Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

“Determinación de genes de resistencia a antibióticos en el metagenoma de suelos expuestos a lixiviados en rellenos sanitarios del estado de Querétaro, como una fuente potencial de diseminación de bacterias multirresistentes.**”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Química Clínica Diagnóstica

Presenta:

I.B.Q. Mario Eduardo Clemente Albores

Dirigido por:

Dr. Juan Campos Guillén



Querétaro, Qro a Octubre de 2026

REPOSITORIO INSTITUCIONAL DGBSDI-UAQ

La presente obra está bajo la licencia:
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es

CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:

Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.

NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .

SinDerivadas — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad, o derechos morales pueden limitar la forma en que utilice el material.

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Química Clínica Diagnóstica

Determinación de genes de resistencia a antibióticos en el metagenoma de suelos expuestos a lixiviados en rellenos sanitarios del estado de Querétaro, como una fuente potencial de diseminación de bacterias multirresistentes.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Química Clínica Diagnóstica

Presenta:

I.B.Q. Mario Eduardo Clemente Albores

Dirigido por:

Dr. Juan Campos Guillén

Dr. Juan Campos Guillén
Presidente
Dra. Karla Isabel Lira De León
Secretario
M. en C. Erika Beatriz Álvarez Hidalgo
Vocal
Dra. María Carlota García Gutiérrez
Suplente
M. en I.M. David Gustavo García Gutiérrez
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
octubre de 2026
México

Dedicatoria

A mis padres, por el apoyo y amor incondicional que me brindaron a lo largo de esta etapa a pesar de los sacrificios realizados.

A mi familia, por acompañarme en cada etapa de mi formación académica, por sus palabras de aliento y por brindarme la fortaleza necesaria para continuar.

A todas aquellas personas que me brindaron su ayuda y de alguna manera forman parte de este camino.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Querétaro y a la Facultad de Química, por brindarme la oportunidad de continuar mi formación académica y desarrollar mis capacidades profesionales y científicas.

A mi director de tesis, por las palabras de aliento y motivación, por su orientación, conocimientos, observaciones y acompañamiento durante el desarrollo de esta investigación.

Índice general

Índice general I
Índice de Tablas III
Índice de figuras IV
Abreviaturas V
Resumen VI
Summary VII
1 Introducción (planteamiento del problema y justificación) 1
2 Antecedentes 5
2.1 Lixiviados
2.1.1 Composición de lixiviados 5
2.1.2 Contaminación en el ambiente 6
2.1.3 Diversidad microbiana presente en lixiviados 8
2.1.4 Microorganismos patógenos presentes en vertederos 9
2.1.5 Resistoma presente en rellenos sanitarios 11
2.2 Bacterias resistentes a antibióticos
2.2.1 Mecanismos de resistencia 15
2.2.1.1 Modificación enzimática del antibiótico 16
2.2.1.2 Alteración del sitio blanco del antibiótico 17
2.2.1.3 Impermeabilidad de la membrana o pared celular 19
2.2.1.4 Bombas de eflujo 19
2.3 Transferencia horizontal de genes
2.3.1 Conjugación 21
2.3.2 Transducción 21

2.3.3 Transformación 25

3 Objetivos 23

3.1 General

3.2 Particulares

3.3 Profesionalizantes

4 Metodología

4.1 Diseño 24

4.2 Procedimientos

4.2.1 Obtención de muestra de suelo y análisis físico-químico

4.2.2 Extracción de ADN

4.2.3 Análisis bioinformático

4.2.4 Cultivo de bacterias multirresistentes

4.2.5 Evaluacion de multirresistencia en cepas aisladas

4.2.6 secuenciación de ADN de bacterias multirresistentes

4.2.7 Análisis bioinformático de taxonomía y genoma

5 Resultados 33

6 Discusiones 63

7 Limitantes 85

8 Aplicaciones 86

9 Conclusiones 88

10 Anexos 90

Índice de tablas

Tabla 1. Bacterias Gram-negativas patógenas aisladas del suelo, lixiviados y aire de un relleno sanitario (Adaptado de Flores-Tena et al. 2007). **11**
Tabla 2. Clasificación molecular de las beta-lactamasas (Drawz y Bonomo, 2010) **17**
Tabla 3. Sistema de eflujo de resistencia a múltiples fármacos de bacterias clínicamente importantes (Alekshun MN,2007). **20**
Tabla 4. Concentraciones de antibióticos para el cultivo de bacterias del suelo. **28**
Tabla 5. Cepas bacterianas y su resistencia a antibióticos: ampicilina (AM), cefalotina (CF), cefotaxima (CFX), ciprofloxacino (CPF), clindamicina (CLM), dicloxacilina (DC), eritromicina (E), gentamicina (GE), penicilina (PE), tetraciclina (TE), sulfametoxazol/trimetroprim (SXT), vancomicina (VA), amikacina (AK), carbenicilina (CB), cloranfenicol (CL), netilmicina (NET), nitrofurantoina (NF), norfloxacino (NOF). **40**
Tabla 6. Descripción genómica de *Priestia aryabhattai* Spcl1. **45**
Tabla 7. Características genómicas de los plásmidos de *Priestia aryabhattai* Spcl1. **46**
Tabla 8. Genes de resistencia a antibióticos de *Priestia aryabhattai* Spcl1. **47**
Tabla 9. Mecanismos de acción de genes de resistencia a antibióticos en *Priestia aryabhattai* Spcl1. **48**
Tabla 10. Genes de resistencia a metales de *Priestia aryabhattai* Spcl1. **49**
Tabla 11. Secuencias que producen alineaciones significativas en los plásmidos de *P. aryabhattai* Spcl1. **50**
Tabla 12. Secuencias que producen alineaciones significativas en los plásmidos de *P. aryabhattai* Spcl1. **51**
Tabla 13. Secuencias que producen alineaciones significativas en los plásmidos de B*. cereus* Sbamp1. **56**
Tabla 14. Características genómicas de los plásmidos de *Bacillus cereus* Spbamp1. **58**
Tabla 15. . Secuencias que producen alineaciones significativas en los plásmidos de *B. cereus* Spbamp1. **59**
Tabla 16. Genes de resistencia a antibióticos de *B. cereus* Spbamp1. **60**
Tabla 17. Genes de resistencia a metales de *B. cereus* Spbamp1. **61**
Tabla 18. Genes de virulencia y su función en *B.cereus* Spbamp1. **62**

Índice de figuras

Figura 1. Composiciones de la comunidad bacteriana representada por abundancia relativa de géneros en vertederos muestreados (Song et al., 2015). **8**
Figura 2 . Perfil cuantitativo de amplio espectro de los tipos de ARG (Zhao et al., 2018). **12**
Figura 3. Porcentaje relativo de hospedadores para los 10 subtipos de GRA más abundantes en la fase aeróbica (FA), la fase ácida anaeróbica (FAA) y la fase metanogénica (FM) durante la descomposición de los desechos (X. Liu et al., 2018). **13**

Figura 4. . Imagen satelital de las áreas a muestrear. **26**

Figura 5. Mapa taxonómico jerárquico tipo Sankey de la composición de los metagenomas. a) suelo contaminando con lixiviados. b) suelo sin lixiviados. **32**

Figura 6. Análisis metagenómico entre el suelo contaminado (SC) y suelo no contaminado (SNC). **34**

Figura 7. Bacterias patógenas en suelo contaminado (SC) y suelo no contaminado (SNC). **34**

Figura 8. Mapa de calor de genes bacterianas en sueno contaminado (SC) y suelo no contaminado (SNC). **36**

Figura 9. Crecimiento bacteriano en medio enriquecido con antibióticos, Blanco (NA), tetraciclina(TET), estreptomicina (SM), cloranfenicol (CL), kanamicina (KN), ampicilina (AMP). **39**

Figura 10. Resultado TYGS para el conjunto de datos. Árbol inferido con FastME 2.1.456 a partir de distancias GBDP calculadas a partir de secuencias genómicas para la cepa SPCL1. **42**

Figura 11. Mapa de calor que muestran los valores medios de identidad de nucleótidos por pares (ANI) y de hibridación digital ADN-ADN (DDH) de la cepa SPCL1 y las cepas tipo *Priestia* estrechamente relacionadas. **43**

Figura 12. Mapa genómico circular para *P. aryabhattai* Spcl1. Desde el exterior hacia el centro se encuentran los contigs ensamblados, el marco de lectura abierto (ORF),CDS en la cadena frontal,CDS en la cadena inversa, los genes de ARN, CDS con similitud con factores de virulencia, contenido de GC y sesgo de GC. **44**

Figura 13. Resultados de TYGS para el conjunto de datos. El árbol filogenómico se infirió utilizando FastME 2.1.456 basándose en las distancias GBDP calculadas a partir de secuencias genómicas. Las longitudes de las ramas se escalan según la fórmula de distancia G BDP, y los números sobre las ramas representan los valores de soporte pseudo-bootstrap GBDP de 100 réplicas. **53**

Figura 14. Mapas de calor que representan los valores de hibridación digital ADN-ADN (dDDH) y la identidad nucleotídica media (ANI) para la cepa Spbamp1 y cepas de *Bacillus* estrechamente relacionadas. **54**

Figura 15. Secuencias que producen alineaciones significativas en los plásmidos de *B. cereus* Sbamp1. **56**

Abreviaturas

RSU	Residuos Sólidos Urbanos
SEMARNAT	Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SEDESU	Secretaria de Desarrollo Sustentable
GRA	Genes de resistencia a antibióticos
ADN	Ácido desoxirribunocleico
BRA	Bacterias resistentes a antibióticos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reaccion en cadena de la polimerasa
MLS	Macrólido-Lincosamida-Estreptogramina
PBP	Proteínas ligadoras de penicilina
MDR	Resistente a multidrogas
SNC	Suelo sin presencia de lixiviados
SC	Suelo con presencia de lixiviados

Resumen

La contaminación del suelo por lixiviados provenientes de residuos sólidos urbanos representa una importante presión ambiental debido a la presencia de compuestos tóxicos, incluidos metales pesados, hidrocarburos, materia orgánica recalcitrante y residuos de antibióticos. Estos contaminantes pueden favorecer la selección de bacterias con mecanismos de resistencia y adaptación, contribuyendo al mantenimiento y dispersión de genes de resistencia antimicrobiana. En este trabajo se analizó el metagenoma de suelos expuestos a lixiviados de un sitio de disposición final de residuos sólidos urbanos en Querétaro, México, con el objetivo de determinar la diversidad bacteriana y el perfil de genes de resistencia. El análisis metagenómico reveló la presencia de genes asociados con resistencia a antibióticos y metales. Posteriormente, se aislaron bacterias en medios suplementados con antibióticos, destacando *Bacillus cereus* Spbamp1 y *Priestia aryabhattai* Spcl1 por sus perfiles multirresistentes. El genoma de Spbamp1 presentó 5.55 Mb, 51 contigs, 5,712 CDS y tres contigs plasmídicos, además de determinantes de resistencia como *OXA-360, mecA, cfrA, dfrGD, catA y fosB.* Spcl1 presentó seis plásmidos y genes como *folA, catA, fosB y lsaB,* encontrándose *folA* en el plásmido P1. Ambas cepas presentaron determinantes de tolerancia a metales, destacando *arsB* en Spcl1 y *acr3* en Spbamp1, asociados con el eflujo de arsenito. La coexistencia de genes de resistencia a antibióticos y metales sugiere un potencial de coselección en bacterias expuestas a lixiviados, resaltando el papel de estos ambientes como reservorios de resistencia antimicrobiana con potencial impacto en la salud pública.

Palabras clave: lixiviados, genes, resistencia, metagenómica.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis seas reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaro y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

Summary

Soil contamination by leachate from municipal solid waste poses a significant environmental threat due to the presence of toxic compounds, including heavy metals, hydrocarbons, recalcitrant organic matter, and antibiotic residues. These contaminants can favor the selection of bacteria with resistance and adaptation mechanisms, contributing to the maintenance and spread of antimicrobial resistance genes. In this study, the metagenome of soils exposed to leachate from a municipal solid waste landfill in Querétaro, Mexico, was analyzed to determine bacterial diversity and the profile of resistance genes. Metagenomic analysis revealed the presence of genes associated with resistance to antibiotics and metals. Subsequently, bacteria were isolated in media supplemented with antibiotics, with *Bacillus cereus* Spbamp1 and *Priestia aryabhattai* Spcl1 standing out for their multidrug-resistant profiles. The Spbamp1 genome comprised 5.55 Mb, 51 contigs, 5,712 CDSs, and three plasmid contigs, in addition to resistance determinants such as *OXA-360, mecA, cfrA, dfrGD, catA*, and *fosB.* Spcl1 contained six plasmids and genes such as *folA, catA, fosB,* and *lsaB,* with *folA* located on plasmid P1. Both strains possessed metal tolerance determinants, notably *arsB* in Spcl1 and *acr3* in Spbamp1, which are associated with arsenite efflux. The coexistence of antibiotic- and metal-resistance genes suggests a potential for co-selection in bacteria exposed to leachate, highlighting the role of these environments as reservoirs of antimicrobial resistance with potential implications for public health.

Keywords: leachates, genes, resistance, metagenomics.

1 Introducción

En México diariamente se producen alrededor de 120,128 toneladas de Residuos Sólidos Urbanos (RSU) diariamente de los cuales se recolecta el 83.93% aproximadamente de estos solamente el 78.54% es llevado a sitios de disposición final, así mismo la región que más residuos genera es la región centro con un 51% de total nacional (SEMARNAT, 2017), para el estado de Querétaro ésta cifra es de 2,602 toneladas de RSU generadas diariamente (SEDESU, 2023) en donde la práctica que sigue predominando es el manejo básico de los RSU consistiendo de manera general en la recolección y disposición en rellenos sanitarios.

Los RSU presentan una composición diversa incluyendo tanto materiales orgánicos como inorgánicos, Sin embargo, con frecuencia contienen restos de antibióticos, principalmente derivados del uso doméstico, esto se debe a la falta de medidas adecuadas para su eliminación y tratamiento lo que provoca que dichos residuos lleguen a los sitios de disposición final (Qi et al., 2018a), debido a la descomposición de los RSU, la escorrentía proveniente de estos mismos y la lluvia se generan lixiviados, los cuales tienden a movilizar aquellos agentes altamente contaminantes como lo son restos de antibióticos y metales pesados hacia el suelo del relleno sanitario (Gu et al., 2022).

La presencia de estos afecta directamente al microbioma albergado en los suelos en donde pueden residir bacterias patógenas para el ser humano así como no patógenas (Mhammedsharif & Kolo, 2023), propiciando la aparición de Genes de Resistencia a Antibióticos (GRA), los cuales son segmentos de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) que confieren a los organismos la capacidad de resistir condiciones adversas, como la exposición a antibióticos, pesticidas, metales pesados o entornos extremos. En las comunidades bacterianas, estos genes pueden transferirse a través de

distintos mecanismos, lo que favorece la aparición de Bacterias Resistentes a Antibióticos (BRA) (Barrantes Jiménez et al., 2022).

Estas bacterias resistentes pueden ser patógenas para el ser humano provocando enfermedades de difícil tratamiento, en estudios realizados en suelos de rellenos sanitarios y lixiviados, se han identificado diversas bacterias, entre las que destacan *Staphylococcus aureus* (Zhang et al., 2022), *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (Odonkor y Mahami, 2020) ya que estas se encuentran dentro de la lista de patógenos prioritarios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) debido a su habilidad natural para desarrollar nuevas estrategias de resistencia a los tratamientos y transferir material genético (OMS, 2020).

Si bien históricamente se ha enfocado la atención en ambientes clínicos, cada vez más evidencia señala que los ambientes naturales, como los suelos, pueden actuar como reservorios y puntos de diseminación de genes de resistencia. Esta situación se agrava en zonas donde los suelos se ven expuestos a contaminantes como los lixiviados de rellenos sanitarios, que contienen antibióticos, metales pesados y otros compuestos que ejercen presión selectiva sobre las bacterias, favoreciendo la aparición de cepas multirresistentes. En este contexto, la metagenómica surge como una herramienta que permite analizar directamente el material genético de comunidades microbianas completas, sin necesidad de cultivo, lo que proporciona una visión más amplia y precisa del resistoma ambiental (Yin et al., 2021). Con base en lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo determinar los genes de resistencia a antibióticos en el metagenoma de suelos expuestos a lixiviados en rellenos sanitarios del estado de Querétaro, como una fuente potencial de diseminación de bacterias multirresistentes.

1.1 Planteamiento del problema

En 2019, la resistencia a los antimicrobianos fue responsable de aproximadamente 1,270,000 muertes a nivel mundial. En México, durante el año 2021, las infecciones causadas por microorganismos resistentes provocaron alrededor de 48,000 muertes y más de tres millones de casos de infección (Secretaría de Salud, 2024). La mayoría de las investigaciones sobre BRA y GRA se han centrado en entornos hospitalarios, debido a la amplia documentación y monitoreo existentes en dichos espacios. En el caso del estado de Querétaro, se han reportado bacterias resistentes provenientes del ámbito hospitalario (García-G et al., 2014); sin embargo, el riesgo asociado a la presencia de estas bacterias fuera de entornos clínicos permanece escasamente estudiado. Un ejemplo claro de esta omisión son los rellenos sanitarios, donde actualmente no existen estudios que evalúen las bacterias presentes ni los genes de resistencia que puedan albergar. Estos sitios representan un foco potencial de contaminación biológica y química, ya que los lixiviados generados contienen una mezcla compleja de compuestos peligrosos, entre ellos metales pesados, residuos de antibióticos y materia orgánica en descomposición. La exposición de las comunidades bacterianas a estos elementos ejerce una presión selectiva que favorece la activación de mecanismos de resistencia y la aparición de genes asociados a dicha resistencia (Wang et al., 2020). Esta situación representa un riesgo para la salud pública, ya que la diseminación de bacterias multirresistentes desde estos ambientes podría derivar en infecciones difíciles de tratar mediante terapias antimicrobianas convencionales.

1.2 Justificación

Los genes de resistencia a metales pesados y los genes de resistencia a antibióticos suelen encontrarse en los mismos elementos genéticos móviles (como plásmidos, transposones e integrones). Esto significa que la exposición de las bacterias a metales pesados puede impulsar indirectamente la resistencia a antibióticos, incluso si estos no están presentes en el ambiente. Como resultado, los rellenos sanitarios actúan como reservorios de genes de resistencia, favoreciendo su transferencia entre bacterias ambientales y potencialmente patógenas. Esta situación representa un riesgo latente de infección para las personas que habitan cerca de estos sitios, ya que pueden entrar en contacto con bacterias resistentes a través del aire, el agua contaminada o el suelo. Además, la diseminación de estas bacterias no solo afecta a las comunidades locales, sino que también contribuye a la expansión de la resistencia a antibióticos a nivel comunitario y global, agravando la crisis sanitaria. A pesar de la relevancia de este problema, en el estado de Querétaro aún no existen estudios enfocados en el análisis de genes de resistencia presentes en el microbioma de los rellenos sanitarios. Por ello, este estudio busca evaluar las comunidades bacterianas y los genes de resistencia a antibióticos en suelos con presencia de lixiviados, no solo para comprender los riesgos para la salud humana y el entorno ecológico, sino también para analizar la diseminación de estos genes y explorar estrategias para mitigar el impacto de la resistencia antimicrobiana.

2 Antecedentes

2.1 Lixiviados

Los lixiviados son líquidos que se producen a partir de la reacción, arrastre o filtración de los materiales que componen los residuos. Estos líquidos contienen sustancias disueltas o en suspensión que pueden infiltrarse en el suelo o generar escurrimientos fuera del sitio de disposición, lo que puede causar contaminación del suelo y de cuerpos de agua, representando un riesgo potencial para la salud humana y otros organismos vivos (NOM-083-SEMARNAT-2003).

El lixiviado de un relleno sanitario es un líquido complejo que presenta variaciones significativas en su composición y en el flujo volumétrico. La calidad de estos lixiviados está influenciada por los materiales depositados en el relleno, los procesos de reacción bioquímica que ocurren en su interior y las condiciones ambientales. Así, la concentración y composición de los contaminantes en el lixiviado pueden variar considerablemente y tienden a cambiar aún más según la antigüedad del relleno (Brutti et al. 2018).

2.1.1 Composición de lixiviados

Los lixiviados en un relleno sanitario arrastran material disuelto, en suspensión, fijo o volátil, lo que resulta en altas cargas orgánicas y un color que varía desde café-pardo-grisáceo cuando son frescos hasta negro viscoso a medida que envejecen (Kennedy et al., 2000). Además, estos lixiviados presentan elevadas concentraciones de sales inorgánicas, como cloruro de sodio y carbonatos, así como de metales pesados. Diversos estudios indican que el carbono orgánico en forma coloidal puede adsorber grandes cantidades de metales en su superficie, funcionando, así como un medio de transporte para metales traza en los lixiviados (Méndez-Novelo et al., 2019).

En la mayoría de los rellenos sanitarios, el lixiviado está formado por el líquido que entra en el relleno desde fuentes externas (drenaje superficial, lluvia, aguas subterráneas, aguas de manantiales subterráneos) y, en su caso, el líquido producido por la descomposición de los residuos. Los diversos materiales confinados en los rellenos sanitarios hacen que la composición de los lixiviados sea variable, de acuerdo con la naturaleza de los mismos desechos (pH, edad, temperatura, etc.) (Rondón, 2016).

La composición de sus componentes varía considerablemente según la antigüedad del vertedero y la naturaleza de los residuos que alberga (Sabba et al., 2025). Aquellos compuestos orgánicos que se pueden encontrar son sustancias húmicas recalcitrantes, como ácidos fúlvicos y húmicos provenientes de la descomposición de materia orgánica, por lo general los lixiviados tienden a tener un gran contenido de nitrógeno amoniacal a causa de la degradación biológica de aminoácidos y otros materiales nitrogenados orgánicos (Lindamulla et al., 2022).

2.1.2 Contaminación en el ambiente

La contaminación del suelo, así como de las aguas subterráneas y superficiales, causada por los lixiviados de los rellenos sanitarios, genera graves problemas ambientales y representa un peligro serio e irreversible para la salud humana. En las aguas superficiales, los lixiviados producen compuestos que acidifican el agua y reducen el oxígeno necesario para la vida de las especies acuáticas. En el caso de las aguas subterráneas, los efectos se deben a la infiltración de lixiviados a través del suelo, lo que afecta su productividad y elimina la microfauna que allí habita, acelerando así el proceso de desertificación del suelo (León-Gómez et al., 2015).

Cuando el lixiviado circula por el suelo, los coloides y microorganismos presentes interceptan los metales pesados por esto la liberación de grandes cantidades de metales pesados en el suelo puede causar una grave degradación del medio

ambiente (Wang et al., 2022). A diferencia de muchos contaminantes orgánicos, los metales pesados peligrosos son indestructibles y no se degradan ni químicamente ni biológicamente (Qian et al., 2024). Además, estos metales pueden trasladarse a los ecosistemas del suelo y ser absorbidos por los organismos (Yan et al., 2020). Los metales pesados como el arsénico, el cromo, el cadmio, el mercurio y el plomo a diferencia de la materia orgánica son componentes que no se degradan logrando permanecer hasta 150 años en los vertederos (Hussein et al., 2021). Se ha comprobado que la resistencia de las bacterias a los metales pesados está vinculada a su resistencia a los antibióticos, lo que indica un proceso de co-selección mediante el cual un agente selectivo, como los metales pesados, favorece indirectamente la persistencia y propagación de genes de resistencia antimicrobiana, actualmente se describen tres mecanismos principales por los cuales se puede dar este coseleccion; el primero es la colocalizacion en donde los genes de reistsencia a metales pesados los cuales permiten a las bacterias sobrevivir en ambientes contaminados mediante mecanismos como la expulsión activa de metales, transformación química, secuestro intracelular o reducción de su toxicidad se encuentran alojados en el mismo elemento genético móvil (plasmidos, trasposones o integrones), el segundo es la resistencia cruzada cuando un mismo mecanismo bacteriano proporciona protección frente a diferentes agentes tóxicos, incluyendo tanto metales pesados como antibióticos. Un ejemplo común son las bombas de eflujo *CzcCBA,* la cual se encarga de expulsar iones de cadmio, cobalto y zinc, en donde se puede expular antibioticos mediante esta misma, por último la corregulación cuando genes de resistencia a metales y antibióticos son controlados por los mismos sistemas regulatorios. La exposición a metales pesados puede activar respuestas globales de estrés que inducen simultáneamente la expresión de genes relacionados con resistencia antimicrobiana (Gillieatt & Coleman, 2024).

2.1.3 Diversidad microbiana presente en lixiviados

La mayoría de los vertederos están formados principalmente por áreas anaeróbicas, donde la descomposición de materia orgánica en metano y dióxido de carbono ocurre gracias a microorganismos con diferentes capacidades metabólicas y funciones. Investigaciones ecológicas moleculares que emplean técnicas de secuenciación de alta profundidad, han evidenciado que las comunidades microbianas en diversos nichos ambientales son variadas y complejas. (Kjeldsen et al. 2002).

De acuerdo al análisis realizado por Song en 10 muestras de 5 vertederos se encontró que la diversidad microbiana a nivel de género era dominante *Pseudomona* afiliado a *Proteobacterias* representando entre el 40,9% y el 92,4% del total de géneros (Figura 1), siendo identificados también *Balneola, Fluviicola, Cetobacterium, Acholeplasma,y Halocela* de acuerdo a la abundancia presente en las muestras.

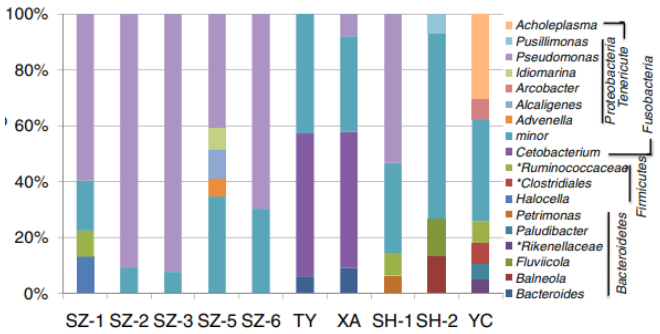


Figura 1 Composiciones de la comunidad bacteriana representada por abundancia relativa de géneros en vertederos muestreados (Song et al., 2015).

Por otra parte la investigación realizada por Remmas et al. (2017) y como resultado de los datos de secuenciación para el análisis de la diversidad se identificaron los principales géneros siendo estos *Candidimonas, Pusillimonas, Leucobacter , Paralcaligens, y Truepera* con un 40% del total de lecturas realizadas, la desviación estándar indicada en la parte superior de cada barra señala que los datos son homogéneos. Así mismo Zhang et al. (2011) reportó los siguientes filos asociados

a las muestras analizadas *Proteobacteria, Spirochaetes, Firmicutes, Bacteroidetes y Thermotogae.* Como se evidencia la diversidad microbiana puede ser distinta entre cada uno de los lixiviados, debido a que estos están sometidos a diferentes fuentes de contaminación alterando de manera directa la composición de estos y a su vez, cambiando la matriz de crecimiento de diversos microorganismos (Song et al. 2015b).

2.1.4 Microorganismos patógenos presentes en rellenos sanitarios

Existe una diversidad microbiana muy compleja en los lixiviados ya que estos presentan condiciones adecuadas en términos de humedad, pH, disponibilidad de nutrientes y temperatura muchos de los microorganismos presentes pueden ser potencialmente patógenos para los humanos. (Mondragón-Quiguanas et al., 2022).

De igual manera estos patógenos pueden transferirse por bioaereosoles que se definen como partículas o microfragmentos de animales, plantas o microorganismos que están presentes en el aire, el reducido tamaño de estas partículas permite que permanezcan en suspensión durante el funcionamiento de los vertederos de residuos sólidos urbanos, y eventualmente ingresen en el cuerpo humano a través de la ingestión, la respiración y la absorción por la piel, lo que puede generar problemas de salud (Franchitti et al., 2020).

Los resultados expuestos por Samadi et al. (2021) en donde se evalúan los efectos sobre la salud de aerosoles provenientes de un vertedero de residuos municipales en Irán, evidencian la presencia de organismos patógenos así como no patógenos presentes en el aire. El estudio realizado en dos estaciones del año; primavera y verano demuestran una mayor concentración en esta última debido a altas temperaturas lo que puede afectar el crecimiento, reproducción y la transferencia en el medio ambiente de agentes microbianos. Estos aerosoles bacterianos patógenos presentaron una mayor concentración de *Pseudomonas spp.* (635.25 ± 77.24 UFC/m3) en donde infecciones a causa de estas pueden presentarse en diversas localizaciones anatómicas, como la piel, los tejidos subcutáneos, los

huesos, los oídos, los ojos, las vías urinarias, los pulmones y las válvulas cardíacas. El área afectada depende de la puerta de entrada y susceptibilidad del huésped puesto que personas inmunocomprometidas son más propensas a contraer alguna infección por este microorganismo (Paz-Zarza et al., 2019), *Staphylococcus aureus* (460.91 ± 49.42 UFC/m3) la cual es una bacteria considerada como oportunista puede causar infecciones en la piel, pulmones e intoxicaciones alimentarias (Massey, 2006) y *Escherichia coli* (449.20 ± 9.61 UFC/m3) la cual puede causar infecciones intestinales y urinarias (OMS, 2018).

Para el caso de bacterias patógenas en el suelo de rellenos sanitarios se tiene registro del aislamiento de coliformes como señala Kalwasińska & Burkowska , diversos autores como Tena y Frączek reportaron la presencia de bacterias de *Salmonella* siendo un indicador del estado de contaminación del suelo. Tena reportó el aislamiento de 39 bacterias Gram-negativas patógenas y oportunistas (Cuadro 1) las cuales fueron obtenidas en muestras de suelo, aire y lixiviados provenientes de un relleno sanitario en Aguascalientes, México. De éstas 10 fueron patógenas, 17 oportunistas y 2 fitopatógenas. Este estudio sugiere un riesgo sanitario importante, especialmente para los empleados permanentes del vertedero ya que los trabajadores de este lugar podrían enfrentar la posibilidad de contraer infecciones gastrointestinales y respiratorias. Además, podrían aparecer enfermedades como bacteriemias, meningitis, infecciones del tracto urinario y otras infecciones oportunistas.

Especies	Suelo	Aire	Lixiviados	Observaciones sobre salud pública
Salmonela spp		*X*		*Salmonelosis, fiebre tofoidea, gastroenteritis*
Y. enterocolitica		X		Gastroenteritis aguda
E. coli		X	X	Diarrea e infecciones del tracto urinario
Bordetella spp	X	X		Tosferina
K. pneumoniae	X	X		Sepsis, neumonia
Brucella spp			X	Brucelosis
A.hydrophyla	X	X	X	Diarrea aguda en niños
A.salmonicida	X			Diarrea aguda en niños
A.baumanii	X		X	Infecciones primarias del torrente sanguíneo, neumonía, infecciones del tracto urinario, peritonitis, sitio quirúrgico, meningitis y sinusitis
A. lwoffii			X	Saprofitos, comensales de la piel y la garganta, celulitis preseptal, gastritis crónica, cáncer

Tabla 1. Bacterias Gram-negativas patógenas aisladas del suelo, lixiviados y aire de un relleno sanitario (Adaptado de Flores-Tena et al. 2007).

2.1.5 Resistoma presente en rellenos sanitarios

El resistoma es el conjunto total de genes de resistencia presentes en una bacteria, comunidad microbiana o ambiente determinado. Incluye tanto genes que actualmente confieren resistencia a antibióticos o metales pesados, como genes potenciales que podrían evolucionar o transferirse a otros microorganismos. (Wright G, 2007). Este resistoma debido a su diversa composición resulta difícil de evaluar mediante PCR y qPCR por la disponibilidad limitada cebadores. (Yang et al., 2016), Diversos autores han empleado como método para la evaluación de resistoma el

análisis metagenómico de alto rendimiento observando la presencia y abundancia de GRA (Christgen et al., 2015).

De acuerdo a lo realizado por Zhao et al. (2021) los GRA encontrados en el análisis metagenómico de vertederos municipales de 19 muestras de lixiviado en 12 ciudades en China se detectaron 21 tipos de GRA (Figura 2.) de los cuales los genes de resistencia a aminoglucósidos, bacitracina, beta-lactamasa, cloranfenicol, fosmidomicina, macrólido-lincosamidaestreptogramina (MLS), multifármacos, polimixina, rifamicina, sulfonamida, tetraciclina y vancomicina fueron encontrados en todas las muestras de lixiviados, siendo más abundante la presencia del tipo de gen con resistencia a la sulfonamida.

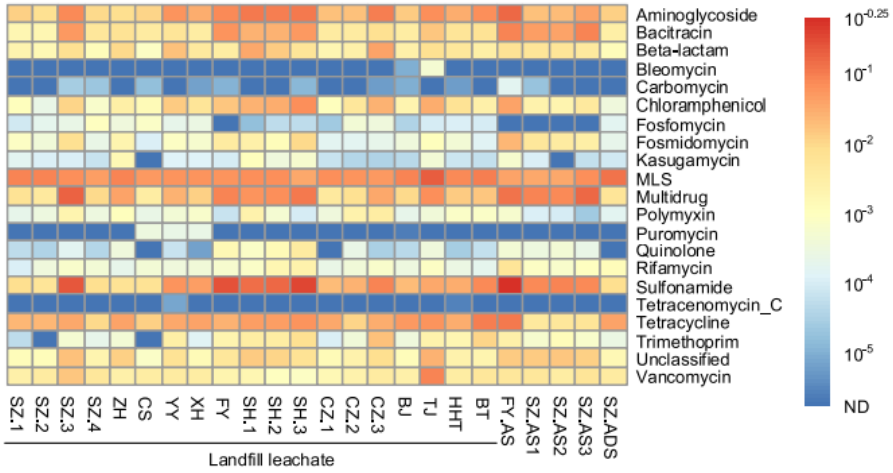


Figura 2. Perfil cuantitativo de amplio espectro de los tipos de ARG (Zhao et al., 2018).

Por otra parte Xi Liu en el análisis de genes presentes en las etapas de descomposición de residuos de un vertedero en este mismo país los principales GRA fueron bacitracina, tetraciclina, multidrogas, macrólido-lincosamida-estreptogramina (MLS) y genes de resistencia a sulfonamida, que representan más del 90% del total de GRA en cada fase, estos genes se transfirieron a diversos huéspedes en donde el gen *bacA* fue transportado en su mayoría por *Ruminococcus y Bacteroides* en la etapa de la fase aérobica. *Pseudomonas* fue el

principal huésped de los genes de resistencia a múltiples fármacos *mexF y mexW* (Figura 5) se puede identificar una similitud en cuanto a GRA encontrados por Zhao.

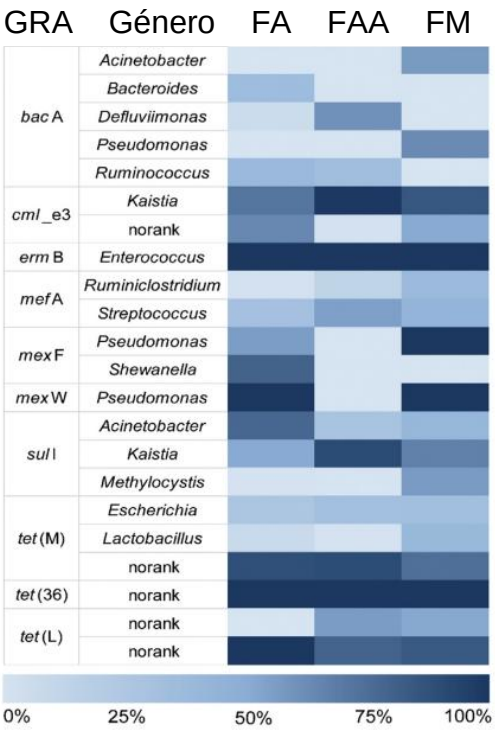


Figura 3. Porcentaje relativo de hospedadores para los 10 subtipos de GRA más abundantes en la fase aeróbica (FA), la fase ácida anaeróbica (FAA) y la fase metanogénica (FM) durante la descomposición de los desechos (X. Liu et al., 2018).

2.1.5.1 Coselección de resistencia a antibióticos y metales pesados mediante la co-localización génica en elementos genéticos móviles.

La coselección de resistencia a antibióticos y metales pesados está mediada por la presión selectiva ejercida por ambientes contaminados con altas concentraciones de metales pesados. Como respuesta a estas condiciones adversas, las bacterias

desarrollan diversas estrategias de supervivencia que les permiten adaptarse y persistir en dichos entornos. Entre estas estrategias destaca la adquisición o generación de genes de resistencia a metales pesados, los cuales codifican mecanismos capaces de expulsar, transformar o almacenar los metales tóxicos, evitando así el daño celular.

La relación entre la resistencia a metales pesados y la resistencia a antibióticos se explica mediante el fenómeno de coselección. En muchos casos, los genes que confieren resistencia a ambos agentes se encuentran localizados en un mismo elemento genético móvil, como plásmidos, transposones o integrones; este mecanismo es conocido como colocalización génica. Debido a esta asociación física, la selección de bacterias resistentes a metales pesados puede favorecer simultáneamente la persistencia y diseminación de genes de resistencia a antibióticos, aun en ausencia de presión selectiva por antibióticos en el ambiente.

Frecuentemente, para determinar la presencia de genes de resistencia a metales pesados y antibióticos en un mismo plásmido, se realizan análisis de correlación entre genes específicos asociados a ambos tipos de resistencia. Entre los ejemplos más reportados se encuentra la asociación entre el gen *czcA*, relacionado con la resistencia a cobalto, zinc y cadmio, y el gen sul1, que confiere resistencia a sulfonamidas. Asimismo, se ha descrito la coexistencia de los genes *copA*, implicado en la resistencia al cobre, y *blaTEM*, asociado a la resistencia a antibióticos β-lactámicos. Estas asociaciones sugieren la posible colocalización de dichos genes en elementos genéticos móviles, favoreciendo procesos de coselección y transferencia horizontal de resistencia bacteriana (Gillieatt & Coleman, 2024).

El estudio realizado por Håkonsholm et al. (2023) evidencio la presencia simultánea en un plasmido conjugativo de genes de resistencia a antibiotiocos y metales. Se identificaron siete plasmidos pertenecientes a los grupos IncFIB e IncFII que contenían genes de resistencia a antibiotico como como *qnrS1*, *aadA1*, *aadA2*, *aph(3')-Ia*, *tet(D)* y *blaSHV-1*, en donde varios de estos plasmidos contenían genes

de resistencia para cobre (*cop*), plata (*sil*) y arsenico (*ars*). Adicionalmente, se comprobó de manera experimental la tarsnferencia conjugativa de un plasmido IncFIB de *K. pneumonie* a *E. coli.*

2.2 Bacterias resistentes a antibióticos

Las bacterias pueden mostrar resistencia natural a ciertos antibióticos, pero también tienen la capacidad de adquirirla mediante mutaciones en sus genes cromosómicos o por transferencia horizontal de genes. La resistencia intrínseca de una especie bacteriana a un antibiótico específico se refiere a su habilidad para resistir los efectos de dicho antibiótico debido a características estructurales o funcionales propias (Blair et al., 2015). Cuando todas las cepas de una misma especie son resistentes a un antibiótico, se conoce como resistencia natural. Esta puede ocurrir debido a características específicas de la pared bacteriana que impiden que el antibiótico llegue a su objetivo, mientras que la resistencia adquirida se presenta solo en algunas cepas de una especie que normalmente sería sensible, este tipo de resistencia es la más común y puede surgir a través de mutaciones o por la incorporación de nuevos genes. Las mutaciones ocurren de manera espontánea, con una frecuencia que varía entre 10^{-6} y 10^{-9}, dependiendo del tipo de bacteria y las condiciones ambientales (Oromí Durich, 2000).

2.2.1 Mecanismos de resistencia

La resistencia bacteriana, ya sea natural o adquirida, puede ser estudiada desde un enfoque molecular y bioquímico. Estos mecanismos describen cómo las cepas bacterianas adquieren resistencia a los antibióticos, según el tipo de resistencia y el modo de acción del antibiótico. Una cepa bacteriana puede generar diferentes mecanismos de resistencia a uno o más antibióticos, y de manera similar, un

antibiótico puede ser desactivado por varios mecanismos de diferentes especies bacterianas (Giedraitienė et al., 2011).

2.2.1.1 Modificación enzimática del antibiótico

Las bacterias generan enzimas que pueden modificar la estructura del antibiótico, lo que provoca que pierda su eficacia. Las enzimas que degradan la estructura química más conocidas son las β-lactamasas, las cuales se distinguen por hidrolizar el núcleo β-lactámico al romper el enlace amida. (Fuchs. 1994), causando un mayor impacto clínico, ya que otorgan resistencia a casi todos los antibióticos betalactámicos (Rice, 2012). Pueden clasificarse de acuerdo a su estructura molecular, secuencia de aminoácidos y propiedades bioquímicas agrupados en las clases A, B, C y D como se esquematiza en la Cuadro 2. (Bush et al. 1995). La clase de β-lactamasas A tiene la capacidad de solo hidrolizar a penicilinas (Paterson, 2005). Mientras que aquellas pertenecientes al grupo B además de tener capacidad para hidrolizar cefalosporinas y penicilinas, cuentan con la capacidad de inhibir a los carbapenémicos (Queenan et al. 2007).

Los genes responsables de la producción de beta-lactamasas (genes *bla*) pueden estar localizados en el cromosoma o en elementos genéticos móviles. Se ha señalado que uno de los principales factores que favorecen la selección de bacterias portadoras de estas enzimas es el uso indiscriminado de antibióticos (Matagne et al., 1998).

De igual manera las pertenecientes al grupo D son denominadas OXAs por su capacidad para hidrolizar oxacilina, éstas se han convertido en un mecanismo de resistencia significativo, especialmente en *Acinetobacter baumannii* y en enterobacterias. Su espectro de acción es muy variable: algunas solo confieren resistencia a penicilinas como la oxacilina y cloxacilina; otras variantes también confieren resistencia a cefalosporinas de primera generación, y algunas incluso hidrolizan carbapenémicos. En general, las OXAs son poco susceptibles a los

inhibidores clásicos de betalactamasas, como el ácido clavulánico, sulbactámico y tazobactámico. (Bush et al., 1995).

Tabla 2. Clasificación molecular de las beta-lactamasas (Drawz y Bonomo, 2010).

Clase	Sustratos	Tipos de Enzimas Betalactamasa
C	Cefalosporinasas	*P99*
	Cefamicinasas	*FOX-4*
A	Penicilinas	
	Cefalosporinas	*PC1*
		TEM -1, SHV-1
		TEM – 10, SHV-2
		TEM - 30
		TEM – 50
		RTG – 4
D	Penicilinas	*OXA – 1*
	Cefalosporinas	*OXA – 11*
	Carbapenémicos	*OXA -23*
		CepA
	Carbapenémicos	*KPC-2*
B	Carbapenémicos	
B1		*NDM-1, VIM-2, IMP-1*
B2		*CphA*
B3		*L1*

2.2.1.2 Alteración del sitio blanco del antibiótico

La resistencia bacteriana que resulta de la modificación del sitio de acción del antibiótico implica cambios en ciertas áreas específicas de la célula bacteriana, como la pared celular, la membrana celular o las subunidades ribosomales 50S y 30S, entre otras. Este mecanismo es utilizado principalmente por las bacterias Gram positivas, que provocan alteraciones estructurales en los sitios de acción de los antibióticos β-lactámicos, específicamente en las proteínas que se unen a la penicilina (Cavaco, 2008). La mayoría de los antibióticos se unen de manera específica a sus dianas con alta afinidad, lo que bloquea su actividad normal. Sin

embargo, los cambios en la estructura de la diana que dificultan la unión del antibiótico, pero que permiten que la diana siga cumpliendo su función, pueden conferir resistencia. Otro caso en el que se considera que los efectos provienen de mutaciones que afectan los sitios diana del medicamento es la resistencia a las fluoroquinolonas afectando a la ADN-girasa y topoisomerasa (Hooper DC, 2003). La eficacia de antibióticos pertenecientes a las clases de glicopéptidos, quinolonas y β-lactámicos puede verse disminuida debido a la creación de nuevos sitios blanco. Los betalactámicos funcionan uniéndose de manera covalente a las proteínas ligadoras de penicilina (PBP) en la membrana citoplasmática.

Esto bloquea la actividad de las enzimas transpeptidasa y carboxipeptidasa de las PBP durante las etapas finales de la síntesis del peptidoglicano. Como resultado, se activan las autolisinas endógenas, lo que provoca la lisis y la muerte celular de la bacteria. Se ha observado en bacterias como *S. pneumoniae* y aislados de *Neisseria* que existen alteraciones en la estructura de las PBP. Estos cambios son causados por una estructura tipo mosaico en la secuencia del gen de la proteína PBP-2, lo que probablemente resulta de un evento de recombinación entre especies, específicamente entre *Streptococcus* orales y *Neisseria* comensales (Barker k, 1999).

La adición de grupos químicos a sitios específicos de la molécula de antibiótico por enzimas bacterianas puede inducir resistencia al antibiótico, ya que bloquea la unión del antibiótico a su proteína objetivo debido a un impedimento estérico. Se pueden transferir diversos grupos químicos, las enzimas responsables forman una amplia y diversa familia de enzimas resistentes a los antibióticos. Los antibióticos aminoglucósidos son particularmente vulnerables a esta modificación, ya que son moléculas grandes con varios grupos hidroxilo y amida expuestos. Las enzimas modificadoras de aminoglucósidos confieren altos niveles de resistencia al antibiótico (o antibióticos) que modifican (Wright , 2007).

2.2.1.3 Impermeabilidad de la membrana o pared celular

Este mecanismo se origina a partir de cambios en los receptores bacterianos específicos para los antimicrobianos o de alteraciones estructurales en los componentes de la envoltura celular que afectan la permeabilidad. También incluye la pérdida de la capacidad de transporte activo a través de la membrana celular y la activación de bombas de eflujo, que se activan cuando el antibiótico ingresa a la célula bacteriana (Fernández-Riverón, 2003). Las bacterias pueden generar cambios de la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente, por cambios en las porinas (Vila, 2007).

2.2.1.4 Bombas de eflujo

En la membrana celular se encuentran las llamadas bombas de eflujo que llevan a cabo la internalización y expulsión de los antimicrobianos. Una amplia variedad de bombas de eflujo confiere resistencia antimicrobiana tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas (Fernández-Riverón, 2003).

Las proteínas de membrana encargadas de exportar antibióticos fuera de la célula, manteniendo así bajas sus concentraciones intracelulares, se conocen como bombas de eflujo. Este mecanismo otorga resistencia a diversos antibióticos, incluyendo tetraciclinas, quinolonas, cloranfenicol, β-lactámicos y también a antisépticos (Lim et al. 2012). Las bombas de eflujo pueden ser específicas para ciertos antibióticos, pero la mayoría de ellas son transportadores de múltiples fármacos, lo que les permite bombear una amplia variedad de antibióticos no relacionados, como macrólidos, tetraciclinas y fluoroquinolonas. Este mecanismo contribuye de manera significativa a la resistencia a múltiples fármacos (MDR) (Džidic S, 2008).

Como se describe en la Tabla 3. Las principales bacterias con importancia clínica y sus respectivas bombas de eflujo se tiene que *Pseudomona aeruginosa* utiliza

más de cuatro potentes bombas de eflujo MDR (Mex). Las bombas de eflujo *MexV-MexW-OprM* MDR son responsables de la resistencia a una amplia gama de antibióticos, como fluoroquinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina, bromuro de etidio y acriflavina. Por otro lado, el aumento de la expresión de las bombas de eflujo *MexAB-OprM* conduce a una mayor concentración inhibitoria frente a antibióticos como penicilinas, cefalosporinas de amplio espectro, cloranfenicol, fluoroquinolonas, macrólidos, novobiocina, sulfonamidas, tetraciclina y trimetoprima, además de colorantes y detergentes (Thomson JM, 2005).

Tabla 3. Sistema de eflujo de resistencia a múltiples fármacos de bacterias clínicamente importantes (Alekshun MN,2007).

Bacteria	Sistema de eflujo	Resistencia representativa a los antibióticos
P. aeruginosa	*MexAB-OprM*	β-lactamas, fluoroquinolonas
	MexCD-OprJ	cefalosporinas de cuarta generación
	MexEF-OprN	fluoroquinolonas, cloranfenicol, trimetoprima, triclosán
	MexHI-OprD	bromuro de etidio
	MexJK-OprM	ciprofloxacino, tetraciclina, eritromicina, triclosán
	MexVW-OprM	fluoroquinolonas, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, bromuro de etidio, acriflavina
	MexXY-OprM	aminoglucósidos, tigeciclina
A. baumannii	*AdeABC*	aminoglucósidos, fluoroquinolonas, tetraciclina, cefotaxima, cloranfenicol, eritromicina, trimetoprima
B. pseudomallei	*AmrAB-AprA*	macrólidos, aminoglucósidos
E. coli	*AcrB-Tolc*	fluoroquinolonas, β-lactamas, tetraciclina, cloranfenicol, acriflavina, trimetoprima
K. pneumoniae	*AcrB-TolC*	fluoroquinolonas, β-lactamas, tetraciclina, cloranfenicol
S. aureus	*MepA*	tigeciclina, minociclina, tetraciclina, ciprofloxacina, bromuro de etidio de norfloxacina, bromuro de tetrafenilfosfonio
E. faecalis	*EmeA*	norfloxacino, bromuro de etidio, clindamicina, eritromicina, novobiocina
	Lsa	Clindamicina, quinupristina-dalfopristina
S. pneumoniae	*PmrA*	fluoroquinolonas, acriflavina, bromuro de etidio

2.3 Transferencia horizontal de genes

2.3.1 Conjugación

La conjugación bacteriana es un mecanismo fundamental de transferencia horizontal de genes. En este proceso, el ADN se transfiere de una bacteria donante a una bacteria receptora a través de contacto directo. Durante la conjugación, la bacteria donante transmite material genético, como plásmidos o fragmentos cromosómicos, a la receptora, lo que puede conferirle nuevas características, como resistencia a antibióticos, capacidad de metabolizar diferentes compuestos o virulencia. Este proceso contribuye a la variabilidad genética entre las bacterias y juega un papel importante en la diseminación de genes, incluyendo aquellos que confieren resistencia a tratamientos antimicrobianos (Sousa et al., 2023). De igual manera se ha demostrado que la conjugación bacteriana es un proceso ubicuo que ocurre en una variedad de entornos bacterianos**.** Este mecanismo de transferencia genética no se limita a un tipo específico de ambiente, sino que se ha observado en comunidades bacterianas presentes en diversos hábitats, como el suelo, las superficies de plantas**,** el agua y las aguas residuales**,** así como en biopelículas (Moriguchi et al., 2020)**.**

2.3.2 Transducción

La transducción es un mecanismo de transferencia genética en el que el ADN de una célula bacteriana es transferido a otra a través de un bacteriófago. Durante este proceso, el bacteriófago infecta una célula huésped y, al final de su ciclo de replicación, provoca la lisis de la célula. En algunos casos, el ADN fragmentado del genoma de la célula huésped es empaquetado accidentalmente dentro de las partículas infecciosas del bacteriófago. Cuando el bacteriófago infecta otra célula, en lugar de inyectar su propio material genético, transfiere el ADN del huésped.

Este mecanismo permite que el material genético de una célula bacteriana se transfiera a otra sin la necesidad de contacto directo (Daubin & Szöllősi, 2016)

Algunas especies bacterianas han aprovechado este mecanismo y secuestrado los genes de los bacteriófagos para facilitar el intercambio genético entre ellas. Este fenómeno es importante para la evolución bacteriana, ya que permite la propagación de genes, incluidos aquellos relacionados con la resistencia a antibióticos, lo que aumenta la diversidad genética y la capacidad de adaptación de las bacterias (Lang & Beatty, 2007).

2.3.3 Transformación

La transformación es un tipo de transferencia horizontal de genes en la cual las bacterias adquieren material genético del ambiente circundante. Este proceso ocurre cuando una bacteria captura ADN libre que ha sido liberado por otra bacteria, generalmente como consecuencia de la lisis celular o mediante la liberación activa de material genético. A diferencia de otros mecanismos como la conjugación y la transducción, la transformación no requiere contacto directo entre las células ni la participación de bacteriófagos (Mell & Redfield, 2014).

Este proceso de transformación genética tiene una relevancia significativa en la evolución bacteriana, ya que permite a las bacterias adquirir rápidamente nuevas características sin necesidad de reproducción sexual o de interacción directa. Esto es especialmente relevante para la resistencia a antibióticos, ya que las bacterias pueden incorporar genes de resistencia de su entorno, lo que les otorga ventajas en presencia de antibióticos. Además, en ambientes como el suelo y las aguas, las bacterias tienen la capacidad de intercambiar material genético de manera eficiente, lo que favorece su adaptación rápida a cambios ambientales, contribuyendo a la evolución y diversidad de las poblaciones bacterianas (Lacroix & Citovsky, 2018).

3 Objetivos

3.1 General

Determinar los genes de resistencia a antibióticos en el metagenoma de suelos expuestos a lixiviados en rellenos sanitarios del estado de Querétaro, como una fuente potencial de diseminación de bacterias multirresistentes.

3.2 Particulares

- Caracterizar, mediante análisis metagenómico, la diversidad taxonómica de comunidades bacterianas presentes en suelos de rellenos sanitarios.
- Evaluar los perfiles del resistoma microbiano asociados a las bacterias detectadas en suelos de rellenos sanitarios.
- Caracterizar los genes de resistencia a antibióticos mediante la secuenciación del genoma de bacterias multirresistentes.

3.3 Profesionalizantes

- Adquirir competencias en el manejo de herramientas bioinformáticas para la interpretación de datos metagenómicos.
- Desarrollar capacidades para el aislamiento de bacterias resistentes.
- Adquirir habilidades para la extracción y purificación de ADN proveniente de microorganismos.
- Fomentar la evaluación del resistoma de comunidades bacterianas en áreas aun no estudiadas y que representen un peligro latente a la población.

4 Metodología

4.1 Diseño

El diseño de este proyecto de investigación es de tipo transversal descriptivo.

4.1.1 Descripción de condiciones experimentales

Muestreo

Se obtuvieron muestras de suelo de acuerdo a la NOM-021-RECNAT-2000: Especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos.

Grupos de observación

Muestra	**Microorganismos patógenos**	**Genes de resistencia a antibióticos**
Suelo libre de lixiviados (SNC)	Microorganismos presentes en suelo libre de lixiviados	Análisis de los genes de resistencia
Suelo con presencia de lixiviados (SC)	Microorganismos presentes en suelo con presencia de lixiviados	Análisis de los genes de resistencia

4.2 Procedimientos

4.2.1 Obtención de muestra de suelo

Se analizaron dos suelos como objetivos de estudio y fueron delimitados los perímetros para la obtención de las muestras. La región en donde se encuentra el vertedero presenta un clima semiárido, con una temperatura promedio de 16.7 a 19 °C, la precipitación media anual es de 576 mm en donde la temporada de lluvias se presenta entre junio y septiembre, destacándose por lluvias moderadas que representan la mayor parte de precipitaciones anuales. Con una línea punteada roja se representa al vertedero con un perímetro de 905.56 m, donde se tomaron un total de 43 submuestras bajo el método aleatorizado simple en donde 8 fueron tomadas de zonas cercanas a la escorrentía de lixiviado, mientras que 35 tomadas aleatoriamente de áreas libres de residuos visibles. En la línea amarilla se presenta el lugar que no tiene presencia de lixiviados como suelo a comparar contando con un perímetro de 827.21 m, de igual manera se tomaron 43 muestras aleatorias en el área correspondiente. Las submuestras de ambos suelos fueron tomadas a una profundidad de 0-30 cm siguiendo las especificaciones que se describen en la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis . Estas submuestras se combinaron para formar una sola muestra de cada suelo, se homogenizaron a un tamaño de partícula de 2 mm mediante un tamiz hasta tener 1.5 kg, posteriormente Se colocaron y etiquetaron en bolsas estériles herméticas para su almacenamiento a 5° C y posterior análisis.



Figura 4. Imagen satelital de las áreas a muestrear

4.2.2 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN metagenómico se usó el kit comercial Quick-DNA Fecal/Soil Microbe DNA Miniprep Kit de marca Zymo Research específico para muestras de suelo, mediante la toma de muestra directa de 5.0 g de suelo siguiendo las especificaciones del fabricante. El ADN obtenido fue analizado para verificar su presencia y calidad, colocando 3 µL de cada muestra mediante un gel de agarosa al 1% con electroforesis a 80 Volts durante 40 minutos y se reveló el resultado con luz UV. La secuenciación se realizó con Shotgun Metagenomic Sequencing Service (Zymo Research, Irvine, CA) bajo el formato de secuencias en pares (paired-end). La calidad de las secuencias se verificó con el programa FastQC.

4.2.3 Análisis bioinformático

Las lecturas paired-end obtenidas mediante secuenciación metagenómica de tipo shotgun fueron procesadas en la plataforma BV-BRC. Inicialmente, las secuencias fueron sometidas a trimming y eliminación de adaptadores mediante Trim Galore v0.6.6 y Cutadapt v3.2, seguido de un análisis de calidad utilizando FastQC v0.11.9. Posteriormente, las lecturas paired-end fueron sincronizadas mediante Fastq-Pair y el ensamblaje fue realizado mediante Unicycler v0.4.8 utilizando SPAdes v3.15 como ensamblador interno, se utilizaron parámetros automáticos, estableciendo una cobertura mínima de contig de 5X y una longitud mínima de contig de 300 pb. Los contigs obtenidos fueron corregidos mediante Pilon v1.23 y evaluados con QUAST v5.2.0. y fueron analizados mediante el servicio *Comprehensive Genome Analysis* de BV-BRC, permitiendo la identificación taxonómica bacteriana, evaluación de diversidad microbiana y detección de genes de resistencia antimicrobiana mediante comparación con bases de datos especializadas como CARD y ResFinder.

4.2.4 Cultivo de bacterias resistentes

Para el aislamiento de bacterias resistentes se prepararó, medio de cultivo Mueller-Hinton adicionado con 5 antibióticos diferentes a concentraciones indicadas en la Tabla 4. Se tomaron 5.0 g de cada muestra (con presencia de lixiviados y libre de lixiviados) y se agregaron a 10 ml de agua estéril para formar una solución madre, posteriormente se tomó 1 ml de solución madre y se agregaron a 9 ml de agua estéril. Se inocularon agregando 100µl de cada una de las soluciones e incubaron en cajas Petri por duplicado a una temperatura de 30-35 ° C durante 24-48 hrs. Posteriormente se examinaron las placas para detectar el crecimiento bacteriano, siguiendo la metodología descrita por (Wiegand et al., 2008). Se contaron las UFC de aquellas bacterias que hayan proliferado en los distintos medios enriquecidos con antibióticos de acuerdo a Hoben y Somasegaran (1982), posteriormente se separaron las distintas colonias por fenotipos para su identificación en placas con agar Mueller-Hinton incubadas a temperatura de 30-35 ° C durante 24-48 hrs, en donde se siguieron los siguientes criterios para la nomenclatura de cepas. 1.- muestra de aislamiento SP (suelo con presencia de lixiviados) y SC (suelo libre de lixiviados), 2.- Antibiotico al que presento resistencia (AMP,TET,SM,CL,KN), 3.- numero de secuencial de cepa con las mismas características.

Los residuos provenientes del cultivo de cepas multirresistentes aisladas de los suelos se manejaron de acuerdo a la norma NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 y al convenio de residuos peligrosos que posee la Facultad de Química con una empresa privada.

Antibiótico	**Concentración (µg/ml)**
Ampicilina	100
Tetraciclina	10
Estreptomicina	20

Cloranfenicol	30
Kanamicina	10

Tabla 4. Concentraciones de antibióticos para el cultivo de bacterias del suelo

4.2.5 Evaluación de multirresistencia en cepas aisladas

La evaluación de la resistencia y susceptibilidad a los antibioticos se evaluo mediante el método de difusión en disco haciendo una siembra por extensión en una placa con agar Mueller-hinton y dejándose incubar a una temperatura de 30-35 ° C durante 24-48 hrs, usando multidiscos comerciales con las siguientes características:

Multidiscos para bacterias Gram positivas (+); ampicilina (10 µg), cefolatina (30 µg), cefotaxima (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), clindamicina (30 µg), dicloxaciclina (1 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), penicilina (10 U), tetraciclina (30 µg), sulfametazol/trimetoprima (25 µg), vancomicina (30 µg).

Multidiscos para bacterias Gram negativas (-): amikacina (30 µg), ampicilina (10 µg), carbenicilina (100 µg), cefalotina (30 µg), cefotaxima (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), netilmicina (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), norfloxacino (10 µg), sulfametoxazol/trimetropim (25 µg).

4.2.6 Secuenciación de ADN de bacterias multirresistentes

El servicio de secuenciación genómica Shotgun (Zymo Research, Irvine, CA) se utilizó para obtener el ADN genómico de las cepas Spcl1 y Spbamp1. Se enviaron las muestras de cultivo celular en tubos eppendorf de 5 ml adicionados con Buffer DNA/RNA shield de la marca Zymo Research para su secuenciación. Se prepararon las bibliotecas de secuenciación con el kit Illumina® DNA Library Prep

Kit (Illumina, San Diego, CA) con una entrada de hasta 500 ng de ADN siguiendo el protocolo del fabricante, utilizando códigos de barras únicos de 10 pb con índice doble y adaptadores Nextera® (Illumina, San Diego, CA), y la biblioteca final se secuenció en la plataforma Illumina® NovaSeq (Illumina, San Diego, CA) .

4.2.7 Análisis bioinformático de taxonomía y genoma

Las lecturas paired-end obtenidas mediante secuenciación Illumina fueron procesadas en la plataforma BV-BRC. Inicialmente, las secuencias fueron sometidas a trimming y eliminación de adaptadores mediante Trim Galore v0.6.6 y Cutadapt v3.2, seguido de un análisis de calidad utilizando FastQC v0.11.9. Las lecturas filtradas fueron sincronizadas mediante Fastq-Pair y ensambladas utilizando Unicycler v0.4.8 con SPAdes v3.15 como ensamblador interno. Posteriormente, los contigs obtenidos fueron corregidos mediante Pilon v1.23 y evaluados con QUAST v5.2.0 y Bandage v0.8.1. El servicio *Comprehensive Genome Analysis* permitió la identificación taxonómica bacteriana mediante comparación y bases de datos de BV-BRC, así como la anotación genómica con RASTtk y la detección de genes de resistencia antimicrobiana mediante CARD y ResFinder, se establecio cobertura mínima de contig de 5X y una longitud mínima de contig de 300 pb. Adicionalmente para realizar la confirmación de especies bacterianas se realizó mediante el análisis de la identidad nucleotídica promedio (ANI), comparando los genomas ensamblados de las bacterias contra genomas de referencia disponibles en la base de datos de BV-BRC/PATRIC. Este análisis permite determinar la similitud genómica entre cepas bacterianas, considerando valores ≥95–96% como criterio para identificación de especie. BV-BRC emplea algoritmos basados en Mash/MinHash y cálculos ANI integrados para la asignación taxonómica bacteriana. Adicionalmente, la relación filogenómica con cepas tipo fue evaluada mediante análisis de hibridación digital DNA-DNA (dDDH) utilizando la plataforma TYGS (Type

Strain Genome Server). El cálculo de dDDH fue realizado mediante el Genome BLAST Distance Phylogeny (GBDP), utilizando comparaciones BLAST entre genomas completos. TYGS emplea fórmulas de distancia genómica recomendadas para taxonomía bacteriana y considera valores de dDDH ≥70% como criterio para pertenencia a la misma especie bacteriana. Se identificaron secuencias plasmídicas con plasmidSPAdes v3.15 posteriormente los contigs fueron comparados mediante BLAST contra la base de datos GenBank, permitiendo identificar los plásmidos previamente descritos con mayor similitud nucleotídica. La visualización y representación gráfica de los genomas bacterianos ensamblados se realizó mediante la plataforma Proksee, La plataforma integra herramientas derivadas de CGView para la representación gráfica de secuencias genómicas y utiliza archivos de anotación en formato GenBank para la construcción de los mapas genómicos.

5 Resultados

5.1 Identidad taxonómica global de las muestras (SC vs SNC).

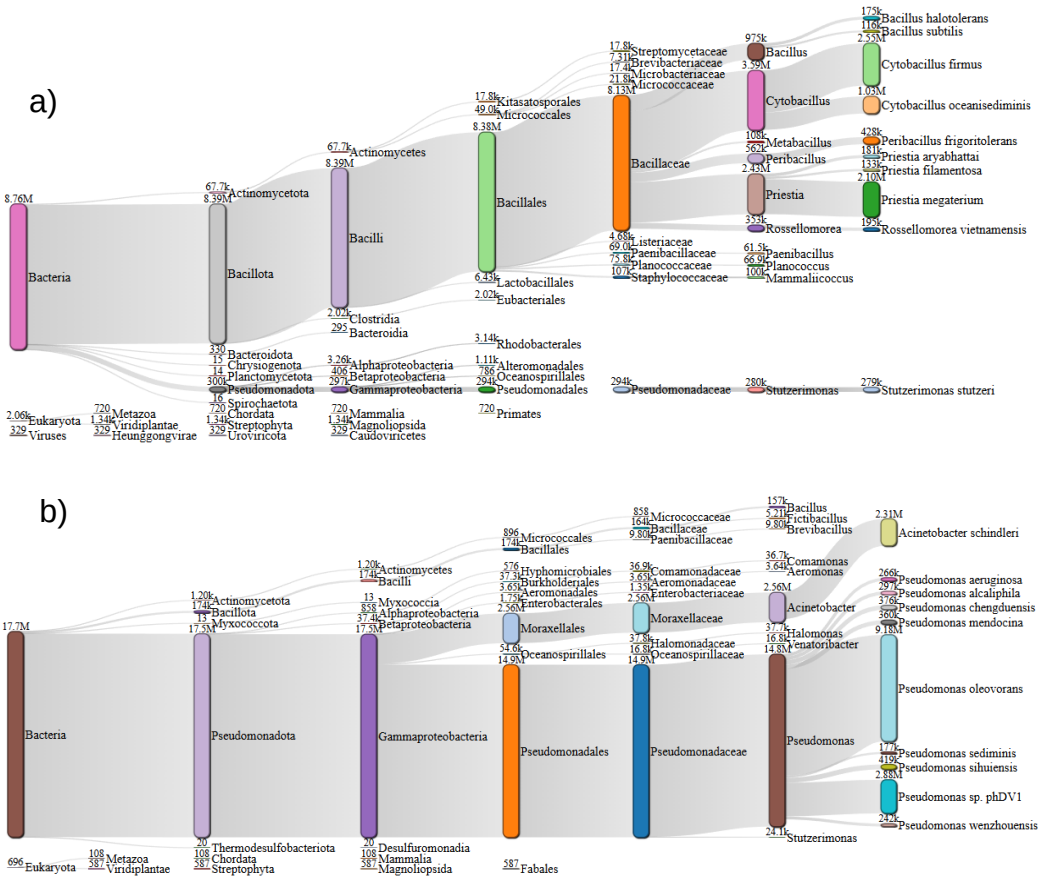


Figura 5. Mapa taxonómico jerárquico tipo Sankey de la composición de los metagenomas. a) suelo contaminando con lixiviados. b) suelo sin lixiviados.

El diagrama tipo Sankey (Figura 5) muestra la distribución taxonómica de las secuencias metagenómicas analizadas en la plataforma BV-BRC para ambos suelos analizados. Cada nodo representa un nivel jerárquico de clasificación (desde dominio hasta especie) y los flujos indican la proporción relativa de secuencias asignadas a cada taxón.

El análisis taxonómico mediante el diagrama de Sankey mostró una marcada diferencia en la estructura de las comunidades bacterianas entre ambas muestras. En la muestra *a*, *Bacillota* fue el filo predominante, representando aproximadamente el 95.8 % de las secuencias bacterianas, mientras que *Pseudomonadota* y *Actinomycetota* representaron aproximadamente 3.4 y 0.77 %, respectivamente. En contraste, la muestra b estuvo dominada por *Pseudomonadota,* con aproximadamente 98.9 % de la abundancia bacteriana, principalmente representada por *Gammaproteobacteria* y el género *Pseudomonas*. Por lo tanto, entre b y a se observa un marcado incremento relativo de *Bacillota* y, en menor magnitud, de *Actinomycetota*, acompañado de una disminución sustancial de *Pseudomonadota*. Estos resultados concuerdan parcialmente con Song et al. (2015), quienes identificaron *Gammaproteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes* entre los principales grupos bacterianos de lixiviados de rellenos sanitarios y reportaron una elevada abundancia de *Pseudomonas*. Asimismo, son compatibles con las observaciones de Zhao et al. (2018), quienes demostraron que la composición de la comunidad microbiana constituye un factor importante asociado con la estructura del resistoma en lixiviados de rellenos sanitarios.

5.2 *Resistoma ambiental por muestra y por condición*

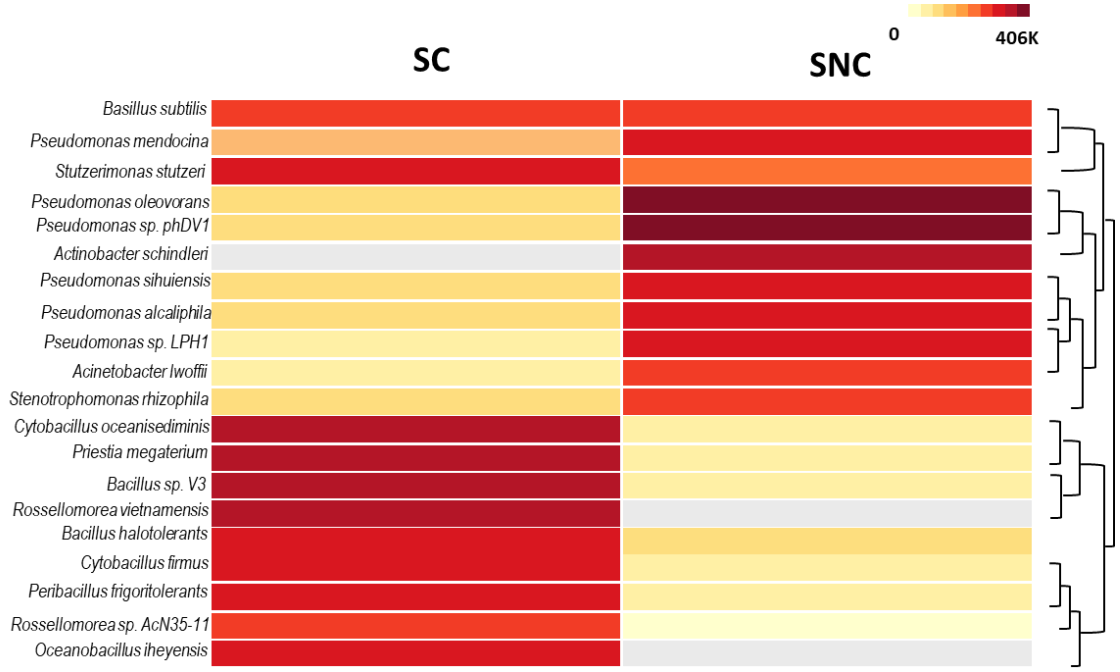


Figura 6. Análisis metagenómico entre el suelo contaminado (SC) y suelo no contaminado (SNC)

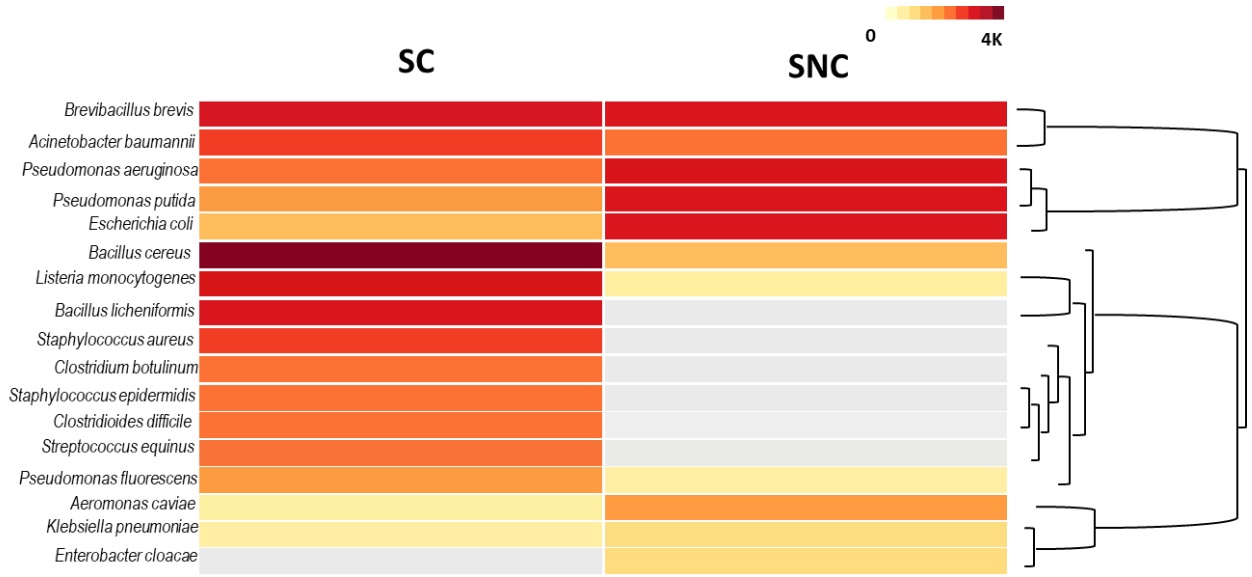


Figura 7. Bacterias patógenas en suelo contaminado (SC) y suelo no contaminado (SNC).

Las figuras 6 y 7 presentan un análisis comparativo de la composición microbiana entre un suelo contaminado con lixiviados (SC) y un suelo no contaminado (SNC), empleando matrices de abundancia relativas representadas mediante mapas de calor y análisis de agrupamiento jerárquico.

Los mapas de calor evidenciaron una marcada diferenciación en la composición de las comunidades bacterianas entre el suelo contaminado (SC) y el suelo no contaminado (SNC). En el SC se observó una elevada representación de especies pertenecientes principalmente al filo Bacillota, entre ellas *Cytobacillus oceanisediminis, Priestia megaterium, Bacillus* sp. V3, *Rossellomorea vietnamensis, Bacillus halotolerans, Cytobacillus firmus, Peribacillus frigoritolerans* y *Oceanobacillus iheyensis*. En contraste, el SNC mostró mayor abundancia de miembros de Pseudomonadota, particularmente especies de los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, incluyendo *P. oleovorans, P. sihuiensis, P. alcaliphila, P. mendocina, A. schindleri* y *A. lwoffii*. Este patrón es consistente con la distribución observada mediante el análisis de Sankey.

La diferenciación entre las muestras también fue evidente al considerar las secuencias asignadas a bacterias potencialmente patógenas u oportunistas. El SC presentó una mayor representación relativa de *Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Bacillus licheniformis, Staphylococcus aureus, Clostridium botulinum, Staphylococcus epidermidis, Clostridioides difficile* y *Streptococcus equinus*, mientras que en el SNC fueron comparativamente más abundantes *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida, Escherichia coli, Aeromonas caviae, Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*. Por lo tanto, la exposición a lixiviados no se relacionó con un incremento uniforme de todos los microorganismos potencialmente patógenos, sino con un cambio en la composición de este grupo, caracterizado principalmente por una mayor representación de miembros de *Bacillota* en SC y de *Pseudomonadota* en SNC.

5.2.1 Genes de resistencia en cada muestra

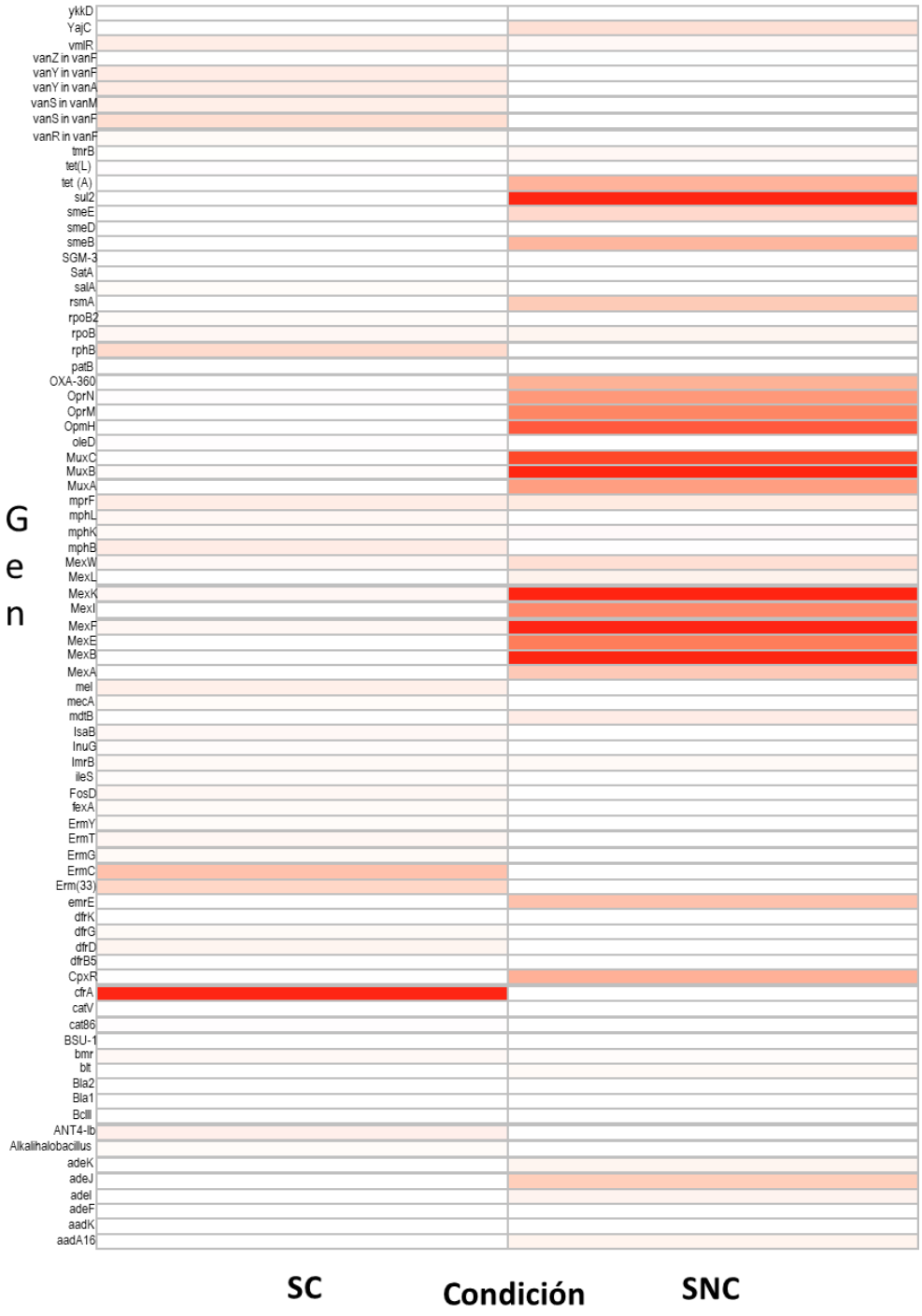


Figura 8. Mapa de calor de genes bacterianas en sueno contaminado (SC) y suelo no contaminado (SNC).

La figura 8 muestra un mapa de calor correspondiente al perfil de genes de resistencia detectados en las muestras de suelo contaminado por lixiviados (SC) y suelo no contaminado (SNC). Cada fila representa un gen o familia génica de resistencia, mientras que las columnas reflejan las dos condiciones experimentales. La intensidad del color indica la abundancia relativa o presencia/ausencia de cada determinante de resistencia, donde los tonos rojos señalan mayor presencia o expresión, y los tonos claros representan baja abundancia o ausencia.

El análisis comparativo del resistoma evidenció diferencias tanto cualitativas como cuantitativas entre el suelo contaminado (SC) y el suelo no contaminado (SNC). Además de las variaciones en abundancia, se identificaron determinantes de resistencia detectados exclusivamente en cada condición. En el SC destacó particularmente *cfrA,* que presentó una elevada abundancia y no fue detectado en SNC. De manera similar, *ErmC, Erm(33)* y diversos componentes asociados con sistemas *van*, entre ellos *vanY, vanS y vanR*, fueron detectados en SC sin una señal correspondiente en SNC. Otros determinantes presentes únicamente en SC incluyeron *tet(L), mecA, dfrG, dfrD y ANT4-Ib*, entre otros.

En contraste, el SNC presentó un conjunto diferente de genes que no fueron detectados en SC. Entre los de mayor representación se encontraron *sul2, OXA-360, OprM, OpmH, MuxC, MuxA, MexB, MexE y MexI.* También se observaron exclusivamente en esta condición *tet(A), smeE, smeB, rsmA, CpxR, adeJ* y otros determinantes. Una característica notable del SNC fue la elevada representación de componentes de sistemas de eflujo multidroga de las familias *Mex, Mux* y *Opr/Opm,* consistente con el predominio taxonómico de *Pseudomonadota* observado en esta muestra.

Además de los genes exclusivos, algunos determinantes se encontraron en ambas condiciones, pero con diferencias importantes de abundancia. *MuxB, MexK, MexF* y *OprN* estuvieron presentes en SC y SNC, aunque mostraron una representación

considerablemente mayor en SNC. Por el contrario, *vmlR y mphB* mostraron una mayor representación en SC. Otros genes, como *mprF, mphI, rpoB, lmrB y bmr*,

Además de los sistemas de eflujo, el SNC presentó determinantes específicos de elevada representación. *sul2* fue uno de los genes más abundantes y no fue detectado en SC; este gen codifica una variante resistente de la dihidropteroato sintasa y se relaciona con resistencia a sulfonamidas. Asimismo, *tet(A)* fue detectado predominantemente en SNC, mientras que *tet(L)* presentó una señal de baja abundancia restringida a SC. Ambos genes codifican sistemas de eflujo de la familia MFS asociados con resistencia a tetraciclinas.

Con respecto a los β-lactámicos, los genes denominados *Bla1 y Bla2* no mostraron una señal detectable en ninguna de las dos condiciones; sin embargo, *OXA-360* fue identificado exclusivamente en SNC. Este determinante pertenece a las β-lactamasas de clase D del grupo *blaOXA,* por lo que constituye evidencia de un mecanismo potencial de resistencia a β-lactámicos presente en el resistoma del SNC.

5.3 Aislamiento y perfiles de resistencia en cepas representativas.

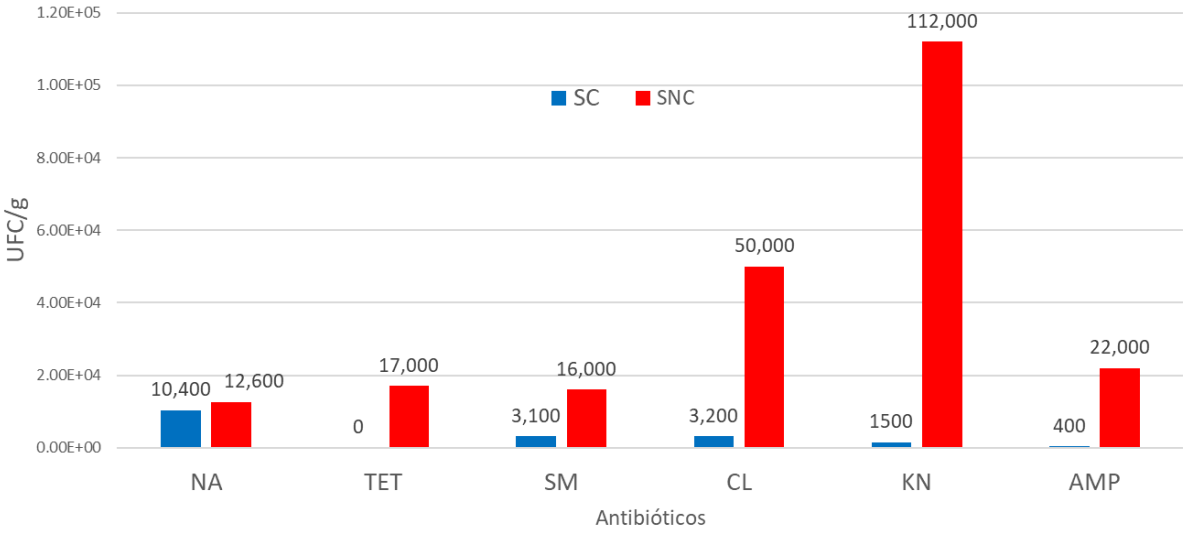


Figura 9. Crecimiento bacteriano en medio enriquecido con antibióticos, Blanco (NA), tetraciclina(TET), estreptomicina (SM), cloranfenicol (CL), kanamicina (KN), ampicilina (AMP).

La Figura 9 muestra los resultados del aislamiento bacteriano de cada muestra de suelo, expresados en UFC/g, frente a los diferentes antibióticos evaluados, además de un control sin antibióticos. En la parte superior de cada barra se indica el número total de UFC/g obtenido en cada condición. El análisis de la fracción bacteriana cultivable mostró diferencias marcadas entre el suelo contaminado (SC) y el suelo no contaminado (SNC) bajo presión selectiva con antibióticos. En ausencia de antibióticos se obtuvieron 10,400 UFC/g en SC y 12,600 UFC/g en SNC, mostrando una diferencia basal relativamente pequeña. Sin embargo, la incorporación de antibióticos produjo perfiles contrastantes entre ambas condiciones. En SC se recuperaron 3,100 UFC/g con estreptomicina, 3,200 UFC/g con cloranfenicol, 1,500 UFC/g con kanamicina y 400 UFC/g con ampicilina, mientras que no se detectó crecimiento bajo tetraciclina. En contraste, el SNC presentó 17,000, 16,000, 50,000, 112,000 y 22,000 UFC/g para tetraciclina, estreptomicina, cloranfenicol, kanamicina y ampicilina, respectivamente. Las mayores diferencias entre las condiciones se

observaron para kanamicina y ampicilina, donde el SNC presentó aproximadamente 75 y 55 veces más UFC/g que el SC, respectivamente.

Tabla 5. Cepas bacterianas y su resistencia a antibióticos: ampicilina (AM), cefalotina (CF), cefotaxima (CFX), ciprofloxacino (CPF), clindamicina (CLM), dicloxacilina (DC), eritromicina (E), gentamicina (GE), penicilina (PE), tetraciclina (TE), sulfametoxazol/trimetroprim (SXT), vancomicina (VA), amikacina (AK), carbenicilina (CB), cloranfenicol (CL), netilmicina (NET), nitrofurantoina (NF), norfloxacino (NOF).

Cepa	AM	CF	CFX	CPF	CLM	DC	E	GE	PE	TE	SXT	VA	AK	CB	CL	NET	NF	NOF	Total
SCSM2	■	■			■	■			■		■				■				7
SCSM3	■		■			■													3
SPAMP1	■	■	■			■			■										5
SPKN6	■	■	■			■			■				■	■	■	■			9
SCCL1	■	■	■		■	■	■			■					■	■			9
SCTET1	■	■	■			■			■					■				■	7
SCAMP2	■	■	■	■		■			■					■					7
SPCL1	■	■	■	■		■			■	■				■	■				9
SCSM3	■		■			■										■			4
SPKN2	■		■													■			3
SCSM4	■		■		■	■					■								5
SPKN9	■	■			■	■	■		■							■			7
SPBAMP1	■	■	■	■		■			■		■	■		■					9
SPKN5	■	■				■	■							■	■	■		■	8
SPSM4	■		■		■	■													4
SCSM1	■	■	■		■	■													5
SCKN8	■	■	■		■	■	■		■						■			■	9
SPSM3	■		■																2
SCKN2	■	■				■	■		■		■							■	7

La Tabla 5 presenta el perfil de susceptibilidad a 18 antibióticos en distintas cepas bacterianas, donde las celdas azules indican resistencia y la columna “Total” muestra el número de antibióticos frente a los cuales cada cepa es resistente.

El análisis de susceptibilidad antimicrobiana evidenció una elevada frecuencia de resistencia entre los aislados bacterianos recuperados. La resistencia predominó frente a los β-lactámicos, observándose resistencia a ampicilina en la totalidad de

las cepas evaluadas (19/19; 100 %), seguida de dicloxacilina (17/19; 89.5 %), cefotaxima (15/19; 78.9 %), cefalotina (13/19; 68.4 %) y penicilina (10/19; 52.6 %). En contraste, ninguna de las cepas presentó resistencia a gentamicina o nitrofurantoína, mientras que la resistencia a amikacina y vancomicina se observó únicamente en un aislamiento para cada antimicrobiano. Estos resultados evidencian que la resistencia no se distribuyó homogéneamente entre las diferentes familias de antibióticos, sino que existió una marcada predominancia de fenotipos resistentes a β-lactámicos.

Los perfiles de mayor amplitud correspondieron a SPKN6, SCCL1, SPCL1, SPBAMP1 y SCKN8, cada uno con resistencia a nueve de los 18 antibióticos evaluados. No obstante, estos aislamientos presentaron diferentes combinaciones de resistencia. SPCL1 mostró resistencia a ampicilina, cefalotina, cefotaxima, ciprofloxacino, dicloxacilina, penicilina, tetraciclina, carbenicilina y cloranfenicol, mientras que SPBAMP1 presentó resistencia a ampicilina, cefalotina, cefotaxima, ciprofloxacino, dicloxacilina, penicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, vancomicina y carbenicilina. Por tanto, aunque ambos aislamientos presentaron el mismo número de resistencias, el espectro de familias antimicrobianas involucradas fue diferente.

Particularmente, SPBAMP1 destacó por ser el único aislamiento en el que se registró resistencia a vancomicina, además de presentar resistencia simultánea a diversos β-lactámicos, ciprofloxacino y sulfametoxazol/trimetoprim. Por su parte, SPCL1 presentó resistencia adicional a tetraciclina y cloranfenicol.

5.4 Análisis de co-localización y posibles plásmidos/MGEs.

5.4.1 *Priestia aryabhattai* Spcl1

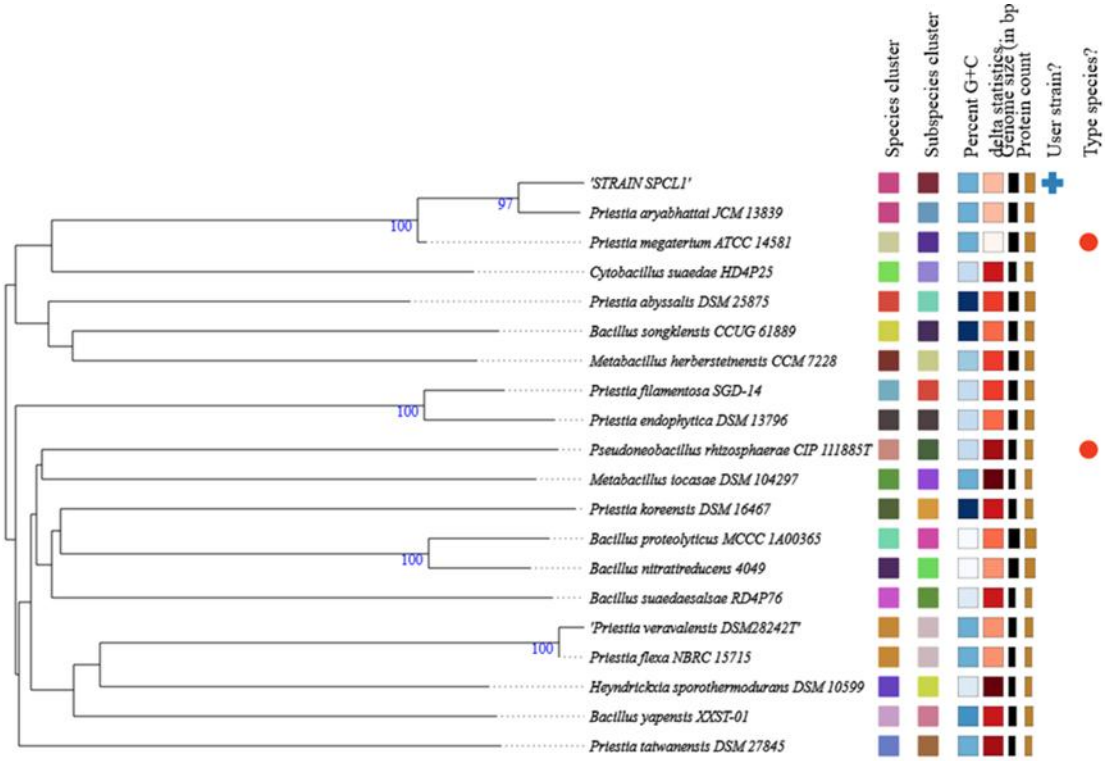


Figura 10. Resultado TYGS para el conjunto de datos. Árbol inferido con FastME 2.1.456 a partir de distancias GBDP calculadas a partir de secuencias genómicas para la cepa SPCL1.

El árbol fillogenómico (Figura 10) fue construido utilizando la plataforma TYGS (Type Strain Genome Server), la cual infiere relaciones evolutivas basadas en comparaciones genómicas completas entre cepas tipo y genomas depositados en bases de datos públicas. El análisis se basa en el método GBDP (Genome BLAST Distance Phylogeny), que calcula distancias intergenómicas a partir de alineamientos BLAST, permitiendo una reconstrucción filogenética robusta. En el árbol obtenido, la cepa Spcl1 se agrupa claramente dentro del clado correspondiente al género *Priestia.* Se observa una relación filogenética estrecha con *Priestia aryabhattai* JCM 13839, con un valor de soporte bootstrap de 97%, lo que indica una alta confiabilidad en la agrupación. Este clado presenta además un soporte interno de 100%, reforzando la estabilidad de la posición taxonómica de la cepa analizada. El árbol incluye especies cercanas previamente clasificadas dentro

del género *Bacillus*, tales como *Bacillus proteolyticus*, *Bacillus wiedmannii* y *Bacillus subtilis*, que aparecen distribuidas en clados relacionados pero filogenéticamente diferenciados del grupo principal donde se ubica la cepa Spcl1. Asimismo, se observan otras especies del género *Priestia* como *P. megaterium, P. koreensis, P. endophytica* y *P. flexa*, formando agrupaciones coherentes con su clasificación taxonómica actual.

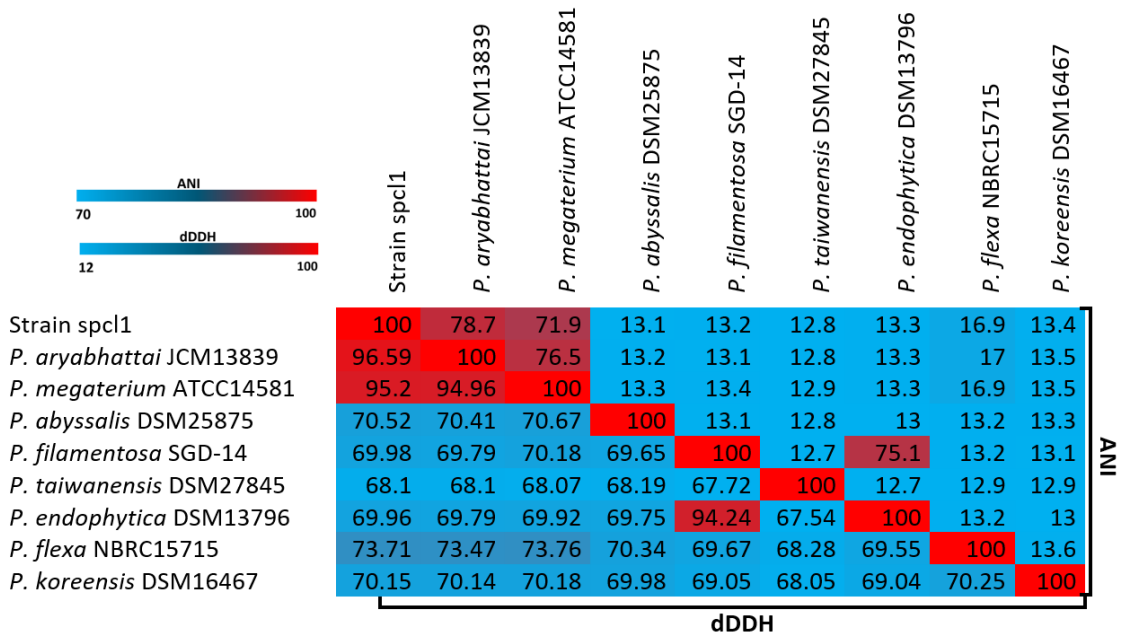


Figura 11. Mapa de calor que muestran los valores medios de identidad de nucleótidos por pares (ANI) y de hibridación digital ADN-ADN (DDH) de la cepa SPCL1 y las cepas tipo Priestia estrechamente relacionadas.

Con el objetivo de confirmar la asignación taxonómica de la cepa Spcl1, se realizó un análisis comparativo de identidad nucleotídica promedio (ANI, Average Nucleotide Identity) y de hibridación ADN-ADN digital (dDDH, digital DNA-DNA Hybridization) frente a especies filogenéticamente cercanas del género *Priestia*. Los resultados se representan en un mapa de calor (Figura 11.) donde la escala de color indica el grado de similitud genómica entre pares de cepas.

Los valores obtenidos muestran que la cepa SPCI1 presenta un ANI de 96.59% y un dDDH de 78.7% con *P. aryabhattai* JCM 13839. Estos valores superan los

umbrales aceptados para delimitación de especie (≥95–96% para ANI y ≥70% para dDDH), lo que confirma que la cepa SPCI1 pertenece a la especie *Priestia aryabhatta*i. La comparación con *P. megaterium* ATCC 14581 muestra valores igualmente elevados (ANI 95.2% y dDDH 71.9%), situándose en el límite inferior del criterio de especie, pero siendo inferiores a los observados con *P. aryabhattai*. En contraste, las comparaciones con otras especies del género, como *P. abyssalis*, *P. filamentosa, P. taiwanensis, P. endophytica, P. flexa* y *P. koreensis*, presentan valores de ANI cercanos al 70% y dDDH alrededor de 13%, muy por debajo de los puntos de corte establecidos, descartando su pertenencia a estas especies.

5.4.1.1 Características genómicas de *P. aryabhattai* Spcl1

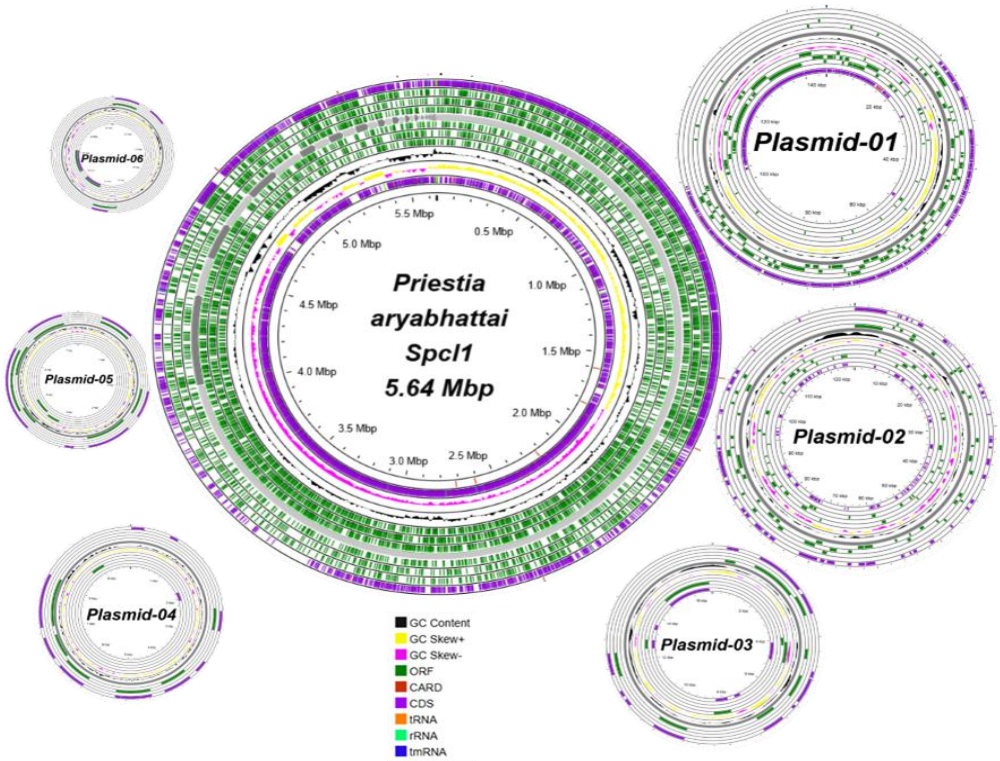


Figura 12. Mapa genómico circular para P. aryabhattai Spcl1. Desde el exterior hacia el centro se encuentran los contigs ensamblados, el marco de lectura abierto (ORF),CDS en la cadena frontal,CDS en la cadena inversa, los genes de ARN, CDS con similitud con factores de virulencia, contenido de GC y sesgo de GC.

Tabla 6. *Descripción genómica de Priestia aryabhattai Spcl1.*

Caracteristicas	Fuente	Total
Longitud del genoma	PATRIC	5,641,954 bp
Numero de contigs	PATRIC	41
Numero de proteinas caracterizadas	PATRIC	6,131
Numero de proteinas hipoteticas	PATRIC	2,193
Numero de genes de ARN ribosómico (rRNA)	PATRIC	4
Numero de genes de ARN de transferencia (tRNA)	PATRIC	97
Numero de proteinas con anotación de vias metabólicas	KEGG	912
G+C	PATRIC	37.58%
Tamaño N50 de contig	PATRIC	4,033,692 bp
Factor de virulencia	VFDB	1
Factor de virulencia	VICTORS	6
Factor de virulencia	PATRIC_VF	3
Genes de resistencia a antibioticos	CARD	1
Genes de resistencia a antibioticos	PATRIC	48
Genes de transporte	TCDB	24
Genes diana de farmacos	DrugBank	19

El análisis genómico de Priestia aryabhattai Spcl1 reveló un genoma con una longitud total de 5,641,954 pares de bases (bp), ensamblado en 41 contigs. El tamaño N50 alcanzó los 4,033,692 bp, lo que indica un ensamblaje con alta continuidad. Se identificaron un total de 6,131 proteínas caracterizadas y 2,193 proteínas hipotéticas. En cuanto a los genes estructurales, se detectaron 4 genes de ARN ribosómico (rRNA) y 97 genes de ARN de transferencia (tRNA). El contenido de G+C fue de 37.58%.

El análisis funcional mostró que 912 proteínas están asociadas a rutas metabólicas según la base de datos KEGG. En relación con factores de virulencia, se identificaron 1, 6 y 3 genes en las bases de datos VFDB, VICTORS y PATRIC_VF, respectivamente. Por otro lado, se detectaron genes asociados a resistencia a antibióticos, incluyendo 1 gen reportado en CARD y 48 genes en PATRIC. Asimismo, se identificaron 24 genes relacionados con sistemas de transporte (TCDB) y 19 genes considerados como posibles dianas farmacológicas de acuerdo con DrugBank.

Tabla7. Características genómicas de los plásmidos de Priestia aryabhattai Spcl1

Genome features	Plasmid 1	Plasmid 2	Plasmid 3	Plasmid 4	Plasmid 5	Plasmid 6
Genome size	146,177 bp	126,627 bp	16,881 bp	9,835 bp	7,402 bp	4,590 bp
GC contents	36.77%	33.27%	34.1 3%	34.67%	36.54%	35.38%
Total genes	179	176	25	14	12	9
CDSs	170	176	25	14	12	9
tRNA	9	0	0	0	0	0
Specialty genes	1	0	0	0	0	0

El análisis de los plásmidos asociados a *Priestia aryabhattai* Spcl1

permitió identificar seis secuencias las cuales coincidieron con plásmidos descritos anteriormente. El plásmido 1 presentó el mayor tamaño con 146,177 bp, seguido

por el plásmido 2 con 126,627 bp. Los plásmidos restantes mostraron tamaños considerablemente menores: 16,881 bp (plásmido 3), 9,835 bp (plásmido 4), 7,402 bp (plásmido 5) y 4,590 bp (plásmido 6). El contenido de G+C osciló entre 33.27% y 36.77%, siendo el plásmido 1 el que presentó el valor más alto. En cuanto al contenido génico, el plásmido 1 y el plásmido 2 mostraron el mayor número de genes, con 179 y 176 genes respectivamente, mientras que los plásmidos 3 a 6 presentaron entre 9 y 25 genes.

El número de secuencias codificantes (CDSs) fue consistente con el número total de genes en la mayoría de los plásmidos. Únicamente el plásmido 1 presentó genes de ARN de transferencia (tRNA), con un total de 9, mientras que los demás plásmidos no mostraron este tipo de genes. En relación con genes especializados, únicamente el plásmido 1 presento un gen, correspondiente al gen *folA*, asociado a resistencia a antibióticos.

5.4.1.2 genes de resistencia a antibióticos y metales pesados

Tabla 8*. Genes de resistencia a antibióticos de Priestia aryabhattai Spcl1.*

Familia de antibiotico a la que confiere resistencia	**Genes**
Fenicoles	*CatA*
Fosfomicinas	*FosB*
Antibioticos que afectan la síntesis de la pared celular	*MurA, Alr, Ddl, BcrC, GdpD, PgsA, LiaF, LiaR, LiaS*
Sulfonamidas y trimetoprim	*folA, Dfr, folP*
Rifamicinas	*rpoB, rpoC*
Aminoglucósidos	*gidB*
Tetraciclinas y antibióticos que actúan sobre el ribosoma	*S10p, S12p, EF-G, EF-Tu, Iso-tRNA*
fluoroquinolonas	*gyrA, gyrB*
Isoniazida	*inhA, kasA, fabI/fabL*

Péptidos antimicrobianos y bacitracina	*BceA, BceB, BceR, BceS*
Otros	*Dxr, rho*

La Tabla 8 muestra los genes de resistencia a antibióticos identificados en el genoma de *Priestia aryabhattai* Spcl1. Entre los genes detectados destacan c*atA* para resistencia a fenicoles, *fosB* relacionado con resistencia a fosfomicina y los genes *gyrA* y *gyrB,* asociados con resistencia a fluoroquinolonas mediante alteraciones en la ADN girasa bacteriana. Asimismo, se identificaron genes involucrados en resistencia a antibióticos que afectan la síntesis de la pared celular, como *murA, ddl, alr, bcrC* y el sistema regulador *liaFSR*, los cuales participan en mecanismos de tolerancia frente a antibióticos tipo glicopéptidos y bacitracina.

Los genes de resistencia identificados en *Priestia aryabhattai* Spcl1 pueden agruparse de acuerdo con el mecanismo molecular mediante el cual confieren resistencia a los antibióticos.

Tabla 9*. Mecanismos de acción de genes de resistencia a antibióticos en Priestia aryabhattai Spcl1.*

Mecanismo de resistencia	**Genes**	**Funcion**
Inactivación enzimática del antibiótico	*catA*, *fosB*	Modifican o inactivan químicamente el antibiótico, impidiendo su acción.
Modificación del sitio blanco	*gyrA*, *gyrB*, *rpoB*, *rpoC*, *gidB*, *S10p*, *S12p*	Alteran la estructura de proteínas blanco ribosomales o enzimas esenciales, disminuyendo la unión del antibiótico.
Protección o alteración de la síntesis de pared celular	*murA*, *alr*, *ddl*, *bcrC*, *gdpD*, *pasA*, *liaF*, *liaR*, *liaS*	Participan en remodelación de pared celular o respuesta al estrés inducido por antibióticos.
Bombas de eflujo y sistemas de transporte	*bceA*, *bceB*	Expulsan activamente péptidos antimicrobianos fuera de la célula.
Sistemas reguladores de	*bceR*, *bceS*, *liaF*, *liaR*, *liaS*	Detectan daño celular y activan genes de resistencia.

respuesta a estrés antimicrobiano		
Resistencia por sobreproducción o variantes metabólicas	*folA*, *dfr*, *folP*, *inhA*, *kasA*, *fabI/fabL*, *dxr*	Alteran rutas metabólicas blanco de sulfonamidas, trimetoprim e isoniazida.
Factores asociados con tolerancia ribosomal	*EF-G*, *EF-Tu*, *Iso-tRNA*	Participan en procesos de traducción que pueden reducir sensibilidad a antibióticos ribosomales.
Genes relacionados con tolerancia general y estabilidad celular	*rho*	Regulador transcripcional asociado con adaptación al estrés y tolerancia antimicrobiana.

Tabla 10*. Genes de resistencia a metales de Priestia aryabhattai Spcl1.*

Metal	Genes de resistencia
Arsenico	*arsC, arsR, arsB*
Cadmio	cadC, cadA
Cobre	CopC, CopD, CopZ
Cobalto-zin-cadmio	czcABC

Se muestran en la tabla 10 los genes de resistencia a metales pesados identificados en el genoma de *Priestia aryabhattai* Spcl1, que confieren tolerancia a arsénico, cadmio, cobre y complejos metálicos de cobalto-zinc-cadmio.

5.4.1.3 genes de virulencia

Tabla 11*. Genes de virulencia y su función en Priestia aryabhattai Spcl1.*

Gen	Producto	Funcion
recA	*Proteina* RecA	Reparación del ADN y recombinación homóloga en bacterias
sodA1	Superóxido dismutasa [Mn] (EC 1.15.1.1)	Cataliza la desproporción del superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno
clpP	Subunidad proteolítica de la proteasa ClpP dependiente de ATP	Reprime la expresión génica o, en algunos casos, puede activarla
codY	Represor transcripcional pleiotrópico sensible al GTP, CodY	Reprime la expresión génica o, en algunos casos, puede activarla
clpX	Subunidad de unión al ATP de la proteasa Clp dependiente de ATP, ClpX	Codificación de proteínas
EF1623	Proteína implicada en la utilización de etanolamina, similar a PduA/Pduj	Proteína anclada a la superficie que favorece la adhesión bacteriana a los tejidos del huésped al unirse a glicoconjugados del huésped, como el ácido siálico.
purA	Adenilosuccinato sintasa (EC 6.3.4.4)	Es esencial para la síntesis de purinas en las bacterias, necesaria para su crecimiento y supervivencia. Las alteraciones en estos genes pueden estar relacionadas con los mecanismos de resistencia a los antibióticos.
fur	Proteína reguladora de la captación de hierro (FUR)	Su función principal es controlar la expresión de genes implicados en la homeostasis del hierro y otros procesos, entre ellos la virulencia de las bacterias patógenas.
purB	Adenilosuccinato liasa (EC 4.3.3.3) @ SACAR liasa	Codifica una proteína

5.4.1.4 secuencias identificadas como plásmidos en *P. aryabhattai* Spcl1

Tabla12. Secuencias que producen alineaciones significativas en los plásmidos de P. aryabhattai Spcl1.

Plasmid	Sequence with significant alignment	Query cover	Percent identity	Length	Sequence ID	Reference
1	NO MATCH FOUND	NA	NA	NA	NA	-
2	Priestia megaterium strain PMUG01 plasmid pPMUG01-3	89%	97.67%	125705 bp	CP150966.1	https://doi.org/10.1186/s12866-025-04157-3
3	Priestia megaterium strain CK7 plasmid unnamed9	63%	98.81%	13676 bp	CP085424.1	-
4	Priestia megaterium NCT-2 plasmid pNCT2_9	64%	95.31%	10257 bp	CP032537.1	https://doi.org/10.1155/2020/4109186

5	Priestia megaterium strain PMUG01 plasmid pPMUG01-5	38%	93.62%	6327 bp	CP150968.1	https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1558238
6	Priestia megaterium strain H2 plasmid punamed15	42%	88.69%	10024 bp	CP071481.1	-

La tabla 12 muestra el análisis de similitud de seis plásmidos mediante alineamientos contra secuencias de referencia en bases de datos, lo que permite inferir su posible origen y relación filogenética. El Plásmido 1 no presentó coincidencias significativas, lo que sugiere que podría tratarse de una secuencia novedosa o poco representada en las bases de datos actuales. En contraste, los plásmidos restantes mostraron similitudes con secuencias previamente reportadas, principalmente de *Priestia megaterium*, indicando una posible conservación genética dentro de esta especie.

El Plásmido 2 presentó el mayor grado de similitud, con un 89% de cobertura y 97.67% de identidad, alineándose con el plásmido pPMUG01-3, lo que sugiere una alta cercanía evolutiva. De manera similar, los Plásmidos 3 y 4 mostraron altos porcentajes de identidad (98.81% y 95.31%, respectivamente), aunque con coberturas moderadas, lo que podría indicar regiones conservadas específicas dentro de estos elementos genéticos. Por otro lado, los Plásmidos 5 y 6 presentaron

menores coberturas (38% y 42%) y valores de identidad ligeramente inferiores, lo que sugiere una mayor divergencia o la presencia de regiones únicas no compartidas con las secuencias de referencia.

5.4.2 *Bacillus cereus* Spbamp1

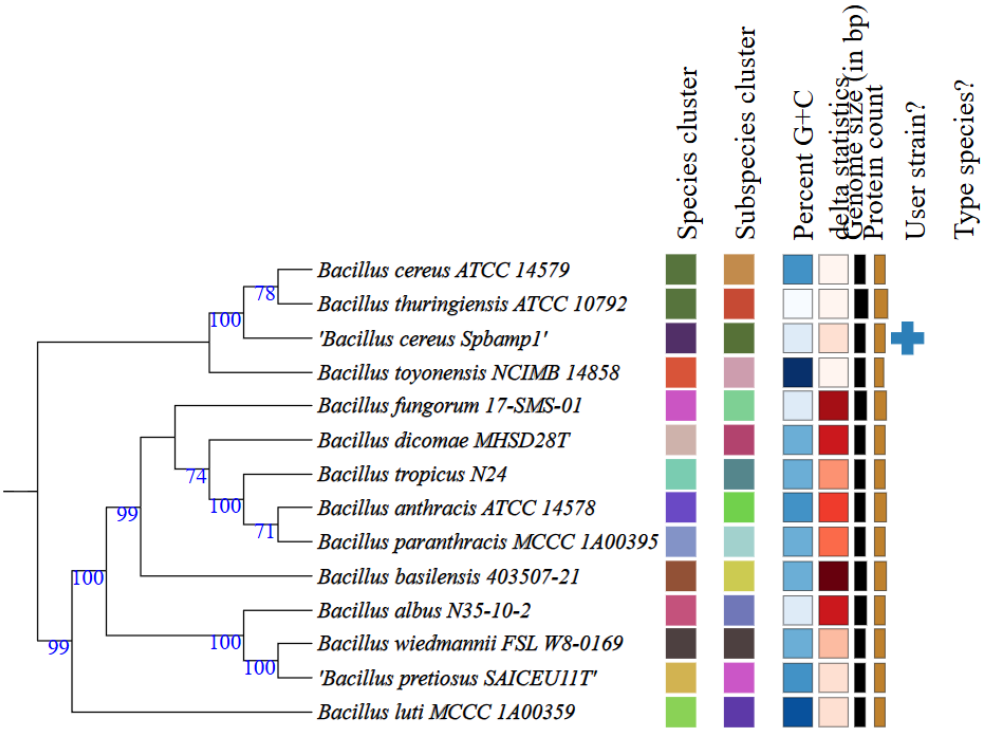


Figura 13. Resultados de TYGS para el conjunto de datos. El árbol filogenómico se infirió utilizando FastME 2.1.456 basándose en las distancias GBDP calculadas a partir de secuencias genómicas. Las longitudes de las ramas se escalan según la fórmula de distancia G BDP, y los números sobre las ramas representan los valores de soporte pseudo-bootstrap GBDP de 100 réplicas.

La posición taxonómica de la cepa *Bacillus cereus* Spbamp1, se realizó un análisis filogenómico comparativo empleando genomas de referencia pertenecientes al complejo *Bacillus cereus sensu lato*. El árbol filogenético (Figura 13.) obtenido, muestra que la cepa Spbamp1 se agrupa dentro del clúster correspondiente a este

complejo bacteriano. Se observa que B. cereus Spbamp1 forma un clado estrechamente relacionado con Bacillus cereus ATCC 14579 y *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792. Esta agrupación presenta valores de soporte bootstrap elevados (78–100%), lo que indica una alta confiabilidad en la relación filogenética inferida.

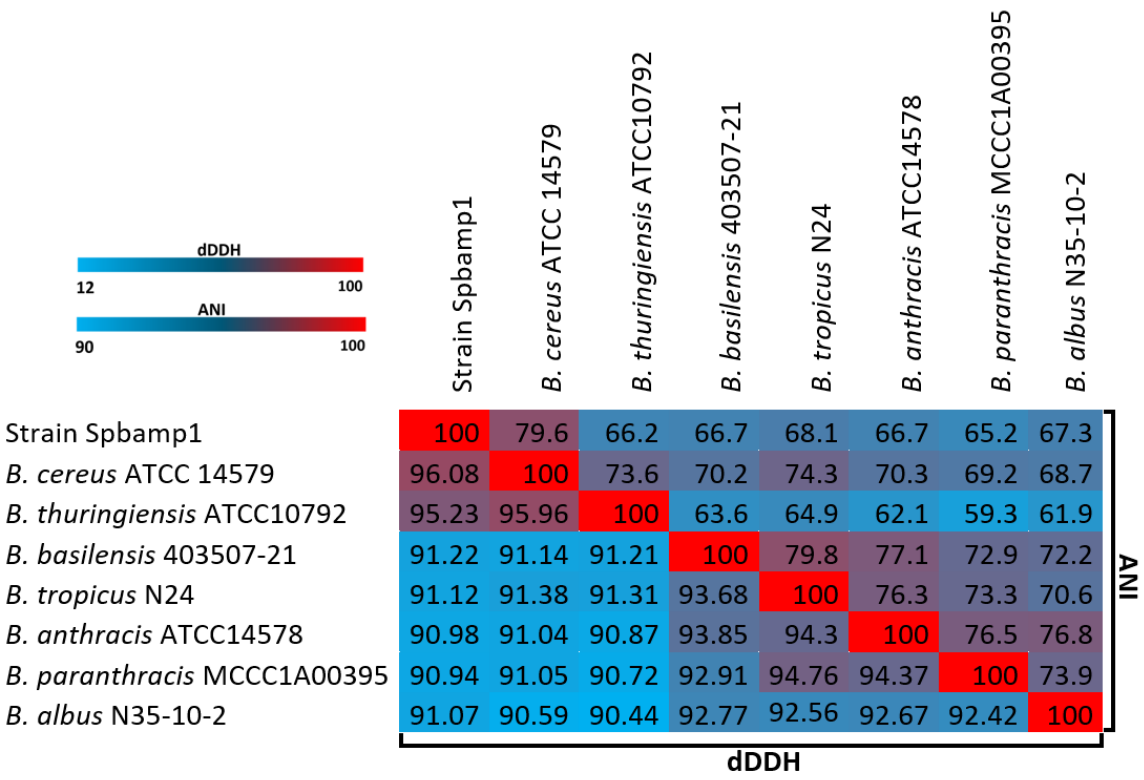


Figura 14. Mapas de calor que representan los valores de hibridación digital ADN-ADN (dDDH) y la identidad nucleotídica media (ANI) para la cepa Spbamp1 y cepas de Bacillus estrechamente relacionadas.

Los resultados presentados en el mapa de calor (Figura 14.) muestran que la cepa Spbamp1 presenta los valores más altos de similitud con *B. cereus* ATCC 14579, registrando un ANI de 96.08% y un dDDH de 79.6%. Estos valores superan los umbrales aceptados para delimitación de especie (≥95–96% para ANI y ≥70% para dDDH), lo que indica que Spbamp1 pertenece a la especie *Bacillus cereus*. Así

mismo, se observaron valores elevados de similitud con *B. thuringiensis* ATCC 10792 (ANI 95.23%; dDDH 66.2%) y con otras especies del complejo *B. cereus como B. anthracis, B. paranthracis* y *B. tropicus*, con valores de ANI entre 90–93%. Sin embargo, en estos casos los valores de dDDH se mantienen por debajo del umbral del 70%, lo que indica que, aunque existe una alta cercanía genómica característica del complejo *B. cereus sensu lato*, no corresponden a la misma especie.

El patrón del mapa de calor muestra una alta cohesión genómica dentro del grupo *B. cereus*, reflejada en valores de ANI superiores al 90% entre sus miembros. No obstante, únicamente la comparación entre Spbamp1 y *B. cereus* ATCC 14579 cumple simultáneamente ambos criterios taxonómicos (ANI y dDDH), lo que confirma su asignación específica. En conjunto, los resultados de ANI y dDDH permiten concluir que la cepa Spbamp1 pertenece a la especie *Bacillus cereus*, mostrando una clara diferenciación respecto a otras especies estrechamente relacionadas dentro del complejo *B. cereus*. La coherencia entre ambos parámetros genómicos proporciona evidencia robusta para su clasificación taxonómica a nivel de especie.

5.4.2.1 Características genómicas de *B. cereus* Spbamp1

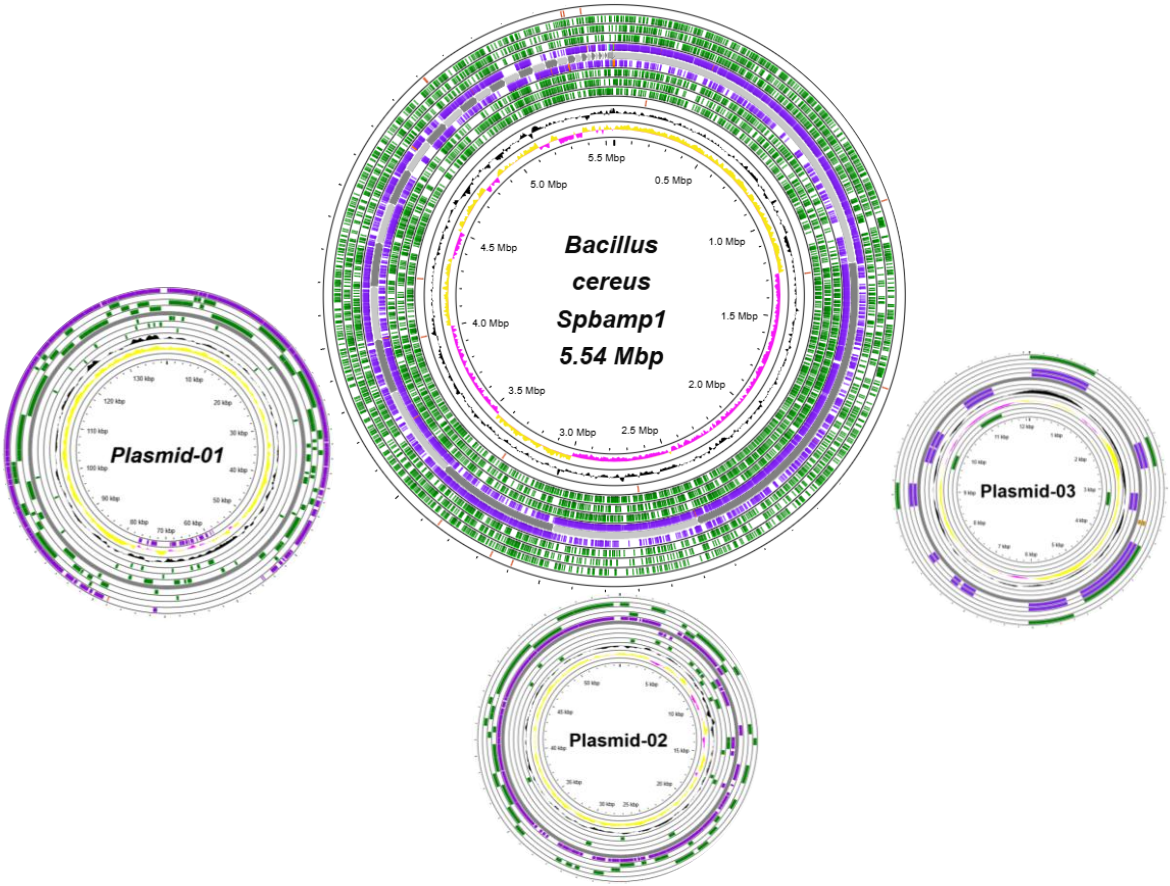


Figura 15. Mapa genómico circular para P. aryabhattai Spcl1. Desde el exterior hacia el centro se encuentran los contigs ensamblados, el marco de lectura abierto (ORF),CDS en la cadena frontal,CDS en la cadena inversa, los genes de ARN, CDS con similitud con factores de virulencia, contenido de GC y sesgo de GC.

Tabla13. Secuencias que producen alineaciones significativas en los plásmidos de B. cereus Sbamp1.

Caracteristicas	**Fuente**	**Total**
Longitud del genoma	PATRIC	5,547,101 bp
Numero de contigs	PATRIC	51
Numero de proteínas caracterizadas	PATRIC	5,712
Numero de proteinas hipoteticas	PATRIC	1,540

Numero de gebes de ARN ribosómico (rARN)	PATRIC	4
Numero de genes de ARN de transferencia (tARN)	PATRIC	79
Numero de proteinas con anotación de vias metabólicas	KEGG	807
G+C	PATRIC	34.91%
Tamaño N50 de contig	PATRIC	540,449 bp
Factor de virulencia	VFDB	9
Factor de virulencia	VICTORS	13
Genes de resistencia a antibiotico	NDARO	8
Genes de resistencia a antibiotico	CARD	9
Genes de resistencia a antibiotico	PATRIC	58
Genes de transporte	TCDB	49
Genes diana de fármacos	DrugBank	27
Genes diana de fármacos	TTD	1

El análisis genómico de *Bacillus cereus* Spbamp1 mostró un genoma con una longitud total de 5,641,954 pares de bases (bp), ensamblado en 41 contigs. El valor de N50 fue de 4,033,692 bp, lo que indica un ensamblaje con un alto grado de continuidad. Se identificaron 6,131 proteínas caracterizadas y 2,193 proteínas hipotéticas. En cuanto a los elementos genéticos estructurales, se detectaron 4 genes de ARN ribosómico (rRNA) y 97 genes de ARN de transferencia (tRNA). El contenido de G+C fue de 37.58%.

El análisis funcional reveló que 912 proteínas están asociadas a rutas metabólicas según la base de datos KEGG, lo que sugiere una notable diversidad metabólica. En relación con factores de virulencia, se identificaron genes en diferentes bases de datos: 1 en VFDB, 6 en VICTORS y 3 en PATRIC_VF. Asimismo, se detectaron genes relacionados con resistencia a antibióticos, incluyendo 1 gen identificado en CARD y 48 genes reportados en PATRIC. Adicionalmente, se identificaron 24

genes asociados a sistemas de transporte (TCDB) y 19 genes considerados como posibles dianas farmacológicas de acuerdo con DrugBank.

Tabla14. Características genómicas de los plásmidos de Bacillus cereus Spbamp1

Genome features	Plasmid 1	Plasmid 2	Plasmid 3
Genome size	139,440 bp	54,700 bp	12,086 bp
GC contents	32.91%	35.96%	34.29%
Total genes	119	89	18
CDSs	117	89	18
tRNA	2	0	0
Specialty genes	0	0	0

La Tabla 14 presenta las características genómicas de tres plásmidos identificados en Bacillus cereus Spbamp1, mostrando diferencias en tamaño, contenido de GC y número de genes. El Plásmido 1 es el de mayor tamaño, con 139,440 pb, y posee un contenido de GC de 32.91%. Contiene un total de 119 genes, de los cuales 117 corresponden a CDSs (secuencias codificantes) y 2 a genes de tRNA, lo que sugiere una mayor complejidad genética en comparación con los otros plásmidos. El Plásmido 2 presenta un tamaño intermedio de 54,700 pb y un contenido de GC ligeramente mayor (35.96%). En este caso, se identificaron 89 genes, todos correspondientes a CDSs, sin presencia de genes de tRNA.

Por su parte, el Plásmido 3 es el más pequeño, con 12,086 pb, y tiene un contenido de GC de 34.29%. Contiene únicamente 18 genes, todos clasificados como CDSs, lo que indica una estructura genética más reducida.En conjunto, ninguno de los tres plásmidos presenta genes de especialidad (specialty genes), lo que podría indicar la ausencia de funciones asociadas a virulencia, resistencia específica o adaptación particular detectadas bajo los criterios de anotación utilizados.

5.3.4.1 secuencias identificadas como plásmidos en *B. cereus spbamp1*.

Tabla15. Secuencias que producen alineaciones significativas en los plásmidos de B. cereus Spbamp1.

Plasmid	Sequence with significant alignment	Query cover	Percent identity	Length	Sequence ID
1	*Bacillus cereus* G9842 plasmid pG9842_140	97%	96.41%	193440 bp	CP001188.1
2	*Bacillus cereus* strain SEM-15 plasmid pb3	42%	92.44%	54700 bp	CP095380.1
3	*Bacillus mycoides* strain PAMC 29501 plasmid unnamed3	25%	94.51%	12086 bp	CP136384.1

La Tabla 15 presenta la identificación de secuencias plasmídicas en *Bacillus cereus* spbamp1 mediante su comparación con plásmidos reportados previamente, considerando parámetros como cobertura de alineamiento, porcentaje de identidad y longitud.

El plásmido 1 muestra una correspondencia muy alta con el plásmido pG9842_140 de *Bacillus cereus* G9842, con una cobertura del 97% y una identidad del 96.41%. Estos valores evidencian una fuerte similitud a lo largo de casi toda la secuencia. Además, con una longitud de 193,440 pb, se posiciona como el plásmido de mayor tamaño, lo que sugiere que podría tratarse de un elemento ampliamente conservado dentro de la especie, adicionalmente se encontró el gen *CczC* que codifica para la proteína CzcC, esta corresponde al componente de membrana externa del complejo CzcCBA.

En el caso del plásmido 2, se observa similitud con el plásmido pb3 de *Bacillus cereus* cepa SEM-15, con una identidad relativamente alta (92.44%), pero una cobertura más limitada (42%). Esto indica que únicamente una parte del plásmido comparte homología con la referencia. Su tamaño de 54,700 pb lo ubica como un plásmido de tamaño intermedio.

Por último, el plásmido 3 presenta similitud con un plásmido de *Bacillus mycoides* (cepa PAMC 29501), con una identidad del 94.51% y una cobertura del 25%. La baja cobertura sugiere que la similitud se restringe a regiones específicas, posiblemente conservadas entre especies relacionadas. Con una longitud de 12,086 pb, corresponde al plásmido más pequeño identificado.

5.4.2.2 genes de resistencia a antibióticos y metales

Tabla 16*. Genes de resistencia a antibióticos de B. cereus Spbamp1.*

Familia de antibiotico a la que confiere resistencia	**Genes**
Glucopéptidos	*VanXY, VanA/I/Pt-type, VanF/M-type, VanR*
Lincosamidas	*Lsa(B)*
Bacitracina	*BcrA, BcrB, BcrC*
Fenicoles	*CatA15/A16*
Fosfomicina	*FosB, MurA*
Aminoglucósidos	*gidB*

Fluoroquinolonas	*gyrA, gyrB*
Rifamicinas	*rpoB, rpoC*
Antifolatos	*folA, folP, Dfr*
Isoniazida	*inhA, kasA*
Tetraciclinas	*EF-G,EF-Tu, S10p, S12p*
D-cicloserina	*Alr, Ddl*
Multirresistencia/ resistencia inespecífica	*YkkCD, LiaF, LiaR, LiaS, GdpD, MprF, PgsA, rho, Iso-tRNA, dxr*

La cepa *Bacillus cereus* Spbamp1 presentó un amplio repertorio de genes asociados con resistencia antimicrobiana, lo que sugiere una elevada capacidad adaptativa frente a diversos compuestos tóxicos presentes en ambientes contaminados. Entre los genes detectados destacan aquellos relacionados con resistencia a glucopéptidos (*vanXY*, *vanA-like/Pt-type*, *vanF/M-type*, *vanR*), los cuales participan en la modificación de los precursores del peptidoglicano celular, reduciendo la afinidad de antibióticos como la vancomicina hacia la pared bacteriana.

Tabla 17. *Genes de resistencia a metales de B. cereus Spbamp1.*

Metal	Genes de resistencia
Arsenico	*arsC, arsR, acr3*
Cadmio	cadC, cadA
Cobre	CopC, CopD, CopZ
Cobalto-zin-cadmio	czcABC

La cepa *Bacillus cereus* SPBAMP1 presentó diversos genes asociados con resistencia a metales pesados, lo que evidencia una elevada capacidad de adaptación y supervivencia en ambientes contaminados como los lixiviados de vertederos. Entre los principales genes identificados destacan los sistemas de

resistencia a arsénico (*arsC, arsR, acr3*), cadmio (*cadA, cadC*), cobre (*copC, copD, copZ*) y el sistema multimetal *czcABC*, relacionado con resistencia simultánea a cobalto, zinc y cadmio.

5.4.2.3 genes de virulencia en *B. cereus* spbamp1

Tabla 18*. Genes de virulencia y su función en B.cereus Spbamp1.*

Gen	Product	Mechanism of action
inhA	*Immune inhibitor A, metalloprotease*	Metalloprotease degrades antibacterial peptides and proteins of the host; facilitates evasion of the immune system and bacterial dissemination.
nheA	*Non-hemolytic enterotoxin A*	It binds to the cell membrane after sequential interaction with NheB and NheC, participating in the formation of pores that alter cell permeability.
nheB	*Non-hemolytic enterotoxin lytic component L1*	First component that binds to the host cell membrane; acts as an initial receptor and allows the recruitment of NheC and subsequently NheA for pore formation.
nheC	*Enterotoxin C*	Component that stabilizes the Nhe complex in the membrane and enhances the insertion of NheA, contributing to the functional formation of the pore.
BAS3109	*Thiol-activated cytolysin*	Thiol-dependent cytolysin dependent on membrane cholesterol; forms large pores in eukaryotic cells, causing cell lysis and tissue damage.
cytK	*Cytotoxin K*	Pore-forming toxin that induces enterocyte lysis; associated with severe diarrhea and intestinal necrosis.
hblA	*Hemolysin BL component B*	Initial binding component of the Hbl complex; it attaches to the host cell membrane and allows the assembly of the toxigenic complex.

hblC	*Hemolysin BL lytic component L2*	A lytic component that, together with HblD, participates in the formation of pores in the cell membrane, causing lysis.
hblD	*Hemolysin BL lytic component L1*	Essential component of the Hbl complex that completes the assembly of the transmembrane pore and causes osmotic destabilization and cell lysis.

La cepa *Bacillus cereus* Spbamp1 presentó un importante repertorio de genes de virulencia asociados principalmente con producción de enterotoxinas, citolisinas y mecanismos de evasión inmune, lo que sugiere un potencial patogénico relevante tanto en infecciones gastrointestinales como sistémicas. Entre los genes identificados destacan *inhA, nheABC, hblACD, cytK y BAS3109*, los cuales han sido ampliamente relacionados con cepas clínicas y alimentarias de alta virulencia dentro del grupo *B. cereus sensu lato*.

6 Discusiones

6.1 *Identidad taxonómica global de las muestras (SC vs SNC).*

La predominancia de bacterias formadoras de esporas y tolerantes al estrés químico sugiere una selección microbiana asociada a la presencia de metales pesados y contaminantes en los lixiviados, lo cual puede favorecer la co-selección y diseminación de genes de resistencia a antibióticos y metales en el ecosistema edáfico.

El perfil metagenómico representado en los diagramas a) y b) revela diferencias notables en la estructura y composición de las comunidades bacterianas entre ambos entornos analizados. En ambas muestras, el dominio Bacteria domina ampliamente sobre los componentes eucariotas y virales, aunque con variaciones en la diversidad y abundancia relativa de los filos predominantes.

En el panel a) se observa una mayor representación del filo *Bacillota* (antes *Firmicutes*), seguido de *Actinomycetota* y *Pseudomonadota*, con una destacada participación de las clases *Bacilli* y *Actinomycetes*. Los órdenes *Bacillales* y *Micrococcales* agrupan una diversidad de familias como *Bacillaceae, Paenibacillaceae* y *Staphylococcaceae*, dominadas por géneros formadores de esporas (*Bacillus, Paenibacillus*) y bacterias Gram positivas resistentes a condiciones ambientales extremas. Este patrón sugiere una adaptación a ambientes con alto contenido de metales pesados o estrés oxidativo, en los que las esporas y sistemas de detoxificación metálica confieren ventajas selectivas, estos resultados concuerdan con lo descrito por Gu et al. (2021) en donde el filo dominante fue *Bacillota* indicando que los taxones *Ba*cilli y *Clostridia* tienen un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad del ecosistema del suelo y en el estudio realizado por Haniff et al. (2025) señala que la mayor parte de bacterias identificadas forman parte de los filos *Proteobacteria, Bacillota, Bacteroidetes y Actinobacteria.* En contraste, el panel b) evidencia una transición hacia una comunidad dominada por el filo *Pseudomonadota*, particularmente por las clases *Gammaproteobacteria y Alphaproteobacteria.* Los órdenes *Pseudomonadales* y *Moraxellales* presentan una abundancia significativa de las familias *Pseudomonadaceae* y *Moraxellaceae*, con géneros como *Pseudomonas, Stutzerimonas y Acinetobacter*. Estas bacterias son reconocidas por su elevada versatilidad metabólica y capacidad de resistencia a antibióticos.

En conjunto, la comparación entre ambos perfiles sugiere una correlación funcional entre la composición microbiana y la presión ambiental. Mientras la comunidad del panel a) refleja un ecosistema más heterogéneo, con predominio de bacterias

formadoras de esporas y tolerantes al estrés, con potencial para portar genes de resistencia a metales y antibióticos debido a los contaminantes albergados en el lixiviado proveniente de los residuos sólidos. Esta dinámica refleja procesos de co-selección microbiana y corrregulación genética inducidos por la exposición continua a contaminantes, favoreciendo la persistencia de microorganismos con alta plasticidad genómica y capacidad de adaptación.

6.2 *Resistoma ambiental por muestra y por condición*

En la Figura 8 se observa que el SC presenta una mayor diversidad y abundancia de géneros bacterianos asociados típicamente a ambientes sometidos a estrés químico y presencia de metales, como *Bacillus, Pseudomonas, Acinetobacter, Rossellomorea y Priestia.* Estos taxones suelen exhibir adaptaciones metabólicas que les permiten tolerar o transformar compuestos tóxicos, lo que explica su incremento en suelos afectados por lixiviados. Por el contrario, el SNC muestra un perfil microbiano diferenciado, con mayor presencia de especies generalistas o típicas de suelos con menor presión antropogénica, reflejando condiciones ambientales más estables.

En la Figura 9 se analiza específicamente la distribución de bacterias potencialmente patógenas. El SC exhibe una concentración significativamente mayor de taxones clínicamente relevantes, como *Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus y Clostridium botulinum.* La elevada abundancia de estos microorganismos en el SC indica que la contaminación por lixiviados no solo altera la estructura ecológica del suelo, sino que también puede incrementar riesgos sanitarios asociados a la presencia y persistencia de patógenos. En contraste, el SNC presenta abundancias notablemente menores de estos grupos, lo cual es consistente con un entorno con menos materia orgánica degradada, menor carga química tóxica y menor presión selectiva para microorganismos oportunistas.

El análisis de las bacterias potencialmente patógenas evidenció la presencia de secuencias asignadas a especies de importancia clínica tanto en el suelo contaminado (SC) como en el suelo no contaminado (SNC). Entre los microorganismos identificados se encontraron *Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Clostridium botulinum, Clostridioides difficile, Klebsiella pneumoniae y Enterobacter cloacae,* así como diversas especies oportunistas. En el SC se observó una mayor representación de varios microorganismos Gram positivos, entre ellos *B. cereus, L. monocytogenes, B. licheniformis, S. aureus, C. botulinum, S. epidermidis y C. difficile*, mientras que el SNC presentó una elevada representación de especies Gram negativas como *P. aeruginosa, P. putida y E. coli*. Esta diferencia es consistente con la estructura taxonómica general de ambas comunidades, caracterizada por el predominio de *Bacillota* en el SC y *Pseudomonadota* en el SNC.

La importancia sanitaria de estos hallazgos radica en que varias de las especies detectadas incluyen linajes capaces de causar infecciones humanas y de desarrollar resistencia antimicrobiana. Particularmente, las formas resistentes de *A. baumannii* y de diversos *Enterobacterales* son consideradas por la Organización Mundial de la Salud como patógenos de prioridad crítica, mientras que *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos y *S. aureus* resistente a meticilina son considerados de prioridad alta. No obstante, debido a que el presente análisis se basa en la asignación taxonómica de secuencias metagenómicas, la detección de una especie no demuestra por sí misma la viabilidad del microorganismo, su potencial infectivo ni la presencia de un fenotipo específico de resistencia, por lo que estos resultados deben interpretarse como evidencia de un reservorio ambiental potencial.

Los resultados son comparables con los obtenidos por Flores-Tena et al., quienes identificaron bacterias patógenas y oportunistas en aire, suelo y lixiviados del relleno sanitario San Nicolás, en Aguascalientes, México, incluyendo *A. baumannii*

y E. coli entre los microorganismos más frecuentes en lixiviados. Los autores señalaron que la presencia de estas bacterias podría representar un riesgo tanto para la salud pública como ocupacional. Asimismo, Mondragón-Quiguanas et al. identificaron *Enterobacterales* potencialmente patógenos en lixiviados de relleno sanitario, entre ellos *K. pneumoniae, E. coli* y miembros del complejo *E. cloacae*, especies también identificadas en el presente estudio. *K. pneumoniae* fue el microorganismo más frecuente en dicho trabajo, con 23.8 % de los aislamientos, y el 34 % de los aislados presentó sensibilidad disminuida o resistencia a al menos un antibiótico β-lactámico, lo que llevó a los autores a proponer a los lixiviados como potenciales reservorios ambientales de bacterias y determinantes de resistencia.

Además del transporte mediante lixiviados hacia el suelo, aguas superficiales o aguas subterráneas, la dispersión mediante bioaerosoles constituye una vía potencial de exposición. Samadi et al. identificaron *Pseudomonas spp., S. aureus, E. coli y Acinetobacter spp*. en bioaerosoles de un relleno sanitario, observando las mayores concentraciones alrededor de la zona activa y del estanque de recolección de lixiviados. Estos resultados respaldan la posibilidad de que microorganismos presentes en suelo, residuos o lixiviados puedan incorporarse a partículas suspendidas y dispersarse hacia otras zonas del relleno. En consecuencia, los trabajadores constituyen una población particularmente expuesta debido al contacto repetido con residuos, polvo, suelo y lixiviados y a la inhalación de bioaerosoles generados durante las actividades operativas. En conjunto, la detección de microorganismos potencialmente patógenos en las muestras analizadas y su concordancia con estudios realizados en rellenos sanitarios de México y otros países respaldan la relevancia de estos ambientes como posibles reservorios y puntos de dispersión de bacterias de importancia clínica y resaltan la necesidad de su vigilancia desde una perspectiva de salud ambiental.

6.2.1 Genes de resistencia en cada muestra

En SC se observa un patrón heterogéneo, con varias regiones que muestran señales bajas o intermitentes para distintos genes de resistencia. Por el contrario SNC presenta múltiples secciones con alta intensidad de color, indicando una mayor abundancia relativa de genes de resistencia asociados a diversos mecanismos, tales como resistencia a antibióticos, metales pesados, compuestos tóxicos y posibles bombas de eflujo.

El SC mostró una abundancia relativa total de ARGs menor que SNC. Esta divergencia puede estar asociada a distintos factores ecológicos y de selección local que modulen la persistencia de comunidades microbianas resistentes, incluyendo competencia microbiana, disponibilidad de nutrientes y la degradación de compuestos residuales, lo cual ha sido reconocido como un fenómeno que puede reducir la prevalencia de ciertos ARGs en ambientes con altos niveles de estrés ambiental o cargas químicas complejas (Karkman et al., 2018).

Un aspecto notable es que, a pesar de la baja abundancia global de ARGs en SC, el gen *cfrA* destaca por su mayor abundancia relativa en este ambiente contaminado. El gen *cfrA* codifica una metiltransferasa de *ARN 23S* que altera el sitio A2503 del ribosoma bacteriano, lo que confiere resistencia a múltiples clases de antibióticos, incluyendo fenicoles, lincosamidas, pleuromutilinas, estreptograminas tipo A y oxazolidinonas (Long et al., 2006; Schwarz et al., 2000). Este mecanismo de resistencia al modificar el sitio de acción ribosomal le confiere al gen *cfrA* un perfil de resistencia multidrogas de gran importancia clínica y ecológica, ya que reduce la eficacia de antibióticos de última línea como linezolid, utilizado en infecciones por bacterias Gram positivas resistentes (Schwarz et al., 2000; Wang et al., 2022). Estudios han demostrado que variantes de *cfr* y genes relacionados están ampliamente distribuidos en diversos géneros bacterianos y pueden estar asociados a elementos móviles de ADN, facilitando su transferencia horizontal en ambientes con presión selectiva por antibióticos o compuestos antimicrobianos (Wang et al., 2022).

En contraste, el SNC mostró un marcado enriquecimiento de determinantes asociados con sistemas de eflujo multidroga. Entre los genes de mayor representación se encontraron MexK, MuxB, MexB, MexF, MuxC, OpmH, MexE, OprM, MexI, OprN y MuxA. Asimismo, se detectaron MexA, SmeB, SmeE, AdeI, AdeJ, AdeK, MdtB y emrE. Particularmente, la presencia simultánea de MexA, MexB y OprM, así como de MexE, MexF y OprN, es compatible con una elevada representación de componentes de sistemas de eflujo tipo RND, los cuales constituyen mecanismos importantes de resistencia multidroga en bacterias Gram negativas.

La presencia relativamente destacada de *cfrA* en SC puede indicar que este gen tiene mayor estabilidad o ventaja selectiva bajo condiciones específicas de contaminación por lixiviados. Compuestos presentes en lixiviados como residuos gástricos de antibióticos, metales pesados y moléculas orgánicas complejas pueden co-seleccionar resistencia no solo a antibióticos clásicos sino también a mecanismos más amplios como la modificación ribosomal mediada por *cfrA* (Schwarz et al., 2000). Este patrón, en el que un gen específico predomina en un ambiente particular a pesar de una baja abundancia total de ARGs, también ha sido observado en otros estudios ambientales donde genes con mecanismos de resistencia de amplio espectro tienden a persistir incluso cuando la diversidad global de ARGs se reduce por estrés ambiental o competencia microbiana (Zhao et al., 2018)

Una posible explicación para la menor abundancia general de ARGs en SC podría ser la competencia microbiana intensa y la presencia de toxinas químicas que limitan el crecimiento de bacterias resistentes en general, pero permiten la persistencia de determinados genes resistentes como *cfrA* si estos confieren ventajas adaptativas bajo dichas condiciones. Estudios ambientales han mostrado que la carga de ARGs no solo depende de la disponibilidad de genes, sino también de la composición de la microbiota, la presencia de elementos móviles y co-selección por metales o compuestos complejos, factores que pueden variar

considerablemente entre suelos contaminados y no contaminados (Forsberg et al., 2012; Zhao et al., 2021).

En síntesis, aunque la abundancia total de ARGs fue menor en el suelo contaminado por lixiviados (SC) comparado con el suelo no contaminado (SNC), el predominio relativo de *cfrA* en SC es consistente con la literatura que describe a este gen como un determinante de resistencia multidroga robusta y con alto potencial de persistencia ecológica y transferencia horizontal (Wang et al., 2022). Este hallazgo sugiere que no solo la cantidad total de ARGs, sino la naturaleza funcional de los genes presentes, debe considerarse al evaluar riesgos ecológicos y de salud derivados de la contaminación por lixiviados. El SC estuvo caracterizado principalmente por determinantes relacionados con modificación del blanco, mientras que el SNC presentó un marcado enriquecimiento de sistemas de eflujo multidroga, acompañado por genes de resistencia a sulfonamidas, tetraciclinas y β-lactámicos. Esta diferenciación es congruente con la estructura taxonómica previamente observada, caracterizada por el predominio de Bacillota en SC y de Pseudomonadota, particularmente Pseudomonas y otros bacilos Gram negativos, en SNC.

6.3 Aislamiento y perfiles de resistencia en cepas representativas.

Los resultados muestran que SC presenta una cantidad significativamente menor de unidades formadoras de colonias (UFC/g) en presencia de antibióticos, en comparación con SNC. Esta diferencia no solo refleja la presión selectiva ejercida por los lixiviados sobre las comunidades microbianas, sino también la existencia de una fracción no cultivable que se ve más acentuada en SC.

En primer lugar, el suelo contaminado está expuesto a compuestos tóxicos, metales pesados y variaciones extremas de pH propias de los lixiviados. Estas condiciones generan estrés fisiológico prolongado sobre los microorganismos, provocando que muchos de ellos entren en un estado VBNC (Viable But Non-Culturable). En este estado, las bacterias mantienen funciones metabólicas mínimas y viabilidad celular,

pero pierden la capacidad de formar colonias en medios de cultivo estándar. Por tanto, aunque el análisis metagenómico demuestra que SC contiene una alta diversidad microbiana y numerosos genes de resistencia, gran parte de esa comunidad no puede recuperarse mediante métodos de cultivo convencionales. Además, el cambio abrupto de ambiente genera un choque fisiológico adicional. Las bacterias adaptadas a condiciones extremas pueden no responder adecuadamente a la disponibilidad súbita de nutrientes, a la presión osmótica del medio o a las condiciones de incubación (temperatura, oxígeno, humedad). Esto incrementa la fracción no cultivable.

Por el contrario, las bacterias del SNC provienen de un entorno más estable y menos estresante, lo que les permite mantener un metabolismo activo y una mayor capacidad de crecimiento cuando se transfieren al medio de cultivo. Esto se refleja en las altas UFC registradas en presencia de distintos antibióticos, como kanamicina, cloranfenicol y ampicilina. En estas condiciones, los microorganismos del SNC pueden expresar de manera eficiente los genes de resistencia presentes, proliferar y formar colonias de forma consistente.

Los perfiles de susceptibilidad observados en las cepas bacterianas aisladas muestran una prevalencia elevada de resistencia a múltiples antibióticos, especialmente a los β-lactámicos como ampicilina, cefalotina y cefotaxima. La resistencia generalizada a estos compuestos ha sido reportada previamente en estudios de bacterias aisladas de ambientes contaminados, como suelos y lixiviados de vertederos, donde la exposición prolongada a agentes antimicrobianos puede favorecer la selección de genes de resistencia (Mondragón-Quiguanas et al., 2022).

Las cinco cepas con un mayor número de resistencias fueron SPKN6, SCCL1, SPCL1, SPBAMP1 y SCKN8 cumplieron con criterios de multirresistencia, definiéndose como resistentes a antibióticos de al menos tres clases distintas. Este patrón de resistencia múltiple es consistente con estudios previos que han descrito la presencia de *Enterobacterales* y otras especies con perfiles similares en

ambientes antropogénicamente afectados, lo que indica la co-selección de múltiples mecanismos genéticos de resistencia en comunidades microbianas expuestas a contaminantes (Andy & Okpo, 2018).

En contraste, algunas cepas presentaron resistencia limitada, lo que sugiere que no todos los microorganismos aislados de un mismo ambiente presentan igual grado de presión selectiva o portan los mismos determinantes de resistencia. Esto también se ha observado en otros estudios sobre bacterias aisladas de suelos de vertederos, en los cuales ciertos aislados mostraron susceptibilidad a múltiples antibióticos, mientras que otros exhibieron resistencia marcada a un conjunto de compuestos (Nyandjou & Umar, 2024)

6.4 Análisis de co-localización.

6.4.1 *Priestia aryabhattai* Spcl1

Desde una perspectiva clínica y de salud pública, *Priestia aryabhattai* no es considerada actualmente un patógeno humano primario ni una bacteria frecuentemente asociada a infecciones clínicas. Sin embargo, debido a su proximidad filogenética con especies del grupo *Bacillus*, diversos autores han señalado la necesidad de evaluar cuidadosamente su potencial oportunista, especialmente en cepas ambientales aisladas de ecosistemas contaminados (Yang et al., 2024). Los estudios genómicos recientes muestran que *P. aryabhattai* posee una elevada plasticidad genética, incluyendo genes relacionados con adaptación al estrés, transporte de metales, resistencia ambiental y sistemas antioxidantes, características que favorecen su supervivencia en ambientes hostiles y altamente contaminados.(Pal et al., 2026)

Uno de los aspectos más relevantes de *P. aryabhattai* es su función como bacteria promotora del crecimiento vegetal. Diversos estudios han demostrado que esta bacteria es capaz de estimular el crecimiento de plantas mediante diferentes mecanismos fisiológicos y bioquímicos (Shahid et al., 2022). Entre estos mecanismos destacan la producción de ácido indolacético, la síntesis de

sideróforos y la capacidad de solubilizar nutrientes esenciales como fósforo, zinc y potasio. Estas características permiten mejorar la disponibilidad de nutrientes en el suelo y aumentar la tolerancia de las plantas frente a condiciones de estrés, sin embargo la información acerca de sus perfiles de resistencia antimicrobiana aún es limitada (Pal et al., 2026; Woo et al., 2026; Yang et al., 2024).

Recientemente se reportó una cepa denominada *P. aryabhattai* MHA1 (Pajuelo et al., 2025) con resistencia a múltiples antibióticos dentro de un estudio enfocado en bacterias de interés agrícola. En dicho trabajo, los autores identificaron que esta cepa presentaba resistencia frente a diversos antimicrobianos y poseía genes relacionados con mecanismos de resistencia como bombas de eflujo, modificación del blanco e inactivación enzimática, además la cepa Spcl1 y MHA1 tienen los siguientes genes de resistencia en común: *gyrA, gyrB, s10p, s12p, gidB, murA y fosA.* La presencia de genes antimicrobianos indica que estas bacterias pueden actuar como reservorios ambientales de resistencia antimicrobiana. Esto representa un riesgo potencial para la salud pública debido a la posible transferencia horizontal de dichos genes hacia bacterias patógenas clínicamente relevantes (Han et al., 2022).

Entre los genes detectados destacan *arsC, arsR y arsB*, pertenecientes al operón *ars*, ampliamente distribuido en bacterias resistentes al arsénico. El gen *arsC* codifica una arsenato reductasa que convierte arsenato en arsenito, mientras que *arsB* participa en la expulsión activa del arsenito fuera de la célula y *arsR* actúa como regulador transcripcional del sistema de resistencia (Sato & Kobayashi, 1998). Asi mismo, se identificaron los genes *cadA* y *cadC*, relacionados con resistencia a cadmio mediante sistemas de eflujo dependientes de ATP, *cadA* codifica una ATPasa transportadora que expulsa cadmio del citoplasma, mientras que *cadC* regula la expresión de este mecanismo en respuesta a estrés metálico (Rehan et al., 2022). Por otra parte, los genes *copC*, *copD* y *copZ* están asociados con homeostasis y resistencia al cobre. Estas proteínas participan en captura,

transporte y detoxificación intracelular del metal, evitando el daño oxidativo generado por concentraciones elevadas de cobre (Chen et al., 2019). De igual manera, el operón *czcABC* identificado en SPCL1 corresponde a un sistema de eflujo capaz de expulsar cobalto, zinc y cadmio, considerado uno de los mecanismos más importantes de resistencia multimetal en bacterias ambientales (Chen et al., 2019).

P. aryabhattai ha sido ampliamente descrita en la literatura científica como un microorganismo con alto potencial biotecnológico para la biorremediación de ambientes contaminados con metales pesados y metaloides, particularmente arsénico, cadmio, plomo, cobre y vanadio (Singh et al., 2016). Además del arsénico, múltiples investigaciones recientes han demostrado que *P. aryabhattai* tolera y remueve otros metales pesados mediante mecanismos de biomineralización y precipitación microbiana. Un estudio de 2025 reportó que la cepa *P. aryabhattai* PMASS1 fue capaz de inmovilizar simultáneamente plomo, cobre y cadmio mediante precipitación inducida de calcita, el análisis genómico identificó genes relacionados con resistencia a metales pesados, incluyendo *zntA*, *cadC*, *czcD* y *cutC*, asociados con tolerancia y detoxificación metálica (Atakpa et al., 2025). De igual manera la cepa *P. aryabhattai* BD1 aislada de sedimentos textiles contaba con genes implicados en la tolerancia del arsenico, cobalto y zinc (Nsa & Omolere, s. f.) lo cual nos indica la amplia adaptación de esta bacteria en diferentes ambientes y su potencial como reservorios de genes de resistencia.

La identificación de genes asociados con virulencia en *Priestia aryabhattai* sugiere que esta bacteria posee mecanismos moleculares relacionados con adaptación, supervivencia y potencial interacción con hospedadores. Aunque *P. aryabhattai* es considerada principalmente una bacteria ambiental, la presencia de estos genes puede favorecer su persistencia en ambientes contaminados y, en determinadas condiciones, contribuir a comportamientos oportunistas similares a los observados en bacterias patógenas.

El gen *recA* codifica la proteína RecA, esencial en la reparación del ADN y recombinación homóloga. Este sistema permite a la bacteria sobrevivir frente a estrés ambiental, daño oxidativo y exposición a compuestos tóxicos presentes en lixiviados. Además, RecA participa en procesos de transferencia horizontal y adquisición de genes de resistencia, favoreciendo la adaptación bacteriana.

El gen *sodA1* codifica una superóxido dismutasa dependiente de manganeso, enzima encargada de detoxificar especies reactivas de oxígeno. Este mecanismo protege a la célula frente al estrés oxidativo generado por metales pesados, antibióticos o respuestas defensivas del hospedador, incrementando la capacidad de supervivencia bacteriana en ambientes hostiles.

Los genes *clpP* y *clpX* forman parte del sistema proteasa ClpXP dependiente de ATP, involucrado en degradación de proteínas dañadas y regulación de factores celulares. En diversas bacterias, este sistema contribuye a tolerancia al estrés, formación de biopelículas y regulación de factores de virulencia, facilitando la adaptación a condiciones ambientales extremas.

El gen *codY* codifica un regulador transcripcional global sensible al estado nutricional celular. En bacterias Gram positivas, CodY regula genes relacionados con metabolismo, supervivencia y virulencia. Su presencia indica mecanismos avanzados de regulación fisiológica que podrían favorecer la persistencia bacteriana en ambientes pobres en nutrientes, como los sitios de disposición final de residuos.

El gen *EF1623*, relacionado con proteínas de adhesión similares a *PduA/PduJ*, podría participar en procesos de unión a superficies o tejidos mediante interacción con glicoconjugados. Este tipo de proteínas favorece la colonización bacteriana y la formación de biopelículas, características importantes para la supervivencia en ambientes contaminados y potencial persistencia en hospedadores.

Los genes *purA* y *purB* participan en la biosíntesis de purinas, ruta metabólica esencial para el crecimiento y supervivencia bacteriana. En diversos

microorganismos patógenos, estas rutas metabólicas están asociadas con virulencia debido a que permiten la proliferación bacteriana bajo condiciones de estrés o limitación nutricional.

Finalmente, el gen fur codifica el regulador de captación de hierro, proteína clave en la homeostasis del hierro y regulación de factores asociados con virulencia. El hierro es un elemento esencial para el crecimiento bacteriano y la presencia de *Fur* puede favorecer mecanismos de adaptación y persistencia en ambientes complejos o durante interacción con hospedadores.

En conjunto, estos genes sugieren que *Priestia aryabhattai* Spc1 posee mecanismos relacionados con resistencia al estrés, adaptación ambiental, regulación metabólica y potencial colonización. Aunque esto no confirma un comportamiento patógeno directo, la coexistencia de genes de virulencia, resistencia a antibióticos y resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de lixiviados representa un posible riesgo ambiental y de salud pública debido a la capacidad de transferencia genética y persistencia en ecosistemas contaminados.

6.4.2 *Bacillus cereus* Spbamp1

Bacillus cereus es una bacteria Gram positiva, formadora de esporas y anaerobia facultativa, ampliamente distribuida en el ambiente, especialmente en suelo, agua, vegetación y alimentos. Su capacidad para formar esporas altamente resistentes le permite sobrevivir a condiciones extremas de temperatura, desecación y desinfección, favoreciendo su persistencia en cadenas de producción alimentaria y ambientes hospitalarios (Ehling-Schulz et al., 2019).

La principal relevancia clínica de *B. cereus* radica en su papel como patógeno transmitido por alimentos. Produce dos síndromes gastrointestinales característicos: el síndrome emético, asociado principalmente al consumo de arroz, pasta y alimentos ricos en almidón contaminados con la toxina cereulida

termoestable; y el síndrome diarreico, causado por enterotoxinas como Hbl, Nhe y CytK producidas en el intestino después de la ingestión de células vegetativas o esporas. Los síntomas incluyen vómito, diarrea, dolor abdominal y, en casos severos, insuficiencia hepática y muerte (Tewari & Abdullah, 2015).

Los genes reguladores *vanR* y variantes tipo *vanF/M* forman parte de sistemas inducibles de resistencia similares a los descritos en enterococos resistentes a vancomicina (Woodford, 2001). Este resultado es de gran importancia, ya que, en comparación con diferentes cepas de B. cereus aisladas de otros ambientes, la cepa Spbamp1 presenta genes de resistencia a vancomicina que no han sido reportados en algunas cepas provenientes de entornos menos contaminados. Por ejemplo, la cepa *B. cereus* LIN78 (Lin et al., 2024), aislada de dientes humanos, no posee genes asociados con resistencia a este antibiótico. Esta diferencia evidencia una posible relación entre el ambiente de aislamiento y la adquisición o selección de genes de resistencia frente a antimicrobianos de alta relevancia clínica.

La presencia de genes de resistencia a vancomicina en Spbamp1 resulta especialmente preocupante debido a que este antibiótico es considerado uno de los tratamientos de último recurso para infecciones graves causadas por bacterias Gram positivas multirresistentes (Liu et al., 2018). Por ello, el hallazgo sugiere que ambientes contaminados, como los lixiviados de vertederos, pueden actuar como reservorios y puntos de selección de bacterias con perfiles de resistencia cada vez más complejos y potencialmente peligrosos para la salud pública.

Asimismo, se identificó el gen *Lsa(B)* relacionado con resistencia a lincosamidas mediante protección ribosomal, limitando la unión del antibiótico a la subunidad 50S del ribosoma. Los genes *bcrA, bcrB* y *bcrC* estuvieron asociados con resistencia a bacitracina, principalmente mediante sistemas de eflujo y protección de la síntesis del peptidoglicano. Este mecanismo ha sido reportado en especies del grupo *B. cereus* y favorece la supervivencia en ambientes con presión antimicrobiana (Yossa et al., 2022).

En aminoglucósidos se detectó *gidB*, gen asociado con modificaciones del ARN ribosomal 16S que pueden reducir la susceptibilidad a estreptomicina. Asimismo, los genes *gyrA* y *gyrB* encontrados en Spbamp1 participan en resistencia a fluoroquinolonas mediante modificaciones en la ADN girasa, mientras que *rpoB* y *rpoC* están relacionados con resistencia a rifamicinas por alteraciones en la ARN polimerasa bacteriana.

La resistencia a antifolatos estuvo representada por *folA, folP* y *dfr*, genes que codifican enzimas de la vía del ácido fólico menos susceptibles a sulfonamidas y trimetoprim. También se identificaron *inhA* y *kasA*, asociados con resistencia a isoniazida y biosíntesis de ácidos micólicos, además de *Alr* y *Ddl*, implicados en resistencia a D-cicloserina mediante alteraciones en enzimas del metabolismo de D-alanina.

La presencia de estos genes RM en Spbamp1 es consistente con lo reportado en otras bacterias del género *Bacillus* aisladas de ambientes altamente contaminados. Por ejemplo, *Bacillus* sp. UWC, aislada de residuos de drenaje ácido de minas y cenizas industriales, presentó el operón *arsRBCDA*, asociado con elevada tolerancia a arsenito y arsenato (Musingarimi et al., 2010). Asimismo, cepas de *Bacillus* aisladas de pozas termales contaminadas con arsénico en Araró, México, también mostraron presencia de *arsB* y *arsC*, correlacionándose con altos niveles de hipertolerancia al arsénico. Estos hallazgos sugieren que los ambientes extremos o contaminados favorecen la selección y mantenimiento de operones ars funcionales (Prieto-Barajas et al., 2019).

El gen *inhA* codifica la metaloproteasa Immune Inhibitor A, una enzima extracelular capaz de degradar péptidos antimicrobianos y proteínas del hospedero, facilitando la evasión del sistema inmune y la diseminación bacteriana. Este gen ha sido descrito tanto en *B. cereus* como en *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus anthracis*, donde participa en supervivencia intracelular y virulencia sistémica. Cepas ambientales y clínicas de *B. cereus* aisladas de alimentos contaminados han

mostrado una elevada prevalencia de *inhA*, particularmente aquellas asociadas con cuadros gastrointestinales severos. (Ramarao & Sanchis, 2013).

Uno de los hallazgos más importantes en Spbamp1 fue la presencia completa del operón *nheABC*, responsable de la enterotoxina no hemolítica (Nhe). Este complejo tripartito constituye una de las toxinas diarreicas más frecuentes en *B. cereus*. El mecanismo requiere acción secuencial de *NheB, NheC* y posteriormente *NheA* para formar poros en la membrana de células epiteliales intestinales, alterando la permeabilidad y causando daño celular. Diversos estudios han reportado que más del 90 % de las cepas patogénicas de *B. cereus* aisladas de alimentos poseen el complejo nheABC. Por ejemplo, en cepas de *B. cereus* aisladas de productos lácteos y arroz cocido en China y Corea se observó alta prevalencia de *nheABC*, correlacionada con citotoxicidad elevada en células epiteliales intestinales. (Ehling-Schulz et al., 2006; Kim et al., 2015).

La cepa Spbamp1 también presentó el complejo hemolítico *hblACD* (Hemolysin BL), otra de las toxinas entéricas más importantes del grupo *B. cereus*. El componente *HblA* participa en la unión inicial a membrana, mientras que *HblC* y *HblD* forman el complejo lítico que genera poros transmembranales y lisis celular. La coexistencia simultánea de *nheABC* y *hblACD* suele asociarse con cepas altamente toxigénicas y con mayor severidad clínica en intoxicaciones alimentarias. Estudios realizados en cepas de *B. cereus* provenientes de hospitales y alimentos listos para consumo demostraron que aquellas portadoras de ambos operones presentan mayor capacidad hemolítica y citotóxica. (Stenfors Arnesen et al., 2008).

Otro gen relevante identificado en Spbamp1 fue *cyt*K, que codifica Cytotoxin K, una toxina formadora de poros asociada con diarrea severa, necrosis intestinal y brotes alimentarios potencialmente mortales. Este gen ganó relevancia tras los brotes ocurridos en Francia asociados con *B. cereus* productor de *CytK*, donde se documentaron cuadros gastrointestinales necrotizantes. La presencia de *cytK* en Spbamp1 sugiere un potencial enteropatogénico importante comparable al observado en cepas clínicas hipervirulentas. (Lund et al., 2000).

Además, se detectó el gen *BAS3109*, correspondiente a una citolisina activada por tioles dependiente de colesterol, similar a las citolisinas de otras bacterias Gram positivas. Estas toxinas forman grandes poros en células eucariotas y contribuyen al daño tisular, hemólisis y evasión inmune. Aunque menos estudiado que *nhe* o *hbl*, este tipo de toxinas se ha relacionado con incremento en la virulencia sistémica de cepas del grupo *B. cereus*. (Hoton et al., 2009).

La combinación de estos genes en Spbamp1 es particularmente relevante porque perfiles similares han sido reportados en cepas clínicas y alimentarias asociadas con intoxicaciones severas. Por ejemplo, cepas de *B. cereus* aisladas de leche, arroz y fórmulas infantiles frecuentemente contienen *nheABC, hblACD y cytK* simultáneamente, considerándose marcadores de alto potencial toxigénico.

6.4.3 Operón *ars* y tolerancia al arsénico.

La presencia de genes del operón *ars* constituye uno de los principales mecanismos bacterianos de tolerancia y detoxificación frente al arsénico. Estos sistemas se encuentran ampliamente distribuidos entre procariotas y pueden presentar diferentes organizaciones genéticas. Una de las configuraciones más comunes corresponde al sistema *arsRBC*, mientras que operones más complejos, como el *arsRDABC* caracterizado en el plásmido R773 de Escherichia coli, incorporan los genes *arsD* y *arsA*, aumentando la eficiencia de la detoxificación mediante un sistema de expulsión dependiente de ATP (Andres & Bertin, 2016; Mateos et al., 2017).

ArsR funciona principalmente como un represor transcripcional sensible al arsénico y regula la expresión del operón. En ausencia de As(III), *ArsR* se une a la región promotora/operadora e inhibe la transcripción de los genes *ars*. Cuando aumenta la concentración intracelular de As(III), el metaloide interactúa con residuos de cisteína de *ArsR*, provocando un cambio conformacional que disminuye su afinidad por el ADN. Como consecuencia, *ArsR* se disocia del operador y permite la

expresión de los genes involucrados en la detoxificación del arsénico (Yang et al., 2015).

ArsC es una arsenato reductasa que cataliza la reducción del arsenato a arsenito. Esta transformación es fundamental debido a que los principales sistemas de eflujo codificados por el operón *ars* reconocen preferentemente As(III). De esta manera, el As(V) que ingresa a la célula puede ser reducido a As(III) y posteriormente eliminado del citoplasma, disminuyendo su acumulación intracelular (Yang et al., 2015; Mateos et al., 2017).

ArsB corresponde a una proteína integral de membrana que actúa como transportador de As(III). En sistemas *arsRBC, ArsB* puede participar directamente en la expulsión de arsenito aprovechando el gradiente electroquímico. Sin embargo, cuando se encuentra asociado con *ArsA*, ambos componentes forman el complejo *ArsAB*, un sistema de eflujo cuya actividad está acoplada a la hidrólisis de ATP.

ArsA constituye la subunidad catalítica ATPasa, mientras que *ArsB* forma el componente transmembranal responsable de la translocación del metaloide hacia el exterior celular. Esta asociación proporciona un mecanismo particularmente eficiente para disminuir la concentración intracelular de As(III) (Rosen et al., 1995; Lin et al., 2007).

ArsD esta proteína puede captar arsenito intracelular mediante residuos de cisteína y transferirlo directamente a *ArsA*. La interacción *ArsD-ArsA* incrementa la afinidad de *ArsA* por As(III), favoreciendo la actividad ATPasa y aumentando la eficiencia de expulsión del arsenito mediante el complejo *ArsAB*. Por lo tanto, *ArsD* permite que las bacterias respondan incluso frente a concentraciones ambientales relativamente bajas de arsénico (Lin et al., 2006; Yang et al., 2010; Ajees et al., 2011).

6.4.4 Relación entre resistencia a metales y resistencia a antibióticos en Spbamp1 y Spcl1

El análisis genómico de *Bacillus cereus* Spbamp1 y *Priestia aryabhattai* Spcl1 mostró la coexistencia de determinantes asociados con tolerancia a metales y metaloides junto con múltiples genes relacionados con resistencia a antibióticos. Esta asociación resulta relevante debido a que ambas cepas proceden de un suelo expuesto a lixiviados en el que se detectaron diferentes metales y metaloides, entre ellos As, Hg, Cr, Pb, Cu y Cd. En ambientes de este tipo, los metales pueden actuar como presiones selectivas persistentes capaces de favorecer indirectamente la conservación de resistencia antimicrobiana mediante mecanismos de co-resistencia, resistencia cruzada y co-regulación (Baker-Austin et al., 2006; Murray et al., 2024).

En *B. cereus* Spbamp1, la presencia de determinantes relacionados con la tolerancia al arsénico, como *arsR, arsC, arsB/ACR3*, coincide con la detección de múltiples determinantes de resistencia antimicrobiana, entre ellos *OXA-360, mecA, cfrA, dfrGD, catA y fosB.* Esta combinación muestra que una misma bacteria posee mecanismos potenciales para responder simultáneamente a dos grupos de presiones selectivas: metales y antibióticos. Los genes del sistema ars permitirían regular, transformar y expulsar especies tóxicas de arsénico, mientras que los ARG detectados están asociados con diferentes mecanismos de resistencia antimicrobiana, incluyendo modificación o protección de blancos, inactivación enzimática y resistencia a diferentes familias de antibióticos

Una situación semejante se observa en *P. aryabhattai* Spcl1, donde los determinantes asociados con resistencia al arsénico y otros metales coexisten con genes relacionados con resistencia a antibióticos, como *folA, catA15/16, fosB, lsa(B)* y diferentes componentes asociados con resistencia o respuesta frente a glicopéptidos, además de sistemas de transporte como *BcrAB/YkkCD*. En particular, la identificación de *folA* en el plásmido P1 de Spcl1 demuestra que al menos parte del repertorio asociado con resistencia antimicrobiana se encuentra en elementos extracromosómicos, lo que resulta relevante al considerar el potencial de movilización de determinantes de resistencia.

En Spcl1, la presencia de seis plásmidos y la localización de *folA* en el plásmido P1 proporcionan un contexto particularmente importante para investigar este mecanismo. Sin embargo, para demostrar co-resistencia entre arsénico y trimetoprim, por ejemplo, sería necesario comprobar que un determinante *ars y folA* se encuentran físicamente localizados en el mismo plásmido. Por tanto, la coexistencia observada actualmente debe interpretarse como potencial de co-resistencia, mientras que la identificación de un MRG y un ARG dentro del mismo elemento genético constituiría una evidencia genómica considerablemente más sólida.

Un segundo punto de conexión se encuentra en los sistemas de eflujo. En ambas cepas se identificaron determinantes relacionados con la tolerancia a metales, entre ellos proteínas de la familia CzcC, además de otros sistemas de transporte. El sistema CzcCBA pertenece a la familia RND y participa principalmente en la expulsión de cationes. Los sistemas RND constituyen también uno de los principales mecanismos bacterianos de resistencia multidroga. Esta similitud funcional es relevante debido a que existen bombas de eflujo capaces de responder tanto a metales como a antibióticos, constituyendo ejemplos de resistencia cruzada (Murray et al., 2024).

No obstante, la identificación de CzcC no significa automáticamente que esta proteína sea responsable de la resistencia fenotípica a los antibióticos observada en Spbamp1. Para demostrar resistencia cruzada sería necesario comprobar que el mismo sistema de eflujo participa funcionalmente en ambos fenotipos. Por lo tanto, CzcC y los demás sistemas de transporte identificados representan candidatos relevantes para explicar la relación entre tolerancia a metales y resistencia antimicrobiana, pero requieren validación funcional

En Spbamp1 esta asociación resulta particularmente interesante debido a que la cepa presentó un fenotipo multirresistente frente a antibióticos pertenecientes a diferentes familias, incluyendo β-lactámicos, quinolonas, aminoglucósidos, macrólidos, lincosamidas, glicopéptidos, fenicoles, nitrofuranos y tetraciclinas. De

esta manera, la coexistencia de un amplio fenotipo de resistencia antimicrobiana con sistemas de tolerancia a As, Cu y otros metales es compatible con un escenario ambiental en el que diferentes presiones selectivas han contribuido a la persistencia de una bacteria multirresistente.

También existe una posible relación mediante co-regulación y respuestas generales al estrés. Los metales pueden generar estrés oxidativo y alteraciones de membrana capaces de activar reguladores y sistemas de respuesta celular que, directa o indirectamente, modifican la susceptibilidad a antibióticos. Sin embargo, la presencia de reguladores como *ArsR, LiaFSR o VanR/S* no demuestra por sí misma que exista co-regulación entre resistencia a metales y antibióticos. Para establecerla sería necesario demostrar que un mismo regulador o señal inducida por el metal controla simultáneamente MRG y ARG.

En conjunto, los resultados de Spbamp1 y Spcl1 son compatibles con un potencial de co-selección entre tolerancia a metales y resistencia a antibióticos. El sistema ars proporciona mecanismos específicos frente al arsénico; *Czc* y otros transportadores participan en la homeostasis o expulsión de metales; mientras que genes como *OXA-360, mecA, cfrA, dfrGD, folA, catA, fosB y lsa(B)* representan un repertorio simultáneo de determinantes relacionados con resistencia antimicrobiana. La coexistencia de estos sistemas en bacterias recuperadas de un suelo contaminado sugiere que la exposición prolongada a metales podría contribuir al mantenimiento de bacterias portadoras de ARG aun en ausencia de una presión antibiótica directa.

7 Limitaciones

Entre las principales limitaciones del presente proyecto se encuentra que el análisis metagenómico permite identificar la presencia de genes de resistencia, virulencia y elementos genéticos móviles; sin embargo, no confirma que dichos genes se encuentren activos o expresándose funcionalmente en las bacterias presentes en el ambiente. En este sentido, la detección de un gen no necesariamente implica que este contribuya fenotípicamente a la resistencia o virulencia bacteriana, por lo que serían necesarios estudios transcriptómicos, proteómicos o ensayos funcionales para corroborar su actividad biológica.

Otra limitación importante corresponde a los sesgos asociados al muestreo ambiental. Las muestras de suelo y lixiviados representan únicamente una fracción espacial y temporal del sitio de disposición final analizado, por lo que la diversidad microbiana identificada podría no reflejar completamente la dinámica real del ecosistema. Factores como la heterogeneidad del suelo, variaciones climáticas, profundidad de muestreo y cambios en la composición de los residuos pueden influir significativamente en la estructura microbiana y en la abundancia de genes de resistencia detectados.

Asi mismo, las metodologías basadas en cultivo presentan limitaciones debido a que una gran proporción de los microorganismos ambientales no pueden crecer bajo condiciones convencionales de laboratorio. Como consecuencia, el aislamiento bacteriano obtenido podría subestimar la diversidad microbiana presente en los sitios contaminados y favorecer únicamente el crecimiento de bacterias cultivables con mayor capacidad de adaptación a los medios utilizados. Esto restringe la identificación de microorganismos potencialmente relevantes que permanecen viables pero no cultivables.

De igual manera, aunque se identificaron genes de resistencia a antibióticos y metales pesados en bacterias aisladas y en datos metagenómicos, no fue posible determinar experimentalmente la frecuencia real de transferencia horizontal de

dichos genes en el ambiente. La presencia de plásmidos encontrados en las bacterias aisladas (Spbamp1 y Spcl1) sugiere un potencial de movilización genética; sin embargo, se requieren estudios de conjugación y movilidad genética para confirmar estos procesos bajo condiciones ambientales reales.

Finalmente, otra limitación del estudio es la escasa información disponible en México sobre microbiota y resistoma en sitios de disposición final de residuos sólidos urbanos. Esto dificulta la comparación directa de resultados con investigaciones nacionales y limita el establecimiento de patrones epidemiológicos o ambientales a nivel regional.

8 Aplicaciones

Los resultados obtenidos en este proyecto abren diversas perspectivas de investigación orientadas al estudio de la resistencia antimicrobiana y la ecología microbiana en sitios de disposición final de residuos sólidos urbanos. Una de las principales aplicaciones futuras consiste en el monitoreo ambiental de genes de resistencia a antibióticos y metales pesados como indicadores de contaminación microbiológica y riesgo sanitario. La identificación de bacterias resistentes y elementos genéticos móviles en suelos impactados por lixiviados podría utilizarse como herramienta de vigilancia para evaluar el impacto ambiental de los vertederos sobre ecosistemas circundantes.

Asimismo, este trabajo sienta las bases para el desarrollo de estudios funcionales enfocados en la expresión y movilidad de genes de resistencia. Futuras investigaciones podrían incluir análisis transcriptómicos, proteómicos y ensayos de conjugación bacteriana que permitan determinar si los genes identificados se encuentran activos y con capacidad real de transferencia horizontal. Esto permitiría comprender con mayor precisión el papel de los plásmidos en la diseminación de la multirresistencia bacteriana en ambientes contaminados.

Otra perspectiva relevante es la ampliación de estudios metagenómicos en distintos sitios de disposición final de México. Debido a la limitada información nacional sobre microbiomas y resistomas ambientales asociados a vertederos, los resultados obtenidos pueden servir como antecedente para establecer redes de monitoreo microbiológico y generar bases de datos regionales sobre diversidad bacteriana, resistoma Ambiental contribuyendo al diseño de estrategias de gestión de residuos y control de contaminación más efectivas.

En el ámbito de salud pública, los hallazgos del proyecto podrían ser útiles para evaluar el riesgo potencial de dispersión de bacterias multirresistentes hacia poblaciones humanas, animales y cuerpos de agua cercanos, para prevenir la propagación de resistencia antimicrobiana.

De igual manera, los resultados pueden tener aplicaciones biotecnológicas y ambientales. Algunas bacterias resistentes a metales pesados identificadas en ambientes contaminados poseen capacidades metabólicas con potencial para procesos de biorremediación, bioadsorción y detoxificación de contaminantes. El estudio de estos microorganismos podría favorecer el desarrollo de tecnologías sustentables para el tratamiento de suelos y lixiviados contaminados.

Finalmente, este proyecto contribuye al entendimiento de los sitios de disposición final como posibles sitios evolutivos donde convergen procesos de selección, adaptación bacteriana y transferencia horizontal de genes.

9. Conclusiones

Los resultados obtenidos para las cepas *Bacillus cereus* Spbamp1 y *Priestia aryabhattai* Spcl1 evidencian que los lixiviados de vertederos contaminados constituyen ambientes altamente selectivos capaces de favorecer la persistencia y evolución de bacterias con perfiles complejos de resistencia y virulencia. La exposición continua a metales pesados, residuos orgánicos, compuestos tóxicos y posibles trazas de antibióticos genera una presión ambiental que promueve la adquisición, mantenimiento y expresión de genes relacionados con supervivencia bacteriana bajo condiciones extremas.

La coexistencia de genes de resistencia a metales y antibióticos tiene una relevancia microbiológica y epidemiológica crítica. Diversos estudios han demostrado que ambos tipos de genes pueden localizarse en los mismos elementos genéticos móviles, como plásmidos, integrones y transposones, favoreciendo fenómenos de co-selección. Esto implica que la exposición constante a metales pesados puede mantener indirectamente genes de resistencia antibiótica aun en ausencia de antibióticos, contribuyendo a la evolución de bacterias multirresistentes. En consecuencia, los lixiviados de vertederos no solo representan una fuente de contaminación ambiental, sino también potenciales reservorios y puntos de dispersión de determinantes genéticos de resistencia.

Desde la perspectiva de salud pública, estos hallazgos son preocupantes porque demuestran que ambientes contaminados como los vertederos pueden funcionar como reservorios ecológicos de bacterias potencialmente patógenas con alta capacidad adaptativa. La posible transferencia horizontal de genes de resistencia y virulencia hacia otros microorganismos ambientales o clínicos podría contribuir a la emergencia de nuevos patógenos multirresistentes. Asimismo, la dispersión de estas bacterias mediante agua, suelo, aerosoles o cadenas alimentarias representa un riesgo potencial para poblaciones humanas y animales.

Por tanto, el estudio de *B. cereus* Spbamp1 y *P. aryabhattai* Spcl1 resalta la importancia de monitorear microbiológicamente ambientes contaminados y

comprender la interacción entre contaminación por metales pesados, resistencia antimicrobiana y virulencia bacteriana. Estos ecosistemas contaminados deben considerarse focos importantes en la dinámica global de resistencia microbiana y en la emergencia de amenazas para la salud pública y ambiental.

10. Anexos

Referencias

Andy, I. E., & Okpo, E. A. (2018). Occurrence and Antibiogram of Bacteria Isolated from Effluent and Waste Dump Site Soil of Selected Hospitals in Calabar Metropolis, Nigeria. *Microbiology Research Journal International*, 1-9. https://doi.org/10.9734/MRJI/2018/44932

Atakpa, E. O., Li, J., Dong, F., Lei, W., Lei, C., Yunyi, Z., Ke, H., Suanon, F., Sesu, F., Zhou, L., Zhenzhen, L., Tingting, H., & Han, Y. (2025). Deciphering the biomolecular mechanisms of calcite precipitation of multi-metals by the novel metallotolerant strain *Priestia aryabhattai* PMASS1. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *13*(5), 117703. https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.117703

Balta, I., Lemon, J., Gadaj, A., Cretescu, I., Stef, D., Pet, I., Stef, L., McCleery, D., Douglas, A., & Corcionivoschi, N. (2025). The interplay between antimicrobial resistance, heavy metal pollution, and the role of microplastics. *Frontiers in Microbiology*, *16*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1550587

Barrantes Jiménez, K., Chacón Jiménez, L., Arias Andrés, M., Barrantes Jiménez, K., Chacón Jiménez, L., & Arias Andrés, M. (2022). El impacto de la resistencia a los antibióticos en el desarrollo sostenible. *Población y Salud en Mesoamérica*, *19*(2), 305-329. https://doi.org/10.15517/psm.v0i19.47590

Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(1), 42-51. https://doi.org/10.1038/nrmicro3380

Chen, J., Li, J., Zhang, H., Shi, W., & Liu, Y. (2019). Bacterial Heavy-Metal and Antibiotic Resistance Genes in a Copper Tailing Dam Area in Northern China. *Frontiers in Microbiology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01916

Daubin, V., & Szöllősi, G. J. (2016). Horizontal Gene Transfer and the History of Life. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(4), a018036. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018036

Ducret, V., Gonzalez, M. R., Leoni, S., Valentini, M., & Perron, K. (2020). The CzcCBA Efflux System Requires the CadA P-Type ATPase for Timely Expression Upon Zinc Excess in Pseudomonas aeruginosa. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 911. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00911

Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., & Koehler, T. M. (s. f.). The Bacillus cereus Group: Bacillus Species with Pathogenic Potential. *Microbiology Spectrum*, *7*(3),

10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018

Forsberg, K. J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E. M., Sommer, M. O. A., & Dantas, G. (2012). The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science (New York, N.Y.)*, *337*(6098), 1107-1111. https://doi.org/10.1126/science.1220761

Gillieatt, B. F., & Coleman, N. V. (2024). Unravelling the mechanisms of antibiotic and heavy metal resistance co-selection in environmental bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *48*(4), fuae017. https://doi.org/10.1093/femsre/fuae017

Gu, Z., Feng, K., Li, Y., & Li, Q. (2021). Microbial characteristics of the leachate contaminated soil of an informal landfill site. *Chemosphere*, *287*, 132155. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132155

Gu, Z., Feng, K., Li, Y., & Li, Q. (2022). Microbial characteristics of the leachate contaminated soil of an informal landfill site. *Chemosphere*, *287*, 132155. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132155

Han, B., Ma, L., Yu, Q., Yang, J., Su, W., Hilal, M. G., Li, X., Zhang, S., & Li, H. (2022). The source, fate and prospect of antibiotic resistance genes in soil: A review. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 976657. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.976657

Haniff, F. A. M., Abdullah, H., Ahmad, M. F., Maniyam, M. N., Azman, H. H., Sulaiman, N., & Yaacob, N. S. (2025). Microbial Diversity in Landfills through Metagenomics Profiling: A Review. *Malaysian Journal of Science Health & Technology*, *11*(2), 162-171. https://doi.org/10.33102/mjosht.487

Hussein, M., Yoneda, K., Mohd-Zaki, Z., Amir, A., & Othman, N. (2021). Heavy metals in leachate, impacted soils and natural soils of different landfills in Malaysia: An alarming threat. *Chemosphere*, *267*, 128874. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128874

Karkman, A., Do, T. T., Walsh, F., & Virta, M. P. J. (2018). Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. *Trends in Microbiology*, *26*(3), 220-228. https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.005

Lacroix, B., & Citovsky, V. (2018). Beyond Agrobacterium-Mediated Transformation: Horizontal Gene Transfer from Bacteria to Eukaryotes. *Current topics in microbiology and immunology*, *418*, 443-462. https://doi.org/10.1007/82_2018_82

Lang, A. S., & Beatty, J. T. (2007). Importance of widespread gene transfer agent genes in alpha-proteobacteria. *Trends in Microbiology*, *15*(2), 54-62. https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.12.001

Lin, Y., Liu, L., Lu, S., Fan, L., Hu, H., Wang, X., Zhu, J., Qiang, X., He, J., Zhou, H., Shao, S., & Zheng, G. (2024). Genomic Insights into the Pathogenicity and Drug-Resistance of a Bacillus cereus Isolated from Human Teeth. *Infection and Drug Resistance*, *17*, 3623-3635. https://doi.org/10.2147/IDR.S477637

Lindamulla, L., Nanayakkara, N., Othman, M., Jinadasa, S., Herath, G., & Jegatheesan, V. (2022). Municipal Solid Waste Landfill Leachate Characteristics and Their Treatment Options in Tropical Countries. *Current Pollution Reports*, *8*(3), 273-287. https://doi.org/10.1007/s40726-022-00222-x

Liu, S., Wang, M., & Guan, W. (2018). Vancomycin in the treatment of adult intra-abdominal infections: Do we have strong evidences? *Infection and Drug Resistance*, *11*, 2539-2543. https://doi.org/10.2147/IDR.S185331

Long, K. S., Poehlsgaard, J., Kehrenberg, C., Schwarz, S., & Vester, B. (2006). The Cfr rRNA Methyltransferase Confers Resistance to Phenicols, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(7), 2500-2505. https://doi.org/10.1128/AAC.00131-06

Mell, J. C., & Redfield, R. J. (2014). Natural Competence and the Evolution of DNA Uptake Specificity. *Journal of Bacteriology*, *196*(8), 1471-1483. https://doi.org/10.1128/JB.01293-13

Mhammedsharif, R. M., & Kolo, K. Y. (2023). A case study of environmental pollution by pathogenic bacteria and metal(oid)s at Soran Landfill Site, Erbil, Iraqi Kurdistan Region. *Environmental Monitoring and Assessment*, *195*(7), 811. https://doi.org/10.1007/s10661-023-11352-0

Mondragón-Quiguanas, A., Villaquirán-Muriel, M. Á., Rivera, S. P., Rosero-García, D., Aranaga, C., Correa, A., & Falco, A. (2022). Beta-Lactam-Resistant Enterobacterales Isolated from Landfill Leachates. *Pathogens*, *11*(10), 1077. https://doi.org/10.3390/pathogens11101077

Moriguchi, K., Zoolkefli, F. I. R. M., Abe, M., Kiyokawa, K., Yamamoto, S., & Suzuki, K. (2020). Targeting Antibiotic Resistance Genes Is a Better Approach to Block Acquisition of Antibiotic Resistance Than Blocking Conjugal Transfer by Recipient Cells: A Genome-Wide Screening in Escherichia coli. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 2939. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02939

Musingarimi, W., Trindade, M., & Cowan, D. (2010). Characterisation of the arsenic resistance genes in Bacillus sp. UWC isolated from maturing fly ash acid mine drainage neutralised solids. *South African Journal of Science*, *106*. https://doi.org/10.4102/sajs.v106i1/2.17

Nsa, I. Y., & Omolere, B. M. (s. f.). Draft Genome Sequence and Annotation of Priestia aryabhattai Strain BD1 Isolated from a Dye Sediment. *Microbiology Resource Announcements*, *12*(2), e01175-22. https://doi.org/10.1128/mra.01175-22

Nyandjou, Y., & Umar, A. (2024). Study on Antibiotic Resistance Profiles Exhibited by Vibrio Species Isolated from Landfill Soils in Zaria Metropolis, Northern Nigeria. *UMYU Journal of Microbiology Research (UJMR)*, *9*, 252-258. https://doi.org/10.47430/ujmr.2493.031

Oromí Durich, J. (2000). Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Medicina Integral*, *36*(10), 367-370.

Pajuelo, E., Medina-Rodríguez, M., Flores-Duarte, N. J., Doukkali, B., Mesa-Marín, J., Rodríguez-Llorente, I. D., & Navarro-Torre, S. (2025). Antimicrobial Resistance in Bacterial Strains of Agricultural Interest: Predictions Based on Genomic Data. *Antibiotics*, *15*(1), 14. https://doi.org/10.3390/antibiotics15010014

Pal, D. C., Khan, S. N., & Karim, M. M. (2026). Whole-genome sequence and functional insights into the salt-tolerant plant growth-promoting bacterium Priestia aryabhattai MS3. *BMC Genomics*, *27*(1), 458. https://doi.org/10.1186/s12864-026-12591-4

Prieto-Barajas, C. M., Elorza-Gómez, J. C., Loeza-Lara, P. D., Sánchez-Yáñez, J. M., Valencia-Cantero, E., & Santoyo, G. (2019). Identificación y análisis de genes ars en cepas de Bacillus hipertolerantes al arsénico, aisladas de pozas termales en Araró, México. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, *21*(S1), 22-29.

Rehan, M., Alhusays, A., Serag, A. M., Boubakri, H., Pujic, P., & Normand, P. (2022). The cadCA and cadB/DX operons are possibly induced in cadmium resistance mechanism by Frankia alni ACN14a. *Electronic Journal of Biotechnology*, *60*, 86-96. https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2022.09.006

Sabba, F., Kassar, C., Zeng, T., Mallick, S. P., Downing, L., & McNamara, P. (2025). PFAS in landfill leachate: Practical considerations for treatment and characterization. *Journal of Hazardous Materials*, *481*, 136685. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.136685

Sastre-Dominguez, J., Rodera-Fernandez, P., DelaFuente, J., Martínez-González, S., Quesada, S., Valencoso-Requena, M., Calvo-Villamañán, A., Costas, C., Fuentes-Hernández, A., Santos-Lopez, A., & San Millan, A. (2026). Plasmids promote antimicrobial resistance through insertion sequence-mediated gene inactivation. *Nature Microbiology*, *11*(4), 976-992. https://doi.org/10.1038/s41564-026-02290-x

Sato, T., & Kobayashi, Y. (1998). The ars operon in the skin element of Bacillus subtilis confers resistance to arsenate and arsenite. *Journal of Bacteriology*, *180*(7), 1655-1661. https://doi.org/10.1128/JB.180.7.1655-1661.1998

Schwarz, S., Werckenthin, C., & Kehrenberg, C. (2000). Identification of a Plasmid-Borne Chloramphenicol-Florfenicol Resistance Gene inStaphylococcus sciuri. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *44*(9), 2530-2533. https://doi.org/10.1128/aac.44.9.2530-2533.2000

Shahid, M., Zeyad, M. T., Syed, A., Singh, U. B., Mohamed, A., Bahkali, A. H., Elgorban, A. M., & Pichtel, J. (2022). Stress-Tolerant Endophytic Isolate Priestia aryabhattai BPR-9 Modulates Physio-Biochemical Mechanisms in Wheat (Triticum aestivum L.) for Enhanced Salt Tolerance. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(17), 10883. https://doi.org/10.3390/ijerph191710883

Singh, N., Gupta, S., Marwa, N., Pandey, V., Verma, P. C., Rathaur, S., & Singh, N. (2016). Arsenic mediated modifications in *Bacillus aryabhattai* and their biotechnological applications for arsenic bioremediation. *Chemosphere*, *164*, 524-534. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.119

Sousa, J. M. de, Lourenço, M., & Gordo, I. (2023). Horizontal gene transfer among host-associated microbes. *Cell Host & Microbe*, *31*(4), 513-527. https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.03.017

Tewari, A., & Abdullah, S. (2015). Bacillus cereus food poisoning: International and Indian perspective. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(5), 2500-2511. https://doi.org/10.1007/s13197-014-1344-4

Wang, S., Han, Z., Wang, J., He, X., Zhou, Z., & Hu, X. (2022). Environmental risk assessment and factors influencing heavy metal concentrations in the soil of municipal solid waste landfills. *Waste Management*, *139*, 330-340. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.11.036

Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, *3*(2), 163-175. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521

Woo, J.-I., Back, M. Y., Gam, H.-J., Ha, J.-Y., Kang, S.-M., & Lee, I.-J. (2026). Whole-Genome Analysis of Priestia aryabhattai WJ45 Reveals a Genetic Repertoire Associated with Enhanced Wheat Germination and Early Seedling Growth Under Salt Stress. *Microorganisms*, *14*(3), 605. https://doi.org/10.3390/microorganisms14030605

Woodford, N. (2001). Epidemiology of the Genetic Elements Responsible for Acquired Glycopeptide Resistance in Enterococci. *Microbial Drug Resistance*, *7*(3), 229-236. https://doi.org/10.1089/10766290152652774

Yang, S., Ning, Y., Li, H., & Zhu, Y. (2024). Effects of Priestia aryabhattai on Phosphorus Fraction and Implications for Ecoremediating Cd-Contaminated Farmland with Plant–Microbe Technology. *Plants*, *13*(2), 268. https://doi.org/10.3390/plants13020268

Yin, Y., Butler, C., & Zhang, Q. (2021). Challenges in the application of NGS in the clinical laboratory. *Human Immunology, Next Generation Sequencing and its Application to Medical Laboratory Immunology*, *82*(11), 812-819. https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.03.011

Yossa, N., Bell, R., Tallent, S., Brown, E., Binet, R., & Hammack, T. (2022). Genomic characterization of Bacillus cereus sensu stricto 3A ES isolated from eye shadow cosmetic products. *BMC Microbiology*, *22*(1), 240. https://doi.org/10.1186/s12866-022-02652-5

Zhao, R., Feng, J., Yin, X., Liu, J., Fu, W., Berendonk, T. U., Zhang, T., Li, X., & Li, B. (2018). Antibiotic resistome in landfill leachate from different cities of China deciphered by metagenomic analysis. *Water Research*, *134*, 126-139. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.01.063

Zhao, R., Liu, J., Feng, J., Li, X., & Li, B. (2021). Microbial community composition and metabolic functions in landfill leachate from different landfills of China. *Science of The Total Environment*, *767*, 144861. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144861