



**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

*Bacterias resistentes a metales pesados, aisladas en aguas de los
manglares Chame, Panamá.*

POR:

Agustín Jiménez

Trabajo de Graduación presentado
como requisito para optar por el
título de Licenciatura en Biología
con orientación en Microbiología y
Parasitología.

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2021



TRIBUNAL EXAMINADOR

Título:

Bacterias resistentes a metales pesados, aisladas en aguas de los manglares Chame, Panamá.

Por:

Agustín Jiménez

Tesis presentada a consideración de la Escuela de Biología como requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Biología con Orientación en Microbiología y Parasitología.

Asesor: Dra. Dalila Montañez

Asesor: Mgter. Humberto Cornejo

Asesor: Mgter. Fermín Mejía

DEDICATORIA

Primeramente le dedico este trabajo a Dios por brindarme el conocimiento, los medios y recursos necesarios para la confección del mismo. Ya que por medio de él los hombre tienen los medios y recursos necesarios para que realicen sus propios designios albedrío.

A mis padres Mariana Riley y Benjamín Jiménez por darme la vida y su apoyo durante toda mi carrera universitaria, sin su esfuerzo y sacrificio el logro de esta carrera no hubiese sido posible.

A mis tías por haberme apoyado durante este largo trayecto, por sus ánimos y consejos que me brindaron en los momentos de adversidades.

A mis profesores por darme la motivación necesaria en los momentos de flaqueo, y brindarme todo el conocimiento necesario con los pocos recursos disponibles, apoyo y consejos necesarios en los momentos que más lo necesitaba.

A mis compañeros del laboratorio Toth Research & Lab, y a los compañeros de licenciatura por brindarme de su conocimiento y los recursos necesarios para el desarrollo de este arduo trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a Dios, por haberme permitido terminar con esta anhelada meta, al brindarme el conocimiento y las fuerzas necesarias para superar los obstáculos que me impedían culminar con este trabajo.

A su vez, le doy gracias a mis padres, quienes con mucho esfuerzo y sacrificio nos brindaron las herramientas necesarias para seguir adelante cada día y de esta manera llegar a la culminación de este trabajo, y de igual manera a mi novia Kivian Castillos que siempre estuvo motivándome a culminar este trabajo.

A mis profesores, Humberto Cornejo por todo el apoyo, paciencia y dedicación desde el principio hasta culminar este trabajo, a la profesora Dalila Montañez, por darme el privilegio de trabajar cerca de ella y aprender nuevas técnicas en el ámbito de la investigación, y al profesor Fermín mejía quien me facilitó nuevos métodos y recursos que facilitaron la culminación de este trabajo.

De manera muy grata quiero mencionar a la profesora Ariadna Betancourt y Rita Betancourt, a la profesora Margarita Cornejo, el profesor Percis Garces, el profesor Cesar Villarreal, y la profesora Nidia Ríos por todos sus consejos, palabras de aliento y lo más importante sus conocimientos y enseñanzas que me ayudaron para la culminación de este trabajo.

A mis tutores que de alguna manera muy especial me apoyaron al brindarme nueva información y consejos que me ayudaron durante el desarrollo de este trabajo en especial a los Lic. Jenifer Benites y Sean Romaña.

Agradezco de forma cordial a la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) por el apoyo financiero que fue utilizado para actividades de muestreo, insumos y reactivos necesarios que se utilizaron durante el proyecto.

Agradezco de forma muy especial al laboratorio Toth Research & Lab, quienes me apoyaron y brindaron sus instalaciones, reactivos y equipos necesarios para realizar la parte experimental de este trabajo.

Este trabajo ha sido posible gracias a los financiamientos de:

- Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT): ayuda en el financiamiento del grupo de investigación *''Caracterización de metales pesados en los manglares de Chame e identificación de microorganismos reductores''*
- TOTH RESEARCH & LAB, INC.: Desarrollo y financiamiento del proyecto, *''Caracterización de metales pesados en los manglares de Chame y prueba de susceptibilidad en bacterias aisladas en agua.''*

Muchas gracias a todos

Agustín Jiménez

Contenido

ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓN	vi
1.	1
1.1 Generalidades de los manglares	1
1.1.1 Los manglares como fuente de biodiversidad	2
1.1.2 Los manglares como reserva de carbono.	2
1.1.3 Los árboles de mangle bioacumulan metales pesados.	4
1.2 Contaminación en los manglares por metales pesados	9
1.3 Generalidades de los metales pesados.	10
1.4 Mecanismos de toxicidad de los metales pesados.	11
1.4.1 Generalidades del Plomo.	11
1.4.2 Toxicidad del plomo.	11
1.4.3 Toxicidad del Hierro y Cobre.	12
1.5 Mecanismos de resistencia bacteriana frente a Metales Pesados.	13
1.5.1 Alteración en la morfología celular.	13
1.5.2 Secuestro intracelular y extracelular de metales pesados en la célula bacteriana.	14
1.5.3 Desintoxicación enzimática, modificando el metal para hacerlo menos activo	20
1.5.4 Metilación de metales pesados.	21
1.5.5 Oxido-reducción del hierro Fe.	21

1.5.6	Biotransformación del plomo.	21
1.5.7	Precipitación del plomo por alteración del pH inducido por bacterias.	22
1.5.8	Exclusión del metal por exportación activa.	22
1.5.9	Regulación del cobre, por medio de proteínas periplásmicas o extracelulares.	25
1.5.10	Mecanismos de resistencia por Transferencia horizontal de genes.	26
1.6	Descripción de área de estudio.	29
1.6.1	Ubicación geográfica del distrito de Chame.	29
1.6.2	Zonas de vida y vegetación.	30
1.6.3	Hidrología.	30
1.6.4	Factores del clima.	30
1.6.5	Clima promedio en el distrito de Chame, Panamá.	30
1.6.6	30	
1.6.7	30	
1.6.8	31	
1.6.9	Actividades antropogénicas negativas, en los manglares del distrito de Chame.	32
2.	34	
3.	Materiales y métodos	35
3.1	Diseño experimental	35
3.1.1	Sitios de estudio y toma de la muestra	35
3.1.2	Toma de la muestra para análisis microbiológico.	36
3.1.3	Toma de la muestra para análisis de metales pesados	37
3.2	Procesamiento de las muestras	37
3.2.1	Análisis de metales pesados en las muestras de aguas.	37
3.2.2	Aislamiento y selección de las colonias resistentes a metales pesados.	37

3.2.3	Pruebas de susceptibilidad a metales pesados.	38
3.2.4	Caracterización de las cepas resistentes.	39
3.2.5	Análisis estadístico	41
4.	Resultados y Discusión	42
4.1	Resultados del análisis de metales pesados en las aguas del manglar.	42
4.2	Aislamiento y selección de las colonias resistentes a metales pesados.	45
4.3	Caracterización de la de cepas resistentes.	47
4.4	Tolerancia de los aislamientos, frente a los a los MP.	47
5.	Conclusión y recomendación	53
6.	55	
7.	Anexo	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Concentraciones de MP en las aguas de los manglares de Chame.	70
Cuadro 2. Límite de valores permisibles para MP en agua potable mg.L ⁻¹ .	70
Cuadro 3. Comparación en las concentraciones de MP (mg.L ⁻¹) en las agua de manglar reportados en diferentes regiones.	71
Cuadro 4. Colonias bacterianas aisladas por área en las aguas del manglar en Chame.	71
Cuadro 5. Valores de CMI, que presentaron los aislamientos para cada metal por área.	72
Cuadro 6. Rangos de CMI para las cepas de referencia	73
Cuadro 7. Características de resistencia a MP en las aguas de los manglares de Chame.	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las vías de transporte PSRG y su contribución a la mejora de la calidad del agua..	7
Figura 2. Interacciones planta-microbio..	9
Figura 3. Modelo del secuestro intracelular del cobre en el espacio periplasmático..	16
Figura 4. Ejemplos de sideróforos producidos por bacterias gramnegativas y bacterias grampositivas..	19
Figura 5. Mecanismos resistentes al plomo realizados por bacterias..	23
Figura 6. Expulsión del cobre facilitado por las proteínas MctB y CtpV..	24
Figura 7. Modelos de vías de homeostasis de Cu en patógenos bacterianos gramnegativos y negativos..	25
Figura 8. Ciclos de vida de fagos y tipos de transducción mediada por fagos. .	28
Figura 9. El porcentajes de humedad, por mes categorizado por el punto de rocío.	32
Figura 10. Ubicaciones de las áreas de estudio en Chame.	36
Figura 11. Colección y distribución de las muestras..	74
Figura 12. Procesamiento de las muestra para el análisis microbiológico.	74
Figura 13. Aislamiento de las colonias resistentes a MP, mediante la técnica de dilución en serie 1:10 en medio TSA..	75
Figura 14. Criopreservación y rotulación de las cepas aisladas. Las cepas de guardaron en tubos de ependorf estériles de 1.5 mL.	75
Figura 15. Ensayos de CMI, mediante la técnica de macrodilución en caldo LB..	76
Figura 16. Evaluación de la CMI, de la cepa <i>B. altitudinis/pumilus</i> en cloruro de hierro (III)..	76
Figura 17. Evaluación de la CMI mediante la técnica de microdilución placa con caldo LB y $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$..	77
Figura 18. Evaluación de la CMI mediante la técnica de microdilución placa con caldo LB y $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$.	78
Figura 19. CMI de la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538p mediante la técnica de microdilución placa con caldo LB y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.	78

Figura 20. Evaluación de la CMI mediante la técnica de microdilución placa con caldo LB y $Pb(C_2H_3O_2)_2$..	79
Figura 21. Montaje de la cepas resistente en la placa MALDI-TOF..	80
Figura 22. Crecimiento de la cepa <i>Bacillus altitudinis/pumilus</i> (A112-1) en agar sangre..	81
Figura 23. Crecimiento de <i>Bacillus altitudinis/pumilus</i> (A111-1) en placas de agar sangre..	81
Figura 24. Crecimiento de la cepa <i>Bacillus altitudinis/pumilus</i> (A114-1) agar sangre..	81
Figura 25. Crecimiento de <i>Serratia marcescens</i> (A43-1)..	81
Figura 26. Crecimiento de <i>Proteus mirabilis</i> (A18-1) en placas de agar sangre.	82
Figura 27. <i>Proteus mirabilis</i> (A11-5) resistente al hierro III..	82
Figura 28. Crecimiento de <i>Klebsiella aerogenes</i> (A110-1), en placas de agar sangre.	82

RESUMEN

En la actualidad, la contaminación por metales pesados en los manglares del distrito de Chame, provincia de Panamá Oeste se debe al aporte sinérgico causado por el vertedero ubicado en el manglar, las actividades industriales, agrícolas y domésticas que conducen a la liberación de compuestos orgánicos e inorgánicos tóxicos, para una amplia gama de organismos en el medio ambiente. Las bacterias expuestas a tales condiciones pueden desarrollar rápidamente adaptaciones fisiológicas y / o genéticas para resistir las restricciones ambientales, favoreciendo la evolución de fenotipos resistentes, algunos de los cuales pueden usar contaminantes como fuente exclusiva de carbono o como donantes y aceptores de electrones. En este estudio se aislaron bacterias resistentes a metales pesados (MP) como el Fe, Cu y Pb en las aguas intersticiales del manglar en Chame, y se les determinó la resistencia mediante la concentración mínima inhibitoria (CMI). Los resultados mostraron que el 8.8% de los aislados bacterianos presentaron resistencia principalmente a la Fe. Y observamos que el mayor porcentaje de cepas resistentes se encontraban en las zonas más cercanas al área del vertedero, el cual presentó una concentración de 3.37 (175.52) mg.L⁻¹ de Fe en sus aguas, esto se determinó mediante espectroscopia de absorción atómica. Este valor superó los límites establecidos por la OMS, la USEPA y los datos de lectura reportados en otros estudios. Para el caso de los aislamientos de *Klebsiella aerogenes* A110-1 y *Bacillus altitudinis/pumilus* A114-1 presentaron resistencia al hierro (III) y al cobre (II) en rangos de 1200-1400 mg.L⁻¹ y mientras que una variante de *Proteus mirabilis* A18-1 que resistió 2400 mg.L⁻¹ de Pb (II) el resto de los aislamientos como *Serratia marcescens* fueron resistentes al hierro (III). Estos resultados demuestran que el vertedero en el manglar de Chame, está provocando el aumento de las concentraciones de Hierro y cobre en el agua del manglar, y a su vez la selección de bacterias resistentes a estos metales, por motivo de las descargas de residuos domésticos y las actividades de extracción de carbón.

ABSTRACT

At present, heavy metal contamination in the mangroves of the Chame district, Panamá West province is due to the synergistic contribution caused by the landfill located in the mangrove swamp, industrial, agricultural and domestic activities that lead to the release of organic compounds and toxic inorganics, for a wide range of organisms in the environment. Bacteria exposed to such conditions can rapidly develop physiological and / or genetic adaptations to resist environmental constraints, favoring the evolution of resistant phenotypes, some of which may use pollutants as exclusive carbon sources or as electron donors and acceptors. In this study, bacteria resistant to heavy metals (HM) such as Fe, Cu and Pb were isolated in the interstitial waters of the mangrove swamp in Chame, and their resistance was determined by means of the minimum inhibitory concentration (MIC). The results showed that 8.8% of the bacterial isolates presented resistance to mainly Fe. And we observed that the highest percentage of resistant strains were found in the areas closest to the landfill area, which presented a concentration of 3.37 (175.52) mg .L⁻¹ of Fe in its waters, this was determined by atomic absorption spectroscopy. This value exceeded the limits established by WHO, USEPA and the reading data reported in other studies. In the case of the isolates of *Klebsiella aerogenes* A110-1 and *Bacillus altitudinis / pumilus* A114-1 they presented resistance to iron (III) and copper (II) in ranges of 1200-1400 mg.L⁻¹ and while a variant of *Proteus mirabilis* A18-1 that resisted 2400 mg.L⁻¹ of Pb (II), the rest of the isolates such as *Serratia marcescens* were resistant to iron (III). These results show that the landfill in the Chame mangrove is causing an increase in the concentrations of iron and copper in the mangrove water, and in turn the selection of bacteria resistant to these metals, due to the discharges of domestic waste and coal mining activities.

INTRODUCCIÓN

Los bosques de manglares constituyen un conjunto de árboles, arbustos leñosos y algunos helechos tropicales y subtropicales que toleran altos niveles de salinidad, que oscilan entre 0 a ~ 50 Unidades de Salinidad Práctica (USP), lo que les permite crecer en la interfaz de los sistemas marinos y terrestres (Moity, Delgado, y Salinas-de-leo, 2019), estos se encuentran ubicados en las zonas intermareales de las regiones tropicales y subtropicales, siendo los ecosistemas costeros de importancia ecológica y económica (Minu *et al.*, 2018). Los hábitats de manglares se caracterizan por tener sedimentos finos, en alto contenido orgánico y periodos periódicamente inundados, que promueven una alta salinidad y bajas concentraciones de oxígeno, así como una biodiversidad microbiana compleja y activa (Bastakoti, Robertson, y Alfaro, 2018). Además, los manglares son también una fuente de nuevas enzimas y pequeñas moléculas tales como LipA-como de lipasa, aspergilumamide-A de péptidos, pirrolizidina alcaloides penibругuieramine-A, GH44 de endoglucanasa de la familia, pullularins E, F péptidos y endo- β -1, 4-glucanasa Cel5A tolerante a la sal y sirven como un fitoestabilizador potencial para absorber contaminantes como los metales pesados en áreas industriales (Imchen *et al.*, 2018).

los metales pesados, son un grupo de metales con una densidad mayor 5 g / cm^3 , los cuales representan una preocupación creciente en los manglares de nuestro país (Defew *et al.*, 2005), ya que el tratamiento inadecuado del agua y de las aguas residuales (de Lima e Silva *et al.*, 2012), junto con el ingreso de residuos domiciliarios, en el vertedero de Chame (Arosemena, Galvis, y González, 2015), Representan una preocupación, ya que pueden aportar metales pesados (MP) capaces de acumularse en la cadena alimenticia (Deng y Wang, 2012), y a su vez ejercer presión selectiva sobre el crecimiento de las bacterias, dando lugar a la adquisición de especies microbianas altamente resistentes a MP (Wang *et al.*, 2017).

El área del vertedero en Chame, cuenta con una superficie de 2.5 ha aproximadamente, el cual se estima que ingresa por año 35 toneladas de residuos domiciliarios al día (Arosemena *et al.*, 2015). Esto ocurre ya que a menudo los manglares son considerado como tierras baldías, y debido a esta actitud muchos manglares son utilizado como sitios para arrojar

basuras, aguas residuales y como vertederos ilegales, provocando la transferencia de metales desde el sitio de contaminación hasta los sedimentos de manglar (Clark, 1998).

Los MP como antibacterianos, seleccionan genotipos que albergan genes de resistencia, lo que facilita la proliferación y evolución de fenotipos resistencia a metales y a otros antimicrobianos (Chenia y Jacobs, 2017). A su vez, las bacterias responden a los diferentes antimicrobianos, presentes en los residuos que llegan al vertedero induciendo la expresión de bombas de flujo de membrana específicas, esta respuesta es llevada a cabo por bacterias capaces de soportar altas concentraciones de solventes orgánicos como benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX). Los BTEX se excretan de las membranas por las bombas de proteínas impulsadas por energía que pertenecen a la familia de proteínas de membrana de nodulación de raíz, las cuales son conocidas en otras bacterias para transportar MP, contribuyendo con su resistencia (Atashgahi *et al.*, 2018).

Sin embargo, no todas las bacterias resistentes a MP, son bioindicadoras de contaminación en los sitios en donde las aíslan, debido a que los MP, biocidas, antibióticos, hidrocarburos y compuestos clorados tienen la capacidad de coseleccionar bacterias resistentes a MP, esto ocurre si los contaminantes comparten un mecanismo de resistencia común, o si la bacteria lleva genes de resistencia para ambos tipos de compuestos (Pal, *et al.*, 2015; Atashgahi *et al.*, 2018)

Otros problemas que podrían estar causando el aumento, en la concentración de los MP en el manglar de Chame, podría ser la tala de *Avicennia germinans* y *Rhizophora mangle*, para la extracción madera, leña, producción de carbón y extracción de tanino (Berdiales y Chavarría, 2009). Estas actividades promueve el aumento de MP, ya que la poca abundancia de estos árboles, en especial *Rhizophora mangle* disminuye los metales presentes en el agua, al bioacumularlos en sus órganos (Analuddin *et al.*, 2017). Dado que la contaminación en las áreas cercanas al vertedero, están aumentando conforme el tiempo (Berdiales y Chavarría, 2009) la abundante y amplia biodiversidad bacteriana, presentes en el manglar (Madangchanok Imchen, Ranjith Kumavath, Debmalya Barh, Aline Vaz, Aristóteles Góes-Neto, Sandeep Tiwari, Preetam Ghosh, 2018) podrían estar expuestas la selección de bacterias resistentes a MP por causa de las altas concentraciones (Zampieri *et al.*, 2016).

Con este trabajo podremos comprobar si las descargas de residuos domiciliarios que se depositan en el vertedero, del manglar en Chame están contribuyendo a la resistencia de MP como el hierro, cobre y plomo en las bacterias que están presentes en el manglar; a su vez esta investigación aportaría nuevos datos sobre la influencia de las descargas de residuos en el vertedero y su aporte en la concentración de los MP presentes en las aguas intersticiales del manglar y a su papel en la resistencia de las bacterias frente a estos contaminantes; de acuerdo a los resultados se podría implementar o aplicar las reglamentaciones encargadas de regular la tala de *Rhizophora mangle* y *Avicennia germinans* y la deposición de residuos domiciliarios en el manglar.

1. Revisión Bibliográfica

1.1 Generalidades de los manglares

Los manglares constituyen un conjunto de árboles y arbustos leñosos tropicales y subtropicales que toleran altos niveles de salinidad (de 0 a ~ 50 unidades prácticas de salinidad, UPS). Lo que les permite crecer en la interfaz de los sistemas marinos y terrestres (Moity *et al.*, 2019). Por lo que están expuestos al agua dulce y oceánica, experimentando una amplia variación de salinidad a lo largo de los ciclos de las mareas (Madangchanok Imchen, Ranjith Kumavath, Debmalya Barh, Aline Vaz, Aristóteles Góes-Neto, Sandeep Tiwari, Preetam Ghosh, 2018). Aunque los manglares ocupan solo el 0.5% del área del océano costero global y representan solo el 0.7% de los bosques tropicales del mundo (Almahasheer *et al.*, 2017).

Estos ecosistemas cumplen una variedad de funciones ecológicas y económicas importantes, incluida la protección de las costas del daño de la tormenta y la erosión, la degradación de los contaminantes ambientales y la provisión de hábitats de vivero para numerosos organismos acuáticos (Liu *et al.*, 2019). son un rico reservorio de diversidad microbiana y actúan como una zona de amortiguamiento entre la tierra y el mar, además son una fuente de nuevas enzimas y pequeñas biomoléculas como la lipasa, similar a LipA, el péptido de aspergilumamida-A, el alcaloide de pirrolizidina penibruguieramina-A, la endoglucanasa de la familia GH44, los péptidos pullularinas E, F y endo- β -1, 4-glucanasa tolerantes a la sal Cel5A, también sirven como un potencial fitoestabilizador para absorber contaminantes de metales pesados en áreas industriales (Madangchanok *et al.*, 2018). Los manglares también juegan un papel clave en la sostenibilidad humana y en los medios de vida, ya que se usan obtener alimentos, medicinas y ofrecer protección contra eventos catastróficos, como tsunamis, ciclones tropicales y mareas y pueden amortiguar la erosión de la costa (Carugati *et al.*, 2018).

1.1.1 Los manglares como fuente de biodiversidad

Los bosques de manglar, proporcionan alimentos, zonas de reproducción y criaderos para una variedad de organismos terrestres y marinos, incluidas muchas especies comerciales y peces juveniles de arrecife (M. Liu *et al.*, 2019), los manglares también proporcionan un entorno óptimo para las comunidades microbianas, que a su vez, ayudan en el reciclaje de nutrientes, mediante bacterias reductoras de sulfato y arqueas metanogénicas (Madangchanok *et al.*, 2018). Las bacterias y los hongos constituyen el 91% de la biomasa microbiana en los ecosistemas de manglar, y además son responsables de la mayor parte del flujo de carbono en los sedimentos ya que procesan la mayor parte del flujo de energía y nutrientes, actuando como un sumidero de carbono (Ghosh *et al.*, 2010), las bacterias como responsable de las principales transformaciones de nutrientes dentro de un ecosistema de manglar, (Ghosh *et al.*, 2010). Presentan una amplia variedad metabólica, lo que ha hecho posible aislar a *Microbulbifer* sp. un halófilo presente en muestras de sedimento del estuario tomada del bosque en el manglar de Matang, Malasia. Este género *Microbulbifer* fue propuesto por González, con la descripción de *Microbulbifer hydrolyticus* que se aisló del efluente de la planta de celulosa marina. Estas bacterias se encuentran típicamente en ambientes de alta salinidad, como los sedimentos marinos, marismas, suelos costeros, y manglares. También son conocidos por su capacidad para degradar una gran variedad de polisacáridos, incluida la celulosa, xilano, quitina, agar y alginato, estas cepas de *microbulbifer* son fuentes potenciales de enzimas activas de carbohidratos con interés biotecnológico (Moh *et al.*, 2017).

1.1.2 Los manglares como reserva de carbono.

Las concentraciones de gases de carbono atmosféricos (principalmente CO₂ y CH₄) han aumentado drásticamente desde la era industrial, desempeñando un papel fundamental en el cambio climático global desde la era industrial. La concentración atmosférica de CO₂ había aumentado de 280 ppm a 403.3 ppm en 2016 con una tasa de crecimiento anual de 2.21 ppm. Para 2016, la concentración atmosférica de CH₄ había alcanzado 1853 ppb, que es el 257% del nivel preindustrial, aunque la quema de combustibles fósiles, la industria del cemento y otros cambios en el uso del suelo enriquecen en gran medida el CO₂ atmosférico, pequeños

cambios de CO₂, la emisión del suelo natural a largo plazo también puede alterar fuertemente la concentración atmosférica de CO₂ para el CH₄, la emisión de los ecosistemas naturales representa el 30-40% del total de las emisiones de CH₄ por lo tanto, muchos estudios han crecido en torno al tema de la emisión de gases de efecto invernadero desde los ecosistemas naturales (Gao *et al.*, 2018).

Los manglares son ecosistemas altamente productivos con tasas de producción primaria iguales a las de los bosques húmedos tropicales de hoja perenne, ya que acumulan carbono en su biomasa, y la mayor parte de este carbono se exporta a los ecosistemas adyacentes o se pierde por descomposición (Carugati *et al.*, 2018), que a su vez está limitada por las inundaciones en estos ecosistemas, por lo tanto con frecuencia esta anóxica en los suelos del manglar, limitan la descomposición del CO en los suelos, por lo que el almacenamiento es de larga duración, ayudando a que los humedales costeros, sirvan como almacenamiento de carbono globalmente significativo (Chen *et al.*, 2017). Debido a que los humedales cuentan con un área de vegetación costera de <2% del océano y uno o dos órdenes de magnitud más pequeños que los bosques terrestres, estos humedales son ecológicamente importantes en el ciclo global del carbono y el secuestro, por lo que las tasas de entierro de carbono orgánico en los humedales costeros marinos pueden contribuir ~ 50% de eso en los océanos mundiales. las síntesis globales recientes estimaron la tasa de enterramiento de carbono en 174 g C m⁻² y⁻¹ en los manglares y 160–186 g C m⁻² años⁻¹ en el prado de algas marinas (Chen *et al.*, 2017).

El intenso secuestro de carbono orgánico (C_{org}) por los manglares se debe principalmente a su alta producción neta en los ecosistemas, lo que resulta en altas cargas de hojarasca y biomasa en el suelo, combinado con su alta capacidad para atrapar y retener el suelo, lo que resulta en una acumulación vertical en comparación con otros bosques y zonas costeras desprovistas de vegetación. La alta conservación de C_{org} debido a la baja disponibilidad de oxígeno combinada con la falta de incendios en el ambiente acuático donde los manglares prosperan, proporciona un alto almacenamiento de carbono en los manglares (Almahasheer *et al.*, 2017).

Los manglares son ecosistemas altamente productivos con tasas de producción primaria iguales a las de los bosques húmedos tropicales de hoja perenne, ya que acumulan carbono

en su biomasa, la cual se exporta a los ecosistemas adyacentes o la mayor parte de este carbono se pierde por descomposición (Carugati *et al.*, 2018), que muchas veces está limitada por las inundaciones en estos ecosistemas, con una frecuencia anóxica en los suelos de humedales, que impiden la descomposición del C_{org} en los suelos, por lo que el almacenamiento es de larga duración, ayudando a que los humedales costeros, sirvan como almacenamiento de carbono globalmente significativo (Chen *et al.*, 2017).

En los manglares, una gran proporción de la biomasa de algas y hojas es procesada por cangrejos buscadores, importantes ingenieros clave en muchos bosques además, tanto en los sedimentos como en las aguas de las mareas, la materia orgánica y el flujo de energía se canalizan a través de un circuito microbiano altamente diverso y de crecimiento activo y posteriormente se transfieren a niveles tróficos más altos a través de alimentadores detritívoros, bacterívoros y depósitos que habitan los bentos, por lo tanto, una pérdida de biodiversidad en la biodiversidad bentónica marina, cualquiera que sea el filo considerado, podría causar una reducción variable de las funciones del ecosistema (Carugati *et al.*, 2018).

También la deforestación de los manglares conduce a la pérdida de su capacidad de sumidero de carbono, así como a las emisiones de gases de efecto invernadero por la remineralización de las grandes reservas de C_{org} que los manglares acumulan. debido a la deforestación del manglar provocando que las emisiones anuales de CO_2 oscilan entre 0.02 a 0.12 Pg de C, lo que contribuye a las emisiones de CO_2 siendo esta la segunda mayor fuente antropogénica de CO_2 en la atmósfera después de la combustión de combustibles fósiles (Almahasheer *et al.*, 2017).

1.1.3 Los árboles de mangle bioacumulan metales pesados.

los acumuladores de metales pesados son el grupo de plantas, que muestra la mayor concentración de metales pesados en las partes aéreas en lugar de las raíces sin desarrollar enfermedades al huésped, sin embargo algunas de estas plantas se consideran hiperacumuladores ya que tienen una concentración de metal de 50 a 500 veces mayor que la normal, por lo que se ha propuesto una razón para el papel de la hiperacumulación de metales pesados, que incluye la protección contra los depredadores y la resistencia a la sequías (Ganeshkumar *et al.*, 2019).

Estas plantas de manglares son muy eficientes en la bioacumulación de MP, por su capacidad para atrapar e inmovilizar metales en el suelo. Estos árboles de manglar generalmente los absorben del suelo agua y metales pesados junto con los nutrientes, (Por ejem., Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Al, Rb, Ti y Zn) que no son tóxicos y desempeñan un papel como micronutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas hasta que excedan un cierto límites otros no son esenciales y a menudo son tóxicos para el crecimiento de las plantas (por ejem., Cd, Pb, U, Cr, Ag, Hg y Zr), mientras que As y Se son metaloides pero también son tóxicos (Almahasheer *et al.*, 2018).

Sin embargo, la translocación de metales desde el suelo a los órganos como las hojas en los árboles de mangle, puede resultar en la movilización de metales pesados almacenados en el suelo durante la senescencia de detritos, aunque esto conducirá a una reducción de metales pesados en los suelos, la eliminación de por ejemplo, las hojas de mangle podría transferir metales de las capas profundas del suelo a la superficie del suelo y a otras partes del ecosistema, de modo que en lugar de secuestrar metales, los manglares podrían remover contaminantes dentro del ecosistema (Almahasheer *et al.*, 2018).

Se ha demostrado que los hábitats de manglares, particularmente de *Rhizophora sp.*, depositan Cu en sus órganos como hojas, tallos y raíces. Esto se debe a que estas plantas que pueden crecer en áreas contaminadas desarrollan mecanismos defensivos eficientes para prevenir los efectos de toxicidad, mediante la absorción del Cu que permanece secuestrado en la pared celular (Torasa *et al.*, 2019).

1.1.3.1 La biotransformación de metales pesados en manglares.

La biotransformación de metales pesados en los manglares contribuye con la disminución de estos contaminantes entre la tierra y el mar, lo que evita su biomagnificación por medio de sus ciclos biogeoquímicos (Li, Chai, y Qiu, 2016). Esto ocurre cuando el manglar modifica el pH del suelo (Tiquia-Arashiro, 2018), cambia el potencial redox u ocurre un aumento el contenido orgánico o la salinidad, que posteriormente reduce la exposición de metales al entorno acuático adyacente. Sin embargo, es probable que los metales se liberen y se transporten de los sedimentos al agua cuando cambian las propiedades fisicoquímicas del

suelo, lo que puede cambiar su especiación química y causar posibles impactos ecológicos y problemas de salud humana (Li *et al.*, 2016).

1.1.3.2 Los manglares como agentes reductores de metales pesados.

Los manglares podrían regular las características de los sedimentos, incluida la acidez, el potencial redox, la salinidad y el contenido de materia orgánica, lo que facilita la acumulación de metales pesados en los sedimentos y, posteriormente, reduce la exposición a metales pesados en los océanos adyacentes, sin embargo, la importancia relativa de estos mecanismos para la estabilización y acumulación de metales pesados en los humedales de manglar no está bien explorada (Wang *et al.*, 2019).

Estudios han demostrado que los hongos micorrícicos arbusculares producen una glucoproteína recalcitrante, proteína del suelo relacionada con la glomalina (PSRG), que se deposita en suelos y sedimentos después de la senescencia de hifas y esporas, esta glucoproteína se encuentran en mayores concentraciones en los humedales de manglar, en comparación con los ecosistemas terrestres, además PSRG es una proteína similar al pegamento e insoluble en agua y une la materia orgánica y las partículas de arcilla para formar agregados estables al agua, por lo tanto PSRG podría usarse como un nuevo biofloculante o agente aglutinante de agregados en suelos y sedimentos, lo que implica que PSRG puede ser un aglutinante de metales proteína en humedales de manglar (Wang *et al.*, 2019).

Siendo la PSRG una proteína del suelo recalcitrante, pegajosa e hidrófoba se une y secuestran grandes cantidades de metales pesados y, por lo tanto, puede ayudar a remediar los suelos contaminados en los ecosistemas terrestres. Se ha demostrado que la proteína PSRG unidas a los metales asociados pueden transportarse con erosión de sedimentos a las cuencas urbanas / costeras como se muestra en la figura 1. el secuestro de metales pesados en los perfiles de sedimento de manglar se debe a que estos puede transportarse con sólidos en suspensión, lo que representa una desventaja ya que la carga de sólidos suspendidos y su contenido de metal afectaran significativamente el equilibrio entre las entradas y salidas de metales en las zonas de estuarios, sin embargo, no hay evidencia directa sobre el mecanismo intrínseco de los sólidos en suspensión que adsorben metales pesados y

cómo la interconexión entre los sólidos en suspensión y los sedimentos contribuye a la restauración de la calidad del agua en los humedales de manglar (Wang *et al.*, 2019).

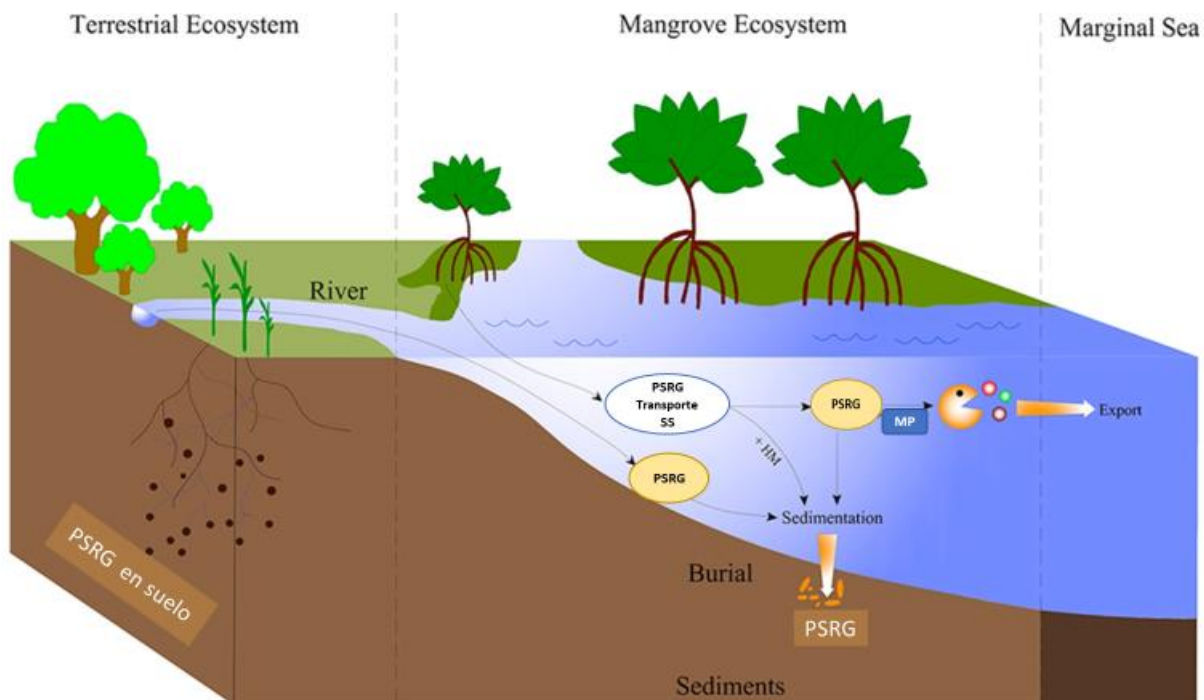


Figura 1. Las vías de transporte PSRG y su contribución a la mejora de la calidad del agua. Con la senescencia de hifas y esporas, se produce PSRG, parte del cual está permanentemente enterrado en el suelo y los sedimentos, y otra parte se transfiere junto con ríos, aguas subterráneas a nuevos ecosistemas, que podrían ser acuáticos y marinos mejorando la calidad del agua a través de dos vías interconectadas: 1) adsorber y depositar metales pesados durante el transporte; 2) secuestrar y enterrar permanentemente metales pesados en sedimentos. Abreviaturas: PSRG, proteína del suelo relacionada con la glomalina; SS, sólidos en suspensión; MP, metales pesados tomado de (Wang *et al.*, 2019).

1.1.3.3 Fitorremediación facilitada por bacterias productoras de sideróforos.

La fitorremediación, una tecnología emergente y ecológicamente benigna para la descontaminación de suelos se define como el proceso de utilización de plantas para absorber, acumular y desintoxicar contaminantes en el agua y suelo a través de procesos físicos, químicos y biológicos. Aunque esta tecnología es rentable en comparación con las

tecnologías fisicoquímicas, que generalmente consume mucho tiempo (Rajkumar, Ae, Prasad, y Freitas, 2010).

El éxito de la fitorremediación está fuertemente determinado por la cantidad de biomasa vegetal presente y la concentración de metales pesados en los tejidos vegetales. Se descubrió que algunas especies de plantas, los llamadas hiperacumuladores (por ejemplo, *Thlaspi goesingense*, *Alyssum bertolonii* y *Alyssum murale*), que crecen naturalmente en sitios contaminados con metales pesados, tienen la capacidad de acumular concentraciones inusualmente altas de metales pesados sin ningún impacto en su crecimiento o desarrollo (Rajkumar *et al.*, 2010) y *Avicennia marina* se puede considerar como una planta de alta eficiencia para la bioacumulación de metales pesados en ecosistemas de manglares (Usman, Alkredaa, y Al-Wabel, 2013).

Los niveles elevados de metales son tóxicos para la mayoría de las plantas, aparte de los hiperacumuladores que conducen a un metabolismo deteriorado y a un crecimiento reducido de la planta, el potencial de fitoextracción de metales está altamente restringido y requiere el desarrollo de otras estrategias de fitorremediación para suelos contaminados con metales pesados. Se considera que la interfaz entre los microbios y las raíces de las plantas (rizosfera) influye en gran medida en el crecimiento y la supervivencia de las plantas ver Figura 2. Por lo tanto, se han investigado métodos alternativos de fitorremediación que explotan las bacterias de la rizosfera para reducir la toxicidad de los metales en las plantas. Sin embargo el descubrimiento de bacterias de la rizosfera que son resistentes a metales pesados y capaces de promover el crecimiento de las plantas ha elevado las esperanzas de estrategias ecológicamente amigables y rentables para la recuperación de suelos contaminados con metales pesados (Rajkumar *et al.*, 2010).

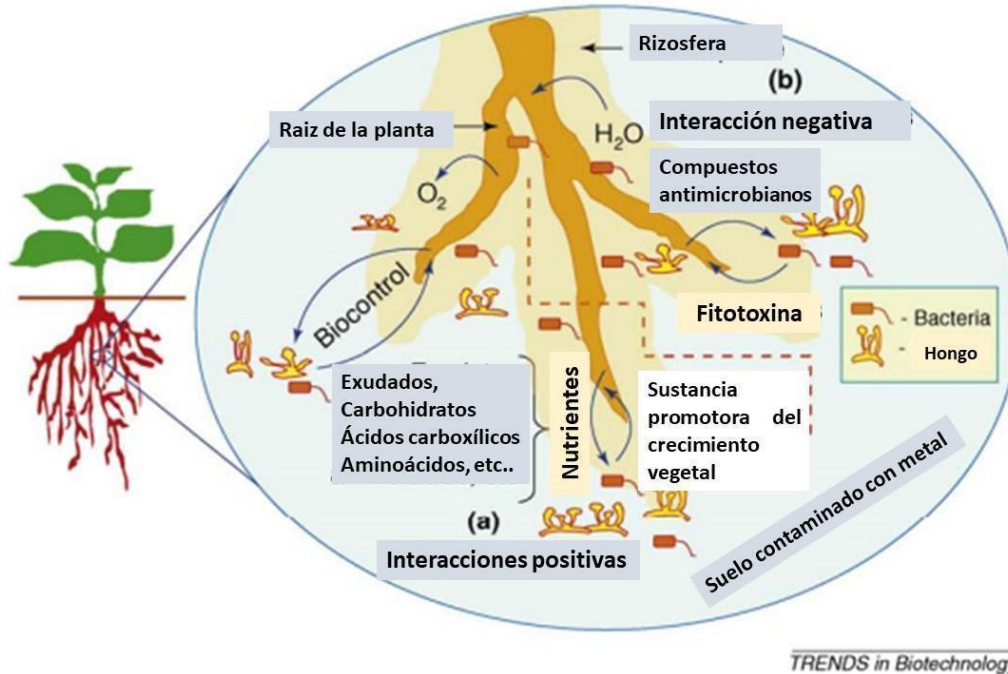


Figura 2. Interacciones planta-microbio. La interacción entre plantas y microbios en la rizosfera se puede clasificar como interacciones positivas o negativas. (a) Interacciones positivas. Durante el crecimiento de las plantas, las raíces liberan activa o pasivamente una gama de compuestos orgánicos. (b) Interacciones negativas. Los microbios de la rizosfera también pueden tener efectos perjudiciales sobre la salud y la supervivencia de las plantas al aumentar el riesgo de infección con patógenos o parásitos de las plantas tomado de (Rajkumar *et al.*, 2010).

La explotación de bacterias productoras de sideróforos (BPS) resistentes a metales, que están presentes en la rizosfera, son de gran importancia ya que proporcionan nutrientes, particularmente el hierro, a las plantas, lo que podría reducir los efectos nocivos de la contaminación por metales, además, los sideróforos producidos por estas bacterias rizosféricas se unen a iones de metales pesados y aumentan su biodisponibilidad en la rizosfera de las plantas, mejorando los procesos de fitoextracción en el agua y suelos contaminados (Rajkumar *et al.*, 2010).

1.2 Contaminación en los manglares por metales pesados

Los contaminantes por metales pesados han llamado la atención cada vez más desde las últimas décadas debido a su persistencia y biotoxicidad en el medio ambiente, ya sea en el agua o en el suelo, la mayor parte estos contaminantes se liberan en el ambiente a través de efluentes de aguas residuales industriales sin tratar o con un tratamiento insuficiente,

emisiones de vehículos, minería y la combustión de carbón (Li, Chai, y Qiu, 2016). Estos contaminantes llegan a los sedimentos en los ecosistemas de manglar, siendo el sumidero primario de contaminantes de fuentes terrestres, cuando estos llegan a los manglares se inmovilizan en el sedimentos debido a su carácter anaeróbico combinado con su enriquecimiento en sulfuros y materia orgánica (Kaewtubtim *et al.*, 2017).

1.3 Generalidades de los metales pesados.

Los manglares son sitios de acumulación de metales pesados (MP), debido a actividades antropogénicas como la agricultura escorrentía, descargas de aguas residuales domésticas e industriales, puertos, actividades y minería (Torasa *et al.*, 2019). Los metales pesados son un grupo de elementos con una densidad específica de más de 5 g / cm^3 . Estos elementos no solo son resistentes a la descomposición en condiciones naturales, sino que también pueden bioacumularse y biomagnificarse en las cadenas alimentarias (Rzymiski *et al.*, 2015). o migrar al agua y a la atmósfera, amenazando así la salud y la reproducción de humanos y animales. Por lo tanto, el tratamiento de la contaminación por metales pesados en los sedimentos y suelos de los ríos se ha convertido en un tema de investigación candente y desafiante (Wei *et al.*, 2019).

La recuperación de los ecosistemas contaminados con metales pesados está ganando un impulso considerable y es una tarea difícil porque los metales no pueden degradarse y los peligros que plantean se ven agravados por su persistencia en el medio ambiente, y las tecnologías de limpieza convencionales son generalmente demasiado costosas para ser utilizadas para restaurar sitios contaminados con metales pesados, y además a menudo afectan negativamente las propiedades importantes de los suelos o lechos del manglar, como su textura y materia orgánica (Rajkumar *et al.*, 2010).

También se acepta que, algunos de estos metales son esenciales para los organismos vivos en pequeñas cantidades, pero tóxicos en concentraciones más altas o en otras formas de especiación, por ejemplo. El cobre (Cu), el cromo (Cr), el manganeso (Mn) y el zinc (Zn), y el hierro (Fe), que son necesarios para los procesos celulares normales tanto en procariontes como en eucariotes, y por lo tanto, existen mecanismos para regular su absorción celular y acumulación mientras, que otros no tienen ningún valor nutritivo conocido por lo que no desempeñan un papel metabólico específico y generalmente se clasifican como tóxicos

obligatorios, p. ej. cadmio (Cd), mercurio (Hg) y plomo (**Pb**). El arsénico (As), aunque se clasifica químicamente como metaloide, también se incluye a menudo en el grupo de metales pesados (Bridges y Zalups, 2005 ; Rzymiski *et al.*, 2015).

El cobre, y el plomo son unas las principales especies de metales pesados en la industria de aguas residuales, ya que en concentraciones relativamente modestas de Pb (II) tienen efectos tóxicos en el medio ambiente y los seres humanos. El Cu (II) también es un potencial tóxico en dosis altas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los límites máximos de concentración de Cu (II), y Pb (II) (<0.017 mg. L⁻¹ para Cu (II), y <0.065 mg. L⁻¹ para Pb) se han establecido para el agua de riego (Zhao *et al.*, 2019).

1.4 Mecanismos de toxicidad de los metales pesados.

1.4.1 Generalidades del Plomo.

El plomo (Pb) es un metal gris azulado que se produce naturalmente en la corteza terrestre. Puede existir como una sal de Pb o como Pb metálico. Los humanos continúan expuestos a Pb a través de muchos medios diferentes. Durante los años en que la gasolina con plomo era la principal fuente de combustible para automóviles, se agregan grandes cantidades de Pb al medio ambiente, especialmente cerca de las principales autopistas y vías públicas. Además, hasta 1978, gran parte de la pintura utilizada en los hogares contenía hasta un 40% de Pb (Bridges y Zalups, 2005).

1.4.2 Toxicidad del plomo.

El plomo ingresa a las células a través de los transportadores de Fe²⁺ y Ca²⁺ y luego ejerce su toxicidad al desplazar estos cationes en sus sitios de unión en las metaloproteínas. Un ejemplo de esto podría ser el transportador de Fe(II), DMT1. Probablemente el Pb(II) ingrese a la célula mediante un mecanismo de “imitación iónica”. El Pb(II) también podría ingresar en las células mediante canales de Ca(II) de la membrana o mediante bombas Ca(II)-ATPasa. Se cree que la “imitación iónica” ocurre debido a que el Pb(II) y el Ca(II) poseen radios iónicos de tamaños similares (1,19 Å y 1,00 Å, respectivamente). Además, el Pb(II) podría sustituir al Ca(II) como ligando de la Ca(II)-ATPasa (Bridges y Zalups, 2005).

El mecanismo principal mediante el cual el Pb genera su toxicidad es a través de su interacción con proteínas. Varios factores influyen esta interacción. El Pb interactúa con

grupos funcionales de enzimas, con proteínas de unión a metales y metalotioneínas (proteínas ricas en cisteínas, capaces de unirse a metales pesados (MP) a través de sus grupos tiol). Una vez dentro de la célula el Pb(II) es capaz de actuar uniéndose a los sitios de unión del Ca(II), bloqueando e inhibiendo su función normal. Se ha demostrado en eucariotas que el Pb(II) sustituye al Ca(II) en el sitio de la calmodulina (proteína reguladora de muchas enzimas, con un papel muy importante en la glucólisis), y también puede afectar la activación de la proteína quinasa C [regulada normalmente por Ca(II) e implicada en la división celular, comunicación célula-célula y reorganización del citoesqueleto]. La unión del Pb(II) a la proteína quinasa C puede generar que se active durante más tiempo del requerido, resultando en efectos nocivos para la célula (Sueiro, 2012)

1.4.3 Toxicidad del Hierro y Cobre.

El hierro es un nutriente esencial para la mayoría de los organismos, ya que es un metal de transición de primera fila y está involucrado en múltiples fenómenos biológicos esenciales para la vida que incluyen transporte y respiración de oxígeno, transferencia de electrones, síntesis y reparación de ADN y metabolismo primario (Zheng y Nolan, 2012), mientras que el cobre es un metal de transición esencial para la actividad de una amplia variedad de enzimas como la citocromo c oxidasa, Cu, Zn superóxido dismutasa y ferroxidasas multicobre (Puig, Rees, y Thiele, 2002).

Todos los componentes celulares son susceptibles al daño inducido por metales pesados por ejemplo, el hierro (Fe) y el cobre (Cu), pueden causar la destrucción de la membrana al catalizar la degradación oxidativa de lípidos, dando lugar a la formación de radicales libre y también en el citoplasma estos metales pueden catalizar la formación de radicales libres, altamente tóxicos para la célula (Rouch, Lee, y Morby, 1995), como en el caso del hierro que es inherentemente tóxico debido a su propensión a alternar entre los estados de oxidación Fe^{3+} / Fe^{2+} y generar radicales perjudiciales a través de la química de Fenton (Zheng y Nolan, 2012).

Las formas iónicas de los metales pesados pueden aumentar o disminuir la actividad y alterar la especificidad enzimática, así como inducir cambios conformacionales y formar enlaces estables con sitios activos de la enzima, entre otros efectos. Los iones metálicos también pueden producir daños en el ADN, al producir entrecruzamientos de las hebras de esta

molécula Intercalación iónica por grupos ATP, afectando así directamente la información contenida a nivel del mismo y disminuyendo la fidelidad de la síntesis de dicha molécula (Rouch *et al.*, 1995).

1.5 Mecanismos de resistencia bacteriana frente a Metales Pesados.

La evolución de la resistencia del metal en bacterias, es un modelo de selección ya que una célula adquiere resistencia al metal al impedir el acceso este en componentes celulares sensibles o alterarlos para reducir su sensibilidad. Por el momento se proponen seis mecanismos de resistencia hacia metales pesados por bacterias: la exclusión del metal por una barrera de permeabilidad, exclusión por exportación activa de metal de la célula, el secuestro físico intracelular del metal mediante proteínas de unión para evitar que dañe los materiales celulares sensibles a metales, secuestro extracelular y la desintoxicación cuando el metal se modifica químicamente para hacerlo menos activo (Rouch *et al.*, 1995).

La resistencia a los metales puede transferirse entre organismos a través de conjugación o transducción, la cual en algunos casos puede estar ligada con la resistencia a antibióticos. La resistencia a ciertos metales y antibióticos está mediada por el mismo plásmido, debido a las actividades humanas que han permitido el desarrollo de la resistencia a los antibióticos, han creado un entorno de alta selección para los metales (Bruins, Kapil, y Oehme, 2000).

1.5.1 Alteración en la morfología celular.

Para contrarrestar la exposición frecuente a metales pesados tóxicos y compuestos orgánicos, las bacterias también exhiben alteraciones significativas en la morfología celular, ya que es una estrategia que adoptan las bacterias para hacer frente al estrés ambiental. Como *Acidiphilium symbioticum* H8 al estar expuesta a concentraciones subinhibitorias de Cu y Cd las células normales de tipo cocobacilo sueltas formaron cadenas características de forma lenticular cocoidal, con constricciones en las uniones entre ellas en presencia de Cd, mientras que Cu indujo su transformación en células redondas. También cuando se expuso *P. putida* expuesta a cadmio mostró una extensa formación de ampollas en la membrana externa junto con gránulos de polifosfato que contenían Cd^{2+} , que se reveló por microscopía electrónica. Se encontraron células de cultivos en fase exponencial de *P. putida* adaptada al cadmio en grupos y eran mucho más pequeñas que las células de control cultivadas sin cadmio y también

contenían agregados densos en electrones. El análisis por microscopía de fuerza atómica (AFM) de la sonda de escaneo indicó que la exposición de *Pseudomonas sp.* G1DM21 a 1 mM Cr (VI) durante 24 h, conduce a un aumento en la longitud y altura de la celda (Naik y Dubey, 2013)

1.5.2 Secuestro intracelular y extracelular de metales pesados en la célula bacteriana.

La acumulación y compartimentación de iones metálicos en la célula bacteriana puede ocurrir en la membrana, el espacio periplasmático y el interior o exterior del celular. En estos procesos intervienen polímeros estructurales y extracelulares que interactúan con los metales agrupándolos dentro lo que evita la interacción del metal con otras proteínas esenciales para el microorganismo (Marrero-Coto *et al.*, 2010).

1.5.2.1 Secuestro intracelular del cobre facilitado por metalotioneínas.

El secuestro intracelular es la acumulación de metales dentro del citoplasma para evitar la exposición a componentes celulares esenciales. Los metales comúnmente secuestrados son Cd (II), Cu (II) y Zn (II). Existen dos ejemplos para esta forma de resistencia del metal: producción de proteínas ricas en cisteína en *Pseudomonas sp.* y metalotioneína en *Synechococcus sp.* El sistema de resistencia en esta bacteria Consiste en dos genes; *smtA* y *smtB*. *smtA* codifica una metalotioneína que se une a Cd (II) y Zn (II) los cuales son inducido por altos niveles de Cd (II), Zn (II) y Cu (II) y es reprimido por el producto génico de *smtB*. La proteína *smtB* actúa como un represor transcripcional de transacción convirtiendo la expresión de *smtA* y la producción de metalotioneína. Este tipo de metalotioneína contiene menos residuos de cisteína que las metalotioneínas animales. Los residuos de cisteína en la metalotioneína *SmtA* pueden actuar como un sumidero para el exceso de cationes tóxicos. Recientemente, se ha determinado la estructura de *smtB*. La proteína *smtB* es un dímero con un motivo hélice-giro-hélice similar al de otras proteínas de unión al ADN. El análisis de estructura indica que la proteína puede tener cuatro sitios de unión de Zn (II). Otro organismo que demuestra el secuestro intracelular de Cd (II) es una cepa de *P. putida* que se aisló de las aguas residuales. Este organismo produce tres proteínas ricas en cisteína de bajo peso molecular, que pueden estar relacionadas con metalotioneínas. *Mycobacterium scrofulaceum*

también demuestra la acumulación intracelular de Cu (II) al secuestrarlo en la forma de un precipitado de sulfato de cobre negro (Bruins *et al.*, 2000).

1.5.2.2 Secuestro intracelular del cobre, en el periplasma celular mediante proteínas de unión.

La acumulación y compartimentación de iones metálicos en la célula bacteriana puede ocurrir en la membrana, el espacio periplasmático y el interior celular. En ella intervienen polímeros estructurales y extracelulares que interactúan con los metales agrupándolos dentro de su estructura (bioabsorción) o proteínas que se unen a los iones metálicos por los que poseen una gran afinidad, evitando sus interacciones con otras proteínas esenciales para el microorganismo (Marrero-Coto *et al.*, 2010).

Las bacterias resistentes al cobre como *Pseudomonas aeruginosa* y *P.syringae* presentan unas proteínas periplasmáticas que unen a cobre, como el sistema CopABCD que consta de cuatro genes ver Figura 3, la proteína CopH, la chaperona CopZ y la metalotioneína SmtA, que funcionan como captoras de metales en el citoplasma celular, estas proteínas actúan de manera similar como proteína de unión a plata SilE (Marrero-Coto *et al.*, 2010; Puig *et al.*, 2002).

El *copA* gen codifica una proteína periplásmica rica en metionina capaz de unirse hasta 11 átomos de cobre. Esta proteína funciona en la resistencia al cobre debido a su alta capacidad de unión al cobre, su actividad de oxidasa multicobre, o ambas ya que estudios genéticos respaldan la idea de que las proteínas periplásmicas CopA y CopC, y tal vez la proteína de membrana externa CopB, confieren resistencia al cobre, mientras que CopC y CopD podrían funcionar en el transporte de cobre a las células de *P. syringae* por lo tanto, estas observaciones sugieren que el mecanismo de resistencia al cobre en *P. syringae* depende al menos en gran medida del secuestro y la acumulación de cobre en el periplasma y la membrana externa de hecho, las células de *P. syringae* expuestas a altas concentraciones de cobre se vuelven azules, acumulan cobre en el espacio periplásmico y se ha encontrado que acumulan hasta el 12% de su peso seco en cobre (Puig *et al.*, 2002).

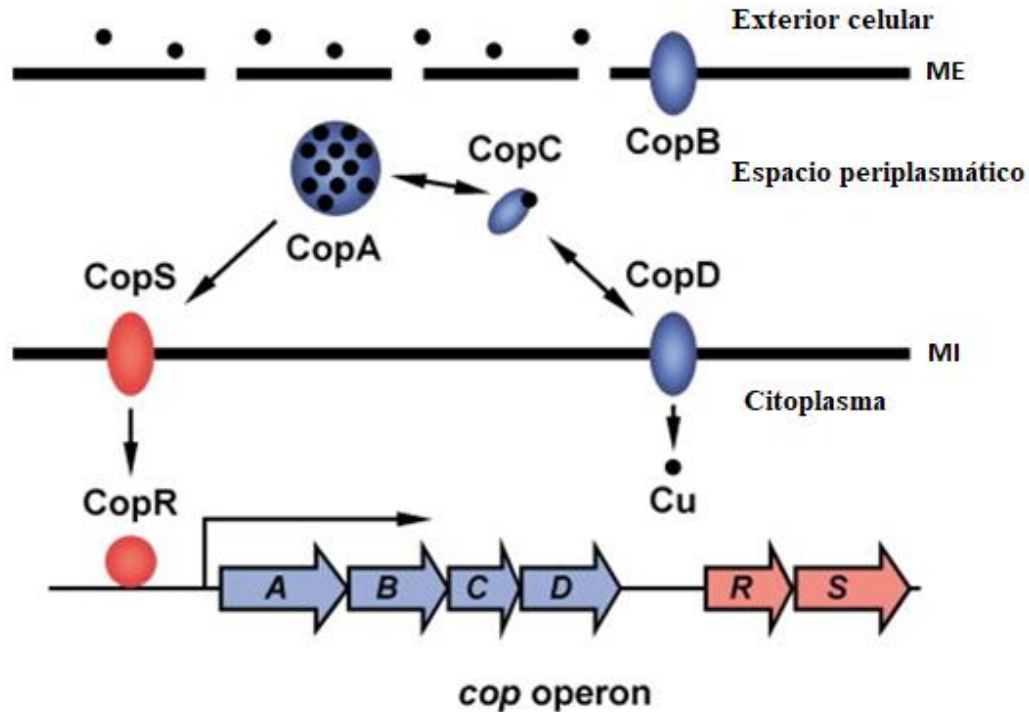


Figura 3. Modelo del secuestro intracelular del cobre en el espacio periplasmático. La regulación o secuestro del cobre en *P. syringae*, se lleva a cabo en el espacio periplásmico a través de la membrana externa porosa (ME). La CopA, con una fuerte homología y con las oxidasas de cobre múltiple, proporcionan resistencia al cobre, debido a su alta capacidad de unión y/o actividad oxidasa. ambas. CopB y CopC también contribuyen a la protección contra la toxicidad del cobre ya que CopC transfiere el cobre de CopA al CopD en el transportador de membrana interna (MI), donde el cobre se importa al citoplasma Tomado de (Puig *et al.*, 2002).

1.5.2.3 Secuestro intracelular del plomo en la superficie celular.

Las paredes celulares de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas llevan naturalmente una carga negativa, que se une a los cationes metálicos y regula el movimiento de los metales a través de la membrana. Los grupos carboxilo en las paredes celulares bacterianas Gram-positivas son los sitios de unión clave para los cationes metálicos, mientras que los grupos fosfato contribuyen significativamente a la unión de metales en especies Gram-negativas. Se reconoce que los grupos carbonilo, fosfato, hidroxilo y amino en la pared celular de *Pseudomonas aeruginosa* ASU6a participan en la unión de Pb^{2+} , mientras que las moléculas con grupos amida, amino, hidroxilo o carboxilo participan en la unión de Pb^{2+} , en la pared celular de *Synechococcus sp.* sin embargo, en *E. coli* el 97% de Pb^{2+} está unido a la membrana celular, mientras que casi no se detecta Pb^{2+} en peptidoglucano, La capacidad de

adsorción de Pb^{2+} en la superficie celular es afectada por el pH y la concentración inicial de plomo ya que estudios realizados *Pseudomonas pseudoalcaligenes* y *Micrococcus luteus* indica que la biosorción del metal aumentó al aumentar el pH de 2 a 6, con una capacidad de absorción máxima alcanzada a pH 5 y concentración de metal inicial de 100 mg. L⁻¹ (Naik y Dubey, 2013; Tiquia-Arashiro, 2018).

1.5.2.4 Bioacumulación intracelular del plomo facilitado por metalotioneínas.

Las metalotioneínas (MT) son un grupo de proteínas cuya función es facilitar el secuestro / bioacumulación de metales tóxicos dentro de la célula (Naik y Dubey, 2013), este proceso de bioacumulación intracelular de metales, es un proceso metabólico activo que requiere energía a diferencia de los procesos de biosorción (Tiquia-Arashiro, 2018). Las metalotioneínas son ricas en cisteína de bajo peso molecular y oscilan entre 3,5 y 14 kDa. Estas proteínas únicas también demuestran inducción en respuesta a metales pesados específicos como Cd, Pb, Zn y Cu los cuales son inmovilizados para proteger los procesos metabólicos bacterianos catalizados por enzimas (Naik y Dubey, 2013). Estas proteínas están contenidas en plásmidos que son transmitidas entre bacterias y cianobacterias como *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Proteus penneri* GM-10, *Providencia vermicola* cepa SJ2A, *Pseudomonas aeruginosa* cepa WI-1, *Salmonella choleraesuis* y *Streptomyces sp.*, *Synechococcus* PCC 7942 (SmtA), *Anabaena* PCC 7120 (SmtA), *Oscillatoria brevis* (BmtA), *Pseudomonas aeruginosa* (BmtA) y *Pseudomonas putida* (BmtA) lo que facilita su dispersión y así expresar metalotioneínas en presencia de Pb^{2+} (Naik y Dubey, 2013; Tiquia-Arashiro, 2018).

1.5.2.5 Secuestro extracelular del hierro facilitado por sideróforos.

Las bacterias Gramnegativas como las positivas producen y exportan sideróforos (Figura. X), una familia de quelantes de hierro de bajo peso molecular que son durante los períodos de privación de nutrientes, y la mayoría de los sideróforos exhiben una afinidad y selectividad extraordinariamente altas por el hierro (III) con constantes de unión (K_a). Mientras que otras tácticas para la adquisición de hierro incluyen la absorción y la utilización de hierro hemo, que se ha observado para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Mycobacterium tuberculosis*, ver Figura 4, la expresión de receptores de transferrina en la superficie celular, de algunas bacterias que permite a varias especies patógenas como *Neisseriaceae* y

Pasteurellacea obtengan hierro de la transferrina del huésped (Zheng y Nolan, 2012), sin embargo el hospedero ha desarrollado nuevos mecanismos para defenderse que consisten en la liberación de neutrófilos infiltrantes y los macrófagos que bloquean la adquisición de hierro bacteriano en parte, al liberar la proteína lipocalina-2 la cual secuestra las moléculas de sideróforos de unión a metales de alta afinidad liberadas por bacterias patógenas y así evitar la absorción de hierro (Lopez y Skaar, 2018).

Los neutrófilos también limitan la disponibilidad de nutrientes en metales al liberar lactoferrina para secuestrar hierro y liberando la proteína antimicrobiana calprotectina como parte de gránulos o como componente de trampas extracelulares de neutrófilos, esta proteína se une principalmente al zinc, manganeso, hierro ferroso, níquel y cobre durante la infección, para mantener un control de la disponibilidad de metales por parte del huésped subraya cómo la redistribución de metales lejos de las bacterias representa un contribuyente clave a las interacciones huésped-patógeno (Lopez y Skaar, 2018), esto se debe a que las cepas productoras de sideróforos son muchos más virulentas, que aquellas que son incapaces de producir o segregar sideróforos (Holden y Bachman, 2015).

1.5.2.6 Secuestro extracelular del plomo facilitado por sideróforos.

Los sideróforos transportadores hierro del ambiente a la célula bacteriana, también se unen de manera efectiva con otros metales fuera de la célula como el plomo como en el caso de *P. aeruginosa* 4EA quien produce los sideróforos (pyochelin y pyoverdine), que están involucrados en la formación de complejos de Pb^{2+} , La producción de estos sideróforos por esta cepa bacteriana resistente al plomo se ve reforzada por la presencia de nitrato de plomo de hasta 0,5 mM, ya que se ha demostrado que la producción de pyoverdinas por la cepa *Pseudomonas putida* KNP9 que promueve el crecimiento de las plantas al reducir la concentración de Pb^{2+} en las raíces de frijol *mungo* en un 93% y en los brotes en un 56%, también sea demostrado que la sideroforina pyochelin contribuye a la unión de Pb^{2+} en *P. aeruginosa* PAO1, aparentemente con mayor afinidad por Pb^{2+} que la pyoverdina por lo que esta capacidad de los sideróforos para reducir la movilidad del plomo en el medio ambiente al formar complejos metal-ligando estables convirtiéndose en una estrategia ideal para la recuperación del plomo (Tiquia-Arashiro, 2018).

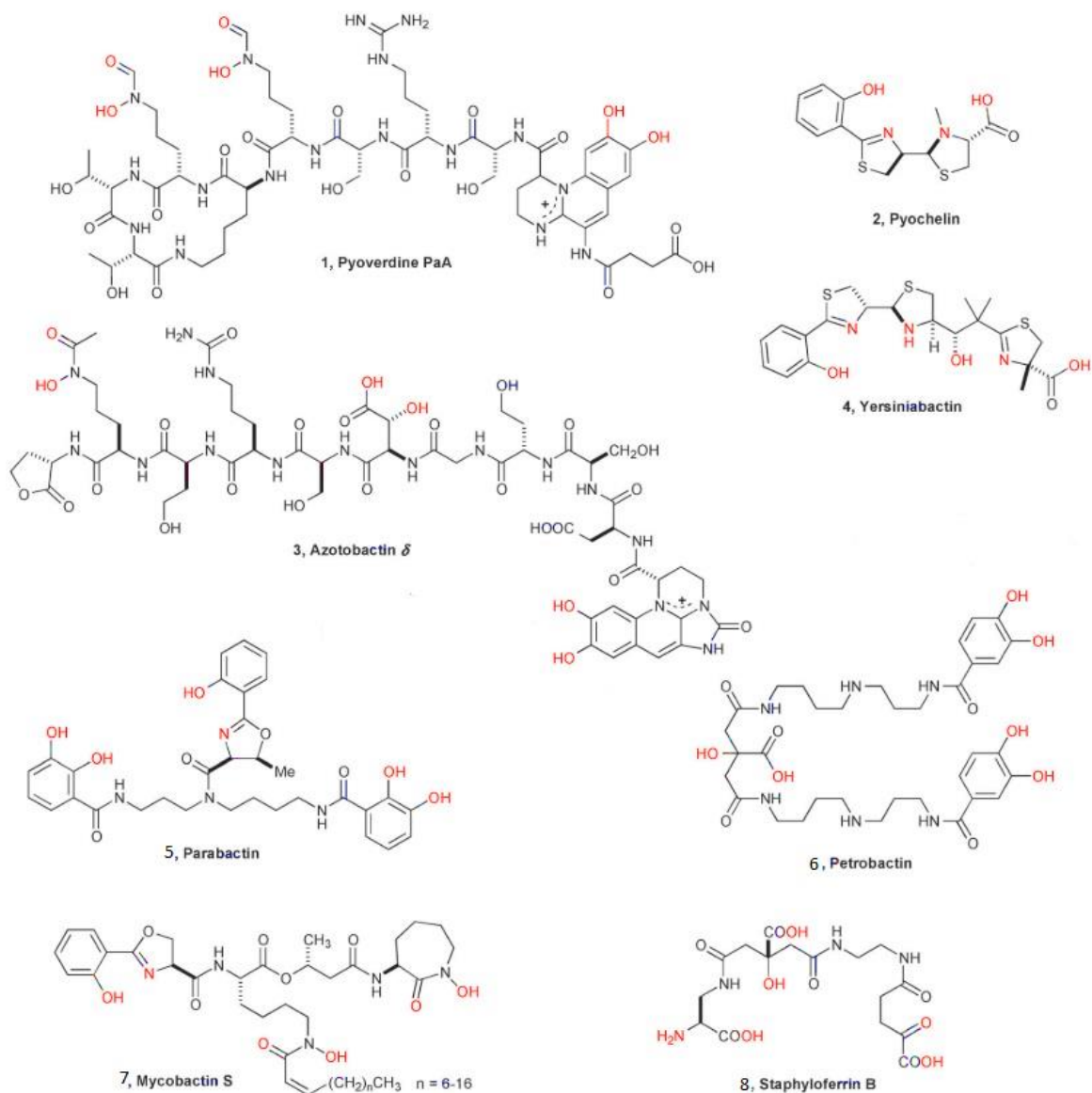


Figura 4. Ejemplos de sideróforos producidos por bacterias gramnegativas (1–7), bacterias grampositivas (8). Los restos de coordinación de hierro están resaltados en rojo. Existen múltiples variantes estructurales de algunos sideróforos (por ejemplo, pioverdinas, azotobactinas, desferrioxaminas, micobactinas, etc) Tomado de (Zheng y Nolan, 2012).

1.5.2.7 Secuestro extracelular del Pb y Cu facilitado por biopolímeros a base polisacáridos.

Las bacterias utilizan estrategias de inmovilización de metales para contrarrestar los efectos tóxicos de los metales pesados, mediante la síntesis de biopolímeros extracelulares de alto peso molecular, denominados exopolisacáridos (EPS), que consisten en macromoléculas

tales como polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, sustancias húmicas, lípidos y otros componentes no poliméricos de bajo peso molecular, y al ser químicamente diversos en su mayoría heteropolisacáridos ácidos con grupos funcionales como hidroxilo, carboxilo, amidas y fosforilo presentan una alta afinidad hacia los metales pesados. Aunque los EPS microbianos poseen diferente grado de especificidad y afinidad se unen a metales pesados como el plomo y desempeñan un papel importante en la bioacumulación de Cu y Pb en la cadena alimentaria marina, presente en aislados de *Marinobacter sp.* siendo este importante en el transporte descendente de metales en el medio marino (Naik y Dubey, 2013).

Los EPS son polímeros polianiónicos de alto peso molecular que se unen a los metales por interacción electrostática entre el catión metálico y los componentes cargados negativamente de EPS, lo que resulta en la inmovilización del metal dentro de la matriz exopolimérica *Pseudomonas marginalis* pudo resistir el plomo de 2.5 mM secuestrando plomo en un exopolímero (Naik y Dubey, 2013) mientras que otras bacterias Gram negativas de *Halomonas spp.* y *C. salexigens* toleran concentraciones de 5nM de Pb y Cu, mediante el secuestro por un polisacáridos extracelulares (PE) que juegan un papel importante en la tolerancia microbiana del metal, ya que numerosas bacterias halófilas y arqueas secretan PE rico en residuos con carga negativa propensos a unirse a cationes metálicos de una manera no específica, el secuestro de metales pesados en la pared celular como el Pb y Cu, podría ser una estrategia eficiente de resistencia a metales pesados en bacterias gram positivas halófilas frente a metales pesados (Voica *et al.*, 2016).

1.5.3 Desintoxicación enzimática, modificando el metal para hacerlo menos activo

Entre las transformaciones enzimáticas de los metales se incluyen la oxidación, reducción, metilación y demetilación y estas pueden dar como resultado compuestos poco solubles en agua o bien compuestos volátiles (Marrero-Coto *et al.*, 2010), como por ejemplo la oxidación donde los metales pesados pierden electrones y se transforman en el estado útil o menos tóxico, el ejemplo más común de oxidación enzimática es la oxidación de uranio por *Thiobacillus ferrooxidans*, *T. thiooxidans* (Cornu *et al.*, 2017)

1.5.4 Metilación de metales pesados.

El mercurio (Hg) se ha convertido en una preocupación mundial debido a sus propiedades tóxicas, ya que las bacterias como por ejemplo las reductoras de sulfatos y hierro como

Desulfovibrio desulfuricans y *Geobacter sulfurreducens* (Zhao *et al.*, 2017), que transforman el Hg inorgánico en compuestos de Hg orgánicos [CH₃-Hg]⁺ como el metilmercurio (MeHg), en los ecosistemas acuáticos a través de procesos anaeróbicos, esto facilita la bioacumulación del MeHg en organismos acuáticos, causando gran preocupación debido a que es una neurotoxina que daña el sistema nervioso central en humanos (Si *et al.*, 2015).

1.5.5 Oxido-reducción del hierro Fe.

El hierro (Fe II) en su requisito fisiológico para la vida, sirve para muchos microorganismos que persisten en el agua, los suelos y los sedimentos, como una fuente de electrones para los microorganismos oxidantes de hierro en condiciones tanto oxicas como anóxicas y Fe (III) puede funcionar como un receptor de electrones terminal en condiciones anóxicas para microorganismos reductores de hierro. Dado que el hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre, las reacciones redox de hierro tienen el potencial de soportar poblaciones microbianas sustanciales en el suelo y los ambientes sedimentarios (Weber, Achenbach, y Coates, 2006).

1.5.6 Biotransformación del plomo.

Entre los compuestos organo-plomo, el tetraetilo de plomo (TEP) y el tetrametilo de plomo (TMP) son los más estables e importantes debido a su uso generalizado como aditivo de gasolina antidetonante. Debido al uso de gasolina con plomo, las partículas de plomo se emiten en la atmósfera desde los gases de escape de los automóviles como haluros de plomo. Los organo-conductores son de naturaleza muy tóxica debido a sus características mutagénicas y teratogénicas. En la naturaleza, los compuestos de tetra-alquil plomo, como el tetra-etil plomo y el tetra-metil plomo están sujetos a fotólisis y volatilización, por lo que la degradación pasa de especies tri-alquil a di-alquil y eventualmente a plomo, algunos microorganismos capaces de degradar los organo-conductores utilizando su mecanismo de biotransformación ya que estudios han demostrado que consorcios microbianos degradan el plomo tetraetílico en el suelo (Naik y Dubey, 2013).

1.5.7 Precipitación del plomo por alteración del pH inducido por bacterias.

La precipitación es un mecanismo utilizado por varias bacterias para reducir la concentración de metales libres en complejos insolubles, para reducir su biodisponibilidad y toxicidad. Se sabe que el Pb²⁺ reacciona con varios aniones como cloruros, fosfatos, sulfuros, carbonatos

e iones hidroxilo para formar precipitados insolubles, estos procesos de precipitación pueden ocurrir fuera (extracelularmente) o dentro (intracelularmente) de la célula, como por ejemplo La capacidad de las bacterias ureolíticas para eliminar completamente el plomo reside en su capacidad de hidrolizar eficientemente la urea para generar iones de carbonato y elevar el pH a condiciones alcalinas (8.0-9.1), lo que promueve la precipitación de plomo y carbonato de calcio por ejemplo, a niveles de pH de 6.6 y superiores, pueden precipitarse varios fosfatos de Pb (en suelos no calcáreos) y $PbCO_3$ (Tiquia-Arashiro, 2018), sin embargo bacterias como *Vibrio harveyi* y *Providentia alcalifaciens* 2EA son capaces de precipitar el plomo Pb^{2+} como un fosfato inusual, $Pb_9(PO_4)_6$, también se ha informado que *Klebsiella sp.* precipita plomo como PbS y cepas resistentes de *S. aureus* precipitaron de manera efectiva (Naik y Dubey, 2013) en estos procesos de precipitación hay que tener en cuenta los cambios de pH cuando se utiliza esta estrategia de precipitación en la biorremediación de metales (Tiquia-Arashiro, 2018).

1.5.8 Exclusión del metal por exportación activa.

Los sistemas activos de transporte o flujo de salida representan la categoría más grande de sistemas de resistencia de metales. Los microorganismos utilizan mecanismos de transporte activo para exportar metales tóxicos de su citoplasma. Estos mecanismos pueden ser cromosómicos o codificados por plásmidos. Los metales no esenciales normalmente ingresan a la célula a través de los sistemas normales de transporte de nutrientes, pero se exportan rápidamente. Estos sistemas de eflujo pueden no estar unidos a la ATPasa o a la ATPasa y son muy específicos para el catión o anión que exportan (Bruins *et al.*, 2000).

1.5.8.1 Expulsión del plomo, facilitado por bombas de flujos y ATPasas.

Las ATPasas de tipo P_{IB} son un grupo de proteínas que transportan metales pesados fuera de la membrana celular y que rigen la resistencia bacteriana al transportan iones metálicos altamente tóxicos y reactivos como **Pb (II)**, **Cu (I)**, **Ag (I)**, **Zn (II)** y **Cd (II)** fuera de la célula. Estas ATPasas de tipo P_{IB} se dividen en dos subgrupos: (i) ATPasas translocantes de **Cu (I) / Ag (I)** codificadas por el gen *copA* presentes en *Enterococcus hirae*, *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*; (ii) ATPasas translocantes **Zn (II) / Cd (II) / Pb (II)** codificadas por el gen *zntA* en *E. coli* y el gen *cadA* en el plásmido *Staphylococcus aureus*. Las ATPasas de tipo P pertenecen a la familia de transportadores transmembrana responsables de los movimientos

de iones y pequeñas moléculas orgánicas dentro y fuera de las membranas celulares. La subfamilia de transportadores transmembrana, que incluye ATPasas de tipo PI_B , regula el flujo de salida de metales pesados tóxicos fuera de las membranas celulares y evita la sobreacumulación de metales blandos altamente reactivos y tóxicos y, por lo tanto, juega un papel importante en la resistencia de los metales pesados (Naik y Dubey, 2013)

Los transportadores de facilitadores de difusión de cationes (CDF) de tipo P y ATP exportan iones metálicos desde el citoplasma al periplasma, mientras que CBA, una bomba de eflujo trans-envolvente de tres componentes, actúa como intercambiador quimiosmótico de ionprotón para extruir iones metálicos periplásmicos. Las bombas de eflujo CBA son impulsadas por proteínas de la superfamilia de división celular de nodulación de resistencia al plomo, como en *Cupriavidus metallidurans* CH34 que involucra ATPasa tipo P para la eliminación de iones Pb^{2+} del citoplasma como se muestra en la Figura 5 (Naik y Dubey, 2013).

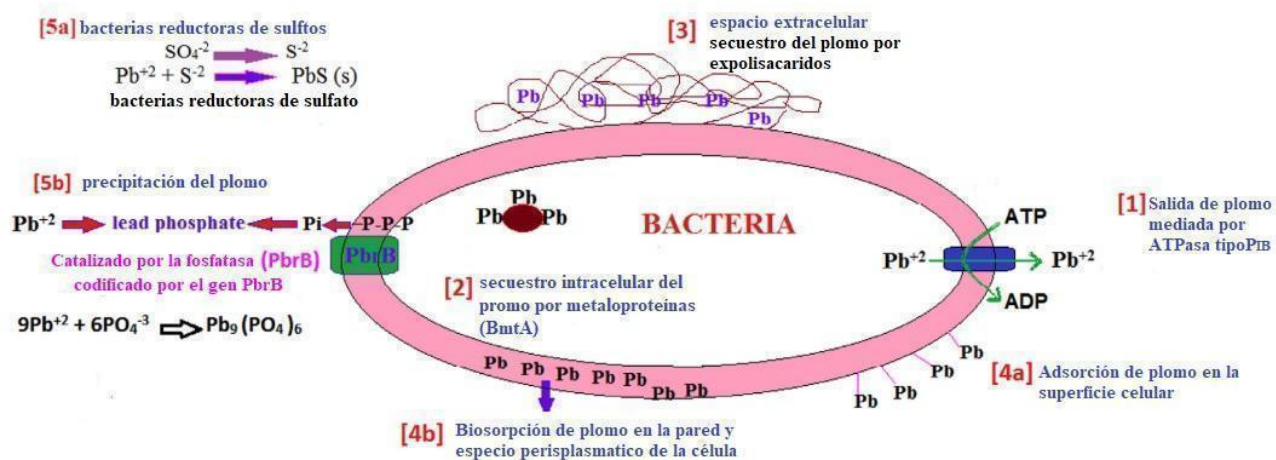


Figura 5. Mecanismos resistentes al plomo realizados por bacterias. (1) flujo de plomo mediado por ATPasa tipo PIB, (2) Secuestro de plomo por metalotioneína (BmtA), (3) Secuestro de plomo en exopolisacárido, (4a) Adsorción de plomo en la superficie celular, (4b) Biosorción de plomo en la pared celular y el espacio periplásmico (bioacumulación), (5a) Precipitación de plomo por bacterias reductoras de sulfato, (5b) Precipitación de plomo catalizada por la enzima Fosfatasa (PbrB) imagen tomada de (Naik y Dubey, 2013).

1.5.8.2 Exclusión del cobre por una barrera de permeabilidad.

Alteraciones en la pared celular, membrana o envoltura de un microorganismo son ejemplos de exclusión de metales por barrera de permeabilidad. Este mecanismo es un intento del organismo para proteger los componentes celulares esenciales sensibles a los metales. Un ejemplo destacado es la exclusión de Cu (Bruins *et al.*, 2000), por la proteína MctB presentes en las especies micobacterianas tanto patógenas como no patógenas y regula las concentraciones intracelulares de Cu, se cree que la proteína MctB actúa como una porina de membrana externa para eliminar el exceso de Cu de la célula como se muestra en la figura 6. Otros estudios han demostrado que la proteína MctB trabaja en conjunto con una proteína de flujo de salida de membrana citoplasmática CtpV, para facilitar la expulsión del cobre (Samanovic, Ding, Thiele, y Darwin, 2012).

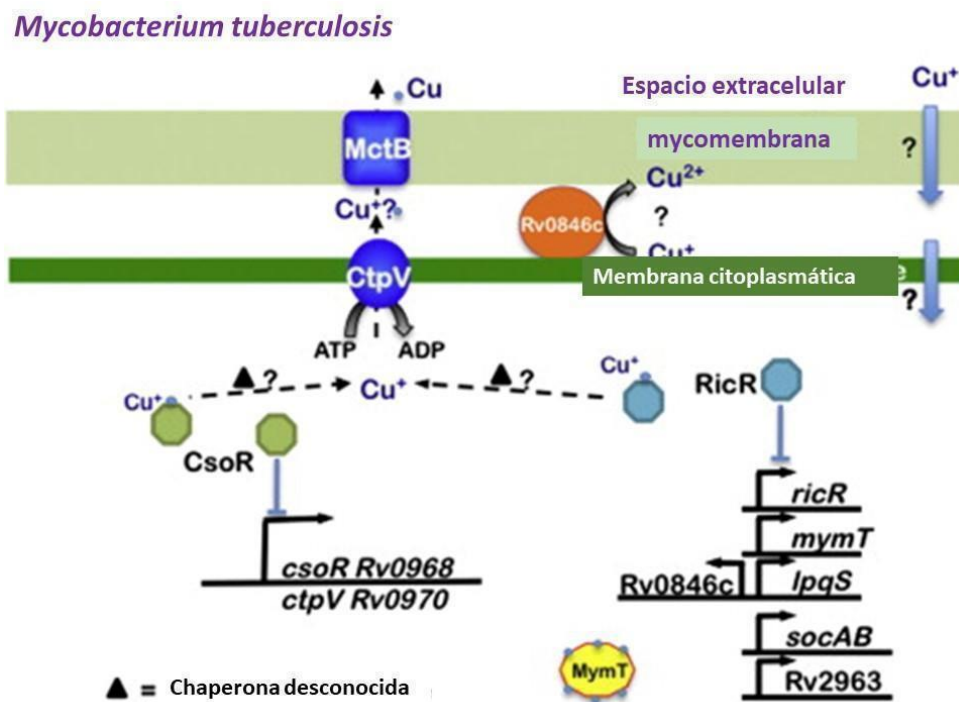


Figura 6. Expulsión del cobre facilitado por las proteínas MctB y CtpV. El regulón RicR es exclusivo de las micobacterias patógenas, mientras que MctB y CtpV se encuentran en especies patógenas como no patógenas. imagen tomada de (Samanovic et al., 2012).

1.5.9 Regulación del cobre, por medio de proteínas periplásmicas o extracelulares.

Las bacterias regulan, las concentraciones de Cu citoplasmático para minimizar la toxicidad y garantizar un suministro adecuado de cuproproteínas. Para esto, las bacterias en general codifican muy pocas enzimas dependientes de Cu y cuproproteínas bacterianas tienden a ser

periplásmicas o extracelulares, en caso de que los niveles de Cu sean demasiado altos. Otros mecanismos para aliviar el estrés inducido por Cu. Algunas de las observaciones iniciales que sugirieron desarrollados por las bacterias que codifican los sistemas de resistencia al Cu provienen de estudios con bacteria Gram-positiva como *Enterococcus hirae* (*E. hirae*). El cual altamente resistente al Cu debido a la presencia de un operón de cuatro genes, *copYZAB* (Figura 2 x). CopA y CopB son ATPasas de tipo P, similares a las proteínas ATP7A y ATP7B en humanos, que experimentan cambios conformacionales para impulsar el transporte de iones Cu^+ a través de las membranas en *E. hirae*, CopA es un exportador de Cu, aunque en condiciones limitantes de Cu esta proteína adquiere una estructura tridimensional defectuosa (Samanovic, Ding, Thiele, y Darwin, 2012).

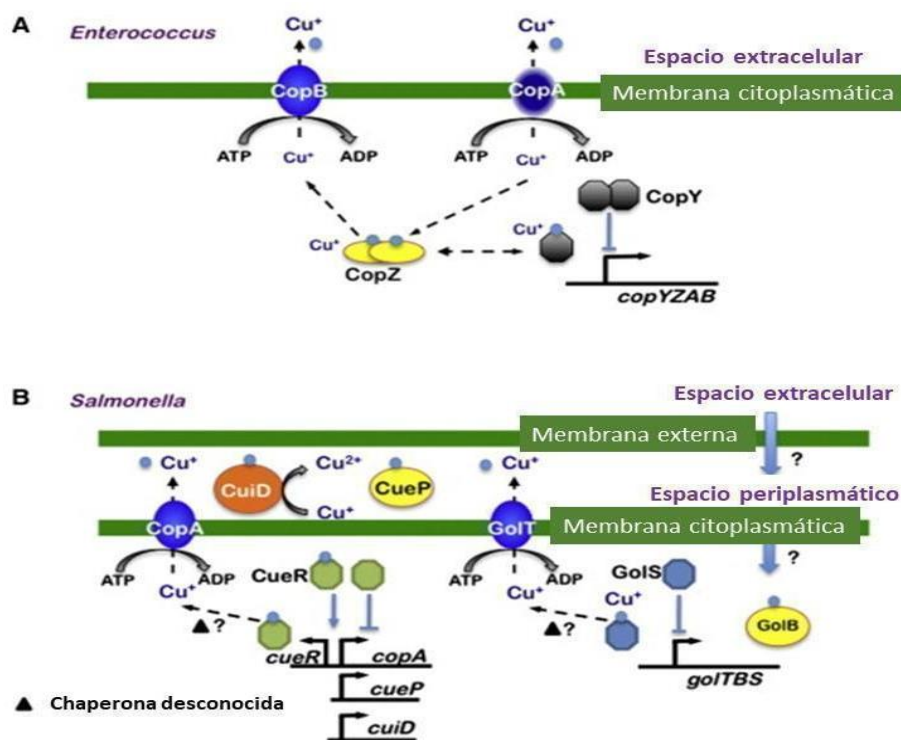


Figura 7. Modelos de vías de homeostasis de Cu en patógenos bacterianos gramnegativos y negativos. (A) Bacterias grampositivas, basadas en *E. hirae*. Se cree que Cu (azul) ingresa a la célula a través de CopA. CopZ, una chaperona de Cu, forma dímeros que unen dos átomos de Cu^+ y los transfiere a CopY u otras proteínas. En consecuencia, un dímero de CopY unido a cuatro Cu^+ se desprende del promotor *copA* y eliminó la expresión del operón *copYZAB*, permitiendo la resistencia a la toxicidad de Cu. (B) Bacterias gramnegativas, basadas en *Salmonella sp.* Izquierda: el Cu ingresa al espacio periplásmico, muy probablemente a través de porinas en la membrana externa, y cruza la membrana interna hacia el citoplasma por un mecanismo desconocido. Dentro del citoplasma, el sistema Cue responde a Cu: CueR cambia su conformación tras la unión de Cu^+ , lo que resulta en la expresión de *cueP*, *copA*, *cuiD* y *cueR*. CopA exporta Cu^+ al espacio periplásmico

y CuiD oxida Cu^+ a Cu^{2+} . La inducción máxima de los genes *copA* y *cueO* tras CueR es extremadamente sensible a Cu^+ (10^{-21} M) y, por lo tanto, parece ser el sensor primario de Cu en estas bacterias. Derecha: sistema Gol. Cuando Cu está en el espacio interior, se cree que GolS se une a Cu^+ , lo que da como resultado la desrepresión del operón *gol*. Se propone GolT para exportar Cu^+ al periplasma. Se propone que CueP y GolB sean periplasmáticos y citoplasmáticos, respectivamente, chaperonas de Cu imagen tomada de (Samanovic *et al.*, 2012).

1.5.10 Mecanismos de resistencia por Transferencia horizontal de genes.

Las fuentes de estrés para las bacterias en los entornos que las rodean son múltiples, por lo que desarrollan estrategias comunes que les permitan resistir al estrés físico o relacionado con los nutrientes confieren resistencia temporal a los antibióticos (Ben Maamar, Hu, y Hartmann, 2019) y a MP, ya que las bacterias resistentes a los antibióticos se enriquecen en lugares contaminados con metales, y los genes que confieren coselección a los metales pesados y los antibióticos se encuentran a menudo juntos en muchos aislados clínicos (Yang *et al.*, 2018). Algunos de estos fenotipos de resistencia incluyen la latencia, la producción de osmoprotectores, la formación de biopelículas, el engrosamiento de la membrana celular y la pared celular, una mayor expresión de las bombas de salida y una menor expresión de porinas en la membrana para reducir la permeabilidad. Estos genes generalmente se encuentran en el cromosoma y, por lo tanto, pueden considerarse intrínsecos. Sin embargo, no se expresan constitutivamente, ni se consideran necesariamente genes de resistencia a antibióticos (Ben Maamar *et al.*, 2019).

los genes de resistencia a los antimicrobianos que forman parte del genotipo clásico de resistencia, y el fenotipo de un microorganismo dado el resistoma "intrínseco", de los genes de resistencia a los antibióticos que se adquieren mediante la transferencia de elementos genéticos móviles, como transposones, integrones, plásmidos o virus, el resistoma "adquirido" (Yang *et al.*, 2018), a través de tres mecanismos básicos: conjugación, transducción y transformación (Takeuchi, Kaneko, y Koonin, 2014).

1.5.10.1 Conjugación.

La conjugación se observó primero en la especie gramnegativa *Escherichia coli* y más tarde en la en la especie *Streptococcus faecalis*. Los plásmidos conjugativos codifican los componentes necesarios para la formación de pares de apareamiento y la posterior transferencia de ADN. Son una herramienta poderosa para la evolución del genoma, ya que

pueden albergar y transferir genes entre organismos, muestreando todos los genomas dentro de un ecosistema. (Wan y Goddard, 2012).

La conjugación es el proceso por el cual un elemento de ADN se transfiere de una célula donante a una receptora a través de un pili. Un elemento conjugativo se puede ubicar en un plásmido que se replica de forma autónoma, que se denomina plásmido conjugativo, o en un genoma bacteriano, que luego se denomina elemento conjugativo integrado (ECI). Los elementos conjugativos están muy extendidos en las bacterias Gram-negativas (G-) y Gram-positivas (G+) (Val-Calvo *et al.*, 2018). Los plásmidos conjugativos contienen un origen de replicación, reclutando las polimerasas del huésped para replicar y, por lo tanto, propagar el plásmido a las células hijas también a través de la replicación. Esto confunde el límite entre la proliferación y el intercambio genético en procariotas (Wan y Goddard, 2012).

1.5.10.2 Transducción

La transducción es el proceso por el cual se introduce ADN en un aislado mediante bacteriófagos Figuras 8A-C (Eggers *et al.*, 2016). Ocurre cuando los fagos líticos y templados integran su ADN en el cromosoma del huésped y el profago puede permanecer inactivo en el huésped hasta que algo de estrés induzca la escisión del fago del cromosoma lo que conducirá a la posterior formación de partículas de fago y la lisis de la célula huésped (Figura 8A) Los fagos líticos no integran su ADN en el cromosoma del huésped, pero inducen la formación inmediata de partículas de fago y la lisis de la célula huésped (Figura 8B) En condiciones de crecimiento desfavorables, algunos fagos pueden adoptar un estado de pseudolisogenia donde su genoma no se degrada sino que existe como un plásmido dentro del citoplasma y durante la división celular bacteriana se incorpora en una sola célula hija (Figura 8C) (Colavecchio *et al.*, 2017).

Los fagos son el organismo más abundante en la biosfera y encontrases en varios entornos del planeta son los principales impulsores de la transferencia horizontal de genes de resistencia entre los patógenos transmitidos por los alimentos, así como del medio ambiente a animales y humanos. Los genes de resistencia a menudo se encuentran en varios elementos genéticos móviles (EGM), como plásmidos, islas genómicas y transposones, y, como tales, pueden transferirse horizontalmente por transducción de fagos (Colavecchio *et al.*, 2017).

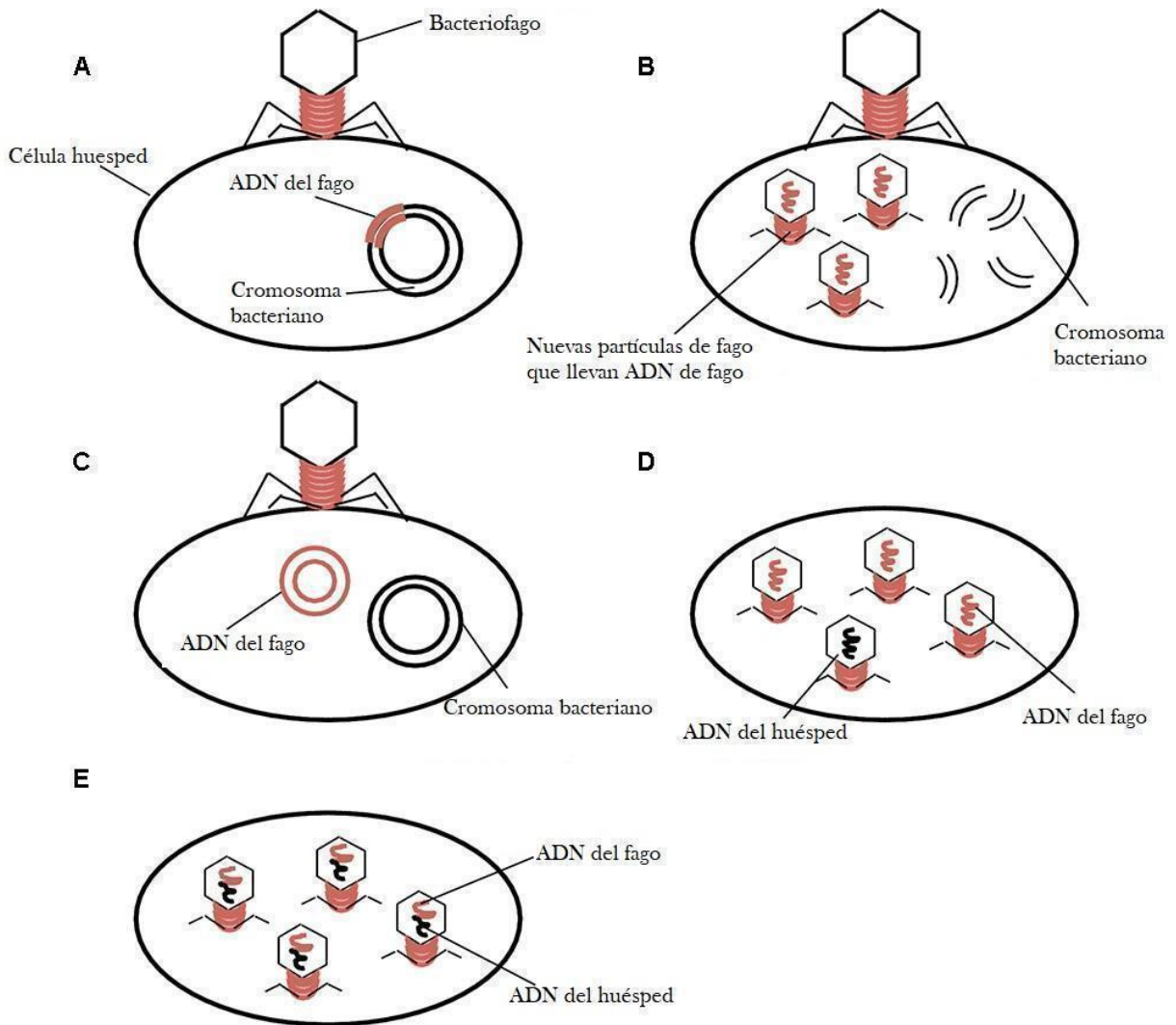


Figura 8. Ciclos de vida de fagos y tipos de transducción mediados por fagos. (A) ciclo de vida del fago templado; (B) ciclo de vida del fago virulento; (C) pseudolisogenia; (D) Transducción generalizada; (E) Transducción especializada tomada de (Colavecchio *et al.*, 2017).

1.5.10.3 Transformación.

La transformación implica la absorción directa de material genético del entorno por un receptor competente que tiene un conjunto cromosómico de proteínas (Sultan *et al.*, 2018). Se conocen dos formas de transformación: (a) la transformación natural que requiere un sistema de captación de ADN, para atraer el ADN a una célula receptora (Mathers, Peirano, y Pitout, 2015), Para que ocurra la transformación natural, las bacterias deben desarrollar un estado fisiológico altamente regulado llamado competencia, durante el cual se expresa específicamente un conjunto específico de proteínas designadas como transformantes. Las

proteínas transformadoras impulsan la unión y la absorción del ADN extracelular y la posterior integración de ese ADN en el genoma (Diallo *et al.*, 2017).

(b) los métodos de transformación bacteriana artificial consta de pasos simples y eficientes. El método básico de transformación bacteriana se basa en procesos químicos, físicos y eléctricos y otros medios para permeabilizar la membrana celular bacteriana para permitir la absorción de ADN plasmídico (Ren *et al.*, 2019).

1.6 Descripción de área de estudio.

Chame es uno de los cinco distritos de la provincia de Panamá Oeste (Panamá) y cuenta con una población de 24 471 habitantes según el censo poblacional del 2010 (Distrito de Chame Panamá 2019)

1.6.1 Ubicación geográfica del distrito de Chame.

El Distrito de Chame está localizado a 76 kilómetros de la Ciudad de Panamá, se extiende bajo una superficie de 376,7 km². Sus límites son: al Norte con el Distrito Capira, al Sur con el Océano Pacífico, al Este con el Océano Pacífico y parte del Distrito Capira, al Oeste con el Distrito San Carlos (Distrito de Chame Panamá 2019)

Sus coordenadas son 8°36'0" N y 79°55'0" W en formato DMS (grados, minutos, segundos) o 8.6 y -79.9167 (en grados decimales). Su posición UTM es PK15 y su referencia Joint Operation Graphics es NC17-15 (Distrito de Chame Panamá 2019)

1.6.2 Zonas de vida y vegetación.

Dentro de esta Cuenca Hidrográfica encontramos dos zonas de vida: el bosque tropical seco (bs-T) y el bosque húmedo premontano (BH-P). La cobertura del manglar en el área de Chame está compuesta por varias especies diferentes, las cuales se encuentran formando rodales puros o especies de mangle. La especie dominante es esta zona es el mangle rojo (*Rizófora mangle* y *Rizófora racemosa*). El mangle negro gateado (*Avicennia germinans* y *avicennia bicolor*) se les encuentra en rodales puros y formando rodales mixtos. Entre las especies asociadas a la vegetación de manglar en esta zona podemos mencionar: espavé (*Anacardium excelsum*), guásimo (*Guazuma ulmifolia*), uvero (*Coccoloba uvifera*), helecho de manglar (*Acrosticum aureum*), paja china (*Frimbrystilis Spadiceae*) (Berdiales y Chavarría, 2009).

1.6.3 Hidrología.

Esta Cuenca Hidrográfica está formada por cuatro subcuencas: las subcuena del río Chame, río Capira, río Lagarto y río Sajalices. Estos ríos que forman esta cuenca son ríos de cursos cortos y de pobre drenaje por ende presentan un bajo caudal (Berdiales y Chavarría, 2009).

1.6.4 Factores del clima.

Los factores del clima son un conjunto de factores que se combinan para influir en el clima, como por ejemplo la radiación solar cuya cantidad cambia con la inclinación de la Tierra, la distancia orbital del sol y la latitud, la temperatura, la presión del aire y la abundancia de agua (Moore, 2020).

1.6.5 Clima promedio en el distrito de Chame, Panamá.

Chame, presenta durante todo el año una estación seca y lluviosa, con una temperatura que varía de 24 °C a 32 °C y rara vez presenta temperaturas extremas de 23 °C a 34 °C.

1.6.6 Temperatura.

La temporada calurosa dura 2,4 meses, del 10 de febrero al 23 de abril, y la temperatura máxima promedio diaria es más de 31 °C. El día más caluroso del año es el 6 de abril, con una temperatura máxima promedio de 32 °C y una temperatura mínima promedio de 24 °C. La temporada fresca dura 3,1 meses, del 2 de septiembre al 4 de diciembre, y la temperatura máxima promedio diaria es menos de 30 °C. El día más frío del año es el 9 de febrero, con una temperatura mínima promedio de 24 °C y máxima promedio de 31 °C (El clima promedio en Chame Panamá, s.f.).

1.6.7 Precipitación.

Los días mojados se caracterizan por cualquier forma de hidrometeoro, que cae de la atmósfera a la superficie terrestre en forma de lluvia, llovizna, granizo o nieve (Guo *et al.*, 2020). Basado en esta categorización, el tipo más común de precipitación durante el año es solo lluvia, con una probabilidad máxima del 58 % el 7 de noviembre (El clima promedio en Chame Panamá, s.f.)

Un día *mojado* es un día con por lo menos 1 milímetro de líquido o precipitación equivalente a líquido. La probabilidad de días mojados en Chame varía muy considerablemente durante el año (El clima promedio en Chame Panamá, s.f.).

La temporada más mojada dura 7,5 meses, de 25 de abril a 9 de diciembre, con una probabilidad de más del 31 % de que cierto día será un día mojado. La probabilidad máxima de un día mojado es del 58 % el 7 de noviembre (El clima promedio en Chame Panamá, s.f.).

La temporada más seca dura 4,5 meses, del 9 de diciembre al 25 de abril. La probabilidad mínima de un día mojado es del 3 % el 1 de febrero (El clima promedio en Chame Panamá, s.f.).

1.6.7.1 Precipitación por lluvias.

Chame cuenta con una variación extrema de lluvias mensual por estación. La temporada de lluvia dura 10 meses, comenzando del 16 de marzo al 19 de enero, con un intervalo móvil de 31 días de lluvia de por lo menos 13 mm. La mayoría de la lluvia cae durante los 31 días centrados alrededor del 29 de octubre, con una acumulación total promedio de 220mm. El periodo del año sin lluvia dura 1,9 meses, del 19 de enero al 16 de marzo. La fecha aproximada con la menor cantidad de lluvia es el 12 de febrero, con una acumulación total promedio de 6 mm (El clima promedio en Chame Panamá, s.f.).

1.6.8 Humedad.

Basamos el nivel de comodidad de la humedad en el punto de rocío, ya que éste determina si el sudor se evapora de la piel enfriando así el cuerpo. Cuando los puntos de rocío son más bajos se siente más seco y cuando son altos se siente más húmedo. A diferencia de la temperatura, que generalmente varía considerablemente entre la noche y el día, el punto de rocío tiende a cambiar más lentamente, así es que aunque la temperatura baje en la noche, en un día húmedo generalmente la noche es húmeda (El clima promedio en Chame Panamá, s.f.).

El nivel de humedad percibido en Chame, debido por el porcentaje de tiempo en el cual el nivel de comodidad de humedad es entre el 1 % del 99 %, como se muestran en la figura 9 (El clima promedio en Chame Panamá, s.f.).

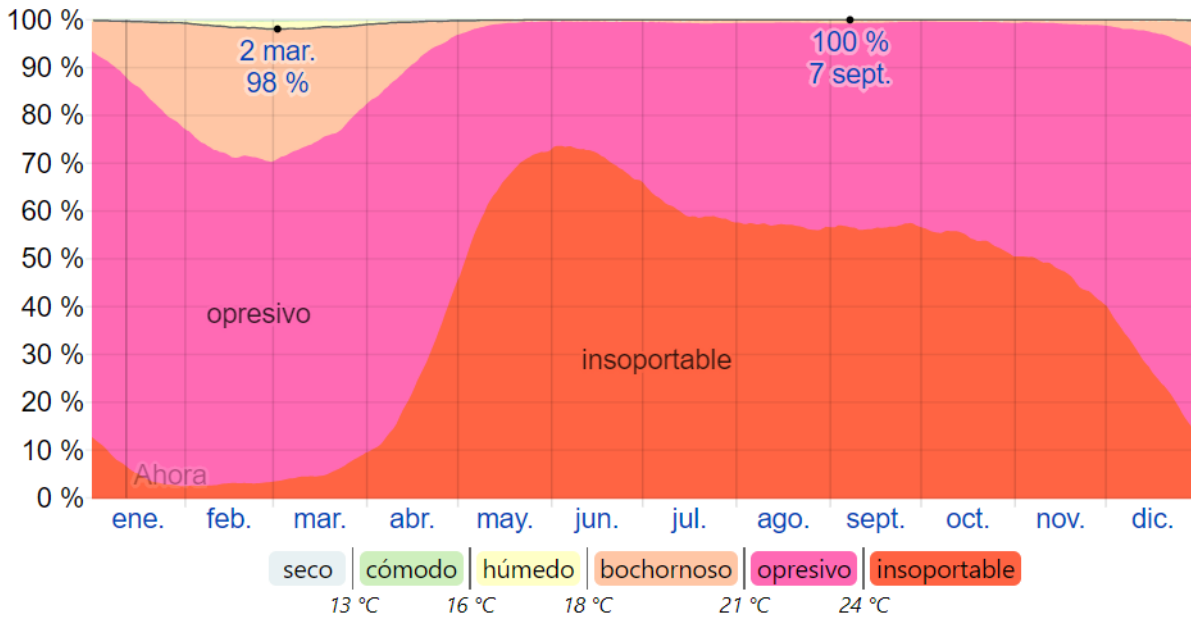


Figura 9. El porcentajes de humedad, por mes categorizado por el punto de rocío.

1.6.9 Actividades antropogénicas negativas, en los manglares del distrito de Chame.

los manglares hoy día se ven afectados por actividades como el desarrollo de la industria de la maricultura del camarón, extracción de carbón vegetal, madera para construcciones urbanas y rurales, leña para el consumo y venta, Postes para cerca, estacas y varas para sostener hortalizas, Durmientes y polines para ferrocarril, corteza de árboles para fuente de tanino y pesca de peces, camarones y conchas. Estas presiones están contribuyendo en parte, con la destrucción indiscriminada de los manglares, lo cual trae consigo la alteración de las funciones naturales y ecológicas del estuario, causando problemas de erosión y contaminación (Berdiales y Chavarría, 2009) .

1.6.9.1 Deforestación del árbol de mangle en el Distrito de Chame.

La bahía de Chame ubicada en el pacífico de la república de Panamá, cuenta con una cobertura de manglares de 5980.37 hectáreas y cuenta con un Plan de Manejo, donde se definen diferentes zonas de manejo, estas son: Zona de Protección Absoluta, Zona de Especial de Manejo, Zona de Uso Sostenible, Zona de Protección Ribereña, estas zonas planifican cómo se deben manejar los manglares sosteniblemente. En todas estas zonas, la especie de mangle que predomina es mangle rojo, que son *Rhizophora racemosa* y *Rhizophora mangle*. El uso de la madera del mangle rojo en todas las comunidades que se

encuentran alrededor del área del manglar es para las actividades de carbón, leña, varas, soleras y pilotes. En el año 2005, según registro del Plan de Manejo, se cortaron 8396 árboles de mangle para diferentes usos forestales. Si esta cifra estadística se mantiene, en 13 años que han pasado hasta el año 2018, se han cortado 109 148 árboles de mangle aproximadamente (Berdiales, 2019).

2. Hipótesis y Objetivos

La hipótesis de trabajo consistió en que el aporte de residuos domiciliarios, en el vertedero del manglar de Chame, tiene influencia sobre la selección de bacterias resistentes en metales pesados.

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la resistencia al hierro, cobre y plomo en las bacterias aisladas en las aguas intersticiales del manglar de Chame.

Para alcanzar el objetivo general de este trabajo se abordaron los siguientes objetivos específicos:

- Conocer mediante la técnica de absorción atómica por espectrofotometría de llama, las concentraciones de hierro, cobre y plomo presentes en las aguas intersticiales del manglar de chame.
- Determinar la resistencia de los aislamientos, a los metales pesados como el hierro, cobre y plomo mediante los valores de concentración mínima inhibitoria.
- Identificar la posible relación de las bacterias resistentes con las concentraciones de cada metal presente en las aguas del manglar.

3. Materiales y métodos

3.1 Diseño experimental

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en $\mu\text{g}/\text{mL}$) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C . La CMI se ha establecido como “*gold Standard*” frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana (Horna *et al.*, 2012).

Materiales y reactivos

- Cepa control ATCC
- Muestra de agua
- solución de NaCl como diluyente
- Medio de cultivo agar tríptico soja (TSA)
- Caldo Luria Bertani (LB)
- Sales de metales
- Agua destilada
- Tubos de ensayo

Equipos

- Incubadora Shaker PHOENIX Instrument.
- Incubadora Termolyne.
- autoclave 2340M-B/L Heidolph
- Vortex Mixers VELP Scientifica
- Balanza digital Scout Pro.
- Balanzas Analíticas Nimbus NBL 254e
- Centrifuge 5427 R eppendorf

3.1.1 Sitios de estudio y toma de la muestra

El sitio del estudio estaba ubicado en el manglar de chame provincia de Panamá Oeste, cuyas coordenadas se muestran en la Fig. 1. El lugar de estudio se dividió en tres áreas, el cual cada área se subdividió en cinco subparcela y se obtuvo un litro de muestra para el análisis microbiológico y 500 mL de muestra para el análisis de metales pesados. Estas muestras de agua de manglar se colectaron en botellas plásticas estériles y se enfriaron inmediatamente a 4°C en el campo, hasta ser transportadas al laboratorio dentro de las 24 h (Baird, y Bridgewater, 2017).



Figura 10. Ubicaciones de las áreas de estudio en Chame. El lugar de estudio fue dividida en tres áreas, el cual cada área se dividió en cinco subparcelas. Imagen tomada de lab. Toth Research & Lab.

3.1.2 Toma de la muestra para análisis microbiológico.

Se colecto un litro de muestra por cada subparcela de cada área, en botellas plásticas autoclavadas durante 15 minutos a 121°C. Se dejó un amplio espacio aéreo en la botella (al menos 2,5 cm) para facilitar la mezcla por agitación con el preservante glicerol al 10% v/v y se almacenaron a 4°C en un tiempo inferior a 24 horas para su debido hasta su debido transporte al laboratorio Toth Research & Lab donde serán analizadas (Baird, y Bridgewater, 2017). Figura 11

3.1.3 Toma de la muestra para análisis de metales pesados

Se tomaron quince muestras con 500 mL de agua de cada subparcela por área, en el mismo lugar donde se tomaron las muestras para el análisis microbiológico, en envases plásticos lavados con agua destilada esterilizada y se autoclavaron durante 15 minutos a 121°C con las tapas parcialmente cerradas. Al tomar las muestras se dejó un amplio espacio aéreo en la botella (al menos 2,5 cm) para facilitar la mezcla por agitación con el preservante 3 mL de ácido nítrico (HNO₃) al 99% de pureza por litro de muestra a pH<2 donde se almacenaron a 4°C en un plazo inferior a 24 horas para su debido transporte al laboratorio Toth Research & Lab donde serán analizadas (Baird y Bridgewater, 2017).

3.2 Procesamiento de las muestras

3.2.1 Análisis de metales pesados en las muestras de aguas.

Las muestras de agua superficial se preservaron con HNO₃ al 50:50 y se colocaron en un baño de hielo a 20° C para su posterior análisis en el laboratorio. Para la lecturas de los metales pesados en el aguas como el Fe, Cu y Pb se empleó la técnica de espectrometría por absorción atómica de llama según el *Estándar métodos para el examen de agua y aguas residuales* (SM 3111 B).

3.2.2 Aislamiento y selección de las colonias resistentes a metales pesados.

Las bacterias resistentes a metales pesados se aislaron por el método de dilución en serie con una concentración 1/10. Para esto se tomó una alícuota de 10 ml de muestra de agua por cada botella de cada subparcela, y se diluyó en serie en agua salina estéril 0.85 % (p / v) y se agitó vigorosamente durante 5 minutos, para obtener un volumen de 100 mL de solución, las próximas diluciones de 10⁻² hasta 10⁻⁶ en se realizaron en un volumen de 10 mL de solución figura 13. Luego, se extendió una alícuota de 0,1 ml de cada dilución sobre placas con 20 mL de medio sólido agar tríptico soja (TSA) (g / L) (peptona de caseína 15, peptona de soja 5, NaCl 5, agar 15, pH 7,3) figura 13. Después de incubación a 37 °C durante 24 h. Se recogieron y purificaron colonias morfológicamente diferentes mediante subcultivo

repetido en el mismo medio. Además, todos los aislamientos bacterianos se clasificaron según la reacción de tinción de Gram (Rahman y Singh, 2018) para luego ser reservas de glicerol al 30% (v / v) a 4 ° C y -20 °C, respectivamente para su posterior análisis (Kimiran-Erdem *et al.*, 2015). Figura 14

3.2.3 Pruebas de susceptibilidad a metales pesados.

Para probar la susceptibilidad de los aislamientos a metales pesados, se determinó la CIM concentración más bajas que no producen crecimiento visible (Samples, 2018), mediante la técnica de microdilución que involucra pequeños volúmenes de caldo, en microplacas plásticas estériles de 96 pocillos con fondo en forma de U cada pocillo debe presentó un volumen final de 300 µl. Las cepas *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p se usaron como cepas de control. El método aquí descrito sigue las indicaciones de la metodología descrita en la norma ISO 20776-1 modificado de (Malbrán, 2012).

3.2.3.1 Preparación de las soluciones de metales pesados.

Se prepararon tres soluciones madres, dos 12000 mg. L⁻¹ para el FeCl₃ · 6 H₂O y el CuSO₄ · 5 H₂O y una a 15000 mg. L⁻¹ para el Pb(CH₃COO)₂ · 3H₂O. las soluciones madres de cloruro de hierro (III) y el sulfato de cobre (II) se diluyeron con caldo Lb para obtener las siguientes rangos 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, mg. L⁻¹ y para el acetato de plomo (III) 2000, 2200, 2400, 2600, 2800, 3000 mg. L⁻¹ modificado de la norma ISO 20776-1 (Martínez-Servat *et al.*, 2018).

3.2.3.2 Preparación del inóculo.

Las cepas aisladas y las cepas controles se activaron en placas de TSA, y se incubaron durante 24 horas a 37 ° C. pasado el periodo de incubación, se tomó una colonia por cada cepa y se diluyó, en 10 ml de NaCl al 0.9 % hasta alcanzar una turbidez de McFarland 0.5 (Mayrhofer *et al.*, 2008), equivalente a una concentración de 1,5 x10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC), cuya absorbancia a 600 nm es de 0.132 nm (Ortiz, 2015), este patrón 0.5 de McFarland se volvió a diluir para obtener 5 x 10⁵ CFU/mL o 5 x 10⁴ CFU/pocillo de microdilución (Malbrán, 2012).

3.2.3.3 Preparación de las microplacas y determinación de la CMI.

Las determinaciones de CMI se realizaron por duplicado por la técnica de macrodilución y microdilución en caldo. Para esto se dispersaron 150 µl de cada solución 2X de cloruro de hierro (III), sulfato de cobre (II) y acetato de plomo (III) por Se dispensaron 150 µl de cada solución 2X por concentración en cada columna de la 1-5, mientras que las columnas 6 contenía 300 µl de caldo LB solamente como control negativo para controlar la esterilidad y la columna 7 contenía 150 µl de LB con 50 µl de inóculo como control positivo. Los pocillos de microdilución del 1-5 que contenían 150 µl de las soluciones dobles de los MP se inocularon con 50 µl de inóculo que contenía entre 5×10^5 UFC / ml. Para obtener los siguientes rangos de concentración: para el cloruro de hierro (III) y el sulfato de cobre (II), 100 a 5200 mg. L⁻¹ y para el acetato de plomo (II) 1400 a 5400 mg. L⁻¹ todas las concentraciones para cada metal se realizarán por duplicado mediante la técnica de microdilución en caldo. Una vez lista las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C, y las CIM se leyeron como las concentraciones más bajas que no producían crecimiento visible modificado de (Samples, 2018).

Los rangos de CMI de los MP, que se evaluaron en los 79 aislamientos se ajustaron en concentraciones de 200 mg. L⁻¹ de manera creciente en cada pocillo de la siguiente manera: para cloruro de hierro (III) y el sulfato de cobre (II), partieron de una concentración de 100 mg. L⁻¹ hasta llegar a la concentración final que fue de 5200 mg. L⁻¹ Figura 17 y 18. Mientras que para el acetato de plomo (II) la concentración inicial fue de 1400 mg. L⁻¹ y la final de 5400 mg. L⁻¹ Figura 15. Todas las concentraciones para cada metal se realizaron por duplicado mediante la técnica de macrodilución en caldo figura 20.

3.2.4 Caracterización de las cepas resistentes.

La caracterización de los aislamientos resistentes, se realizó en el laboratorio de microbiología del Instituto Oncológico Nacional, bajo la supervisión de la Lic. Irene Espinosa.

3.2.4.1 Caracterización con el VITEK MALDI-TOF MS.

Todos los aislamientos fueron probados por duplicado, las cepas se incubaron en agar sangre durante 24h. Se tomó una parte de la colonia y se inoculó en un punto en el portaobjetos de la placa, el cual se cubrió con una gota de solución matriz preparada (que consta de una

solución de 3,10 g de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en 25,44 g de acetonitrilo, 25,57 g de etanol en 100 ml de disolvente) al punto en el portaobjetos objetivo y se dejó secar. Luego, el portaobjetos se cargó en la máquina VITEK MS. Al igual que con el sistema Microflex MS, la muestra se sometió a múltiples disparos con láser. La matriz absorbe la luz láser y se vaporiza junto con la muestra en proceso de ionización. Se usó un espectrómetro de masas VITEK para generar espectros a partir de la suspensión bacteriana y se usó el software Biotyper (versión 2.00) para analizar los resultados. Ambos sistemas fueron calibrados inmediatamente antes del análisis de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Fernández-Cadena *et al.*, 2020)

Control de calidad. *Escherichia coli* ATCC 8739, se incluyeron como controles de calidad positivos en cada ejecución con sistemas y matrices (Fernández-Cadena *et al.*, 2020).

Análisis de los datos.

Los resultados se evaluaron de acuerdo con un índice de color: verde para porcentajes $\geq 90\%$, amarillo para aquellos entre 85 y 89.9%, y blanco para aquellos por debajo del 85%. Todas las identificaciones al nivel de género o especie cayeron en la zona verde, con un puntaje superior al 90% considerado confiable. Se eligió un límite del 90% para el VITEK MS (Fernández-Cadena *et al.*, 2020).

3.2.4.2 Método VITEK[®]2

Las cepas A110-1 y A43-1 Transfirieron con un asa estéril, a partir de un cultivo puro desarrollado durante 24 h en Agar TSA, una cantidad suficiente de inóculo se transfirió a un tubo de ensayo de poliestireno claro de 12x75 mm que contiene 3 mL de solución salina estéril (Sol. Acuosa de NaCl 0.45% a 0.5%, pH 4.5 a 7.0) hasta ajustar la turbiedad a 0.50-0.63 unidades de la escala de McFarland con el densitómetro DensiChek[™]. Los tubos de ensayo que contiene la suspensión bacteriana dentro de la gradilla especial (cassette), con la tarjeta de identificación para bacilos gram negativos se colocaron en la cámara de llenado al vacío en el equipo Vitek. Una vez llenos todos los pozos de la tarjeta para identificación se procedió al sellado e incubación de las tarjetas a $35.5 \pm 1.0^\circ$ C. Los resultados fueron interpretados mediante el programa VITEK 2 Systems 08:01 (Wattal y Oberoi, 2016).

3.2.5 Análisis estadístico

La prueba Kruskal Wallis se realizó utilizando el programa estadístico SPSS 23.0 (SPSS, EE. UU.) para identificar las diferencias de concentración de metales pesados entre las áreas, y se calcularon las medias y las desviaciones estándar.

4. Resultados y Discusión

4.1 Resultados del análisis de metales pesados en las aguas del manglar.

Las concentraciones de Fe y Cu analizados en los en las tres áreas de estudio no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de metales en sus parcelas ($p > 0.05$) mostrando un patrón similar en el orden de las concentraciones (Fe>Cu>Pb) presentes en el estudio realizado en los sedimentos del manglar en la bahía Punta Mala, provincia de Los Santos en donde el orden de los mételes fueron (Fe > Pb > Cu) y de igual modo las concentraciones de Fe no presentaron diferencias significativas entre las parcelas (Defew *et al.*, 2005). Estos resultados obtenidos en Panamá, se contrasta con los datos reportados en las aguas intersticiales del manglar de Cardisoma, México en donde las concentraciones de Fe entre las parcelas no presentaron diferencias estadísticas (Rodríguez-Saldaña *et al.*, 2018). De igual manera que los datos reportados en las aguas del estuario en el manglar de Sarawak, Malasia en donde las concentraciones de Cu no presentaron diferencias significativas entre las aguas intersticiales en sus parcelas (Billah *et al.*, 2014). Sin embargo, un estudio realizado en los manglares de Malasia y en Guangzhou, al sur de China reportaron que si habían diferencias estadísticamente significativas, entre las concentraciones de Fe y Cu presente en la aguas intersticiales, en cada área de este manglar respectivamente (Billah *et al.*, 2014; Y. Chen *et al.*, 2019). Hecha esta salvedad, es probable que la falta de variación en las concentraciones de Fe y Cu en nuestro estudio se deban a los efectos causados por fenómenos biológicos y físicos, como inundación de mareas, cambios de salinidad, vientos y olas que contribuyen en las distribución y dilución de los MP (Defew *et al.*, 2005).

Como se menciona al principio de esta sección, el Fe presentó la concentración más alta entre los metales en toda la zona de estudio con una Me dé 2.11 (3.14) mg.L⁻¹ el cual supera los límites permisibles para Fe en agua potable establecidos por la OMS 2011, 2017 y la USEPA 2018 (tabla 2) (Abdeldayem, 2020; Kacmaz, 2020). Este valor se distribuye en las tres áreas, presentando concentraciones de 3.37 (175.52) mg. L⁻¹ en el área 1(vertedero) seguido área 3 o costa con un valor de (3.07 ± 2,61 mg. L⁻¹) y por último el del área 2 o intermedia con una

media de $(1.86 \pm 1,32 \text{ mg. L}^{-1})$. Estos valores en las aguas intersticiales del manglar, en las diferentes áreas rebasaron los valores reportados en otras regiones (Tabla 3). Estas concentraciones de Fe en el agua intersticiales son más altas debido a los desechos generados por actividades antropogénicas en el manglar (Ngole-Jeme *et al.*, 2016), tales como la industria de la maricultura del camarón, deforestación de los manglares, en particular *Rhizophora racemosa* y *Rhizophora mangle* el cual es empleado en la extracción de carbón vegetal, madera para construcciones urbanas y rurales, leña para consumo y venta, postes para cercas, estacas y varas para sostener hortalizas (Berdiales y Chavarría, 2009). Estas especies desempeñan un papel importante en la disminución de Fe, gracias a su capacidad de bioacumularlos en sus tejidos por lo que contribuyen en la disminución de Fe en las aguas intersticiales de manglar (Duarte, Pereira, y Pinheiro, 2017; Gopalakrishnan *et al.*, 2020). Por tanto, estas prácticas aumentan las concentraciones de MP en los sedimentos del manglar en Camerún, ya que se obtuvieron menores concentraciones en aquellas zonas donde había mayor abundancia y diversidad de manglar (Ngole-Jeme *et al.*, 2016). Sin embargo existe evidencia de que las altas concentraciones de Fe en los manglares acelera el crecimiento y permite la tolerancia al Cadmio en plantas tales como *Avicennia marina*, ya que el Cd es un elemento venenoso (Jian, *et al.*, 2019).

Entre otras actividades antropogénicas que se realizan en el manglar de Chame, podemos mencionar el ingreso anual de 35 toneladas de residuos domiciliarios al día, lo que puede contribuir con el ingreso de Fe en las aguas del manglar (Arosemena *et al.*, 2015) ya que la mayoría de los desechos, contribuyen con el aporte de Fe en el agua, donde pueden permanecer de manera soluble y no en los sedimentos como óxidos, hidróxidos y sulfuros en donde permanecen en altas concentraciones de manera insoluble (Saifullah, Ismail *et al.*, 2004) gracias a la acción oxido reductora de los MP, por parte de los microorganismos presentes en el manglar (Fernández-Cadena *et al.*, 2020).

A, pesar de que el Fe juega un papel importante en los procesos metabólicos de los seres vivos (Rössler *et al.*, 2020), Los excedentes acumulados en el manglar, pueden viajar a través de las corrientes de marea y las redes alimentarias, y finalmente llegan a las personas a través del consumo de (Kumar *et al.*, 2019) camarones, cangrejos y conchas (Arosemena, Galvis, y González, 2015). Estas prácticas pueden provocar la bioacumulación del hierro, el cual

sobrecarga en la capacidad de amortiguación de la transferrina, evitando que hierro se una a esta enzima, lo que provoca que sea adsorbido en el hígado, corazón y las glándulas endocrinas, provocando daño oxidativo y la disfunción orgánica, lo que conduce a la cirrosis, cardiomiopatía, diabetes mellitus, carcinoma hepatocelular y asociado enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y la enfermedad de Alzheimer (Dev y Babitt, 2017), entre otras enfermedades neurodegenerativa está el deterioro de la memoria de motivación emocional y de reconocimiento en neonatos debido a la sobrecarga de hierro durante el periodo de lactancia. (Figueiredo *et al.*, 2016).

Las concentraciones para el Cu obtenidas en las aguas intersticiales fueron de $(0.13 \pm 0.10 \text{ mg. L}^{-1})$ en el vertedero, seguido del área 3 $(0.08 \pm 0.01 \text{ mg.L}^{-1})$ y $(0.07 \pm 0.01 \text{ mg. L}^{-1})$ en el área intermedia, dando como resultado una concentración total de $(0.09 \pm 0.06 \text{ mg. L}^{-1})$ el cual no superó los valores de límites permisibles para agua potable establecidos por la OMS 2011, 2017 y la USEPA 2018 (tabla 2) (Abdeldayem, 2020; Kacmaz, 2020). El cual podría ser baja debido al efecto de dilución del agua en la época lluviosa en que fue colectada (Ali, Ali, Islam, y Rahman, 2016), actividades de las mareas (Billah *et al.*, 2014) o la precipitación de estos en los sedimentos, ya que los manglares juegan un papel clave como sumideros de MP (Fernández-Cadena *et al.*, 2020). Sin embargo estos valores son superiores a los reportados en otras regiones (Tabla 3), a excepción de Vietnam que reportó un promedio de 0.08 mg.L^{-1} en los manglares ubicados en la costa sur, el cual se asemeja a los datos obtenidos en el área dos y tres. Es probable que tengamos concentraciones más altas a las reportadas en otros países, por motivo de las actividades antropogénicas mencionadas (Berdiales y Chavarría, 2009) y al aporte anual de las 35 toneladas de basura (Arosemena, Galvis, y González, 2015).

Para el Pb se obtuvieron lecturas menor a 0.20 mg.L^{-1} (Cuadro 1) debido a que el límite de detección del equipo, que no permite medir rangos inferiores a este valor, o que las concentraciones presentes en el agua podrían tener valores menores que la curva de calibración.

4.2 Aislamiento y selección de las colonias resistentes a metales pesados.

De 79 cepas aisladas, 56 (71%) corresponden al área del vertedero, 16 al área media y 7 al área costa (Tabla 4). En este estudio, se aisló una mayor diversidad de colonias bacterianas

en las áreas del vertedero, el cual recibe un ingreso anual de 35 toneladas de residuos domiciliarios al día (Arosemena *et al.*, 2015). Por lo que es probable, que estos desechos orgánicos de origen domésticos, aportan nutrientes como C,H,O,N,P,S y Se los cuales influyen en la distribución de las comunidades microbiana en los manglares (Seale, 2019; Zhang *et al.*, 2019). Estos desechos, no solo aportan los bioelemento básicos para los bloques de construcción de las biomoléculas, sino que también aportan otros componentes biodegradables que son metabolizadas por las bacterias mediante una serie de reacciones bioquímicas complejas (S. jia Liu *et al.*, 2019).

Sin embargo, existen otros factores que pueden influir en la abundancia y diversidad de la microbiota del manglar, como el mal manejo de los desechos proveniente de hogares en zonas aledañas (Arosemena *et al.*, 2015), ya que un estudio realizado en los vertederos de Estados Unidos, afirmaron que estas actividades fomentan un microbioma único y esencialmente distinto de cualquier ecosistema natural o artificial y que a su vez, estos desechos domésticos, ejercen fuerzas selectivas responsables de la diversidad microbiana (Stamps *et al.*, 2016). Además, otro estudio realizado en los grandes rellenos sanitarios al Norte y Oeste de China, demostraron mediante la técnica secuenciación de alto rendimiento genético, que los Filum predominante (Firmicutes y Proteobacterias),se vieron afectados por la carencia de nitrógeno, la humedad, el pH, y el carbono orgánico disuelto (Stamps *et al.*, 2016) las cuales están presente en los manglares. Estas condiciones favorecen la distribución y abundancia de las bacterias (Almahasheer *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2017; SamKamaleson y Gonsalves, 2019).

A diferencia del área 1, en el área intermedia solo se aislaron 16 (20%) morfotipos de colonias bacterias (Cuadro 4). Es probable que la disminución, en la abundancia en los morfotipos de las colonias bacterianas, se deba a que en la subparcela 1, 2 y 3 presentaron aguas estancadas (anóxicas) por lo que podría albergar especies como *Clostridium sp.* que requieren condiciones anaerobias para su crecimiento en el laboratorio (Shanmugam *et al.*, 2019). En estas subparcelas también se observó un sedimento oscuro por debajo de la capa superficial del suelo el cual estaba cubierto por 30 cm de agua aproximadamente, lo que podría indicar la presencia de bacterias anaerobias como las oxidantes de azufre que juegan un papel importante en la desintoxicación del sulfuro en agua y sedimento de manglar

(SamKamaleson y Gonsalves, 2019). Estas condiciones anaeróbicas limitan la diversidad de bacterias aeróbicas, ya que la carencia de oxígeno impide la degradación de la materia orgánica que es indispensable para el crecimiento de bacterias aeróbicas, por lo que podría ser un factor que redujo la abundancias y diversidad de bacterias aeróbicas (Cavan, Trimmer, Shelley, y Sanders, 2017). Debido a que las bacterias anaeróbicas requieren condiciones fisicoquímicas especiales para su crecimiento (Lu *et al.*, 2019; Raimi, Ezeokoli, y Adeleke, 2019).

Sin embargo las muestras de las subparcela 4 y 5 que se tomaron del estero proveniente del río Lagarto, el cual se caracterizó por ausencia de turbidez, malos olores o algún tipo eutrofización por lo que la baja abundancia de morfotipos bacterianos podría deberse a las condiciones climáticas (Zhang *et al.*, 2019) como la lluvia, el cual influye fuertemente en la distribución general y la abundancia relativa de las comunidades microbianas (Xu *et al.*, 2017), o las actividades de las mareas que desempeñan un papel importante en las aguas de los manglares (Cavan *et al.*, 2017).

De manera similar al área intermedia, el área 3 también presentó una disminución en cuanto a la abundancia de las colonias bacterianas. Esta área se aislaron 7 (9%) colonias diferentes las cuales fueron aisladas de las aguas en el estero del río Lagarto y la quebrada de Caño sucio, el cual se caracterizó por presentar aguas muy cristalinas con ausencia visible de algún tipo de eutrofización que pudiera provocar un incremento de la microbiota del manglar, ya que estos factores influyen en la abundancia y diversidad microbiana (Wei, Kao, y Liu, 2020).

En última instancia, estos resultados sostienen que la materia orgánica es esencial para el sostenimiento de la vida (Seale, 2019; Zhang *et al.*, 2019), ya que a medida que nos alejamos del área 1 se observa una disminución, en la abundancia de colonias bacterias cultivables bajo nuestras condiciones de laboratorio (Cuadro 5).

4.3 Caracterización de la de cepas resistentes.

Mediante el análisis de VITEK MALDI-TOF MS se identificaron las cepas: *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* y *Klebsiella aerogenes* las cuales pertenecen al Orden Enterobacteriales, de igual manera de se caracterizaron tres cepas como *Bacillus altitudinis/pumilus* el cual corresponde al orden Bacillales presentando un nivel de confianza del 99.9 % . Sin embargo, las cepas caracterizadas como *S. marcescens* y *K. aerogenes* fueron confirmadas mediante la técnica de VITEK[®]2 para bacterias Gram negativas no formadoras de esporas, dando como resultado un excelente nivel de confianza de un 99% de probabilidad. Estos resultados se contrastan con otros estudios que han demostrados el aislamiento de Enterobacterias y Bacillales resistentes a múltiples metales en manglares, que presentaron alta interacciones antropogénicas como en el caso del manglar del estado de Kerala, al sur de la India (Imchen *et al.*, 2019), o los manglares al Noroeste (Sacramento *et al.*, 2018) y sur de Brasil (Huerdo *et al.*, 2018).

4.4 Tolerancia de los aislamientos, frente a los a los MP.

De los 79 aislamiento, se tomaron como resistentes aquellas cepas, que superaron los valores de CMI de la cepa control *Escherichia coli* ATCC 8739, (Cuadro 7). El valor de CMI que presentó nuestra cepa control, para el $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ es similar al valor reportado por Samples y sus colaboradores, en el cual la cepa control de *E. coli* ATCC 25922 empleada en ese estudio presentó una CMI de $1.024 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para el mismo metal (Samples, 2018).

Basado en los valores de CMI, que presentó cepa control *Escherichia coli* ATCC 8739 y las cepas control de confirmación *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p y la *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027 (Tabla 6) (Samples, 2018). De los 79 aislamientos, 7 cepas (8.8%) presentaron resistencia a MP (Cuadro 7), los cuales corresponden al área del vertedero subparcela 1 (A1), quien se caracterizó por presentar concentraciones de hierro en sus aguas, superan los valores de permisible para metales en agua (Cuadro 2). Igualmente, las concentraciones de hierro y cobre, fueron mucho más altas a las reportadas en las aguas intersticiales en otros manglares (cuadro 3). Es probable que la concentración de $107.84 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ registrada en la subparcela 1 del cual se aislaron todas las cepas resistentes, pudo

haber influido en la selección de los 6 fenotipos resistentes al hierro (III) (Atashgahi *et al.*, 2018)

La resistencia de las bacterias, en los ambientes naturales se debe a la rápida respuesta, de las bacterias frente a las altas concentraciones de hierro, en las aguas intersticiales del área del vertedero, han permitido el aislamiento de *Bacillus altitudinis/pumilus* resistentes al Fe³⁺ y Cu²⁺, los cuales se relacionan con los estudios reportados en los manglares de la India, en donde aisló una cepa de *Bacillus pumilus* resistentes al Fe (Rishad *et al.*, 2017) y otra caracterizada como *Bacillus altitudinis* resistente al Cu, la cual se presume que la resistencia de esta cepa frente al Fe y Cu se deba a las actividades antropogénicas que se realizan en el manglar (Kayalvizhi y Kathiresan, 2019). Lo cual sugiere que dichas actividades antropogénicas (Berdiales y Chavarría, 2009) pudieron haber influido en el proceso de selección de fenotipos resistentes a MP (Ferences, Knowled, y Nts, 2014; Sultan *et al.*, 2018). Este proceso ocurre, cuando las bacterias están expuestas a fuerzas selectivas, como el ambiente contaminado con altas concentraciones de sustancias tóxicas, que seleccionan la supervivencia y proliferación de genotipos microbianos específicos. Debido a que los ambientes extremos y contaminados muestran el poder de tales fuerzas selectivas (Atashgahi *et al.*, 2018), o en algunos casos los recursos presente en un microhábitat colonizado por bacterias disminuyen, estas migran a regiones de selección espacialmente distintas, en lugar de competir con sus vecinos por recursos limitados, un individuo adaptado solo necesita ser el primero con la capacidad de aventurarse y sobrevivir en una nueva región para considerarse como resistente (Baym *et al.*, 2014)

Los distintos valores de CMI, para un solo tipo de MP en una sola especie de bacteria, como en el caso de nuestra cepa *B. altitudinis/pumilus* (Cuadro 7) se deba a la migración de las bacterias por quimiotaxis u acción mecánica en el hábitat, cuando los nutrientes se agotan por lo que se desplazan a otras regiones donde las concentraciones del metal, son cada vez más altas, permitiendo que sólo los mutantes cada vez más resistentes puedan colonizar secciones que contienen niveles cada vez más altos de MP (Baym *et al.*, 2014; Atashgahi *et al.*, 2018). Cuando estos linajes resistentes (primera generación), alcanzan concentraciones mayores de metales pesados el cual gran parte de la nueva población de mutantes tampoco pueden crecer, la segunda generación de bacterias mutantes que han surgiendo en la primera generación,

poseerán genes distintos a la primera permitiéndole expandirse y reproducirse por lo proceso se repite. Este proceso selectivo no solo les permite a las bacterias alcanzar y extenderse en lugares donde la concentración de Fe es cada vez más alta, sino que también provoca la aparición de cepas pertenecientes a la especie tolerantes a diferentes concentraciones de MP. Esto ocurre a medida que los mutantes van migrado a diferentes zonas, donde las concentraciones de MP van cambiando y los primeros linajes resistentes van quedando atrás, porque se mueven de manera difusa sin un gradiente de nutrientes, lo que resulta que algunos linajes bloqueen completamente el crecimiento de otros y creen cepas de la misma o distintas especie como toleren diferentes concentraciones del mismo metal como el caso del Fe (Baym *et al.*, 2014). Del mismo modo, este principio se puede aplicar en otros metales distintos al Fe, u otros contaminantes, ya que pudieron haber influido en la resistencia de los aislamientos en este estudio, mediante mecanismos de coselección, causado por la contaminación ambiental presente en el manglar (Atashgahi *et al.*, 2018). Estos contaminantes seleccionan a los fenotipos mutantes, a través de sus genes de resistencia que en la mayoría de la veces no solo confiere resistencia a los MP sino que también a los biocidas y antibióticos (Cantón y Ruiz-Garbajosa, 2011; Pal *et al.*, 2015).

La cepa caracterizada como *Klebsiella aerogenes* el cual es considerada como un patógeno oportunista (Passarelli-Araujo *et al.*, 2019), presentó resistencia al Fe III y Cu II, estos hallazgos se contrastan con los datos reportados en los manglares de Malasia, y en las islas Mauricio, en donde se aislaron cepas de *K. aerogenes* resistentes al hierro III (Ghaderpour *et al.*, 2014; Rampadarath *et al.*, 2018). Mientras que en los manglares de Sundarbans de Bengala Occidental en la India, se aisló una cepa de *K. aerogenes* resistente al cobre (Cu^{2+}) cuyas concentraciones oscilaban entre 1801.6 a 4504.0 mg.L^{-1} (Choudhury y Kumar, 1998).

Con el propósito de tolerar las altas concentraciones de hierro III, presentes en las aguas intersticiales en el área del vertedero, es probable que nuestra cepa de *K. aerogenes* esté empleando mecanismo para reducir el Fe (III), ya que este mecanismo ha sido estudiado en una cepa de *K. aerogenes* XM02, productora de hidrógeno (Zhang *et al.*, 2009). Estas bacterias desasimiladoras reductoras de hierro (BDRH), oxidan la materia orgánica con la reducción de Fe (III) a Fe (II) en condiciones anóxicas, las cuales estaban presente en las aguas donde aislo esta cepa. Se ha demostrado que muchas cepas de *Klebsiella sp.* pueden

reducir el citrato de Fe (III) y biodegradar algunos compuestos clorados, tales como clorpirifos, o eliminarlos mediante las especies de Fe (II) que reducen abióticamente los contaminantes clorados (Li *et al.*, 2009).

Al igual que los mecanismo empleados para reducir el Fe (II), es probable que nuestra cepa también esté empleando mecanismo para secuestrar iones de Fe³⁺ y Fe, ya que estos iones son utilizados como un cofactor para la enzima promiscua llamada glicofosfodiesterasa (*gpdQ*) (Schenk *et al.*, 2012), la cual es una metalohidrolasa dinuclear con preferencia de iones metálico Fe² (Hadler *et al.*, 2010), aunque también posee permite la unión de otros iones metálicos tanto como de sustratos (Daumann *et al.*, 2013). Si bien esta promiscuidad puede afectar negativamente la eficiencia catalítica de la enzima, su capacidad para hidrolizar algunos organofosforados (OF) y subproductos de la degradación de OF han convertido a *gpdQ* en un candidato prometedor para bioremediación de agentes nerviosos organofosforados VX, el cual se le hidroliza los enlaces organofosfato (Schenk *et al.*, 2012), y la biorremediación de pesticidas (Hadler *et al.*, 2010). Por lo tanto es de esperar el aislamiento de bacterias con el potencial de biorremediar pesticidas y compuestos OF, en sitios contaminados con altas concentraciones de metales pesados u otros contaminantes como como los que pueden estar en el citio del vertedero (Chiboub *et al.*, 2016; Atashgahi *et al.*, 2018).

Las altas concentraciones de Hierro (Cuadro 1), y el aporte de basura en el área del vertedero también han permitido el aislamiento de dos cepas de *Proteus mirabilis*, de las cuales una presenta resistencia al hierro III y la otra al plomo II, hasta octubre del año 2019 solo se reportó el aislamiento de esta cepa en los manglares de Malasia, el cual presenta la capacidad de sintetizar proteasas (Mustapha., 2012). Sin embargo, un estudio realizado en el arroyo de Panteka ubicado al norte de Kaduna, Nigeria aislaron una cepa de *P. mirabilis*, el cual presentó resistencia al hierro y plomo, y a su vez pudo disminuir las concentraciones de estos metales a un 53,51% y 100% respectivamente. Estos resultados mostraron el potencial de *P. mirabilis* al biorremediar metales pesados en agua contaminadas (Elizabeth, *et al.*, 2017)

Si bien, la relación de *Proteus mirabilis* con el hierro, ha sido bien estudiada en las infecciones relacionadas con tracto urinario, en donde expresa proteínas de membrana

externa reguladas por hierro, en respuesta a la restricción del hierro (Lima *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009). Como resultado, a las condiciones limitantes de hierro en el tracto urinario, se han identificado 45 genes regulados por hierro en una cepa de *P. mirabilis* HI4320, los cuales representan 21 sistemas putativos regulados por hierro, que han sido clasificado en dos grupos genéticos el, PMI0229-0239 y PMI2596-2605, involucrados en la expresión del sistemas de sideroforos putativos. El PMI0229-0239 codifica un sistema sideroforo independiente de péptidos no ribosómicos, llamado proteobactina que no ha sido descrito en ninguna especie bacteriana (Himpsl *et al.*, 2010). Aunque, está claro que la producción de sideróforos se realiza bajo condiciones limitantes de hierro, estudios realizados con *Pseudomonas fluorescens* han demostrado que esta cepa es capaz de producir sideróforos en concentraciones superiores a los 250 mg.L⁻¹ cuando crecía conjuntamente con plomo 500 µM y 30 unidades/ml de penicilina (Rachid y Ahmed., 2005). Por lo tanto, es probable que la presencia de plomo en las aguas del área del vertedero, hayan contribuido con la capacidad de nuestra cepa para el tolerar hierro, de la manera como lo realiza *P. fluorescens* ya que ambas pertenecen a la clase Gammaproteobacteria (Cavaliere *et al.*, 2014).

En nuestro estudio, asilamos una cepa de *Serratia marcescens* no pigmentada la cual se puede encontrar en ambientes naturales (Martineau *et al.*, 2018), la cual normalmente se caracteriza por la producción de un pigmento color rojo u amarillo (naranja amarillento) llamado prodigiosina, que se expresa dependiendo de los nutrientes y el pH (Andreyeva y Ogorodnikova, 2015), o como mecanismo de protección contra otras bacterias (Castillo-Zacarías *et al.*, 2019). Actualmente se describen dos biotipos diferentes de esta bacteria, las pigmentadas y no pigmentadas, siendo este último descrito en algunos estudios como virulento (Castillo-Zacarías *et al.*, 2019). Por otro parte, nuestros reultados han demostrado que nuestra cepa presento resistencia al Cloruro de hierro (III) (Ccuadro 7) asemejándose a los resultados obtenidos en los manglares de Malasia (Ghaderpour *et al.*, 2014), contrario a los hallazgos obtenidos en años anteriores donde habían reportaron una cepa de *S. marcescens* WPRA3 pigmentada con resistencia a diversos MP entre ellos el Pb (Jafarzade *et al.*, 2012).

Es probable que la capacidad de nuestra cepa *S. marcescens* no pigmentada al tolerar altas concentraciones de hierro (III) se deba a un proceso de reducción química, de las formas no

solubles de Fe (III), por medio de la oxidación del acetato, glucosa, glicerol u otra molécula orgánica el cual se encuentran en el medio ambiente, ya que algunos de ellos se forman como resultado del proceso de fermentación previo realizado por otros microorganismos, siendo el acetato y glucosa los mejores donadores de electrones, aunque otros estudios demuestra que el acetato también actúa como un buen donador de electrones (Castillo-Zacarías *et al.*, 2019). No obstante, otros estudios han demostrado que al igual que *P. mirabilis*, *S. marcescens* también es capaz de disminuir la concentraciones de Fe y Pb presentes en las aguas del arroyo en Panteka, Nigeria a un 53.51% y 100 % respectivamente. (Elizabeth *et al.*, 2017).

No obstante, el conocer a cabalidad los mecanismos de resistencia empleados por nuestros aislamientos representa una limitante, ya que son pocos los estudios realizados con *S. marcescens* resistentes al hierro, dado que al igual como ocurre con *K. aerogenes* y *P. mirabilis* los estudios realizados con estas cepas, están enfocados en el proceso de adsorción del hierro cuando las concentraciones oscilan entre unos 2×10^{-3} mg.L⁻¹ o su papel como patógeno clínico (Angerer, Klupp, y Braun, 1992 ; Benevides-Matos y Biville, 2010 ; Lin *et al.*, 2016 ; Exner *et al.*, 2020).

En resumen, nuestros aislamientos, mostraron un patrón similar de tolerancia al hierro (III) lo que podría atribuirse al hecho de que los aislamientos están estrechamente relacionados genéticamente, ya que los resultados de la tinción de Gram mostraron que la mayoría de los aislamientos son gramnegativos y pertenecen al orden Enterobacterales (Elizabeth *et al.*, 2017), y al Bacillales, la cual este último fue reportado como un grupo de organismos resistentes a metales pesados, en un estudio realizado en dos compostes comerciales de residuos sólidos urbanos (Silva, *et al.*, 2016). Sin embargo la adquisición de resistencia por parte de ambos ordenes, frente a los MP se debe a un proceso de selección natural, el cual ocurre a medida que surgen mutantes resistentes en la población, y estos migran por quimiotaxis o la población mixta queda expuesta a las altas concentraciones de sustancias tóxicas antropogénicas (Baym *et al.*, 2014), como aceite, solventes clorados, antibióticos, MP o al estrés físico, lo que favorece la selección de fenotipos resistentes a MP en las comunidades bacterianas (Atashgahi *et al.*, 2018; Squadrone, 2020).

5. Conclusión y recomendación

- Los resultados demostraron nuestra hipótesis, debido a que la mayoría de los aislamientos presentaron resistencia al hierro (III), siendo este el metal con mayor concentración en el manglar. Estos resultados indican las fuerzas selectivas que están ejerciendo estos contaminantes sobre la microbiota del manglar.
- La influencia de residuos domiciliarios en el vertedero de Chame están provocando en aumento de hierro y cobre en las aguas del manglar, cercanas al vertedero.
- Las altas concentraciones de hierro presente en las aguas intersticiales, cercanas al manglar están provocando la selección de bacterias resistentes a metales pesados, particularmente el hierro.
- Los ordenes bacterianos obtenidos en las aguas intersticiales del manglar que presentaron resistencia fueron las Enterobacterales y Bacillales.

Recomendaciones

- Exhortamos a realizar futuras investigaciones sobre los mecanismos de resistencia para el hierro (III) y el plomo (II) en *Serratia marcescens* y *Proteus mirabilis* ya que otros estudios han demostrado que estas disminuyen las concentraciones de MP en aguas contaminadas.
- En vista a la poca información sobre los mecanismos de resistencia al hierro (III) por *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* y *Klebsiella aerogenes* sugerimos realizar ensayos que involucren el crecimiento de estas cepas en altas concentraciones de hierro para así identificar los genes involucrados en los mecanismos de resistencia.

Ya que diversos estudios muestran el comportamiento de estas cepas cuando las concentraciones de hierro son limitadas.

- Recomendamos que se apliquen debidamente las normas sobre la tala y deposición de residuos domiciliarios en el vertedero, porque estas actividades podrían causar la selección de fenotipos bacterianos resistentes a los antimicrobianos debido al aumento en la concentración de hierro y cobre en las agua del manglar, aledañas al vertedero.

6. – Referencia

Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S., y Gupta, R. S. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 5575-5599. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>

Ali, M. M., Ali, M. L., Islam, M. S., y Rahman, M. Z. (2016). Preliminary assessment of heavy metals in water and sediment of Karnaphuli River, Bangladesh. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 5, 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2016.01.002>

Almahasheer, H., Serrano, O., Duarte, C. M., y Arias-ortiz, A. (2017). Low Carbon sink capacity of Red Sea mangroves. *Scientific Reports*, (June), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10424-9>

Almahasheer, H., Serrano, O., Duarte, C. M., y Irigoien, X. (2018). Remobilization of Heavy Metals by Mangrove Leaves, 5(December), 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00484>

Alongi, D. M. (2010). Dissolved iron supply limits early growth of estuarine mangroves. *Ecology*, 91(11), 3229-3241. <https://doi.org/10.1890/09-2142.1>

America Del Norte / Panamá (Panama City) / Panama / Distrito Chame. (s. f.). Recuperado 9 de enero de 2020, de http://es.getamap.net/mapas/panama/panama/_chame_distrito/

Analuddin, K., Sharma, S., Jamili, X., Septiana, A., Sahidin, I., Rianse, U., y Nadaoka, K. (2017). Heavy metal bioaccumulation in mangrove ecosystem at the coral triangle ecoregion, Southeast Sulawesi, Indonesia. *Marine Pollution Bulletin*, (July), 0-1. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.07.065>

Andreyeva, I. N., y Ogorodnikova, T. I. (2015). Pigmentation of *Serratia marcescens* and spectral properties of prodigiosin. *Microbiology (Russian Federation)*, 84(1), 28-33. <https://doi.org/10.1134/S0026261715010026>

Angerer, A., Klupp, B., y Braun, V. (1992a). Iron transport systems of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 174(4), 1378-1387. <https://doi.org/10.1128/jb.174.4.1378-1387.1992>

Arosemena, J. D., Galvis, S., y González, A. (2015). *Chame un manglar contaminado, producto de un vertedero colapsado*. Recuperado de <https://piraguamdp.com/2018/03/14/chame-un->

manglar-contaminado-producto-de-un-vertedero-colapsado/

Ashokkumar, S., Mayavu, P., Sampathkumar, P., Manivasagam, P., Rajaram, G., Marinebiology, C. a S., y Nadu, T. (2009). Seasonal Distribution of Heavy Metals in the Mullipallam Creek of Muthupettai Mangroves (Southeast Coast of India). *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 4(4), 308-312.

Atashgahi, S., Sánchez-Andrea, I., Heipieper, H. J., van der Meer, J. R., Stams, A. J. M., y Smidt, H. (2018). *Prospects for harnessing biocide resistance for bioremediation and detoxification*. 746(May), 743–746.

Bastakoti, U., Robertson, J., y Alfaro, A. C. (2018). Spatial variation of heavy metals in sediments within a temperate mangrove ecosystem in northern New Zealand. *Marine Pollution Bulletin*, 135(April), 790-800. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.08.012>

Baird, R., y Bridgewater, L. (2017). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 23rd edition. Washington, D.C.: American Public Health Association.

Baym, M., Lieberman, T., Kelsic, E., Chait, R., Gross, R., Yelim, I., y Kishony, R. (2014). *Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes*. 3072(2012), 598–600. <https://doi.org/10.1126/science.aag0822>

Ben Maamar, S., Hu, J., y Hartmann, E. M. (2019). Implications of indoor microbial ecology and evolution on antibiotic resistance. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41370-019-0171-0>

Benevides-Matos, N., y Biville, F. (2010). The Hem and Has haem uptake systems in *Serratia marcescens*. *Microbiology*, 156(6), 1749-1757. <https://doi.org/10.1099/mic.0.034405-0>

Berdiales, J. A. (2019). La agonía de los manglares del Pacífico panameño. Recuperado 9 de enero de 2020, de <https://www.laestrella.com.pa/opinion/columnistas/190520/agonia-pacifico-panameno-manglares>

Berdiales, J., y Chavarría, J. (2009). *Informe del componente de manglar region de Panamá Oeste*. Recuperado de http://www.itto.int/files/itto_project_db_input/2457/Technical/infochame_manglar_I_y_II.pdf

Billah, M., Kamal, A. H. M., Idris, M. H. Bin, Johan Bin, I., y Bhuiyan, K. A. (2014). Cu, Zn, Fe, and Mn in mangrove ecosystems (sediment, water, oyster, and macroalgae) of Sarawak, Malaysia. *Zoology and Ecology*, 24(4), 380-388. <https://doi.org/10.1080/21658005.2014.978527>

Bridges, C. C., y Zalups, R. K. (2005). Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204(3), 274-308. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.09.007>

Bruins, M. R., Kapil, S., y Oehme, F. W. (2000). Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45(3), 198-207. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1860>

Cantón, R., y Ruiz-Garbajosa, P. (2011, octubre 1). Co-resistance: An opportunity for the bacteria and resistance genes. *Current Opinion in Pharmacology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.07.007>

Carugati, L., Gatto, B., Rastelli, E., Martire, M. Lo, Coral, C., Greco, S., y Danovaro, R. (2018). Impact of mangrove forests degradation on biodiversity and ecosystem functioning. *Scientific Reports*, (August), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31683-0>

Castillo-Zacarías, C., Cantú-Cárdenas, M. E., López-Chuken, U. J., Parra-Saldívar, R., Garza-Gonzalez, M. T., de Jesús Rostro-Alanis, M., y Villarreal-Chiu, J. F. (2019). Dissimilatory reduction of Fe(III) by a novel *Serratia marcescens* strain with special insight into the influence of prodigiosin. *International Microbiology*, (Iii). <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00088-y>

Cavaliere, P., Levi-Acobas, F., Mayer, C., Saul, F. A., England, P., Weber, P., ... Norel, F. (2014). Structural and functional features of Crl proteins and identification of conserved surface residues required for interaction with the RpoS/ σ Ssubunit of RNA polymerase. *Biochemical Journal*, 463(2), 215-224. <https://doi.org/10.1042/BJ20140578>

Cavan, E. L., Trimmer, M., Shelley, F., y Sanders, R. (2017). Remineralization of particulate organic carbon in an ocean oxygen minimum zone. *Nature Communications*, 8(May 2016). <https://doi.org/10.1038/ncomms14847>

Chaoua, S., Boussaa, S., El Gharmali, A., y Boumezzough, A. (2019). Impact of irrigation with wastewater on accumulation of heavy metals in soil and crops in the region of Marrakech in Morocco. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 18(4), 429-436. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2018.02.003>

Chen, G., Azkab, M. H., Chmura, G. L., Chen, S., Sastrosuwondo, P., Ma, Z., ... Chen, B. (2017). Mangroves as a major source of soil carbon storage in adjacent seagrass meadows. *Nature Publishing Group*, (February), 1-10. <https://doi.org/10.1038/srep42406>

Chen, Y., Huang, H., Ding, y., Chen, W., Luo, J., Li, H., ... Qi, S. (2019). Trace metals in aquatic environments of a mangrove ecosystem in Nansha, Guangzhou, South China: pollution status, sources, and ecological risk assessment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 191(10). <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7732-5>

Chenia, H. Y., y Jacobs, A. (2017). Antimicrobial resistance, heavy metal resistance and integron content in bacteria isolated from a South African tilapia aquaculture system. *Diseases of Aquatic Organisms*, 126(3), 199-209. <https://doi.org/10.3354/dao03173>

Chiboub, M., Saadani, O., Fatnassi, I. C., Abdelkrim, S., Abid, G., Jebara, M., y Jebara, S. H. (2016). Characterization of efficient plant-growth-promoting bacteria isolated from *Sulla coronaria* resistant to cadmium and to other heavy metals. *Comptes Rendus - Biologies*, 339(9-10), 391-398. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2016.04.015>

Choudhury, P., y Kumar, R. (1998). Multidrug- and metal-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from *Penaeus monodon* of the coastal waters of deltaic Sundarban. *Canadian Journal of Microbiology*, 44(2), 186-189. <https://doi.org/10.1139/w97-144>

Clark, M. W. (1998). Management implications of metal transfer pathways from a refuse tip to mangrove sediments. *Science of the Total Environment*, 222(1-2), 17-34. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00283-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00283-6)

Colavecchio, A., Cadieux, B., Lo, A., y Goodridge, L. D. (2017). Bacteriophages contribute to the spread of antibiotic resistance genes among foodborne pathogens of the Enterobacteriaceae family - A review. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01108>

Collins-Fairclough, A. M., Co, R., Ellis, M. C., y Hug, L. A. (2018). Widespread Antibiotic, Biocide, and Metal Resistance in Microbial Communities Inhabiting a Municipal Waste Environment and Anthropogenically Impacted River. *mSphere*, 3(5), 1-17. <https://doi.org/10.1128/msphere.00346-18>

Cornu, J. Y., Huguenot, D., Jézéquel, K., Lollier, M., y Lebeau, T. (2017). Bioremediation of copper-contaminated soils by bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(2), 0. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2191-4>

Costa-Böddeker, S., Hoelzmann, P., Thuyên, L. X., Huy, H. D., Nguyen, H. A., Richter, O., y Schwalb, A. (2017). Ecological risk assessment of a coastal zone in Southern Vietnam: Spatial distribution and content of heavy metals in water and surface sediments of the Thi Vai Estuary and Can Gio Mangrove Forest. *Marine Pollution Bulletin*, 114(2), 1141-1151. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.046>

Culurgioni, S., Harris, G., Singh, A. K., King, S. J., y Walsh, M. A. (2017). Structural Basis for Regulation and Specificity of Fructooligosaccharide Import in *Streptococcus pneumoniae*. *Structure*, 25(1), 79-93. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.11.008>

de Lima e Silva, A. A., Ribeiro de Carvalho, M. A., L de Souza, S. A. L., Teixeira Dias, P. M., da Silva Filho, R. G., de Meirelles Saramago, C. S., ... Hofer, E. (2012). Heavy metal tolerance (Cr, Ag and Hg) in bacteria isolated from sewage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1620-1631. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400047>

Defew, L. H., Mair, J. M., y Guzman, H. M. (2005). An assessment of metal contamination in mangrove sediments and leaves from Punta Mala Bay, Pacific Panama. *Marine Pollution Bulletin*, 50(5), 547-552. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.11.047>

Deng, X., y Wang, P. (2012). Isolation of marine bacteria highly resistant to mercury and their bioaccumulation process. *Bioresource Technology*, 121, 342-347. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.017>

Dev, S., y Babitt, J. L. (2017). Overview of iron metabolism in health and disease. *Hemodialysis International*, 21, S6-S20. <https://doi.org/10.1111/hdi.12542>

Diallo, A., Foster, H. R., Gromek, K. A., Perry, T. N., Dujeancourt, A., Krasteva, P. V., ... Fronzes, R. (2017). Bacterial transformation: ComFA is a DNA-dependent ATPase that forms complexes with ComFC and DprA. *Molecular Microbiology*, 105(5), 741-754. <https://doi.org/10.1111/mmi.13732>

Eggers, C. H., Gray, C. M., Preisig, A. M., Glenn, D. M., Pereira, J., Ayers, R. W., ... Moeller, J. T. (2016). Phage-mediated horizontal gene transfer of both prophage and heterologous DNA by ϕ BB-1, a bacteriophage of *Borrelia burgdorferi*. *Pathogens and Disease*, 74(9), 1-15. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw107>

El clima promedio en Chame Panamá. (s. f.). Clima promedio en Chame, Panamá, durante todo el año - Weather Spark. Recuperado 12 de enero de 2020, de <https://es.weatherspark.com/y/19400/Clima-promedio-en-Chame-Panamá-durante-todo-el-año>.

Elizabeth, C. N., Victoria, M. Y., Nkechi, E. E., y Godwin, B. O. (2017). Isolation and characterization of heavy metal tolerant bacteria from Panteka stream, Kaduna, Nigeria and their potential for bioremediation. *African Journal of Biotechnology*, 16(1), 32-40. <https://doi.org/10.5897/ajb2016.15676>

Exner, T. E., Becker, S., Becker, S., Boniface-Guiraud, A., Delepelaire, P., Diederichs, K., y Welte, W. (2020). Binding of HasA by its transmembrane receptor HasR follows a conformational funnel mechanism. *European Biophysics Journal*, 49(1), 39-57. <https://doi.org/10.1007/s00249-019-01411-1>

Ferences, R. E., Knowled, A. C., y Nts, G. M. E. (2014). 10.1126@Science.Aag0822, 3072(2012), 598-600. <https://doi.org/10.1126/science.aag0822>

Fernández-Cadena, J. C., Ruíz-Fernández, P. S., Fernández-Ronquillo, T. E., Díez, B., Trefault, N., Andrade, S., y De la Iglesia, R. (2020). Detection of sentinel bacteria in mangrove sediments contaminated with heavy metals. *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110701.

<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110701>

Figueiredo, L. S., de Freitas, B. S., Garcia, V. A., Dargél, V. A., Köbe, L. M., Kist, L. W., ... Schröder, N. (2016). Iron Loading Selectively Increases Hippocampal Levels of Ubiquitinated Proteins and Impairs Hippocampus-Dependent Memory. *Molecular Neurobiology*, 53(9), 6228-6239. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9514-6>

Ganeshkumar, A., Arun, G., Vinothkumar, S., y Rajaram, R. (2019). Ecohydrology y Hydrobiology Bioaccumulation and translocation efficacy of heavy metals by *Rhizophora mucronata* from tropical mangrove ecosystem , Southeast coast of India. *Integrative Medicine Research*, 19(1), 66-74. <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2018.10.006>

Gao, G. F., Li, P. F., Shen, Z. J., Qin, Y. Y., Zhang, X. M., y Ghoto, K. (2018). Exotic *Spartina alterniflora* invasion increases CH₄ while reduces CO₂ emissions from mangrove wetland soils in southeastern China. *Scientific Reports*, (October 2017), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27625-5>

Ghaderpour, A., Mohd Nasori, K. N., Chew, L. L., Chong, V. C., Thong, K. L., y Chai, L. C. (2014). Detection of multiple potentially pathogenic bacteria in Matang mangrove estuaries, Malaysia. *Marine Pollution Bulletin*, 83(1), 324-330. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.04.029>

Ghosh, A., Dey, N., Bera, A., Tiwari, A., Sathyaniranjan, K. B., Chakrabarti, K., y Chattopadhyay, D. (2010). Culture independent molecular analysis of bacterial communities in the mangrove sediment of Sundarban, India. *Saline Systems*, 6(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-6-1>

Gopalakrishnan, G., Wang, S., Mo, L., Zou, J., y Zhou, Y. (2020). Distribution determination, risk assessment, and source identification of heavy metals in mangrove wetland sediments from Qi'ao Island, South China. *Regional Studies in Marine Science*, 33, 100961. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100961>

Guo, B., Zhang, J., Meng, X., Xu, T., y Song, Y. (2020). Long-term spatio-temporal precipitation variations in China with precipitation surface interpolated by ANUSPLIN. *Scientific Reports*, 10(1), 81. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57078-3>

Himpsl, S. D., Pearson, M. M., Arewng, C. J., Nusca, T. D., Sherman, D. H., y Mobley, H. L. T. (2010). Proteobactin and a yersiniabactin-related siderophore mediate iron acquisition in *Proteus mirabilis*. *Molecular Microbiology*, 78(1), 138-157. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07317.x>

Holden, V. I., y Bachman, M. A. (2015). Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics*, 7(6), 986-995. <https://doi.org/10.1039/c4mt00333k>

Horna, G., Silva, M., Vicente, W., y Tamariz, J. (2012). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Medica Herediana*, 16(1), 39.

Jafarzade, M., Mohamad, S., Usup, G., y Ahmad, A. (2012). Heavy-Metal Tolerance and Antibiotic Susceptibility of Red Pigmented Bacteria Isolated from Marine Environment. *Natural Resources*, 03(04), 171-174. <https://doi.org/10.4236/nr.2012.34022>

Jian, L., Jingchun, L., Chongling, Y., Daolin, D., y Haoliang, L. (2019). The alleviation effect of iron on cadmium phytotoxicity in mangrove *A. marina*. Alleviation effect of iron on cadmium phytotoxicity in mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Chemosphere*, 226, 413-420. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.172>

Kacmaz, H. (2020). Assessment of heavy metal contamination in natural waters of Dereli, Giresun: an area containing mineral deposits in northeastern Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192(2). <https://doi.org/10.1007/s10661-019-8057-0>

Kaewtubtim, P., Meeinkuirt, W., Seepom, S., y Pichtel, J. (2017). Occurrence of heavy metals and radionuclides in sediments and seawater in mangrove ecosystems in Pattani Bay, Thailand. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(8), 7630-7639. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8266-9>

Kayalvizhi, K., y Kathiresan, K. (2019). Microbes from wastewater treated mangrove soil and their heavy metal accumulation and Zn solubilization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, 101379. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101379>

Kimiran-Erdem, A., Arslan-Aydoğdu, E. Ö., Gürün, S., y Altun, Ö. (2015). Determination of multiple antibiotic and heavy metal resistance of the bacteria isolated from the Küçükçekmece Lagoon, Turkey. *Polish Journal of Environmental Studies*, 24(3), 1077-1084. <https://doi.org/10.15244/pjoes/29202>

Kumar, S., Karmoker, J., Pal, B. K., Luo, C., y Zhao, M. (2019). Trace metals contamination in different compartments of the Sundarbans mangrove: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 148(May), 47-60. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.07.063>

Leaño, E. M., y Pang, K. L. (2010). Effect of copper(II), lead(II), and zinc(II) on growth and sporulation of *Halophytophthora* from Taiwan mangroves. *Water, Air, and Soil Pollution*, 213(1-4), 85-93. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0369-1>

Li, R., Chai, M., y Qiu, G. Y. (2016). Distribution, fraction, and ecological assessment of heavy metals in sediment-plant system in mangrove forest, South China Sea. *PLoS ONE*, 11(1), 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147308>

Li, X. M., Zhou, S. G., Li, F. B., Wu, C. Y., Zhuang, L., Xu, W., y Liu, L. (2009). Fe(III) oxide

reduction and carbon tetrachloride dechlorination by a newly isolated *Klebsiella pneumoniae* strain L17. *Journal of Applied Microbiology*, 106(1), 130-139. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03985.x>

Lima, A., Zunino, P., D'Alessandro, B., y Piccini, C. (2007). An iron-regulated outer-membrane protein of *Proteus mirabilis* is a haem receptor that plays an important role in urinary tract infection and in in vivo growth. *Journal of Medical Microbiology*, 56(12), 1600-1607. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47320-0>

Lin, C. S., Tsai, Y. H., Chang, C. J., Tseng, S. F., Wu, T. R., Lu, C. C., ... Young, J. D. (2016). An iron detection system determines bacterial swarming initiation and biofilm formation. *Scientific Reports*, 6(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/srep36747>

Liu, M., Huang, H., Bao, S., y Tong, Y. (2019). Microbial community structure of soils in Bamenwan mangrove wetland. *Scientific Reports*, (July 2018), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44788-x>

Liu, S. jia, Xi, B. D., Qiu, Z. P., He, X. S., Zhang, H., Dang, Q. L., ... Li, D. (2019). Succession and diversity of microbial communities in landfills with depths and ages and its association with dissolved organic matter and heavy metals. *Science of the Total Environment*, 651(8), 909-916. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.267>

Lopez, C. A., y Skaar, E. P. (2018). The Impact of Dietary Transition Metals on Host-Bacterial Interactions. *Cell Host and Microbe*, 23(6), 737-748. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.008>

Lu, Q.-P., Ye, J.-J., Huang, Y.-M., Liu, D., Liu, L.-F., Dong, K., ... Sun, C.-H. (2019). Exploitation of Potentially New Antibiotics from Mangrove Actinobacteria in Maowei Sea by Combination of Multiple Discovery Strategies. *Antibiotics*, 8(4), 236. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040236>

Madangchanok Imchen, Ranjith Kumavath, Debmalya Barh, Aline Vaz, Aristóteles Góes-Neto, Sandeep Tiwari, Preetam Ghosh, A. R. W. y V. A. (2018). Comparative mangrove metagenome reveals global prevalence of heavy metals and antibiotic resistome across different ecosystems, 72(17), 568. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29521-4>

Malbrán, C. G. (2012). MIC testing (Vol. 32).

Mandaric, L., Kalogianni, E., Skoulikidis, N., Petrovic, M., y Sabater, S. (2019). Contamination patterns and attenuation of pharmaceuticals in a temporary Mediterranean river. *Science of the Total Environment*, 647, 561-569. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.308>

Marrero-Coto, J., Díaz-Valdivia, A., y Coto-Pérez, O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista*

CENIC Ciencias Biologicas, 41(1), 67-78. <https://doi.org/10.1007/s10534-013-9633-3>

Martineau, C., Li, X., Lalancette, C., Perreault, T., Fournier, E., Tremblay, J., ... Quach, C. (2018). *Serratia marcescens* outbreak in a neonatal intensive care unit: New insights from next-generation sequencing applications. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(9). <https://doi.org/10.1128/JCM.00235-18>

Martínez-Servat, S., Yero, D., Huedo, P., Marquez, R., Molina, G., Daura, X., y Gibert, I. (2018). Heterogeneous colistin-resistance phenotypes coexisting in *Stenotrophomonas maltophilia* isolates influence colistin susceptibility testing. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02871>

Mathers, A. J., Peirano, G., y Pitout, J. D. D. (2015). The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 565-591. <https://doi.org/10.1128/CMR.00116-14>

Mayrhofer, S., Domig, K. J., Mair, C., Zitz, U., Huys, G., y Kneifel, W. (2008). Comparison of broth microdilution, Etest, and agar disk diffusion methods for antimicrobial susceptibility testing of *Lactobacillus acidophilus* group members. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3745-3748. <https://doi.org/10.1128/AEM.02849-07>

Minu, A., Routh, J., Dario, M., Bilosnic, M., Kalén, R., Val Klump, J., y Machiwa, J. F. (2018). Temporal and spatial distribution of trace metals in the Rufiji delta mangrove, Tanzania. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(6). <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6707-2>

Moh, T. H., Lau, N. S., Furusawa, G., y Amirul, A. A. A. (2017). Complete genome sequence of *Microbulbifer* sp. CCB-MM1, a halophile isolated from Matang Mangrove Forest, Malaysia. *Standards in Genomic Sciences*, 12(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0248-0>

Moity, N., Delgado, B., y Salinas-de-leo, P. (2019). *Mangroves in the Galapagos islands: Distribution and dynamics*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209313>

Moore, S. (2020). ¿Cuáles son los cuatro factores que influyen en el clima? . Recuperado 12 de enero de 2020, de <https://education.seattlepi.com/four-factors-influence-weather-4416.html>

Naik, M. M., y Dubey, S. K. (2013). Lead resistant bacteria: Lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.09.039>

Ngole-Jeme, V. M., Fonge, B. A., Tabot, P. T., y Mumbang, C. (2016). Impact of logging activities in a tropical mangrove on ecosystem diversity and sediment heavy metal concentrations. *Journal of Coastal Conservation*, 20(3), 245-255. <https://doi.org/10.1007/s11852-016-0435-y>

Ortiz, J. F. (2015). Patrón de turbidez : Patrón McFarland.

Pal, C., Bengtsson-palme, J., Kristiansson, E., y Larsson, D. G. J. (2015). Co-occurrence of resistance genes to antibiotics , biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics*, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2153-5>

Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., y Larsson, D. G. J. (2015). Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics*, 16(1), 964. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2153-5>

Passarelli-Araujo, H., Palmeiro, J. K., Moharana, K. C., Pedrosa-Silva, F., Dalla-Costa, L. M., y Venancio, T. M. (2019). Genomic analysis unveils important aspects of population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella aerogenes*. *The FEBS Journal*, 286(19), 3797-3810. <https://doi.org/10.1111/febs.15005>

Puig, S., Rees, E. M., y Thiele, D. J. (2002). The ABCDs of periplasmic copper trafficking. *Structure*, 10(10), 1292-1295. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(02\)00863-8](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00863-8)

Rachid, D., y Ahmed, B. (2005). Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*. *African Journal of Biotechnology*, 4(7), 697-702. <https://doi.org/10.5897/ajb2005.000-3129>

Rahman, Z., y Singh, V. P. (2018). Assessment of heavy metal contamination and Hg-resistant bacteria in surface water from different regions of Delhi, India. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(8), 1687-1695. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.09.018>

Raimi, A. R., Ezeokoli, O. T., y Adeleke, R. A. (2019). High-throughput sequence analysis of bacterial communities in commercial biofertiliser products marketed in South Africa: an independent snapshot quality assessment. *3 Biotech*, 9(3), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1643-6>

Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M. N. V., y Freitas, H. (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology*, 28(3), 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.002>

Rampadarath, S., Bandhoa, K., Puchooa, D., Jeewon, R., y Bal, S. (2018). Metatranscriptomics analysis of mangroves habitats around Mauritius. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(4), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2442-7>

Ren, J., Karna, S., Lee, H. M., Yoo, S. M., y Na, D. (2019). Artificial transformation methodologies for improving the efficiency of plasmid DNA transformation and simplifying its

use. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10173-x>

Rishad, K. S., Rebello, S., Shabanamol, P. S., y Jisha, M. S. (2017). Biocontrol potential of Halotolerant bacterial chitinase from high yielding novel *Bacillus Pumilus* MCB-7 autochthonous to mangrove ecosystem. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 137, 36-41. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.09.005>

Rodríguez, V. S., González Farías, F., y Miranda-Navarro, S. V. (2018). Bioaccumulation of metal(loid)s in *Cardisoma crassum* and pollution assessment in a mangrove protected area in Mexico. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(12). <https://doi.org/10.1007/s10661-018-7114-4>

Rössler, J., Schoenrath, F., Seifert, B., Kaserer, A., Spahn, G. H., Falk, V., y Spahn, D. R. (2020). Iron deficiency is associated with higher mortality in patients undergoing cardiac surgery: a prospective study. *British Journal of Anaesthesia*, 124(1), 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.09.016>

Rouch, D. A., Lee, B. T. O., y Morby, A. P. (1995). Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *Journal of Industrial Microbiology*, 14(2), 132-141. <https://doi.org/10.1007/BF01569895>

Rzymiski, P., Tomczyk, K., Rzymiski, P., Poniedziałek, B., y Opala, T. (2015). Impact of heavy metals on the female reproductive system, 22(2), 259-264. <https://doi.org/10.5604/12321966.1152077>

Saifullah, S. M., Ismail, S., Khan, S. H., y Saleem, M. (2004). Land Use—Iron Pollution in Mangrove Habitat of Karachi, Indus Delta. *Earth Interactions*, 8(17), 1-9. [https://doi.org/10.1175/1087-3562\(2004\)8<1:lupimh>2.0.co;2](https://doi.org/10.1175/1087-3562(2004)8<1:lupimh>2.0.co;2)

Samanovic, M. I., Ding, C., Thiele, D. J., y Darwin, K. H. (2012). Copper in microbial pathogenesis: Meddling with the metal. *Cell Host and Microbe*, 11(2), 106-115. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.01.009>

SamKamaleson, A., y Gonsalves, M. J. (2019). Role of sulfur-oxidizing bacteria on the ecology in tropical mangrove sediments. *Regional Studies in Marine Science*, 28, 100574. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100574>

Samples, U. (2018). crossm Heavy Metal Susceptibility of *Escherichia coli* Isolated from, 1-11. Sarwar, T., Shahid, M., Natasha, Khalid, S., Shah, A. H., Ahmad, N., ... Bakhat, H. F. (2019). Quantification and risk assessment of heavy metal build-up in soil–plant system after irrigation with untreated city wastewater in Vehari, Pakistan. *Environmental Geochemistry and Health*, 8. <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00358-8>

Schenk, G., Sa, N., Gahan, L. R., Ollis, D. L., Mcgeary, R. P., y Guddat, L. W. (2012). Binuclear Metallohydrolases: Complex. *American Chemical Society*, 45(9), 1593-1603. <https://doi.org/10.1021/ar300067g>

Shanmugam, S., Sun, C., Chen, Z., y Wu, Y. R. (2019). Enhanced bioconversion of hemicellulosic biomass by microbial consortium for biobutanol production with bioaugmentation strategy. *Bioresource Technology*, 279, 149-155. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.121>

Shuhadah Mustapha. (2012). Characterization of newly isolated protease producing marine bacteria and expression of a neutral protease from Bacillus PPB15 isolated from mangroves in Sabah.

Seale, L. A. (2019). Selenocysteine β -lyase: Biochemistry, regulation and physiological role of the selenocysteine decomposition enzyme. *Antioxidants*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/antiox8090357>

Si, Y., Zou, Y., Liu, X., Si, X., y Mao, J. (2015). Mercury methylation coupled to iron reduction by dissimilatory iron-reducing bacteria. *Chemosphere*, 122, 206-212. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.11.054>

Silva, M. E. F., Lopes, A. R., Cunha-Queda, A. C., y Nunes, O. C. (2016). Comparison of the bacterial composition of two commercial composts with different physicochemical, Stability and maturity properties. *Waste Management*, 50, 20-30. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.02.023>

Squadrone, S. (2020, abril 1). Water environments: metal-tolerant and antibiotic-resistant bacteria. *Environmental Monitoring and Assessment*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-8191-8>

Stamps, B. W., Lyles, C. N., Suflita, J. M., Masoner, J. R., Cozzarelli, I. M., Kolpin, D. W., y Stevenson, B. S. (2016). Municipal solid waste landfills harbor distinct microbiomes. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00534>

Sueiro, F. (2012). Caracterización de la resistencia a metales pesados y búsqueda de integrones en cepas de *Delftia* sp .

Sultan, I., Rahman, S., Jan, A. T., Siddiqui, M. T., Mondal, A. H., y Haq, Q. M. R. (2018). Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: A bacterial perspective. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02066>

Superficie, población y densidad de población en la República según provincia, comarca, distrito

y corregimiento. (s. f.). Recuperado 9 de enero de 2020, de <http://www.contraloria.gob.pa/inec/archivos/P3601Cuadro11.xls>

Takeuchi, N., Kaneko, K., y Koonin, E. V. (2014). Horizontal gene transfer can rescue prokaryotes from Muller's ratchet: Benefit of DNA from dead cells and population subdivision. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(2), 325-339. <https://doi.org/10.1534/g3.113.009845>

Tiquia-Arashiro, S. M. (2018). Lead absorption mechanisms in bacteria as strategies for lead bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(13), 5437-5444. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8969-6>

Torasa, S., Boonyarat, P., Phongdara, A., y Buapet, P. (2019). Tolerance Mechanisms to Copper and Zinc Excess in *Rhizophora mucronata* Lam . Seedlings Involve Cell Wall Sequestration and Limited Translocation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02589-y>

Usman, A. R. A., Alkredaa, R. S., y Al-Wabel, M. I. (2013). Heavy metal contamination in sediments and mangroves from the coast of Red Sea: *Avicennia marina* as potential metal bioaccumulator. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 97, 263-270. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.08.009>

Val-Calvo, J., Luque-Ortega, J. R., Crespo, I., Miguel-Arribas, A., Abia, D., Sánchez-Hevia, D. L., ... Meijer, W. J. J. (2018). Novel regulatory mechanism of establishment genes of conjugative plasmids. *Nucleic Acids Research*, 46(22), 11910-11926. <https://doi.org/10.1093/nar/gky996>

Voica, D. M., Bartha, L., Banciu, H. L., y Oren, A. (2016). Heavy metal resistance in halophilic Bacteria and Archaea. *FEMS Microbiology Letters*, 363(14), 1-9. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw146>

Wan, Z., y Goddard, N. L. (2012). Competition between conjugation and M13 Phage infection in *Escherichia coli* in the Absence of selection pressure: A kinetic study. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2(10), 1137-1144. <https://doi.org/10.1534/g3.112.003418>

Wang, Q., Mei, D., Chen, J., Lin, Y., Liu, J., Lu, H., y Yan, C. (2019). Sequestration of heavy metal by glomalin-related soil protein : Implication for water quality improvement in mangrove wetlands. *Water Research*, 148, 142-152. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.043>

Wang, T., Sun, H., Ren, X., Li, B., y Mao, H. (2017). Evaluation of biochars from different stock materials as carriers of bacterial strain for remediation of heavy metal-contaminated soil. *Scientific Reports*, 7(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12503-3>

Wattal, C., y Oberoi, J. K. (2016). Microbial identification and automated antibiotic susceptibility testing directly from positive blood cultures using MALDI-TOF MS and VITEK 2. *European Journal of Clinical Microbiology y Infectious Diseases*, 35(1), 75-82.

<https://doi.org/10.1007/s10096-015-2510-y>

Weber, K. A., Achenbach, L. A., y Coates, J. D. (2006). Microorganisms pumping iron: Anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology*, 4(10), 752-764. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1490>

Wei, J., Duan, M., Li, Y., Nwankwegu, A. S., Ji, Y., y Zhang, J. (2019). Concentration and pollution assessment of heavy metals within surface sediments of the Raohe Basin, China. *Scientific Reports*, 9(1), 1-7. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49724-7>

Wei, L., Kao, S. J., y Liu, C. (2020). Mangrove species maintains constant nutrient resorption efficiency under eutrophic conditions. *Journal of Tropical Ecology*, 36(1), 36-38. <https://doi.org/10.1017/S0266467419000336>

Xu, S., Lu, W., Liu, Y., Ming, Z., Liu, Y., Meng, R., y Wang, H. (2017). Structure and diversity of bacterial communities in two large sanitary landfills in China as revealed by high-throughput sequencing (MiSeq). *Waste Management*, 63, 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.07.047>

Yang, Q. E., Agouri, S. R., Tyrrell, J. M., y Walsh, T. R. (2018). Heavy metal resistance genes are associated with bla NDM-1 - and bla CTX-M-15 -carrying enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(5), 4-10. <https://doi.org/10.1128/AAC.02642-17>

Zampieri, B. D. B., Pinto, A. B., Schultz, L., de Oliveira, M. A., y de Oliveira, A. J. F. C. (2016). Diversity and Distribution of Heavy Metal-Resistant Bacteria in Polluted Sediments of the Araçá Bay, São Sebastião (SP), and the Relationship Between Heavy Metals and Organic Matter Concentrations. *Microbial Ecology*, 72(3), 582-594. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0821-x>

Zhang, C.-J., Pan, J., Duan, C.-H., Wang, Y.-M., Liu, Y., Sun, J., ... Li, M. (2019). Prokaryotic Diversity in Mangrove Sediments across Southeastern China Fundamentally Differs from That in Other Biomes. *mSystems*, 4(5), 1-15. <https://doi.org/10.1128/msystems.00442-19>

Zhang, J.-T., Zhou, S.-G., Zhang, L.-X., Lu, N., Deng, L.-F., y Ni, J.-R. (2009). [Mechanisms of bioelectricity generation in *Enterobacter aerogenes*-based microbial fuel cells]. *Huan jing ke xue= Huanjing kexue*, 30(4), 1215-1220. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19545032>

Zhao, J., Shen, X.-J., Domene, X., Alcañiz, J.-M., Liao, X., y Palet, C. (2019). Comparison of biochars derived from different types of feedstock and their potential for heavy metal removal in multiple-metal solutions. *Scientific Reports*, 9(1), 9869. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46234-4>

Zhao, L., Chen, H., Lu, X., Lin, H., Christensen, G. A., Pierce, E. M., y Gu, B. (2017). Contrasting Effects of Dissolved Organic Matter on Mercury Methylation by *Geobacter*

sulfurreducens PCA and Desulfovibrio desulfuricans ND132. *Environmental Science and Technology*, 51(18), 10468-10475. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02518>

Zheng, T., y Nolan, E. M. (2012). Siderophore-based detection of Fe(iii) and microbial pathogens. *Metallomics*, 4(9), 866-880. <https://doi.org/10.1039/c2mt20082a>

7. Anexo

Cuadros

Cuadro 1. Concentraciones de MP en las aguas de los manglares de Chame.

Áreas de estudio	Concentración de los metales por área (mg.L ⁻¹)		
	Hierro III	Cobre II	Plomo II
Área 1 (vertedero)			
Subparcela 1	107.84	0.18	< 0.20
Subparcela 2	245.19	0.29	< 0.20
Subparcela 3	1.02	0.06	< 0.20
Subparcela 4	0.98	0.06	< 0.20
Subparcela 5	3.37	0.08	< 0.20
Área 2 (intermedio)			
Subparcela 1	3.03	0.08	< 0.20
Subparcela 2	0.07	0.07	< 0.20
Subparcela 3	3.10	0,06	< 0.20
Subparcela 4	2.11	0.08	< 0.20
Subparcela 5	0.98	0.06	< 0.20
Área 3 (costa)			
Subparcela 1	1.08	0.08	< 0.20
Subparcela 2	1.00	0.08	< 0.20
Subparcela 3	1.99	0.08	< 0.20
Subparcela 4	4.14	0.07	< 0.20
Subparcela 5	7.16	0.09	< 0.20

Nota. la prueba de correlación múltiple. (Kruskal Wallis $P > 0,05$: no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las áreas de estudio)

Cuadro 2. Límite de valores permisibles para MP en agua potable mg. L⁻¹.

Estándar	Fe	Cu	Pb
OMS (2011)	0.3*	2.00	0.01
USEPA (2018)	0.3	1.00	0.015

Nota. método para detección límite en aguas superficiales basado en los estándares de la OMS (Organización mundial de la salud) y la USEPA (Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos).* OMS 2017.

Cuadro 3. Comparación en las concentraciones de MP (mg.L⁻¹) en las agua de manglar reportados en diferentes regiones.

Localización	Fe	Cu	Pb	Referencias
Zona Miri, Sarawak Malaysia	1.55x10 ⁻³ ±3.40 x10 ⁻⁴	9.00x10 ⁻⁵ ±3.00 x10 ⁻⁶	ND	(Billah et al., 2014)
Zona Bakam, Sarawak Malaysia	3.26x10 ⁻³ ±7.00 x10 ⁻⁴	6.00x10 ⁻⁵ ±3.00 x10 ⁻⁶	ND	(Billah et al., 2014)
Zona Nyalau, Sarawak Malaysia	8.26x10 ⁻³ ±5.00 x10 ⁻⁴	9.00x10 ⁻⁵ ±4.00 x10 ⁻⁶	ND	(Billah et al., 2014)
Estuario Karnafuli, Bangladesh	0.02-0.04	3.70x10 ⁻⁴ -9.10x10 ⁻⁴	ND	(Billah et al., 2014)
Estuario Karnafuli, Bangladesh	4.63x10 ⁻³	3.20x10 ⁻⁴	ND	(Billah et al., 2014)
Estación seca A Jalisco, México	0.78 (0.63-0.97)	0.043 (0.03-0.05)	ND	(Rodríguez et al., 2018)
Estación seca B Jalisco, México	0.68 (0.31-1.38)	0.037 (0.02-0.04)	ND	(Rodríguez et al., 2018)
Estación lluviosa A Jalisco, México	0.51 (0.35-0.64)	0.011 (0.010-0.014)	ND	(Rodríguez et al., 2018)
Estación lluviosa B Jalisco, México	0.57 (0.20-0.81)	0.014 (0.01-0.017)	ND	(Rodríguez et al., 2018)
Manglar de Hsinchu, Taiwán	ND	0.11	3.50x10 ⁻³	(Leaño y Pang, 2010)
Manglar de Miaoli, Taiwán	ND	1.00x10 ⁻⁴	ND	(Leaño y Pang, 2010)
Manglar de Taoyuan, Taiwán	ND	2.30x10 ⁻³	1.00x10 ⁻³	(Leaño y Pang, 2010)
Zona costera al sur de Vietnam	ND	0.08	0.08	(Costa-Böddeker et al., 2017)

Nota: ND- no hay datos.

Cuadro 4. Colonias bacterianas aisladas por área en las aguas del manglar en Chame.

Subparcelas por área	Área 1 (vertedero)	Área 2 (intermedio)	Área 3 (costa)
Subparcela 1	23	4	1
Subparcela 2	4	1	1
Subparcela 3	13	4	1
Subparcela 4	4	6	2
Subparcela 5	12	1	2
Total	56	16	7

Nota. En algunos caso las colonias se repetían.

Cuadro 5. Valores de CMI, que presentaron los aislamientos para cada metal por área.

Áreas	Concentraciones de Sales de metales pesados en mg. L ⁻¹									
	Fe				Cu			Pb		
	800*	1000	1200	1400	800*	1000	1200	2000*	2200	2400
Área 1										
(vertedero)										
Subparcela 1	15	4	3	1	20	1	2	15	6	2
Subparcela 2	3	1	--	--	4	--	--	3	1	--
Subparcela 3	13	--	--	--	13	--	--	13	--	--
Subparcela 4	4	--	1	--	5	--	--	5	--	--
Subparcela 5	12	--	--	--	12	--	--	12	--	--
Área 2										
(intermedio)										
Subparcela 1	3	1	--	--	4	--	--	4	--	--
Subparcela 2	1	--	--	--	1	--	--	1	--	--
Subparcela 3	4	--	--	--	4	--	--	4	--	--
Subparcela 4	5	1	--	--	6	--	--	6	--	--
Subparcela 5	1	--	--	--	1	--	--	1	--	--
Área 3										
(costa)										
Subparcela 1	1	--	--	--	1	--	--	1	--	--
Subparcela 2	1	--	--	--	1	--	--	1	--	--
Subparcela 3	1	--	--	--	1	--	--	1	--	--
Subparcela 4	2	--	--	--	2	--	--	2	--	--
Subparcela 5	2	--	--	--	2	--	--	2	--	--

Nota * las cepas pueden presentar una CMI menor o igual al dato mostrado.

Cepas control	Concentración de los metales pesados en mg. L ⁻¹		
	Cloruro de hierro (III)	Sulfato de cobre (II)	Acetato de plomo (II)
^a <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	1000	1000	2200
^b <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538p	1000	1000	2200
^b <i>Pseudomona</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 9027	800	800	2000

Nota. ^a valores de la cepa utilizados en este estudio. ^b cepas utilizadas para confirmar los valores de cepa^a.

Cuadro 7. Características de resistencia a MP en las aguas de los manglares de Chame.

Cepa	Aislamiento	CMI de los MP (mg.L ⁻¹)			Fenotipo resistente
		Cloruro de hierro (III)	Sulfato de cobre (II)	Acetato de plomo (II)	
<i>Bacillus altitudinis/pumilus</i>	A111-1	1200	≤800	≤2000	Fe
	A112-1	1200	1000	≤2000	Fe
	A114-1	1400	1200	≤2000	Fe, Cu
<i>Klebsiella aerogenes</i>	A110-1	1400	1200	≤2000	Fe, Cu
<i>Proteus mirabilis</i>	A11-5	1200	≤800	≤2000	Fe
	A18-1	≤800	≤800	2400	Pb
<i>Serratia marcescens</i>	A43-1	1400	≤800	≤2000	Fe
* <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739		1000	1000	2200	

Nota. * cepa control.

Figuras



Figura 11. Colección y distribución de las muestras. **A** Se colectó un galón con agua intersticial, por subparcela en cada área del manglar. **B** los galones se distribuyeron en recipientes de 1L y 500mL, para el análisis microbiológico y de MP respectivamente.

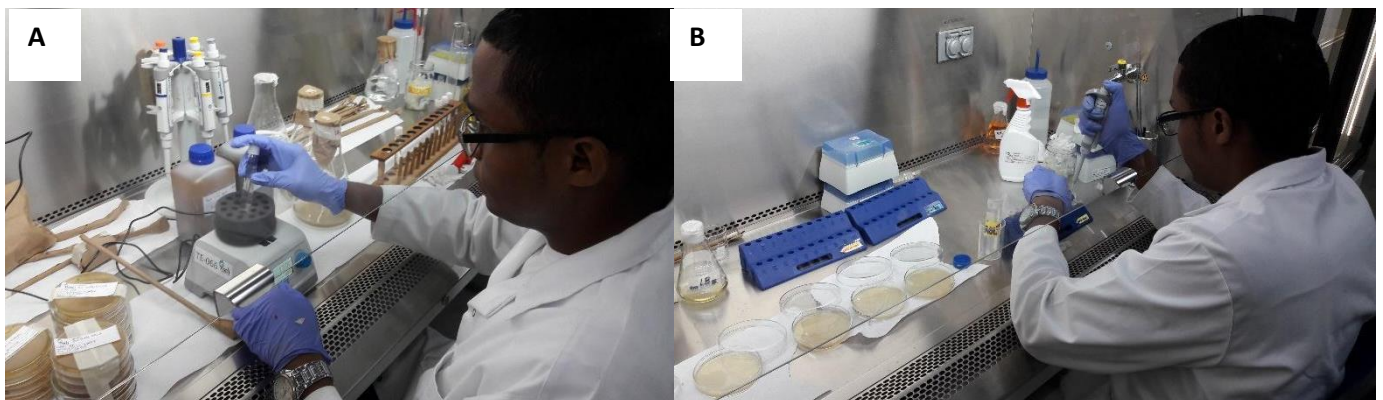


Figura 12. Procesamiento de las muestras para el análisis microbiológico. **A.** dilución de las muestras y **B.** siembra.

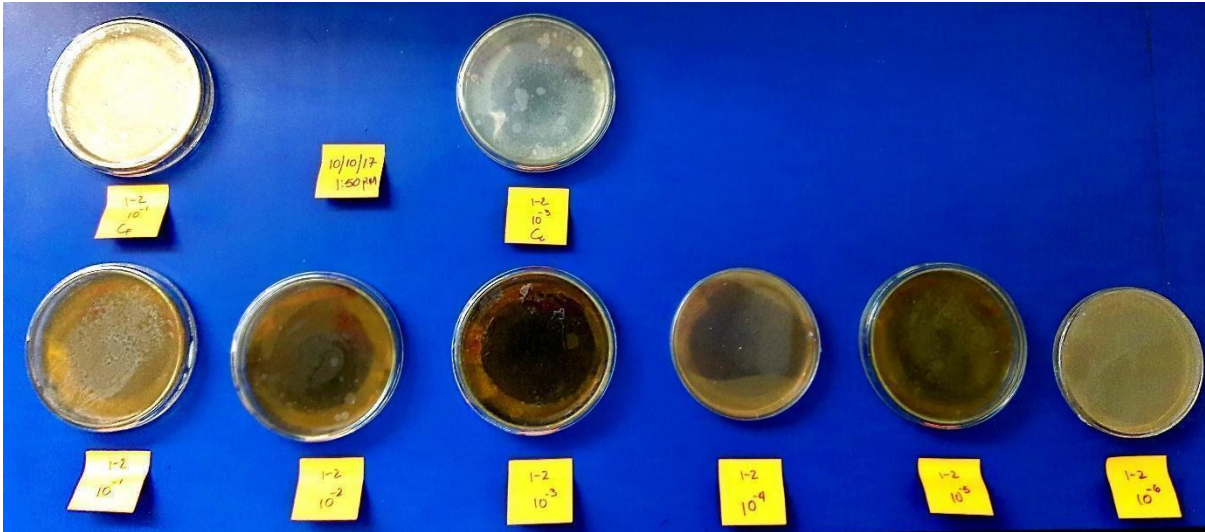


Figura 13. Aislamiento de las colonias resistentes a MP, mediante la técnica de dilución en serie 1:10 en medio TSA. En la parte superior se observa los platos utilizados como control negativo.

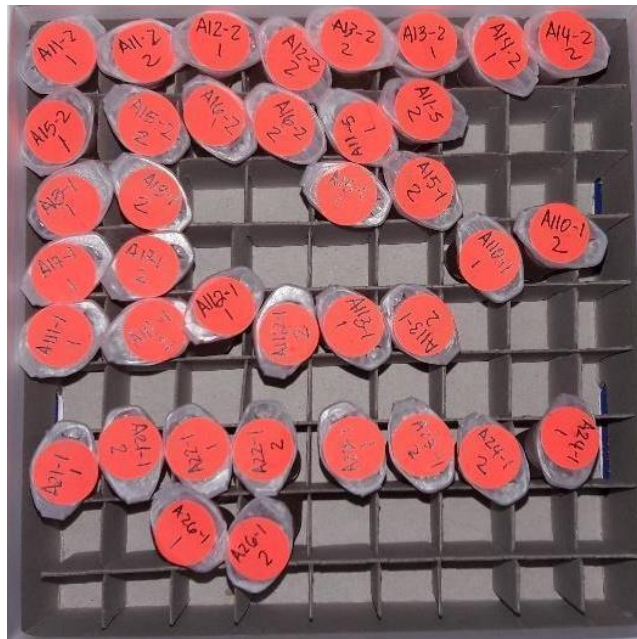


Figura 14. Criopreservación y rotulación de las cepas aisladas. Las cepas se guardaron en tubos de eppendorf estériles de 1.5 mL.

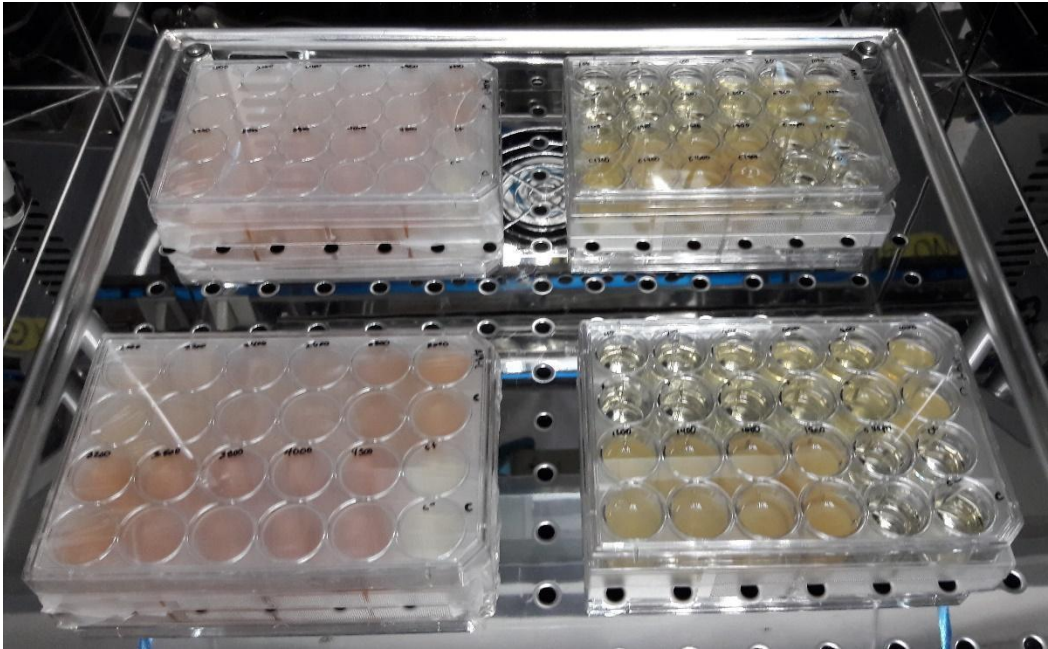


Figura 15. Ensayos de CMI, mediante la técnica de macrodilución en caldo LB. Todas las placa se colocaron en la incubadora Shaker.



Figura 16. Evaluación de la CMI, de la cepa *Bacillus altitudinis/pumilus* en cloruro de hierro (III). La cepa A114-1 caracterizada como *Bacillus altitudinis/pumilus* resistente al Hierro III presentó una CMI de 1400 mg.L⁻¹, ubicado en el pocillo C2 rodeado por un aro rojo. la fila B y D representa los controles de las filas A y C respectivamente, el pocillo C6 corresponde al control negativo y el pocillo D6 al control positivo.

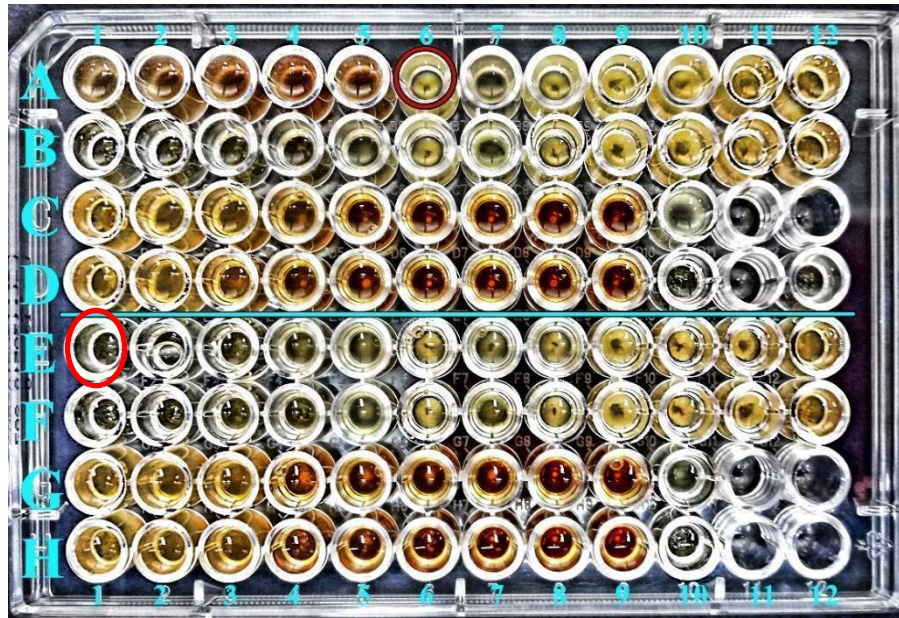


Figura 17. Evaluación de la CMI mediante la técnica de microdilución placa con caldo LB y $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$. La cepa categorizada como B12-1 presentó una CMI de $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en el pocillo A6 los cuales se respaldan con la columna B de los controles. Por otra parte la cepa C11-1 presentó una CMI de menor o igual a $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, en el pocillo E1.

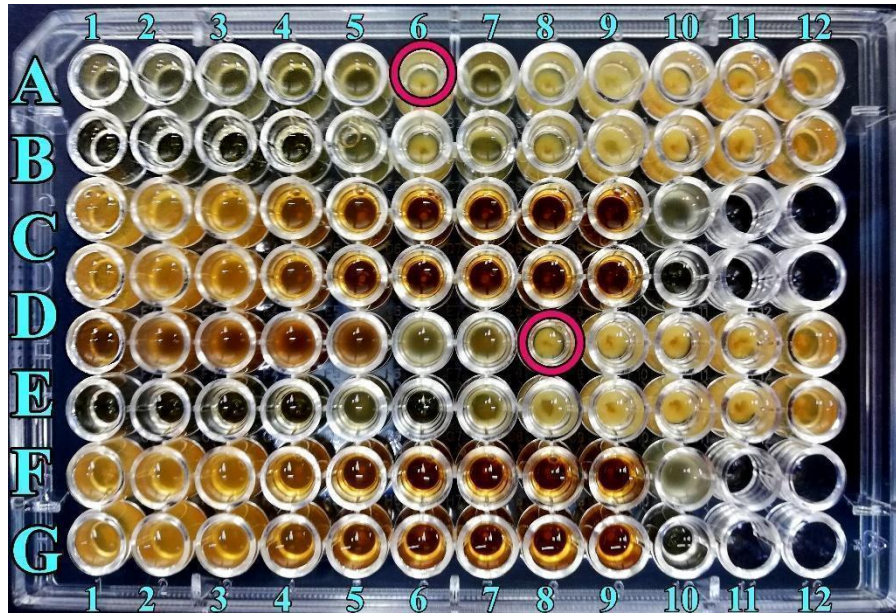


Figura 18. Evaluación de la CMI mediante la técnica de microdilución placa con caldo LB y $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$. La cepa *Escherichia coli* ATCC 8739 presentó una CMI de $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en cual se observa en el pocillo A6, este resultado se comparó con la fila B de los controles. En cambio la cepa A43-1 *Serratia marcescens* presentó una CMI de $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, en el pocillo D8 y se comparó con la fila E de control.

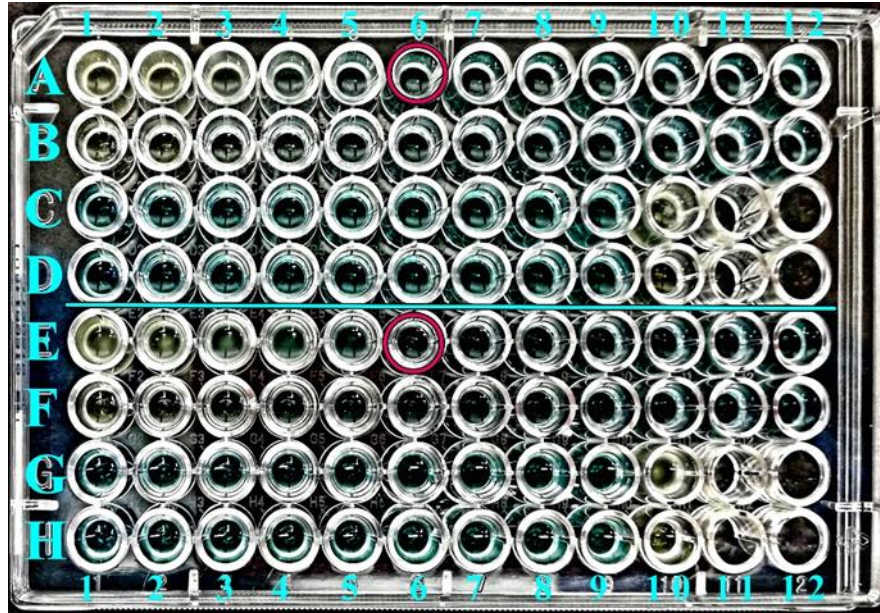


Figura 19. CMI de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p mediante la técnica de microdilución placa con caldo LB y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Esta cepa presento una CMI de 1000 mg.L^{-1} en cual se observa en el pocillo A6, este resultado se comparó con la fila B de los controles. De igual manera la cepa *Escherichia coli* ATCC 8739 también presento una CMI de 1000 mg.L^{-1} , en el pocillo E6 y se comparó con la fila control F.

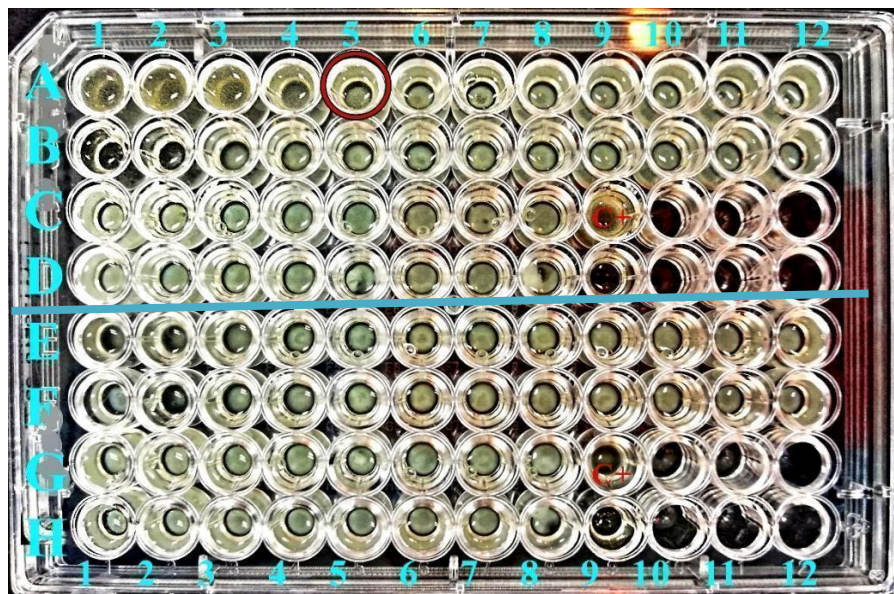


Figura 20. Evaluación de la CMI mediante la técnica de microdilución placa con caldo LB y $Pb(C_2H_3O_2)_2$. La cepa *Escherichia coli* ATCC 8739 presento una CMI de 2200 mg. L^{-1} en cual se observa en el pocillo A5, este resultado se comparó con la fila B de los controles. La cepa B12-1 inocula en las filas E y G presentaron una CMI menor o igual a 1400 mg. L^{-1} , pocillo E1 y se comparó con la fila control F.

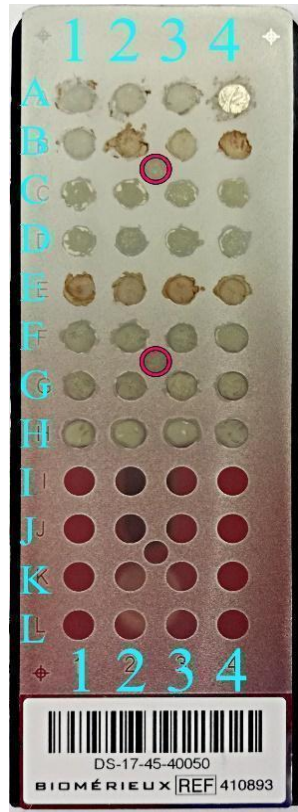


Figura 21. Montaje de la cepas resistente en la placa MALDI-TOF. Todas las cepas se analizaron por duplicados, y con un control positivo colocado en el poro marcado con rojo mediante una cepa control *Escherichia coli* ATCC 8739. Las cepas se colocaron de forma horizontal y los duplicados con sus respectivos controles en las columnas 3 y 4 respectivamente. Pongamos por caso a la cepa A111-1, el cual se colocó en la fila A, en donde el poro A2 será el control o confinación de la primera identificación realizada en el poro A1, estos resultados se confirmaron nuevamente en los poro A3 y A4 done este último también desempeño el papel de control positivo a la lectura. Todos los resultados mostraron un alto nivel de confianza de un 99.9%.



Figura 22. Crecimiento de la cepa *Bacillus altitudinis/pumilus* (A112-1) en agar sangre. Esta cepa de color amarilla y de textura rugosa es capaz de producir hemólisis.



Figura 23. Crecimiento de *Bacillus altitudinis/pumilus* (A111-1) en placas de agar sangre. Esta cepa presenta colonias amarillas con textura rugosa cuando crece en agar sangre y es capaz de provoca hemólisis.



Figura 24. Crecimiento de la cepa *Bacillus altitudinis/pumilus* (A114-1) agar sangre. Los valores de CMI para esta cepa fue más alto para el hierro en comparación con las otras de su especie aisladas en este estudio. De igual forma presento colonias de color amarillas y textura rugosa provocando hemolisis en el medio de cultivo.

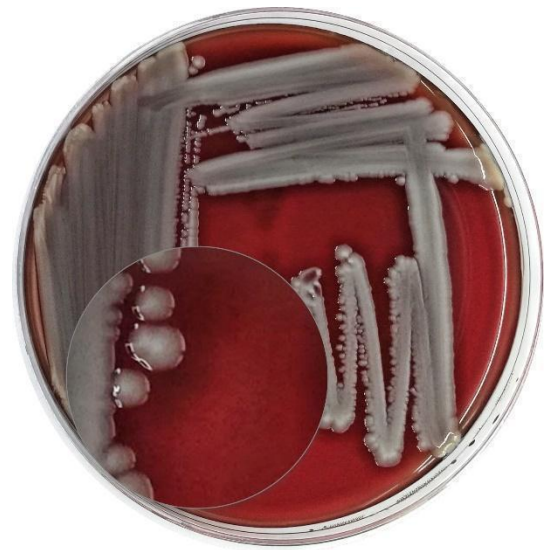


Figura 25. Crecimiento de *Serratia marcescens* (A43-1). Esta cepa cuando crece en este medio las colonias adquieren un color blanquecino como cera con, bordes redondeados y forma fusiforme circular.



Figura 26. Crecimiento de *Proteus mirabilis* (A18-1) en placas de agar sangre. Esta especie se caracteriza por presentar el efecto de swarming el cual es característico de *Proteus mirabilis* (A18-1) cuando crece en agar sangre. las colonias medianas, convexas de color blanquecino con forma circular y bordes redondeados se fusionan



Figura 27. *Proteus mirabilis* (A11-5) resistente al hierro III. La presencia de swarming es característicos de esta cepa cuando crece en agar sangre.



Figura 28. Crecimiento de *Klebsiella aerogenes* (A110-1), en placas de agar sangre. Nuestra cepa se caracterizó por presentar colonias de color blanquecino brillante, y tamaño grandes planoconvexa y textura mucoide, con forma redonda y bordes irregulares