

Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ciencias



TESIS

“PRESENCIA Y CUANTIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A CEFALEXINA (CTX), SULFAMETOXAZOL (*sul1*) Y DEL GEN ASOCIADO A LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (*pahE*) EN SEDIMENTOS MARINOS DE LA COSTA DE BAJA CALIFORNIA.”

Que para obtener el título de

Biólogo

Presenta

Jesús Tadeo Briseño Guerrero

Ensenada, B. C., mayo de 2024



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS,
CAMPUS ENSENADA.



**“PRESENCIA Y CUANTIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A CEFALEXINA (CTX),
SULFAMETOXAZOL (*sul1*) Y DEL GEN ASOCIADO A LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS
AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (*pahE*) EN SEDIMENTOS MARINOS DE LA COSTA DE BAJA
CALIFORNIA.”**

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Biólogo

PRESENTA

**Jesús Tadeo Briseño Guerrero
353776**

A quien el Comité de Tesis autoriza el trabajo terminal y de acuerdo con el
Art. 19 del R.G.E.P.E.P, emite los siguientes votos aprobatorios mediante rubrica:

Dra. Aseneth Herrera Martínez

SINODAL

Dra. Hortencia Silva Jimenez
DIRECTOR

Dr. Alejandro Sánchez
González
SINODAL

Dr. Manuel Alejandro Carballo
Amador
SINODAL

“Por la Realización Plena del Ser”

Resumen

Las costas juegan un papel muy importante al ser un sitio de transición entre el mar y la tierra, fungiendo como hábitat de una variedad de organismos. Dentro de esta biodiversidad se encuentra una alta riqueza taxonómica y variedad de cepas de bacterias, cuyas características aún se siguen estudiando. Para el humano, las costas son un punto de desarrollo socio-económico, ya que aquí se desarrollan actividades industriales, turísticas, recreativas y comerciales. Las actividades llevadas a cabo han contribuido a la urbanización de estas zonas, donde una de las consecuencias es el impacto ambiental derivado de la contaminación por residuos urbanos que terminan en el océano afectando a los organismos que viven ahí. Los avances tecnológicos han permitido hacer uso de los marcadores moleculares para detectar la presencia de genes funcionales en el ambiente y monitorear la salud de los cuerpos de agua al cuantificar los genes dentro de las bacterias que habitan la zona. En este trabajo se analizó el gen marcador relacionado a la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (*pahE*), al igual que dos genes marcadores relacionados a la resistencia a los antibióticos cefalexina (*CTX*) y sulfametoxazol (*sul1*) con el fin de detectar la presencia de comunidades bacterianas afectadas por el impacto antropogénico y proponer estos marcadores para el monitoreo del ambiente marino en la costa de Baja California. Los datos arrojados por los experimentos por PCR punto final demostraron la presencia de estos genes cerca de lugares urbanizados (como lo son la ciudad de Ensenada y Tijuana), comunidades donde los desechos no son propiamente procesados y, sorprendentemente, en el este de la isla Coronado, donde se presume que el tráfico marítimo y las corrientes marinas depositan los contaminantes en este lugar. Se encontró también una relación entre la presencia del gen *pahE* con respecto a los genes de resistencia a antibióticos *CTX* y *sul1*, explicada por la presión selectiva que los contaminantes aplican a las bacterias marinas. Este trabajo establece las bases para la estandarización y experimentación por PCR en tiempo real (qPCR) para la cuantificación de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en sedimentos marinos.

Palabras clave: Marcadores moleculares, cefalexina, sulfametoxazol, hidrocarburos, contaminación, PCR, qPCR, *pahE*, *sul1*, *CTX*.

Dedicatoria

A mis padres, Sandra y Raymundo, quienes siempre fueron los primeros en apoyarme en cada decisión, cada tropiezo y cada vez que me levantaba. Este trabajo no refleja solamente mi dedicación, sino la fe, la confianza y el esfuerzo que depositaron en mí. Esta tesis también es de ustedes.

A Carol, que a pesar de que no tuvimos el mejor principio o final, su presencia y ausencia en mi vida marcó una etapa que me ayudó a madurar, identificar quién era yo y trabajar en el desarrollo de mi mejor versión. No podemos cambiar los errores del pasado, pero sí podemos usarlos como combustible para mejorar como individuos. A ti, quien estuvo en las buenas y en las malas conmigo, quien me demostró todo su cariño, te dedico esta tesis.

A mí, porque a pesar de que me dejé caer muchas veces jamás perdí mi optimismo y pasión por lo que anhelaba. Lo que viví, sufrí y aprendí es solo lo primero de muchas cosas que me quedan por experimentar.

Agradecimientos

A la Dra. Hortencia Silva Jiménez, quien me abrió las puertas de su laboratorio y me otorgó su confianza para desarrollarme académicamente. Con ella aprendí lo que es realmente la investigación, las adversidades que se pueden presentar y cómo afrontarlas buscando nuevas soluciones con optimismo. En la vida caminaremos mucho, pero los primeros pasos son muy importantes. Siempre agradeceré que usted me ayudara a empezar a caminar.

A mis amigos, quienes siempre estuvieron pendientes de mi salud emocional y dispuestos a platicar conmigo para desahogarme. Quiero hacer mención especial a mis mejores amigos de Ensenada, José Luis e Iván, y a mis mejores amigos de Caborca, Bryant y Ramón. Nunca fui bueno para hacer verdaderos amigos, pero estoy feliz de haber conseguido hermanos en este caótico e intrigante camino que es la vida.

A Alejandra, por la retroalimentación, las pláticas y su apoyo moral y emocional incondicional hacia mi persona. Palabras faltan para demostrar lo agradecido que estoy de conocerte. Espero que la vida me siga permitiendo apoyarte como tú lo has hecho.

Al equipo de trabajo del laboratorio de Bacteriología Marina del Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Principalmente a la Dra. Cynthia Lizzeth Araujo Palomares y al Dr. Salvador Embarcadero Jiménez, quienes me acompañaron en el camino de la investigación y me compartieron de su sabiduría, conocimiento y experiencia. A través de estos conocimientos siempre me acompañará su esencia.

A cada una de mis amistades, compañeros y compañeras de laboratorio, quienes su sola presencia elimina la monotonía en el ambiente. Quiero agradecer en especial a Ileana y a Andrea, con quienes no solo compartí momentos divertidos, sino que me permitieron desahogarme y mostrarme vulnerable en mis momentos más difíciles.

A mis sinodales (la Dra. Aseneth Herrera Martínez, el Dr. Alejandro Sánchez González y el Dr. Manuel Alejandro Carballo Amador) y maestros, quienes aportaron su sabiduría y tiempo para la realización de esta tesis y mi realización personal y profesional. Quiero agradecer especialmente al Dr. Manuel Alejandro Carballo Amador, quien fue el primer investigador que me permitió trabajar con él y explorar mi pasión por la Biotecnología. Haré valer la confianza y el tiempo que invirtió en mí para convertirme en un biólogo excepcional.

Finalmente, se agradece enormemente el apoyo económico de la 22va convocatoria interna del Instituto de Investigaciones Oceanológicas “Estudio de la diversidad bacteriana y de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y la resistencia a antibióticos en la zona costera de Baja California”. Sin este, el trabajo plasmado en esta tesis nunca se hubiera podido realizar.

Contenido

1. Introducción.	1
1.1. Contaminantes prioritarios: El caso de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.	3
1.2. Contaminantes emergentes: El caso de los antibióticos.	5
1.3. Marcadores moleculares para el monitoreo de la presencia de contaminantes prioritarios y emergentes.....	8
2. Antecedentes.	11
3. Justificación.	13
4. Hipótesis.	13
5. Objetivos.	13
5.1. Objetivo general	13
5.2. Objetivos específicos.....	13
6. Metodología.	14
6.1. Medios de cultivo.....	14
6.2. Extracciones de ADN.....	14
6.3. PCR punto final.	15
6.4. PCR en tiempo real.	18
6.4.1. Construcción de vectores para la cuantificación de genes por qPCR.....	18
6.4.2. Protocolo para obtener células químicamente competentes.	19
6.4.3. Protocolo de transformación de células DH5α por choque térmico utilizando el vector pGEM-T.	19
6.4.4. Extracción de ADN plasmídico.	20
6.4.5. Comprobación de la inserción de los genes de interés en el plásmido pGEM-T.	20
6.4.6. Linealización de plásmidos obtenidos con los genes <i>sul1</i> , <i>CTX</i> , <i>pahE</i> y <i>16S rRNA</i>	21
6.4.7. Amplificación y purificación de los fragmentos génicos <i>16S rRNA</i> (1,465 pb) y <i>pahE</i> para uso en qPCR.	22
6.4.8. Cuantificación del gen <i>16S rRNA</i> y <i>pahE</i> utilizando PCR cuantitativa.	23
6.4.9. Cálculos para cuantificación del gen <i>16S rRNA</i> por cada gramo de sedimento.	24
7. Resultados.	25
7.1. Concentración y calidad de ADN ambiental extraído de las muestras de sedimento.	25
7.2. Amplificaciones por PCR punto final de los genes <i>CTX</i> , <i>sul1</i> y <i>pahE</i> en ADN ambiental de sitios.	27
7.3. Análisis de qPCR para el gen <i>16S rRNA</i>	32
7.4. Análisis de qPCR para el gen <i>pahE</i>	39

7.5. Análisis de qPCR para los genes de resistencia a antibióticos <i>sul1</i> y <i>CTX</i>	43
8. Discusión	44
8.1. Presencia de genes en la región Norte: Tijuana y norte de Playas de Rosarito.	44
8.2. Presencia de genes en la región Centro: Playas de Rosarito.	46
8.3. Presencia de genes en la región Sur: Ciudad de Ensenada.	47
8.4. Generalidades y relación entre la presencia del gen <i>pahE</i> y los genes de resistencia a antibióticos <i>sul1</i> y <i>CTX</i>	48
8.5. PCR tiempo real: adversidades encontradas y perspectivas.	49
9. Conclusiones	50
10. Referencias.....	51
11. Anexo.....	58

1. Introducción.

Albergando a la mitad de la población mundial y teniendo alrededor de 440,000 km de extensión, las costas son consideradas una zona crítica para el desarrollo humano (Davis Jr & FitzGerald, 2009). Estas juegan un papel muy importante al resguardar una amplia diversidad de seres vivos y una gran cantidad de recursos. Además, son una fuente de servicios ambientales y bienes que ayudan al desarrollo socioeconómico. Los recursos que se suelen obtener de estas zonas son materiales de construcción (arena, limo, rocas), petróleo, minerales y componentes celulares con aplicación biotecnológica, mientras que dentro de los servicios podemos hallar la protección contra tormentas y el almacenamiento y ciclo de nutrientes (Martínez et al., 2007). Desde la perspectiva económica, las costas sirven como sitio de actividades tales como la navegación, el turismo, los deportes acuáticos, entre otros (Gössling et al., 2018).

En las costas podemos encontrar una amplia diversidad de microorganismos con características de importancia ecológica y biotecnológica. De acuerdo con predicciones matemáticas y moleculares, se estima que el número de especies microbianas en nuestro planeta se encuentra alrededor de 10^{11} a 10^{12} (Locey & Lennon, 2016). En escala global, se ha predicho que la riqueza taxonómica, solamente de bacterias y arqueas, en sedimentos marinos es mayor a 3.07×10^6 (Hoshino et al., 2020). Lo anterior sugiere que hay especies microbianas que continúan sin identificarse o sin estudiarse a fondo.

Los microorganismos que habitan los ambientes marinos se encuentran constantemente expuestos a contaminantes que pueden influir tanto en su genotipo como en su fenotipo. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés) ha declarado a 126 sustancias como “prioritarias”, debido al riesgo nocivo que representan para la biodiversidad marina (USEPA, 2014). Dentro de las sustancias enlistadas por la USEPA se encuentran metales pesados, como el arsénico y el mercurio; insecticidas, como el dicloro fenil tricloroetano (DDT) y la endrina; e hidrocarburos aromáticos policíclicos, tales como el pireno y el tolueno. En otros lugares como Europa (Council of the European Union, 2013) y China (Ministry of Ecology and Environment of the People’s Republic of China, 2017) también se han declarado como de alta prioridad los contaminantes antes mencionados y aquellos derivados de los mismos.

Otros contaminantes tienen efectos a mediano y largo plazo, por lo que no representan un riesgo inmediato para la salud de la red trófica del lugar y del humano, ya que hasta tiempo después de su presencia en el ambiente se observan los efectos negativos en diferentes individuos o en una población. Tales sustancias, que suelen no estar reguladas al momento de su desecho pero que de igual manera se descubre su efecto nocivo a un nivel ecológico, se consideran “contaminantes emergentes” (Daughton, 2004). Algunos ejemplos de estos contaminantes son los disruptores endocrinos derivados de productos de cuidado personal, los cuales ingresan al medio acuático por

medio de descargas de agua e interfieren con la síntesis de hormonas en animales y humanos alterando los procesos bioquímicos (Diamanti-Kandarakis et al., 2009); y los microplásticos, que causan cambios en el comportamiento, metabolismo, reducen la fertilidad y causan muerte temprana en organismos vivos (Yin et al., 2018). Otro grupo de contaminantes de este tipo que ha tomado relevancia por su efecto son los antibióticos, los cuales pueden ocasionar que algunas bacterias adquieran genes de resistencia a estos compuestos (Souza & Féris, 2016).

Actualmente, la Unión Europea y Estados Unidos tienen programas y leyes que regulan y supervisan a los contaminantes emergentes y a las nuevas sustancias que entran a esta clasificación. Sin embargo, en lugares como Latinoamérica las regulaciones son laxas y las investigaciones son escasas, por lo que el riesgo de afectar a la población o a la biodiversidad en estas regiones aumenta (Vargas-Berrones et al., 2020).

1.1. Contaminantes prioritarios: El caso de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

La contaminación por el petróleo y sus derivados es un problema que se ha vuelto más persistente especialmente en los ecosistemas marinos (Bhattacharjee & Dutta, 2022). El petróleo varía en su composición presentando principalmente hidrocarburos (del 50% al 98% de cadena lineal, acíclicos o compuestos aromáticos) y en muy bajas concentraciones, elementos y compuestos a base de oxígeno, nitrógeno, hierro, vanadio, azufre, entre otros (Botello, 2005; Castro & Vázquez 2009).

Los hidrocarburos son compuestos altamente contaminantes, y dentro de estos destacan los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Los HAPs son compuestos hidrocarbonados formados con 2 o más anillos de benceno fusionados, formando diferentes configuraciones que les otorgan una variedad de características fisicoquímicas y toxicológicas (Lawal, 2017). Estos hidrocarburos tienen mayor hidrofobicidad y menor solubilidad que los hidrocarburos lineales o acíclicos, favoreciendo una mayor adsorción a las partículas que forman parte del suelo y sedimentos. Lo anterior hace que los HAPs persistan en el ambiente afectando la salud y supervivencia de la biodiversidad de la zona en que se encuentran (Blanchard et al., 2004; Patel et al., 2020).

Los HAPs pueden clasificarse como de origen antropogénico o natural. El primero ocurre principalmente con la quema de combustibles fósiles, carbón, madera y durante los derrames de petróleo provocados o accidentales que pueden ocurrir durante su extracción, transporte y consumo (Wait et al., 2020). El origen de los segundos, se da por emanaciones naturales del petróleo en forma de chapopoterías y por actividad volcánica (Abdel-Shafy & Mansour, 2016).

Otro sistema de clasificación considera que los HAPs pueden tener origen pirogénico (combustión imparcial), petrogénico (derrame de petróleo por algún fenómeno geológico o provocado por el ser humano) y diagénico (derivado de algún proceso donde participan seres vivos) (Mastandrea et al., 2005; Sanders et al., 2002). En esta última clasificación podemos mencionar como ejemplo el reteno (metil-isopropil fenantreno) que se deriva del ácido abiético diterpenoide presente en resinas de árboles, cuya transformación es mediada por actividad microbiana (Neira et al., 2017).

En un derrame en el océano, los hidrocarburos, incluyendo los HAPs, pueden encontrarse suspendidos por diferencia de densidad por lo que actúan bloqueando el intercambio de gases y de luz afectando negativamente a los organismos que dependen de estos procesos, convirtiendo a estos compuestos en contaminantes prioritarios (Fig. 1) (Ordoñez-Burbano et al., 2018).

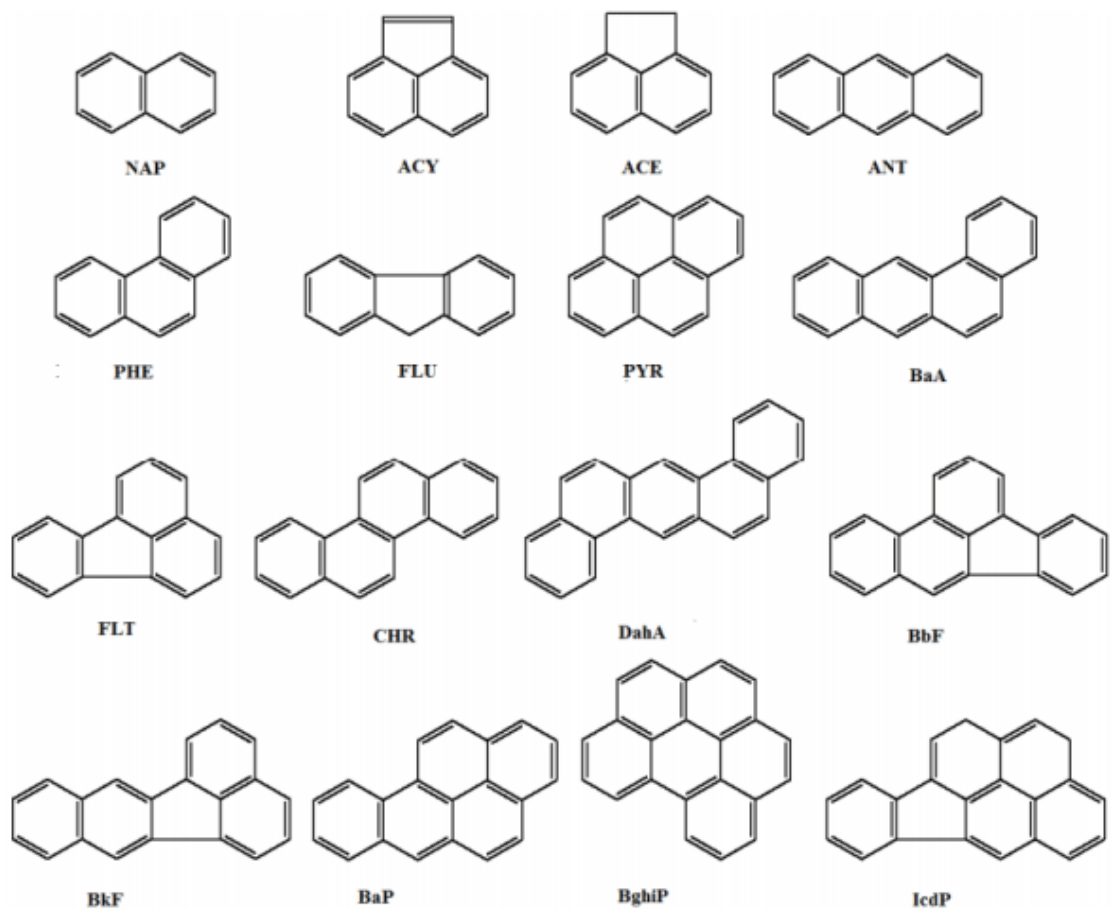


Figura 1. Los 16 Hidrocarburos aromáticos policíclicos de importancia ambiental señalados por la EPA (Environmental Protection Agency): Naftaleno (NAP); acenaftaleno (ACY); acenafteno (ACE); antraceno (ANT); fenantreno (PHE); fluoreno (FLU); pireno (PYR); 1,2-benzantraceno (BaA); fluoranteno (FLT); criseno (CHR); dibenzo (*a,h*) antraceno (DahA); benzo (*b*) fluoranteno (BbF); benzo (*k*) fluoranteno (BkF); benzo (*a*) pireno (BaP); benzo (*g,h,i*) perileno (BghiP); e indeno (1,2,3-*c,d*) pireno (IcdP) (tomado de Yang et al., 2019).

1.2. Contaminantes emergentes: El caso de los antibióticos.

A pesar de no ser un contaminante de prioridad como los hidrocarburos, los antibióticos se encuentran dentro de la clasificación de “contaminante emergente”, ya que su incorrecto desecho hace que estos terminen disueltos en el suelo y el océano generando presión selectiva en bacterias que adquieren resistencia a antibióticos (Kumari et al., 2022; Kumar et al., 2020). Sumado a lo anterior, concentraciones variadas de antibióticos pueden provocar efectos tóxicos e, incluso, mortales en organismos marinos.

La resistencia a los antibióticos es un tema que ha tomado relevancia con el paso de las décadas debido al riesgo que representa para la humanidad (Podolsky, 2018). Existen bacterias como *Pseudomonas* spp. o *Variovorax* spp. que presentan “super resistencia” al poseer más de un mecanismo de defensa contra distintos antibióticos (Zhang et al., 2015). Otra bacteria que también representa un riesgo clínico grave es la denominada MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*), la cual ocasiona enfermedades que no pueden ser tratadas debido a su continua evolución contra diversos tipos de antibióticos (Enright et al., 2002). Algunos de los grupos de antibióticos que las bacterias han presentado resistencia son las cefalosporinas (Arizpe et al., 2016) y las sulfonamidas (Sköld, 2000).

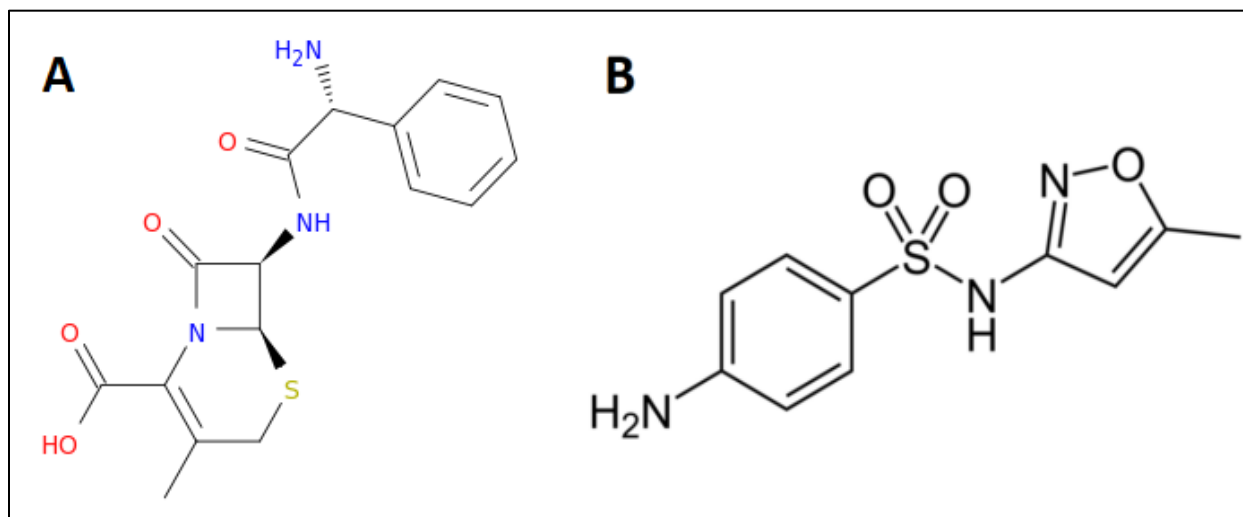


Figura 2. Estructuras químicas de la cefalexina (A) y el sulfametoxazol (B). A: La estructura de la cefalexina (C₁₆H₁₇N₃O₄S) consiste en un anillo β-lactámico y un anillo dihidrotiazínico formado por 6 átomos. B: El sulfametoxazol (C₁₀H₁₁N₃O₃S) posee un anillo adicional de oxazol, un grupo aromático y una unión de un átomo de azufre doblemente ligado a oxígeno y unidos a un grupo amino (National Center for Biotechnology Information, 2022a; National Center for Biotechnology Information, 2022b).

Dentro de las cefalosporinas podemos encontrar la cefalexina (Fig. 2A), un antibiótico de primera generación de origen fúngico, que actúa inhibiendo a la transpeptidasa e interfiriendo con el crecimiento de la pared celular de las bacterias con su anillo β-lactámico que inhibe la síntesis de peptidoglicano (Fig. 3) (Pandey & Cascella, 2021:

Wang et al., 2019). Este medicamento suele ser utilizado para tratar enfermedades como neumonía, infecciones en la piel, meningitis y bacteriemia (Marshall & Blair, 1999).

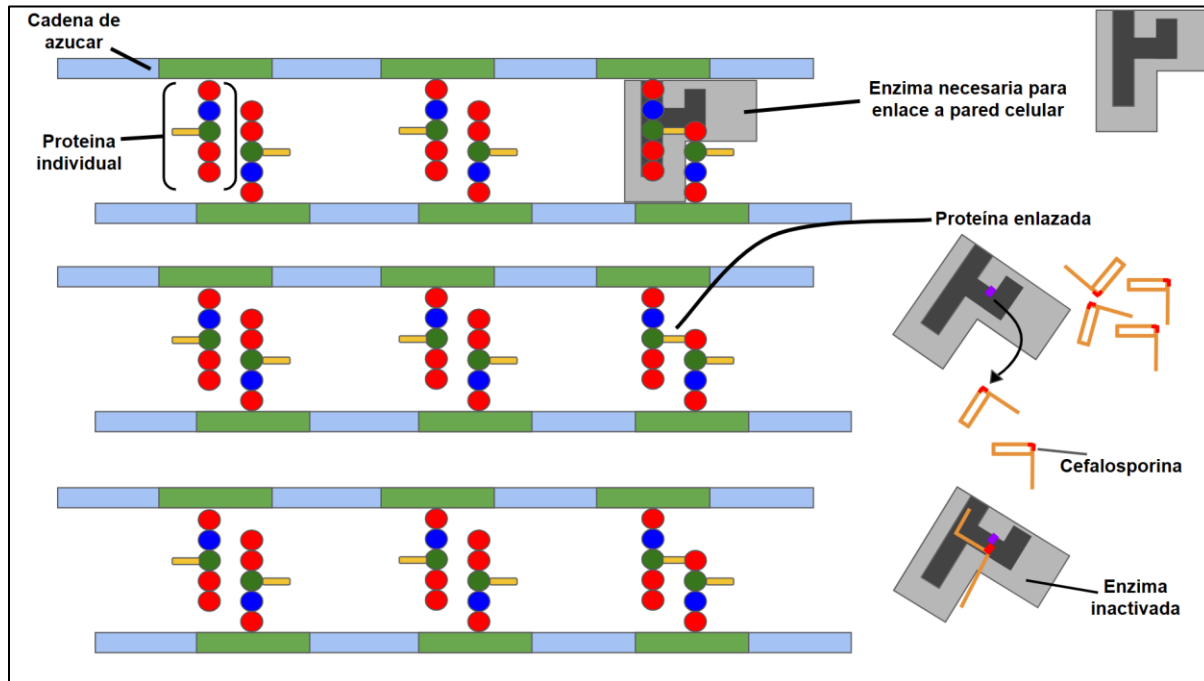


Figura 3. Mecanismo de acción de las cefalosporinas sobre las proteínas de la pared celular (modificado de Shahbaz, 2017). En el diagrama se observa cómo la cefalosporina inactiva a la enzima encargada de formar los enlaces en la pared celular al unirse en el sitio de anclaje.

Las sulfonamidas, al igual que sus derivados (sulfamidas y sulfamatos), tienen una fórmula del tipo $A-SO_2NHR$, donde el grupo A se puede enlazar a un compuesto aromático, heterocíclico, alifático o azúcar y el grupo R puede enlazarse al hidrógeno de una sustancia como las anteriores, permitiendo una amplia cantidad de variaciones (Supuran, 2017). Dentro de las sulfonamidas encontramos al sulfametoxazol (Fig. 2B), que suele ser utilizado como agente bacteriostático y actúa de manera similar a los otros miembros de las sulfonamidas (Richards et al., 1996). Este antibiótico actúa por interferencia en la biosíntesis del ácido tetrahidrofólico por inhibición competitiva debido a que su estructura es similar al ácido P-aminobenzoico (PABA), precursor para la síntesis de ácido dihidrofólico (Lüllmann et al., 2000). Al combinar el sulfametoxazol con trimetoprima, estos adquieren el estatus de bactericida (Fig. 4), ya que esta última inhibe a la enzima dihidrofolato reductasa, impidiendo totalmente la síntesis de folato, el cual es un proceso necesario para la formación de timidina y purinas, fundamentales para la síntesis del ADN (Kielhofner, 1990). Este medicamento suele recetarse principalmente para infecciones urinarias, aunque también se ha usado en el tratamiento de neumocistosis, shigelosis y otitis media causada por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Gleckman et al., 1979; van der Veen et al., 2007).

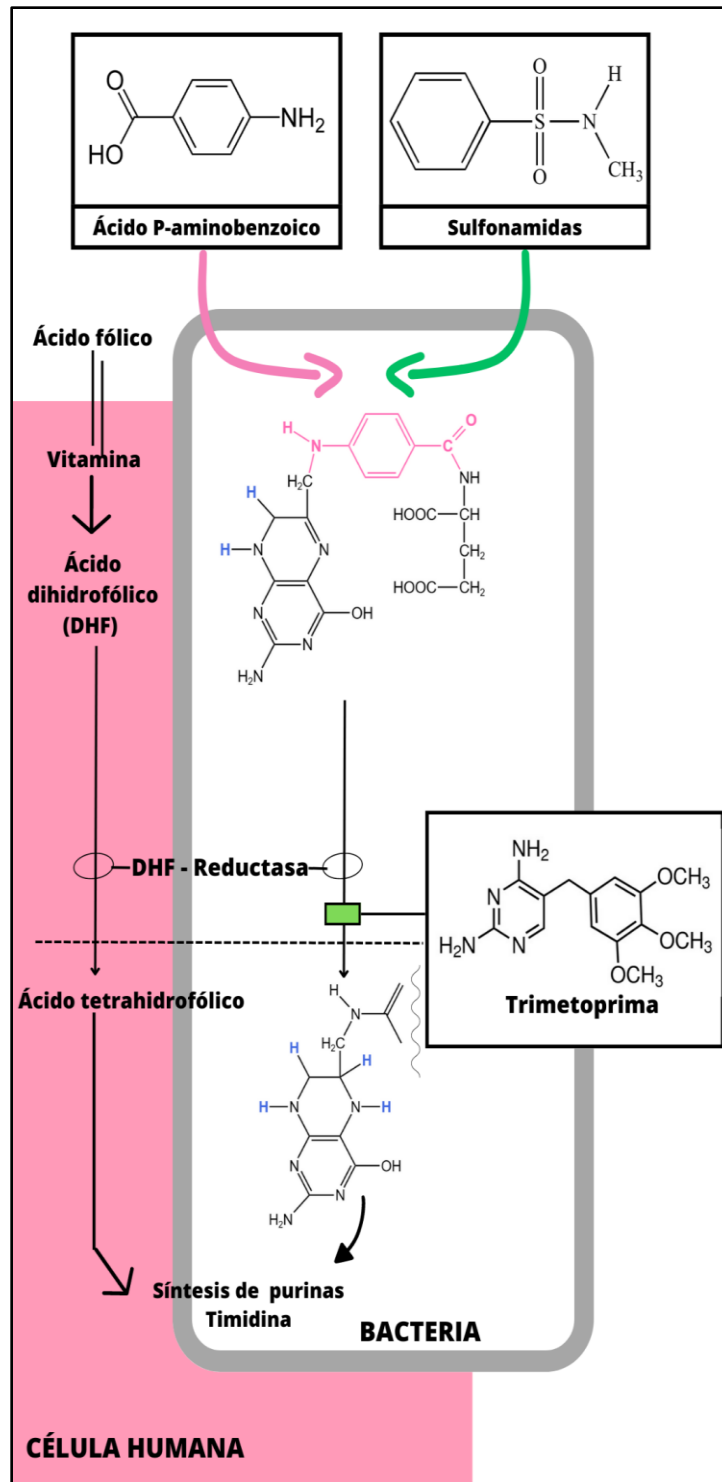


Figura 4. Mecanismo de acción general del sulfametoxazol y la trimetoprima en una célula bacteriana. En el diagrama se observa cómo un miembro del grupo sulfonamida puede interferir en la síntesis de la dihidrofolato reductasa al inhibir por competencia al ácido P-aminobenzoico. Por otro lado, la trimetoprima inhibe la acción de la dihidrofolato reductasa ya existente. El uso de ambos medicamentos impide producir ácido tetrahidrofólico, el cual es una coenzima necesaria para la síntesis de purinas y timidina, compuestos necesarios para el crecimiento y la replicación celular de las bacterias (modificado de Lüllmann et al., 2000).

1.3. Marcadores moleculares para el monitoreo de la presencia de contaminantes prioritarios y emergentes.

Las actividades llevadas a cabo en las costas han contribuido a su urbanización, donde una de las consecuencias es el impacto ambiental derivado de la contaminación con residuos urbanos que terminan en el océano, afectando a los organismos que viven ahí. Los avances tecnológicos han permitido hacer uso de marcadores moleculares de microorganismos propios del ambiente como indicadores de contaminación por diversos compuestos orgánicos tóxicos y emergentes (por ejemplo, hidrocarburos y antibióticos) (Gillings et al., 2015; Chen et al., 2019; Knapik et al., 2019).

La existencia de marcadores moleculares bacterianos relacionados a la degradación de hidrocarburos ya ha sido reportada anteriormente (Sengupta & Pal, 2021). Estos marcadores representan una alternativa rápida para la búsqueda e identificación de bacterias candidatas para el control de este tipo de contaminantes. Además, estos marcadores moleculares se pueden utilizar para el monitoreo de la contaminación por hidrocarburos. Uno de los marcadores moleculares más populares y utilizados es el gen *alkB*, ya que se conserva en bacterias aeróbicas degradadoras de petróleo y se le han descubierto más de 250 homólogos en una variedad de especies de bacteria de distintos ambientes (Viggor et al., 2013).

Recientemente ha tomado importancia científica el gen *pahE* que codifica para la enzima trans-o-hidroxi-bencilideno piruvato aldolasa hidratasa relacionada con la ruta de degradación de HAPs. El gen *pahE* se ha propuesto como un marcador molecular novedoso para la detección de un gran número de grupos bacterianos que forman parte de las comunidades microbianas degradadoras de HAPs (Fig. 5) (Liang et al., 2019).

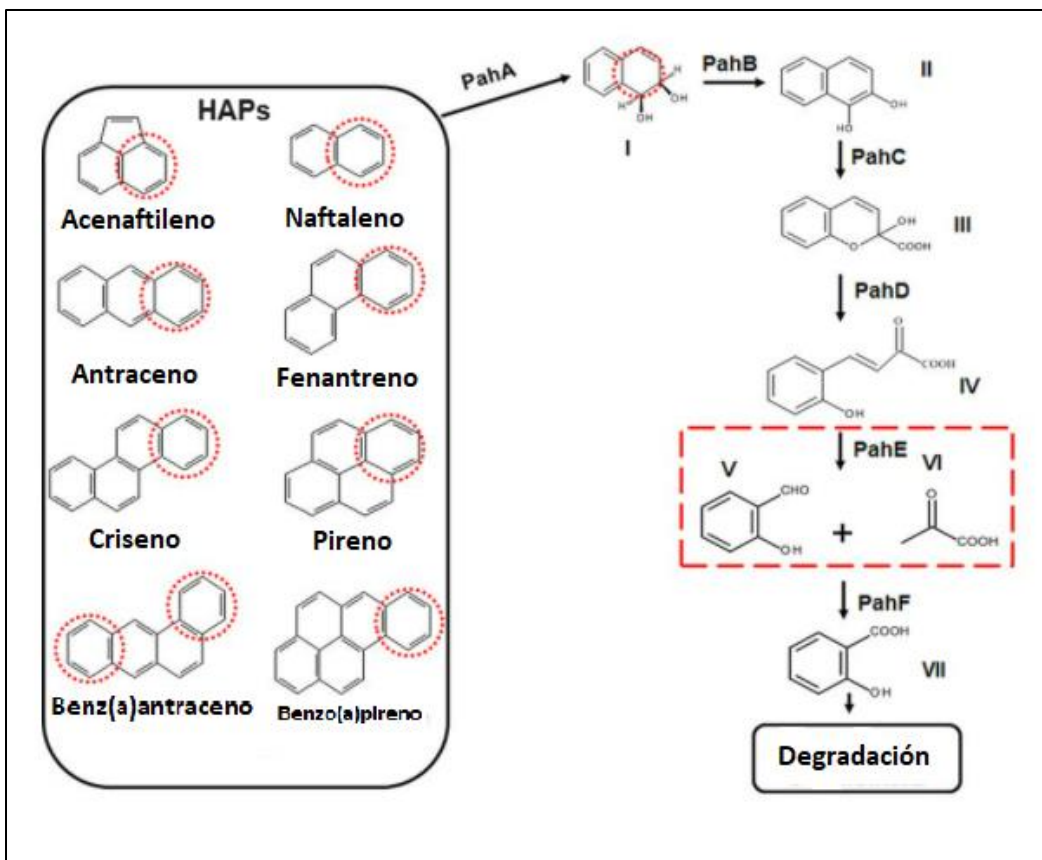


Figura 5. Enzimas relacionadas a la degradación de los HAPs. En este caso se usa al naftaleno para ejemplificar la ruta metabólica para la degradación del compuesto donde actúan las enzimas naftaleno dioxigenasa (*pahA*) para obtener cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno (I); cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno deshidrogenasa (*pahB*) que actúa sobre la molécula de 1,2-dihidroxinaftaleno (II); 1,2-dihidroxinaftaleno dioxigenasa (*pahC*) que ayuda a formar 2-hidroxi-4-(2'-oxo-3,5-ciclohexadienil)-buta-2,4-dienoato (III); 2-hidroxicromeno-2-carboxilato isomerasa (*pahD*) que forma a trans-o-hidroxi-bencilideno-piruvato (IV); trans-o-hidroxi-bencilideno piruvato aldolasa hidratasa (*pahE*) que cataliza la ruptura del sustrato en dos moléculas: salicilaldehído (V) y piruvato (VI); y salicilaldehído deshidrogenasa (*pahF*), que forma un salicilato (VII) (modificado de Liang et al., 2019).

Por otro lado, existen genes de resistencia a antibióticos que también han sido utilizados como marcadores moleculares para el monitoreo de contaminación ambiental por antibióticos y bacterias resistentes a estos medicamentos (Ondon et al., 2021). Como ejemplos de estos tipos de genes tenemos al gen *CTX*, que confiere resistencia al antibiótico cefalexina; y al gen *sul1*, que permite a las bacterias resistir al antibiótico sulfametoxazol.

El gen *CTX* codifica para una variante de la β -lactamasa de espectro extendido de clase A (ESBL, por sus siglas en inglés) denominada cefotaximasa de Munich (Farshadzadeh et al., 2014), la cual hidroliza el anillo β -lactámico de la cefalexina, impidiendo que este afecte a la pared celular bacteriana (Jawad et al., 2020).

El gen *sul1* es uno de cuatro genes (*sul2*, *sul3* y *sul4*) que codifica para una variante de la dihidropteroato sintetasa que es altamente resistente a antibióticos del grupo de las

sulfonamidas, impidiendo que el antibiótico inhiba los procesos de síntesis de timidina (Antunes, 2005). Este tipo de genes comúnmente se adquieren a través de plásmidos que contienen regiones denominados “integrónes”, los cuales suelen venir en colecciones de genes que otorgan beneficios a las bacterias, siendo un ejemplo la resistencia a antibióticos (Alekhun & Levy, 2007). En la figura 6 se puede observar el casete correspondiente al integrón 1 (*int1*), el cual trae consigo en el marco de lectura al gen *sul1*.

La transferencia horizontal de genes mediada por plásmidos, elementos móviles o por transformación bacteriana en la naturaleza, se ha convertido en un gran problema que acelera la aparición de nuevas cepas bacterianas resistentes a múltiples antibióticos, lo que se ha convertido en un serio problema de salud mundial que obliga a hacer uso racional de los agentes antimicrobianos (Garza-Ramos et al., 2009).

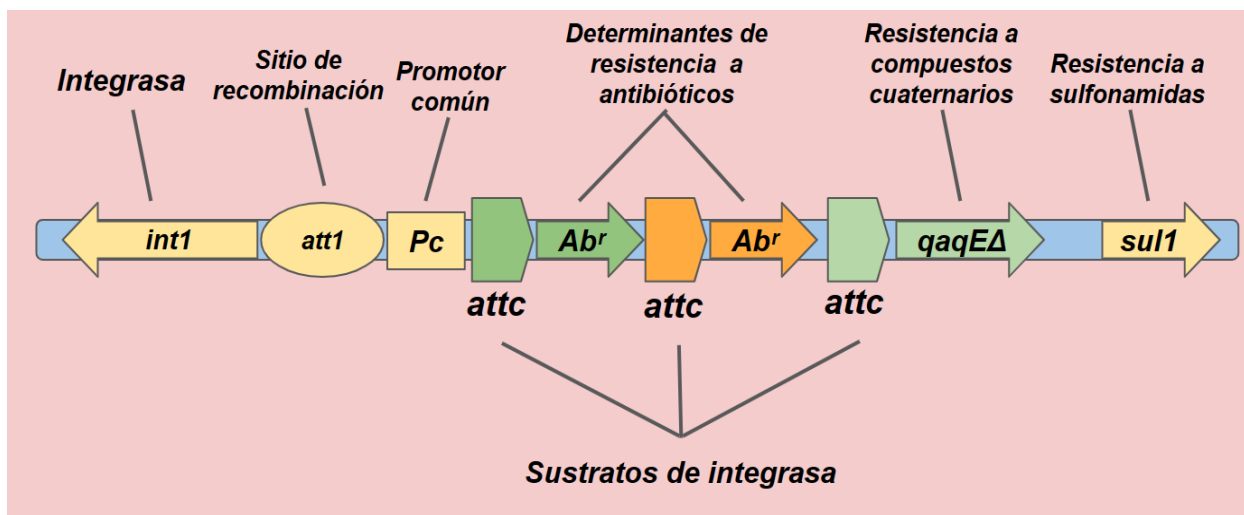


Figura 6. Casete de genes del integrón 1. En este casete viene una colección de genes que pueden otorgar resistencia a antibióticos, entre ellos *sul1*, que ofrece resistencia contra las sulfonamidas (modificado de Alekhun & Levy, 2007).

2. Antecedentes.

Mundialmente ocurren problemas de contaminación con hidrocarburos y México no es una excepción. Uno de los eventos más conocidos y catastróficos fue el derrame que sucedió en el Golfo de México en el año 2010 por el Deepwater Horizon de la compañía British Petroleum (Ingersoll et al., 2012). Las costas de Baja California también han sido afectadas con problemas de contaminación por hidrocarburos. En el siglo pasado se registraron varios eventos de derrames de petróleo en las costas de Baja California, como el varamiento del “Tampico Maru” en 1957 y el barco “Plan de Ayala” en 1971 que liberaron hasta 60,000 barriles de crudo cada uno (Peynador & Escofet, 2009).

En sedimentos marinos de la Bahía de Todos Santos, B. C. se detectaron concentraciones altas de pireno, fluoranteno e indeno (1,2,3-*cd*) pireno (>100 ng/g), así como bajas concentraciones de otros HAPs de importancia ambiental (Macias-Zamora et al., 2002). Otros problemas sobre contaminación que se han encontrado en la costa es la presencia de metales pesados como cadmio, plomo y zinc (Villaescusa-Celaya et al., 2000), cantidades variadas de microplásticos (Ramírez-Álvarez et al., 2020), así como una alta concentración de coliformes totales y fecales (Orozco-Borbón et al., 2006; Tanahara et al., 2021).

Respecto a la contaminación por antibióticos y detección de genes de resistencia a antibióticos en el ecosistema marino de Baja California la información es escasa. Solo dos estudios relacionados con la resistencia a antibióticos han sido reportados. En uno de ellos analizaron sedimentos del río Tijuana, obteniendo resultados positivos para los genes relacionados a la resistencia a quinolonas (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA* y *aac(6')-Ib-cr*) (Cummins et al., 2011). El otro estudio se enfocó en detectar genes de resistencia a antibióticos, tales como ampicilina, cefoxitina, trimetoprim/sulfametoxazol en heces de lobo marino (*Zalophus californianus*) (Ávalos-Téllez et al., 2017). A pesar de los estudios anteriores, actualmente no existen trabajos que analicen la presencia de antibióticos o la resistencia a estos en sedimentos marinos en la costa occidental de Baja California, así como el uso de genes como marcadores moleculares para monitoreo de la salud ambiental de la zona.

Según la información obtenida por CONAGUA (2021), se estima que en México solo se ha logrado el correcto tratamiento de aguas residuales municipales del 67.5% del país, por lo que muchas de las aguas sin tratar se desechan a los cuerpos de agua llevando todo tipo de contaminantes que afectan de forma directa o indirecta a los organismos acuáticos.

Por otra parte, existen registros de la presencia de diversos géneros de bacterias con genes degradadores de hidrocarburos aromáticos policíclicos alrededor del mundo, como es el caso de *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Rhodococcus* spp., entre muchos otros (Molina et al., 2009). Estos organismos abren la posibilidad de su uso biotecnológico en zonas afectadas por estos contaminantes con el

fin de reducir su daño. En la costa de Baja California han sido aislados microorganismos con la capacidad de degradar hidrocarburos, teniendo reportados varias cepas del género *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Paracoccus* y *Pseudomonas* (Silva-Jiménez et al., 2018). En varios de estos aislados bacterianos se detectó la presencia de *pahE*, el marcador molecular relacionado con la degradación de HAPs. Lo anterior nos da indicios de que en la costa de Baja California podríamos monitorear la presencia de comunidades hidrocarbonoclastas hacia HAPs con el empleo del marcador *pahE*.

Sabiendo el gran problema que es la contaminación por hidrocarburos y el riesgo que presentan los contaminantes emergentes como los antibióticos, en esta tesis se detectarán y cuantificarán los genes de resistencia a sulfametoxazol (*sul1*) y cefalexina (CTX), al igual que al gen que codifica a la aldolasa hidratasa involucrada en la degradación de HAPs (*pahE*) en muestras de sedimentos marinos provenientes de distintos sitios de la Costa de Baja California.

3. Justificación.

Los marcadores moleculares son una herramienta que ofrecen un potencial uso tanto para monitoreo de la salud ambiental marina a gran escala como para un rápido análisis de diversidad microbiana en un sitio. El monitorear la salud ambiental del ecosistema marino permitiría a los encargados de la toma de decisiones percatarse de la magnitud del problema en cada sitio y así desarrollar mejores estrategias para el cuidado ambiental. El análisis de genes como *pahE* permitiría extender el aprovechamiento de cepas bacterianas con capacidad de biorremediar zonas afectadas por HAPs.

4. Hipótesis.

Se encontrarán genes de resistencia a antibióticos en las muestras de sedimento a analizar, especialmente cerca de las zonas de descarga de aguas residuales, al igual que se encontrarán genes de degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en lugares con alta actividad antropogénica.

5. Objetivos.

5.1. Objetivo general

Evaluar la presencia de genes marcadores asociados a la degradación de hidrocarburos y a la resistencia a antibióticos en la Costa de Baja California (CBC).

5.2. Objetivos específicos.

- 1.- Detectar los genes marcadores funcionales relacionados con la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (*pahE*) y de resistencia a antibióticos (*sul1* y *CTX*) de importancia clínica en los sedimentos marinos de la CBC.
- 2.- Cuantificar el número de genes marcadores *sul1*, *CTX* y *pahE* en muestras de sedimentos marinos de la CBC.
- 3.- Correlacionar el número de genes marcadores presentes en los sedimentos marinos de la CBC con las actividades antropogénicas que se realizan en la costa.

6. Metodología.

6.1. Medios de cultivo.

El medio Luria-Bertani (LB) se preparó en agua destilada con 1% (*p/v*) de peptona, 0.5% (*p/v*) de extracto de levadura, 1% (*p/v*) de NaCl. Para el medio sólido, se le agregaron 1.5% (*p/v*) de agar. El pH del medio se ajustó a 7.2 ± 0.2 con NaOH 5 M. El medio se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 libras de presión por 15 minutos.

6.2. Extracciones de ADN.

Para realizar los análisis con los marcadores moleculares (*pahE*, *sul1* y *CTX*) se realizaron extracciones de ADN ambiental de 34 muestras de sedimento marino correspondientes a los sitios de recolección de la expedición oceanográfica Bight de 2018 (Fig. 7). Las extracciones de ADN ambiental se realizaron utilizando el kit DNeasy PowerClean Pro Cleanup Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del proveedor con algunas modificaciones (Ver Anexo 1).

Como controles positivos para los ensayos de PCR punto final, se utilizó el ADN genómico de la cepa *Escherichia coli* FSEC66 (donada amablemente por la Dra. Ninfa Ramírez Durán, UAEMex) con multirresistencia a cefalexina y sulfametoxazol, extraído con el método CTAB (Ver Anexo 2). Para el gen *pahE*, se usó el ADN ambiental extraído de una muestra de sedimento del sitio conocido como “Monoboya” (con registro previo de poseer comunidades bacterianas degradadoras de HAPs), ubicado en las costas del Puerto de Rosarito, B.C. (Silva-Jiménez et al., 2018) utilizando el kit antes mencionado.

La cuantificación y determinación de pureza del ADN se realizó en un espectrofotómetro NanoDrop Lite (ThermoFisher). La integridad del ADN se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% (*p/v*). Para ello, 2 μL de ADN mezclados con 0.5 μL de buffer de carga y 0.1 μL del agente fluorescente intercalante SYBR Gold (Invitrogen) fueron cargados en un gel de agarosa al 1% (*p/v*). Las diferentes electroforesis se desarrollaron durante 45 minutos a 80 V y al final los geles fueron visualizados con los transiluminadores BIO-RAD Uview Mini o Accuris E4000 - Smartblue.

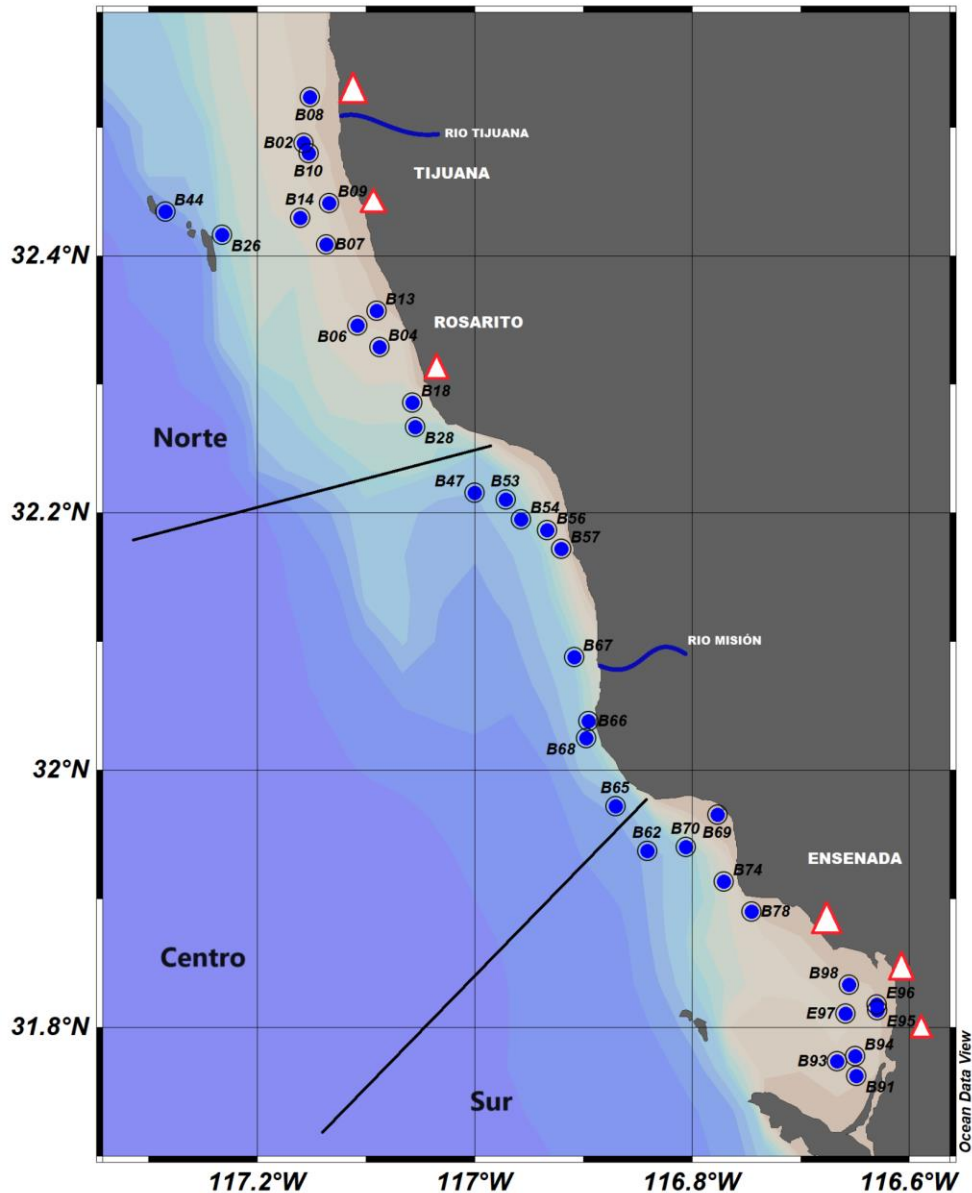


Figura 7. Mapa de los sitios de colecta de sedimentos a analizar. Las muestras de sedimento marino fueron tomadas a lo largo de la costa, desde Tijuana hasta el Estero Punta Banda en Ensenada. Los sitios fueron divididos en tres regiones: norte, que abarcó 13 muestras de sitio; centro, con 9 muestras; y sur con 8. Los puntos azules muestran los sitios de recolección de las muestras de sedimento marino. Los triángulos blancos con contorno rojo representan las plantas de tratamiento de aguas residuales. Los ríos se observan como curvas azules que desembocan en el mar. En fuente color blanco se describen las localidades como referencia del mapa. Las localidades de referencia a los sitios y su profundidad de toma de muestra pueden consultarse en el anexo 4.

6.3. PCR punto final.

Para el análisis de genes funcionales por PCR punto final se usó un termociclador BIORAD modelo T-100. La información de los oligonucleótidos para los fragmentos génicos a analizar, al igual que sus referencias, se encuentran en la tabla 1.

Tabla 1. Descripción de los oligonucleótidos utilizados en las pruebas de PCR punto final y qPCR.

Gen	Producto del gen	Oligonucleótidos	Secuencia (en sentido 5´-3´)	Tamaño de fragmento (pares de bases)	Referencias
<i>pahE</i>	<i>trans</i> - <i>o</i> -hidroxi-bencilideno piruvato aldolasa	pahE-F	TGCGGCGGGTGTNAAAYGGNAT	377 pb	Liang et al., 2019
		pahE-R	CCTGAGGAATCTCGGACATYTSTGCCARAA		
<i>sul1</i>	Dihidropteroato sintasa	sul1-F	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC	162 pb	Lu et al., 2019
		sul1-R	TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG		
CTX	β-Lactamasa	CTX-F	ACCAACGATATCGCGGTGAT	101 pb	Guo et al., 2018.
		CTX-R	ACATCGCGACGGCTTTCT		

En el caso del gen *pahE*, las condiciones iniciales de PCR fueron 94°C de desnaturalización por 5 minutos, 94°C por 30 segundos de desnaturalización, 56°C de alineamiento por 45 segundos y 72°C de extensión por 30 segundos, repitiendo estos tres últimos pasos por 35 ciclos, con una temperatura de 75°C de extensión final de 10 minutos. Posteriormente se optimizaron las condiciones y concentraciones de la PCR para el gen *pahE*, cambiando la temperatura de alineamiento a 60°C.

Para el gen *sul1* se inició con una desnaturalización de 95°C por 5 minutos, luego 35 ciclos de desnaturalización de 95°C por 1 minuto, seguido de una fase de alineamiento a 57°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 1 minuto. Al final se realizó una extensión por 10 minutos a 72°C.

La amplificación del gen *CTX* se inició con una desnaturalización de 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión a 94°C por 1 minuto, 60°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, respectivamente. Al final se aplicó un paso de extensión a 72°C por 6 minutos.

La mezcla para las reacciones de PCR se preparó tomando como base los datos de la tabla 2. Para el gen *CTX*, la concentración final para el par de oligonucleótidos fue de 200 nM cada uno, mientras que en *sul1*, la concentración fue de 110 nM para ambos. Para el gen *pahE* se utilizó una concentración de 2 µM para ambos oligonucleótidos.

Tabla 2. Mezcla de reacción base para las amplificaciones de los fragmentos génicos por PCR punto final.

REACTIVOS*	Volumen para cada gen (en microlitros)		
	<i>pahE</i>	<i>CTX</i>	<i>sul1</i>
H ₂ O grado HPLC	2.25 µL	5.85 µL	6.03 µL
5x buffer Gotaq Flexi (invitrogen)	2 µL	2 µL	2 µL
MgCl ₂ 25mM	1 µL	1 µL	1 µL
dNTPs 10mM	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL
Oligonucleótido Forward 10 µM	2 µL	0.2 µL	0.11 µL
Oligonucleótido Reverse 10 µM	2 µL	0.2 µL	0.11 µL
ADN muestra (10 ng/µL)	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
Gotaq polimerasa 5 U/µL (invitrogen)	0.05 µL	0.05 µL	0.05 µL
<u>Volumen final de reacción</u>	10 µL	10 µL	10 µL

*: Las concentraciones descritas en los reactivos corresponden a la concentración de la solución stock.

Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1.5% (fragmento *pahE*) y 2% (fragmentos *sul1* y *CTX*) sometidos a electroforesis a 80 V, 200 mA, por 50 minutos. Para cargar las muestras en el gel fue necesario mezclar cada producto amplificado con 0.5 µL de SYBR Gold (Invitrogen) para su visualización asistida con una cámara de luz ultravioleta, además de agregar el uso de marcadores de talla molecular (conocidos también como “escaleras”) de ADN. En el caso de *pahE* se utilizó una escalera de 1 Kb (PROMEGA). Para los genes *sul1* y *CTX* se usó una escalera de 50 pb – 1,500 pb (Bio-Helix).

6.4. PCR en tiempo real.

6.4.1. Construcción de vectores para la cuantificación de genes por qPCR.

Para poder realizar los ensayos de qPCR, fue necesario construir plásmidos que funcionarían como controles positivos que contengan los fragmentos del gen *16S rRNA*, *pahE*, *CTX* o *sul1*, y con ellos preparar las diluciones con diferentes cantidades de número de copias por microlitro y realizar la cuantificación de los genes en las muestras de ADN ambiental.

En el caso del gen *16S rRNA* se optó por utilizar un fragmento de 194 pb, proveniente del ADN de la cepa *Rhodococcus ruber* MSA14 y se emplearon los oligonucleótidos Forward 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' y Reverse 5'-ATTACCGCGGCTGCTGGCA-3' reportados por Bru et al. (2008). La PCR inició con una desnaturalización de 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 60 segundos, alineamiento a 60°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 60 segundos, finalizando con una extensión de 72°C por 6 minutos. Se utilizó el mismo volumen final descrito en la tabla 2, con una concentración final de cada oligonucleótido de 300 nM. Para poder observar el producto de PCR en un gel de electroforesis, se empleó el procedimiento descrito para los genes *sul1* y *CTX* en la sección anterior.

El resto de los fragmentos génicos de interés se obtuvieron al amplificar la región correspondiente mediante PCR punto final utilizando las condiciones y concentraciones ya descritas en el apartado 6.3.1. El tamaño de cada producto amplificado fue verificado mediante electroforesis para luego recuperarlo del gel usando el kit Qiaquick Gel Extraction Kit de QIAGEN (Ver anexo 3) con algunas modificaciones.

Posteriormente se llevó a cabo la ligación de cada fragmento al vector pGEM-T, siguiendo las indicaciones del fabricante (PROMEGA). Esta consistió en preparar en un tubo de 1.5 mL estéril la mezcla de reacción, utilizando buffer de ligación a una concentración final de 1X, vector pGEM-T a una concentración de 5 ng/μL, 10 ng/μL de concentración final del ADN inserto, 0.3 unidades Weiss/μL de ligasa de ADN T4, se agregó la cantidad de agua destilada grado HPLC necesaria para un volumen final de 10 μL. La reacción de ligación se incubó a 4°C toda la noche. Estos vectores fueron utilizados para transformar células de *Escherichia coli* DH5α químicamente competentes.

6.4.2. Protocolo para obtener células químicamente competentes.

Para obtener las copias necesarias de los plásmidos control, se prepararon células de *E. coli* DH5 α químicamente competentes, la cual se empleó como cepa receptora de tales plásmidos. La cepa fue sembrada sobre LB sólido contenido en placas de Petri, y se incubó a 37°C toda la noche. Al día siguiente, 3 mL de medio LB líquido fueron inoculados con la cepa DH5 α y se incubaron a 37°C con agitación oscilatoria constante (200 rpm) toda la noche en un agitador SK-0330-PRO (DLAB). Al día siguiente se transfirió el cultivo a un matraz con 50 mL de medio LB y se incubó a 37°C en agitación constante hasta obtener una densidad óptica (DO) de 0.45 a 0.5 a 550 nm. El cultivo se transfirió a un tubo de 50 mL y se incubó en hielo por 20 minutos. Pasado el tiempo, se centrifugó a 4°C a 2,500 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla celular en 7 mL de solución fría y estéril de MgCl₂ a concentración de 50 mM y CaCl₂ a 80 mM. Después se centrifugó a 2,500 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante para resuspender las células en 500 μ L de solución fría y estéril de CaCl₂ 100 mM. Finalmente, se hicieron alícuotas de 50 μ L y se congelaron rápidamente utilizando hielo con etanol y sal para transportar rápidamente a un ultracongelador, donde se almacenaron a -70°C para su posterior uso.

6.4.3. Protocolo de transformación de células DH5 α por choque térmico con el vector pGEM-T.

Una vez obtenidos los vectores con cada gen de interés, se inició la transformación de células *E. coli* DH5 α químicamente competentes. A 50 μ L de células competentes se les agregaron 5 μ L del producto de ligación (ver sección 6.4.1), mezclando suavemente por pipeteo y luego se incubó a 4°C durante 25 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se colocó el tubo en un termobloque a 37°C por 5 minutos. Rápidamente se se incubó el tubo a 4°C por 2 minutos. Después se le agregaron 900 μ L de medio LB líquido y se incubó a 37°C con agitación constante por una hora. Finalizada la incubación, se centrifugó el cultivo a 13,500 rpm por 1 minuto y se desecharon 800 μ L de medio LB. Con los 100 μ L de LB se resuspendió suavemente por pipeteo la pastilla celular. La suspensión celular se esparció, con un asa delta en medio LB sólido suplementado con 0.1 μ g/mL de ampicilina, 0.09 mg/mL de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) y 0.06 mg/mL de Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido). Los cultivos en placa se dejaron incubando a 37°C durante toda la noche. Las clonas que presentaron incorporación del plásmido conteniendo el fragmento de gen (colonias blancas) se seleccionaron para su cultivo en medio LB sólido suplementado con ampicilina. Adicionalmente, el resguardo de cada clona se hizo mediante criocongelación a -70°C.

6.4.4. Extracción de ADN plasmídico.

Previo a la extracción del ADN plasmídico, cada clona se sembró en un vial que contenía de 3 a 5 mL LB líquido suplementado con ampicilina 100 mg/mL. El cultivo se dejó incubando a 37°C en agitación, durante toda la noche. Al día siguiente el cultivo fue centrifugado a 13,000 rpm por un minuto, descartando el sobrenadante y conservando la pastilla celular. A continuación, se agregaron 100 µL de solución P1 (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM y Tris-HCl 25 mM a pH 8) y se agitó por vórtex durante 5 segundos. Se continuó agregando 150 µL de solución P2 (NaOH 200 mM y SDS al 1%) y mezclando por inversión cuatro veces. Después se incubó en hielo por 5 minutos y se agregaron 200 µL de solución P3 (CH₂COOK 5 M, ácido acético glacial ajustado a un pH de 5.2) fría, mezclando por inversión cuatro veces. Se incubó en hielo por 10 minutos y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo limpio y estéril. Posteriormente se adicionó el doble del volumen de etanol al 96% (con base en la cantidad recuperada) para precipitar al ADN y se incubó a -20°C por 30 minutos; al finalizar se mezcló por inversión. La solución se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos y se desechó el sobrenadante, continuando con dos lavados de la pastilla con etanol 70% frío. La pastilla lavada se recuperó por centrifugación a 13,000 rpm por 5 minutos y se dejó secar a 37°C por 15 minutos para eliminar los restos de etanol. Una vez seco, el ADN plasmídico se resuspendió en 30 µL de solución ARNasa (20 mg/mL) en TE (Tris-HCl 1 M y EDTA 0.22 M a pH 8) y se incubó a 37°C una hora para dejar actuar a la ARNasa. Finalmente, la solución de ADN plasmídico se almacenó a -20°C. Este protocolo se basa en el trabajo desarrollado por Green & Sambrook (2016) para la extracción de plásmidos mediante lisis alcalina.

6.4.5. Comprobación de la inserción de los genes de interés en el plásmido pGEM-T.

Se procedió a realizar una PCR punto final y/o dobles digestiones enzimáticas para liberar los insertos. Para la PCR se utilizó como ADN molde el ADN plasmídico obtenido de las clonas positivas con los insertos de los genes de interés, utilizando las condiciones descritas en la sección 6.3 (*pahE*, *sul1* y *CTX*) y 6.4.1 (*16S rRNA*). En las digestiones enzimáticas dobles se siguió el protocolo descrito por el proveedor de las enzimas de restricción (New England Biolabs). El protocolo consistió en una reacción con buffer rCutsmart a una concentración final 1X, 10 U de enzima *Apal*, 10 U de enzima *NdeI*, y 100 ng de ADN plasmídico. El volumen final se llevó a 50 µL con agua destilada grado HPLC. Las enzimas utilizadas se eligieron por ser reconocidas en el sitio de clonación múltiple del plásmido pGEM-T. La mezcla se incubó a 37°C por 2 horas y luego se inactivó al someterla a 65°C por 20 minutos.

El producto de las digestiones se visualizó en un gel de agarosa al 1% (*p/v*) bajo las condiciones descritas en la sección 6.3 con la diferencia de que se utilizó la escalera de 1 Kb (Promega).

6.4.6. Linealización de plásmidos obtenidos con los genes *sul1*, *CTX*, *pahE* y *16S rRNA*.

Se preparó una reacción por cada vector con el gen de interés utilizando 100 ng de ADN plasmídico, buffer rCutSmart a 1X y 10 U de enzima de restricción *NdeI*, llegando a un volumen final de 50 µL utilizando agua destilada grado HPLC.

La reacción se incubó a 37°C por 2 horas seguido de la inactivación de la enzima a 65°C por 20 minutos. La reacción se mezcló con 5 µL de buffer de carga y 0.5 µL de SYBR Gold, luego se cargó en un gel de agarosa al 1.5% (*p/v*) sumergido en buffer TAE 1X para desarrollar la electroforesis con las condiciones establecidas en el apartado 6.3. Se incluyó en el gel una escalera de ADN de 1 Kb mezclada con 0.5 µL de SYBR Gold. Al terminar, el gel se colocó en el transiluminador y se cortó la banda asegurando que se encontrara en el tamaño esperado. Los tamaños de fragmentos de ADN fueron los siguientes: 3,377 pb para *pahE*, 3,101 pb para *CTX*, 3,162 pb para *sul1* y 3,194 pb para *16S rRNA*.

A los fragmentos de agarosa conteniendo el ADN de interés fueron tratados mediante el protocolo de purificación de ADN descrito en la sección 6.4.1. Posteriormente se midió mediante espectrofotometría la concentración del ADN plasmídico. Con este dato, se procedió a calcular la cantidad proporcional de ADN del inserto con la siguiente fórmula:

$$[ADN\ inserto] = \left(\frac{Pares\ de\ bases\ del\ inserto}{Tamaño\ total\ del\ vector\ con\ el\ inserto} \times 100 \right) \times [ADN\ total]$$

El cálculo anterior permitió obtener el número de copias del gen blanco por cada microlitro de muestra de ADN plasmídico, utilizando la ecuación siguiente:

$$N = \frac{(6.023 \times 10^{14}\ Da/ng) \times (ADN\ del\ inserto\ (ng/\mu L))}{(Tamaño\ del\ inserto) \times (660\ dalton)}$$

N: Número de copias del gen blanco

El valor anterior se utilizó para determinar la cantidad de microlitros de muestra para hacer diluciones decimales que se utilizaron para la estandarización de las curvas de la qPCR.

6.4.7. Amplificación y purificación de los fragmentos génicos *16S rRNA* (1,465 pb) y *pahE* para uso en qPCR.

Cómo estrategia alternativa, al uso de vectores con los genes de interés insertados o construcciones, se optó por utilizar fragmentos génicos mayores a las 300 pb para la cuantificación en tiempo real. Esta estrategia se aplicó para los genes *16S rRNA* y *pahE*. En el caso del gen *16S rRNA* se utilizó el ADN extraído de la cepa *E. coli* DH5 α y se probaron los oligonucleótidos 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' forward y 1492R 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' reverse que amplifican una región equivalente a 1,465 pb (Weisburg et al., 1991). Las condiciones de la PCR punto final para el gen *16S rRNA* fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos que consistieron en un paso de desnaturalización a 94°C por 45 segundos, un alineamiento a 55°C por 45 segundos y una extensión a 72°C por 1 minuto, finalizando con un periodo de 72°C por 10 minutos. La concentración final para cada oligonucleótido fue 250 nM, manteniendo las concentraciones de los otros reactivos usados en la tabla 2. Para el gen *pahE* se utilizó el ADN genómico de la cepa MSB30 de *Acinetobacter lwoffii* utilizando las condiciones y concentraciones mencionadas en la sección 6.3. Las reacciones para cada gen se realizaron a un volumen final de 50 μ L, corriendo toda la reacción de amplificación en un gel de agarosa al 1% (p/v) bajo las condiciones descritas en la sección 6.3. Las bandas de tamaño esperado fueron purificadas utilizando el kit Genomic DNA Clean & Concentrator-25 de ZYMO Research (Irvine, CA, E.U.A.) siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante.

Para calcular el número de copias de cada fragmento génico por cada microlitro se utilizó la siguiente fórmula:

$$n = \frac{(ng \text{ de ADN}) (6.022 \times 10^{23} \text{ Da/ng})}{(\text{Tamaño del fragmento en pb})(1 \times 10^9)(660)}$$

n: número de copias del gen

De cada producto se prepararon diluciones 1 a 10 desde 1×10^9 hasta 1×10^2 copias por cada microlitro para construir la curva de cuantificación.

6.4.8. Cuantificación del gen *16S rRNA* y *pahE* utilizando PCR cuantitativa.

Las reacciones de PCR cuantitativa se llevaron a cabo en un termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems), donde cada reacción de control positivo, negativo y problema se realizó por triplicado. Se utilizó el kit GoTaq qPCR master mix (Promega), empleando un volumen final de 10 μ L por reacción en tubos para qPCR (Applied biosystems, número de catálogo N8010580) los cuales incluían, a concentraciones finales, el master mix de qPCR a 1X, 300 nM de fluoróforo de referencia o pasivo carboxi-X-rodamina (CXR) y la muestra de ADN con al menos 10 ng/ μ L. Las reacciones incluyeron los oligonucleótidos Fw (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') y Rv (5'-ATTACCGCGGCTGCTGGCA-3'), para la cuantificación del gen *16S rRNA*. El tamaño del producto esperado fue de 194 pb. Se empleó una concentración final de 300 nM para cada oligonucleótido del *16S rRNA*. Para el gen *pahE* (377 pb), se usaron los mismos oligonucleótidos empleados en PCR punto final, a una concentración final de 1.4 μ M.

La curva de estandarización se realizó con las diluciones del ADN del gen de interés y con sus correspondientes controles negativos. Una vez obtenidas correctamente las curvas de estandarización, se montaron los experimentos utilizando las muestras problema.

El protocolo de la qPCR para el gen *16S rRNA* inició con 95°C de desnaturalización, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 20 segundos, un alineamiento de 55°C por 30 segundos y una extensión de 72°C por 30 segundos. El registro de la fluorescencia se llevó a cabo en fase de alineamiento. Acabando los ciclos, se saltó al desarrollo de una curva de disociación desde los 55°C a los 95°C con aumento gradual de 0.3°C cada 30 segundos.

En el caso del gen *pahE*, se empezó con una desnaturalización a 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 20 segundos, alineamiento a 60°C por 45 segundos y una extensión de 72°C por 30 segundos. Midiendo la fluorescencia en la fase de alineamiento. Acabando los ciclos se desarrolló una curva de disociación desde los 55°C hasta los 95°C con aumento gradual de 0.5°C cada 30 segundos.

6.4.9. Cálculos para cuantificación del gen *16S rRNA* por cada gramo de sedimento marino.

Para determinar la cantidad de copias del gen por gramo de sedimento marino se utilizó la siguiente ecuación simplificada.

$$(4 \times V) (C) (\text{inverso de la dilución empleada en el DNA}) = \text{número de copias totales.}$$

Donde "C" es el promedio de la cuantificación de genes de la muestra; "V", volumen empleado para eluir el ADN extraído de los sedimentos (usualmente 50 μL); y el número 4 es el inverso de la masa empleada para extraer el sedimento (0.25 g).

El número de copias de gen por gramo de sedimento obtenido se dividió entre el factor de 7 para estimar el número de bacterias existentes en una unidad de volumen o superficie a partir del gen *16S rRNA* bacteriano (Okano et al., 2004). Esto se hizo debido a que las bacterias de vida libre tienen varios operones del gen *16S rRNA* en su genoma.

7. Resultados.

7.1. Concentración y calidad de ADN ambiental extraído de las muestras de sedimento.

El ADN extraído de las 34 muestras de sedimento fue cuantificado en un espectrofotómetro Nanodrop (Tabla 3). Se obtuvieron valores en un rango de 4 a 19.6 ng/μl de ADN, mientras que los valores de A260/A280 variaron de 1.23 a 1.82. El sitio B69, ubicado en la bahía de Salsipuedes, fue la muestra con mejor calidad de ADN extraído con una relación A260/A280 de 1.82, mientras que la muestra con la menor calidad de ADN fue el sitio B68 con un valor de 1.23, ubicado en el arroyo al norte de Bajamar.

Tabla 3. Valores de concentración de ADN y calidad obtenidas por el espectrofotómetro NanoDrop.

Muestra	[ADN](ng/μl)	A260/A280	Muestra	[ADN](ng/μl)	A260/A280
B02	6.1	1.58	B57	9.4	1.68
B04	10.5	1.69	B62	9.5	1.65
B06	8.0	1.63	B65	11.3	1.71
B07	5.8	1.63	B66	5.6	1.71
B08	5.8	1.56	B67	7.1	1.63
B09	5.8	1.40	B68	12.3	1.23
B10	4.0	1.68	B69	12.8	1.82
B13	6.0	1.70	B70	17.3	1.72
B14	5.0	1.72	B74	9.9	1.26
B18	16.0	1.53	B78	4.7	1.42
B26	5.8	1.79	B91	7.7	1.63
B28	9.2	1.71	B93	4.5	1.76
B44	16.0	1.45	B94	5.7	1.51
B47	19.6	1.76	B98	10.2	1.68
B53	14.2	1.74	E95	4.7	1.66
B54	11.0	1.68	E96	14.5	1.75
B56	9.2	1.67	E97	6.2	1.38

El ADN ambiental extraído de cada sitio fue sometido a una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (*p/v*) para corroborar su integridad (Fig. 8). En todas las muestras se obtuvo un ADN íntegro, aunque no se observara una banda intensa. Es importante mencionar que en algunas muestras la extracción de ADN fue complicada, como el caso de la muestra del sitio B02. Lo anterior, podría deberse a la propia naturaleza del sedimento.

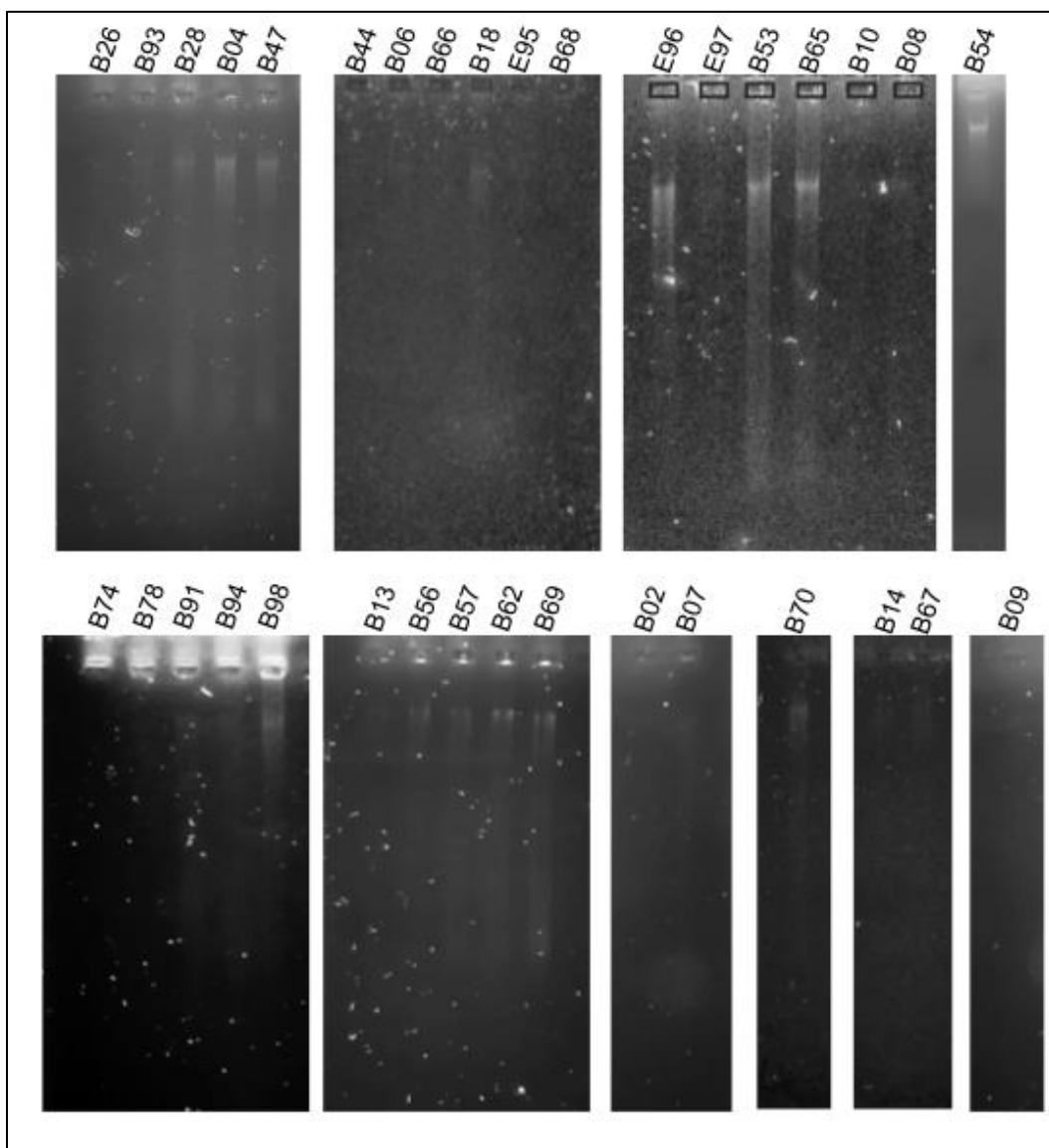


Figura 8. ADN ambiental de sedimentos marinos proveniente de los 34 sitios muestreados en la CBC. La visibilidad del ADN en el gel de agarosa varió debido a las dificultades en la extracción de ADN derivado de las características de cada muestra de sedimento marino.

7.2. Amplificaciones por PCR punto final de los genes *CTX*, *sul1* y *pahE* en ADN ambiental de sitios.

El gen *CTX* fue encontrado en 11 de las 34 muestras sedimentarias, representando el 32.35% del total de muestras (Fig. 9). Las muestras donde el gen fue amplificado fueron B02, B08, B09, B14, B26, B54, B65, B67, B68, B93, E95. En la región norte hubo 5 muestras que amplificaron el gen *CTX*, siendo equivalente al 38.46% de las muestras de esa región. En la región centro hubo 4 sitios con el gen y fue también la que tuvo mayor porcentaje representativo de muestras donde se encontró el gen en las 3 regiones, siendo 44.44% del total de la región. La región sur presentó solamente 2 sitios, teniendo un porcentaje representativo de 16.66% dentro de la misma.

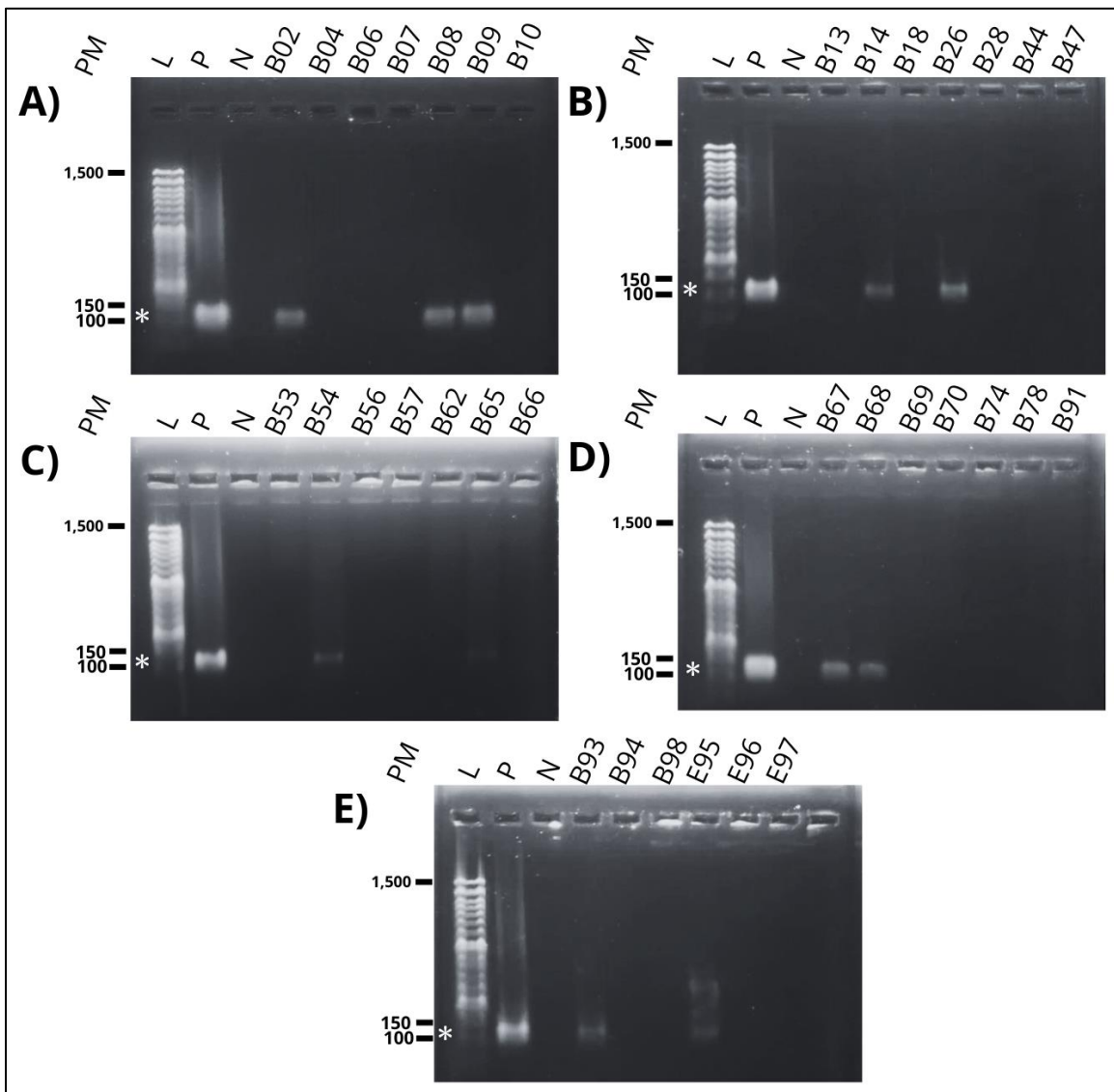


Figura 9. Electroforesis del análisis del gen *CTX* en las 34 muestras de ADN ambiental de sitio. Electroforesis con el análisis de los productos de los sitios A: B02 al B10; B: B13 al B47; C: B53 al B66; D: B67 al B91; E: B93 al E97. El

tamaño del fragmento esperado para el gen *CTX* es de 101 pb y se encuentra señalado con un asterisco. PM: peso molecular en pares de base. L: escalera de ADN de 50 – 1,500 pb (Bio-Helix); P: control positivo; N: control negativo (agua grado HPLC).

Al analizar los resultados representados en la figura 10 correspondientes al gen *sul1* se observó que el gen está presente en 6 de los sitios, representando al 17.64% del total de las muestras. Estos sitios fueron B02, B09, B10, B26, B67 y E95. En la región norte hubo la mayor cantidad de sitios con el gen presente, siendo estos 4, los cuales equivalen al 30.77% del total de muestras en esa región. Para la región centro y sur, cada uno presentó la amplificación del gen en una sola muestra, representando para el total de muestras de cada región el 11.11% y el 8.33% respectivamente.

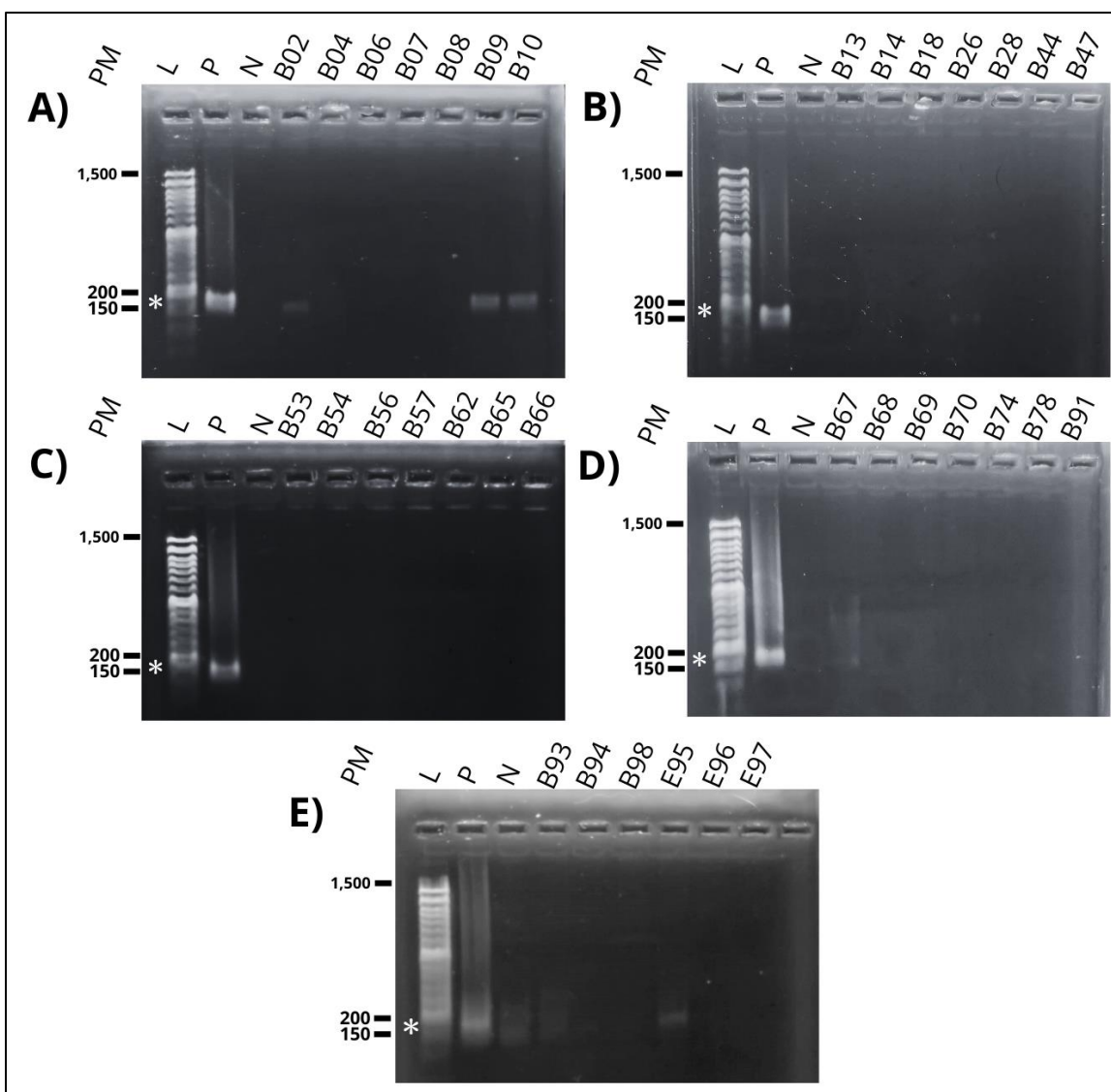


Figura 10. Electroforesis para el gen *sul1* en las 34 muestras de ADN ambiental de sitio. Producto de amplificación del gen *sul1* en los sitios A: B02 al B10; B: B13 al B47; C: B53 al B66; D: B67 al B91; E: B93 al E97. El tamaño del fragmento esperado para el gen *sul1* es de 162 pb, usando un asterisco como referencia. PM: peso molecular en pares de base. L: escalera de ADN de 50 – 1,500 pb (Bio-Helix); P: control positivo; N: control negativo (agua grado HPLC).

El gen *pahE* mostró amplificación en 20 sitios (Fig. 11), siendo el 58.82% del total de muestras. Los sitios que amplificaron el gen fueron B02, B07, B08, B10, B13, B14, B26, B54, B62, B65, B66, B67, B68, B69, B74, B91, B93, B94, B98 y E95. En 7 de los sitios de la región norte hubo presencia de *pahE*, con un porcentaje de 53.85%. Dentro de la región centro, 5 muestras fueron positivas a la amplificación de *pahE*, siendo el 55.55% del total de los sitios. Finalmente, en las muestras de la región sur hubo amplificación del fragmento en 8 sitios, representando el 66.66%.

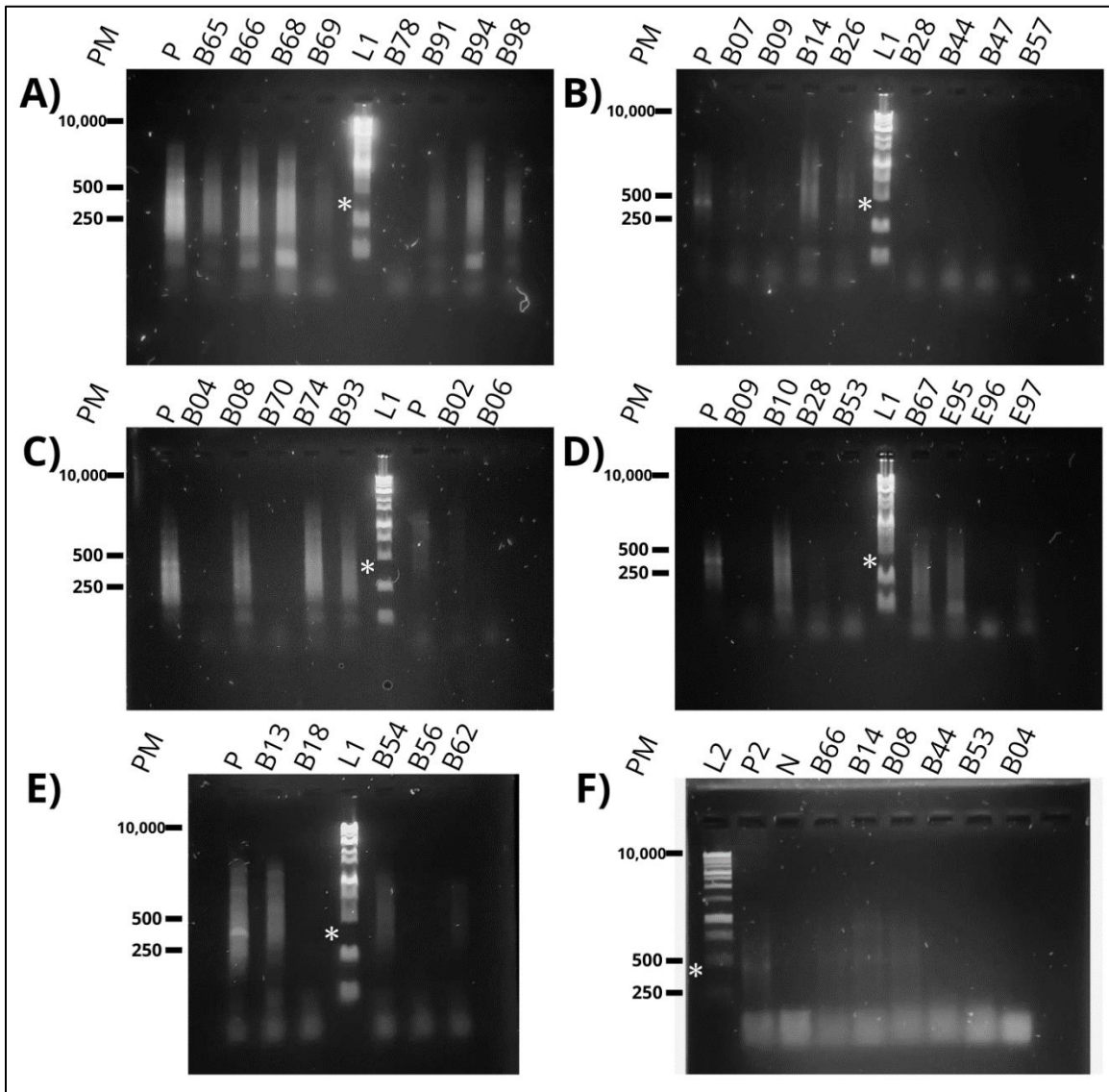


Figura 11. Electroforesis del fragmento del gen funcional *pahE* amplificado a partir del ADN ambiental de las muestras de sedimentos marinos. Presencia y ausencia del gen en las muestras A: B65, B66, B68, B69, B78, B91, B94 y B98; B: B07, B09, B14, B26, B28, B44, B47 y B57; C: B04, B08, B70, B74, B93, B02 y B06; D: B09, B10, B28, B53, B67, E95, E96 y E97; E: B13, B18, B54, B56 y B62. F: Electroforesis con los productos de amplificación con condiciones optimizada de PCR del gen *pahE*. Las muestras B66, B14 y B08 fueron utilizadas como controles positivos para la optimización de la PCR y las muestras B44, B53 y B04, como controles negativos. El tamaño del fragmento esperado para el gen *pahE* es de 377 pb, señalándose este con un asterisco. PM: peso molecular en pares de base. L1: escalera de ADN de 100 - 10,000 pb (Bio-Helix); L2: escalera de 1 kb (Promega); P: control positivo (ADN ambiental sitio

Monoboya); P2: control positivo (ADN de la cepa MSB30 de *Acinetobacter lwoffii*); N: control negativo (agua grado HPLC).

Con los datos obtenidos de la PCR punto final se realizó un mapa para relacionar la presencia y ausencia de genes en muestras respecto a las localidades cercanas (Fig. 12). En la zona norte hubo 8 sitios cuyas muestras fueron positivas a al menos uno de los genes analizados. En las costas de Tijuana 6 muestras correspondientes a los sitios B02, B07, B08, B09 y B10 amplificaron los genes estudiados. El sitio B08 es el punto más cercano a las playas de Tijuana y en la muestra de este se detectaron los genes *CTX* y *pahE*. Los sitios B02 y B10 son puntos ubicados al sur de Playas de Tijuana. La muestra B02 presentó los genes *CTX*, *sul1* y *pahE*, mientras que B10 a *sul1* y *pahE*. Al sur de los puntos B02 y B10, cerca de la localidad de Playa Blanca, se encuentran los puntos B07, B09 y B14, donde la muestra del primero amplificó el gen *pahE*, la muestra del segundo ambos genes de resistencia a antibióticos y en la muestra del último sitio a los genes *CTX* y *pahE*. En la muestra del sitio B13, cercano a la costa de Rosarito, se encontró al gen *pahE*. Finalmente, cercano a la isla Coronado se encuentra el sitio B26, cuya muestra amplificó a los 3 genes analizados.

En la región centro hubo 5 muestras positivas (B54, B65, B66, B67 y B68) para alguno de los 3 genes. Las muestras del sitio B54, ubicado frente a la localidad de Primo Tapia, tuvo presencia de los genes *CTX* y *pahE*. Los puntos B65, B66, B67 y B68 son puntos cercanos entre sí que se encuentran desde la zona costera de Playa Escondida en la localidad de La Misión hasta el mirador de Salsipuedes. De norte a sur, la muestra B67 de Playa Escondida presentó a los 3 genes; la muestra B66, en el ejido Ensenada, solo amplificó al gen *pahE*; y ambas muestras de los sitios B68 proveniente al sitio del arroyo cercano a Bajamar y B65 proveniente del sitio cercano al mirador de Salsipuedes mostraron presencia del gen *CTX* y *pahE*.

Por último, la región sur mostró 8 muestras positivas con al menos uno de los genes. Los sitios B62, B69 y B74 se ubican en la Bahía de Salsipuedes, y las muestras de los 3 presentaron la amplificación del gen *pahE*. En la bahía de la ciudad de Ensenada se encuentran los sitios B91, B93, B94, B98, E95, donde las muestras de los sitios B91, B94 y B98 amplificaron solamente al gen *pahE*, mientras que la muestra B93 amplificó a los genes *CTX* y *pahE*. La muestra del sitio E95 tuvo presente a los 3 genes analizados.

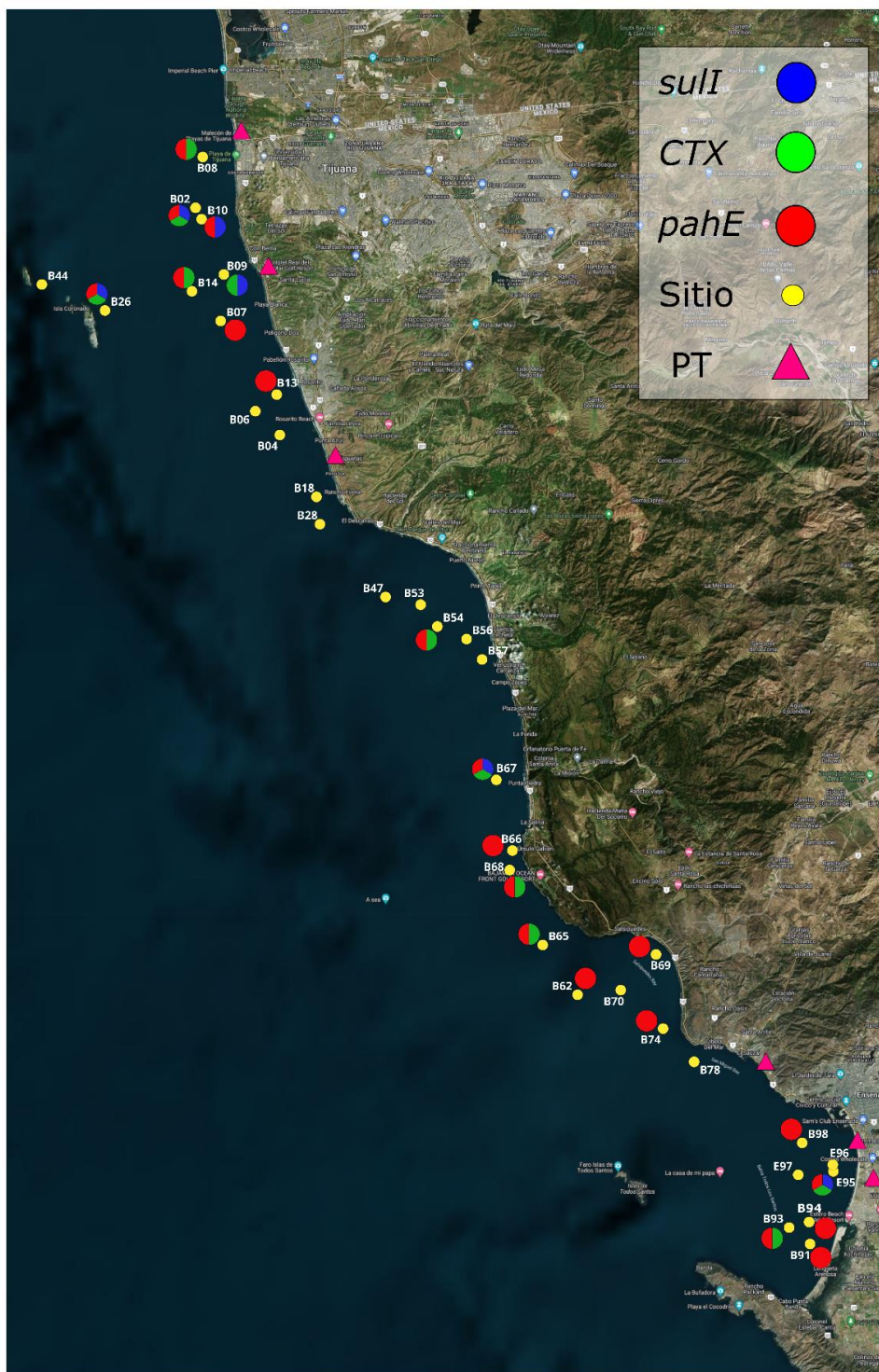


Figura 12. Mapa con los sitios cuyas muestras amplificaron uno o más de los genes *pahE*, *sul1* y *CTX*. Se señalan como puntos amarillos los sitios de muestreo, mientras que los sitios con presencia de alguno de los genes presentan una gráfica de pastel con los colores azul, verde y rojo, representando al gen *sul1*, *CTX* y *pahE*, respectivamente. Las plantas de tratamiento de aguas residuales (PT) están representadas como triángulos rosas.

7.3. Análisis de qPCR para el gen *16S rRNA*.

Los resultados de la PCR punto final permitieron continuar con la experimentación en qPCR. Para ello, primero se transformaron células con el inserto del gen *16S rRNA* y se les extrajo el ADN plasmídico a 10 clonas obtenidas tal y como se mencionó en el apartado 6.4. En la figura 13A se muestra el resultado de las extracciones, donde las clonas 2-10 tuvieron una correcta extracción llegando a presentar al ADN plasmídico en al menos dos de sus tres isoformas (enrollada, superenrollada y circular relajada). Las muestras exitosas fueron utilizadas para realizar una PCR punto final para determinar la presencia del gen *16S rRNA*, lo cual a su vez sería apoyado con una doble digestión enzimática para corroborar la presencia del inserto. La figura 13B muestra el resultado de las PCR punto final, donde todas las muestras presentaron amplificación del gen *16S rRNA*. Dado que era difícil inferir si el fragmento *16S rRNA* amplificado era proveniente del ADN plasmídico o podría ser un falso positivo por contaminación de ADN genómico bacteriano exógeno, se llevó a cabo una doble digestión como método de corroboración. El ADN de las clonas 3, 5, 8, 9 y 10 fue sometido a la digestión con las enzimas *NdeI* y *ApaI*. Los resultados fueron poco concluyentes, ya que se obtuvo un tamaño del fragmento liberado mayor al esperado, estando arriba de los 250 pb (Fig. 13C).

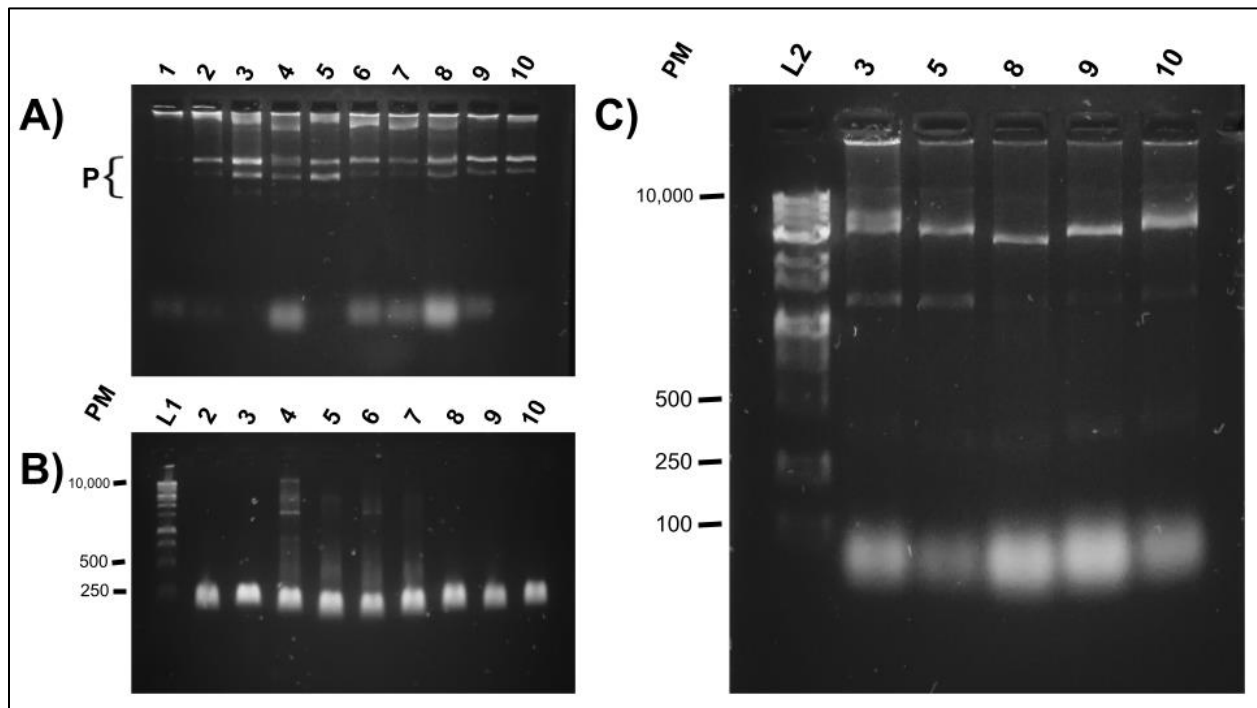


Figura 13. Electroforesis de la extracción del ADN plasmídico, PCR punto final y doble digestión enzimática para el gen *16S rRNA* clonado en el vector pGEM-T. A: Electroforesis de la extracción de ADN plasmídico de 10 clonas diferentes con el inserto del gen *16S rRNA* enumeradas de 1 a 10. Se señala como "P" al ADN plasmídico en tres isoformas (enrollada, superenrollada y circular relajada). B: Electroforesis con los amplicones del fragmento *16S rRNA* a partir del ADN plasmídico de las clonas 2-10. El tamaño esperado para el fragmento *16S rRNA* fue de 194 pb. C: Electroforesis de las digestiones enzimáticas para las 5 mejores extracciones de ADN plasmídico de clonas. PM: peso molecular en pares de base. L1: escalera de ADN de 1 Kb (Promega); L2: escalera de ADN de 100 - 10 Kb (Bio-Helix).

Debido a la incertidumbre de los resultados del gen *16S rRNA* en la estrategia principal, se decidió realizar la cuantificación del gen utilizando la estrategia alternativa discutida en la sección 6.4.7. En la figura 14 se puede observar la amplificación del gen *16 rRNA* (Fig. 14A) y el producto purificado del fragmento de 1465 pb. Dado que se obtuvo una cantidad suficiente del producto purificado del gen *16S rRNA* esto permitió su posterior uso en la qPCR (Fig. 14B). El producto de purificación fue medido después en el espectrofotómetro NanoDrop por sextuplicado, obteniendo los siguientes valores: 68.4, 64.8, 64.0, 72.5, 71.2, 73.6. Estos valores fueron promediados dando como resultado 69.08 ng/μL de concentración de ADN. El valor fue utilizado en la fórmula descrita en el apartado 6.4.7, obteniéndose 43.02×10^9 copias gen/μL. Este valor fue utilizado para realizar diluciones de 1×10^9 a 1×10^1 . Las diluciones 1×10^7 a 1×10^2 fueron las utilizadas para la estandarización y realización de las qPCR.

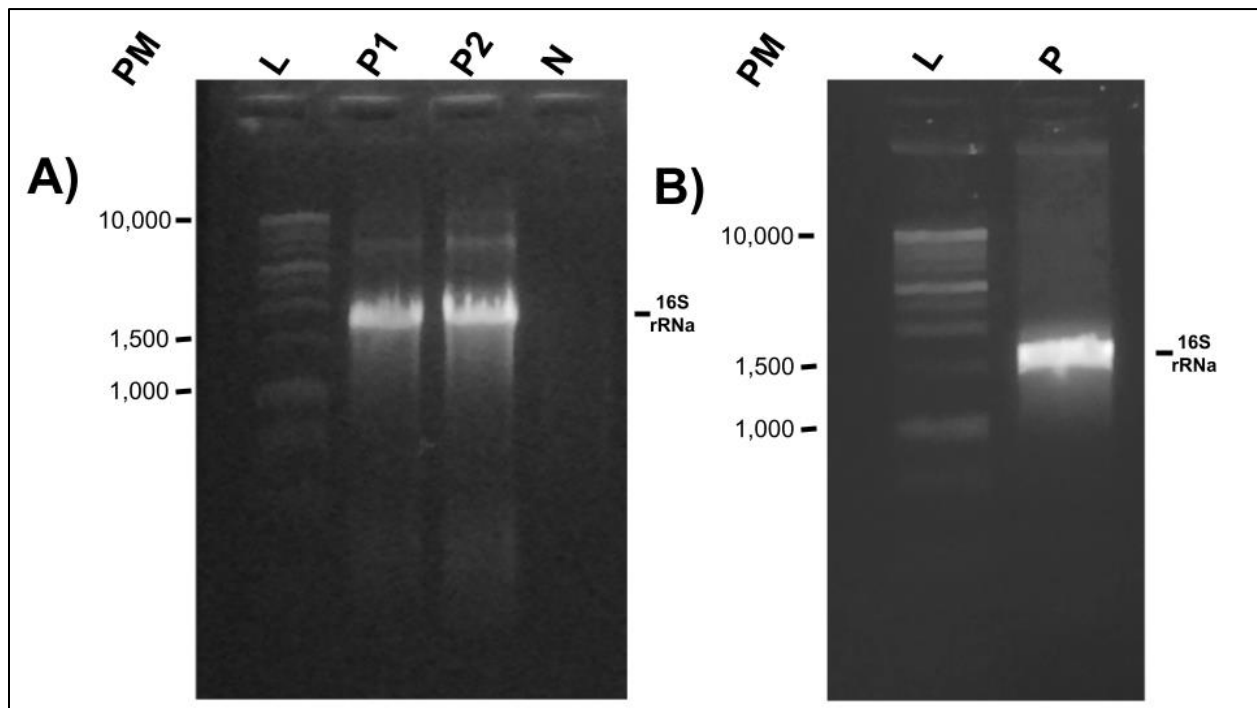


Figura 14. Electroforesis del resultado de la PCR punto final para extracción de banda del fragmento *16S rRNA* de 1,465 pb y purificación del mismo. Se observa una banda definida entre 1,000 y 1,500 pb, que evidencia la correcta amplificación de nuestro producto. A: electroforesis obtenida después de amplificar el gen *16S rRNA* por PCR punto final. B: electroforesis de la purificación del fragmento de 1,465 pb. PM: peso molecular en pares de base. P1 y P2: producto de la amplificación del gen *16S rRNA* de 1,465 pb; N: control negativo donde se usó como muestra agua grado HPLC. L: escalera de ADN de 1 Kb (Promega); P: producto de purificación del fragmento de ADN *16S rRNA*.

Para la qPCR del fragmento *16S rRNA* inicialmente se usaron oligonucleótidos que amplificaban un fragmento de 194 pb; sin embargo, estos presentaron problemas al formar dímeros que fueron detectados al realizar la curva de disociación al final de la qPCR (ver anexo 5). La alternativa al problema fue utilizar otros oligonucleótidos que amplificaran al fragmento de 143 pb del mismo gen, y que previamente hayan sido usados para cuantificación de bacterias en muestras ambientales. Los oligonucleótidos

Bact1369F (5'-CGGTGAATACGTTTCYCGG-3') y Bact1492R (5'-GGWTACCTTGTTACGACTT-3') reportados por Vigneron et al. (2016) fueron seleccionados. Las condiciones y concentraciones para la qPCR fueron las mismas mostradas en la sección 6.4.8.

En la figura 15A se muestra la curva estándar donde se obtuvo una $R^2 = 0.982$ y una eficiencia del 113.23%, lo cuales son valores aceptables de estandarización. Se observó el aumento de señal de fluorescencia en cada ciclo de amplificación (Fig. 15B). Para la dilución 1×10^7 las amplificaciones alcanzaron las 10 unidades de fluorescencia en el ciclo 18, mientras que las siguientes diluciones alcanzaron ese valor a los 22, 29, 35 y 37 ciclos. La figura 15C incluye a las amplificaciones de las muestras de los sitios B09, B54, B78 y B94, donde todos ellos mostraron amplificación entre las diluciones 1×10^6 y 1×10^3 . Sumado a la curva de amplificación, se obtuvo también una curva de disociación ilustrada en la figura 15D en la cual se mostró un único pico a 84.4°C , descartando la posibilidad de formación de dimerizaciones o productos inespecíficos. Las gráficas de qPCR correspondientes a la experimentación con todas las muestras se pueden observar en el anexo 6 a 10.

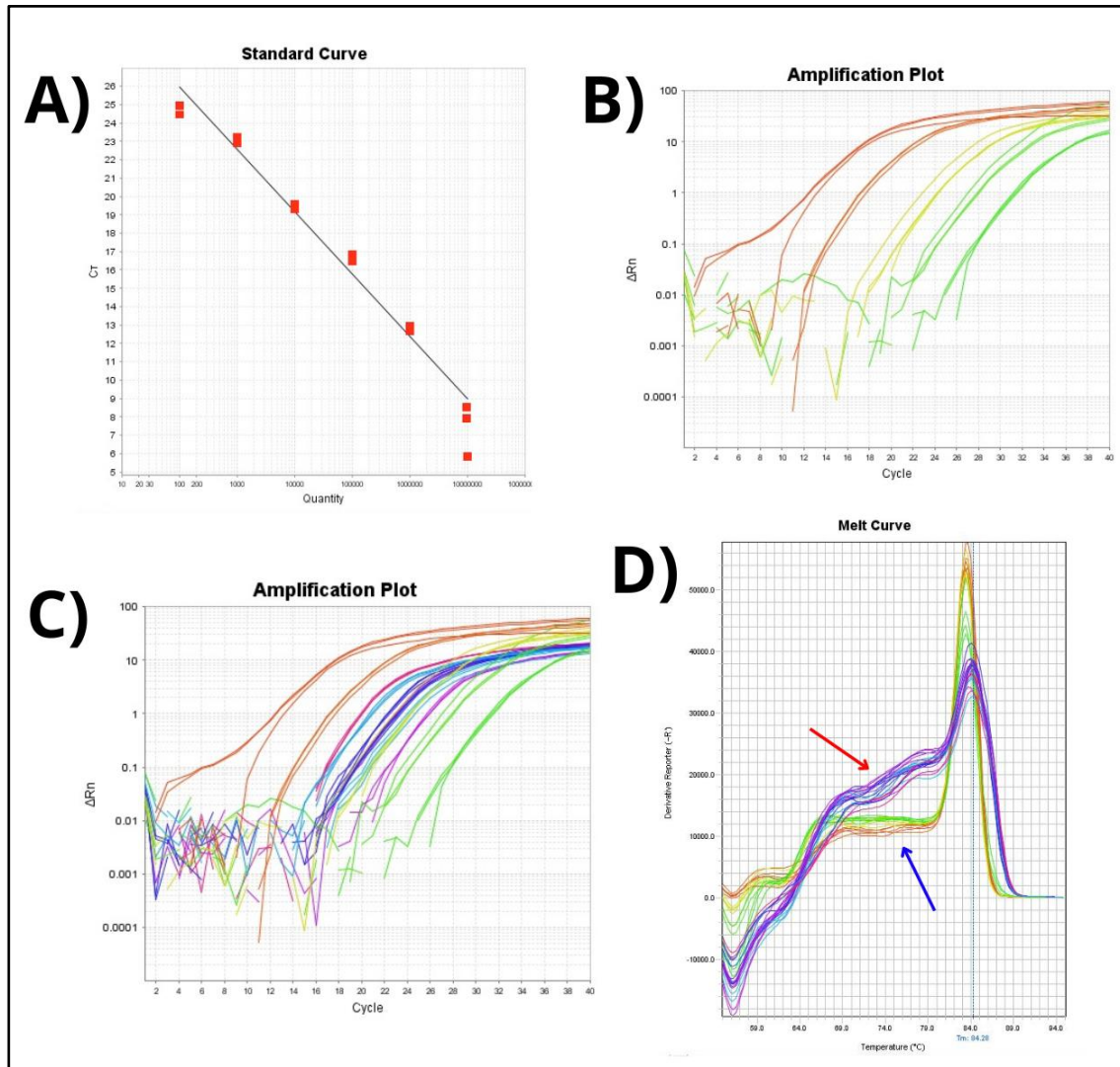


Figura 15. Resultados representativos de las pruebas de PCR tiempo real para el gen *16S rRNA*. A: Gráfica que muestra la curva de estandarización (standard curve). En esta se observan las 6 diluciones por triplicado empleadas en un factor de 1:10 yendo de 1×10^7 hasta las 1×10^2 copias/μL, todas representadas como puntos rojos. El equipo calculó una eficiencia de 113.23% y un coeficiente de regresión lineal $R^2 = 0.982$. B: Curva de amplificación (amplification plot) mostrando solo a las diluciones empleadas por triplicado utilizadas para la creación de la curva de estandarización y a los testigos negativos, los cuales no tuvieron amplificación alguna. C: Misma curva de amplificación con las diluciones de la curva de estandarización, testigos negativos y las amplificaciones de las muestras problemáticas (B09, B54, B78 y B94) derivadas de los sitios por triplicado. D: Curva de disociación (melt curve) con las diluciones 1×10^7 a la 1×10^2 (se muestran aglomeradas y señaladas por la flecha azul) y las muestras problemáticas descritas en el inciso C (aglomeradas y señaladas por la flecha roja). Se observa que la temperatura de melting o disociación de los productos de PCR se encuentra en 84.28°C.

Del mismo modo que se obtuvieron las gráficas, el equipo también proporcionó la cantidad de copias de gen en cada pocillo y se partió de estos valores para realizar los cálculos de cuantificación de genes por gramo de sedimento marino y cantidad de células por gramo de sedimento marino según lo descrito en el apartado 6.4.9. El análisis se llevó a cabo por región (norte, centro y sur). En la sección de anexos (anexo 11, 12 y 13)

se muestran los valores obtenidos el equipo a partir de la cuantificación de las muestras de sitios correspondientes a cada región para el gen *16S rRNA*.

La tabla 4 presenta el resumen de la cuantificación en la región norte, centro y sur. En la región norte se puede observar que el sitio con mayor cantidad de células bacterianas por gramo de sedimento fue el sitio B28 con 4.79×10^8 células/gramo, mientras que el sitio que presentó la menor cantidad fue el sitio B09 con 2.92×10^6 células/gramo. La región norte tuvo un promedio de 1.37×10^8 células por gramo por el total de sitios. En la región centro se obtuvo que el sitio B57 presentó el mayor valor, siendo este 3.85×10^8 células/gramo, por otro lado, el sitio B67 fue el que mostró la menor cantidad, con 4.29×10^6 células/gramo. El promedio para la región centro fue 1.26×10^8 células/gramo. Finalmente, en la región sur el sitio con mayor cantidad de bacterias fue B69, con 6.25×10^8 células/gramo, y el sitio B74 tuvo el valor más bajo, siendo este 3.99×10^6 células/gramo. El promedio fue de 7.23×10^7 células/gramo. Englobando los datos, el sitio B69 fue el que mayor cantidad de células bacterianas por gramo de sedimento presentó, mientras que la muestra del sitio B09 fue el valor más bajo.

Tabla 4. Promedio de copias del gen por gramo de sedimento y número de bacterias por gramo de sedimento en las regiones norte, centro y sur.

Región	Punto de muestreo	Promedio del número de copias del gen <i>16S rRNA</i> g ⁻¹ sedimento marino húmedo	Número de bacterias g ⁻¹ de sedimento marino húmedo (células bacterianas g ⁻¹)	Punto de muestreo	Promedio del número de copias del gen <i>16S rRNA</i> g ⁻¹ sedimento marino húmedo	Número de bacterias g ⁻¹ de sedimento marino húmedo (células bacterianas g ⁻¹)
Norte	B02	7.40×10^8	1.06×10^8	B13	1.03×10^9	1.47×10^8
	B04	1.12×10^9	1.61×10^8	B14	4.61×10^7	6.58×10^6
	B07	8.32×10^8	1.19×10^8	B18	2.16×10^9	3.09×10^8
	B08	8.42×10^8	1.20×10^8	B26	3.18×10^7	4.55×10^6
	B09	2.04×10^7	2.92×10^6	B28	3.35×10^9	4.79×10^8
	B10	2.95×10^8	4.21×10^7	B44	1.07×10^9	1.53×10^8

Centro	B47	2.33×10^8	3.32×10^7	B65	5.30×10^8	7.57×10^7
	B53	2.28×10^8	3.26×10^7	B66	1.52×10^9	2.17×10^8
	B54	1.83×10^8	2.62×10^7	B67	3.0×10^7	4.29×10^6
	B56	2.27×10^9	3.24×10^8	B68	2.65×10^8	3.79×10^7
	B57	2.69×10^9	3.85×10^8	-	-	-
Sur	B62	1.24×10^8	1.77×10^7	B93	6.42×10^7	9.17×10^6
	B69	4.38×10^9	6.25×10^8	B94	6.97×10^7	9.97×10^6
	B70	3.53×10^8	5.04×10^7	B98	1.80×10^8	2.58×10^7
	B74	2.80×10^7	3.99×10^6	E95	3.13×10^7	4.47×10^6
	B78	3.97×10^7	5.67×10^6	E96	6.94×10^8	9.92×10^7
	B91	7.44×10^7	1.06×10^7	E97	4.20×10^7	6.0×10^6

En la figura 16 se puede observar con más claridad la cantidad de células bacterianas halladas por gramo de sedimento marino en cada sitio derivado de lo presentado en la tabla 4. Los datos obtenidos se representaron en escala logarítmica y se ordenaron para facilitar la comparación visual.

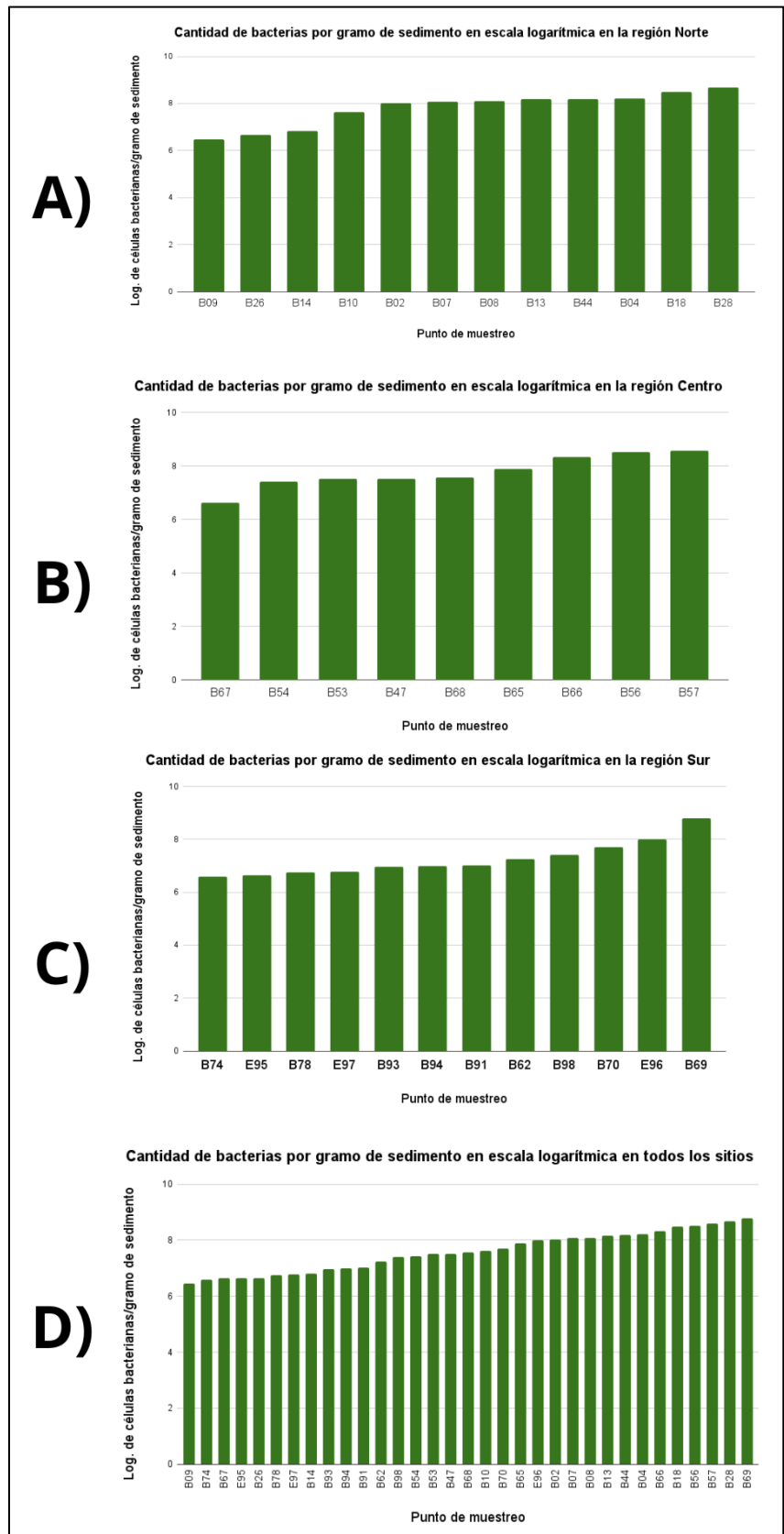


Figura 16. Cantidad de células bacterianas por gramo de sedimento marino en cada sitio de la zona Norte, Centro, Sur y total en escala logarítmica. Los valores para cada sitio fueron organizados de manera ascendente. A: Gráfico correspondiente al análisis de la zona Norte. B: Gráfico correspondiente a la zona Centro. C: Gráfico correspondiente al análisis de la zona Sur. D: Gráfico que engloba el análisis en todas las zonas.

7.4. Análisis de qPCR para el gen *pahE*.

Se logró obtener el plásmido con el inserto del fragmento del gen *pahE* linealizado correctamente con la enzima *NdeI* como se planteó en el apartado 6.4.6. La medición de la concentración con un espectrofotómetro NanoDrop dio como resultado 7.675 ng/μL y un valor 280/260 de 1.99 a partir de 4 repeticiones de medición. La ecuación del apartado 6.4.6 dió como resultado una concentración de ADN del inserto de 0.85 ng/μL, y un número de copias del gen blanco de 2.074×10^9 copias gen/μL. El valor anterior permitió crear una dilución madre de 1×10^9 copias del gen por microlitro al agregar 9.65 μL de la muestra a 10.35 μL de agua grado HPLC, el cual se usaría para crear las diluciones de la qPCR para el gen *pahE*.

Se trató de realizar una curva de estandarización para el gen *pahE*; sin embargo, hubo complicaciones en su desarrollo. Algunas de estas se muestran en la figura 17. En la figura 17A se muestra la amplificación del producto en el mismo ciclo para las diluciones correspondientes a 1×10^3 y 1×10^1 y en el testigo negativo. La figura 17B representa otro problema encontrado durante el desarrollo de la qPCR con el gen *pahE*, donde las reacciones presentan dos productos principales a diferentes temperaturas de alineamiento (77.5°C y 88.04°C) en todas las diluciones empleadas, donde las diluciones con menor concentración de ADN amplificaban con mayor intensidad al producto en 77.5°C y los de mayor concentración al producto en 88.04°C. A partir de esta última observación, se dedujo que el producto con la temperatura más baja de disociación correspondía a la formación de dímeros entre los oligonucleótidos. Finalmente, el tercer problema ilustrado en la figura 17C consistió en probar los oligonucleótidos de manera individual. En el experimento donde se empleó el oligonucleótido *pahE*-F, se observó que este amplificaba por sí solo un producto de PCR en la misma temperatura de alineamiento que al utilizarlo junto con *pahE*-R.

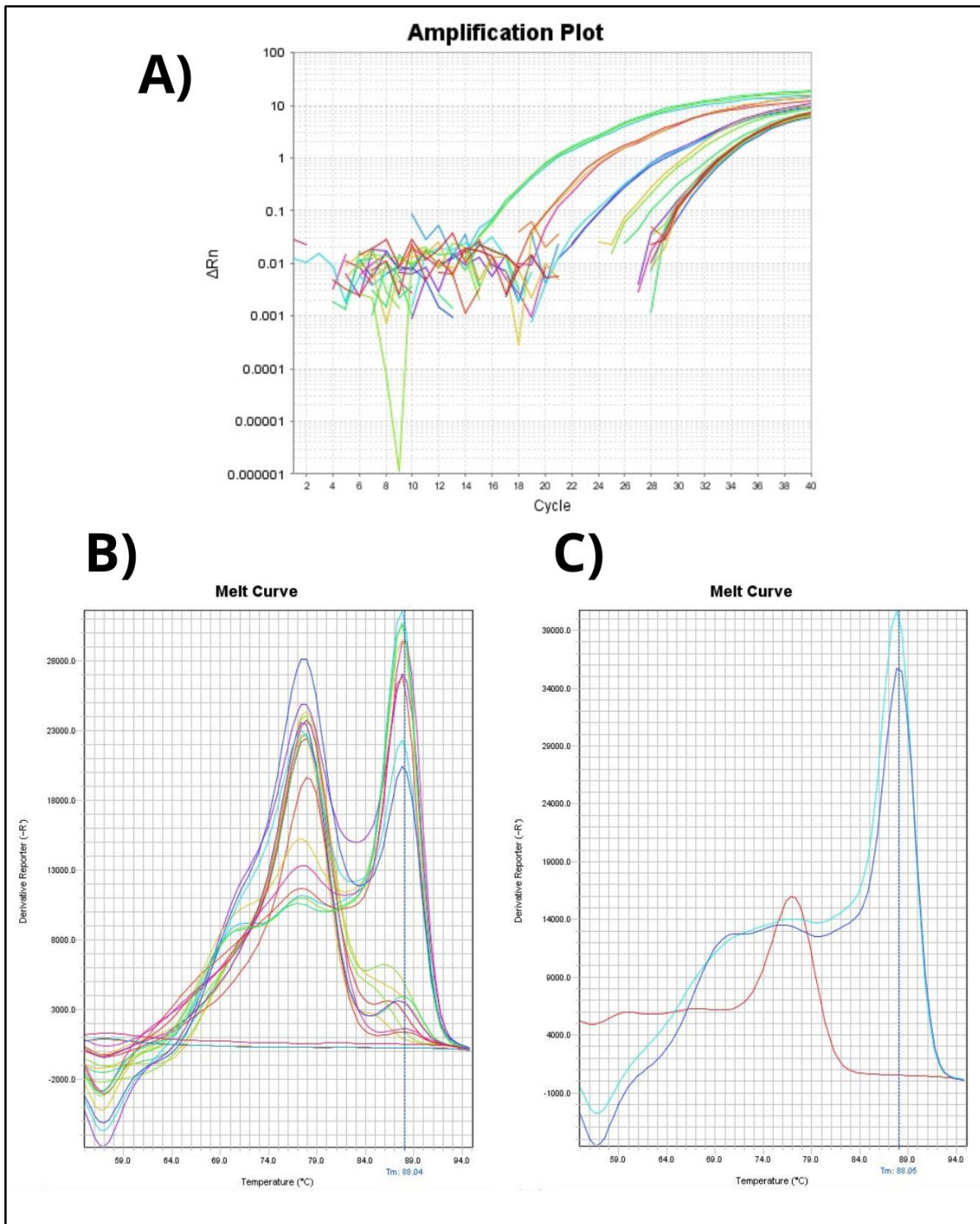


Figura 17. Gráficas representativas de los diversos problemas presentados en la qPCR para cuantificar el gen *pahE*. A: Curva de amplificación con los productos de las diluciones del plásmido con el inserto. En esta se observó cómo hubo amplificación incluso de los testigos negativos. B: Curva de disociación con los productos de amplificación de las diluciones empleadas, mostrándose dos picos en las temperaturas 77.5°C y 88.04°C, el primer pico representa a los dímeros formados, mientras que el pico más alto representa el producto verdadero. C: Curva de disociación presentando la formación dímeros (curva rosa), una curva con un pico para el producto con solo el primer Forward (curva azul marino) y la curva con un pico producto de usar ambos oligonucleótidos (curva celeste).

Una de las soluciones que permitió resolver el problema de la formación de dímeros fue la estrategia reportada por Shahsavari et al. (2018), donde cambiaron la temperatura de medición de la fluorescencia y la agregaron como un paso extra en el programa del termociclador. Este paso adicional tuvo una duración de 15 segundos, con una temperatura de 80°C. A esta temperatura los dímeros formados por los oligonucleótidos se desnaturalizan, por lo que solamente se detectó la fluorescencia de los verdaderos productos de PCR. De esta forma se redujeron las sobreestimaciones en la cantidad de copias de producto. El resultado de esta prueba se puede observar en la figura 18, donde en la figura 18B se ve cómo la estrategia permitió reducir de manera significativa la fluorescencia de los productos inespecíficos en la curva de disociación, permitiendo inferir qué pico se trataba del producto que buscábamos.

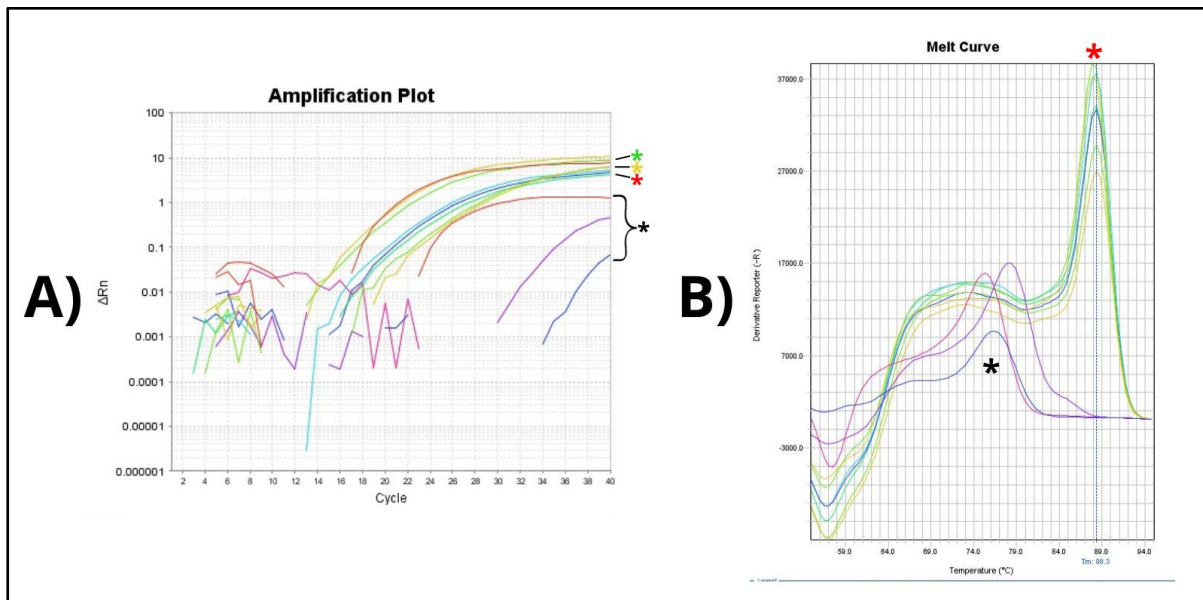


Figura 18. Prueba de PCR tiempo real para el gen *pahE* con medición de fluorescencia a los 80°C. Se realizó una prueba de PCR tiempo real aplicando una fase extra en cada ciclo donde la temperatura se elevaría a los 80°C, con base en lo reportado por Shahsavari et al. (2018). En la prueba se probaron tres concentraciones de oligonucleótidos por triplicado, empleando la dilución de 1×10^6 copias/ μ L del plásmido con el fragmento clonado de *pahE*. A: Se muestra la curva de amplificación de los experimentos. Se señalan con asteriscos a las curvas con las concentraciones 1 μ M (verde), 700 nM (amarillo) y 500 nM (rojo) para ambos oligonucleótidos. Los resultados de los controles negativos se señalan con un asterisco negro. B: Curva de disociación que muestra un único pico (señalado con un asterisco rojo) en los 88.3°C, derivado de la amplificación del verdadero fragmento *pahE*. Se observa el registro de fluorescencia en los testigos negativos de las tres concentraciones (asterisco negro), donde el menor pico con menor tamaño corresponde a la concentración de 500 nM.

Se trató de proceder con la estrategia planteada en la sección 6.4.7; sin embargo, los oligonucleótidos empezaron a generar productos inespecíficos al amplificar el fragmento de *pahE* presente tanto en el plásmido como en la cepa de *Acinetobacter lwoffii* MSB30. Esto se comprobó al separar los productos de PCR generados en una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (*p/v*). La comparación de la amplificación que mostraban en abril del 2023, y la que se obtuvo en experimentos desarrollados en agosto de ese mismo año

revelan múltiples bandas de productos inespecíficos. Aunque se intentó corregir el problema, los inconvenientes presentados en este punto no permitieron la continuación de la estandarización del gen *pahE*.

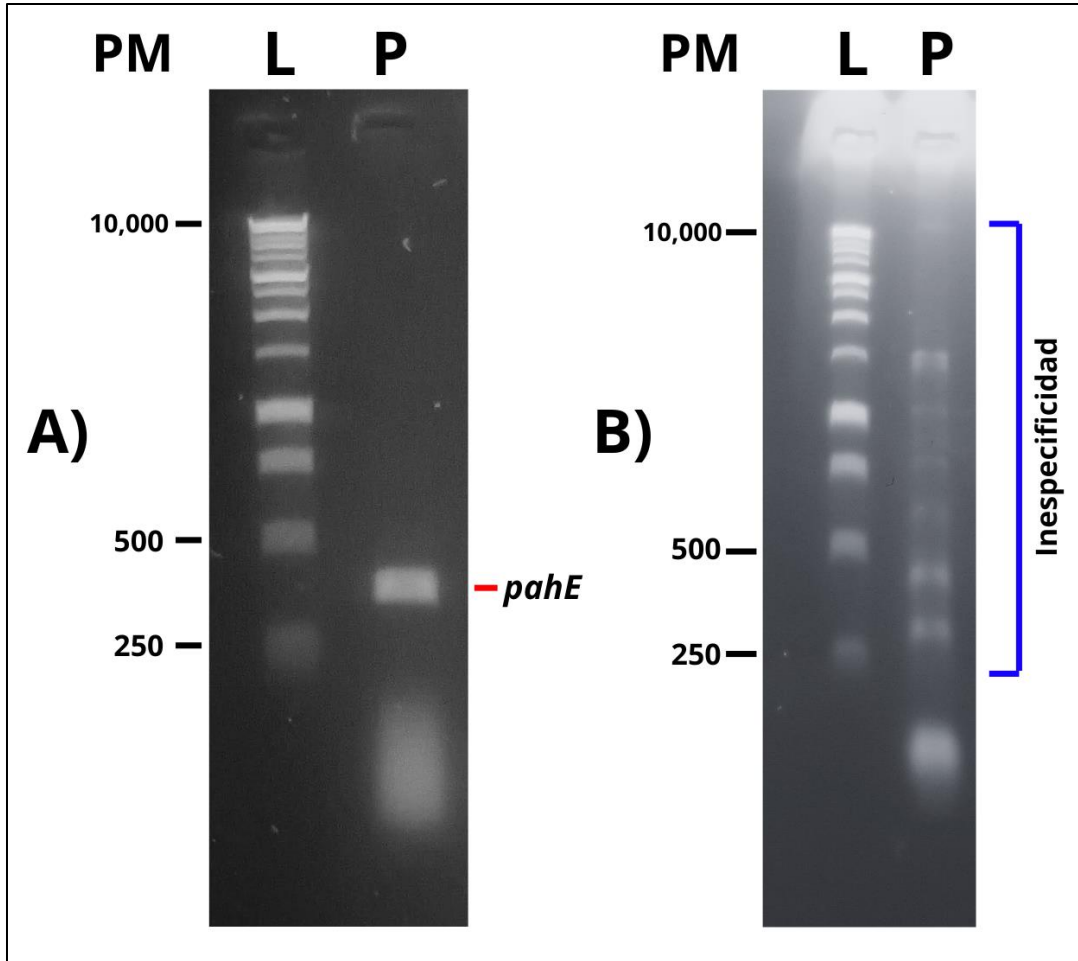


Figura 19. Comparación de las amplificaciones del fragmento *pahE*. Se observan los geles de electroforesis con los productos de PCR para el fragmento de 377pb bajo las mismas condiciones y concentraciones. A: Resultado de electroforesis de un experimento de PCR del gen *pahE* realizado el 14 de abril de 2023. Se resalta con una línea roja al fragmento *pahE*. B: Resultado de electroforesis de un experimento de PCR del gen *pahE* realizado el 11 de agosto del 2023. Se señala en corchete azul los productos inespecíficos. PM: peso molecular en pares de base. L: escalera de ADN de 1 Kb (PROMEGA). P: control positivo cepa MSB30 *Acinetobacter Iwoffii*.

7.5. Análisis de qPCR para los genes de resistencia a antibióticos *sul1* y *CTX*.

En el caso de los genes *sul1* y *CTX*, se trató de obtener el ADN plasmídico linealizado tal y como se hizo con el gen *pahE*; No obstante, hubo complicaciones al usar las enzimas *NdeI* y *ApaI*, ya que había pérdida del producto en su totalidad como se observa en la figura 20A y 20B. En la figura 20 se muestra como el producto esperado de la doble digestión debería presentarse en el tamaño esperado por las flechas rojas. Sin embargo, no hay producto perceptible, a excepción de una banda mayor al rango de la escalera de ADN utilizada, el cual corresponde al ADN plasmídico. Esto impidió realizar la digestión con solo la enzima *NdeI* como se planeó en la sección 6.4.6, al igual que continuar con la qPCR.

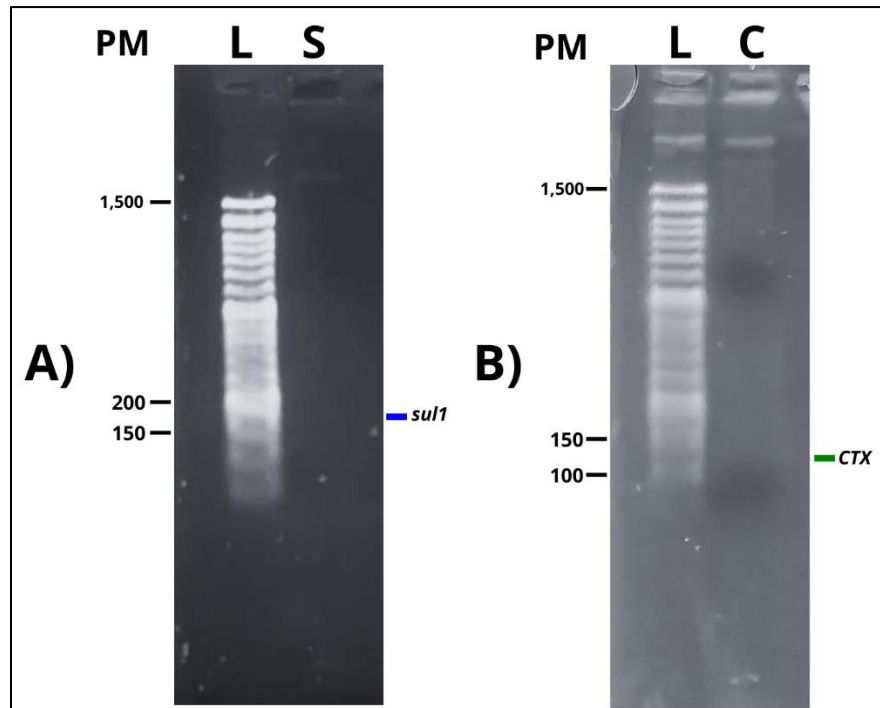


Figura 20. Electroforesis de los productos de las digestiones enzimáticas dobles para *sul1* y *CTX*. A: Gel de electroforesis para visualizar el producto obtenido de la digestión enzimática para corte del plásmido con el gen *sul1*. La línea azul señala al tamaño teórico de *sul1*, el cual es 162 pb. B: Gel de electroforesis para observar el producto de la digestión enzimática en el plásmido con el inserto del gen *CTX*. La línea verde señala al tamaño teórico de *CTX*, el cual es 101 pb. En ambos casos se observa la inexistencia del producto a pesar de haber desarrollado el protocolo como el proveedor aconsejaba. PM: Peso molecular en pares de base. L: Escalera de 50 -1,500 pb (bio-Helix). S: Pocillo con el producto de corte del plásmido con el inserto *sul1*. C: Pocillo con el producto de corte del plásmido con el inserto *CTX*.

8. Discusión

La contaminación en las zonas costeras por contaminantes prioritarios (como los HAPs) y emergentes (como los antibióticos y en consecuencia la selección de cepas bacterianas con genes de resistencia a estos) es un tema de alta relevancia debido a las repercusiones a la salud que tienen sobre el ecosistema marino en corto y largo plazo (Deblonde et al., 2011; Eriksson et al., 2007). En la costa de Baja California hay registro de contaminación principalmente por los desechos generados en las zonas urbanas que terminan afectando al ambiente marino (Sánchez, 2012). La ubicuidad y características genéticas de las bacterias fueron puntos importantes para elegir a estos seres vivos como candidatas ideales para conocer la salud del ambiente marino costero del occidente de Baja California al hacer uso de los marcadores moleculares *pahE*, *CTX* y *sul1*. Los datos obtenidos por las pruebas de PCR punto final y el mapa (Fig. 12) realizado con los datos anteriores permitieron obtener información de gran relevancia respecto a la salud ambiental de la costa oeste de Baja California.

8.1. Presencia de genes en la región Norte: Tijuana y norte de Playas de Rosarito.

La mayoría de las muestras de los sitios correspondientes a esta zona amplificaron al gen *pahE*, y fue la zona que presentó la mayor cantidad de muestras con genes de resistencia a antibióticos (*sul1* y *CTX*). La mayoría de las muestras con amplificación de los genes antes mencionados provienen de sitios que se sitúan frente a las costas de Tijuana. Lo anterior puede ser debido a que la ciudad de Tijuana ha experimentado, en poco tiempo, un crecimiento poblacional y de urbanización que ha impactado en una serie de problemas ambientales (Obee et al., 1998). Se ha reportado que el 36% del total de la contaminación por HAPs en el ambiente en Tijuana se debe al alto tráfico de vehículos (que en su mayoría, tienen más de 6 años de uso), la abrasión de llantas, el desprendimiento del asfalto, fugas de aceite de los vehículos (por derrames) y la combustión incompleta de la gasolina y diésel por combustión interna (García-Flores et al., 2013; Quiñonez-Plaza et al., 2017). Las lluvias en estas zonas suelen darse entre invierno y primavera, y son el medio de transporte por el cual contaminantes como los HAPs son arrastrados a los cuerpos de agua más cercanos desde las calles y carreteras (Zhang et al., 2017; Brown & Peake, 2006). Por otro lado, solamente el 53% de las plantas de tratamiento de aguas residuales en Tijuana y Rosarito cumplen con las regulaciones estipuladas por las leyes mexicanas. Lo anterior implica que se desechan al mar del océano Pacífico altas cantidades de sólidos suspendidos, coliformes fecales y materia orgánica (Arreola-Serrano et al., 2022), y junto con ellos, residuos de fármacos consumidos por la población. En ese sentido, los antibióticos sin metabolizar pueden promover la adquisición de genes de resistencia en las bacterias (García et al., 2020). Cummings et al. (2011) realizaron un estudio en sedimento cercano y dentro del río Tijuana, y hallaron diversos genes de resistencia a quinolonas, dejando en evidencia

que, a pesar de no analizar a los genes *CTX* o *sul1*, sí hay genes de resistencia a antibióticos en el agua residual de la zona de Tijuana que se pueden transportar hacia el océano, sugiriendo la ineficiencia de las plantas de tratamiento. Una investigación más reciente, desarrollada por Shahar et al. (2024) reveló por métodos independientes de cultivo la presencia de genes de resistencia a antibióticos en la parte estadounidense del río Tijuana y su desembocadura en el océano Pacífico. Los genes de resistencia más comunes fueron los de resistencia a tetraciclina, resistencia a cloranfenicol asociados a plásmidos de *E. coli*, plásmidos o transposones que confieren resistencia al cloranfenicol a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, genes de resistencia asociados a la inactivación de macrólidos, betalactamasas asociadas a Enterobacterias y diversos genes que inactivan aminoglicósidos presentes en los genomas de Enterobacterias, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Vibrio*.

En el lado este de la Isla Coronado (sitio B26) se encontraron los genes *CTX*, *sul1* y *pahE*, mientras que en el lado oeste (sitio B44) no hubo amplificación de ningún gen. Lo anterior coincide, particularmente con el gen *pahE*, con el trabajo realizado por Macías-Zamora (1996), quien reporta una mayor cantidad de HAPs entre la isla Coronado y la costa de Baja California en comparación al lado oeste de la isla. Además, este mismo autor menciona tres fuentes de contaminación de HAPs: el tráfico marítimo y aéreo con derrames, y el flujo de la corriente de California desde Punta Loma (California) entre el lado este de la isla y la costa. Las masas de agua de la corriente de California mantienen una trayectoria principalmente hacia el sur en las épocas de invierno/primavera y sufren un retorno hacia el norte en verano/otoño (Durazo, 2015). Como se mencionó anteriormente, las temporadas de lluvia en la zona de Baja California y California ocurren también en invierno/primavera, lo cual refuerza la evidencia del transporte de una mayor cantidad de contaminantes hacia el sur. Es importante mencionar que la trayectoria de las corrientes puede llegar a ser afectadas por fenómenos ambientales como El Niño o La Niña. Sin embargo, en la zona analizada en este trabajo, la alteración de las corrientes por estos fenómenos es mínima (McPhaden, 2002).

Frente a la localidad de Rosarito la muestra del sitio B13, que se encuentra PEMEX y la central termoeléctrica de la CFE, presentó amplificación del gen *pahE*. Esta zona es un sitio de carga y descarga de petróleo y gasolinas que son transportados al continente a través de mangueras entre los buques, una monoboya y la central de PEMEX. En esta zona se tiene documentado la presencia de HAPs de origen pirogénico (por combustión de materia orgánica) y petrogénico (presencia de petróleo crudo, potencialmente proveniente de la monoboya y los buques) y también se ha reportado la presencia de bacterias degradadoras de hidrocarburos (Silva-Jiménez et al., 2018).

8.2. Presencia de genes en la región Centro: Playas de Rosarito.

En la región centro se encontró el gen *pahE* en 5 muestras de sitios cercanos a comunidades que van desde “Los Arenales” hasta el mirador “Salsipuedes” antes de llegar a la ciudad de Ensenada. Entre la zona que comprenden los sitios B47 (ubicado en “Los Arenales”) y B57 (a la altura del Norte de Punta Mezquite en la comunidad de Venustiano Carranza), se obtuvo la amplificación de los genes *pahE* y *CTX* en una sola muestra (B54), a la altura del complejo turístico Misión Viejo Sur. Se hipotetiza, a partir del mapa, que la descarga fluvial por canales puede ser el medio de transporte de contaminantes (HAPs y antibióticos). En el sitio correspondiente al área de Playa Escondida, en la comunidad de La Misión (B67), se encuentra la desembocadura del río que pasa por las comunidades de La Misión y Santa Anita. En los sedimentos de este sitio se amplificaron los tres genes analizados. La información en estas localidades es muy escasa; sin embargo, existe un reporte de Carrillo et al. (2014) donde se obtuvo información respecto a los residuos generados en la comunidad de La Misión y Santa Anita. En lo reportado, los autores explicaron que en la comunidad no hay sistema de drenaje, pero sí fosas sépticas, las cuales pueden remover los sólidos suspendidos; sin embargo, son ineficaces en la remoción de contaminantes químicos (aceites, detergentes, antibióticos) y biológicos (como bacterias) en las aguas que serán vertidas al río. Además, estas localidades no poseen un sistema de desecho de basura como en las grandes ciudades, por lo que esta, a menudo, es quemada o dejada al aire libre, estando expuesta a llegar al río. Adicionalmente, la quema de basura, como los empaques de plástico, pueden ser una fuente de HAPs al ambiente.

Al sur de la desembocadura del río La Misión se encuentra el complejo turístico Bajamar. Frente a este resort se encuentran cercanos los sitios B65, B66 y B68, donde las 3 muestras amplificaron el gen *pahE*; mientras que las muestras de los sitios B65 y B68 amplificaron también a *CTX*. La presencia de estos genes puede deberse a que, en la zona cercana al complejo turístico, hacia al norte, se encuentra puerto Salina “La Marina”, el cual es una zona residencial con lugar de entrada y salida de barcos de pesca deportiva, los cuales pueden liberar contaminantes derivados del combustible empleado. Por otro lado, al sur de Bajamar, antes de llegar al mirador de Salsipuedes, se encuentra Energía Costa azul, una empresa dedicada a la extracción, distribución y almacenamiento de gas natural licuado cuyos residuos acuosos son liberados al mar por medio de descargas. Al respecto, el trabajo de Quintero-Nuñez et al. 2014 ahonda en el impacto ambiental provocado por la instalación y funcionamiento de esta terminal, la cual representa una fuente importante de contaminación y perturbaciones al ecosistema. Otra posible respuesta a la presencia de estos genes en esta área podría ser la entrada de contaminantes derivados de la descarga de aguas residuales desde el río La Misión que viajan hacia el sur por las corrientes, que someten a estrés selectivo a las bacterias que habitan el lugar (corriente de California). Actualmente, no existen estudios que hablen sobre la descarga de contaminantes que sean originados desde el complejo turístico.

8.3. Presencia de genes en la región Sur: Ciudad de Ensenada.

Tres muestras de los sitios B62, B69 y B74, cercanos a las orillas de la bahía de Salsipuedes, amplificaron el gen *pahE*. Al momento, no existen trabajos publicados que hablen específicamente sobre la contaminación por HAPs en el área de Salsipuedes, sin embargo, los resultados obtenidos en el laboratorio de Bacteriología Marina del IIO-UABC (comunicación personal) afirman que todos los sitios (con excepción de B57, B62 y B65) del sur de la costa presentan HAPs, lo cual se comprobó por cuantificación mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). La presencia de genes *pahE* en estos sitios puede deberse a transferencia de genes entre comunidades y la persistencia de estos en el tiempo (Yuan et al., 2017). Sobre la fuente de contaminantes en este territorio, existe un reporte sobre contaminantes relacionados a los insecticidas que son descargados hacia estos lugares a través de aguas residuales o fluviales (Hernández-Guzmán et al., 2017), por lo que podemos asegurar que existe un flujo de contaminantes que se depositan en la zona a través de descarga urbana.

Respecto a la muestra del sitio B70, esta no presentó amplificación de ninguno de los genes a pesar de que se encontraba rodeado por sitios que fueron positivos a *pahE*. Este resultado pudo deberse a la distancia del sitio de extracción de la muestra de sedimento y la concentración de contaminantes derivados de la descarga. Lo anterior es sustentado por Jinshu et al. (2004), ya que ellos analizaron la concentración de HAPs en sedimentos marinos cercanos y alejados de las costas y observaron una tendencia a que la concentración de contaminantes se reducía conforme se alejaba de la costa. Otra posible respuesta al resultado anterior se puede vincular a la cobertura de clados de los oligonucleótidos utilizados (*pahE1-F* y *pahE1-R*), los cuales son 1 de 4 pares empleados por Liang et al. (2019). Estos autores reportaron 4 pares de oligonucleótidos para distintas regiones del gen representados como *pahE1*, *pahE2*, *pahE3* y *pahE4*, y que su empleo simultáneo puede abarcar la mayor cantidad de secuencias registradas para el gen. La experimentación con los pares no usados podría resultar en la amplificación del gen en el sitio B70. Se mencionó también que al descubrir nuevas secuencias de *pahE*, se podrá determinar una región más conservada del gen, lo cual podrá ayudar a minimizar la cantidad de pares de oligonucleótidos necesarios para abarcar el espectro de bacterias que lo poseen.

Acercándonos más al sur y adentrándonos al área urbana, en las muestras provenientes de la costa de la ciudad de Ensenada amplificaron al menos uno de los genes de interés (con la excepción de las muestras de los sitios E96 y E97). La ciudad de Ensenada es una ciudad portuaria que desde 1988 ha tenido reportes de la baja calidad del agua cerca de los sitios de las plantas de tratamiento de la ciudad (el Sauzal, el Naranjo y el Gallo) debido a su mal estado, cuyo problema solo ha empeorado en los últimos años (Tanahara et al., 2021). Los desechos llevados por las lluvias y el mal funcionamiento de las plantas de tratamiento de aguas residuales son dos fuentes de todo tipo de contaminantes a la bahía. Sumado a esto, el puerto de Ensenada presenta aguas contaminadas provenientes de diferentes actividades en el muelle, como procesamiento

de peces, reparación y mantenimiento de barcos, y desechos comerciales (De la Lanza Espino et al., 2010). Previamente, se ha reportado que la bahía de Todos Santos tenía presencia de HAPs y que el origen de estos contaminantes era por aire, derivada de la combustión de vegetación y quema de combustibles fósiles (Macías-Zamora et al., 2002). Finalmente, los contaminantes que son esparcidos en la costa suelen ser arrastrados por las corrientes marinas que entran desde el norte de la isla Todos Santos y salen por el sur de esta, donde todas las partículas viajan hacia el centro de la bahía para seguir su curso hasta ser depositadas en el sedimento marino (Sánchez & Carriquiry, 2011).

Por otro lado, existen actividades de maricultura en Punta Banda, Salsipuedes y las islas Coronado cercanas a Tijuana, y cabe señalar que en estas 3 zonas se encontraron sitios positivos a la amplificación de al menos uno de los genes, principalmente *pahE* (García-Mendoza et al., 2008). Estas actividades no usan antibióticos (Santos & Ramos, 2018; Zertuche et al., 2008); sin embargo, se puede inferir que el transporte marítimo a estas áreas es una fuente de contaminantes relacionados a combustibles que también someten a estrés a las bacterias.

8.4. Generalidades y relación entre la presencia del gen *pahE* y los genes de resistencia a antibióticos *sul1* y *CTX*.

En este trabajo se encontró una mayor dominancia del gen *pahE* en comparación a los genes de resistencia a antibiótico, siendo este detectado en más de la mitad del total de las muestras recolectadas en la costa e incluso presente junto con los genes de resistencia a antibióticos (a excepción del sitio B09). Se presume que la deposición atmosférica y la escorrentía urbana son algunas de las formas por las cuales los contaminantes (plaguicidas, fármacos, aceites, etc.) llegan al ambiente marino y someten a estrés selectivo a los microorganismos causando la obtención de estos genes, siendo transportados a los cuerpos de agua más pequeños para terminar uniéndose a los más grandes (Sauret et al., 2016; Aguilar-Aguilar et al., 2023; Latimer & Zheng, 2003). Fenómenos recurrentes como los vientos de Santa Ana, transportan partículas de polvo al Golfo de California y al Océano Pacífico, al igual que causan incendios en la zona de California y Baja California, por lo que estos también son considerados contribuyentes a la contaminación (Westerling et al., 2004; Li et al., 2019).

La presencia de bacterias con genes de resistencia a antibióticos y genes de degradación de HAPs en sitios contaminados por hidrocarburos es algo que se ha reportado anteriormente. Wang et al. (2017) encontraron que una concentración de HAPs de 10 mg/L puede incrementar la abundancia de genes de resistencia a antibióticos en comunidades microbianas costeras, y que el principal mecanismo en el que lo hacen es por conjugación genética. De igual manera existen otros estudios que coinciden en que la presencia de HAPs y otros contaminantes como los plaguicidas someten a las comunidades bacterianas a un estrés selectivo que las hace adquirir genes de resistencia

antibióticos, entre ellos *sul1* y aquéllos relacionados a las β -lactamasas (cuyo mecanismo es similar contra las cefalosporinas, de los cuales *CTX* forma parte), presentando mayor cantidad de estos en comparación a sitios de menor impacto antropogénico (Das et al., 2021; Li et al., 2015; Chen et al., 2017; Qiu et al., 2022).

Por último, se observó que el gen *CTX* se presentó con mayor frecuencia en comparación al gen *sul1*. Existen estudios que hablan sobre cómo ambos genes (*sul1* y *CTX*) son abundantes en plantas de tratamiento de aguas residuales, al igual que se menciona que aquellos genes de resistencia relacionados a las β -lactamasas suelen tener un mayor espectro de resistencia (Rizzo et al., 2013; Wang et al 2020), lo que nos permite inferir que es probable que estos genes sean conservados más tiempo en el ambiente por su utilidad ante una variedad de antibióticos, promoviendo su detección con mayor frecuencia.

8.5. PCR tiempo real: adversidades encontradas y perspectivas.

A pesar de no haber podido concluir la experimentación en PCR tiempo real con los tres genes mencionados, se logró conocer el número potencial de bacterias que fueron analizadas en cada sitio por el gen *16S rRNA*. La cantidad de copias de gen que se registraron coinciden dentro del rango reportado en otros estudios (Buongiorno et al., 2017; Li et al., 2018), donde Li et al. También reportaron que las temporadas de lluvias pueden aumentar hasta dos veces la cantidad de copias de genes y que esto se puede deber al ingreso de nuevas sustancias que nutren a las comunidades bacterianas.

No se observó alguna relación entre los genes de resistencia a antibióticos detectados y el número de genes *16S rRNA* cuantificados. Tampoco se observó algún patrón respecto al número de genes y la profundidad en la que se tomó la muestra. Otro factor a tener en cuenta, que puede afectar a la cantidad de bacterias en la muestra, es el tipo de sedimento. En este sentido, Valenzuela-Suarez (2021) analizó el tamaño de partícula de sedimento y porcentaje de carbono orgánico en las muestras utilizadas en este trabajo. Al comparar estos resultados con algunas de las cuantificaciones de bacterias más altas (como el sitio B57) y más pequeñas (como el sitio B09) se observó que las características de los sedimentos no influyen en la cantidad de bacterias. Finalmente, otros factores como la depredación de las bacterias, también pueden afectar la abundancia de estas en los sedimentos (Santmire & Leff, 2007).

Por otro lado, los oligonucleótidos empleados en este trabajo para la cuantificación del gen *16S rRNA* presentaron una serie de problemas. Como se refirió en la tabla 1, estos fueron los mismos que se usaron en estudios publicados por otros autores, por lo que se esperaba que al replicar la metodología se obtuvieran resultados similares. Sin embargo, se tuvieron que modificar las temperaturas de alineamiento y las concentraciones utilizadas durante la experimentación. El diseño de oligonucleótidos con degeneraciones es útil, aunque existe la desventaja de amplificar una variedad de genes desconocidos,

pero similares, al que se busca amplificar (Linhart & Shamir, 2002). Gaby y Buckley (2017) recomendaron que para el correcto empleo de oligonucleótidos degenerados (como *pahE*) es necesario realizar varios ajustes, como la concentración de estos, la estandarización de la temperatura de alineamiento y análisis del ADN molde con el fin de aumentar la especificidad. Respecto a los genes *CTX* y *sul1*, se logró obtener clonas con el inserto de cada gen de interés y se corroboró la presencia de estos por medio de PCR; sin embargo, no se pudo realizar la experimentación por qPCR ya que se presentaron problemas en la liberación de los fragmentos al aplicar el protocolo de digestión con enzimas de restricción NEB.

Aunque el objetivo de proponer a los genes *sul1*, *CTX* y *pahE* no se logró concluir, se dejaron las herramientas, protocolos y estandarizaciones planteadas que permitirán el desarrollo de un futuro proyecto. La PCR tiempo real es un paso indispensable para monitorear los cambios en la salud de las comunidades bacterianas, ya que se proponía hacer uso de la misma para cuantificar la cantidad de genes en diferentes periodos como ya se ha reportado en diversos trabajos en otras partes del mundo (Murata et al., 2011; Yuan et al., 2017).

9. Conclusiones

La costa oeste de Baja California es una zona que es continuamente afectada por la contaminación derivada del impacto antropogénico. La entrada de estos contaminantes al medio acuático por medio de la descarga urbana se ha visto reflejada a una escala genética en las comunidades bacterianas al presentar genes que se relacionan a la respuesta a estas sustancias. La hipótesis de este trabajo fue confirmada al detectar genes de resistencia a antibióticos y de degradación de hidrocarburos en muestras obtenidas de puntos situados cerca de las grandes ciudades, así como cerca de las plantas de tratamiento de aguas residuales y de los canales cercanos a comunidades con un mal manejo de los desechos que terminan siendo transportados hacia el océano. En isla Coronado, lugar alejado de la urbanización, se presentó la amplificación de estos genes cuya potencial fuente de contaminantes se deriva del tráfico marítimo y la deposición de contaminantes por corrientes. El gen más abundante fue *pahE*, el cual está ligado a contaminantes como HAPs, que son capaces de ejercer presión selectiva en bacterias confiriéndoles la potencial adquisición de genes de resistencia a antibióticos. Si bien no se logró concluir los experimentos por medio de qPCR para proponer a los genes para el monitoreo de las costas por medio de la cuantificación de bacterias, se obtuvieron datos por PCR punto final que son de alta importancia respecto a la salud del ambiente marino y que junto a la bibliografía consultada permitió inferir la fuente de contaminación.

10. Referencias bibliográficas

Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian journal of petroleum*, 25(1), 107-123.

Aguilar-Aguilar, A., de León-Martínez, L. D., Forjionny, A., Soto, N. Y. A., Mendoza, S. R., & Zárate-Guzmán, A. I. (2023). A systematic review on the current situation of emerging pollutants in Mexico: A perspective on policies, regulation, detection, and elimination in water and wastewater. *Science of The Total Environment*, 167426.

Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128(6), 1037-1050.

Antunes, P., Machado, J., Sousa, J. C., & 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.

Arreola-Serrano, A. S., Mendoza-Espinosa, L. G., Hernández-Cruz, A., Daesslé, L. W., & Villada-Canela, M. (2022). Quantifying the pollutant load into the Southern California Bight from Mexican sewage discharges from 2011 to 2020. *Frontiers in Water*, 4, 993713.

Arizpe, A., Reveles, K. R., Patel, S. D., & Aitken, S. L. (2016). Updates in the management of cephalosporin-resistant Gram-negative bacteria. *Current infectious disease reports*, 18(12), 1-12.

Avalos-Téllez, R., Hernández-Castro, R., Ramírez-Delgado, D., Suzán, G., & Suárez-Güemes, F. (2017). Sea Lions (*Zalophus californianus*) as a Sentinel of Antibiotic Resistant Bacteria in Pacific Islands and the Gulf of California, Mexico. *IAAAM*.

Bhattacharjee, S., & Dutta, T. (2022). An overview of oil pollution and oil-spilling incidents. *Advances in Oil-Water Separation*, 3-15.

Blanchard, M., Teil, M. J., Ollivon, D., Legenti, L., & Chevreuil, M. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorobiphenyls in wastewaters and sewage sludges from the Paris area (France). *Environmental research*, 95(2), 184-197.

Botello, A. V. (2005). Características, composición y propiedades fisicoquímicas del petróleo. *Golfo de México contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*, 1(1), 261-268.

Brown, J. N., & Peake, B. M. (2006). Sources of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons in urban stormwater runoff. *Science of the total environment*, 359(1-3), 145-155.

Bru, D., Martin-Laurent, F., & Philippot, L. (2008). Quantification of the detrimental effect of a single primer-template mismatch by real-time PCR using the *16S rRNA* gene as an example. *Applied and environmental microbiology*, 74(5), 1660-1663.

Buongiorno, J., Turner, S., Webster, G., Asai, M., Shumaker, A. K., Roy, T., ... & Lloyd, K. G. (2017). Interlaboratory quantification of Bacteria and Archaea in deeply buried sediments of the Baltic Sea (IODP Expedition 347). *FEMS Microbiology Ecology*, 93(3).

Carrillo, V. W. B., de la Peña Nettel, G., De la Torre Barrera, A., Guerrero, S. D. D. D. L., Velasco, C. E. J., Ríos, N. L., ... & del Rosario Norzagaray, M. (2014). MISIÓN: NUESTRA BASURA Plan de manejo alternativo de los residuos sólidos urbanos de La Misión.

Castro, L. V., & Vazquez, F. (2009). Fractionation and characterization of Mexican crude oils. *Energy & fuels*, 23(3), 1603-1609.

Chen, B., He, R., Yuan, K., Chen, E., Lin, L., Chen, X., Sha, S., Zhong, J., Lin L., Yang, L., Yang, Y., Wang, X., Zou, S., Luan, T., (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) enriching antibiotic resistance genes (ARGs) in the soils. *Environmental pollution*, 220, 1005-

1013.

Comisión Nacional del Agua. (2021). Inventario Nacional de Plantas Municipales de Potabilización y de Tratamiento de Aguas Residuales en Operación. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/759492/Inventario_2021.pdf

Council of the European Union, European Parliament. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Off J Eur Union* 2013; L 226:1–17.

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. & Zuill, D. E. (2011). Broad dissemination of plasmid-mediated quinolone resistance genes in sediments of two urban coastal wetlands. *Environmental Science & Technology*, 45(2), 447-454.

Das, N., Kotoky, R., Maurya, A. P., Bhuyan, B., & Pandey, P. (2021). Paradigm shift in antibiotic-resistome of petroleum hydrocarbon contaminated soil. *Science of The Total Environment*, 757, 143777.

Daughton. G (2004). Non-regulated water contaminants: emerging research. 24(7-8), 711–732. Doi:10.1016/j.eiar.2004.06.003.

Davis Jr, R. A., & FitzGerald, D. M. (2009). *Beaches and coasts*. John Wiley & Sons.

De la Lanza Espino, G., Rodríguez, I. P., & Czitrom, S. P. (2010). Water quality of a port in NW Mexico and its rehabilitation with swell energy. *Marine Pollution Bulletin*, 60(1), 123-130.

Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., & Hartemann, P. (2011). Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *International journal of hygiene and environmental health*, 214(6), 442-448.

Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., ... & Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews*, 30(4), 293-342.

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.

Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H., & Spratt, B. G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11), 7687-7692.

Eriksson, E., Baun, A., Scholes, L., Ledin, A., Ahlman, S., Revitt, M., ... & Mikkelsen, P. S. (2007). Selected stormwater priority pollutants—a European perspective. *Science of the total environment*, 383(1-3), 41-51.

Farshadzadeh, Z., Khosravi, A. D., Alavi, S. M., Parhizgari, N., & Hoveizavi, H. (2014). Spread of extended-spectrum β -lactamase genes of *bla* OXA-10, *bla* PER-1 and *bla* CTX-M in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. *Burns*, 40(8), 1575-1580.

Gaby, J. C., & Buckley, D. H. (2017). The use of degenerate primers in qPCR analysis of functional genes can cause dramatic quantification bias as revealed by investigation of *nifH* primer performance. *Microbial ecology*, 74, 701-708.

García, J., García-Galán, M. J., Day, J. W., Boopathy, R., White, J. R., Wallace, S., & Hunter, R. G. (2020). A review of emerging organic contaminants (EOCs), antibiotic resistant bacteria (ARB), and antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment: Increasing removal with wetlands and reducing environmental impacts. *Bioresource technology*, 307, 123228.

García-Flores, E., Wakida, F. T. and Espinoza-Gomez, J. H. (2013). Sources of poly cyclic aromatic hydrocarbons in urban storm water runoff in Tijuana, Mexico.

García-Mendoza, E., Cáceres-Martínez, J., Rivas, D., Fimbres-Martínez, M., Sánchez-Bravo, Y., Vásquez-Yeomans, R., & Medina-Elizalde, J. (2018). Mass mortality of cultivated

northern bluefin tuna *Thunnus thynnus orientalis* associated with *Chattonella* species in Baja California, Mexico. *Frontiers in Marine Science*, 454.

Garza-Ramos, U., Silva-Sánchez, J., & Martínez-Romero, E. (2009). Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud pública de México*, 51, s439-s446.

Gleckman, R., Alvarez, S., & Joubert, D. W. (1979). Drug therapy reviews: trimethoprim-sulfamethoxazole. *American Journal of Hospital Pharmacy*, 36(7), 893-906.

Gössling, S., Hall, C. M., & Scott, D. (2018). Coastal and ocean tourism. In *Handbook on marine environment protection* (pp. 773-790). Springer, Cham.

Green, M. R., & Sambrook, J. (2016). Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with sodium dodecyl sulfate: minipreps. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016(10).

Guo, X., Yan, Z., Zhang, Y., Xu, W., Kong, D., Shan, Z., & Wang, N. (2018). Behavior of antibiotic resistance genes under extremely high-level antibiotic selection pressures in pharmaceutical wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 612, 119-128.

Hernández-Guzmán, F. A., Macías-Zamora, J. V., Ramírez-Álvarez, N., Alvarez-Aguilar, A., Quezada-Hernández, C., & Fonseca, A. P. (2017). Treated wastewater effluent as a source of pyrethroids and fipronil at Todos Santos Bay, Mexico: its impact on sediments and organisms. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(11), 3057-3064.

Hoshino, T., Doi, H., Uramoto, G. I., Wörmer, L., Adhikari, R. R., Xiao, N., Morono, Y., D'Hondt, S., Hinrichs, K., & Inagaki, F. (2020). Global diversity of microbial communities in marine sediment. *Proceedings of the national academy of sciences*, 117(44), 27587-27597.

Ingersoll, C., Locke, R. M., & Reavis, C. (2012). BP and the Deepwater Horizon Disaster of 2010.

Jawad, A. M., Aljamali, N. M., & Aseel, M. J. (2020). Innovation, Preparation of Cephalexin Drug Derivatives and Studying of (Toxicity & Resistance of Infection). *International Journal of Psychosocial Rehabilitation*, 24(04), 3754-3767.

Jinshu, Z., Richardson, B. J., Shouming, O., & Jianhua, Z. (2004). Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) in marine environment of China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 22, 136-145.

Kielhofner, M. A. (1990). Trimethoprim-sulfamethoxazole: pharmacokinetics, clinical uses, and adverse reactions. *Texas Heart Institute Journal*, 17(2), 86.

Kumar, M., Borah, P., & Devi, P. (2020). Priority and emerging pollutants in water. In *Inorganic Pollutants in Water* (pp. 33-49). Elsevier.

Kumari, A., Harshawardhan, R., Kushawaha, J., & Nandi, I. (2022). Spatial Identification of Vulnerable Coastal Ecosystems for Emerging Pollutants. In *Coastal Ecosystems* (pp. 359-386). Springer, Cham.

Latimer, J. S., & Zheng, J. (2003). The sources, transport, and fate of PAHs in the marine environment. *PAHs: an ecotoxicological perspective*, 7-33.

Lawal, A. T. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. *Cogent Environmental Science*, 3(1), 1339841.

Li, A., Chen, L., Zhang, Y., Tao, Y., Xie, H., Li, S., ... & Wen, D. (2018). Occurrence and distribution of antibiotic resistance genes in the sediments of drinking water sources, urban rivers, and coastal areas in Zhuhai, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 26209-26217.

Li, A. X., Wang, Y., & Yung, Y. L. (2019). Inducing factors and impacts of the October 2017 California wildfires. *Earth and Space Science*, 6(8), 1480-1488.

Li, B., Yang, Y., Ma, L., Ju, F., Guo, F., Tiedje, J. M., & Zhang, T. (2015). Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes. *The ISME journal*, 9(11), 2490-2502.

Liang, C., Huang, Y., & Wang, H. (2019). *pahE*, a functional marker gene for polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 85(3), e02399-18.

Linhart, C., & Shamir, R. (2002, July). The degenerate primer design problem. In *ISMB* (pp. 172-181).

Locey, K. J., & Lennon, J. T. (2016). Scaling laws predict global microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(21), 5970-5975.

Lu, J., Zhang, Y., Wu, J., Wang, J., Zhang, C., & 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.

Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L., & Bieger, D. (2000). *Color atlas of pharmacology*. New York: Thieme. P. 273.

Macías-Zamora, J. (1996). Distribution of hydrocarbons in recent marine sediments off the coast of Baja California. *Environmental Pollution*, 92(1), 45-53.

Macías-Zamora, J. V., Mendoza-Vega, E., & Villaescusa-Celaya, J. A. (2002). PAHs composition of surface marine sediments: a comparison to potential local sources in Todos Santos Bay, BC, Mexico. *Chemosphere*, 46(3), 459-468.

Marshall, W. F., & Blair, J. E. (1999). The cephalosporins. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 74, No. 2, pp. 187-195). Elsevier.

Martínez, M. L., Intralawan, A., Vázquez, G., Pérez-Maqueo, O., Sutton, P., & Landgrave, R. (2007). The coasts of our world: Ecological, economic and social importance. *Ecological economics*, 63(2-3), 254-272.

Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B., Sánchez, H., Álvarez, H., & Gutiérrez, A. (2005). Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 39(1), 27-36.

McPhaden, M. J. (2002). El Niño and La Niña: causes and global consequences. *Encyclopedia of global environmental change*, 1, 353-370.

Ministry of Ecology and Environment of the People's Republic of China. (2017). Prioritized list of substance to be subject to control (1st batch) [Internet]. Beijing, China. Recuperado el 15 de agosto de 2019, de http://www.mee.gov.cn/gkml/hbb/bgg/201712/t20171229_428832.htm

Molina, M. C., González, N., Bautista, L. F., Sanz, R., Simarro, R., Sánchez, I., & Sanz, J. L. (2009). Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. *Biodegradation*, 20(6), 789-800.

Murata, A., Takada, H., Mutoh, K., Hosoda, H., Harada, A., & Nakada, N. (2011). Nationwide monitoring of selected antibiotics: distribution and sources of sulfonamides, trimethoprim, and macrolides in Japanese rivers. *Science of the total Environment*, 409(24), 5305-5312.

Nardelli, M., Scalzo, P. M., Ramírez, M. S., Quiroga, M. P., Cassini, M. H., & Centrón, D. (2012). Class 1 integrons in environments with different degrees of urbanization. *PloS one*, 7(6), e39223.

National Center for Biotechnology Information (2022a). PubChem Compound Summary for CID 5329, Sulfamethoxazole. Retrieved February 22, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfamethoxazole>.

National Center for Biotechnology Information (2022b). PubChem Compound Summary for CID 27447, Cephalexin. Retrieved February 22, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cephalexin>.

Neira, C., Cossaboon, J., Mendoza, G., Hoh, E., & Levin, L. A. (2017). Occurrence and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of San Diego Bay marinas.

Marine pollution bulletin, 114(1), 466-479.

Obee, A. J., Griffin, E. C., & Wright, R. D. (1998). Using a GIS to overcome data adversity: industrial air pollution risk modeling in Tijuana, Mexico. *Photogrammetric engineering and remote sensing*, 64(11), 1089-1096.

Okano Y, Hristova KR, Leutenegger CM, Jackson LE, Denison RF, Gebreyesus B, Lebauer D, Scow KM (2004) Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Appl Environ Microbiol* 70:1008-16.

Ondon, B. S., Li, S., Zhou, Q., & Li, F. (2021). Sources of antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARGs) in the soil: a review of the spreading mechanism and human health risks. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Volume 256, 121-153.

Ordoñez-Burbano, D. E., Abella Medina, C. A., Echeverry Tamayo, A., Paz Lasprilla, L. M., & Benítez-Campo, N. (2018). Biodegradación de hidrocarburos alifáticos saturados por microorganismos aislados de suelo contaminado con derivados del petróleo. *Revista de Ciencias*, 22(2), 33-44.

Orozco-Borbón, M. V., Rico-Mora, R., Weisberg, S. B., Noble, R. T., Dorsey, J. H., Leecaster, M. K., & McGee, C. D. (2006). Bacteriological water quality along the Tijuana–Ensenada, Baja California, México shoreline. *Marine pollution bulletin*, 52(10), 1190-1196.

Pandey N, Cascella M. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; Treasure Island (FL): Sep 30, 2021. Beta Lactam Antibiotics.

Patel, A. B., Shaikh, S., Jain, K. R., Desai, C., & Madamwar, D. (2020). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches. *Frontiers in microbiology*, 11, 562813. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.562813>.

Peynador C. & Escofet A. (2009). An Ad Hoc Procedure for the environmental assessment of ship grounding at Todos Santos Bay (BAJA CALIFORNIA, MEXICO): LESSONS AND PERSPECTIVES. *Environmental Impact Assessments*, 193.

Pickup, R. (1998, July). Molecular markers and river health: bacteria, a cautionary tale. In *Microbial Indicators of River Health—1997 Workshop* (p. 25).

Podolsky, S. H. (2018). The evolving response to antibiotic resistance (1945–2018). *Palgrave Communications*, 4(1), 1-8.

Qiu, D., Ke, M., Zhang, Q., Zhang, F., Lu, T., Sun, L., & Qian, H. (2022). Response of microbial antibiotic resistance to pesticides: An emerging health threat. *Science of The Total Environment*, 850, 158057.

Quintero-Núñez, M., Sanchez-Sanchez, C. D. C., García-Cueto, R., Santillán-Soto, N., Ojeda-Benítez, S., & Velázquez-Limón, N. (2014). Environmental impact of the Energía Costa Azul LNG terminal at Ensenada, BC, México. *WIT Trans Ecol Environ*, 181, 15-24.

Quiñonez-Plaza, A., Wakida, F. T., Temores-Peña, J., Rodríguez-Mendivil, D. D., Garcia-Flores, E., Pastrana-Corral, M. A., & Melendez-Lopez, S. G. (2017). Total petroleum hydrocarbons and heavy metals in road-deposited sediments in Tijuana, Mexico. *Journal of Soils and Sediments*, 17, 2873-2886.

Ramírez-Álvarez, N., Mendoza, L. M. R., Macías-Zamora, J. V., Oregel-Vázquez, L., Alvarez-Aguilar, A., Hernández-Guzmán, F. A., ... & Navarro-Olache, L. F. (2020). Microplastics: Sources and distribution in surface waters and sediments of Todos Santos Bay, Mexico. *Science of the Total Environment*, 703, 134838.

Richards, R. M. E., Taylor, R. B., & Zhu, Z. Y. (1996). Mechanism for Synergism between Sulphonamides and Trimethoprim Clarified. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 48(9), 981–984. [Doi:10.1111/j.2042-7158.1996.tb06017.x](https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1996.tb06017.x)

Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M. C., ... & Fatta-Kassinos,

D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Science of the total environment*, 447, 345-360.

Sánchez, A., & Carriquiry, J. D. (2011). Sediment transport patterns in Todos Santos Bay, Baja California, Mexico, inferred from grain-size trends. *Sediment transport in aquatic environments*, 3-18.

Sánchez-García, Y. (2012). Evaluación rápida de fuentes de contaminación ambiental por descargas al mar, en la franja costera de Tijuana-Ensenada, Baja California.

Sanders, M., Sivertsen, S., & Scott, G. (2002). Origin and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in surficial sediments from the Savannah River. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 43(4), 0438-0448.

Santmire, J. A., & Leff, L. G. (2007). The effect of sediment grain size on bacterial communities in streams. *Journal of the North American Benthological Society*, 26(4), 601-610.

Santos, L., & Ramos, F. (2018). Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(2), 135-143.

Sauret, C., Tedetti, M., Guigue, C., Dumas, C., Lami, R., Pujo-Pay, M., ... & Ghiglione, J. F. (2016). Influence of PAHs among other coastal environmental variables on total and PAH-degrading bacterial communities. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 4242-4256.

Sengupta, K., & Pal, S. (2021). A review on microbial diversity and genetic markers involved in methanogenic degradation of hydrocarbons: futuristic prospects of biofuel recovery from contaminated regions. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(30), 40288-40307.

Shahar, S., Sant, K. E., Allsing, N., & Kelley, S. T. (2024). Metagenomic analysis of microbial communities and antibiotic resistant genes in the Tijuana river, and potential sources. *Environmental Pollution*, 342, 123067.

Shahbaz, K. (2017). Cephalosporins: pharmacology and chemistry. *Pharmaceutical and Biological Evaluations*.

Silva-Jiménez, H., Araujo-Palomares, C. L., Macías-Zamora, J. V., Ramírez-Álvarez, N., García-Lara, B., & 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), 214-225.

Sköld, O. (2000). Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug resistance updates*, 3(3), 155-160

Souza, F. S., & Féris, L. A. (2016). Hospital and municipal wastewater: identification of relevant pharmaceutical compounds. *Water Environment Research*, 88(9), 871-877.

Supuran, C. T. (2017). Sulfonamides. *Molecules*, 22(10), 1642.

Tanahara, S., Canino-Herrera, S. R., Durazo, R., Félix-Bermúdez, A., Vivanco-Aranda, M., Morales-Estrada, E., & del Carmen Lugo-Ibarra, K. (2021). Spatial and temporal variations in water quality of Todos Santos Bay, northwestern Baja California, Mexico. *Marine pollution bulletin*, 173, 113148.

United States Environmental Protection Agency (2014). Priority Pollutant List.

Vargas-Berrones, K., Bernal-Jácome, L., de León-Martínez, L. D., & Flores-Ramírez, R. (2020). Emerging pollutants (Eps) in Latin América: A critical review of under-studied Eps, case of study-Nonylphenol. *Science of the Total Environment*, 726, 138493.

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.

- Viggor, S., Juhanson, J., Jõesaar, M., Mitt, M., Truu, J., Vedler, E., & Heinaru, A. (2013). Dynamic changes in the structure of microbial communities in Baltic Sea coastal seawater microcosms modified by crude oil, shale oil or diesel fuel. *Microbiological research*, 168(7), 415-427.
- Vigneron, A., Alsop, E. B., Chambers, B., Lomans, B. P., Head, I. M., & Tsesmetzis, N. (2016). Complementary microorganisms in highly corrosive biofilms from an offshore oil production facility. *Applied and environmental microbiology*, 82(8), 2545-2554.
- Villaescusa-Celaya, J. A., Gutiérrez-Galindo, E. A., & Flores-Muñoz, G. (2000). Heavy metals in the fine fraction of coastal sediments from Baja California (Mexico) and California (USA). *Environmental Pollution*, 108(3), 453-462.
- Wait, A. D., Tuit, C. B., & Maney, J. P. (2020). Forensic sampling practices for oil spills in the marine environment. *Environmental Forensics*, 21(3-4), 310-318.
- Wang, J., Chu, L., Wojnárovits, L., & Takács, E. (2020). Occurrence and fate of antibiotics, antibiotic resistant genes (ARGs) and antibiotic resistant bacteria (ARB) in municipal wastewater treatment plant: An overview. *Science of the Total Environment*, 744, 140997.
- Wang, B., Ni, B. J., Yuan, Z., & Guo, J. (2019). Cometabolic biodegradation of cephalixin by enriched nitrifying sludge: process characteristics, gene expression and product biotoxicity. *Science of the Total Environment*, 672, 275-282.
- Wang, J., Zhao, Z., Chen, J., Lu, H., Liu, G., Zhou, J., & Guan, X. (2017). PAHs accelerate the propagation of antibiotic resistance genes in coastal water microbial community. *Environmental pollution*, 231, 1145-1152.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.
- Westerling, A. L., Cayan, D. R., Brown, T. J., Hall, B. L., & Riddle, L. G. (2004). Climate, Santa Ana winds and autumn wildfires in southern California. *Eos, Transactions American Geophysical Union*, 85(31), 289-296.
- Yang, X., Li, Z., Liu, Y., Xing, Y., Wei, J., Yang, B., Zhang, C., Yang R. T. & Tsai, C. J. (2019). Research progress of gaseous polycyclic aromatic hydrocarbons purification by adsorption. *Aerosol and Air Quality Research*, 19(4), 911-924.
- Yin, L., Chen, B., Xia, B., Shi, X., & Qu, K. (2018). Polystyrene microplastics alter the behavior, energy reserve and nutritional composition of marine jacobever (Sebastes schlegelii). *Journal of hazardous materials*, 360, 97-105.
- Yuan, K., Chen, B., Qing, Q., Zou, S., Wang, X., & Luan, T. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) enrich their degrading genera and genes in human-impacted aquatic environments. *Environmental Pollution*, 230, 936-944.
- Zertuche-González, J. A., Sosa-Nishizaki, O., Vaca Rodriguez, J. G., del Moral Simanek, R., Yarish, C., & Costa-Pierce, B. A. (2008). Marine science assessment of capture-based tuna (*Thunnus orientalis*) aquaculture in the Ensenada Region of Northern Baja California, Mexico.
- Zhang, Q., Hou, C., Shamsi, I. H., Ali, E., Muhammad, N., Shah, J. M., & Abid, A. A. (2015). Identification of super antibiotic-resistant bacteria in diverse soils. *Int. J. Agric. Biol*, 17(6), 1133.
- Zhang, J., Wu, J., Hua, P., Zhao, Z., Wu, L., Fan, G., Bai, Y., Kaeserberg, T. & Krebs, P. (2017). The influence of land use on source apportionment and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in road-deposited sediment. *Environmental Pollution*, 229, 705-714.

11. Anexo.

Anexo 1. Protocolo Dneasy PowerClean Pro Cleanup Kit.

Se pesaron 0.25 g de cada sedimento y se agregaron a tubos con perlas disruptivas "Powerbeads" junto con 800 μ L de solución CD1. Los tubos se colocaron en posición horizontal en una placa adaptada para vórtex y se agitaron por 10 minutos. Después, los tubos fueron centrifugados a 12,500 rpm por un minuto y se recuperaron los sobrenadantes para colocarlos en tubos nuevos de 1.5 mL. A cada sobrenadante se agregaron 200 μ L de solución CD2 y se aplicó vórtex por 5 segundos. La mezcla contenida en cada tubo se centrifugó a 12,500 rpm por un minuto. Del sobrenadante obtenido, se transfirieron 700 μ L a un tubo nuevo, se agregaron 600 μ L de la solución CD3 y se aplicó vórtex por 5 segundos. Esta mezcla se pasó a través de una columna MB, centrifugando a 12,500 rpm por un minuto y descartando el residuo líquido. Después la columna se colocó en un tubo de colección y se agregaron 500 μ L de la solución EA, se centrifugó a 12,500 rpm por 1 minuto y se descartó el líquido. Posteriormente se agregaron 500 μ L de solución C5 para después centrifugar a 12,500 rpm por 1 minuto. El líquido obtenido en el paso anterior se desechó y se centrifugó nuevamente la columna a 12,500 rpm por 2 minutos para eliminar restos de la solución C5. Finalmente, la columna se colocó en un tubo de elución y se agregaron 50 μ L de solución C6 a 37°C y se recuperó el ADN ambiental por centrifugación a 12,500 rpm por un minuto.

Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN genómico por método CTAB.

A partir de inóculos bacterianos crecidos toda la noche en medio LB líquido, se recuperó la pastilla celular y se resuspendió en 450 μ L de solución TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH a 8.0), se mezcló el contenido con vórtex por 1 minuto y luego se centrifugó a 13,000 rpm por 2 minutos, desechando el sobrenadante y repitiendo el proceso dos veces más. Después de los lavados se agregó 50 μ L SDS (dodecilsulfato sódico) al 10% y se incubó a 65°C por 1 hora. Terminado el tiempo de incubación, se mezcló por inversión, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se agregó 3 μ L de ARNasa 20 mg/mL y se incubó a 37°C por 30 minutos. Al término de la incubación, se agregaron 100 μ L de una solución de NaCl a 5 M, se mezcló por inversión y se dejó incubando a 65°C por 10 minutos en un termoblock. Después de lo anterior, se agregó 80 μ L de una solución de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) al 10% y NaCl 0.7 M, se mezcló por inversión y se incubó a 65°C por 30 minutos. Al final de la incubación, se agregaron 700 μ L de una solución de cloroformo; alcohol isoamílico y se mezcló fuertemente de manera manual (sin vórtex) por 1 min. A continuación se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos. Se extrajo la fase superior del sobrenadante sin tocar la capa inferior y se colocó en un tubo nuevo de 1.5 mL. De inmediato se agregó el 60% de equivalente al volumen obtenido de la extracción de ADN de una solución de fenol; cloroformo; alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó por 5 minutos a 13,000 rpm. Nuevamente el líquido se separó en dos

fases y se extrajo la capa superior para colocarla en un tubo de 1.5 mL nuevo. Se repitió de nuevo este paso, pero usando cloroformo; alcohol isoamílico (concentración 24:1). Una vez terminado estos pasos, el sobrenadante se colocó en otro tubo y se agregó el 60% del volumen obtenido de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se dejó reposar por 5 minutos. Después de lo anterior, se centrifugó a 13,000 rpm 10 minutos, descartando el sobrenadante y el ADN precipitado se lavó 3 veces con 500 μ L de etanol al 70%, mezclando con vórtex y centrifugando a 13,000 rpm por 5 minutos en cada paso. Finalmente, el etanol se desechó y la pastilla de ADN se secó a 37°C hasta no ver humedad, se resuspendió en 30 μ L de solución TE y se almacenó a -20°C para su posterior uso.

Anexo 3. Protocolo del Qiaquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN).

El procedimiento involucró pesar el fragmento de agarosa en un tubo de 1.5 mL, donde por cada 0.1 g de peso del fragmento, se agregaron 300 μ L de solución QG y se incubó a 50°C por 10 minutos hasta disolver cada gel. Después se agregaron 100 μ L de isopropanol por cada 0.1 g del peso inicial del gel y se mezcló por inversión. La solución obtenida de cada fragmento se transfirió a una columna sobre un tubo de colección, se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto y se desechó el líquido sobrante. Se repitió el paso anterior hasta que el contenido del tubo haya pasado por la columna. Una vez hecho lo anterior, se agregaron 500 μ L de buffer QG y se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto, nuevamente desechando el líquido que pasó por la membrana. El siguiente paso fue añadir 750 μ L de solución PE en la membrana y se dejó reposar por 5 minutos para continuar con una centrifugación a 13,000 rpm por 1 minuto, descartando el líquido que pase por la membrana y centrifugando una vez más para asegurar que no queden residuos de PE. Finalmente, se transfirió la columna con filtro a un tubo de 1.5 mL limpio, donde se obtuvo nuestro ADN al eluir con 30 μ L de solución EB caliente (~50°C), después de reposar la solución caliente por 1 minuto y centrifugar a 13,000 rpm por 1 minuto.

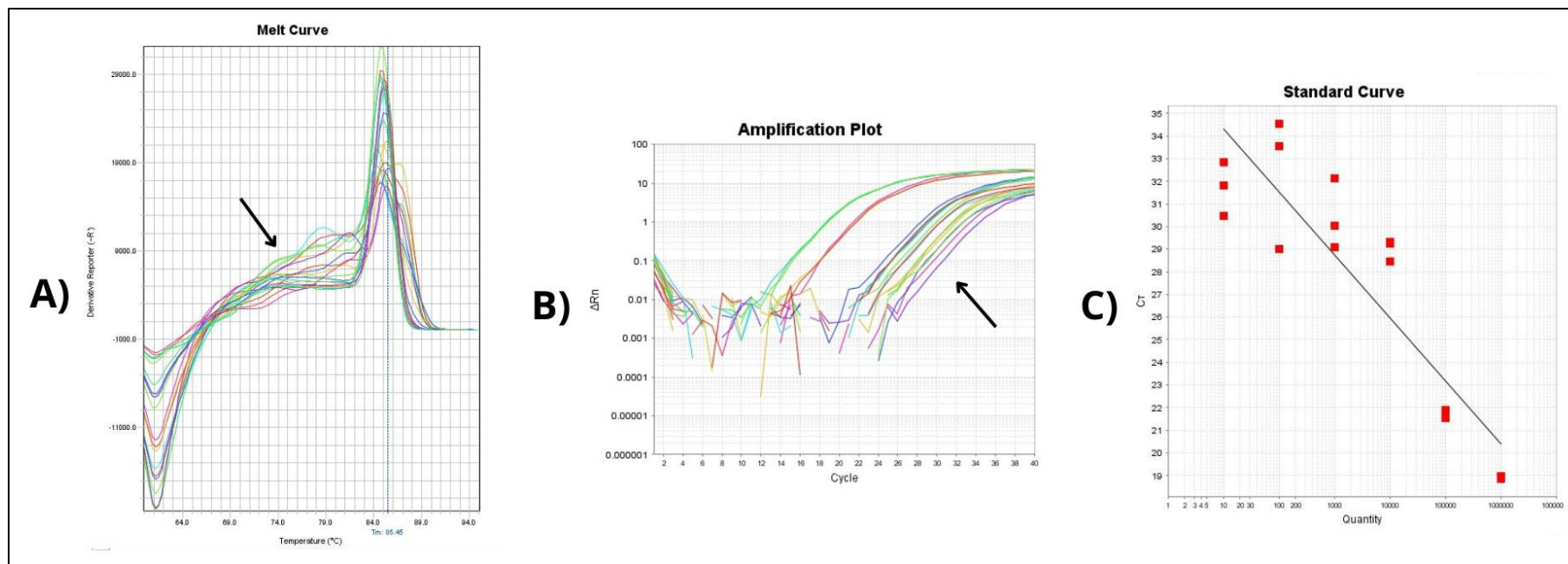
Anexo 4. Características de los sitios de donde se tomaron las muestras de sedimento.

Muestra	Coordenadas		Referencia de Ubicación	Profundidad (metros)
	Latitud	Longitud		
B02	32.4876	-117.1575	Mirador Marlikas La Joya	24
B04	32.329	-117.0877	Muelle de Rosarito	30
B06	32.3456	-117.1080	Playa de Rosarito	22
B07	32.4086	-117.1367	Playa Blanca	20
B08	32.523	-117.1516	Playas de Tijuana	18
B09	32.441	-117.1341	Real del Mar Golf Resort	19
B10	32.4797	-117.1525	Sur de Mirador Marlikas La Joya	21
B13	32.3572	-117.0903	Playa La bardita, Rosarito	16

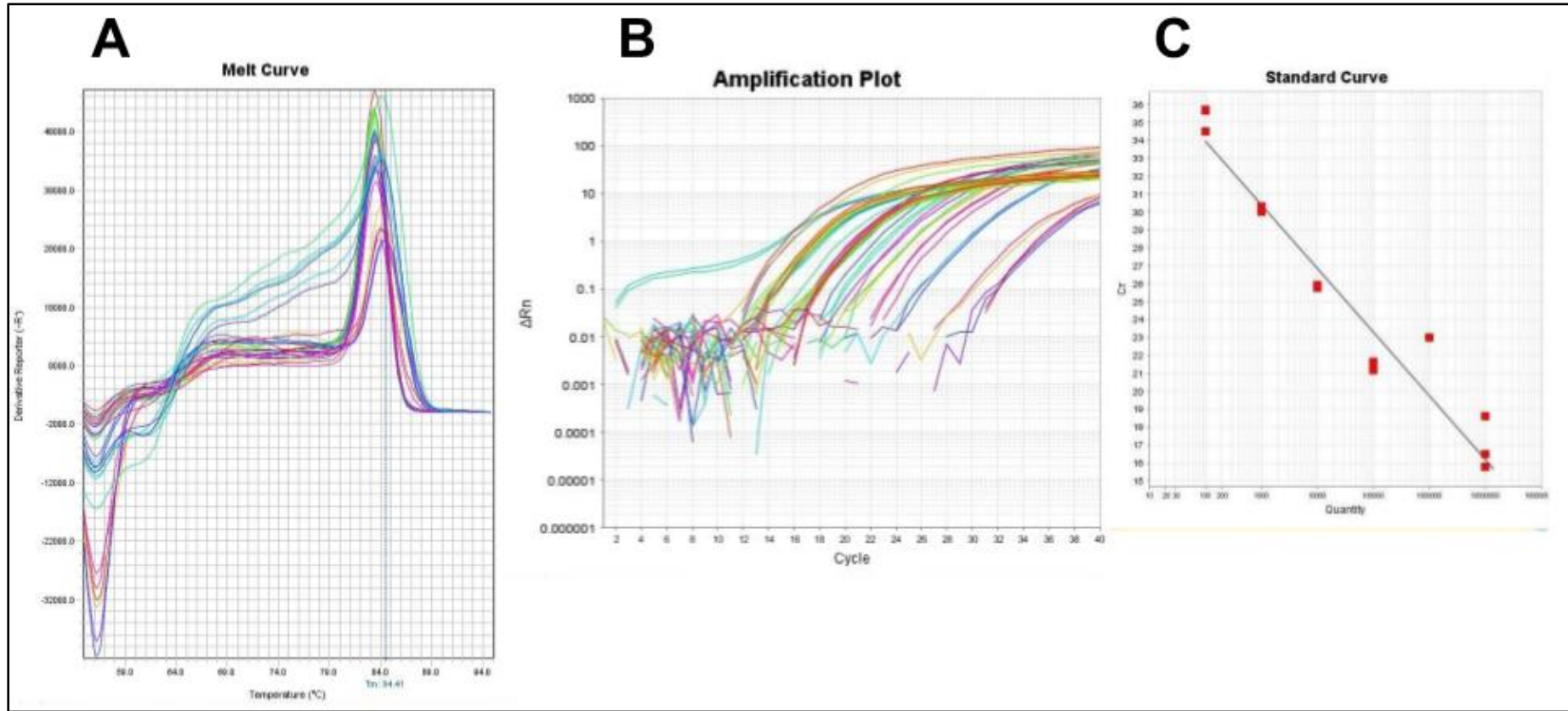
B14	32.4293	-117.1605	Playa Los buenos, Tijuana	23
B18	32.2857	-117.0575	Fox Studio, Rosarito	50
B26	32.4159	-117.2324	Este de la Isla Coronado Sur	21
B28	32.2666	-117.0546	El Descanso, Rosarito	68
B44	32.4341	-117.2847	Este de la Isla Coronado Norte	54
B47	32.2156	-117.0002	Los Arenales, Primo Tapia	160
B53	32.2103	-116.9711	Los Arenales, Primo Tapia	79
B54	32.195	-116.9574	Misión Viejo Sur, Rosarito	72
B56	32.1863	-116.9332	Cuenca Lechera	39
B57	32.1719	-116.9203	Norte de Punta Mezquite (Venus. Carranza)	24

B62	31.9369	-116.8412	Salsipuedes (derrumbe Carretera)	172
B65	31.9719	-116.8701	Mirador Salsipuedes	157
B66	32.0381	-116.8952	Ejido Ensenada	26
B67	32.0876	-116.9085	Playa Escondida, La Misión (Ensenada)	46
B68	32.0245	-116.8975	Arroyo al Norte de Bajamar	30
B69	31.9652	-116.7763	Bahía Salsipuedes	20
B70	31.9402	-116.8056	Salsipuedes (derrumbe) – Cuatro cuatros	102
B74	31.9132	-116.7705	Sur Playa Saldamando	46
B78	31.8899	-116.7449	Playa Tres Emes	31

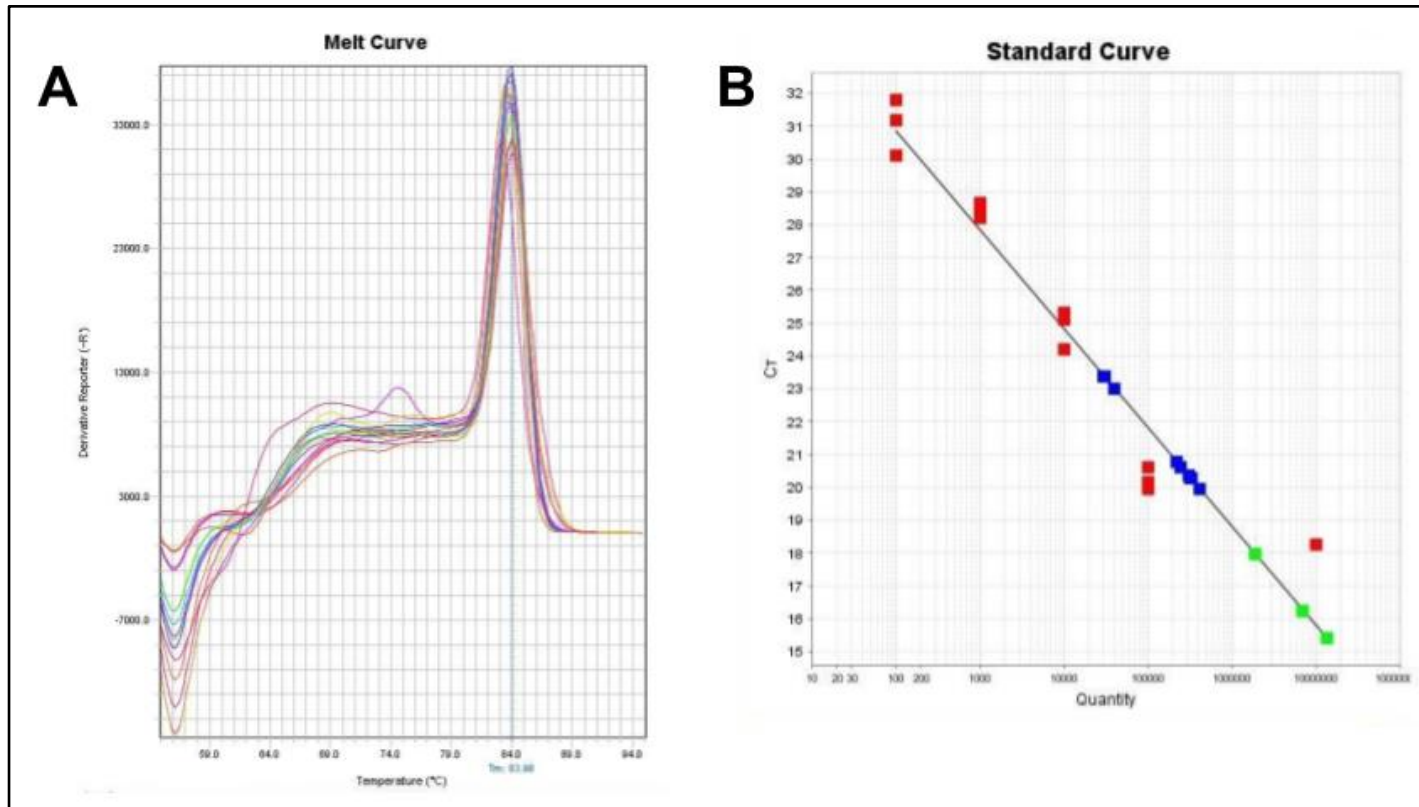
B91	31.7618	-116.6488	Mitad de Barra Estero de Punta Banda	15
B93	31.7734	-116.6662	Casi Boca del Estero de Punta Banda	28
B94	31.7773	-116.6497	Boca del Estero de Punta Banda	20
B98	31.8105	-116.6587	Malecón Playa Hermosa	23
E95	31.833	-116.6554	Playa Pacífica	17
E96	31.813	-116.6296	Playa Pacífica (Costco)	17
E97	31.8176	-116.63	Guarnición Militar	25



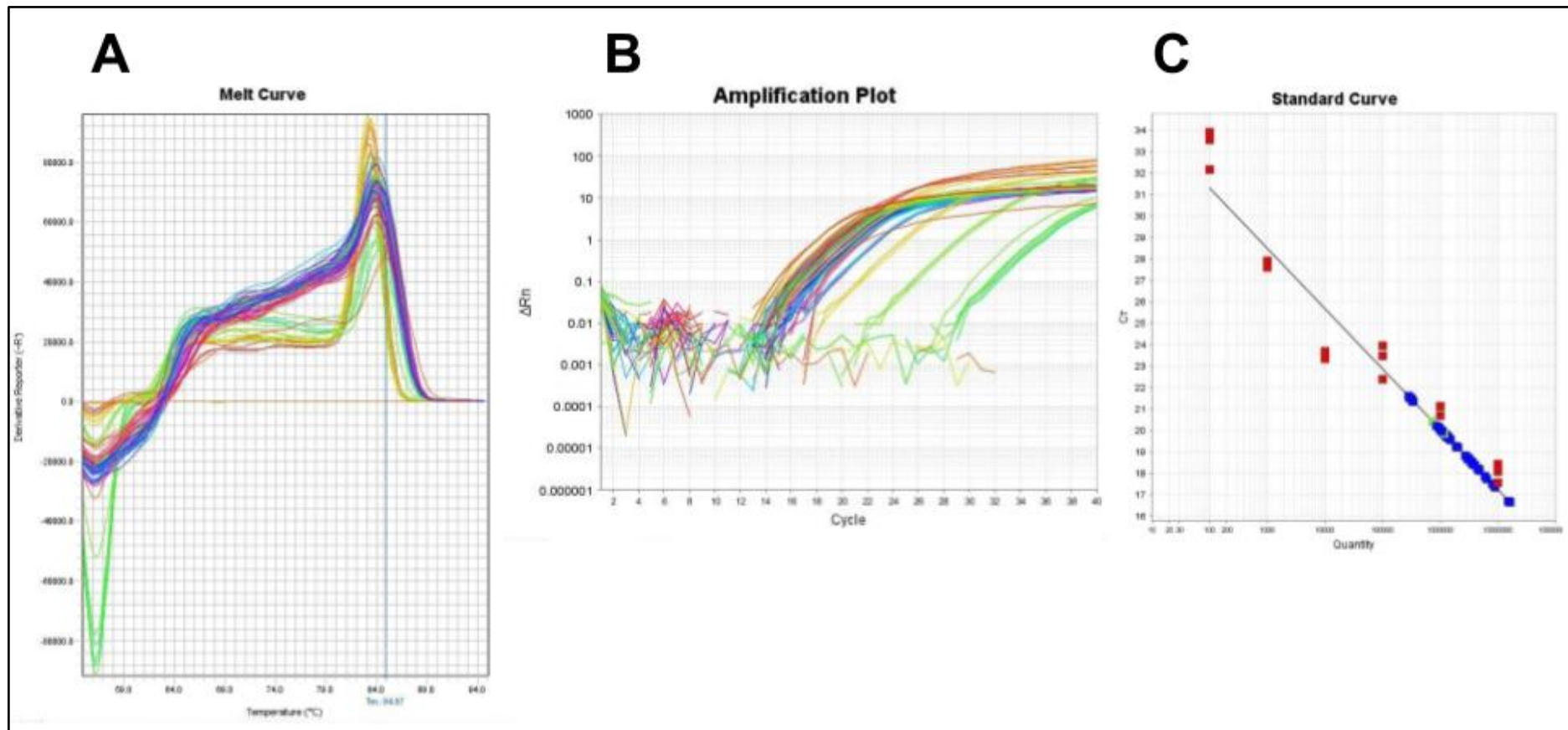
Anexo 5. Gráficas de qPCR con el gen *16S rRNA* de 194 pb mostrando dimerizaciones en las pruebas de estandarización. Se utilizó el ADN genómico de un fragmento de 1465 pb del gen *16S rRNA* a partir de *Escherichia coli* como control positivo realizando diluciones de 1×10^6 a 1×10^1 . Cada dilución se aplicó por triplicado, agregando también tres testigos negativos (agua esteril grado HPLC en lugar de ADN). A: Curva de disociación con un pico a 85.45°C. Se señala con una flecha la curva irregular de los testigos negativos. B: Curva de amplificación donde se señala la amplificación de los testigos negativos aglomerándose con las diluciones de 1×10^4 a 1×10^1 , lo cual sugiere dimerizaciones. C: Curva estándar de la qPCR con una eficiencia del 128.82% y una $R^2 = 0.807$.



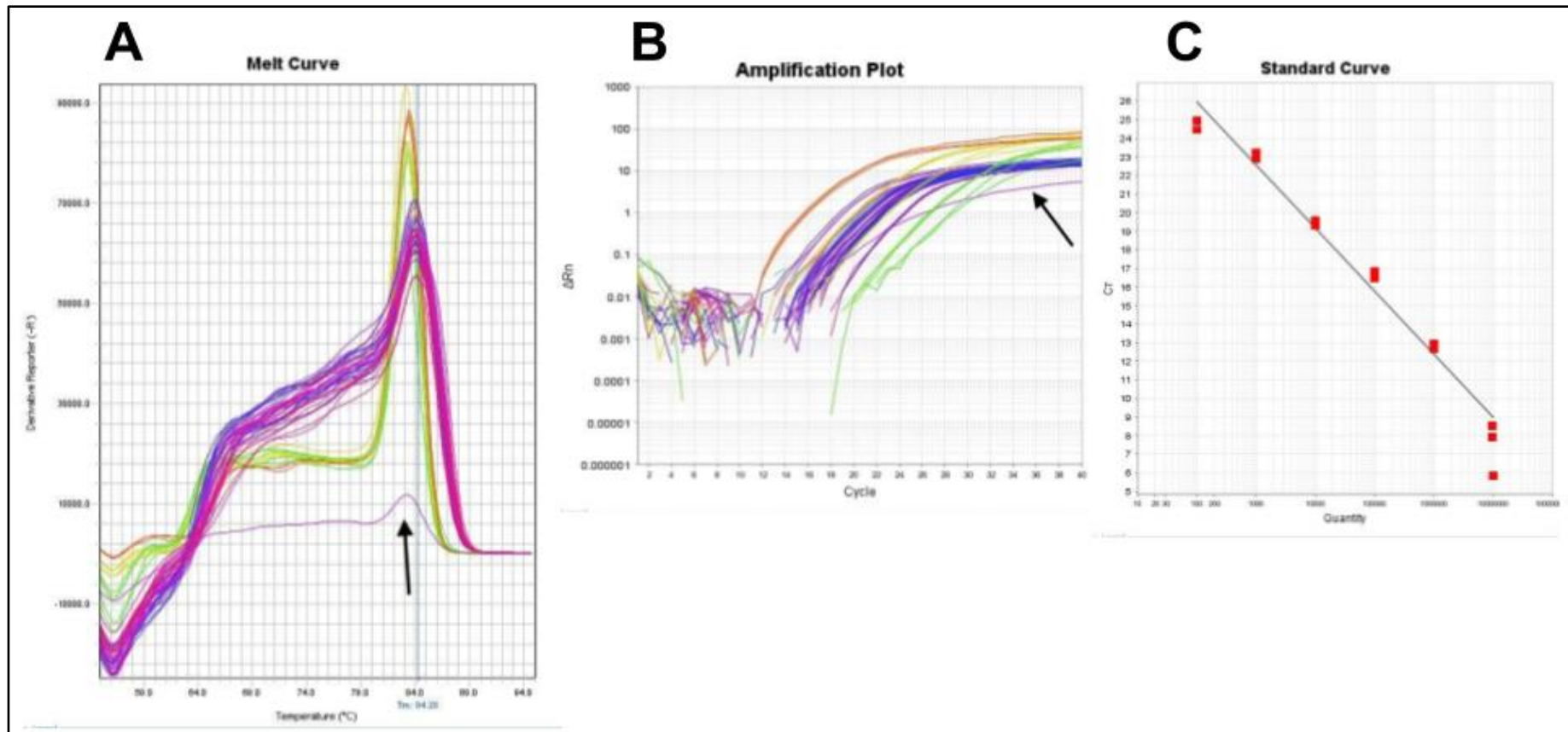
Anexo 6. Resultados de qPCR para el gen *16S rRNA* analizando los sitios B02, B07 y E96. En esta prueba se incluyeron las muestras de ADN plasmídico derivado del sitio Monoboya, el ADN de la muestra B02, B07 y E96, además de testigos negativos. Todas las muestras, a excepción del sitio E96 que se usó a una dilución de 1:10, se emplearon a una concentración directa y con dilución 1:10, por triplicado. A: Curva de disociación mostrando un solo pico a los 84.41°C. B: Curva de amplificación de las muestras utilizadas. C: Curva estándar de la qPCR con una eficiencia del 100.24% y una $R^2 = 0.941$.



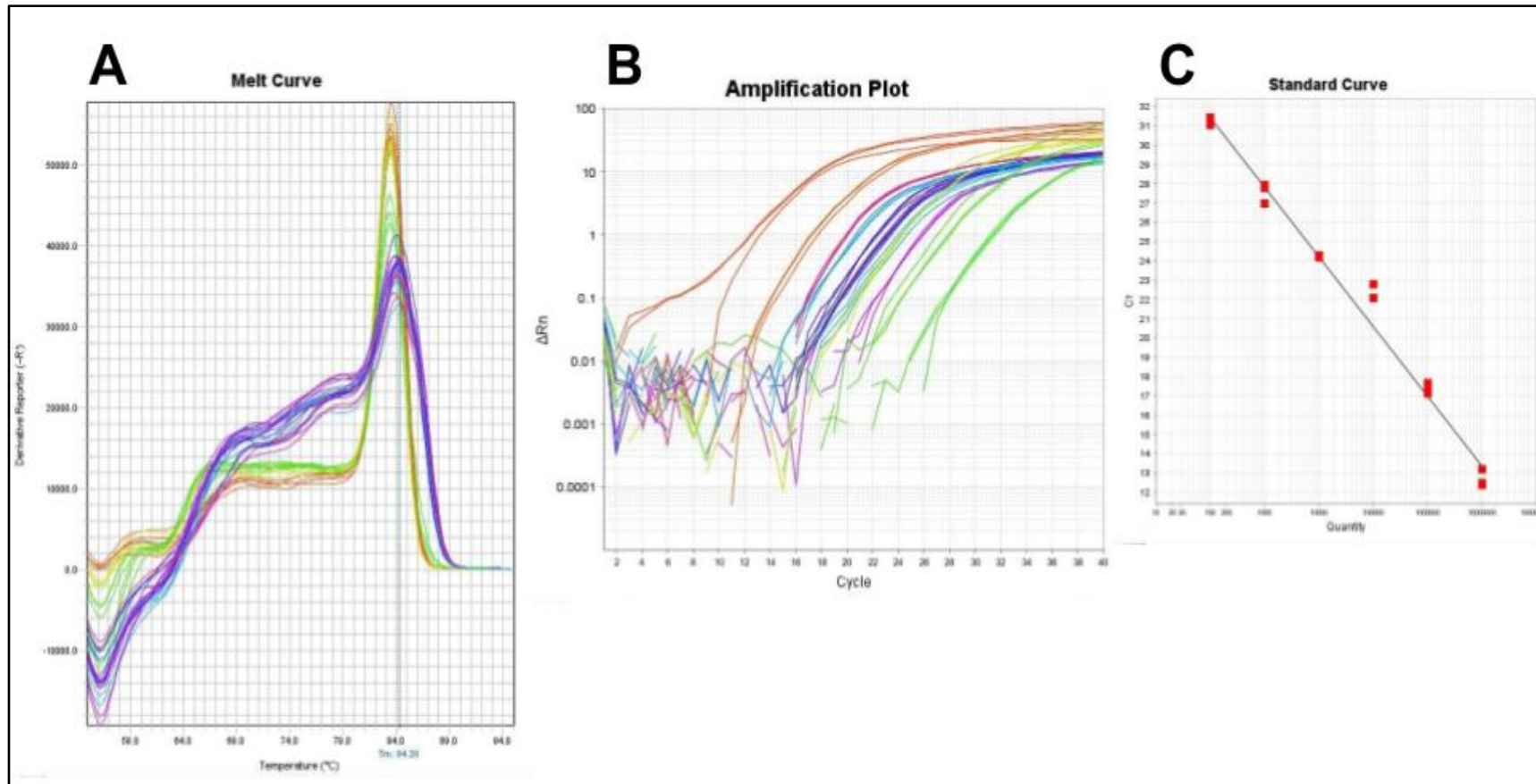
Anexo 7. Resultados de qPCR para el gen *16S rRNA* analizando los sitios B65 y E96. Se utilizó el ADN plasmídico clonado a partir de la muestra del sitio Monoboya para la formación de la curva de estandarización, agregando las muestras B65 diluido a un factor de 1:10 y la muestra del sitio E96 diluido a un factor de 1:10 y 1:100. Las muestras se emplearon por triplicado, incluyendo a los controles negativos. La ausencia de la curva de amplificación se debe a la corrupción del archivo en la máquina. A: Curva de disociación mostrando un único pico a los 83.98°C. B: Curva de estandarización con eficiencia del 114.873 % y una $R^2= 0.933$.



Anexo 8. Resultados de qPCR para el gen *16S rRNA* analizando los sitios B04, B08, B10, B13, B18, B28, B44, B56, B57, B66, B68 y B69. Utilizando el ADN plasmídico derivado del sitio Monoboya se creó una curva de estandarización para medir las muestras de los sitios B04, B08, B10, B13, B18, B28, B44, B56, B57, B66, B68 y B69, todas empleadas a un factor de dilución 1:10. Las muestras problemas, las muestras para la formación de la curva estándar y los testigos negativos se aplicaron por triplicado. A: Curva de disociación con un pico a 84.87°C. B: Curva de amplificación. C: Curva de estandarización con una eficiencia de 114.87% y una $R^2=0.978$.



Anexo 9. Resultados de qPCR para el gen *16S rRNA* analizando los sitios B14, B26, B47, B53, B62, B67, B70, B74, B91, B93, B98, E95 y E97. Se usó el ADN plasmídico clonado a partir de la muestra del sitio Monoboya para la formación de la curva de estandarización, agregando al experimento las muestras diluidas a un factor de 1:100 para el sitio B47 y 1:10 de los sitios B14, B26, B53, B62, B67, B70, B74, B91, B93, B98, E95 y E97. Se agregaron también testigos negativos y en todos los casos se aplicó muestra por triplicado. A: Curva de disociación con un único pico a los 84.28°C. La flecha negra apunta a la muestra B78, la cual se inhibió. B: Curva de amplificación. La flecha negra apunta a la inhibición de la muestra B78. C: Curva de estandarización con eficiencia calculada del 113.23 % y una $R^2=0.982$.



Anexo 10. Resultados de qPCR para el gen *16S rRNA* analizando los sitios B09, B54, B78 y B94. Utilizando el ADN plasmídico derivado del sitio Monoboya se creó una curva de estandarización para medir las muestras de los sitios B09, B54, B78 y B94. Las muestras problemáticas se diluyeron con un factor de 1:10. Todas las muestras, incluyendo testigos negativos, fueron empleadas por triplicado. A: Curva de disociación con un único pico a los 84.28°C. B: Curva de amplificación C: Curva de estandarización con eficiencia del 90.64% y una $R^2=0.988$.

Anexo 11. Cuantificación del gen *16S rRNA* bacteriano en muestras de ADN ambiental de sedimentos marinos de la región norte.

Sitio de muestreo	B02	B04	B07	B08	B09	B10	B13	B14	B18	B26	B28	B44
<i>Valores directos multiplicados por 10 (factor de dilución)</i>	3,572,980	5,367,610	4,454,210	4,292,260	123,260	1,403,980	5,008,390	229,910	10,343,080	149,740	16,536,480	4,858,090
	4,014,640	5,983,750	4,369,730	3,991,380	104,950	1,539,210	5,087,940	234,990	10,283,490	154,410	17,575,870	5,247,070
	3,512,350	5,503,760	3,662,230	4,351,060	77,920	1,478,610	5,315,550	226,140	11,827,090	173,370	16,154,470	5,933,190
<i>Promedio</i>	3,699,990	5,618,373	4,162,056	4,211,566	102,043	1,473,933	5,137,293	230,346	10,817,886	159,173	16,755,606	5,346,116
<i>Promedio redondeado</i>	3.70 x 10 ⁶	5.62 x 10 ⁶	4.16 x 10 ⁶	4.21 x 10 ⁶	1.02 x 10 ⁵	1.47 x 10 ⁶	5.14 x 10 ⁶	2.30 x 10 ⁵	1.08 x 10 ⁷	1.59 x 10 ⁵	1.67 x 10 ⁷	5.35 x 10 ⁶
<i>Número de copias del gen /gramo de sedimento</i>	714,596,000	1,073,522,000	890,842,000	858,452,000	24,652,000	280,796,000	1,001,678,000	45,982,000	2,068,616,000	29,948,000	3,307,296,000	971,618,000
	802,928,000	1,196,750,000	873,946,000	798,276,000	20,990,000	307,842,000	1,017,588,000	46,998,000	2,056,698,000	30,882,000	3,515,174,000	1,049,414,000
	702,470,000	1,100,752,000	732,446,000	870,212,000	15,584,000	295,722,000	1,063,110,000	45,228,000	2,365,418,000	34,674,000	3,230,894,000	1,186,638,000

<i>Promedio del número de copias /gramo</i>	739,998,000	1,123,674,667	832,411,333	842,313,333	20,408,666	294,786,666	1,027,458,667	46,069,333	2,163,577,333	31,834,666	3,351,121,333	1,069,223,333
<i>Promedio redondeado</i>	7.40×10^8	1.12×10^9	8.32×10^8	8.42×10^8	2.04×10^7	2.95×10^8	1.03×10^9	4.61×10^7	2.16×10^9	3.18×10^7	3.35×10^9	1.07×10^9
<i>Número de bacterias por gramo</i>	1.06×10^8	1.61×10^8	1.19×10^8	1.20×10^8	2.92×10^6	4.21×10^7	1.47×10^8	6.58×10^6	3.09×10^8	4.55×10^6	4.79×10^8	1.53×10^8

Anexo 12. Cuantificación del gen *16S rRNA* bacteriano en muestras de ADN ambiental de sedimentos marinos de la región centro.

Sitio de muestreo	B47	B53	B54	B56	B57	B65	B66	B67	B68
<i>Valores directos multiplicados por 10 (factor de dilución)</i>	983,700	1,036,410	895,460	11,085,620	14,395,540	3,280,900	7,776,940	149,370	1,359,980
	1,195,500	1,045,720	825,890	11,295,310	12,815,610	2,479,320	7,435,500	125,020	1,337,320
	1,309,500	1,344,040	1,029,270	11,679,180	13,195,220	2,191,450	7,619,740	176,450	1,277,530
<i>Promedio</i>	1,162,900	1,142,056	916,873	11,353,370	13,468,790	2,650,557	7,610,726	150,280	1,324,943
<i>Promedio redondeado</i>	1.16 x 10 ⁶	1.14 x 10 ⁶	9.17 x 10 ⁵	1.13 x 10 ⁷	1.35 x 10 ⁷	2.65 x 10 ⁶	7.61 x 10 ⁶	1.50 x 10 ⁵	1.32 x 10 ⁶
<i>Número de copias del gen /gramo de sedimento</i>	196,740,000	207,282,000	179,092,000	2,217,124,000	2,879,108,000	656,180,000	1,555,388,000	29,874,000	271,996,000
	239,100,000	209,144,000	165,178,000	2,259,062,000	2,563,122,000	495,864,000	1,487,100,000	25,004,000	267,464,000
	261,900,000	268,808,000	205,854,000	2,335,836,000	2,639,044,000	438,290,000	1,523,948,000	35,290,000	255,506,000
<i>Promedio del número de copias /gramo</i>	232,580,000	228,411,333	183,374,666	2,270,674,000	2,693,758,000	530,111,333	1,522,145,333	30,056,000	264,988,666

<i>Promedio redondeado</i>	2.33×10^8	2.28×10^8	1.83×10^8	2.27×10^9	2.69×10^9	5.30×10^8	1.52×10^9	3.0×10^7	2.65×10^8
<i>Número de bacterias por gramo</i>	3.32×10^7	3.26×10^7	2.62×10^7	3.24×10^8	3.85×10^8	7.57×10^7	2.17×10^8	4.29×10^6	3.79×10^7

Anexo 13. Cuantificación del gen *16S rRNA* bacteriano en muestras de ADN ambiental de sedimentos marinos de la región sur.

Sitio de muestreo	B62	B69	B70	B74	B78	B91	B93	B94	B98	E95	E96	E97
<i>Valores directos multiplicados por 10 (factor de dilución)</i>	686,550	20,970,670	2,137,470	113,970	197,590	391,390	353,170	329,750	766,180	142,110	3,201,200	216,180
	615,070	21,486,900	1,650,220	158,380	181,450	359,510	339,530	352,760	1,010,820	163,810	4,138,610	220,460
	556,470	23,190,020	1,506,010	147,360	216,990	365,340	270,470	364,000	930,010	164,160	3,077,400	193,510
<i>Promedio</i>	619,363	21,882,530	1,764,566	139,903	198,676	372,080	321,056	348,836	902,336	156,693	3,472,403	210,050
<i>Promedio redondeado</i>	6.19 x 10 ⁵	2.18 x 10 ⁷	1.76 x 10 ⁶	1.40 x 10 ⁵	1.99 x 10 ⁵	3.72 x 10 ⁵	3.21 x 10 ⁵	3.49 x 10 ⁵	9.02 x 10 ⁵	1.57 x 10 ⁵	3.47 x 10 ⁶	2.10 x 10 ⁵
<i>Número de copias del gen /gramo de sedimento</i>	137,310,000	4,194,134,000	427,494,000	22,794,000	39,518,000	78,278,000	70,634,000	65,950,000	153,236,000	28,422,000	640,240,000	43,236,000
	123,014,000	4,297,380,000	330,044,000	31,676,000	36,290,000	71,902,000	67,906,000	70,552,000	202,164,000	32,762,000	827,722,000	44,092,000
	111,294,000	4,638,004,000	301,202,000	29,472,000	43,398,000	73,068,000	54,094,000	72,800,000	186,002,000	32,832,000	615,480,000	38,702,000
<i>Promedio del número de copias /gramo</i>	123,872,666	4,376,506,000	352,913,333	27,980,666	39,735,333	74,416,000	64,211,333	69,767,333	180,467,333	31,338,666	694,480,667	42,010,000
<i>Promedio redondeado</i>	1.24 x 10 ⁸	4.38 x 10 ⁹	3.53 x 10 ⁸	2.80 x 10 ⁷	3.97 x 10 ⁷	7.44 x 10 ⁷	6.42 x 10 ⁷	6.97 x 10 ⁷	1.80 x 10 ⁸	3.13 x 10 ⁷	6.94 x 10 ⁸	4.20 x 10 ⁷

<i>Número de bacterias por gramo</i>	1.77×10^7	6.25×10^8	5.04×10^7	3.99×10^6	5.67×10^6	1.06×10^7	9.17×10^6	9.97×10^6	2.58×10^7	4.47×10^6	9.92×10^7	6.0×10^6
--------------------------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	-------------------