10(6). <https://doi.org/10.3390/genes10060456>
- Gleckman, R., Blagg, N. y Joubert, D. W. (1981). Trimethoprim: Mechanisms of Action, Antimicrobial Activity, Bacterial Resistance, Pharmacokinetics, Adverse Reactions, and Therapeutic Indications. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 1(1). 14–19. <https://doi.org/10.1002/j.1875-9114.1981.tb03548.x>
- Godoy-Lozano, E. E., Escobar-Zepeda, A., Raggi, L., Merino, E., Gutierrez-Rios, R. M., Juarez, K., Segovia, L., Licea-Navarro, A. F., Gracia, A., Sanchez-Flores, A. y Pardo-Lopez, L. (2018). Bacterial diversity and the geochemical landscape in the southwestern Gulf of Mexico. *Frontiers in Microbiology*. 9(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02528>
- Grevesse, T., Guéguen, C., Onana, V. E. y Walsh, D. A. (2022). Degradation pathways for organic matter of terrestrial origin are widespread and expressed in Arctic Ocean microbiomes. *Microbiome*. 10(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01417-6>
- Guevara, G., Castillo Lopez, M., Alonso, S., Perera, J. y Navarro-Llorens, J. M. (2019). New insights into the genome of *Rhodococcus ruber* strain Chol-4. *BMC Genomics*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5677-2>
- He, P., Li, L., Liu, J., Bai, Y. y Fang, X. (2016). Diversity and distribution of catechol 2, 3-dioxygenase genes in surface sediments of the Bohai Sea. *FEMS Microbiology Letters*. 363(10). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw086>
- Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D. y Eiros, J. M. (2020). Bioinformatics of next generation sequencing in clinical microbiology diagnosis. *Revista Argentina de Microbiología*. 52(2). 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.003>
- Jang, Y., Oh, H. M., Kang, I., Lee, K., Yang, S. J. y Cho, J. C. (2011). Genome sequence of strain IMCC3088, a proteorhodopsin-containing marine bacterium belonging to the OM60/NOR5 clade. *Journal of Bacteriology*. 193(13). 3415–3416. <https://doi.org/10.1128/JB.05111-11>
- Kasuga, I., Nakajima, F. y Furumai, H. (2007). Diversity of catechol 2,3-dioxygenase genes of bacteria responding to dissolved organic matter derived from different sources in a eutrophic lake. *FEMS Microbiology Ecology*. 61(3). 449–458. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00347>
- Kleindienst, S., Herbst, F. A., Stagars, M., von Netzer, F., von Bergen, M., Seifert, J., Peplies, J., Amann, R., Musat, F., Lueders, T. y Knittel, K. (2014). Diverse sulfate-reducing bacteria of the *Desulfosarcina/Desulfococcus* clade are the key alkane degraders at marine seeps. *ISME Journal*, 8(10), 2029–2044. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.51>

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

- Kleine Bardenhorst, S., Vital, M., Karch, A. y Rübsamen, N. (2022). Richness estimation in microbiome data obtained from denoising pipelines. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 20. 508–520. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.12.036>
- Kniemeyer, O., Musat, F., Sievert, S. M., Knittel, K., Wilkes, H., Blumenberg, M., Michaelis, W., Classen, A., Bolm, C., Joye, S. B. y Widdel, F. (2007). Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. *Nature*. 449(7164). 898–901. <https://doi.org/10.1038/nature06200>
- Koch, N., Islam, N. F., Sonowal, S., Prasad, R. y Sarma, H. (2021). Environmental antibiotics and resistance genes as emerging contaminants: Methods of detection and bioremediation. *Current Research in Microbial Sciences*. 2. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100027>
- Korpinen, S. y Andersen, J. H. (2016). A global review of cumulative pressure and impact assessments in marine environments. *Frontiers in Marine Science*. 3(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00153>
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K. y Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(17). 5112–5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>
- Kuever, J., Könneke, M., Galushko, A. y Drzyzga, O. (2001). Reclassification of *Desulfobacterium phenolicum* as *Desulfobacteria phenolica* comb. nov. and description of strain SaxT as *Desulfotignum balticum* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51. 171–177.
- Kurczyn, J. A., Pérez-Brunius, P., López, M., Candela, J., Delgadillo-Hinojosa, F. y García-Mendoza, E. (2019). Water Masses and Ocean Currents Over the Continental Slope off Northern Baja California. *Journal of Geophysical Research: Oceans*. 124(4). 2803–2823. <https://doi.org/10.1029/2018JC013962>
- Lambert, T. (2012). Antibiotics that affect the ribosome. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 31(1). 57–64.
- Lee, Y., Jeong, H. I., Jeong, S. E. y Jeon, C. O. (2016). *Zeaxanthinibacter aestuarii* sp. nov., isolated from estuary sediment and emended description of the genus *Zeaxanthinibacter* Asker *et al.* 2007. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66(9). 3264–3269. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001185>
- Ley, Y., Cheng, X.-Y., Ying, Z.-Y., Zhou, N.-Y. y Xu, Y. (2023). Characterization of Two Marine Lignin-Degrading Consortia and the Potential Microbial Lignin Degradation Network in Nearshore Regions. *Microbiology Spectrum*. 11(3). <https://doi.org/10.1128/spectrum.04424-22>
- Li, S.-H., Kang, I. y Cho, J.-C. (2023). Metabolic Versatility of the Family Halieaceae Revealed by the Genomics of Novel Cultured Isolates. *Microbiology Spectrum*. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03879-22>

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

- Liang, C., Huang, Y. y Wang, H. (2019). *pahE*, a functional marker gene for polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 85(3). <https://doi.org/10.1128/AEM.02399-18>
- Liang, C., Ye, Q., Huang, Y., Zhang, Z., Wang, C., Wang, Y. y Wang, H. (2023). Distribution of the new functional marker gene (*pahE*) of aerobic polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) degrading bacteria in different ecosystems. *Science of the Total Environment*. 865. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161233>
- Ligozzi, M., Pittaluga, F., Fontana, R., Fontana, R., Aldegheri, M., Ligozzi, M., Lopez, H., Sucari, A., Satta, G. A. y Agents, C. (1996). Modification of Penicillin-Binding Protein 5 Associated with High-Level Ampicillin Resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40(2).
- Liu, Q., Tang, J., Bai, Z., Hecker, M. y Giesy, J. P. (2015). Distribution of petroleum degrading genes and factor analysis of petroleum contaminated soil from the Dagang Oilfield, China. *Scientific Reports*. 5. <https://doi.org/10.1038/srep11068>
- Lu, J., Zhang, Y., Wu, J., Wang, J., Zhang, C. y Lin, Y. (2019). Occurrence and spatial distribution of antibiotic resistance genes in the Bohai Sea and Yellow Sea areas, China. *Environmental Pollution*. 252. 450–460. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.143>
- Lu, Z., Deng, Y., Van Nostrand, J. D., He, Z., Voordeckers, J., Zhou, A., Lee, Y. J., Mason, O. U., Dubinsky, E. A., Chavarria, K. L., Tom, L. M., Fortney, J. L., Lamendella, R., Jansson, J. K., D'Haeseleer, P., Hazen, T. C. y Zhou, J. (2012). Microbial gene functions enriched in the Deepwater Horizon deep-sea oil plume. *ISME Journal*. 6(2). 451–460. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.91>
- Macías-Zamora, J. V., Meléndez-Sánchez, A. L., Ramírez-Álvarez, N., Gutiérrez-Galindo, E. A. y Orozco-Borbón, M. V. (2014). On the effects of the dispersant Corexit 9500© during the degradation process of n-alkanes and PAHs in marine sediments. *Environmental Monitoring and Assessment*. 186(2). 1051–1061. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3438-2>
- Macías-Zamora, J. V., Mendoza-Vega, E. y Villaescusa-Celaya, J. (2002). PAHs composition of surface marine sediments: a comparison to potential local sources in Todos Santos Bay, B.C., Mexico. www.elsevier.com/locate/chemosphere
- Maurya, A. P., Rajkumari, J. y Pandey, P. (2021). Enrichment of antibiotic resistance genes (ARGs) in polyaromatic hydrocarbon-contaminated soils: a major challenge for environmental health. *Environmental Science and Pollution Research*. 28. 12178–12189. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12171-3>/Published
- McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., Desantis, T. Z., Probst, A., Andersen, G. L., Knight, R. y Hugenholtz, P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

- and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME Journal*. 6(3). 610–618. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.139>
- McIlroy, S. J. y Nielsen, P. H. (2014). The family Saprospiraceae. *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*. 9783642389542. 863–889. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2_138
- Navgire, G. S., Goel, N., Sawhney, G., Sharma, M., Kaushik, P., Mohanta, Y. K., Mohanta, T. K. y Al-Harrasi, A. (2022). Analysis and Interpretation of metagenomics data: an approach. In *Biological Procedures Online* (Vol. 24, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12575-022-00179-7>
- Neu, A. T., Allen, E. E. y Roy, K. (2021). Defining and quantifying the core microbiome: Challenges and prospects. *PNAS*. <https://doi.org/10.1073/pnas.2104429118/-/DCSupplemental>
- Nie, Y., Chi, C. Q., Fang, H., Liang, J. L., Lu, S. L., Lai, G. L., Tang, Y. Q. y Wu, X. L. (2014). Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. *Scientific Reports*. 4. <https://doi.org/10.1038/srep04968>
- Olaitan, A. O., Morand, S. y Rolain, J. M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 5(NOV). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00643>
- Oren, A. (2004). Prokaryote diversity and taxonomy: Current status and future challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 359(1444). 623–638. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1458>
- Ossai, I. C., Ahmed, A., Hassan, A. y Hamid, F. S. (2020). Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environmental Technology and Innovation*. 17. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100526>
- Ovung, A. y Bhattacharyya, J. (2021). Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. *Biophysical Reviews*. 13. 259–272. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00795-9/Published>
- Park, S., Yoon, S. Y., Ha, M. J., Jung, Y. T. y Yoon, J. H. (2017). *Lutibacter litorisediminis* sp. nov., isolated from a tidal flat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 67(3). 583–588. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001662>
- Peressutti, S. R. y Zorzoli, P. A. (2023). Monitoreo de contaminantes y detección de genes *alkB* en la Zona Común de Pesca Argentino-Uruguaya. *Marine and Fishery Sciences*. 36(1). <https://doi.org/10.47193/mafis.3612023010109>

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

- Plugge, C. M. y Zoetendal, E. G. (2014). The family Victivallaceae. In *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*. 9783642389542. 1019–1021. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2_150
- Poyntner, C., Kutzner, A. y Margesin, R. (2021). Microorganisms biodegradation potential and putative catabolic genes of culturable bacteria from an alpine deciduous forest site. <https://doi.org/10.3390/microorganisms>
- Quéméneur, M., Bel Hassen, M., Armougom, F., Khammeri, Y., Lajnef, R. y Bellaaj-Zouari, A. (2020). Prokaryotic Diversity and Distribution Along Physical and Nutrient Gradients in the Tunisian Coastal Waters (South Mediterranean Sea). *Frontiers in Microbiology*. 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.593540>
- Ramsay, J., McEntee, I. y Hammond, P. (1992). Production and purification of salicylate monooxygenase from *Pseudomonas cepacia* ATCC 29351. *Bioseparation*. 2(6). 375–383.
- Rodgers, K., McLellan, I., Peshkur, T., Williams, R., Tonner, R., Hursthouse, A. S., Knapp, C. W. y Henriquez, F. L. (2019). Can the legacy of industrial pollution influence antimicrobial resistance in estuarine sediments? *Environmental Chemistry Letters*. 17(2). 595–607. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0791-y>
- Rodríguez-Salazar, J., Almeida-Juarez, A. G., Ornelas-Ocampo, K., Millán-López, S., Raga-Carbajal, E., Rodríguez-Mejía, J. L., Muriel-Millán, L. F., Godoy-Lozano, E. E., Rivera-Gómez, N., Rudiño-Piñera, E. y Pardo-López, L. (2020). Characterization of a Novel Functional Trimeric Catechol 1,2-Dioxygenase From a *Pseudomonas stutzeri* Isolated From the Gulf of Mexico. *Frontiers in Microbiology*. 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01100>
- Sakary, M., Zakaria, M. P., Lajis, N. H., Mohamed, C. A. R. y Abdullah, M. H. (2012). Reconstruction of aliphatic hydrocarbons history and sources from sedimentary record of the Johor Strait, Malaysia. *Coastal Marine Science*. 35(1). 142–152.
- Setlhare, B., Kumar, A., Mokoena, M. P. y Olaniran, A. O. (2019). Catechol 1,2-dioxygenase is an analogue of homogentisate 1,2-dioxygenase in *Pseudomonas chlororaphis* strain UFB2. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(1). <https://doi.org/10.3390/ijms20010061>
- Silva-Jiménez, H., Araujo-Palomares, C. L., Macías-Zamora, J. V., Ramírez-álvarez, N., García-Lara, B. y Corrales-Escobosa, A. R. (2018). Identification by MALDI-TOF MS of environmental bacteria with high potential to degrade pyrene. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 62(2). <https://doi.org/10.29356/jmcs.v62i2.411>
- Slobodkin, A. (2014). The family Peptostreptococcaceae. In *The Prokaryotes: Firmicutes and Tenericutes*. 9783642301209. 291–302. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30120-9_217

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

- Somee, M. R., Amoozegar, M. A., Dastgheib, S. M. M., Shavandi, M., Maman, L. G., Bertilsson, S. y Mehrshad, M. (2022). Genome-resolved analyses show an extensive diversification in key aerobic hydrocarbon-degrading enzymes across bacteria and archaea. *BMC Genomics*. 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08906-w>
- Speight, J. G. (2017). Organic Chemistry. In *Environmental Organic Chemistry for Engineers*. 43–86. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804492-6.00002-2>
- Szekeres, E., Baricz, A., Chiriac, C. M., Farkas, A., Opris, O., Soran, M. L., Andrei, A. S., Rudi, K., Balcázar, J. L., Dragos, N. y Coman, C. (2017). Abundance of antibiotics, antibiotic resistance genes and bacterial community composition in wastewater effluents from different Romanian hospitals. *Environmental Pollution*. 225. 304–315. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.054>
- Tamburini, E., Doni, L., Lussu, R., Meloni, F., Cappai, G., Carucci, A., Casalone, E., Mastromei, G. y Vitali, F. (2020). Impacts of Anthropogenic Pollutants on Benthic Prokaryotic Communities in Mediterranean Touristic Ports. *Frontiers in Microbiology*. 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01234>
- Thomas, T., Gilbert, J. y Meyer, F. (2012). Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation*. 2(1). <https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-3>
- Tolosa, I., De Mora, S., Sheikholeslami, M. R., Villeneuve, J. P., Bartocci, J. y Cattini, C. (2004). Aliphatic and aromatic hydrocarbons in coastal Caspian Sea sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 48(1–2), 44–60. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00255-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00255-8)
- Ul-Hasan, S., Bowers, R. M., Figueroa-Montiel, A., Licea-Navarro, A. F., Michael Beman, J., Woyke, T. y Nobile, C. J. (2019). Community ecology across bacteria, archaea and microbial eukaryotes in the sediment and seawater of coastal Puerto Nuevo, Baja California. *PLoS ONE*. 14(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212355>
- Valenzuela - Suárez, B. J. (2021). “Metales traza relacionados a actividades antropogénicas en sedimentos marinos superficiales y aguas residuales tratadas de la frontera Tijuana (B.C.) - California (E.U.A) a la Bahía Todos Santos, B.C., México.” Universidad Autónoma de Baja California. Tesis de Maestría.
- Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E. y Vargas-Albores, F. (2015). El Gen 16S ARNr en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias Marinas*. 41(4). 297–313. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>
- van Hoek, A. H. A. M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P. y Aarts, H. J. M. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: An overview. *Frontiers in Microbiology*. 2(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203>
- Walker, C. B., de La Torre, J. R., Klotz, M. G., Urakawa, H., Pinel, N., Arp, D. J., Brochier-Armanet, C., Chain, P. S. G., Chan, P. P., Gollabgir, A., Hemp, J., Hügler, M., Karr, E. A., Könneke, M., Shin, M., Lawton,

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

- T. J., Lowe, T., Martens-Habbena, W., Sayavedra-Soto, L. A., ... Stahl, D. A. (2010). *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(19). 8818–8823. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913533107>
- Wang, J. y Zhou, J. (2020). The effects of offshore petroleum exploitation on microbial community and antibiotic resistome of adjacent marine sediments. *Water Science and Technology*. 81(12). 2501–2510. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.289>
- Wang, Y., Sheng, H. F., He, Y., Wu, J. Y., Jiang, Y. X., Tam, N. F. Y. y Zhou, H. W. (2012). Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(23). 8264–8271. <https://doi.org/10.1128/AEM.01821-12>
- Willis, A. D. (2019). Rarefaction, alpha diversity, and statistics. *Frontiers in Microbiology*. 10(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02407>
- Wöhlbrand, L., Jacob, J. H., Kube, M., Musmann, M., Jarling, R., Beck, A., Amann, R., Wilkes, H., Reinhardt, R. y Rabus, R. (2013). Complete genome, catabolic sub-proteomes and key-metabolites of *Desulfobacula toluolica* Tol2, a marine, aromatic compound-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Environmental Microbiology*. 15(5). 1334–1355. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02885.x>
- Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., Gao, X., Li, F., Li, H. y Yu, H. (2018). Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis. *Frontiers in Microbiology*. 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02885>
- Yan, A., Guan, Z. y Raetz, C. R. H. (2007). An undecaprenyl phosphate-aminoarabinose flippase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 282(49). 36077–36089. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706172200>
- Yang, Y., Ok, Y. S., Kim, K. H., Kwon, E. E. y Tsang, Y. F. (2017). Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. *Science of the Total Environment*. 596–597. 303–320. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.102>
- Ye, Q., Wu, Y., Zhu, Z., Wang, X., Li, Z. y Zhang, J. (2016). Bacterial diversity in the surface sediments of the hypoxic zone near the Changjiang Estuary and in the East China Sea. *Microbiology Open*. 5(2). 323–339. <https://doi.org/10.1002/mbo3.330>
- Zandaryaa, S. y Frank-Kamenetsky, D. (2021). A source-to-sea approach to emerging pollutants in freshwater and oceans: pharmaceuticals in the Baltic Sea region. *Water International*. 46(2). 195–210. <https://doi.org/10.1080/02508060.2021.1889867>

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

- Zhang, J., Zhang, X., Hu, T., Xu, X., Zhao, D., Wang, X., Li, L., Yuan, X., Song, C. y Zhao, S. (2022). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and antibiotics in oil-contaminated aquaculture areas: Bioaccumulation, influencing factors, and human health risks. *Journal of Hazardous Materials*. 437. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129365>
- Zhang, Y., Lu, J., Wu, J., Wang, J. y Lin, Y. (2020). Occurrence and distribution of antibiotic resistance genes in sediments in a semi-enclosed continental shelf sea. *Science of the Total Environment*. 720. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137712>
- Zhong, H., Zhong, H., Lehtovirta-Morley, L., Liu, J., Liu, J., Zheng, Y., Lin, H., Song, D., Todd, J. D., Tian, J., Zhang, X. H., Zhang, X. H. y Zhang, X. H. (2020). Novel insights into the Thaumarchaeota in the deepest oceans: Their metabolism and potential adaptation mechanisms. *Microbiome*. 8(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00849-2>

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

Anexo

Anexo I. Combinaciones de los índices. En gris se muestran las combinaciones de cada estación.

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	
	16SK701R	16SK702R	16SK703R	16SK704R	16SK705R	16SK706R	16SK707R	16SK708R	16SK709R	16SK710R	16SK711R	16SK712R	16SK713R	16SK714R	16SK715R	16SK716R	16SK717R	
F1	16SK501F	1	12	23	34	45	56	67	78	89	100	111	122	133	144	155	166	177
F2	16SK502F	2	13	24	35	46	57	68	79	90	101	112	123	134	145	156	167	178
F3	16SK503F	3	14	25	36	47	58	69	80	91	102	113	124	135	146	157	168	179
F4	16SK504F	4	15	26	37	48	59	70	81	92	103	114	125	136	147	158	169	180
F5	16SK505F	5	16	27	38	49	60	71	82	93	104	115	126	137	148	159	170	181
F6	16SK506F	6	17	28	39	50	61	72	83	94	105	116	127	138	149	160	171	182
F7	16SK507F	7	18	29	40	51	62	73	84	95	106	117	128	139	150	161	172	183
F8	16SK508F	8	19	30	41	52	63	74	85	96	107	118	129	140	151	162	173	184
F9	16SK509F	9	20	31	42	53	64	75	86	97	108	119	130	141	152	163	174	185
F10	16SK510F	10	21	32	43	54	65	76	87	98	109	120	131	142	153	164	175	186
F11	16SK511F	11	22	33	44	55	66	77	88	99	110	121	132	143	154	165	176	187

Anexo II. Combinaciones de los índices de cada muestra de sedimento y el control “mock microbial community”.

Estación	Combinaciones de índices		
	Combinación	Forward	Reverse
B02	1	F1	R1
B04	11	F11	R1
B07	21	F10	R2
B08	25	F3	R3
B09	31	F9	R3
B10	34	F1	R4
B13	41	F8	R4
B14	47	F3	R5
B18	51	F7	R5
B26	55	F11	R5
B28	56	F1	R6
B44	64	F9	R6
B47	69	F3	R7
B53	73	F7	R7
B54	77	F11	R7
B56	85	F8	R8
B57	87	F10	R8
B62	89	F1	R9
B65	91	F3	R9
B66	107	F8	R10
B67	109	F10	R10
B68	111	F1	R11
B69	117	F7	R11
B70	121	F11	R11
B74	129	F8	R12
B78	131	F10	R12
B91	135	F3	R13
B93	141	F9	R13

Diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos de la costa noroeste de Baja California

B94	144	F1	R14
B98	150	F7	R14
E95	157	F3	R15
E96	164	F10	R15
E97	166	F1	R16
Control	176	F11	R16