UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Estudio genómico y transcriptómico de la resistencia a cadmio(II) de *Serratia* sp. 5b

Kevin Stiven Nonsocua Triviño

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias - Instituto de Biotecnología IBUN
Bogotá, Colombia
2025

Estudio genómico y transcriptómico de la resistencia a cadmio(II) de *Serratia* sp. 5b

Kevin Stiven Nonsocua Triviño

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencias – Microbiología

Director:

Ph.D., Pedro Filipe de Brito Brandão

Línea de Investigación:

Microbiología

Grupo de Investigación:

Grupo de Estudios para la Remediación y Mitigación de Impactos Negativos al Ambiente (GERMINA)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias - Instituto de Biotecnología IBUN

Bogotá, Colombia

2025

A mi muy amada madre Patricia

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

_____

Kevin Stiven Nonsocua Triviño
Fecha 21/04/2025

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por sus bendiciones al permitirme culminar estos estudios y apoyarme durante estos años.

Además, quiero reconocer que la realización de esta tesis de maestría fue posible gracias al apoyo de varias personas e instituciones.

Al Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Colombia (MinAmbiente) por los permisos de recolección y acceso a los recursos genéticos nacionales (Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No. 121 de 2016 — Otrosí No. 17 y Otrosí No. 35).

A la Universidad Nacional de Colombia y a la Dirección de Investigación y Extensión sede Bogotá (DIEB) por el financiamiento mediante la Convocatoria para el Apoyo a Proyectos de Investigación y Creación Artística de la Sede Bogotá. Proyectos con códigos 48328 y 57665.

A la Universidad Nacional de Colombia y la Facultad de Ciencias Sede Bogotá por el financiamiento a través de la Beca Auxiliar Docente.

Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, en donde se realizó la secuenciación de ADN.

A mi director Pedro Filipe de Brito Brandão por sus aportes que contribuyeron invaluablemente en la realización de esta tesis.

A la profesora Liliana López Kleine por sus valiosos aportes durante el análisis de datos transcriptómicos.

A los integrantes del grupo de investigación GERMINA por sus aportes en el desarrollo de esta tesis, en especial a mis compañeras y compañeros del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Aplicada.

A los integrantes del grupo de investigación de bioquímica y biología molecular de las micobacterias por brindarme el apoyo con diversos materiales, especialmente al profesor Carlos Yesid Soto Ospina y la profesora Milena Maya Hoyos, y a Sergio Nicolás Ricaurte Ruiz y Alver Antonio Cruz Cacais por sus valiosas sugerencias durante las extracciones de ARN y la realización de RT-qPCR

.

Resumen

Estudio genómico y transcriptómico de la resistencia a cadmio(II) de *Serratia* sp. 5b

Serratia sp. 5b es una cepa previamente aislada de suelos agrícolas contaminados con cadmio (Cd(II)), a la que se le ha determinado experimentalmente una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 4 mM y la capacidad para reducir la concentración del metal en solución. No obstante, no se conocía su identidad taxonómica a nivel de especie ni se había determinado cuáles genes están implicados en la resistencia a Cd(II). En este estudio se integraron de forma transversal aproximaciones filogenómicas, genómicas y transcriptómicas con el propósito de identificar taxonómicamente la cepa y dilucidar los mecanismos moleculares que sustentan su resistencia al Cd(II). El análisis filogenómico, basado en 1.052 genes ortólogos de copia única, indicó que la especie de *Serratia* sp. 5b corresponde a *Serratia surfactantfaciens*, al formar un clado monofilético con soporte *bootstrap* del 100 %, lo cual fue ratificado por un valor ANI del 99,18 %. A nivel genómico, el ensamblaje presentó 18 *contigs*, una longitud total de 4,99 Mbp y una completitud estimada en 99,88 %. Se identificaron diez genes putativos relacionados con resistencia a Cd(II), *dsbA, dsbB, fieF, mntH, robA, ychH, ygiW, zinT, zitB* y *zntA*, todos ubicados en el cromosoma y sin asociación a plásmidos ni elementos genéticos móviles. Asimismo, el análisis de variantes detectó mutaciones no sinónimas en *fieF* y *zntA*, siendo este último el único con alteraciones estructurales localizadas en regiones flexibles. Por otro lado, el análisis transcriptómico reveló una respuesta génica dependiente de la concentración de Cd(II), con 428, 1.852 y 638 genes diferencialmente expresados (DEGs) al comparar las condiciones control vs 0,15 mM Cd(II), control vs 0,50 mM Cd(II), y 0,15 mM Cd(II) vs 0,50 mM Cd(II), respectivamente. Se observó una sobreexpresión progresiva de genes asociados al transporte de cationes, defensa antioxidante y reparación del ADN, destacándose *zntA*, *zinT*, *mntA*, *znuC*, *trxB* y *recA*. El análisis funcional evidenció una activación gradual de rutas implicadas en metabolismo energético, transporte activo y organización de membranas, con procesos exclusivos bajo condiciones de alta exposición. La validación experimental mediante RT-qPCR de genes seleccionados reprodujo la tendencia observada en RNA-seq, indicando la confiabilidad de los

resultados transcriptómicos. En conjunto, estos hallazgos demuestran que *Serratia surfactantfaciens* 5b presenta una respuesta transcripcional compleja y coordinada frente a Cd(II), basada en mecanismos de exclusión, secuestro intracelular y adaptación fisiológica.

Palabras clave: Cadmio, genes de resistencia, ADN, ARN, secuenciación, *Serratia surfactantfaciens*

Abstract

Genomic and transcriptomic study of cadmium(II) resistance in *Serratia* sp. 5b

Serratia sp. 5b is a strain previously isolated from cadmium (Cd(II))-contaminated agricultural soils. Experimental studies determined a minimum inhibitory concentration (MIC) of 4 mM for this strain, along with its ability to reduce the concentration of the metal in solution. However, its species-level taxonomic identity was unknown, and the genes involved in its Cd(II) resistance had not been identified. In this study, we integrated phylogenomic, genomic, and transcriptomic approaches to identify the strain at the species level and elucidate the molecular mechanisms underlying its resistance to Cd(II). Phylogenomic analysis based on 1,052 single-copy orthologous genes indicated that *Serratia* sp. 5b belongs to the species *Serratia surfactantfaciens*, as it formed a monophyletic clade with 100% bootstrap support. This finding was further supported by an ANI value of 99.18%. At the genomic level, the assembly consisted of 18 contigs, with a total length of 4.99 Mbp and an estimated completeness of 99.88%. Ten putative genes associated with Cd(II) resistance were identified—*dsbA*, *dsbB*, *fieF*, *mntH*, *robA*, *ychH*, *ygiW*, *zinT*, *zitB*, and *zntA*—all of which were located on the chromosome and showed no association with plasmids or mobile genetic elements. Variant analysis revealed non-synonymous mutations in *fieF* and *zntA*, the latter being the only gene with structural alterations located in flexible protein regions. Transcriptomic analysis revealed a Cd(II) concentration-dependent gene expression response, with 428, 1,852, and 638 differentially expressed genes (DEGs) identified when comparing control vs. 0.15 mM Cd(II), control vs. 0.50 mM Cd(II), and 0.15 mM vs. 0.50 mM Cd(II), respectively. A progressive overexpression was observed in genes associated with cation transport, antioxidant defense, and DNA repair, particularly *zntA*, *zinT*, *mntA*, *znuC*, *trxB*, and *recA*. Functional enrichment analysis revealed a gradual activation of pathways involved in energy metabolism, active transport, and membrane organization, with exclusive processes emerging under high Cd(II) exposure. Experimental validation by RT-qPCR of selected genes reproduced the expression trends observed in the RNA-seq data, confirming the reliability of the transcriptomic results. Together, these findings demonstrate that *Serratia surfactantfaciens* 5b exhibits a complex and coordinated

transcriptional response to Cd(II), based on mechanisms involving exclusion, intracellular sequestration, and physiological adaptation.

Keywords: Cadmium, resistance genes, DNA, RNA, sequencing, *Serratia surfactantfaciens*

Contenido

	Pág.
1. Capítulo 1: Marco Teórico	**16**
1.1. Características del cadmio	16
1.2. Efectos del cadmio en las bacterias	18
1.2.1. Alteración de la integridad de la membrana celular	18
1.2.2. Inhibición enzimática	19
1.2.3. Estrés oxidativo	19
1.2.4. Daño al ADN e inestabilidad genómica	19
1.2.5. Alteración de la división celular bacteriana y la homeostasis de metales	20
1.3. Mecanismos microbianos de resistencia al cadmio	20
1.3.1. Sistemas de eflujo	21
1.3.2. Secuestro intracelular	23
1.3.3. Secuestro Extracelular	24
1.4. Métodos para identificar genes de resistencia	26
1.4.1. Técnicas basadas en el análisis de ADN	26
1.4.2. Técnicas basadas en el análisis de ARN	27
1.5. Estado del arte	29
1.6. Planteamiento del problema	30
1.7. Justificación	32
2. Capítulo 2: Identificación taxonómica y análisis genómico de la resistencia a cadmio(II) de Serratia sp. 5b	**34**
2.1. Introducción	34
2.2. Materiales y métodos	36
2.2.1. Aislamiento bacteriano	36
2.2.2. Extracción y secuenciación de ADN	36
2.2.3. Ensamblaje y anotación del genoma	37
2.2.4. Análisis taxonómico	37
2.2.5. Identificación de genes implicados con la resistencia a cadmio	38
2.2.6. Caracterización genómica de los genes de resistencia a cadmio	39
2.2.7. Análisis de variantes genéticas	39
2.2.8. Anotación funcional de variantes	40
2.3. Resultados y discusión	40
2.3.1. Ensamblaje y anotación del genoma	40
2.3.2. Clasificación taxonómica	41
2.3.3. Identificación de genes asociados con resistencia a cadmio	44
2.3.4. Caracterización genómica de los genes de resistencia a cadmio	46
2.3.5. Análisis de variantes genéticas	47
2.4. Conclusiones	49

3. Capítulo 3: Análisis transcriptómico de la resistencia a cadmio(II) en Serratia sp. 5b **50**
3.1. Introducción 50
3.2. Materiales y métodos 52
3.2.1. Condiciones de cultivo 53
3.2.2. Extracción y secuenciación de ARN 53
3.2.3. Pre-procesamiento de datos transcriptómicos 54
3.2.4. Análisis de datos transcriptómicos 55
3.2.5. Extracción de ARN y síntesis de ADNc 55
3.2.6. Diseño de primers 57
3.2.7. Análisis de expresión relativa 57
3.3. Resultados y discusión 59
3.3.1. Diseño experimental 59
3.3.2. Preprocesamiento, alineamiento y tabla de conteos 59
3.3.3. Análisis preliminar de los datos de expresión 60
3.3.4. Análisis de genes diferencialmente expresados 63
3.3.5. Análisis de enriquecimiento funcional 68
3.3.6. Validación de la expresión génica por RT-qPCR 71
3.4. Conclusiones 73
4. Conclusiones y recomendaciones **74**
4.1. Conclusiones 74
4.2. Recomendaciones 75
Anexo **84**
Referencias **86**

Lista de figuras

Pág.

Figura 2-1: Reconstrucción filogenómica de *Serratia* sp 5b basada en genes ortólogos de copia única. 42
Figura 2-2: Valores de identidad nucleotídica promedio (ANI) entre *Serratia* sp. 5b y genomas de referencia del género *Serratia*. 43
Figura 2-3: Representación esquemática de las proteínas codificadas por los genes detectados mediante análisis genómico. 45
Figura 3-1: Diagrama de cajas de la expresión génica global tras transformación VST en *Serratia* sp. 5b. 62
Figura 3-2: Análisis de componentes principales (PCA) de la expresión génica en las condiciones control y tratamientos con Cd(II). 63
Figura 3-3: Mapa de correlación por coeficiente de Pearson entre réplicas biológicas tras normalización VST. 64
Figura 3-4: Volcano plot de genes diferencialmente expresados entre la condición control y 0,50 mM de Cd(II). 66
Figura 3-5: Representación esquemática de los sistemas de entrada y salida de Cd(II) identificados en el análisis transcriptómico. 68
Figura 3-6: Dotplot de términos enriquecidos de ontología génica GO en la condición 0,50 mM de Cd(II) frente al control. 70
Figura 3-7: Validación por RT-qPCR de la expresión de zntA, zinT, mntA y znuC en respuesta a Cd(II). 73

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura o símbolo	Término
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNasa	enzima que rompe moléculas de ADN
ADNg	ADN genómico
ANI	Average Nucleotide Identity
ARN	Ácido ribonucleico
ARN-seq	ARN sequencing
ATP	Adenosín Trifosfato
ATPasa	enzima que hidroliza ATP
BAM	Binary Alignment Map
Cd	Cadmio
Cd(II)	Cadmio(II)
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DEGs	Differential Expression Genes
IS	Inserción sequence
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MICP	Microbiologically Induced Carbonate Precipitation
LFC	Log-Fold Change Values
OD_{600}	Densidad Óptica a 600 nm
PCR	Polymerase Chain Reaction
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RT-qPCR	Real Time - quantitative Polymerase Chain Reaction
SAM	Sequence Alignment Map
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
TIRs	Terminal Inverted Repeats
VST	Variance Stabilizing Transformation
Zn	Zinc
Zn(II)	Zinc(II)

1. Capítulo 1: Marco Teórico

1.1. Características del cadmio

El cadmio es un metal pesado altamente tóxico y no esencial que representa un riesgo significativo para la salud humana y el medio ambiente debido a su persistencia, bioacumulación y amplia distribución en los ecosistemas (Ati-Hellal & Hellal, 2021; Peana et al., 2022). Este elemento se encuentra en diversos ambientes, como el suelo, el agua y el aire, como resultado de fuentes tanto naturales como de actividades antropogénicas (Tchounwou et al., 2012). Su capacidad para acumularse en los organismos vivos, incluidos los seres humanos, lo convierte en un motivo de gran preocupación en el ámbito de la toxicología ambiental y la salud pública.

Si bien el cadmio está presente de forma natural en la corteza terrestre, generalmente asociado con menas de zinc, plomo o cobre, las actividades antropogénicas constituyen la principal fuente de contaminación ambiental (Fatima et al., 2019). Siendo la minería, la galvanoplastia, la fabricación de baterías y la producción de pigmentos, las actividades que más liberan cadmio al medio ambiente (Du et al., 2020).

Asimismo, el cadmio es un contaminante común en las rocas fosfatadas utilizadas en la producción de fertilizantes, lo que provoca su acumulación en los suelos agrícolas y su posterior absorción por las plantas (Mar & Okazaki, 2012; Kubier et al., 2019). Otras fuentes importantes de contaminación incluyen la disposición inadecuada de desechos industriales, lodos de depuradora y residuos electrónicos, los cuales contribuyen a la contaminación del suelo y el agua. Además, las emisiones industriales y la combustión de combustibles fósiles liberan cadmio a la atmósfera, facilitando su dispersión y posterior deposición en la superficie terrestre y acuática (Shi et al., 2019).

La distribución geográfica del cadmio varía considerablemente, observándose mayores concentraciones en regiones con intensa actividad industrial o antecedentes de explotación minera. Debido a su elevada estabilidad química, el cadmio puede persistir en el medio ambiente durante períodos prolongados, acumulándose en los suelos y sedimentos, representando un riesgo a largo plazo tanto para la salud humana como para los ecosistemas (Kubier et al., 2019).

El cadmio es un elemento altamente bioacumulativo que ingresa a la biota a través del suelo y el agua, afectando a una amplia gama de organismos, desde microorganismos hasta vertebrados. Su acumulación en la cadena trófica puede alterar funciones ecológicas esenciales y contribuir a la pérdida de biodiversidad (Carvalho et al., 2020; Peana et al., 2022). Uno de los mecanismos más preocupantes es la biomagnificación, en la que los organismos de niveles tróficos superiores acumulan concentraciones crecientes de cadmio a medida que avanzan en la cadena alimentaria. Esto puede afectar negativamente el crecimiento, la reproducción y la supervivencia de numerosas especies, alterando, en última instancia, el equilibrio ecológico (Croteau et al., 2005; Ali & Khan, 2018).

En los humanos la exposición al cadmio ocurre principalmente a través del consumo de alimentos y agua contaminados, así como por la inhalación de partículas en suspensión en el aire. Una vez absorbido, el cadmio se acumula principalmente en los riñones, donde puede provocar disfunción renal progresiva y aumentar el riesgo de enfermedad renal crónica (Åkesson, 2011). Debido a su prolongada vida media biológica, el cadmio permanece en el organismo durante décadas, lo que conduce a una toxicidad acumulativa y efectos adversos persistentes en la salud. Además, interfiere con el metabolismo óseo al alterar la homeostasis del calcio, lo que contribuye al desarrollo de osteoporosis y a un mayor riesgo de fracturas (Satarug et al., 2009).

La inhalación crónica de cadmio, especialmente en entornos ocupacionales, se ha asociado con trastornos respiratorios graves, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el cáncer de pulmón. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) ha clasificado al cadmio como un carcinógeno humano, con evidencia que respalda su asociación con un mayor riesgo de cáncer de pulmón, próstata y riñón. Asimismo, la exposición al cadmio se ha vinculado con

enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión y la aterosclerosis, posiblemente mediadas por el estrés oxidativo y la disfunción endotelial (Ledda, 2018; Joseph, 2023).

Más allá de sus efectos nefrotóxicos, osteotóxicos y carcinogénicos, el cadmio también ha sido implicado en la toxicidad reproductiva. Diversos estudios sugieren que el cadmio puede afectar la fertilidad tanto en hombres como en mujeres al alterar la regulación hormonal y la gametogénesis. Además, la exposición prenatal ha sido asociada con resultados adversos en el desarrollo fetal, lo que genera preocupación sobre sus efectos a largo plazo en la salud reproductiva (Kumar & Sharma, 2019; Zhu et al., 2020; Yang et al., 2022).

La gravedad de la toxicidad por cadmio depende de múltiples factores, incluidos el nivel y la duración de la exposición, la susceptibilidad individual y el estado nutricional. Dada su amplia presencia en el medio ambiente y su persistente bioacumulación, el cadmio constituye un importante problema de salud pública, lo que subraya la necesidad de implementar estrategias eficaces de monitoreo y mitigación para minimizar la exposición y los riesgos asociados para la salud (Fatima et al., 2019; Peana et al., 2022; Zhao et al., 2022).

1.2. Efectos del cadmio en las bacterias

El cadmio ejerce una amplia variedad de efectos tóxicos sobre las células bacterianas a través de distintos mecanismos que comprometen la integridad celular, la función enzimática, los procesos metabólicos y la estabilidad genética (Sharma et al., 2023).

1.2.1. Alteración de la integridad de la membrana celular

Los iones de cadmio desplazan cationes divalentes esenciales que son fundamentales para mantener la estabilidad de la membrana celular. Este desplazamiento debilita la estructura de la membrana, aumentando su permeabilidad y provocando la fuga de componentes intracelulares. Además, el cadmio induce la peroxidación lipídica, una reacción en cadena que daña los lípidos de la membrana y compromete aún más su integridad (Bauda et al., 1987; Zhang et al., 2021).

1.2.2. Inhibición enzimática

El cadmio puede interferir en el funcionamiento enzimático de diversos procesos celulares como la replicación del ADN, la síntesis de proteínas y el metabolismo (Hrynkiewicz et al., 2014). Este proceso puede ocurrir por inhibición competitiva, en la cual el cadmio compite con los cofactores naturales por los sitios de unión de las enzimas, reduciendo su eficiencia y afectando su actividad catalítica (Jaishankar et al., 2014). También la inhibición se puede generar por la unión directa provocando el cambio conformacional de las enzimas. En este caso, el cadmio interactúa con los grupos sulfhidrilo de la cisteína, lo que altera la conformación y desestabiliza el sitio activo, afectando su funcionalidad (Glušič et al., 2012).

1.2.3. Estrés oxidativo

El cadmio promueve indirectamente la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) al interrumpir las cadenas de transporte de electrones, provocando la pérdida de electrones y la formación de radicales superóxido. Además, reduce los niveles de antioxidantes celulares como el glutatión, esenciales para la eliminación de ROS. La combinación de un aumento en la producción de ROS y una disminución de la capacidad antioxidante genera un estado de estrés oxidativo, causando daños en componentes celulares como el ADN, las proteínas y los lípidos (Hossain et al., 2012).

1.2.4. Daño al ADN e inestabilidad genómica

El cadmio induce daño en el ADN tanto de forma directa como indirecta. Directamente, se une a las bases del ADN, afectando su estabilidad. Indirectamente, la producción de ROS inducida por cadmio genera diversas lesiones en el ADN, incluyendo rupturas de cadena simple, rupturas de doble cadena y modificaciones oxidativas de bases nitrogenadas. Estos daños pueden dar lugar a mutaciones genéticas y comprometer la estabilidad genómica celular (Wu et al., 2011).

1.2.5. Alteración de la división celular bacteriana y la homeostasis de metales

El cadmio interfiere en la división celular bacteriana mediante múltiples mecanismos. Inhibe el ensamblaje y el funcionamiento del anillo Z, una estructura del citoesqueleto compuesta por proteínas FtsZ esenciales para la iniciación y progresión del proceso de división celular. Además, el cadmio afecta la replicación del ADN y la segregación cromosómica, intensificando su impacto en la proliferación bacteriana (Hossain et al., 2012).

El cadmio compite con metales esenciales por los sistemas de captación y sitios de unión, lo que genera deficiencias que afectan la función de metaloproteínas y otras estructuras celulares que requieren estos metales como cofactores. Por ejemplo, el cadmio puede desplazar el zinc en las proteínas tipo "zinc-finger", que desempeñan un papel fundamental en la regulación génica (Rensing & Mitra, 2007; Neville et al., 2015).

Los efectos tóxicos del cadmio en las células bacterianas están interrelacionados y pueden actuar de manera sinérgica, amplificando el daño celular. La relevancia de cada mecanismo varía en función de la especie bacteriana, la concentración de cadmio y las condiciones ambientales (Hrynkiewicz et al., 2014; Nnaji et al., 2024). Es importante destacar que diferentes especies bacterianas presentan sensibilidades variables al cadmio, con algunas mostrando una alta susceptibilidad mientras que otras exhiben una notable resistencia (Mathivanan & Rajaram, 2014).

Más allá de las respuestas específicas de cada especie bacteriana, los factores ambientales, como el pH, la temperatura y la presencia de otros metales o materia orgánica, influyen en la toxicidad del cadmio al modificar su especiación y biodisponibilidad. Estas condiciones afectan la interacción del cadmio con las células bacterianas y, en consecuencia, su impacto general (Wu et al., 2018; Fashola et al., 2023).

1.3. Mecanismos microbianos de resistencia al cadmio

Las células bacterianas presentan diversos mecanismos para contrarrestar los efectos perjudiciales del cadmio. Los cuales se dividen en tres grupos: 1) sistemas de eflujo, en los cuales los iones cadmio son transportados activamente desde el citosol al exterior de

la célula; 2) secuestro extracelular, en donde el cadmio es inmovilizado fuera de la célula sin la activación de procesos metabólicos; 3) secuestro intracelular, en el cual el cadmio es inmovilizado dentro de la célula (Khan et al., 2022; Thai et al., 2023).

1.3.1. Sistemas de eflujo

Las bombas de eflujo son proteínas transportadoras ubicadas en la membrana celular que expulsan activamente los iones de cadmio del citoplasma. Este proceso dependiente de energía evita la acumulación de cadmio a niveles tóxicos dentro de la célula (Jebril et al., 2022). Estas bombas suelen estar codificadas por genes ubicados en plásmidos o en el cromosoma bacteriano (Sharma et al., 2023). Los mecanismos de transporte de eflujo se clasifican en tres categorías principales: transportadores de la familia Resistencia-Nodulación-División (RND), ATPasas tipo P y Facilitadores de Difusión de Cationes (CDF). Cada categoría presenta características moleculares únicas y emplea principios bioquímicos distintos para mantener la homeostasis de los metales celulares.

- ATPasas tipo P

Las ATPasas tipo P constituyen una clase crucial de transportadores de eflujo que desempeñan un papel central en los mecanismos de resistencia microbiana al cadmio. Estas bombas de membrana dependientes de energía transportan activamente los iones de cadmio fuera del citoplasma bacteriano, evitando su acumulación tóxica dentro de la célula. Las ATPasas tipo P se caracterizan por la presencia de motivos estructurales altamente conservados, como la firma CPC, esenciales para la unión y el transporte selectivo de iones metálicos (Chan et al., 2010).

El gen *cadA*, presente en la bacteria *Staphylococcus aureus*, es un ejemplo representativo de una ATPasa tipo P que confiere resistencia al cadmio (Jang, 2016). El transportador CadA bombea activamente los iones de cadmio fuera del citoplasma, reduciendo así su concentración intracelular y previniendo la toxicidad (Oger et al., 2003). La actividad de estos transportadores tipo ATPasa P está estrictamente regulada para equilibrar el gasto de ATP con la desintoxicación efectiva del entorno celular. Esta regulación es fundamental, ya que permite a la célula bacteriana optimizar el uso de su

energía mientras mantiene una defensa eficaz contra el estrés inducido por el cadmio (Khan et al., 2022).

La importancia evolutiva de las ATPasas tipo P en la adaptación microbiana a la toxicidad por metales pesados se evidencia en sus características estructurales conservadas, como la firma CPC (Maynaud et al., 2014). Estas bombas de eflujo especializadas transportan de manera eficiente el cadmio y otros cationes divalentes a través de la membrana citoplasmática, desempeñando un papel fundamental en los mecanismos de resistencia al cadmio en bacterias (Nies, 2003).

- Transportadores resistencia-nodulación-división (RND)

Además de las ATPasas tipo P, otro mecanismo clave involucrado en la resistencia bacteriana al cadmio es la familia de sistemas de eflujo de la división resistencia-nodulación (RND, por sus siglas en inglés). Esta familia abarca sistemas de eflujo tripartitos complejos, predominantemente observados en bacterias Gram-negativas. Estos transportadores utilizan la fuerza motriz de protones para expulsar activamente una variedad de iones metálicos pesados, incluido el cadmio, a través de la envoltura celular bacteriana (Kavanaugh et al., 2024). Estructuralmente, los sistemas de eflujo RND constan de tres componentes clave: una proteína RND de la membrana interna, una proteína de fusión de membrana y un factor de la membrana externa. En conjunto, estos componentes forman un canal continuo que atraviesa todo el espacio periplásmico, permitiendo la exportación directa de iones metálicos desde el citoplasma hasta el entorno extracelular (Guglierame et al., 2006).

Esta disposición intrincada y coordinada permite a los sistemas de eflujo RND translocar de manera eficiente metales pesados tóxicos, como el cadmio, fuera de la célula bacteriana. Esto proporciona un mecanismo de protección fundamental contra el estrés y la toxicidad inducidos por metales. Un ejemplo destacado de un sistema de eflujo RND es el sistema CzcCBA, presente en el patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa* (Ducret et al., 2020). El sistema CzcCBA confiere resistencia a una variedad de metales pesados, incluidos el cobalto, el zinc y el cadmio, al expulsar activamente estos iones tóxicos del citoplasma bacteriano (Chatterjee et al., 2024). La expresión y actividad coordinadas del sistema CzcCBA y otros transportadores de eflujo RND desempeñan un

papel central en las estrategias globales de resistencia al cadmio empleadas por las bacterias Gram-negativas para mitigar los efectos adversos del metal (Liu et al., 2021).

- Facilitadores de Difusión de Cationes (CDFs)

Las proteínas transportadoras CDF emplean mecanismos quimioosmóticos especializados para extruir cationes metálicos divalentes, incluido el cadmio, desde el citoplasma (Kolaj-Robin et al., 2015). Su actividad contribuye a la desintoxicación del cadmio y a la regulación general de los iones metálicos dentro de las células bacterianas (Adhikary et al., 2024). Al utilizar mecanismos de antiporte acoplados a protones, los transportadores CDF reducen eficazmente las concentraciones intracelulares de cadmio, mitigando el estrés inducido por metales. Además, ayudan a mantener un equilibrio adecuado de iones esenciales como el zinc y el cobalto, crucial para la supervivencia bacteriana en entornos contaminados con metales (Montanini et al., 2007; Kolaj-Robin et al., 2015).

1.3.2. Secuestro intracelular

El secuestro intracelular es un mecanismo fundamental empleado por las bacterias para mitigar los efectos tóxicos del cadmio. Este proceso consiste en la unión de iones cadmio a moléculas específicas, evitando su interacción con componentes celulares esenciales. Al reducir la concentración de cadmio libre en el citoplasma, este mecanismo contribuye a minimizar sus efectos perjudiciales sobre los procesos celulares clave (Lima et al., 2006; Thai et al., 2023).

Diversas moléculas participan en el secuestro intracelular de cadmio. Las metalotioneínas, pequeñas proteínas ricas en cisteína, desempeñan un papel fundamental en la unión de metales debido a su abundancia de grupos tiol, que forman enlaces fuertes con los iones de cadmio (Chatterjee et al., 2020). Otra molécula clave es el glutatión, un tripéptido que contiene un grupo tiol capaz de unirse al cadmio y a otros metales pesados. Además, el glutatión facilita tanto la exportación de cadmio desde el citoplasma como su secuestro en compartimentos intracelulares, como las vacuolas (Helbig et al., 2008). Adicionalmente, las metalochaperonas contribuyen al secuestro intracelular al unir y transportar iones metálicos hacia metaloenzimas, reduciendo así su

citotoxicidad y protegiendo las estructuras celulares (Bazzi et al., 2020). Diversas especies bacterianas emplean el secuestro intracelular como estrategia de detoxificación. Por ejemplo, *Pseudomonas putida* utiliza proteínas de bajo peso molecular ricas en cisteína para secuestrar cadmio (Shamim et al., 2014), mientras que *Rhizobium leguminosarum* emplea glutatión para este propósito (Lima et al., 2006).

1.3.3. Secuestro Extracelular

El secuestro extracelular es un mecanismo clave de resistencia al cadmio en bacterias, que implica la unión o precipitación de cadmio fuera de la célula. Este proceso reduce su biodisponibilidad e impide su acumulación intracelular (Das & Dash, 2017). Las bacterias logran el secuestro extracelular a través de tres mecanismos principales: la complejación con sustancias poliméricas extracelulares (EPS) (Ghosh et al., 2024), la biosorción en la superficie celular (Limcharoensuk et al., 2015) y la bioprecipitación en forma de compuestos insolubles (Kumari et al., 2016).

- Biosorción

La biosorción es un proceso pasivo en el que los iones de cadmio se adhieren a la superficie celular bacteriana mediante interacciones con grupos funcionales como carboxilos, fosfatos, hidroxilos y aminos presentes en la pared celular. Dado que este mecanismo no requiere energía metabólica, su eficacia depende principalmente de las propiedades fisicoquímicas de la superficie bacteriana (Limcharoensuk et al., 2015; Aryal, 2020). En este contexto, las bacterias Gram-positivas, caracterizadas por poseer gruesas capas de peptidoglicano con abundantes residuos cargados negativamente, suelen exhibir una mayor capacidad de biosorción en comparación con las bacterias Gram-negativas (Silva et al., 2012). La eficiencia de la biosorción está influenciada por factores ambientales como el pH, la fuerza iónica y la presencia de iones metálicos competidores (Priyadarshanee & Das, 2020).

- Complejación con Sustancias Poliméricas Extracelulares (EPS)

Junto con las interacciones directas con la superficie celular, algunas bacterias secretan sustancias poliméricas extracelulares (EPS), que son biopolímeros de alto peso

molecular compuestos principalmente por polisacáridos, proteínas y lípidos. Las EPS pueden quelar iones de cadmio en el medio circundante, inmovilizándolos eficazmente e impidiendo su ingreso a la célula (Gupta & Diwan, 2016). Por ejemplo, un estudio sobre la cepa *Pseudomonas* AN-B15 demostró que la complejación mediada por EPS fue el principal mecanismo de eliminación de Cd en solución (Huang et al., 2023). Este mecanismo es relevante para mitigar los efectos adversos del cadmio en bacterias formadoras de biopelículas, donde la matriz de EPS actúa como una barrera protectora frente al estrés por metales pesados. *Stenotrophomonas maltophilia*, por ejemplo, ha demostrado resistencia a la toxicidad del cadmio a través del secuestro mediado por EPS (Chellaiah, 2018; Ramakrishnan et al., 2023). A diferencia de la biosorción, la complejación mediada por EPS implica una matriz extracelular que regula activamente la unión del cadmio, atrapando los iones de Cd lejos de la superficie celular.

- Bioprecipitación

La bioprecipitación es un mecanismo metabólicamente activo en el que las bacterias inducen la formación de compuestos de cadmio insolubles, reduciendo así su solubilidad y toxicidad. Este proceso suele implicar la producción microbiana de subproductos metabólicos, como iones de sulfuro (S^{2-}), que reaccionan con el cadmio para formar sulfuro de cadmio (CdS), un precipitado insoluble (Pagnanelli et al., 2010). Además de la precipitación por sulfuro, algunas bacterias promueven la precipitación de cadmio en forma de carbonatos, dependiendo de la disponibilidad de aniones correspondientes (Tamayo-Figueroa et al., 2019). La precipitación por carbonatos ocurre en bacterias que modifican el pH del medio circundante, lo que conduce a la formación de carbonato de cadmio insoluble ($CdCO_3$) (Priyadarshanee & Das, 2020). Por ejemplo, se ha observado que *Sporosarcina pasteurii* promueve la precipitación de carbonato de cadmio al aumentar la alcalinidad mediante procesos metabólicos (Xu & Wang, 2023). La eficiencia de la bioprecipitación depende de condiciones ambientales como el pH, el potencial redox y la presencia de iones competidores que puedan interferir con las reacciones de precipitación (Hoffmann et al., 2021).

1.4. Métodos para identificar genes de resistencia

El estudio de los mecanismos de resistencia bacteriana a metales pesados encaminados en identificar los genes que confieren este rasgo deben emplear técnicas precisas. Para ello, se ha usado un conjunto de técnicas moleculares que permiten estudiar este fenómeno desde distintos niveles, desde detectar la presencia de genes en el genoma, evaluar su expresión en respuesta al estrés metálico y validar su participación en el fenotipo resistente. Cada técnica brinda un tipo particular de evidencia, y su aplicabilidad está determinada por el tipo de material analizado (ADN o ARN), la resolución deseada y el alcance del estudio (Gillieatt & Coleman, 2024). Conocer estas diferencias metodológicas resulta fundamental para interpretar críticamente los resultados obtenidos y para justificar el uso de enfoques complementarios.

Teniendo en cuenta las técnicas empleadas en este trabajo, en esta sección se consideran las principales técnicas moleculares basadas en el análisis de ácidos nucleicos empleadas para identificar genes de resistencia a metales pesados en bacterias. Particularmente, se abordan las técnicas basadas en el análisis de ADN, que permiten detectar genes candidatos presentes en el genoma, y las basadas en ARN, que revelan su expresión bajo condiciones de estrés (Halema et al., 2024). No se incluirán técnicas de análisis proteómico ni enfoques meta-ómicos, ya que desbordan la metodología utilizada en este trabajo.

1.4.1. Técnicas basadas en el análisis de ADN

Las técnicas moleculares basadas en ADN han sido fundamentales para identificar genes bacterianos asociados a la resistencia a metales pesados, ya sea mediante métodos dirigidos como la PCR o aproximaciones globales como la secuenciación genómica (Gillieatt & Coleman, 2024; Halema et al., 2024). Cada una permite inferencias distintas, desde la detección puntual de genes conocidos hasta la caracterización completa de los determinantes genéticos presentes en un genoma. Sin embargo, estas herramientas ofrecen evidencia de potencial genético y no de función activa, por lo que los resultados deben interpretarse con cautela (Zhu et al., 2022).

La PCR convencional ha sido utilizada extensamente para detectar genes de resistencia bien caracterizados, mediante *primers* específicos diseñados a partir de secuencias

previamente descritas. Mediante esta técnica se ha identificado la presencia de genes como *merA*, *czcA* o *arsC* en cepas aisladas de ambientes contaminados, con alta sensibilidad y especificidad (Abou-Shanab et al., 2007; Trajanovska et al., 1997). Sin embargo, su alcance está limitado a blancos previamente definidos, lo que impide detectar variantes o genes nuevos. Es importante tener en cuenta que la detección por PCR debe interpretarse como evidencia de presencia genómica, pero no necesariamente de expresión ni funcionalidad bajo condiciones reales de exposición a metales (Xu et al., 2023). Por otra parte, la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) representa un avance respecto a la PCR convencional al permitir cuantificar la abundancia relativa de genes específicos (Lopez et al., 2018; Smith & Osborn, 2009). Esta capacidad ha sido aprovechada en estudios que comparan niveles de genes de resistencia entre distintas condiciones ambientales o cepas, con buena resolución y rendimiento (Zhu et al., 2022). A pesar de ello, esta técnica también requiere el conocimiento previo de los genes a estudiar y no informa sobre su actividad transcripcional ni su contribución funcional directa sobre el fenotipo de resistencia.

A diferencia de las anteriores técnicas, la secuenciación del genoma permite identificar el conjunto de genes de resistencia presentes en un organismo sin requerir conocimientos previos (Halema et al., 2024). Este enfoque se ha utilizado para caracterizar la diversidad y organización de genes asociados a metales pesados, incluyendo operones completos y elementos móviles que podrían facilitar su diseminación (Lan et al., 2023). Además, el análisis comparativo entre genomas ha permitido identificar diferencias relevantes en la entre cepas de una misma especie o entre especies filogenéticamente relacionadas (Bouzat & Hoostal, 2013; Permina et al., 2006). Sin embargo, la inferencia funcional a partir del genoma tiene algunos retos ya que los genes son anotados por similitud, y su implicación en la resistencia debe confirmarse mediante estudios complementarios.

1.4.2. Técnicas basadas en el análisis de ARN

Las técnicas basadas en ARN permiten identificar los genes que se expresan activamente en un organismo cuando es expuesto en una condición, en contraste con métodos de ADN que solo detectan la presencia de genes (Halema et al., 2024). Es decir, estas técnicas permiten identificar los genes que se transcriben, y potencialmente contribuyen a la resistencia, cuando la bacteria es expuesta a metales tóxicos, pero no

brinda evidencia directamente su función bioquímica. La identificación se basa en aumentos o disminuciones en los niveles de ARNm bajo estrés por metales pesados, lo que sugiere que tales genes responden al metal y posiblemente están involucrados en su tolerancia.

La RT-qPCR es una técnica dirigida que permite cuantificar con alta sensibilidad la expresión de genes específicos. La cual se ha empleado ampliamente en estudios de resistencia a metales, permitiendo la identificación de genes como *arsB*, *copA, merA* y *zntA*, los cuales se sobreexpresan en presencia de arsénico, cobre, mercurio o cadmio, respectivamente (Cardona et al., 2022; Huang et al., 2022; Zhu et al., 2022; Zhang et al., 2016). Entre las ventajas que ofrece esta técnica destaca la especificidad, reproducibilidad y capacidad de detectar pequeños cambios en la expresión. Sin embargo, como es un análisis dirigido exige conocimiento previo del gen a estudiar, limitando su utilidad en el descubrimiento de genes nuevos (Rocha et al., 2020).

Aunque actualmente es una técnica poco utilizada, los *microarrays* permiten analizar la expresión de miles de genes simultáneamente. Sin embargo, la identificación está restringida a los genes que están representados en la plataforma. A través de esta técnica se han identificado redes de genes que responden colectivamente al estrés por metales pesados, revelando perfiles transcripcionales que incluyen bombas de eflujo, sistemas antioxidantes y proteínas de transporte (Mosieurs et al., 2011; Hu et al., 2005). Entre sus ventajas destaca su bajo costo relativo y disponibilidad comercial para organismos modelo. No obstante, los *microarrays* tienen limitaciones importantes como dependencia de sondas previamente diseñadas y dificultad para detectar genes poco expresados o variantes desconocidas (Malone & Oliver, 2011).

La secuenciación de ARN (RNA-seq) se ha consolidado actualmente como la técnica más usada para el análisis transcriptómico. Permite la secuenciación directa del ARN mensajero total, sin necesidad de sondas específicas, lo que facilita la detección de genes, incluso aquellos escasamente expresados, así como la identificación de transcritos novedosos. En bacterias resistentes a metales pesados, RNA-seq ha permitido determinar respuestas transcripcionales en detalle y diferenciar entre respuestas específicas a distintos metales (Croucher & Thomson, 2010). Además, ofrece ventajas cuantitativas significativas respecto a *microarrays*, como mayor resolución y

mayor rango dinámico. Sin embargo, su implementación requiere recursos computacionales, experiencia bioinformática y cuidado en la interpretación ya que la expresión de un gen no implica por sí sola un rol funcional directo en resistencia, y puede deberse a una respuesta inespecífica al estrés (Croucher & Thomson, 2010).

1.5. Estado del arte

El género *Serratia*, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, comprende un grupo diverso de bacterias que se encuentran en diversos ambientes, incluidos el suelo, el agua e incluso como patógenos oportunistas en humanos (Barman et al., 2020). Algunas especies de *Serratia* han demostrado la capacidad de tolerar e incluso prosperar en presencia de metales pesados, como el cadmio, lo que las convierte en candidatas prometedoras para aplicaciones de biorremediación (Zhu et al., 2022; Diez-Marulanda & Brandão, 2023). Sin embargo, los mecanismos específicos que subyacen a la resistencia al cadmio en *Serratia* han sido relativamente menos estudiados en comparación con otros géneros bacterianos (Jebril et al., 2022).

Los sistemas de eflujo desempeñan un papel fundamental en la resistencia bacteriana a metales pesados al transportar activamente los iones tóxicos fuera de la célula. En *Serratia marcescens* RSC-14, los análisis genómicos han identificado algunos genes que codifican ATPasas tipo P y transportadores CBA, los cuales están implicados en el eflujo de Cd(II). Estos transportadores utilizan la hidrólisis de ATP para translocar iones de Cd(II) a través de la membrana celular, reduciendo así su toxicidad intracelular (Khan et al., 2017). Además, la formación de biopelículas representa otra estrategia clave empleada por algunas especies de *Serratia* para mitigar el estrés inducido por metales pesados. Estudios en *S. marcescens* KMR-3 han demostrado que la exposición al Cd(II) incrementa significativamente la producción de biopelícula, lo que facilita la adsorción de iones de Cd(II) y contribuye a reducir sus efectos citotóxicos (Zhu et al., 2022).

La producción de metabolitos secundarios, como el pigmento rojo prodigiosina, también se ha asociado con la resistencia al Cd(II) en especies de *Serratia*. En *S. marcescens* KMR-3, la biosíntesis de prodigiosina se encuentra regulada positivamente en respuesta a la exposición al Cd(II), lo que genera un aumento del 19.5% en la adsorción de este metal en comparación con condiciones sin el pigmento. Esto sugiere que la prodigiosina

podría quelar iones de Cd(II) o modificar las propiedades de la superficie celular para mejorar la unión al metal. Sin embargo, no todas las cepas de *Serratia* producen prodigiosina; por ejemplo, *S. marcescens* RSC-14 carece del grupo de genes responsable de su biosíntesis, lo que indica variaciones en los mecanismos de resistencia al Cd(II) entre cepas (Zhu et al., 2022).

Las interacciones planta-microorganismo también contribuyen a la tolerancia al Cd(II) en especies de *Serratia*. Se ha demostrado que *Serratia marcescens* BM1 mejora el crecimiento y la tolerancia al estrés por cadmio en plantas de soya (El-Esawi et al., 2020). La inoculación con esta cepa incrementa la biomasa vegetal, la absorción de nutrientes y la actividad de enzimas antioxidantes bajo condiciones de estrés por cadmio. Esta relación simbiótica no solo beneficia a la planta al reducir la toxicidad del cadmio, sino que también resalta el potencial de *Serratia* en procesos de fitorremediación (Chen et al., 2019; El-Esawi et al., 2020; Khan et al., 2015).

A pesar de los avances en la comprensión de estos mecanismos, persisten importantes vacíos en el conocimiento sobre la base genética y molecular de la resistencia al Cd(II). La mayoría de los estudios se han centrado en especies como *S. marcescens*, dejando una falta de análisis genómicos y proteómicos exhaustivos para otras especies como *S. surfactantfaciens*. Investigaciones recientes han indicado que esta especie presenta una alta tolerancia al Cd(II) (Diez-Marulanda & Brandão, 2023, 2024); sin embargo, los determinantes genéticos específicos y las redes regulatorias involucradas en esta tolerancia siguen siendo en gran medida desconocidos. Este estudio busca abordar esta brecha de conocimiento mediante análisis genómicos y transcriptómicos, proporcionando información valiosa sobre los mecanismos de resistencia al Cd(II) en esta especie poco estudiada de *Serratia*.

1.6. Planteamiento del problema

Aunque se ha reportado que *Serratia* sp. 5b posee una notable capacidad para crecer en presencia de Cd(II) y reducir su concentración en solución bajo condiciones de laboratorio (Diez-Marulanda, 2022; Diez-Marulanda & Brandão, 2023), los mecanismos moleculares responsables de esta resistencia no han sido caracterizados de manera integral. Esta situación limita la comprensión del repertorio genético y regulatorio que

sustenta dicho fenotipo, y dificulta la extrapolación de estos resultados a escenarios más amplios, como la evaluación ecológica o evolutiva del fenómeno.

Si bien se han realizado análisis genómicos en otras especies del género *Serratia*, estos estudios son todavía escasos y, en muchos casos, se enfocan en cepas con relevancia clínica más que ambiental. De igual manera, los estudios transcriptómicos bajo condiciones de exposición a metales pesados han sido limitados, careciendo en su mayoría de una integración explícita entre la presencia de genes de resistencia en el genoma y su expresión diferencial ante estímulos específicos como el Cd(II). Esta desconexión entre el análisis genómico y la respuesta transcriptómica representa una brecha metodológica y conceptual en el estudio de la resistencia bacteriana a metales pesados.

En el caso particular de *Serratia* sp. 5b, no existe hasta el momento una caracterización genómica completa ni un análisis transcriptómico en condiciones controladas de exposición a Cd(II). Tampoco se ha verificado experimentalmente si los genes presuntamente asociados con la resistencia al metal son transcritos diferencialmente. Esta ausencia de información, limita la posibilidad de establecer relaciones causales entre la estructura genómica de la cepa y su fenotipo resistente, y dificulta la identificación de genes clave que podrían servir como marcadores moleculares o blancos funcionales para estudios posteriores.

Así, se plantea la necesidad de desarrollar un estudio que combine el análisis genómico y transcriptómico de *Serratia* sp. 5b con el fin de identificar los genes potencialmente implicados en la resistencia a Cd(II) y evaluar su expresión en condiciones de exposición al metal. Tal aproximación permitirá avanzar hacia una comprensión más precisa de los mecanismos moleculares involucrados en este proceso, y contribuirá a cerrar la brecha de conocimiento respecto a la base genética de la resistencia a metales pesados en bacterias no clínicas del género *Serratia*.

1.7. Justificación

La resistencia bacteriana a metales pesados como el cadmio representa un fenómeno de gran interés científico debido a su implicación en la adaptación microbiana a ambientes

contaminados y a los riesgos asociados con la movilidad de estos elementos en los ecosistemas. Aunque diversos estudios han documentado la capacidad de algunas cepas bacterianas para sobrevivir en presencia de cadmio, aún persisten vacíos importantes en la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a esta capacidad, especialmente en bacterias no clínicas del género *Serratia*.

En particular, *Serratia* sp. 5b ha demostrado ser capaz de crecer en medios contaminados con Cd(II) y reducir su concentración en solución bajo condiciones de laboratorio (Diez-Marulanda, 2022; Diez-Marulanda & Brandão, 2023). Sin embargo, la base molecular que sustenta esta resistencia no ha sido caracterizada hasta el momento. La cepa no cuenta con un análisis genómico detallado que permita identificar genes implicados en resistencia a metales, ni con un perfil transcriptómico que evidencie la respuesta diferencial de dichos genes ante la exposición al metal. Esta ausencia de información limita la interpretación del fenotipo resistente observado y dificulta establecer relaciones funcionales entre la estructura genética y la expresión génica asociada al Cd(II).

Adicionalmente, la detección de genes relacionados con factores de virulencia en el genoma de *Serratia* sp. 5b refuerza la necesidad de abordar este estudio desde una perspectiva crítica y no aplicativa, evitando extrapolaciones prematuras hacia escenarios de biorremediación. En cambio, la caracterización genómica y transcriptómica de esta cepa permitirá generar conocimiento fundamental sobre su biología molecular, aportando información clave para entender cómo ciertos microorganismos pueden persistir y adaptarse a ambientes contaminados con cadmio.

En este contexto, se plantea el presente estudio con el objetivo general de “Determinar la presencia y expresión de los genes de *Serratia* sp. 5b implicados en la resistencia a cadmio(II)”. Para ello, se han definido los siguientes objetivos específicos:

- Identificar en el genoma de *Serratia* sp. 5b los genes implicados en la resistencia a cadmio(II).

- Determinar mediante análisis transcriptómico los genes de *Serratia* sp. 5b responsables de la resistencia a cadmio(II).

- Verificar la expresión de algunos genes de *Serratia* sp. 5b que intervienen en la resistencia a cadmio(II).

2. Capítulo 2: Identificación taxonómica y análisis genómico de la resistencia a cadmio(II) de *Serratia* sp. 5b

2.1. Introducción

Las bacterias resistentes a cadmio (Cd(II)) tiene diversos determinantes genéticos con los cuales disminuyen la toxicidad del metal (Jebril et al., 2022). Entre los mecanismos mejor conocidos destacan operones y genes específicos los cuales intervienen en la detoxificación del Cd(II), tales como *cad, czc* y *znt* (Intorne et al., 2012; Rehan et al., 2022; Zheng et al., 2024). Por ejemplo, el operón *czc* (cobalto-zinc-cadmio) codifica un sistema de eflujo de tres componentes que expulsa iones divalentes como el Co(II), Zn(II) y Cd(II) fuera de la célula, confiriendo resistencia al metal (Nies, 2003). Además, genes individuales como *cadA* o *zntA* pueden codificar ATPasas tipo P que transportan activamente cationes divalentes, contribuyendo a la exportación de Cd(II) desde el citoplasma (Oger et al., 2003; Qin et al., 2019).

En el género *Serratia*, la resistencia a Cd(II) ha sido menos investigada en comparación con otros géneros como *Bacillus*, *Cupriavidus*, *Escherichia* y *Pseudomonas* (Chellaiah, 2018; Shi et al., 2020; Tseng et al., 2023a; Liang et al., 2025). Sin embargo, se han reportado algunas cepas resistentes aisladas del suelo. Un ejemplo es *Serratia marcescens* RSC-14, una bacteria endófita promotora del crecimiento vegetal aislada de suelos contaminados con cadmio, capaz de aliviar el estrés por Cd(II) en la planta hospedera (Khan et al., 2015). El análisis de su genoma permitió identificar diferentes genes asociados a resistencia a metales pesados, incluyendo tres ATPasas transportadoras de Cd(II)/Pb(II)/Zn(II)/Hg(II) y al menos tres genes putativos del operón *czc*, todos implicados en la resistencia a Cd(II) (Khan et al., 2017). Estos hallazgos indican que *Serratia* puede poseer determinantes genéticos cruciales para la

detoxificación de Cd(II) en entornos contaminados. De modo similar, *S. rubidaea* SR19, aislada de la rizósfera, presentó elevada tolerancia a Cd(II) y promovió el crecimiento de plántulas bajo estrés por este metal (El-Minisy et al., 2025). En el genoma se identificaron genes relacionados con la resistencia a metales pesados y respuestas al estrés, lo cual sustenta el fenotipo tolerante (El-Minisy et al., 2025). A pesar de estos ejemplos, en general los estudios genómicos sobre resistencia a cadmio en *Serratia* spp. son escasos en la literatura en comparación con otros géneros, lo que señala la necesidad de investigar más a fondo este grupo de microorganismos.

En este contexto, en el grupo de investigación GERMINA, de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, se han realizado investigaciones con cepas de *Serratia* aisladas de suelos cacaoteros contaminados con cadmio. Estas cepas tienen la capacidad de inducir la inmovilización del Cd(II) como carbonatos a través del proceso denominado precipitación de carbonatos inducida microbiológicamente (MICP, por sus siglas en inglés), empleando la ruta ureolítica (Diez-Marulanda & Brandão, 2023). En particular, *Serratia* sp. 5b demostró la capacidad de remover más del 99% del Cd(II) inicial (0,15 mM) en medio líquido, precipitando el metal principalmente en forma de calcita (Diez-Marulanda & Brandão, 2024). Además, en el genoma de *Serratia* sp. 5b se identificó un gen del operón *czc*, asociado a la expulsión de Cd(II), cuya expresión no se vió afectada por la presencia de Cd(II) pero sí se incrementó bajo condiciones con presencia de urea (Diez-Marulanda & Brandão, 2024).

A pesar de las investigaciones realizadas, existen vacíos en el conocimiento sobre cuáles genes específicamente confieren la resistencia a Cd(II) en la cepa *Serratia* sp. 5b, y además, a qué especie del género *Serratia* corresponde exactamente. Evidencias preliminares sugieren que la cepa 5b podría estar filogenéticamente emparentada con *S. surfactantfaciens* al emplear en gen 16S rRNA (Diez-Marulanda & Brandão, 2023), una especie caracteriza por producir biosurfactantes, pigmentos y promover el crecimiento vegetal (Su et al., 2016; Ouyang et al., 2024). Sin embargo, hasta la fecha no se han publicado estudios genómicos enfocados específicamente en los determinantes de resistencia a metales pesados en este microorganismo. Por ello, este capítulo se centra en el primer objetivo específico que consiste en caracterizar el genoma de *Serratia* sp. 5b para identificar los genes implicados en su resistencia a Cd(II) y precisar su identificación taxonómica. De manera que la investigación aporta al conocimiento sobre la resistencia a

cadmio en este género y la base genética de la resistencia a Cd en *Serratia* sp. 5b, así como su clasificación taxonómica dentro del género.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Aislamiento bacteriano

La cepa *Serratia* sp. 5b fue previamente aislada a partir de una muestra de suelo cacaotero con presencia de Cd(II) (Diez-Marulanda & Brandão, 2023). Además fue determinada la capacidad de la bacteria para crecer en medio líquido suplementado con Cd(II), siendo la concentración mínima inhibitoria de 4 mM (Diez-Marulanda & Brandão, 2024). Así mismo, fue realizada la caracterización morfológica mediante observaciones macroscópicas y microscópicas, y la identificación molecular analizando la secuencia del gen 16S rRNA (Diez-Marulanda, 2022; Diez-Marulanda & Brandão, 2023).

Para su conservación, la cepa fue criopreservada en medio LB (peptona 10 g L^{-1}, extracto de levadura 5 g L^{-1}, NaCl 5 g L^{-1}) suplementado con glicerol al 20 % y almacenada a −80 °C. Además, con el fin de garantizar la trazabilidad y homogeneidad experimental, se realizó un banco de trabajo derivado de una única resiembra del stock criopreservado, a partir del cual se obtuvieron los subcultivos empleados en todos los experimentos posteriores.

2.2.2. Extracción y secuenciación de ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega Co., EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad y concentración del ADN fueron evaluadas mediante espectrofotometría utilizando NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific), considerando las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 nm como indicadores de pureza, obteniéndose las métricas recomendadas para los pasos posteriores. La secuenciación del genoma se efectuó en la plataforma Illumina con el equipo MiSeq, empleando una configuración paired-end con generación de lecturas de 150 pares de bases (2 × 150 bp), utilizando *MiSeq Reagent Kit v2*, de acuerdo con los protocolos establecidos por el fabricante.

2.2.3. Ensamblaje y anotación del genoma

Inicialmente se determinó la calidad de las lecturas utilizando FastQC v1.12.0 (Andrews, s/f) y seguidamente fueron filtradas con Trimmomatic v0.36 (Bolger et al., 2014) y Cutadapt (Martin, 2011) para eliminar secuencias de adaptadoras y bases con valores de calidad Phred menores a 20. Posteriormente, las secuencias procesadas se emplearon para realizar el ensamblaje del genoma *de novo* utilizando SPAdes v4.0.0 (Prjibelski et al., 2020) con los parámetros por defecto. La calidad de los *contigs* obtenidos fue evaluada con QUAST v5.3.0 (Gurevich et al., 2013) considerando las métricas N50, L50, número total de *contigs* y longitud total del ensamblaje. La integridad del genoma ensamblado, su grado de completitud y la posible presencia de contaminación fueron determinados mediante CheckM v1.2.3 (Parks et al., 2015) teniendo en cuenta los marcadores universales correspondientes a la familia *Enterobacteriaceae* a la cual pertenece la cepa. Finalmente, la anotación del genoma fue realizada con Prokka v1.14.6-5 (Seemann, 2014), identificando las regiones correspondientes a genes codificantes, ARN ribosomales (rRNA), ARN de transferencia (tRNA) y ARN no codificante (ncRNA).

2.2.4. Análisis taxonómico

El análisis taxonómico de *Serratia* sp. 5b se realizó en base a los genes ortólogos de copia única. Para ello, de las 28 diferentes especies que conforman el género *Serratia,* de acuerdo con la base de datos taxonómica del NCBI, se consideraron las secuencias de 25 especies ya que presentan genoma de referencia disponible. Así mismo, se utilizó el genoma ensamblado de *Serratia* sp. 5b y como *outgroup* se incluyó a *Yersinia ruckeri* KMM821. La información detallada sobre los genomas utilizados se presenta en el Anexo A.

Para cada uno de los taxones analizados se descargaron desde NCBI los archivos correspondientes con las secuencias de proteínas y las secuencias de los genes codificantes. La identificación de los genes ortólogos de copia única se realizó con OrthoFinder v2.5.5 (Emms & Kelly, 2019), utilizando DIAMOND (Buchfink et al., 2021) para la búsqueda todo contra todo, y MCL (Van Dongen, 2008) para el agrupamiento en *orthogroups*. Además, se especificó la opción de alineamiento múltiple de secuencias

(MSA) para generar alineamientos *codon-aware* con las secuencias de proteínas alineadas con MAFFT (Kuraku et al., 2013), a partir de la cuales se generaron sus correspondientes secuencias de ADN. Los alineamientos de los genes ortólogos de copia única fueron posteriormente concatenados en una única matriz filogenómica (supermatriz), junto con el archivo de particiones correspondiente, utilizando FASconCAT-G (Kück & Longo, 2014).

La inferencia filogenética se realizó por máxima verosimilitud mediante RAxML-NG v1.2.2 (Kozlov et al., 2015; Stamatakis, 2014). El modelo evolutivo óptimo se determinó para cada gen previamente con ModelTest-NG v0.1.7 (Darriba et al., 2020; Flouri et al., 2014), y aplicado en RAxML-NG a través del archivo de particiones. La robustez de los nodos fue evaluada mediante análisis de *bootstrap* utilizando el criterio de convergencia que permite detener el procedimiento una vez la distribución de las ramas no varía. Finalmente, se generó el árbol de consenso con valores de soporte *bootstrap*, el cual fue visualizado y editado mediante FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2015/2025).

Se determinó la identidad promedio de nucleótidos (ANI) para estimar el grado de similitud genómica entre *Serratia* sp. 5b con las diferentes especies que conforman el género. Para ello fueron incluidas las 26 especies con genomas de referencia disponibles en la base de datos NCBI RefSeq, junto con el genoma ensamblado de la cepa de *Serratia* sp. 5b. La lista de los genomas de referencia utilizados se presenta en el Anexo A. El análisis ANI se llevó a cabo utilizando FastANI v1.33 (Jain et al., 2018), especificando el genoma de *Serratia* sp. 5b como consulta y los genomas de referencia como base comparativa. Se consideró como umbral de pertenencia a la misma especie aquellos casos con valores de ANI > 95%.

2.2.5. Identificación de genes implicados con la resistencia a cadmio

Los genes implicados con la resistencia a cadmio fueron identificados a partir del genoma ensamblado mediante el uso del programa ABRicate v1.0.0 (Seemann, 2014/2025), configurado con una base de datos personalizada, compuesta exclusivamente por genes con evidencia experimental de resistencia a cadmio obtenidos de la base de datos BacMet v2.0 (Pal et al., 2014). Fueron recuperadas 54 secuencias de proteínas las cuales se tradujeron a sus correspondientes secuencias de ADN con EMBOSS v6.6.0

(Madeira et al., 2024) empleando la tabla de codones para bacterias. Para considerar una coincidencia como válida los criterios en ABRicate fueron ajustados a 70% de identidad y 60% de cobertura.

2.2.6. Caracterización genómica de los genes de resistencia a cadmio

Para conocer la organización de los genes asociados con la resistencia a cadmio, se realizaron tres tipos de análisis complementarios. Primero, se determinó si los genes formaban parte de unidades transcripcionales mediante Operon-Mapper (Taboada et al., 2018), utilizando como entrada el genoma ensamblado y su respectiva anotación. Los resultados fueron comparados con la localización de los genes de resistencia a fin de determinar si se encontraban integrados en operones predichos. En segundo lugar, se evaluó la posible presencia de plásmidos en el genoma ensamblado utilizando ABRIcate (Seemann, 2014/2025) con la base de datos PlasmidFinder (Carattoli et al., 2014) con un umbral mínimo de identidad del 80 % y una cobertura del 70 %. Finalmente, se llevó a cabo la detección de inserciones, integrones y transposones mediante ISEScan v1.7.2.3 (Xie & Tang, 2017), IntregronFinder v2 (Néron et al., 2022) y TnComp_finder v1.0.0 (Alvarenga & Vanari, 2019), respectivamente. Los elementos móviles detectados fueron luego comparados con la localización de los genes de resistencia a cadmio para determinar posibles asociaciones funcionales o eventos de transferencia horizontal.

2.2.7. Análisis de variantes genéticas

Inicialmente se hizo el alineamiento de los *reads* filtrados contra el genoma de *S. surfactantfaciens* YD25 (con código de acceso GCF_001642805.2 en la base de datos RefSeq del NCBI), identificada como la cepa filogenéticamente más cercana según el análisis descrito previamente, con BWA-MEM v0.7.19 (Li, 2013). Los archivos SAM obtenidos fueron convertidos a BAM, ordenados e indexados con SAMtools (Danecek et al., 2021) y posteriormente, la identificación de variantes genéticas se hizo con FreeBayes v1.3.9 (Garrison & Marth, 2012). Las variantes fueron filtradas con BCFtools (Danecek et al., 2021) empleando los criterios de umbrales mínimos de calidad (QUAL ≥ 30) y profundidad mínima de cobertura (DP ≥ 15). Los resultados obtenidos se cruzaron

con la localización de los genes de resistencia a cadmio para determinar la presencia de SNPs.

2.2.8. Anotación funcional de variantes

El archivo con los sitios variantes filtrados fue anotado utilizando SnpEff (Cingolani et al., 2012), para lo cual se construyó una base de datos personalizada con la información del genoma de referencia de *S. surfactantfaciens* YD25, así como la correspondiente tabla de uso codónico para bacterias. La anotación permitió clasificar las variantes según su localización (codificantes, intergénicas, sinónimas, no sinónimas, etc.) y estimar su posible impacto funcional. Los resultados obtenidos se cruzaron con la localización de los genes de resistencia a cadmio.

2.3. Resultados y discusión

2.3.1. Ensamblaje y anotación del genoma

El ensamblaje *de novo*, fue realizado a partir de 1,28 millones de lecturas previamente filtradas. La proporción de GC antes y después de filtrar las secuencias se mantuvo en 59%, lo cual está en concordancia con lo reportado para otros genomas del género *Serratia* (Su et al., 2016). El ensamblaje del genoma estaba compuesto por 18 *contigs* con una longitud total de 4.99 Mbp. La profundidad media, considerada como el número promedio de veces que se secuencia una base, fue de 35X y la cobertura fue del 97%. Estos valores indican que el genoma obtenido tiene buena calidad y es representativo (Riesco & Trujillo, 2024). El valor de N50 fue de 554.169 pb y el L50 fue de 3, lo que refleja una alta continuidad del ensamblaje (Wang & Wang, 2023). El *contig* más largo alcanzó 1,5 Mbp, abarcando la mayor parte del replicón principal. Las métricas de cada uno de los *contigs* se encuentran en el Anexo B.

Para evaluar la completitud y la contaminación, el ensamblaje fue analizado utilizando conjuntos de marcadores específicos de linaje, obteniéndose una completitud del 99.88% y una contaminación del 0%. En total, se identificaron 542 de 546 genes de copia única específicos de la familia *Enterobacteriaceae* en la cual se encuentra el género *Serratia*, lo que confirma la relación taxonómica de la cepa y descarta la presencia de secuencias

exógenas o quiméricas. Estos valores se ajustan a los criterios utilizados para genomas de referencia curados en GenBank (Parks et al., 2015; Almeida et al., 2021).

La anotación genómica identificó 4.602 secuencias codificantes (CDSs) y varios tipos de ARNs: 83 tRNAs, 9 rRNAs, 1 tmRNA y 26 ncRNAs. De los CDSs anotados, 1.101 corresponden a proteínas hipotéticas (casi el 24% de las 4.557 CDSs anotadas). Aunque esta proporción es relativamente alta, no es inusual en bacterias no modelo (Galperin & Koonin, 2010). Sin embargo, llama la atención que una fracción importante de las secuencias codificantes aún se les desconoce alguna función. Además, teniendo en cuenta que el tamaño promedio de las proteínas hipotéticas identificadas fue de 316 aminoácidos, sugiere que no se trata únicamente de artefactos de anotación, sino que podrían representar entidades funcionales reales.

El genoma completo de *Serratia* sp. 5b se encuentra depositado en la base de datos GenBank bajo el número de acceso JBPSCT000000000, asociado al *BioProject* PRJNA1291823 y al *BioSample* SAMN49979229. La versión descrita en este trabajo corresponde al ensamblaje GCA_051418095.1. Las lecturas crudas de secuenciación se encuentran disponibles en el *Sequence Read Archive* (SRA) bajo el número de acceso SRR34980014.

2.3.2. Clasificación taxonómica

Determinar la clasificación taxonómica de las bacterias que hacen parte del género *Serratia* a nivel de especie o cepa, en algunas ocasiones suele ser complicado, debido a la plasticidad genómica y al comportamiento polifilético que presentan algunos clados del género (Iguchi et al., 2014; Williams et al., 2022). Para la identificación taxonómica de *Serratia* sp. 5b, se llevó a cabo un análisis filogenómico por máxima verosimilitud empleando los genes ortólogos de copia única presentes en 26 diferentes especies de *Serratia*. Este tipo de análisis ha demostrado superar el poder discriminatorio que emplean los métodos clásicos de análisis filogenético que emplean un único marcador molecular, como el gen 16S rRNA o un grupo de genes *housekeeping* como *rpoB*, *qyrB*, *infB* o *atpD* (Meier-Kolthoff et al., 2013; Na et al., 2018). Del mismo modo, utilizar los genes ortólogos para establecer la identificación taxonómica de un organismo tiene ventajas sobre otras aproximaciones que emplean todo el genoma o todos los genes

(ortólogos, no ortólogos y parálogos) ya que disminuyen el ruido y aporta mayor resolución a la filogenia. Los detalles de los genomas utilizados se encuentran en el Anexo A**.**

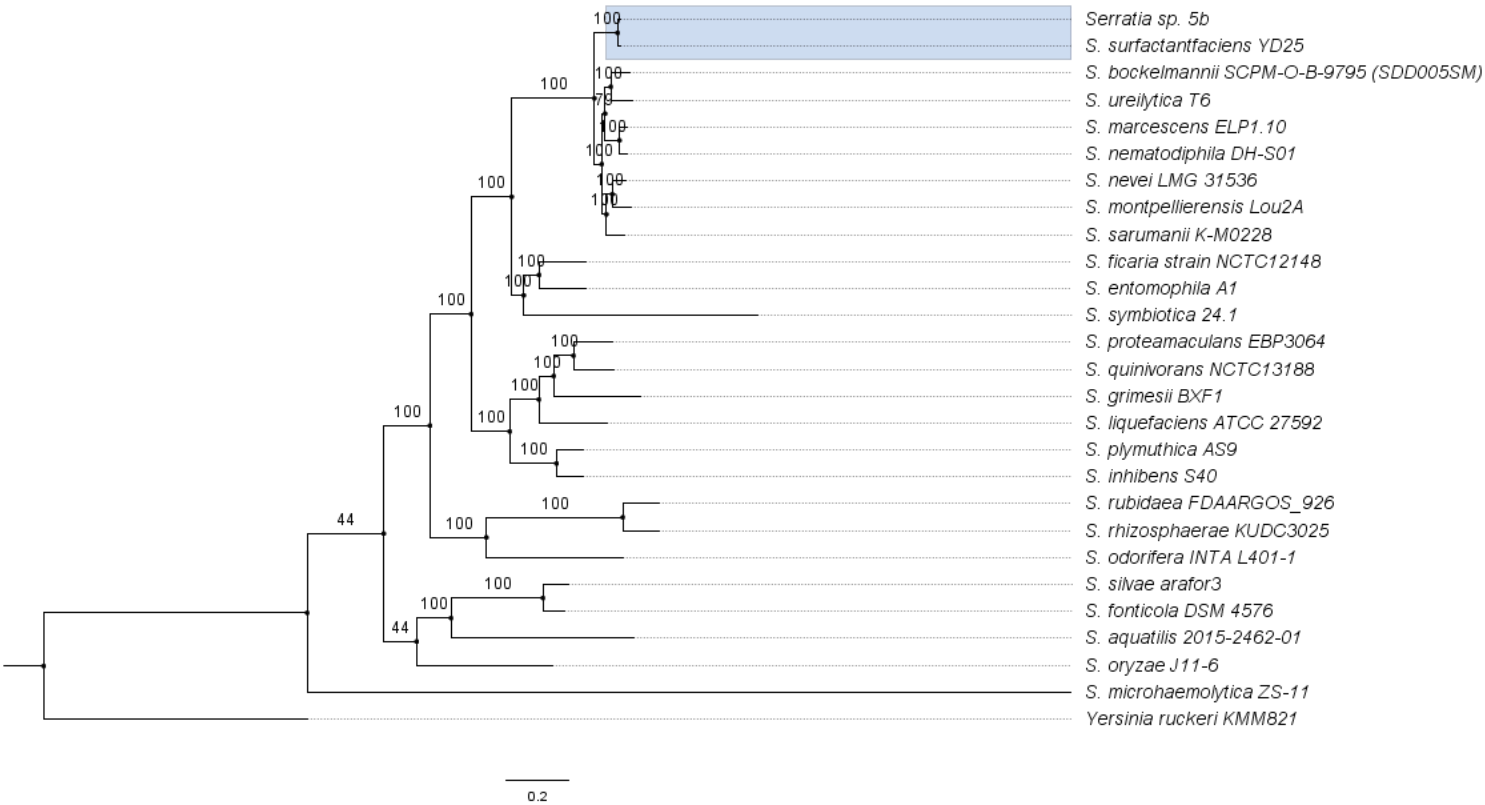


Figura 2-1. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en 1052 genes ortólogos de copia única. El recuadro en azul destaca el clado conformado por *Serratia* sp. 5b y *S. surfactantfaciens YD25* con un 100 % de compatibilidad con bootstrap. La barra representa el número de sustituciones estimado.

El análisis filogenómico empleando 1052 genes ortólogos de copia única permitió inferir un árbol, en el cual *Serratia* sp. 5b constituye un clado junto con *S. surfactantfaciens* YD25, con un soporte de *bootstrap* de 100, indicando que la cepa hace parte de este género (**Figura 2-1**). Al igual que *Serratia* sp. 5b, la cepa *S. surfactantfaciens* YD25 fue aislada de muestras de suelo rizosférico de plantas de tabaco (Chun et al., 2017). El grupo hermano al clado de *S. surfactantfaciens* está constituido por las especies *S. bockelmannii, S. ureilytica, S. marcescens, S. nematodiphila, S. nevei, S. montpellierensis* y *S. sarumanii,* los cuales conforman el clado más derivado dentro del género (*bootstra*p=100). En cada uno de estos clados los tamaños de las ramas son

cortos, indicando que las diferencias de sustitución entre los taxones son bajas, pero están bien resueltas sin formar una politomía.

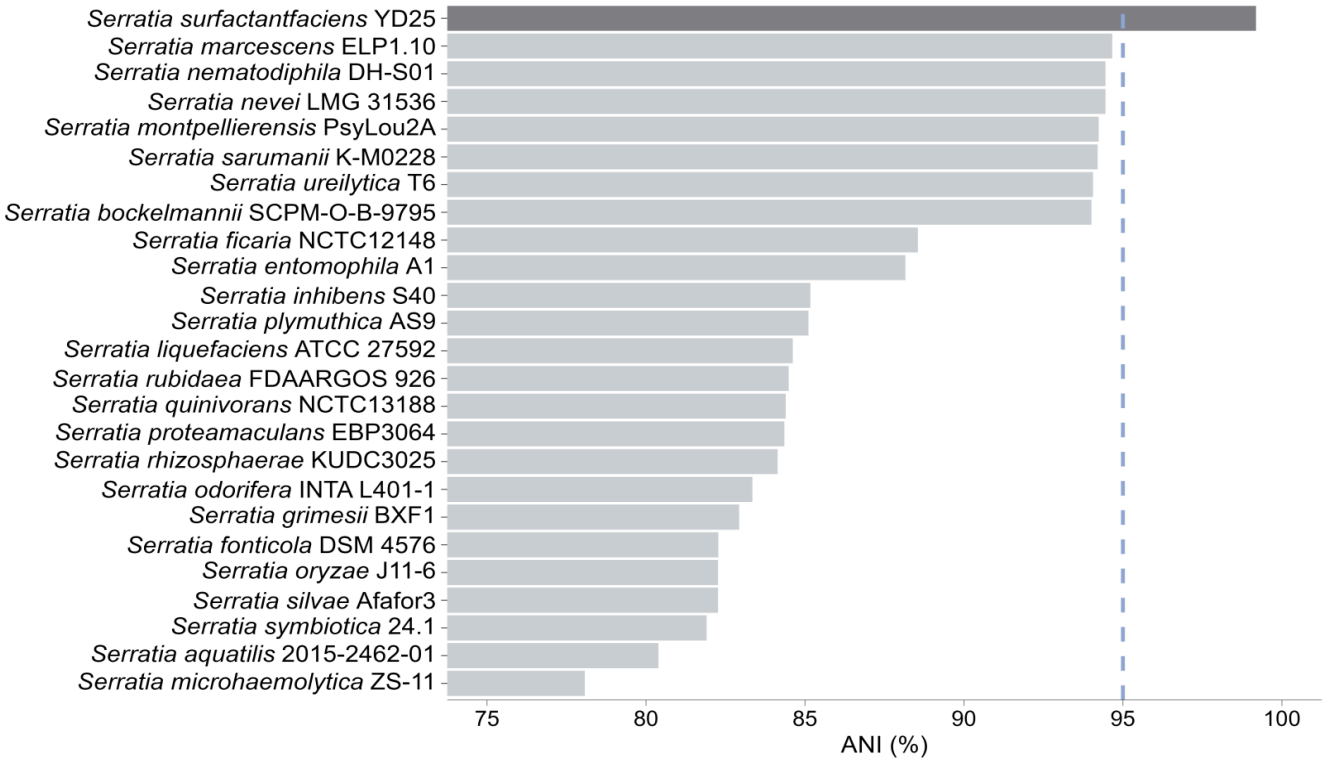


Figura 2-2. Valores promedio de identidad de nucleótidos (ANI) entre *Serratia* sp. 5b y 25 genomas de referencia de *Serratia*. Únicamente *S. surfactantfaciens* YD25 superó el umbral de especie (>95 %, línea punteada).

Su et. al (2016) utilizaron los genes *rpoB*, *atpD*, *gyrB* y *infB* para establecer las relaciones filogenéticas de *S. surfactantfaciens YD25*, reportando que hace parte de un clado conformado por *S. nematodiphila*, *S. marcescens* y *S. ureilytica*, el cual no estaba bien resuelto formando una politomía. Este hallazgo demuestra que las aproximaciones metodológicas que emplean un número bajo de genes no tienen la capacidad de resolver las relaciones filogenéticas del género *S. surfactantfaciens*. En otra investigación, utilizando una aproximación metodológica similar a la empleada en este trabajo, fueron analizadas las relaciones filogenéticas dentro del género *Serratia* empleando 664 taxones, en la cual el parentesco entre las diferentes especies es igual al obtenido en este trabajo (Williams et al., 2022). Sin embargo, no fueron incluidos taxones de los grupos más basales y derivados como *S. surfactantfaciens*. De modo que los resultados

obtenidos en este trabajo permiten conocer cuál es la relación filogenética de *Serratia* sp. 5b y a su vez del género *S. surfactantfaciens*.

Adicionalmente, se determinó la identidad promedio de nucleótidos (ANI, por sus siglas en inglés) de *Serratia* sp. 5b utilizando las mismas especies de *Serratia* del análisis previo. Teniendo en cuenta que el umbral del valor ANI para designar una especie es entre 95-96% (Lindsey et al., 2023), *Serratia* sp. 5b pertenece al género *S. surfactantfaciens* YD25 con un valor ANI de 99,18% (**Figura 2-2**), superando ampliamente el umbral lo que proporciona una asignación taxonómica con alta confianza. Este resultado es congruente con la identificación obtenida en el análisis filogenético previo.

2.3.3. Identificación de genes asociados con resistencia a cadmio

El análisis del genoma ensamblado de Serratia sp. 5b permitió identificar diez genes potencialmente asociados con la resistencia a Cd(II): dsbA, dsbB, fieF, mntH, robA, ychH, ygiW, zinT, zitB y zntA. Estos fueron detectados mediante búsquedas de homología contra la base de datos BacMet, restringidas a genes con evidencia experimental frente a Cd(II). Los umbrales de identidad y cobertura fueron establecidos en 65 %, valores inferiores a los convencionalmente empleados (80–90 %) con el propósito de reconocer homólogos más divergentes que podrían pasar inadvertidos bajo criterios más estrictos. Cabe aclarar que la presencia de estos genes no representa una evidencia experimental directa, sino que da indicios sobre la conservación de la estructura genética y por tanto la función esperada en la bacteria.

Desde una perspectiva funcional, los genes identificados se pueden clasificar en dos grupos. El primero comprende los genes que codifican proteínas involucradas de manera directa en la regulación de la biodisponibilidad intracelular de Cd(II) (**Figura 2-3**). Particularmente en este grupo se encuentra la proteína ZntA, una ATPasa tipo P que cataliza el eflujo de iones Cd(II) desde el espacio periplásmico al citoplasma utilizando ATP (Chien et al., 2013; Zheng et al., 2024). FieF y ZitB, ambas pertenecientes a la familia CDF (facilitadores de difusión de cationes), median el eflujo de cationes divalentes desde el citoplasma hacia el periplasma mediante un mecanismo de antiporte metal/H^+ (Munkelt et al., 2004; Grass et al., 2005). MntH, miembro de la familia NRAMP, implicada principalmente en el transporte de Mn(II), aunque también otros metales divalentes como

el Cd(II) en condiciones de estrés oxidativo, pero a diferencia de las otras tres proteínas, desde el espacio periplásmico al citoplasma (Kehres et al., 2002). Finalmente, ZinT actúa como una chaperona en el espacio periplásmico, capturando iones metálicos y dirigiéndolos a transportadores transmembranales (Lee et al., 2002; Kershaw et al., 2007).

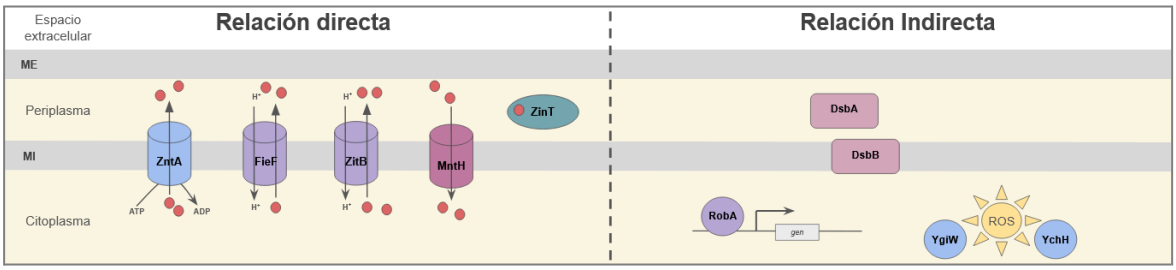


Figura 2-3. Representación esquemática de las proteínas codificadas por los genes detectados mediante análisis genómico, organizadas según su relación funcional con el metal. Los genes con relación directa participan en el transporte o manejo intracelular de Cd(II), mientras que aquellos con relación indirecta se asocian con respuestas al daño oxidativo y al mantenimiento de la calidad proteica. ME: membrana externa; MI: membrana interna; círculos rojos: iones Cd(II). Adaptado de Rensing & Mitra (2007) y Kha et al. (2022).

El segundo grupo, está conformado por los genes que codifican proteínas cuya relación con Cd(II) es indirecta, pero que intervienen en procesos celulares afectados por la exposición al metal (Figura 2-3). RobA es un regulador transcripcional implicado en la resistencia a antibióticos y al estrés por metales, activando sistemas de eflujo y genes de respuesta al estrés oxidativo (Tseng et al., 2023). Mientras que DsbA y DsbB, participan en la formación de enlaces disulfuro en el periplasma, esenciales para el correcto plegamiento y estabilidad de las proteínas; su importancia bajo exposición a Cd(II) radica en su contribución a la reparación de proteínas oxidadas o mal plegadas (Stafford et al., 1999; Khairnar et al., 2013; Forouzan et al., 2020; Xia et al., 2023). Por último, las proteínas YgiW y YchH aunque no han sido bien caracterizadas, previamente se asoció con estrés oxidativo posiblemente generado por Cd(II)(Lee et al., 2010) (**Figura 2-3**).

En conjunto, los genes identificados en *Serratia* sp. 5b implicados con la resistencia a Cd(II), sugieren que cuando la bacteria es expuesta al metal el proceso de detoxificación no consiste en el transporte del metal hacia el exterior de la célula. La presencia de

genes que codifican proteínas implicadas en procesos de transporte transmembranal del metal, homeostáticos y respuesta al estrés, indican la interacción entre desintoxicación, inmovilización y adaptación. Es importante tener en cuenta que los genes encontrados, a excepción de *zntA* identificado en una cepa de *S. marcescens* (Zhu et al., 2022), no han sido caracterizados funcionalmente en *Serratia*, de modo que la actividad de las proteínas se está asumiendo en base a los resultados en otros grupos taxonómicos.

2.3.4. Caracterización genómica de los genes de resistencia a cadmio

Determinar la ubicación en el genoma, así como las características de las regiones que se encuentran antes y después de los genes asociados con la resistencia a Cd(II), es crucial para dilucidar su regulación, movilidad y evolución. Además, considerando que la resistencia a Cd(II) puede surgir en respuesta a presiones de selección ambientales, establecer si estos genes se encuentran codificados en operones, presentes en plásmidos o asociados con elementos genéticos móviles, permite conocer la capacidad que tiene para diseminarse y su relevancia adaptativa.

La organización transcripcional de los genes de resistencia a cadmio se evaluó mediante predicciones de operones utilizando Operon-Mapper. De los diez genes previamente identificados, *zitB*, *fieF* y *dsbB*, hacen parte de operones. Particularmente, *zitB* fue identificado dentro de un operón tricistrónico junto con *rcsC* y *bvgA*, los cuales codifican el sensor histidina quinasa y un regulador transcripcional putativo, respectivamente. Por su parte, *fieF* hizo parte de un operón bicistrónico con un gen de función desconocida. Del mismo modo, *dsbB* se ubicó en un operón bicistrónico con *nhaB*, y codifica un antiportador sodio/protones. Aunque *nhaB* no ha sido vinculado tradicionalmente con la desintoxicación de cadmio, su asociación con *dsbB* podría reflejar respuestas fisiológicas más amplias frente a estrés iónico o redox, en concordancia con modelos que proponen mecanismos de regulación cruzada entre la homeostasis oxidativa y la metálica (Silver & Phung, 2005).

Los otros genes implicados con la resistencia: d*sbA, mntH, robA, ychH, ygiW, zinT* y *zntA*, están organizados como unidades monocistrónicas o no forman parte de operones identificables. Esta configuración podría reflejar mecanismos de regulación independientes, posiblemente mediados por factores de transcripción específicos

sensibles a metales (Hantke, 2001; Brocklehurst & Morby, 2000). Sin embargo, es importante señalar que esta falta de agrupamiento no implica la posible co-regulación, como se ha observado en algunos sistemas de resistencia a metales que están coordinados transcripcionalmente a pesar de su separación genómica (Nies, 2003).

La presencia de plásmidos y posible localización extracromosomal de los genes de resistencia al cadmio en *Serratia* sp. 5b se evaluó mediante ABRicate utilizando la base de datos PlasmidFinder. El análisis no identificó *contigs* de origen plasmídico en el ensamblaje genómico de *Serratia* sp. 5b, de manera que los genes de resistencia están ubicados en el ADN cromosómico. En estudios previos se han reportado plásmidos con genes de resistencia a metales en *Serratia*, incluyendo determinantes para mercurio (*mer*) y cobre (*cop*), especialmente en *S. marcescens* y *S. proteamaculans* (Youenou et al., 2015; van Hoek et al., 2011). Sin embargo, no se han encontrado reportes sobre de genes de resistencia a cadmio localizados en plásmidos.

La identificación de elementos genéticos en el genoma fue realizada utilizando ISEScan y TnComp_finder. ISEScan identificó dos secuencias de inserción (IS) pertenecientes a la familia IS3, así como cuatro repeticiones invertidas terminales (TIRs). Por su parte, TnComp_finder detectó 36 inserciones y 9 transposones. Sin embargo, ninguno de estos elementos se encontró próximo a los genes de resistencia al cadmio.

2.3.5. Análisis de variantes genéticas

La plasticidad genómica intraespecífica constituye un eje central en el potencial adaptativo de las bacterias, especialmente frente a estrés ambiental como la exposición a metales pesados (Nnaji et al., 2024). Aunque los enfoques de genómica comparativa y minería de genes ofrecen información sobre la presencia y conservación de determinantes candidatos de resistencia, con frecuencia pasan por alto variaciones a escala fina que, si bien son sutiles, pueden alterar significativamente la función génica o eventualmente proteica (Kobras et al., 2021). En este contexto, la detección e interpretación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) proporciona información adicional, capaz de identificar micro divergencias funcionales dentro de genomas que, en apariencia, se conservan estructuralmente (Didelot & Maiden, 2010). Dado que *Serratia* sp. 5b exhibe tolerancia fenotípica a concentraciones elevadas de cadmio y comparte

una alta identidad promedio de nucleótidos con *S. surfactantfaciens* YD25 (>99%), se realizó un análisis genómico global de variantes utilizando a esta última como referencia, con el objetivo de identificar cambios a nivel de secuencia potencialmente asociados con los genes de resistencia a cadmio.

Tras un control de calidad y filtrado de variantes, se conservaron 27.698 variantes genómicas de alta confianza a partir de un conjunto inicial de 52.609. Estas incluyeron 24.810 SNPs, 308 polimorfismos multinucleotídicos (MNPs), 105 inserciones, 113 deleciones y 2.362 variantes complejas. Aunque el software utilizado para la llamada de variantes (FreeBayes) no está específicamente optimizado para genomas procariotas—lo que podría sobreestimar la detección de *indels* en comparación con herramientas diseñadas para sistemas microbianos—los SNPs fueron considerados el tipo de variante más robusto para los análisis posteriores. De particular relevancia fueron los 43 SNPs localizados en los diez genes previamente identificados como asociados al cadmio. Si bien varios de estos correspondieron a cambios sinónimos o en regiones no codificantes, presumiblemente neutros, siete derivaron en sustituciones no sinónimas que podrían afectar la estructura o función proteica.

La distribución específica de SNPs por gen reveló una notable heterogeneidad. *mntH* y *fieF* presentaron el mayor número de SNPs (10 cada uno), seguidos por *zntA* (9), *robA* (5), *zitB* (4), *ygiW* (2) y *dsbA* (2). En contraste, no se detectaron SNPs en *zinT*, *ychH* ni *dsbB*. De manera destacada, únicamente dos genes (*fieF* y *zntA*) contenían mutaciones predichas como causantes de sustituciones de aminoácidos. El impacto de estos SNPs no sinónimos fue evaluado mediante SnpEff, que anotó las siete variantes como de impacto “moderado”, en concordancia con su localización en regiones codificantes y su potencial para alterar propiedades bioquímicas sin generar cambios en el marco de lectura ni codones de terminación prematuros.

En FieF, se identificaron tres sustituciones: Val130Ile, Glu220Asp y Arg272Trp. Las dos primeras son consideradas sustituciones conservadoras, ya que implican el reemplazo de aminoácidos con propiedades similares: valina e isoleucina son alifáticos e hidrofóbicos, mientras que glutamato y aspartato son ácidos y cargados negativamente (Hughes et al., 2008). Estas sustituciones suelen tener un impacto funcional limitado. En contraste, la sustitución de arginina por triptófano en la posición 272 es no conservadora, dado que cambia un residuo básico y cargado positivamente por uno aromático y neutro, lo que

podría afectar significativamente la estructura o función de la proteína. En ZntA, una ATPasa tipo P, se observaron cuatro sustituciones: Gly56Ser, Gly58Cys, Thr104Ser y Ser556Gly. Las sustituciones de glicina por serina y cisteína en las posiciones 56 y 58, respectivamente, son semi-conservativas, ya que introducen grupos funcionales adicionales que podrían alterar la flexibilidad local. La sustitución de treonina por serina en la posición 104 es conservadora, dado que ambos aminoácidos son polares y contienen grupos hidroxilo. Finalmente, la sustitución de serina por glicina en la posición 556 es semiconservativa, eliminando el grupo hidroxilo y potencialmente afectando la formación de enlaces de hidrógeno en esa región (Hughes et al., 2008). De manera que algunos de los cambios detectados en FieF y ZntA podrían tener efectos estructurales mínimos, o podrían generar cambios estructurales y funcionales significativos en las proteínas, especialmente aquellos que son no conservativos o semi-conservativos.

Estos hallazgos subrayan que aun cuando se obtuvo un valor alto de ANI entre *Serratia* sp. 5b y *S. surfactantfaciens* YD25, existe una divergencia a nivel de determinantes clave de resistencia, la cual podría alterar la conformación proteica, la cinética regulatoria o la afinidad por sustratos. Ademas, la combinación de conservación genotípica y divergencia a nivel de aminoácidos resalta la utilidad de los análisis centrados en SNPs como enfoque complementario a los estudios clásicos de presencia/ausencia de genes, especialmente al estudiar en cepas estrechamente relacionadas.

2.4. Conclusiones

El análisis filogenómico basado en genes ortólogos de copia única, complementado por el cálculo de identidad nucleotídica promedio (ANI), permitió determinar que *Serratia* sp. 5b pertenece a la especie *S. surfactantfaciens*, con un soporte bootstrap del 100 % y un valor de ANI de 99,18 %. A partir del análisis genómico, se identificaron diez genes potencialmente implicados en la resistencia a cadmio, utilizando una base de datos curada derivada de BacMet que incluye únicamente genes con evidencia experimental. Estos genes codifican proteínas asociadas a transporte de cationes metálicos (*fieF, mntH, zntA*), homeostasis intracelular (*zitB, zinT, ygiW, ychH*) y regulación del estrés celular (dsbA, dsbB, robA). Si bien la mayoría de estos genes no ha sido reportada previamente en el género *Serratia* con una función específica en resistencia a cadmio, su presencia sugiere posibles roles adaptativos que ameritan validación experimental.

El análisis del contexto genómico determinó que tres de los genes identificados (*zitB, fieF y dsbB*) se organizan en operones junto con genes implicados en señalización o transporte iónico. No fueron identificados plásmidos ni asociaciones directas con elementos genéticos móviles, lo que sugiere que estos determinantes están integrados de manera estable en el genoma cromosómico. A nivel de variantes, se identificaron 43 SNPs distribuidos en los diez genes, de los cuales solo siete resultaron en sustituciones no sinónimas, localizadas exclusivamente en *fieF* y *zntA*.

3. Capítulo 3: Análisis transcriptómico de la resistencia a cadmio(II) en *Serratia* sp. 5b

3.1. Introducción

La resistencia bacteriana a metales pesados constituye un fenómeno intrincado que comprende mecanismos genéticos, bioquímicos y fisiológicos los cuales les permiten crecer y proliferar en ambientes contaminados (Mathivanan et al., 2021). Los estudios de genómica sobre la resistencia bacteriana a metales pesados han desempeñado un rol crucial en la identificación de genes, operones y sistemas de transporte, particularmente aquellos relacionados con el secuestro intracelular, detoxificación y reparación de los daños inducidos por metales como el cadmio (Cd) (Halema et al., 2024). Sin embargo, aunque el análisis genético permite conocer el repertorio de genes asociados a la resistencia, como se trató en el capítulo previo, no ofrece información sobre su activación transcripcional ni sobre su participación efectiva bajo condiciones específicas. Por ello, el estudio de la expresión génica mediante enfoques transcriptómicos, como la secuenciación de ARN (RNA-seq), es una herramienta importante para comprender la respuesta bacteriana a ambientes contaminados, incluyendo la exposición a metales tóxicos (Jiao et al., 2024), como el cadmio.

Desde un enfoque comparativo, el análisis genómico permite establecer la potencial capacidad de un organismo para resistir metales, mientras que el análisis transcriptómico revela qué genes efectivamente están activos en un determinado momento (Lata et al., 2023). Esta diferencia es importante, teniendo en cuenta que los genes identificados en el genoma pueden permanecer reprimidos o no responder directamente ante la exposición al metal, lo que limita la inferencia funcional si no se cuenta con evidencia transcripcional (Halema et al., 2024). La transcriptómica, por el contrario, permite identificar genes diferencialmente expresados, rutas metabólicas inducidas y elementos reguladores clave (Wu et al., 2022).

En lo que respecta al género *Serratia*, los estudios transcriptómicos enfocados específicamente en la respuesta a metales tóxicos son escasos. Hasta la fecha, solo se

ha reportado un estudio transcriptómico en *Serratia marcescens* KMR-3, una cepa con la capacidad de crecer a altas concentraciones de Cd(II) (MIC ≥ 500 mg/L), donde se analizó mediante RNA-seq el impacto de la exposición a cadmio sobre la expresión génica global (Zhu et al., 2022). En dicho estudio se observó una fuerte inducción de genes involucrados en sistemas de transporte de zinc como *znuA, znuB y znuC*, de igual modo genes que codifican bombas de eflujo tipo ATPasa *zntA, zntB* y el regulador *zntR*. Además, se reportó una regulación positiva en genes asociados con la biosíntesis de prodigiosina, un pigmento con capacidad de quelación de Cd(II), y un aumento en la formación de biopelículas, ambas consideradas estrategias complementarias para la inmovilización superficial del metal (Zhu et al., 2022). Investigaciones como esta, evidencian que la resistencia a Cd(II) comprende diversos mecanismos de transporte de eflujo activa, adsorción y modificación del entorno inmediato del microorganismo. No obstante, más allá de este antecedente, no se conocen estudios transcriptómicos aplicados a otras especies de *Serratia*, como *S. surfactantfaciens,* bajo condiciones de estrés por cadmio, lo que evidencia un vacío en la literatura científica.

La relevancia del análisis transcriptómico en estudios de resistencia bacteriana a metales pesados ha sido ampliamente demostrada en otros géneros. En bacterias como *Cellulomonas, Cupriavidus, Geobacter y Pseudomonas*, el RNA-seq ha revelado que la respuesta incluye la activación de bombas de eflujo, proteínas antioxidantes, sistemas reguladores sensibles a metales y rutas de modificación de la envoltura celular (Huang et al., 2023; Wen et al., 2023; Kerdsomboon et al., 2024; Sun et al., 2025). Estas respuestas transcripcionales reflejan no solo los genes directamente implicados en la resistencia, sino también las redes regulatorias y rutas de señalización que permiten una adaptación fisiológica eficiente frente al estrés metálico. En este sentido, Jiao et al. (2024) argumentan que los perfiles transcriptómicos obtenidos bajo presión selectiva por metales pesados constituyen una manifestación directa del proceso adaptativo, el cual no puede inferirse de forma confiable únicamente a partir del genoma. La transcriptómica permite, además, detectar elementos reguladores finos como ARN no codificantes, rutas co-reguladas y efectos pleiotrópicos de la exposición metálica, lo cual es particularmente relevante en estudios funcionales de resistencia.

En este contexto, este capítulo se enmarca en la necesidad de comprender con mayor profundidad los mecanismos moleculares que permiten a *Serratia* sp. 5b crecer en

concentraciones elevadas de Cd(II). A pesar de que en un capítulo previo se identificaron genes potencialmente asociados a resistencia en su genoma, era necesario determinar si su expresión es diferencialmente regulada bajo exposición al metal, y si existen otros factores transcripcionalmente activos no detectables mediante análisis genómico. Así, los objetivos de este capítulo son: (i) determinar mediante análisis transcriptómico los genes de *Serratia* sp. 5b implicados con la resistencia a cadmio(II), y (ii) comprobar la expresión de algunos de estos genes mediante RT-qPCR, validando los resultados obtenidos por RNA-seq. Esta investigación permite tener una caracterización funcional más precisa del repertorio genético de resistencia, y aportar información en un campo aún poco documentado en el género *Serratia*.

3.2. Materiales y métodos

Para investigar la resistencia a Cd(II) de *Serratia* sp. 5b fue realizado un análisis transcriptómico mediante secuenciación de ARN y posteriormente los resultados fueron validados mediante RT-qPCR. La procedencia de la cepa y otras características se detallan en el Capítulo 2.

3.2.1. Condiciones de cultivo

Se realizó un pre-inóculo en medio LB (10 g L^{-1} de peptona, 5 g L^{-1} de extracto de levadura, 5 g L^{-1} de NaCl) incubado a 30 °C y 100 rpm durante 24 h a partir de un cultivo criopreservado. Luego, para el inóculo se realizó una transferencia al 1% v/v del cultivo activado a medio LB fresco y se incubó durante 12 h, en las mismas condiciones. Antes de la inoculación, la densidad óptica (OD_{600}) se ajustó a 1,0.

El diseño experimental comprendió tres condiciones (medios de cultivo): (i) medio LB (control), (ii) LB suplementado con 0.15 mM de Cd(II) y (iii) LB suplementado con 0.50 mM de Cd(II). La solución stock de Cd(II) (10mM) fue preparada a partir de $CdCl_2 \cdot H_2O$ (Merck, Darmstadt, Alemania), esterilizada por filtración con membranas de 0.22 µm (Sartorius Biolab Products, Alemania), antes de su adición aséptica al medio LB previamente esterilizado (120 °C, 15 psi, 20 min). La inoculación se realizó al 1% (v/v) a partir del cultivo ajustado a OD_{600} 1,0. Los cultivos fueron incubados durante 12 h a las

mismas condiciones. Para cada una de las condiciones fueron consideradas tres réplicas biológicas.

Tras la incubación, fueron tomados 8 mL de cada muestra en tubos Falcon estériles y se recuperó la biomasa por centrifugación a 7500 rpm durante 10 min a 4 °C. Luego, los *pellets* obtenidos se congelaron a −80 °C durante 30 min y posteriormente se liofilizaron a −52 °C durante 36 h. Este proceso fue realizado con el fin de preservar la integridad del ARN y prevenir su degradación, durante el transporte de la muestra en nevera de icopor con hielo seco.

3.2.2. Extracción y secuenciación de ARN

Los procedimientos de extracción y secuenciación de ARN de las muestras fueron realizados como servicio externo por Biomarker Technologies Company (BMKGENE, Hong Kong). Brevemente, el ARN fue extraído utilizando SPLIT RNA Extraction Kit (Lexogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ARN se determinaron con espectrofotometría con NanoDrop 2000 (OD260/280 y OD260/230), mientras que la integridad se analizó utilizando un Bioanalyzer Agilent 2100 y una electroforesis en gel. Todas las muestras presentaron valores adecuados para continuar con el proceso de secuenciación. Las métricas detalladas de concentración, calidad e integridad se detallan en el Anexo C. Previo a la construcción de la librería, se realizó la depleción del ARN ribosomal con RiboCop rRNA Depletion Kit (Lexogen) para bacterias. Las librerías de ARN se construyeron con la configuración *paired-end* de 150 pb (2 × 150 pb) utilizando ALFA-SEQ RNA Library Prep Kit (FINDROP) y la secuenciación se realizó en la plataforma Illumina NovaSeq 6000.

3.2.3. Pre-procesamiento de datos transcriptómicos

En primer lugar, la calidad de las lecturas crudas (*paired-end*) para cada una de las muestras fue evaluada mediante FastQC v0.12.0 (Andrews, s/f). Las bases de baja calidad y secuencias de adaptadores fueron removidas con Trimmomatic v0.39 (Bolger et al., 2014) y Cutadapt (Martin, 2011), respectivamente. Una vez obtenidas las lecturas filtradas, fueron alineadas contra el genoma de referencia de *S. surfactantfaciens* YD25 (con código de acceso GCF_001642805.2 en la base de datos RefSeq del NCBI) utilizando Bowtie2 v2.5.4 (Langmead & Salzberg, 2012). El mapeo se realizó empleando

el modo *very-sensitive-local* con orientación de las lecturas *forward-read*. La selección del genoma de referencia se basa en el resultado del análisis taxonómico presentado en el Capítulo 2.

El siguiente paso consistió en la cuantificación génica a partir de los resultados del alineamiento utilizando el programa featureCounts (Liao et al., 2014), especificando como archivo de anotación el GTF correspondiente al genoma de referencia. Dado que las librerías fueron preparadas bajo un protocolo *strand-specific* de orientación inversa, se indicó la opción correspondiente, para mantener la dirección original de transcripción durante el conteo. Las lecturas multimapeadas no fueron descartadas, sino distribuidas proporcionalmente entre las regiones genómicas compatibles. Además, la cuantificación se efectuó a nivel de gen y no de transcritos individuales. Finalmente, los conteos de cada una de las muestras fueron integrados en una matriz de expresión mediante R v4.4.3 (R core Team, 2025). En esta etapa no se aplicaron transformaciones ni normalizaciones.

3.2.4. Análisis de datos transcriptómicos

La identificación de genes diferencialmente expresados (DEGs, por sus siglas en inglés) fue realizada en R v4.4.3 (R core Team, 2025) con el paquete DESeq2 v1.47.5 (Love et al., 2014). Inicialmente, de la tabla de conteos fueron eliminados los genes que presentaban varianza inferior a 1, no tenían conteos en cada una de las muestras y codificaban proteínas hipotéticas. El análisis se hizo con los parámetros por defecto de DESeq2 comparando las condiciones (medios): LB frente a LB con 0,15 mM Cd(II), LB frente a LB con 0,50 mM Cd(II) y LB con 0,15 mM Cd(II) frente a 0,50 mM Cd(II). Los valores *p* fueron ajustados con el método de Benjami-Hochberg. Un gen fue considerado como diferencialmente expresado si presentaba un valor *p* ajustado menor a 0,01 y LFC ($\log_2$ fold change) superior a 1,5.

Por otro lado, se realizó el análisis de enriquecimiento funcional utilizando el método *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA, (Subramanian et al., 2005)), con el paquete ClusterProfiler (Yu, 2024) en R v4.4.3 (R core Team, 2025). Para cada una de las tres comparaciones por pares mencionadas anteriormente se ejecutó un análisis GSEA individual, empleando como conjunto de entrada la lista completa de genes

diferencialmente expresados, sin separar los genes sobre-expresados de los reprimidos. El enriquecimiento utilizó los términos Gene Ontology (GO) y un valor de *p* ajustado inferior a 0,05, aplicando la corrección para pruebas múltiples mediante el método de Benjamini-Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995).

Considerando que *S. surfactantfaciens* no es un organismo modelo, no tiene información disponible en bases de datos como DAVID o KEGG, siendo necesario construir un directorio personalizado para realizar la sumarización y la anotación a partir del archivo GTF de la anotación del genoma de referencia (*S. surfactantfaciens* YD25, con código de acceso GCF_001642805.2 en la base de datos RefSeq del NCBI) que permitió asignarle a cada gen el nombre (*gene symbol*) y términos GO correspondientes.

3.2.5. Extracción de ARN y síntesis de ADNc

La validación experimental de los resultados transcriptómicos fue realizada mediante RT-qPCR, evaluando las mismas condiciones experimentales del análisis transcriptómico: medio LB como control, LB suplementado con 0,15 mM de Cd(II), y LB suplementado con 0,50 mM de Cd(II), cada uno con tres réplicas biológicas. Con el fin de evitar contaminación por nucleasas, todo el material de laboratorio fue esterilizado por autoclave en dos ciclos consecutivos (121 °C, 15 psi, 20 min), y los reactivos fueron preparados en agua tratada con DEPC.

El ARN fue extraído a partir de la biomasa recuperada por centrifugación a 8,000 rpm durante 10 min a 4 °C. Las células fueron lavadas dos veces con agua tratada con DEPC, resuspendidas y nuevamente centrifugadas a 13.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Posteriormente, se agregaron 1 mL de TRIzol (Merck, Darmstadt, Alemania), 100 µL de agua DEPC, 1 µL de inhibidor de ARN (SMOBIO, Taiwán), y la mezcla fue incubada durante dos minutos a temperatura ambiente. Después, se adicionaron 300 µL de cloroformo (Merck, Darmstadt, Alemania) y se agitó vigorosamente en vórtex durante 30 s. Tras incubación a 4 °C durante 10 min, las muestras fueron centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min. La fase acuosa fue recuperada y mezclada con un volumen equivalente de isopropanol, y se incubó toda la noche a −20 °C para precipitar los ácidos nucleicos. El ARN se recuperó por centrifugación, se lavó con etanol al 80 %, se secó brevemente al aire y finalmente se resuspendió en 60 µL de agua DEPC. La integridad del ARN extraído se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (Anexo D) y

la concentración y pureza fueron evaluadas por espectrofotometría mediante NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific), determinando las razones de absorbancia OD260/280 y OD260/230 como indicadores de calidad (Anexo E). Las muestras fueron conservadas a −80 °C hasta su procesamiento.

Con el propósito de eliminar de las muestras de ARN el ADN coextraído, se trataron 2 µg de ARN con ADNasa I (Invitrogen, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La digestión se realizó en un volumen de 20 µL que incluía tampón de ADNasa, inhibidor de ARNasa y la enzima. La incubación se mantuvo durante 30 min a 37 °C, seguida de inactivación térmica mediante la adición de 2 µL de EDTA 25 mM e incubación a 65 °C por 10 min. Posteriormente, la digestión del ADN fue verificada mediante una PCR punto final dirigida al gen 16S rRNA, utilizando como molde el ARN tratado con ADNasa. Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (Anexo F).

La síntesis de cDNA se realizó con el kit ExcelRT™ Reverse Transcription Kit (SMOBIO, Taiwán), empleando aproximadamente 500 ng de ARN tratado previamente con ADNasa por reacción, siguiendo las instrucciones del fabricante. La retrotranscripción se llevó a cabo utilizando *random hexamers* en un volumen final de 20 µL. Los productos de cDNA obtenidos fueron conservados a −20 °C hasta su uso.

3.2.6. Diseño de *primers*

Considerando los resultados del analisis transcriptomico previo, se seleccionaron los genes *mntA*, *zinT*, *zntA* y *znuC* a los cuales se les diseñaron *primers* específicos siguiendo los criterios propuestos por Thornton y Basu (2011) utilizando Primer-BLAST (Ye et al., 2012), proporcionando como secuencia *query* el gen correspondiente obtenido del genoma ensamblado de *Serratia* sp. 5b en el **Capítulo 2**. Específicamente, los parámetros se ajustaron de la siguiente manera: longitud entre 20 y 22 nucleótidos, temperatura *melting* (Tm) óptima de 60 °C (con límites de 58 a 62 °C), contenido GC entre 50 % y 70 %, y tamaño del amplicón entre 100 y 120 pb. Posteriormente, se evaluó la formación de potenciales estructuras secundarias y dímeros mediante OligoAnalyzer (Owczarzy et al., 2008), descartando configuraciones con autofluorescencia, formación de estructuras inestables o interacciones no deseadas. Los *primers* para el gen de

referencia 16S rRNA fueron previamente empleados en otra investigación (Diez-Marulanda & Brandão, 2024). La secuencia de los *primers* se encuentra en el Anexo G.

3.2.7. Análisis de expresión relativa

Las reacciones de qPCR fueron realizadas utilizando el reactivo Luna® Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs, EE. UU.) el cual contiene SYBR Green como fluoróforo, en un sistema CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, EE. UU.). Cada reacción se preparó en un volumen final de 12 µL, compuesto por: 6 µL de mezcla maestra (2X), 0.3 µL de cada *primer* (10 µM), 1 µL de cDNA y el volumen restante se ajustó con agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, seguida de 40 ciclos de amplificación (95 °C durante 15 s, 59 °C durante 10 s, 60 °C durante 20 s). Al finalizar, se realizó un análisis de curva de disociación (*melting curve*) para verificar la especificidad de la amplificación. Para cada una de las réplicas biológicas se realizaron tres réplicas técnicas de qPCR. Como control de procedimiento se incluyeron reacciones en las que el volumen correspondiente al ADNc fue sustituido por agua libre de nucleasas.

El análisis de expresión relativa se llevó a cabo utilizando el método de Pfaffl (2001), el cual tiene en cuenta las diferencias en la eficiencia de amplificación entre los genes de interés (*mntA*, *zinT*, *zntA* y *znuC*) y el gen de referencia (16S rRNA). Las eficiencias de amplificación de cada set de *primers* se calcularon a partir de curvas estándar generadas mediante diluciones seriadas decimales utilizando ADNg (Yun et al., 2006), con la **Ecuación (3.1)**.

$$E = 10^{(-1/pendiente)} - 1 \quad \text{Ecuación (3.1)}$$

Los valores de eficiencia de cada set de *primers* para cada uno de los genes seleccionados fueron: *zntA*=1,024; *zinT*=1,018; *znuC*=1,032; *mntA*=1,039; 16S rRNA=0,995.

La expresión relativa (*Fold Change*) se calculó para cada gen usando la ecuación (3.2).

$$Fold\ Change\ = \frac{\left(E_{target}\right)^{\Delta Cq_{control-tratamiento}}}{\left(E_{ref}\right)^{\Delta Cq_{control-tratamiento}}}$$ Ecuación (3.2)

Donde:

- E_{target}: eficiencia del gen problema.
- E_{target}: eficiencia del gen de referencia.
- $\Delta Cq_{control-tratamiento}$: diferencia de Cq para cada gen entre la condición control y tratamiento.

El análisis de expresión relativa fue realizado en R v4.4.3 (R core Team, 2025). Previo a la comparación entre condiciones, se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk (SHAPIRO & WILK, 1965), y se aplicó un ANOVA de una vía. Ante la detección de diferencias significativas, se realizó la prueba Tukey (Tukey, 1949) para comparaciones múltiples considerando cada una de las condiciones evaluadas para cada gen.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Diseño experimental

El diseño experimental empleado para conocer la respuesta de *Serratia* sp. 5b ante la exposición a Cd(II) mediante análisis transcriptómico utilizando RNA-seq no se limitó a considerar una única condición de exposición al metal, sino que se evaluaron dos concentraciones diferentes (0,15 mM y 0,50 mM) para conocer posibles patrones de expresión genética asociados a la concentración en los cuales se identificaran genes que pudiesen responder de manera progresiva, así como aquellos que son cruciales para contrarrestar los efectos tóxicos del metal. Aunque previamente se estableció que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Serratia* sp. 5b frente al Cd(II) es de 4 mM (Diez Marulanda, 2022; Diez-Marulanda & Brandão, 2024), se eligieron concentraciones moderadas, considerando que concentraciones elevadas de metales tóxicos inducen respuestas inespecíficas que involucran la activación simultánea de redes regulatorias relacionadas con el choque térmico, el estrés oxidativo, la reparación de ADN y el metabolismo energético, entre otras (Wang & Crowley, 2005). Esta respuesta

generalizada puede enmascarar la expresión de genes directamente implicados en la resistencia al metal, dificultando su identificación funcional (Khan et al., 2015). Así, el uso de concentraciones intermedias permitió disminuir el posible ruido transcripcional asociado al estrés, favoreciendo la identificación de genes diferencialmente expresados relacionados de forma específica con la respuesta al Cd(II). Por otra parte, la decisión de establecer el tiempo de cultivo en 12 horas, momento en el cual *Serratia* sp. 5b alcanza la fase exponencial tardía, se debe a que esa etapa fisiológicamente representa un estado metabólicamente activo en la cual hay una alta actividad transcripcional, y aún no dominan mecanismos de defensa de la fase estacionaria (Veselovsky et al., 2022) los cuales podrían interferir en las etapas posteriores durante el análisis y la interpretación de los datos.

3.3.2. Preprocesamiento, alineamiento y tabla de conteos

Las secuencias de las muestras presentaron pérdidas mínimas durante la etapa de preprocesamiento reflejando la calidad de los datos crudos. De manera general, al menos el 96,81% de las lecturas fueron retenidas luego del proceso de filtrado, con un rango de pérdida entre 2.3 % y 3.2 % entre todas las muestras. Los valores de calidad por base con *Phred scores* Q30 superaron el 96 % en las lecturas crudas y alcanzaron valores superiores al 98 % tras el filtrado, lo que indica una baja tasa de error durante la asignación de la base (Liao et al., 2017). El contenido GC se mantuvo estable antes y después del filtrado, con valores entre 55 % y 59 %. Aunque este valor es ligeramente inferior al genoma de *Serratia* sp. 5b (59 %) ensamblado en el capítulo previo, esta diferencia se debe a que el contenido GC puede variar respecto al genoma completo dependiendo del conjunto de genes expresados y a que previo a la preparación de las librerías se realizó la depleción de ARNr.

3.3.3. Análisis preliminar de los datos de expresión

Previo al análisis, la matriz de conteos fue filtrada con el fin de descartar aquellos genes poco informativos. En primer lugar, se eliminaron los genes cuya varianza calculada entre todas las muestras fue menor o igual a uno (n=5), considerando que una baja variabilidad no aporta información relevante para detectar diferencias entre condiciones. Así mismo, se descartaron aquellos genes cuya suma de conteos fue igual a cero (n=169), lo cual

indica que no presentaron expresión detectable en ninguna de las muestras. Y, además, se excluyeron genes anotados como codificantes de proteínas hipotéticas (n=310), dado que no se pueden relacionar con alguna función biológica. Tras realizar los filtros, la matriz de conteos presentó 4288 genes, los cuales fueron empleados en los análisis posteriores.

Para evaluar la estructura general de los datos, verificar la consistencia entre las réplicas biológicas y detectar posibles muestras atípicas se realizó un análisis exploratorio el cual consistió en tres enfoques complementarios: diagramas de caja (boxplot), análisis de componentes principales (PCA) y matriz de correlación de Pearson (Love et al., 2014; Conesa et al., 2016).

El diagrama de cajas basado en los valores transformados mediante la función de estabilización de varianza (VST, por las siglas en inglés *Variance Stabilizing Transformation*) mostró una distribución homogénea en la expresión génica entre la mayoría de las muestras, con medianas y rangos intercuartílicos similares dentro de cada condición (**Figura 3-1**). Este patrón sugiere una adecuada normalización de los datos y una buena calidad general de las muestras procesadas, alineado con lo esperado para estudios de RNA-seq con réplicas biológicas (Love et al., 2014). Aunque, se observaron diferencias entre las réplicas del tratamiento con Cd(II) a 0,15 mM (Tr1), donde la muestra Tr1R1 presentó una mayor dispersión y una mediana ligeramente desplazada en comparación con las muestras Tr1R2 y Tr1R3, lo que indica una mayor heterogeneidad técnica o biológica generada por una respuesta no reguladas por el tratamiento o de una diferencia técnica en la eficiencia de la extracción de ARN o la construcción de librerías (Williams et al., 2017).

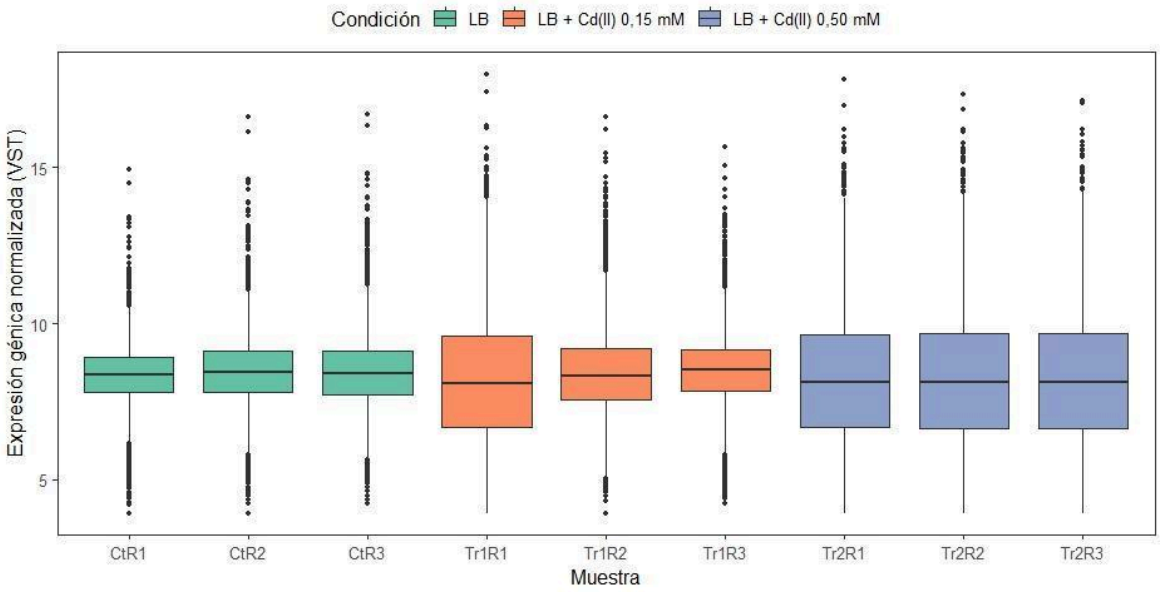


Figura 3-1. Diagrama de cajas que muestra la distribución de la expresión génica normalizada (transformación VST) de los datos de expresión de *Serratia* sp. 5b por muestra bajo tres condiciones de cultivo: LB (control), LB suplementado con 0,15 mM de Cd(II) y LB suplementado con 0,50 mM de Cd(II).

El análisis de componentes principales (PCA) mostró una agrupación clara entre las réplicas correspondientes a la condición control (Ct) y al tratamiento con Cd(II) a 0,50 mM (Tr2), evidenciando una clara separación entre las condiciones (**Figura 3-2**). Las réplicas de Tr2 formaron un *cluster* bien definido, reflejando la consistencia sobre efecto provocado por la concentración elevada de Cd(II). En contraste, las muestras del tratamiento con Cd(II) a 0,15 mM (Tr1) presentaron una amplia distribución, sin formar algún *cluster*. De hecho, llama la atención que la muestra Tr1R3 se agrupó estrechamente con las muestras control, indicando un perfil de expresión similar al basal y no representativo de una respuesta al tratamiento. Este comportamiento pudo deberse a una exposición ineficaz al Cd(II), a errores en el procesamiento de la muestra o a una variabilidad biológica no controlada. Por su parte, las muestras Tr1R1 y Tr1R2 se encuentran ubicadas entre los grupos conformados por las otras condiciones evaluadas, cada una más cerca de las otras condiciones considerando el eje de la primera componente.

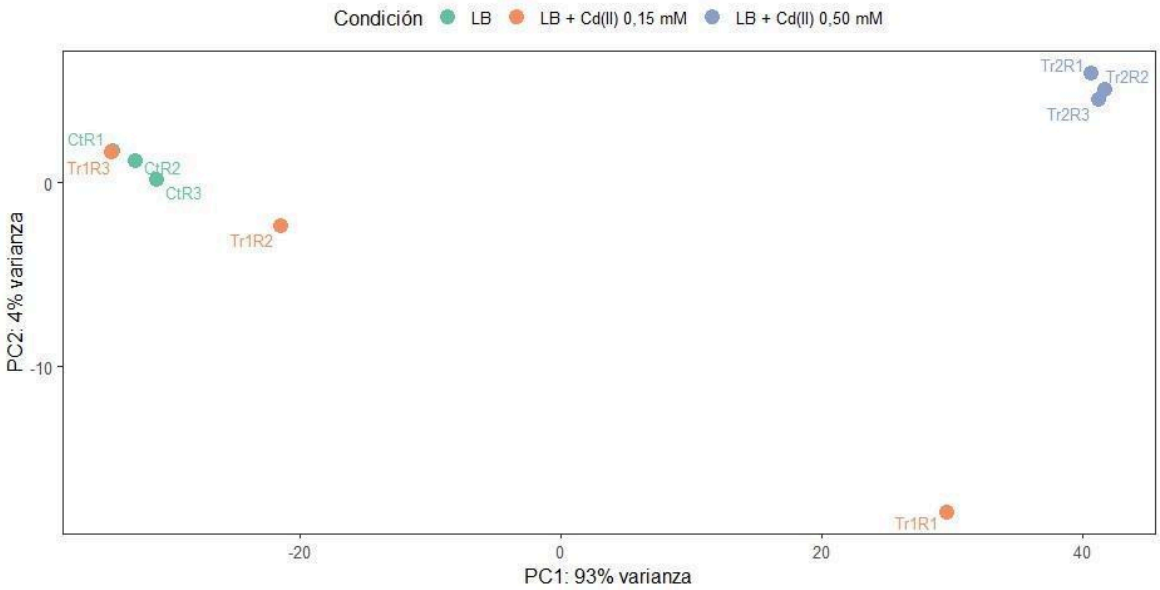


Figura 3-2. Gráfico de análisis de componentes principales (PCA) basado en la transformación de varianza estabilizada (VST) de los datos de expresión de *Serratia* sp. 5b. Cada punto representa una réplica biológica, coloreada según la condición experimental: LB (verde), LB suplementado con Cd(II) 0,15 mM (naranja), y LB suplementado con Cd(II) 0,50 mM (azul). Las componentes PC1 y PC2 explican el 93 % y 4 % de la varianza, respectivamente.

La matriz de correlación de Pearson entre réplicas biológicas (**Figura 3-3**), calculado sobre los valores transformados por VST, evidenció un patrón coherente con los resultados previos. Las réplicas de Tr2 presentaron coeficientes de correlación iguales a 0,99 entre sí, lo cual corrobora la uniformidad de la expresión génica del grupo. Las muestras control también presentaron una alta correlación interna ($r > 0,96$), aunque con ligeras diferencias dentro del grupo. Para las muestras del tratamiento Tr1, las correlaciones fueron más variables: mientras Tr1R2 y Tr2R3 presentaron una alta correlación ($r > 0,92$), Tr1R1 mostró una correlación entre 0,65 a 0,85 con las demás réplicas, y Tr1R1 y Tr1R3 exhibieron una alta correlación con las muestras Ct y Tr2, respectivamente, pero no con las de su propia condición.

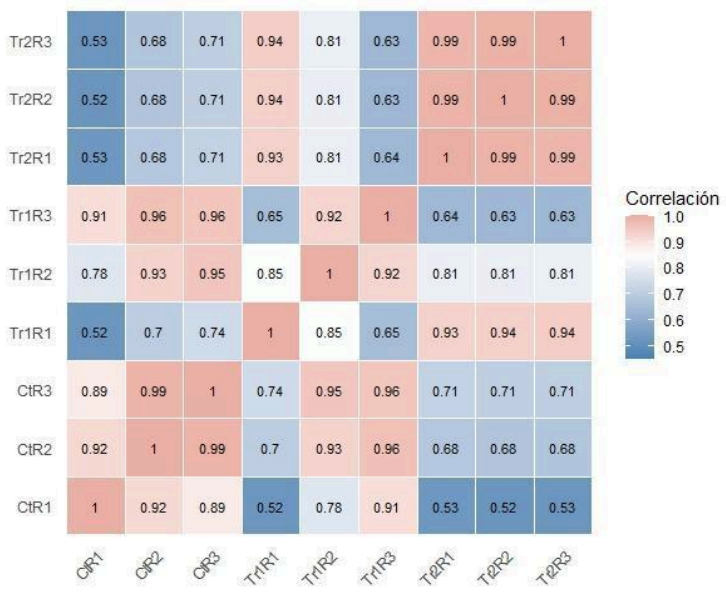


Figura 3-3. Matriz de correlación de Pearson calculada a partir de los valores de expresión génica transformados mediante VST. El gradiente de color representa el coeficiente de correlación (r), desde 0,5 (baja correlación, azul) hasta 1 (alta correlación, rojo claro).

Teniendo en cuenta que la inclusión de muestras no representativas puede conducir a errores en la identificación de genes diferencialmente expresados, sesgar los análisis de enriquecimiento funcional (Kvam et al., 2012; Rapaport et al., 2013), disminuir significativamente la potencia estadística, aumentar la tasa de falsos positivos y reducir la sensibilidad de los análisis de expresión diferencial (Chen et al., 2016). Considerando los resultados obtenidos en los análisis previos de calidad y estructura de los datos, se decidió excluir de los análisis posteriores la muestra Tr1R3 debido a su comportamiento atípico, al agruparse con las muestras del grupo control evidenciando la ausencia de respuesta al tratamiento.

3.3.4. Análisis de genes diferencialmente expresados

Con el objetivo de identificar los genes implicados en la resistencia al Cd(II) en *Serratia* sp. 5b, se realizó un análisis de expresión diferencial considerando tres comparaciones: LB vs Cd(II) 0,15 mM (Tr1), LB vs Cd(II) 0,50 mM (Tr2) y Tr1 vs Tr2. Los criterios para definir los DEGs fueron un valor de p-ajustado < 0,01 y un cambio de expresión absoluto $|\log_2 FC| \geq 1,5$. Los resultados obtenidos mostraron una respuesta transcripcional más intensa y amplia a mayor concentración de Cd(II): se identificaron 428 DEGs en Tr1 (363

sobreexpresados, 65 reprimidos), 1852 en Tr2 (755 sobreexpresados, 1097 reprimidos) (**Figura 3-4**), y 638 en la comparación Tr1 vs Tr2 (109 sobreexpresados, 529 reprimidos).

- Relación entre los genes del análisis genómico y DEGs

Al contrastar estos resultados con los obtenidos en el análisis genómico del **Capítulo 2**, se observó que 5 de los 10 genes putativos potencialmente implicados con resistencia a Cd(II) también fueron identificados como DEGs en al menos una de las comparaciones. Esta convergencia funcional y regulatoria valida parcialmente la relevancia de dichos genes y refuerza su papel en la respuesta molecular de *Serratia* sp. 5b frente al Cd(II).

Entre los genes con mayor consistencia destaca *dsbA*, presente como DEG en las tres comparaciones, mostrando un incremento progresivo en su nivel de expresión: con LFC = 1,73 en Tr1; 3,43 en Tr2 y 1,71 en Tr2 vs Tr1. Esta proteína está implicada en la formación de enlaces disulfuro en proteínas del espacio periplásmico, esenciales para la correcta maduración de proteínas bajo condiciones de estrés oxidativo, lo cual es consistente con los efectos tóxicos del Cd(II) en bacterias (Heras et al., 2009). Por su parte, *zinT* (también conocido como *yodA*), mostró sobreexpresión en las tres comparaciones (LFC de 1,92 en Tr1; 3,83 en Tr2 y 1,91 en Tr2 vs Tr1). ZinT ha sido asociado con el secuestro intracelular de cationes metálicos, especialmente Zn(II) y Cd(II), y su participación en el mantenimiento de la homeostasis metálica ha sido reportada en diversas enterobacterias (Graham et al., 2009).

La expresión diferencial de *zntA*, que codifica una ATPasa tipo P implicada en la expulsión activa de cationes pesados como Cd(II) y Zn(II) (Noll & Lutsenko, 2000), fue detectada en Tr1 (LFC = 4,49) y Tr2 (LFC = 5,57). Este gen es uno de los sistemas de defensa más relevantes frente a intoxicación por metales, al expulsarlos desde el citoplasma hacia el exterior (Rensing et al., 1997; Noll & Lutsenko, 2000; Okkeri & Haltia, 2006). En tanto, *ygiW*, cuya función ha sido menos caracterizada, pero ha sido vinculada a condiciones de estrés, se expresó diferencialmente en Tr2 (LFC = 3,39) y en la comparación Tr2 vs Tr1 (LFC = 4,67), lo que sugiere un papel en ambientes tóxicos (Lee et al., 2010; Saathoff et al., 2023).

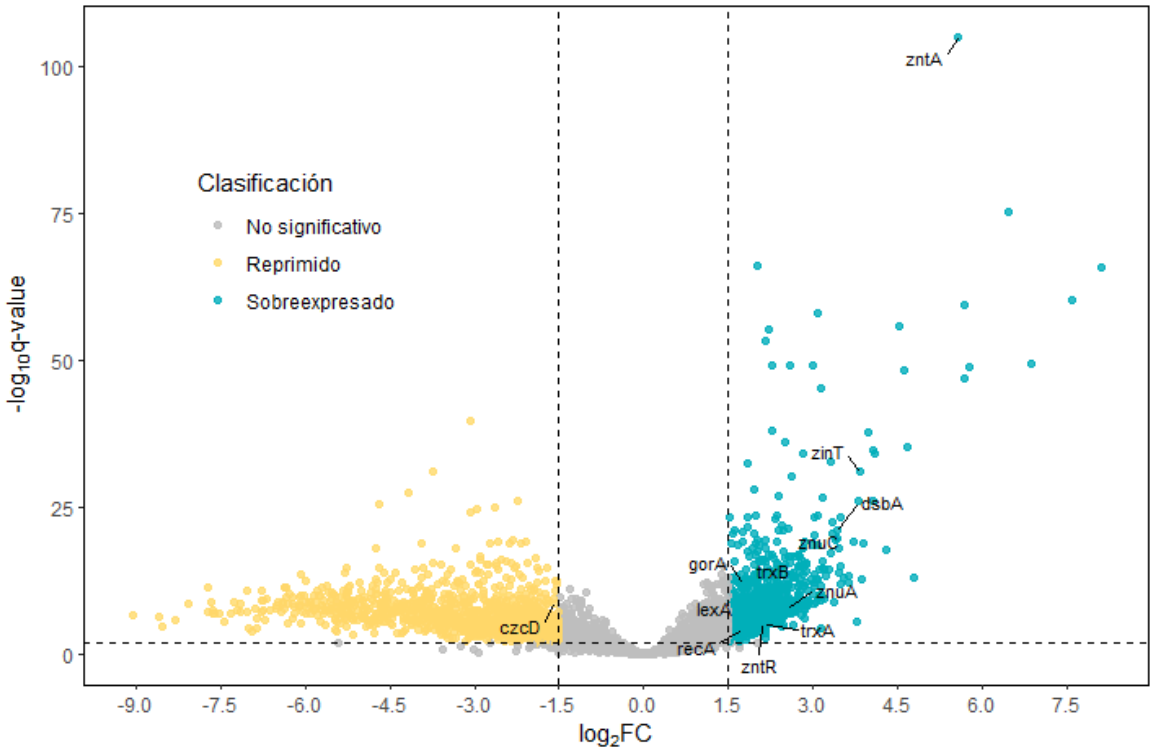


Figura 3-4. Volcano plot de genes diferencialmente expresados en *Serratia* sp. 5b comparando las condiciones de cultivo en medio LB (control) y medio LB suplementado con Cd(II) a 0,50 mM (Tr2). El eje X representa el logaritmo en base 2 del cambio en la expresión génica (LFC), mientras que el eje Y indica el valor ajustado q. Se consideraron genes diferencialmente expresados aquellos con |LFC| ≥ 1,5 y q-value < 0,01. En azul se muestran los genes sobreexpresados, en amarillo los reprimidos, y en gris los no significativos. Se destacan con líneas negras y respectivos nombres, algunos de los genes clave implicados con mecanismos de resistencia al Cd(II).

Los resultados muestran una convergencia funcional parcial entre el análisis genómico y transcriptómico. En la cual, no solo algunos de los genes previamente identificados en el **Capítulo 2** como candidatos están presentes entre los DEGs, sino que además presentan una regulación proporcional a la concentración del Cd(II), lo que sugiere que la resistencia en *Serratia* sp. 5b depende tanto de la presencia estructural de genes específicos como de su activación transcripcional inducida bajo condiciones de exposición. Los otros cinco genes identificados en el genoma (*fieF/yiiP, mntH/yfeP, robA, ychH, zitB/ybgR*) no mostraron expresión diferencial bajo las condiciones evaluadas. Sin embargo, su activación podría depender de mecanismos de regulación no

transcripcional, tiempos de respuesta diferentes o condiciones ambientales distintas a las evaluadas en este trabajo.

- Análisis de DEGs entre condiciones

La exposición de *Serratia* sp. 5b al Cd(II) desencadenó una respuesta transcripcional compleja, particularmente bajo la condición Tr2. Aunque un amplio número de genes fueron identificados como diferencialmente expresados, se consideraron aquellos implicados en el transporte del Cd(II), la regulación del estado redox y la reparación del ADN, los cuales en conjunto constituyen una red molecular para mitigar el estrés inducido por este metal.

Además de la sobreexpresión previamente discutida del gen *zntA*, también fueron identificados otros genes involucrados en el transporte del metal como aquellos que conforman el operón *znuABC*. En la condición Tr2 se observó una alta sobreexpresión de *znuA* y *znuC* (LFC = 3,85 y 2,62, respectivamente), mientras que *znuB* no presentó una expresión significativa. Si bien este sistema se activa ante deficiencia de zinc, también puede inducirse por Cd(II) debido a la interferencia competitiva que este ejerce sobre la homeostasis de Zn(II) (**Figura 3-5**). Anteriormente se ha reportado la activación de este operón ante la exposición al Cd(II) en otras especies de *Serratia* y en otras bacterias como *E. coli* y *Salmonella* (Petrarca et al., 2010; Gabbianelli et al., 2011; Zhu et al., 2022).

En consonancia con esta respuesta, se observó la sobreexpresión de *zntR* (LFC = 1,63), regulador transcripcional del gen *zntA*, que codifica una ATPasa tipo P implicada en la expulsión de cationes metálicos divalentes (Noll & Lutsenko, 2000; Zheng et al., 2024). En contraste, el gen *czcD*, miembro de la familia de transportadores CDF (Munkelt et al., 2004), fue reprimido en Tr2 (LFC = –1,82). Este hallazgo es consistente con lo observado en otras cepas de *Serratia* en donde hay una posible redistribución funcional hacia otros sistemas de transporte cuando *czcD* no se encuentra activo (El-Minisy et al., 2025). Adicionalmente, el gen *mntA*, implicado en la captación de Mn(II) y otros cationes bivalentes (Deng et al., 2007), fue consistentemente sobre-expresado en las tres comparaciones: Tr1 vs Ct (LFC = 2,75), Tr2 vs Ct (LFC = 4,61) y Tr1 vs Tr2 (LFC = 1,87). Aunque *mntA* está asociado con la captación de manganeso, su sobreexpresión bajo

exposición a Cd(II) ha sido reportada en especies de *Bacillus subtilis* y *E. coli*, probablemente como resultado de la disrupción generada por la competencia del Cd(II) con otros iones divalentes esenciales como Mn(II) y Zn(II) (Deng et al., 2007; Vigonsky et al., 2015).

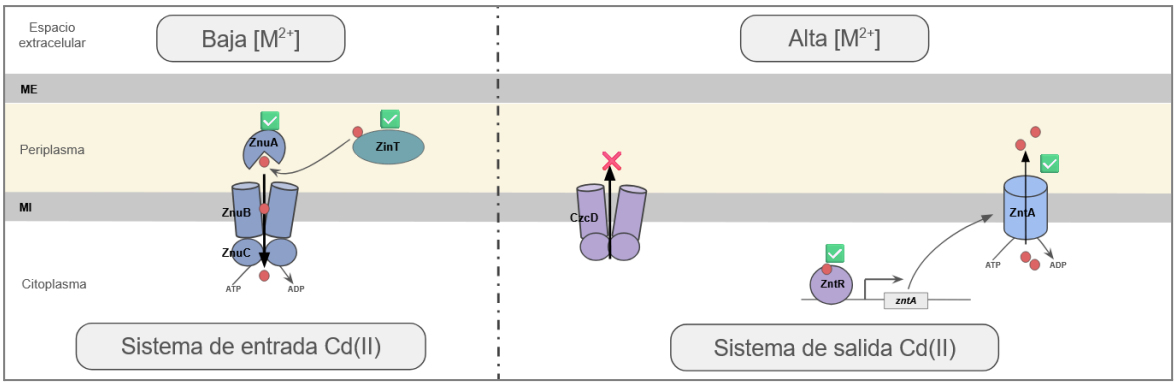


Figura 3-5. Representación esquemática de los sistemas de entrada y salida de Cd(II) identificados en el análisis transcriptómico. Los recuadros en verde indican proteínas codificadas por genes sobreexpresados, mientras que la "X" en rojo corresponden a proteínas cuyos genes fueron reprimidos bajo exposición a Cd(II). ME: membrana externa; MI: membrana interna; círculos rojos: iones Cd(II). Adaptado de Rensing & Mitra (2007), Capdevila et al. (2016) y Raghavan et al. (2023).

En cuanto al estado redox, el Cd(II) puede inducir daño oxidativo indirecto al interferir con sistemas enzimáticos sensibles y promover la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Begg et al., 2015). Tr2 presentó la sobreexpresión significativa de *trxA*, *trxB* y gorA (LFC = 2,38; 2,07 y 2,46, respectivamente), los cuales son componentes centrales de los sistemas tioredoxina y glutarredoxina (Chrestensen et al., 2000), los cuales mantienen la reducción de cisteínas y previenen la acumulación de radicales libres (E. R. Rocha et al., 2007; Anjou et al., 2024). Además, se identificó la represión de *ggt* (LFC = –1,83 en Tr2 y –1,76 en Tr2 vs Tr1), enzima responsable de la degradación del glutatión extracelular que actúa como agente antioxidante y quelante de Cd(II), lo cual ha sido relacionado en otras bacterias como una medida protectora frente al estrés por metales tóxicos (Mitrić & Castellano, 2023).

Finalmente, el análisis evidenció la activación de la respuesta SOS, un sistema regulado por los genes *recA* y *lexA*, que se activa frente a daños severos en el ADN (Maslowska

et al., 2019). Ambos genes se encontraron sobre-expresados en Tr2 (LFC = 2,34 y 2,01, respectivamente), lo que indica una inducción coordinada del sistema de reparación genómica. En condiciones de exposición a metales tóxicos, se ha encontrado que *lexA* deja de reprimir operones de reparación al ser inactivado proteolíticamente por RecA, permitiendo la expresión de genes como *uvrA*, *sulA*, *dinI* y otras proteínas de mantenimiento del genoma (Serment-Guerrero et al., 2020; Jaramillo et al., 2022). Además, la activación de *recD* (LFC = 1,76), parte del complejo RecBCD encargado de la reparación del ADN (Dillingham & Kowalczykowski, 2008), indica un daño significativo posiblemente generado por la acumulación intracelular de Cd(II) o por la interferencia con enzimas esenciales del ciclo celular.

En conjunto, estos resultados indican que *Serratia* sp. 5b activa un sistema de defensa frente al Cd(II), basada en la regulación diferencial de genes involucrados en transporte de cationes, protección antioxidante y mantenimiento genómico. La sobreexpresión de genes como *mntA*, *znuA*, *trxB* y *recA*, junto con patrones reguladores consistentes con lo reportado en bacterias tolerantes a cadmio, implica que la resistencia en esta cepa no depende de una única vía, sino de múltiples rutas funcionales las cuales actúan en sinergia para mitigar los efectos adversos provocados por el Cd(II).

3.3.5. Análisis de enriquecimiento funcional

Para determinar los patrones funcionales en la respuesta transcriptómica de *Serratia* sp. 5b frente al Cd(II), se realizó un análisis de enriquecimiento funcional a partir de los DEGs en cada una de las tres comparaciones. El análisis permitió identificar funciones celulares predominantes y procesos moleculares de forma diferencial, destacando categorías relacionadas con la biosíntesis de proteínas, el transporte de membrana, la actividad catalítica dependiente de ATP y la organización estructural celular. En total, se detectaron 7 términos enriquecidos en la comparación entre la condición control (Ct) y la exposición a 0,15 mM de Cd(II) (Tr1), 23 en la condición con 0,50 mM (Tr2), y 3 términos adicionales en la comparación entre ambas concentraciones.

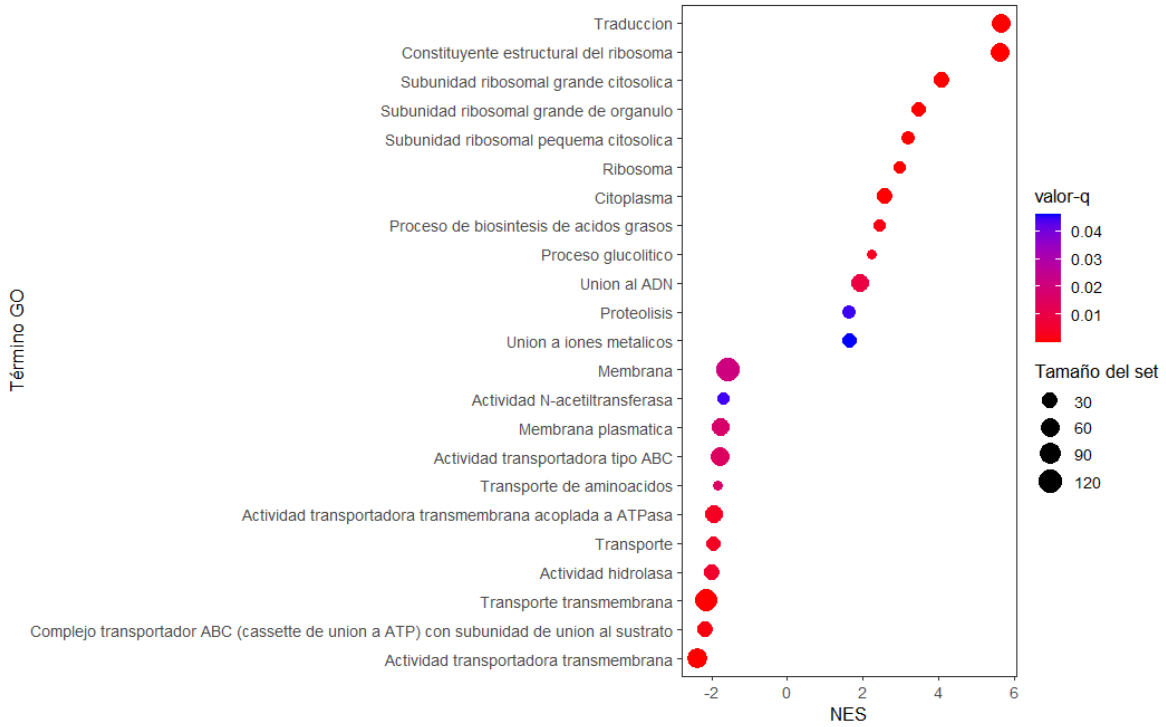


Figura 3-6. Dotplot del análisis de enriquecimiento funcional (GSEA) basado en ontologías GO para la comparación entre *Serratia* sp. 5b cultivada en medio LB (control) y expuesta a Cd(II) 0,50 mM. Se muestran los términos significativamente enriquecidos (padj < 0,05), agrupados según su valor NES (Normalized Enrichment Score). El color indica el valor p ajustado (valor-q) y el tamaño del punto representa el número de genes asociados al término.

Los resultados obtenidos para Tr2 presentaron la activación funcional más extensa y diversa. Entre los términos más representativos se encontraron procesos relacionados con la traducción (“actividad estructural del ribosoma”, “síntesis de proteínas”), el transporte de protones y metabolitos (“transporte activo”, “actividad de translocación”), y la organización de la membrana (“componente de membrana integral”, “membrana plasmática”) (**Figura 3-6**). Este perfil funcional sugiere que la bacteria cuando es expuesta al metal, reorganiza tanto su metabolismo como sus estructuras para mantener su viabilidad. La activación de funciones ribosomales puede reflejar no solo un aumento en la síntesis de proteínas adaptativas, sino también una respuesta compensatoria ante el daño estructural en componentes del ribosoma, como ha sido documentado en *E. coli* en presencia de Cd(II) (Ba et al., 2022).

La sobrerrepresentación de términos asociados al metabolismo energético y al transporte a través de la membrana (“actividad ATPasa acoplada al transporte de protones”, “transporte activo de metabolitos”) indican que hay demanda energética elevada con la cual se intenta contrarrestar la disrupción iónica generada por Cd(II). Este patrón está en línea con la necesidad de sostener procesos de eflujo, captura de iones esenciales y mantenimiento de potenciales de membrana (Manara et al., 2012).

En la comparación Ct vs Tr1 se identificaron funciones similares, pero en menor número y diversidad. Se repitieron procesos como “actividad estructural del ribosoma”, “biosíntesis de proteínas” y “complejo ribosomal”, lo que indica que incluso a concentraciones moderadas, la exposición al Cd(II) induce una reorganización de la maquinaria de traducción. Sin embargo, no se observaron términos vinculados al metabolismo energético o al transporte acoplado a ATP, lo que sugiere que a esta concentración la respuesta celular se mantiene en un nivel basal, sin comprometer rutas que implican un alto consumo de energía. Esta activación limitada puede interpretarse como una respuesta inicial en la cual se preservan funciones esenciales ante una exposición que no resulta crítica.

Por otro lado, la comparación Tr1 vs Tr2 presentó únicamente tres términos significativamente enriquecidos: “actividad catalítica”, “actividad ATPasa” y “actividad de transportador de protones acoplado a ATP”. La aparición exclusiva de estos procesos en esta comparación puede indicar una relación funcional dependiente de la dosis, donde el incremento en la concentración de Cd(II) hace que la célula despliegue mecanismos activos de expulsión y compensación iónica. Este tipo de transición funcional ha sido reportado en bacterias como *Cupriavidus metallidurans* y *Bacillus cereus*, donde se ha reportado la activación progresiva de sistemas de transporte acoplados a ATP en función de la concentración del metal (Alviz-Gazitua et al., 2019; Alotaibi et al., 2021).

De manera transversal, se identificaron algunos términos comunes en las comparaciones Ct vs Tr1 y Ct vs Tr2, como “actividad estructural del ribosoma”, “complejo ribosomal”, “componente integral de membrana” y “componente de membrana plasmática”. Esta coincidencia sugiere que la reorganización de estructuras fundamentales, como la membrana y los complejos de traducción, constituye una primera línea de respuesta ante la exposición al Cd(II). En cambio, procesos más especializados y dependientes de

consumo energético únicamente se activan en condiciones de mayor concentración, sugiriendo una respuesta jerárquica y progresiva.

En conjunto, los resultados del análisis de enriquecimiento funcional muestran que *Serratia* sp. 5b activa mecanismos de defensa diferenciados y jerárquicos frente al Cd(II), comenzando por la reorganización de componentes estructurales esenciales, como la membrana y el ribosoma, continuando hacia respuestas de mayor demanda energética, como el transporte activo y la síntesis adaptativa. Este patrón escalonado sugiere una respuesta transcripcional coordinada y dependiente de la dosis, mediante la cual la célula ajusta su fisiología en función de la intensidad del daño.

3.3.6. Validación de la expresión génica por RT-qPCR

Para validar los resultados transcriptómicos obtenidos mediante RNA-seq, se evaluó la expresión de cuatro genes mediante RT-qPCR: *zntA*, *zinT*, *mntA* y *znuC*. Los genes *zntA* y *zinT* fueron seleccionados por haber sido identificados tanto en el análisis genómico (Capítulo 2) como en el análisis de expresión diferencial, mientras que *mntA* y *znuC* fueron seleccionados por haber sido identificados como DEGs en los datos de RNA-seq, a pesar de no haber sido detectados entre los genes candidatos en el análisis genómico. Esta combinación de criterios permitió validar tanto genes con respaldo estructural como genes cuya activación se observó exclusivamente a nivel transcripcional.

Además, los genes seleccionados no pertenecen a una única categoría funcional, sino que intervienen en distintas rutas asociadas a la homeostasis de metales. *zntA* participa en la expulsión activa de cationes divalentes como Cd(II) y Zn(II), mientras que *zinT* se asocia con el secuestro periplásmico de metales (Gabbianelli et al., 2011; Okkeri & Haltia, 2006); contrario a estos, *mntA* está implicado en la captura de metales divalentes (Vigonsky et al., 2015) y *znuC* forma parte del sistema de transporte ABC relacionado con la homeostasis de Zn(II), el cual puede alterarse por interferencia con Cd(II) (Gabbianelli et al., 2011). De modo que en esta etapa se consideró validar experimentalmente múltiples componentes de los mecanismos de respuesta al metal.

Los resultados obtenidos mediante RT-qPCR mostraron una alta concordancia con los perfiles de expresión identificados por RNA-seq, tanto en la dirección del cambio como en la magnitud relativa entre condiciones. En todos los casos, se observó una expresión

significativamente mayor en la condición T2 (Cd 0,50 mM) en comparación con la condición control (Ct), y una respuesta intermedia en T1 (Cd 0,15 mM), lo cual reproduce el patrón dosis-dependiente observado previamente (**Figura 3-7**). El análisis estadístico, basado en ANOVA seguido de la prueba de Tukey, confirmó diferencias significativas entre tratamientos para cada uno de los genes evaluados ($p < 0,05$). Las letras diferentes sobre cada barra indican los grupos estadísticamente distintos, y la escala del eje Y varía entre genes según el nivel de expresión relativa obtenido con el método de Pfaffl.

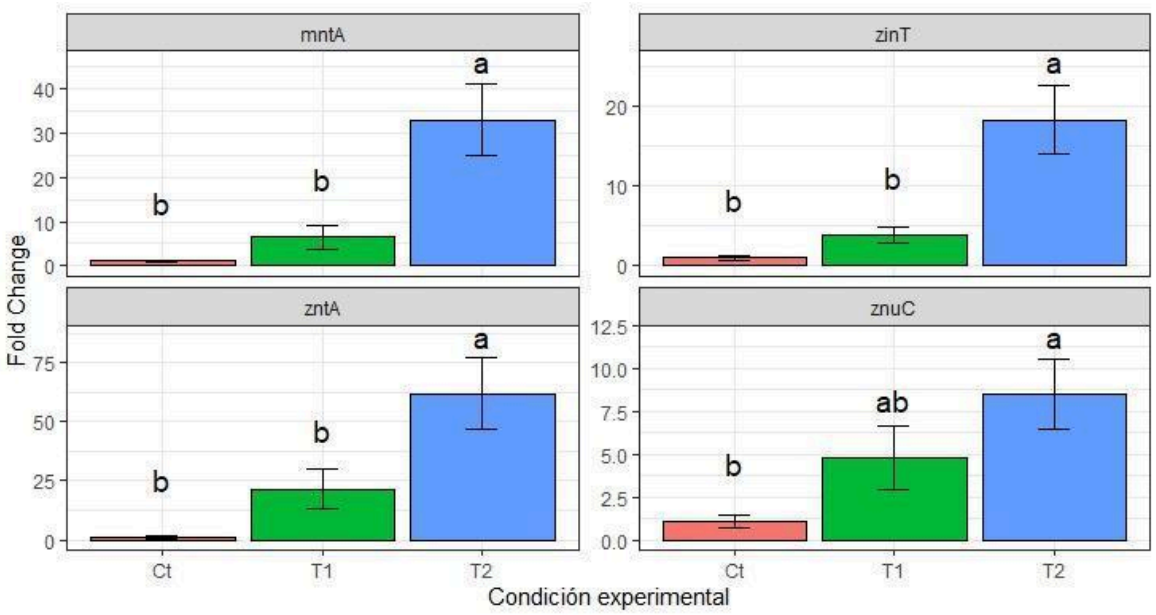


Figura 3-7. Expresión relativa de los genes *mntA*, *zinT*, *zntA* y *znuC* en *Serratia* sp. 5b bajo tres condiciones experimentales: LB (Ct), LB + Cd(II) 0,15 mM (T1) y LB + Cd(II) 0,50 mM (T2). Los valores corresponden al promedio ± la desviación estándar indicadas en las barras de error.

La etapa de validación es importante para confirmar los resultados obtenidos a partir de datos de secuenciación masiva, especialmente en estudios bacterianos donde pueden confluir factores biológicos y técnicos que introducen sesgos en la cuantificación global (Rocha et al., 2020). Particularmente los análisis de RT-qPCR ofrecen mayor sensibilidad y precisión en la cuantificación de transcritos específicos, permitiendo validar de forma independiente los genes candidatos y sustentar con mayor rigor su implicación funcional (Bong et al., 2024; Kralik & Ricchi, 2017). De este modo, la coherencia entre los resultados obtenidos de RNA-seq y RT-qPCR proporciona una validación sólida sobre los

hallazgos encontrados en esta investigación respecto a la respuesta de *Serratia* sp. 5b al Cd(II).

3.4. Conclusiones

Los resultados transcriptómicos obtenidos permitieron identificar un conjunto de genes diferencialmente expresados en *Serratia* sp. 5b bajo condiciones de exposición a Cd(II), cuya activación se intensificó con el incremento en la concentración del metal. Esta respuesta no fue uniforme, sino que reflejó un patrón dependiendo de la dosis, en el cual se activaron sucesivamente procesos asociados a la reorganización estructural, el transporte activo de cationes, la defensa frente al estrés oxidativo y la reparación del ADN.

El análisis transversal entre los resultados genómicos y transcriptómicos evidenció que algunos genes putativos previamente identificados como potencialmente relacionados con resistencia a cadmio no solo estaban presentes en el genoma, sino que fueron regulados en función del tratamiento, confirmando su participación activa en la respuesta adaptativa. A su vez, se identificaron nuevos genes diferencialmente expresados que no habían sido reconocidos a nivel estructural, ampliando así el repertorio funcional implicado en la resistencia.

Finalmente, la validación de un subconjunto de genes mediante RT-qPCR confirmó la confiabilidad de los resultados de RNA-seq, reforzando la evidencia de que *Serratia* sp. 5b presenta una respuesta coordinada de mecanismos transcripcionales orientados a contrarrestar los efectos tóxicos al Cd(II).

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1. Conclusiones

El presente estudio integró análisis genómicos, transcriptómicos y de validación experimental para explorar los mecanismos moleculares asociados con la resistencia a Cd(II) en *Serratia* sp. 5b. El ensamblaje y la anotación del genoma permitieron identificar diez genes putativos relacionados con la resistencia a Cd(II), asociados con sistemas de transporte, mecanismos de homeostasis iónica y factores de regulación transcripcional. A su vez, la disponibilidad del genoma ensamblado también permitió establecer con mayor precisión la identidad taxonómica de la cepa. A través de un enfoque filogenómico basado en genes ortólogos de copia única, complementado con un análisis de identidad promedio de nucleótidos (ANI), se determinó que *Serratia* sp. 5b corresponde a la especie *Serratia surfactantfaciens*. Además, se descartó la presencia de plásmidos u otros elementos extracromosomales que contuvieran genes asociados a resistencia a metales, lo que sugiere que los determinantes genéticos relevantes para la resistencia al cadmio se encuentran codificados de manera estable en el cromosoma.

El análisis de variantes en los genes identificados reveló la presencia de cambios no sinónimos en dos casos específicos. Sin embargo, los análisis *in silico* indicaron que estas sustituciones no representaban un impacto estructural o funcional significativo sobre las proteínas, al menos bajo los criterios computacionales empleados. Este hallazgo subraya la necesidad de realizar estudios funcionales dirigidos para confirmar el efecto real de estas variantes en el contexto de la resistencia al metal.

Por otro lado se investigaron los patrones de expresión génica en respuesta a la exposición a Cd(II), mediante análisis transcriptómico basado en datos de RNA-seq, evaluando dos concentraciones del metal, representando condiciones de baja y alta exposición. En presencia de 0,15 mM de Cd(II) se identificaron 428 genes diferencialmente expresados, de los cuales 363 mostraron sobreexpresión y 65 represión. Bajo una concentración de 0,50 mM, se detectaron 1852 genes regulados diferencialmente, con 755 sobreexpresados y 1097 reprimidos. Al comparar ambos tratamientos, se identificaron 638 DEGs adicionales, evidenciando que el incremento en

la concentración del metal genera una respuesta más amplia, compleja y posiblemente asociada a efectos deletéreos sobre el metabolismo celular.

Solo cinco de los genes identificados como candidatos genómicos coincidieron con los DEGs del análisis transcriptómico, lo que refuerza la noción de que la presencia de un gen en el genoma no implica necesariamente su participación activa bajo condiciones específicas. Este hallazgo resalta la importancia de combinar datos genómicos y transcriptómicos para comprender la funcionalidad real de los determinantes genéticos involucrados. Entre los genes diferencialmente expresados se identificaron varios relacionados no solo con transporte de metales, sino también con respuesta al estrés oxidativo, reparación del ADN y regulación de procesos redox. Estos resultados sugieren que, frente a concentraciones elevadas de cadmio, *Serratia* sp. 5b activa mecanismos de protección celular adicionales, posiblemente como respuesta a un daño molecular más severo. El análisis de enriquecimiento funcional confirmó esta interpretación, mostrando un incremento progresivo en la activación de procesos relacionados con detoxificación, homeostasis y mantenimiento de la integridad celular, a medida que aumenta la exposición al metal.

La validación de estos resultados mediante RT-qPCR permitió confirmar la sobreexpresión de los genes *zntA, zinT, mntA* y *znuC* en condiciones con Cd(II), observándose una tendencia concordante con los resultados transcriptómicos. Esta consistencia entre métodos refuerza la confiabilidad de los datos y apunta a un rol relevante de estos genes en la respuesta adaptativa de *Serratia* sp. 5b al cadmio.

4.2. Recomendaciones

Aunque los hallazgos de esta investigación son coherentes, es importante tener en cuenta que los análisis funcionales se basaron en homología con proteínas caracterizadas en otros organismos, sin que se hayan realizado validaciones específicas en *Serratia* sp. 5b o en alguna especie de este mismo género. Por ello, se recomienda realizar análisis funcionales y estructurales de las proteínas codificadas por los genes identificados, mediante modelado tridimensional, ensayos de expresión heteróloga o mutagénesis dirigida, para confirmar su participación directa en la resistencia a Cd(II). Asimismo, es importante complementar los hallazgos transcriptómicos con análisis proteómico y metabolómico en condiciones controladas de exposición a Cd(II), con el fin

de identificar rutas bioquímicas y procesos celulares relacionados. También sería interesante investigar la regulación epigenética y los mecanismos de control postranscripcional, los cuales podrían desempeñar un rol relevante en los mecanismos moleculares. Finalmente, sería importante evaluar la resistencia en condiciones más cercanas al ambiente natural, así como en presencia de mezclas de contaminantes o en microcosmos ambientales, para simular escenarios más próximos a los ecosistemas contaminados.

A. Anexo A: Información de los genomas empleados en el análisis taxonómico

Tabla A-1. Lista de especies del género *Serratia* y otro taxón utilizado como referencia en el análisis filogenético. Se incluye el nombre de la cepa, así como el código de acceso correspondiente a la base de datos RefSeq del NCBI.

Especie	Cepa	Código de acceso
Serratia oryzae	J11-6	GCF_001976145.1
Serratia aquatilis	2015-2462-01	GCF_044865145.1
Serratia bockelmannii	SCPM-O-B-9795 (SDD005SM)	GCF_029907835.1
Serratia entomophila	A1	GCF_021462285.1
Serratia ficaria	NCTC12148	GCF_900187015.1
Serratia fonticola	DSM 4576	GCF_001006005.1
Serratia grimesii	BXF1	GCF_900186025.1
Serratia liquefaciens	ATCC 27592	GCF_000422085.1
Serratia marcescens	ELP1.10	GCF_030291735.1
Serratia nematodiphila	DH-S01	GCF_004768745.1
Serratia nevei	LMG 31536	GCF_037948395.1
Serratia odorifera	INTA L401-1	GCF_041448735.1
Serratia plymuthica	AS9	GCF_000214235.1
Serratia proteamaculans	EBP3064	GCF_949794035.1
Serratia quinivorans	NCTC13188	GCF_900638135.1
Serratia rubidaea	FDAARGOS_926	GCF_016026735.1
Serratia sarumanii	K-M0228	GCF_035749905.1
Serratia silvae	arafor3	GCF_023282985.1
Serratia rhizosphaerae	KUDC3025	GCF_009817885.1
Serratia montpellierensis	Lou2A	GCF_020858655.1
Serratia inhibens	S40	GCF_003591175.1

Especie	Cepa	Código de acceso
Serratia	5b	GCA_051418095.1
Serratia surfactantfaciens	YD25	GCF_001642805.2
Serratia symbiotica	24.1	GCF_009831665.3
Serratia ureilytica	T6	GCF_017309605.1
Yersinia ruckeri	KMM821	GCF_017498685.1
Serratia microhaemolytica	ZS-11	GCF_004011885.1

B. Anexo B. Características de los contigs del ensamblaje de *Serratia* sp. 5b

Tabla A-2. Resumen de las características de los *contigs* que conforman el ensamblaje del genoma de *Serratia* sp. 5b.

Nombre	Tamaño (pb)[a]	Número de *reads* [b]	cobertura [c]	profundidad [d]	calidad promedio de base [e]	calidad promedio de mapeo [f]
Contig_1	1519076	801850	100	73.2055	35.1	59.9
Contig_2	954731	442146	100	64.2944	35.1	59.9
Contig_3	554169	368320	100	92.3159	35.1	59.9
Contig_4	421655	276425	100	91.1479	35.1	59.9
Contig_5	340438	184115	100	75.0013	35.1	59.9
Contig_6	285959	202627	100	98.4022	35.1	59.9
Contig_7	285816	166310	100	80.717	35.1	59.9
Contig_8	222561	138097	100	86.1054	35.1	59.9
Contig_9	182385	126931	100	96.7119	35.1	59.9
Contig_10	119709	84538	100	98.1741	35.2	59.9
Contig_11	33022	23212	100	97.1189	35.0	59.9
Contig_12	30926	22243	100	99.3541	35.4	59.7
Contig_13	25767	18083	100	96.8828	35.8	59.9
Contig_14	5422	3782	100	93.4478	35.6	58.9
Contig_15	3735	19597	94.8594	675.119	35.8	59.8
Contig_16	1950	1235	100	88.7426	35.2	58.9
Contig_17	1811	1171	100	87.5687	35.1	58.7
Contig_18	1207	1221	100	139.546	36.1	59.4

[a] Longitud total del *contig* en pares de bases.
[b] Cantidad total de lecturas que se alinearon al *contig*.
[c] Porcentaje relativo de cobertura del *contig* en relación con su propia longitud (en algunos casos fijada artificialmente al 100%).
[d] Promedio de veces que cada base fue leída (profundidad de secuenciación).
[e] Calidad media de las bases (Phred score).
[f] Calidad media del mapeo de las lecturas (Phred score del alineamiento).

C. Anexo C. Métricas de las muestras de ARN utilizadas en la secuenciación

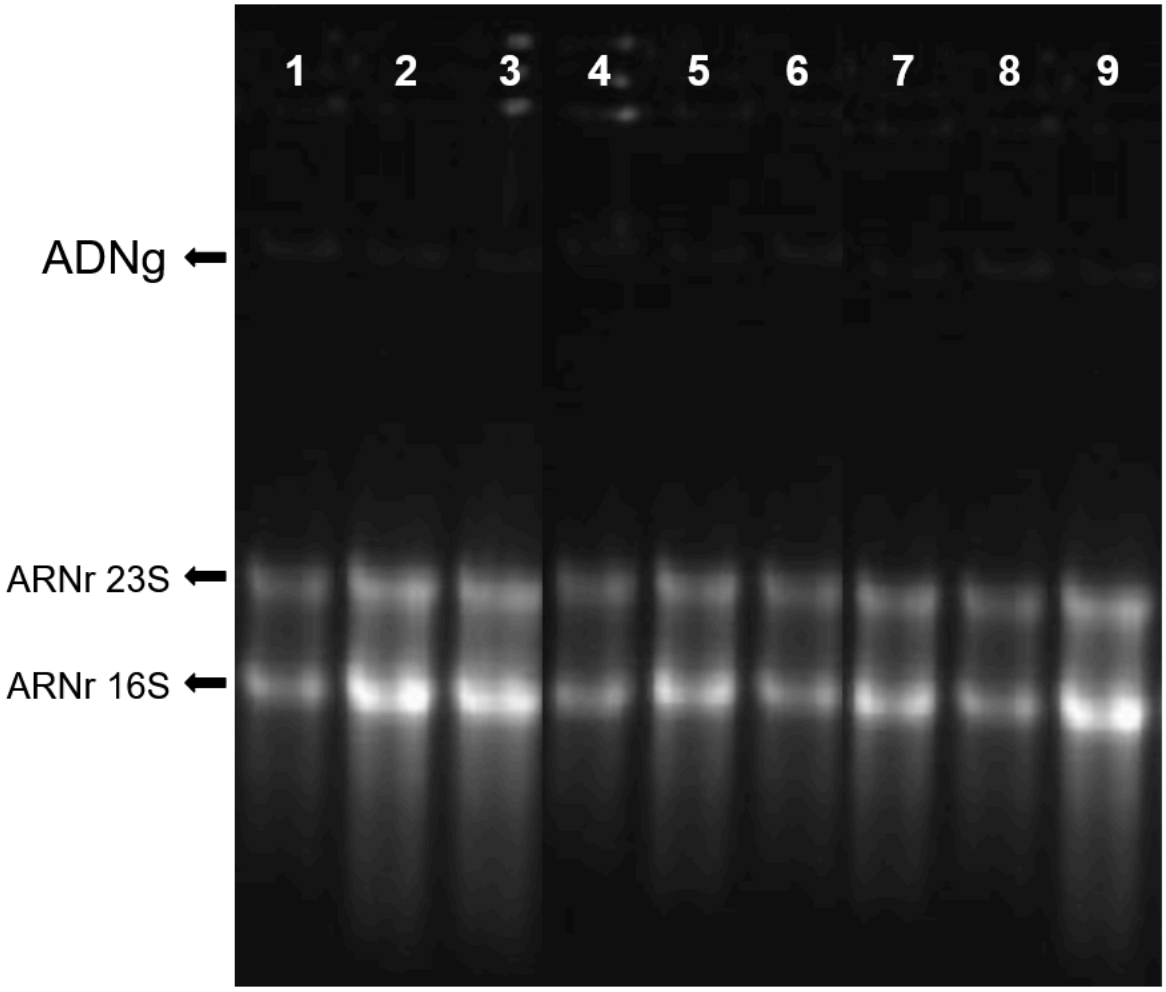
Tabla A-4. Concentración, calidad e integridad del ARN extraído para ARN-seq.

Muestra	Condición	Réplica	Concentración (ng/µL)	Relación 260/280	Relación 260/230	RIN[a]
1	Control (Medio LB)	1	1408,92	2,1	2,5	6,6
2		2	1374,51	2,1	2,51	6,3
3		3	1344,68	2,09	2,5	6,9
4	Tr1 (LB + 0.15 mM Cd(II))	1	1064,43	2,16	2,26	6,4
5		2	1623,14	2,1	2,52	7
6		3	1862,22	2,1	2,49	7,4
7	Tr2 (LB + 0.15 mM Cd(II))	1	1094,01	2,16	2,35	7,1
8		2	931,53	2,16	2,33	6,4
9		3	1067,55	2,15	2,37	6,6

[a]*RNA Integrity Number*

D. Anexo D. Integridad de las muestras de ARN

Figura A-1. Integridad del ARN extraído de cada muestra en el procedimiento de RT-qPCR. La integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa. Las muestras correspondientes al grupo control (Ct, medio LB), tratamiento 1 (Tr1, LB + 0.15 mM Cd(II)) y tratamiento 2 (Tr2, LB + 0.50 mM Cd(II)) se encuentran en los carriles 1–3, 4–6 y 7–9, respectivamente. La corrida se realizó en gel de agarosa al 1.2 % con buffer TBE, a 100 V durante 60 min.



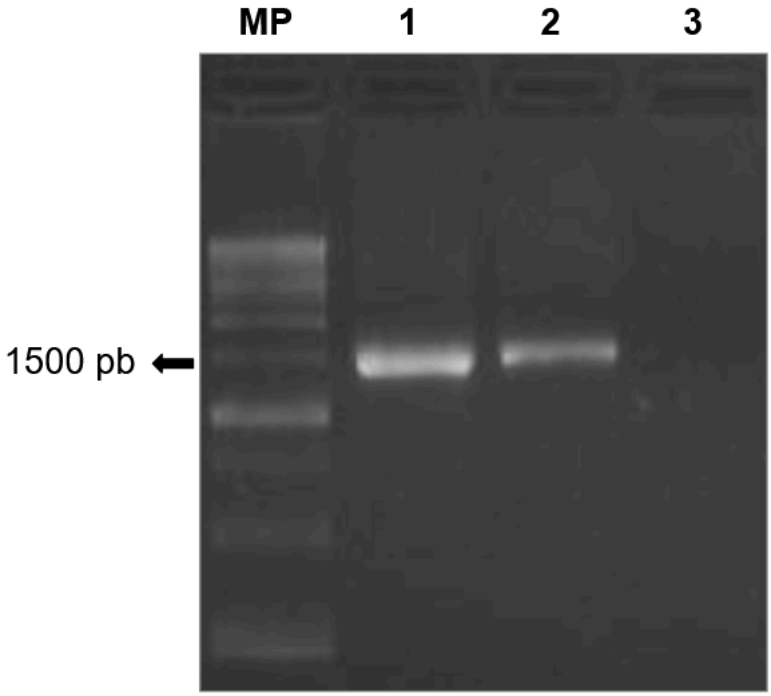
E. Anexo E. Métricas de las muestras de ARN

Tabla A-4. Concentración y calidad del ARN extraído en el procedimiento de RT-qPCR.

Muestra	Condición	Réplica	Concentración (ng/µL)	Relación 260/280	Relación 260/230
1	Control (Medio LB)	1	3198,7	2,01	2,26
2		2	1885,1	1,97	2,10
3		3	1614,7	1,98	2,02
4	Tr1 (LB + 0.15 mM Cd(II))	1	1683,9	1,99	2,11
5		2	1146,8	2,00	2,33
6		3	1204,8	2,01	2,24
7	Tr2 (LB + 0.15 mM Cd(II))	1	784,8	2,03	2,24
8		2	782,2	2,02	2,41
9		3	773,6	2,02	1,96

F. Anexo F. Tratamiento de las muestras de ARN con ADNasa I

Figura A-2. Verificación del tratamiento con ADNasa I en las muestras de ARN. La eficacia del tratamiento se evaluó mediante amplificación por PCR del gen 16S rRNA y posterior electroforesis en gel de agarosa. Las muestras correspondientes a ADN genómico (control positivo), ARN sin tratamiento con ADNasa y ARN tratado con ADNasa se encuentran en los carriles 1, 2 y 3, respectivamente. El marcador de peso molecular (MP) se encuentra en el carril correspondiente. La corrida se realizó en gel de agarosa al 1.2 % con buffer TBE, a 100 V durante 60 min.



G. Anexo G. Características de los primers

Tabla A-3. Detalles de los primers utilizados en los procedimientos de RT-qPCR

Nombre del primer	Gen objetivo	Secuencia del primer (5' →3')	Temperatura de annealing	Tamaño del amplicón	Referencia
zntA2_F zntA2_R	*zntA*	CATGGACAGCCGATCAACAG CGTTATTACACCCCGGCCAT	58.99 60.18	128	Este trabajo
mntA1_F mntA1_R	*mntA*	GGGGCATCGGGCTATAAAGG CGTTCATCACATTGGTGGCG	60.32 60.18	148	Este trabajo
zinT_F zinT_R	*zinT*	ATAGCGCACGCCCTTTTTAC ATTGAGAACGGCGTCATGGA	59.27 59.75	114	Este trabajo
znuC_F znuC_R	*znuC*	AATATCTCCGTCGCCTTCGG TTTGACCAATCCGAGCACCA	59.69 59.89	141	Este trabajo
519F 909R	16S rRNA	CAGCMGCCGCGGTAATAC CCGTCAATTCATTTGAGT	55 55	~380	Montaño-Salazar et al., 2018

Referencias

Abou-Shanab, R. A. I., Van Berkum, P., & Angle, J. S. (2007). Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of Alyssum murale. *Chemosphere, 68*(2), 360-367. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.051

Adhikary, S., Saha ,Jayanti, Dutta ,Prajesh, & and Pal, A. (2024). Bacterial Homeostasis and Tolerance to Potentially Toxic Metals and Metalloids through Diverse Transporters: Metal-Specific Insights. *Geomicrobiology Journal*, *41*(5), 496–518. https://doi.org/10.1080/01490451.2024.2340517

Åkesson, A. (2011). Cadmium Exposure in the Environment: Renal Effects and the Benchmark Dose. En J. O. Nriagu (Ed.), *Encyclopedia of Environmental Health* (pp. 465–473). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52272-6.00379-2

Ali, H., & and Khan, E. (2019). Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs—Concepts and implications for wildlife and human health. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, *25*(6), 1353–1376. https://doi.org/10.1080/10807039.2018.1469398

Alotaibi, B. S., Khan, M., & Shamim, S. (2021). Unraveling the underlying heavy metal detoxification mechanisms of Bacillus species. Microorganisms, 9(8), 1628. https://doi.org/10.3390/microorganisms9081628

Alvarenga D. O. & Varani A. M. (2019). TnComp_finder: prokaryotic composite transposon finder. Available from https://github.com/danillo-alvarenga/tncomp_finder.

Alviz-Gazitua, P., Fuentes-Alburquenque, S., Rojas, L. A., Turner, R. J., Guiliani, N., & Seeger, M. (2019). The Response of Cupriavidus metallidurans CH34 to Cadmium Involves Inhibition of the Initiation of Biofilm Formation, Decrease in Intracellular c-di-GMP Levels, and a Novel Metal Regulated Phosphodiesterase. *Frontiers in Microbiology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01499

Andrews, S. (s/f). *Babraham Bioinformatics—FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*. Recuperado el 26 de marzo de 2025, de https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/

Anjou, C., Lotoux, A., Morvan, C., & Martin-Verstraete, I. (2024). From ubiquity to specificity: The diverse functions of bacterial thioredoxin systems. *Environmental Microbiology*, *26*(6), e16668. https://doi.org/10.1111/1462-2920.16668

Aryal, M. (2021). A comprehensive study on the bacterial biosorption of heavy metals: Materials, performances, mechanisms, and mathematical modellings. *Reviews in Chemical Engineering*, *37*(6), 715–754. https://doi.org/10.1515/revce-2019-0016

Ati-Hellal, M. E., Hellal, F., Ati-Hellal, M. E., & Hellal, F. (2021). Heavy Metals in the Environment and Health Impact. En *Environmental Health*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.97204

Ba, Q., Zhou, J., Li, J., Cheng, S., Zhang, X., & Wang, H. (2022). Mutagenic Characteristics of Six Heavy Metals in Escherichia coli: The Commonality and Specificity. *Environmental Science & Technology*, *56*(19), 13867–13877. https://doi.org/10.1021/acs.est.2c04785

Barman, S., Bhattacharya, S. S., & Chandra Mandal, N. (2020). Chapter 3—Serratia. En N. Amaresan, M. Senthil Kumar, K. Annapurna, K. Kumar, & A. Sankaranarayanan (Eds.), *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 27–36). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00003-4

Bauda, P., Garsot, P., & Block, J. C. (1987). Cadmium uptake by pseudomonas fluorescens cells. *Toxicity Assessment*, *2*(1), 63–78. https://doi.org/10.1002/tox.2540020106

Bazzi, W., Abou Fayad, A. G., Nasser, A., Haraoui, L.-P., Dewachi, O., Abou-Sitta, G., Nguyen, V.-K., Abara, A., Karah, N., Landecker, H., Knapp, C., McEvoy, M. M., Zaman, M. H., Higgins, P. G., & Matar, G. M. (2020). Heavy Metal Toxicity in Armed Conflicts Potentiates AMR in A. baumannii by Selecting for Antibiotic and Heavy Metal Co-resistance Mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00068

Begg, S. L., Eijkelkamp, B. A., Luo, Z., Couñago, R. M., Morey, J. R., Maher, M. J., Ong, C. Y., McEwan, A. G., Kobe, B., O'Mara, M. L., Paton, J. C., & McDevitt, C. A. (2015). Dysregulation of transition metal ion homeostasis is the molecular basis for cadmium toxicity in Streptococcus pneumoniae. *Nature Communications*, *6*(1), 6418. https://doi.org/10.1038/ncomms7418

Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, *57*(1), 289–300. https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x

Bong, D., Sohn, J., & Lee, S. J. V. (2024). Brief guide to RT-qPCR. Molecules and Cells, 47(12), 100141. https://doi.org/10.1016/j.mocell.2024.100141

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114–2120. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170

Bouzat, J. L., & Hoostal, M. J. (2013). Evolutionary analysis and lateral gene transfer of two-component regulatory systems associated with heavy-metal tolerance in bacteria. *Journal of molecular evolution, 76*(5), 267-279. https://doi.org/10.1007/s00239-013-9558-z

Buchfink, B., Reuter, K., & Drost, H.-G. (2021). Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. *Nature Methods*, *18*(4), 366–368. https://doi.org/10.1038/s41592-021-01101-x

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, *55*(4), 611–622. https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797

Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Møller Aarestrup, F., & Hasman, H. (2014). In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(7), 3895–3903. https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14

Carvalho, M. E. A., Gaziola, S. A., Carvalho, L. A., & Azevedo, R. A. (2021). Cadmium effects on plant reproductive organs: Physiological, productive, evolutionary and ecological aspects. *Annals of Applied Biology*, *178*(2), 227–243. https://doi.org/10.1111/aab.12612

Capdevila, D. A., Wang, J., & Giedroc, D. P. (2016). Bacterial strategies to maintain zinc metallostasis at the host-pathogen interface. *Journal of biological chemistry*, 291(40), 20858-20868. https://doi.org/10.1074/jbc.R116.742023

Cardona, G. I., Escobar, M. C., Acosta-González, A., Marín, P., & Marqués, S. (2022). Highly mercury-resistant strains from different Colombian Amazon ecosystems affected by artisanal gold mining activities. Applied Microbiology and Biotechnology, 106(7), 2775-2793. https://doi.org/10.1007/s00253-022-11860-y

Chatterjee, S., Barman, P., Barman, C., Majumdar, S., & Chakraborty, R. (2024). Multimodal cadmium resistance and its regulatory networking in Pseudomonas aeruginosa strain CD3. *Scientific Reports*, *14*(1), 31689. https://doi.org/10.1038/s41598-024-80754-y

Chatterjee, S., Kumari, S., Rath, S., Priyadarshanee, M., & Das, S. (2020). Diversity, structure and regulation of microbial metallothionein: Metal resistance and possible applications in sequestration of toxic metals. *Metallomics*, *12*(11), 1637–1655. https://doi.org/10.1039/d0mt00140f

Chellaiah, E. R. (2018). Cadmium (heavy metals) bioremediation by Pseudomonas aeruginosa: A minireview. *Applied Water Science*, *8*(6), 154. https://doi.org/10.1007/s13201-018-0796-5

Chen, Y., Lun, A. T. L., & Smyth, G. K. (2016). From reads to genes to pathways: Differential expression analysis of RNA-Seq experiments using Rsubread and the edgeR quasi-likelihood pipeline. *F1000Research*, *5*, 1438. https://doi.org/10.12688/f1000research.8987.2

Chen, Y., Zhu, Q., Dong, X., Huang, W., Du, C., & Lu, D. (2019). How Serratia marcescens HB-4 absorbs cadmium and its implication on phytoremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *185*, 109723. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109723

Chien, C.-C., Huang, C.-H., & Lin, Y.-W. (2013). Characterization of a Heavy Metal Translocating P-Type ATPase Gene from an Environmental Heavy Metal Resistance Enterobacter sp. Isolate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *169*(6), 1837–1846. https://doi.org/10.1007/s12010-012-0047-4

Chrestensen, C. A., Starke, D. W., & Mieyal, J. J. (2000). Acute Cadmium Exposure Inactivates Thioltransferase (Glutaredoxin), Inhibits Intracellular Reduction of Protein-glutathionyl-mixed Disulfides, and Initiates Apoptosis *. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(34), 26556–26565. https://doi.org/10.1074/jbc.M004097200

Chun, S., Yibo, L., & Zni, L. (2017). Complete genome sequence of Serratia sp. YD25 (KCTC 42987) presenting strong antagonistic activities to various pathogenic fungi and bacteria. *Journal of Biotechnology*, *245*, 9–13. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.01.011

Cingolani, P., Platts, A., Wang, L. L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., Land, S. J., Lu, X., & Ruden, D. M. (2012). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of Drosophila melanogaster strain w^{1118}; iso-2; iso-3. *Fly*, *6*(2), 80–92. https://doi.org/10.4161/fly.19695

Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., Szcześniak, M. W., Gaffney, D. J., Elo, L. L., Zhang, X., & Mortazavi, A. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology*, *17*(1), 13. https://doi.org/10.1186/s13059-016-0881-8

Croteau, M.-N., Luoma, S. N., & Stewart, A. R. (2005). Trophic transfer of metals along freshwater food webs: Evidence of cadmium biomagnification in nature. *Limnology and Oceanography*, *50*(5), 1511–1519. https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.5.1511

Croucher, N. J., & Thomson, N. R. (2010). Studying bacterial transcriptomes using RNA-seq. Current opinion in microbiology, 13(5), 619-624. https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.09.009

Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S. A., Davies, R. M., & Li, H. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*, *10*(2), giab008. https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008

Darriba, D., Posada, D., Kozlov, A. M., Stamatakis, A., Morel, B., & Flouri, T. (2020). ModelTest-NG: A New and Scalable Tool for the Selection of DNA and Protein Evolutionary Models. *Molecular Biology and Evolution*, *37*(1), 291–294. https://doi.org/10.1093/molbev/msz189

Das, S., & Dash, H. R. (Eds.). (2017). *Handbook of Metal-Microbe Interactions and Bioremediation* (1a ed.). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781315153353

Deng, X., Yi, X. E., & Liu, G. (2007). Cadmium removal from aqueous solution by gene-modified *Escherichia coli* JM109. *Journal of Hazardous Materials*, *139*(2), 340–344. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.06.043

Diez Marulanda, J. C. (2022). *Estudio de la bioprecipitación de cadmio por bacterias ureolíticas aisladas de fincas cacaoteras de Santander, Colombia*. Universidad Nacional de Colombia.

Diez-Marulanda, J. C., & Brandão, P. F. B. (2023). Isolation of urease-producing bacteria from cocoa farms soils in Santander, Colombia, for cadmium remediation. *3 Biotech*, *13*(3), 98. https://doi.org/10.1007/s13205-023-03495-1

Diez-Marulanda, J. C., & Brandão, P. F. B. (2024). Potential use of two Serratia strains for cadmium remediation based on microbiologically induced carbonate precipitation and their cadmium resistance. *Environmental Science and Pollution Research*, *31*(4), 5319–5330. https://doi.org/10.1007/s11356-023-31062-x

Dillingham, M. S., & Kowalczykowski, S. C. (2008). RecBCD Enzyme and the Repair of Double-Stranded DNA Breaks. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, *72*(4), 642–671. https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-08

Du, B., Zhou, J., Lu, B., Zhang, C., Li, D., Zhou, J., Jiao, S., Zhao, K., & Zhang, H. (2020). Environmental and human health risks from cadmium exposure near an active lead-zinc mine and a copper smelter, China. *Science of The Total Environment*, *720*, 137585. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137585

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

El-Esawi, M. A., Elkelish, A., Soliman, M., Elansary, H. O., Zaid, A., & Wani, S. H. (2020). Serratia marcescens BM1 Enhances Cadmium Stress Tolerance and Phytoremediation Potential of Soybean Through Modulation of Osmolytes, Leaf Gas Exchange, Antioxidant Machinery, and Stress-Responsive Genes Expression. *Antioxidants*, *9*(1), 43. https://doi.org/10.3390/antiox9010043

El-Minisy, A. M., Bekheet, S. A., El-Assal, S. E.-D., Soliman, M., Amer, A. M., Hassan, M., El-Shabrawi, H. M., & El-Tarras, A. (2025). *Serratia rubidaea* SR19: A cadmium -tolerant bacteria enhancing phosphate solubilization, IAA production, and promoting cucumber seed germination. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *65*, 103546. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2025.103546

Emms, D. M., & Kelly, S. (2019). OrthoFinder: Phylogenetic orthology inference for comparative genomics. *Genome Biology*, *20*(1), 238. https://doi.org/10.1186/s13059-019-1832-y

Fashola, M., Anagun, O., & Babalola, O. O. (2023). *Heavy metal pollution: Toxic effects on bacterial cells*. Preprints. https://doi.org/10.22541/au.168690270.01555938/v1

Fatima, G., Raza, A. M., Hadi, N., Nigam, N., & Mahdi, A. A. (2019). Cadmium in Human Diseases: It's More than Just a Mere Metal. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, *34*(4), 371–378. https://doi.org/10.1007/s12291-019-00839-8

Flouri T., Izquierdo-Carrasco F., Darriba D., Aberer AJ, Nguyen LT, Minh BQ, von Haeseler A., Stamatakis A. (2014) The Phylogenetic Likelihood Library. Systematic Biology, 64(2): 356-362. https://doi.org/10.1093/sysbio/syu084

Forouzan, E., Karkhane, A. A., & Yakhchali, B. (2020). *Exploring metal resistance genes and mechanisms in copper enriched metal ore metagenome* (p. 2020.07.02.184564). bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2020.07.02.184564

Gabbianelli, R., Scotti, R., Ammendola, S., Petrarca, P., Nicolini, L., & Battistoni, A. (2011). Role of ZnuABC and ZinT in Escherichia coliO157:H7 zinc acquisition and interaction with epithelial cells. *BMC Microbiology*, *11*(1), 36. https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-36

Garrison, E., & Marth, G. (2012). *Haplotype-based variant detection from short-read sequencing* (No. arXiv:1207.3907). arXiv. https://doi.org/10.48550/arXiv.1207.3907

Ghosh, A., Sah, D., Chakraborty, M., & Rai, J. P. N. (2024). Mechanism and application of bacterial exopolysaccharides: An advanced approach for sustainable heavy metal abolition from soil. *Carbohydrate Research*, *544*, 109247. https://doi.org/10.1016/j.carres.2024.109247

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

Glušič, M., Stare, J., Grdadolnik, J., & Vianello, R. (2013). Binding of cadmium dication to glutathione facilitates cysteine SH deprotonation: A computational DFT study. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *119*, 90–94. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.11.004

Graham, A. I., Hunt, S., Stokes, S. L., Bramall, N., Bunch, J., Cox, A. G., McLeod, C. W., & Poole, R. K. (2009). Severe Zinc Depletion of Escherichia coli. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(27), 18377–18389. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.001503

Grass, G., Fan, B., Rosen, B. P., Franke, S., Nies, D. H., & Rensing, C. (2001). ZitB (YbgR), a Member of the Cation Diffusion Facilitator Family, Is an Additional Zinc Transporter in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, *183*(15), 4664–4667. https://doi.org/10.1128/JB.183.15.4664-4667.2001

Grass, G., Otto, M., Fricke, B., Haney, C. J., Rensing, C., Nies, D. H., & Munkelt, D. (2005). FieF (YiiP) from Escherichia coli mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Archives of Microbiology*, *183*(1), 9–18. https://doi.org/10.1007/s00203-004-0739-4

Guglierame, P., Pasca, M. R., De Rossi, E., Buroni, S., Arrigo, P., Manina, G., & Riccardi, G. (2006). Efflux pump genes of the resistance-nodulation-division family in Burkholderia cenocepacia genome. *BMC Microbiology*, *6*(1), 66. https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-66

Gupta, P., & Diwan, B. (2017). Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports*, *13*, 58–71. https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.006

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, *29*(8), 1072–1075. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086

Halema, A. A., El-Beltagi, H. S., Al-Dossary, O., Alsubaie, B., Henawy, A. R., Rezk, A. A., Almutairi, H. H., Mohamed, A. A., Elarabi, N. I., & Abdelhadi, A. A. (2024). Omics technology draws a comprehensive heavy metal resistance strategy in bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *40*(6), 193. https://doi.org/10.1007/s11274-024-04005-y

Helbig, K., Grosse, C., & Nies, D. H. (2008). Cadmium Toxicity in Glutathione Mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *190*(15), 5439–5454. https://doi.org/10.1128/JB.00272-08

Heras, B., Shouldice, S. R., Totsika, M., Scanlon, M. J., Schembri, M. A., & Martin, J. L. (2009). DSB proteins and bacterial pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, *7*(3), 215–225. https://doi.org/10.1038/nrmicro2087

Hoffmann, T. D., Reeksting, B. J., & Gebhard, S. (2021). Bacteria-induced mineral precipitation: A mechanistic review. *Microbiology*, *167*(4). https://doi.org/10.1099/mic.0.001049

Hossain, S. T., Mallick, I., & Mukherjee, S. K. (2012). Cadmium toxicity in *Escherichia coli*: Cell morphology, Z-ring formation and intracellular oxidative balance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *86*, 54–59. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.09.017

Hrynkiewicz, K., Złoch, M., Kowalkowski, T., Baum, C., Niedojadło, K., & Buszewski, B. (2015). Strain-specific bioaccumulation and intracellular distribution of Cd2+ in bacteria isolated from the rhizosphere, ectomycorrhizae, and

fruitbodies of ectomycorrhizal fungi. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(4), 3055–3067. https://doi.org/10.1007/s11356-014-3489-0

Hu, P., Brodie, E. L., Suzuki, Y., McAdams, H. H., & Andersen, G. L. (2005). Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in Caulobacter crescentus. Journal of bacteriology, 187(24), 8437-8449. https://doi.org/10.1128/jb.187.24.8437-8449.2005

Huang, M., Shen, S., Meng, Z., Si, G., Wu, X., Feng, T., Liu, C., Chen, J., & Duan, C. (2023). Mechanisms involved in the sequestration and resistance of cadmium for a plant-associated Pseudomonas strain. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *266*, 115527. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115527

Hughes, A. L., Friedman, R., Rivailler, P., & French, J. O. (2008). Synonymous and Nonsynonymous Polymorphisms versus Divergences in Bacterial Genomes. *Molecular Biology and Evolution*, *25*(10), 2199–2209. https://doi.org/10.1093/molbev/msn166

Iguchi, A., Nagaya, Y., Pradel, E., Ooka, T., Ogura, Y., Katsura, K., Kurokawa, K., Oshima, K., Hattori, M., Parkhill, J., Sebaihia, M., Coulthurst, S. J., Gotoh, N., Thomson, N. R., Ewbank, J. J., & Hayashi, T. (2014). Genome Evolution and Plasticity of Serratia marcescens, an Important Multidrug-Resistant Nosocomial Pathogen. *Genome Biology and Evolution*, *6*(8), 2096–2110. https://doi.org/10.1093/gbe/evu160

Intorne, A. C., de Oliveira, M. V. V., de M Pereira, L., & de Souza Filho, G. A. (2012). Essential role of the czc determinant for cadmium, cobalt and zinc resistance in Gluconacetobacter diazotrophicus PAl 5. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, *15*(2), 69–78. https://doi.org/10.2436/20.1501.01.160

Jain, C., Rodriguez-R, L. M., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T., & Aluru, S. (2018). High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature Communications*, *9*(1), 5114. https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9

Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., & Beeregowda, K. N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*, *7*(2), 60–72. https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009

Jang, S. (2016). Multidrug efflux pumps in Staphylococcus aureus and their clinical implications. *Journal of Microbiology*, *54*(1), 1–8. https://doi.org/10.1007/s12275-016-5159-z

Jaramillo, A. V. C., Cory, M. B., Li, A., Kohli, R. M., & Wuest, W. M. (2022). Exploration of Inhibitors of the Bacterial LexA Repressor-Protease. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *65*, 128702. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2022.128702

Jebril, N., Boden, R., & Braungardt, C. (2022). Cadmium resistant bacteria mediated cadmium removal: A systematic review on resistance, mechanism and bioremediation approaches. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *1002*(1), 012006. https://doi.org/10.1088/1755-1315/1002/1/012006

Jiao, J., Lv, X., Shen, C., & Morigen, M. (2024). Genome and transcriptomic analysis of the adaptation of *Escherichia coli* to environmental stresses. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *23*, 2132–2140. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2024.05.033

Joseph, P. (2009). Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *238*(3), 272–279. https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.01.011

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., … Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*(7873), 583–589. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2

Kavanaugh, L. G., Dey, D., Shafer, W. M., & Conn, G. L. (2024). Structural and functional diversity of Resistance-Nodulation-Division (RND) efflux pump transporters with implications for antimicrobial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *88*(3), e00089-23. https://doi.org/10.1128/mmbr.00089-23

Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. Frontiers in microbiology, 8, 108. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108

Kerdsomboon, K., Techo, T., Mhuantong, W., Limcharoensuk, T., Luangkamchorn, S. T., Laoburin, P., & Auesukaree, C. (2024). Genomic and transcriptomic analyses reveal insights into cadmium resistance mechanisms of *Cupriavidus nantongensis* strain E324. *Science of The Total Environment*, *952*, 175915. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.175915

Kershaw, C. J., Brown, N. L., & Hobman, J. L. (2007). Zinc dependence of *zinT* (*yodA*) mutants and binding of zinc, cadmium and mercury by ZinT. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *364*(1), 66–71. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.09.094

Khairnar, N. P., Joe, M.-H., Misra, H. S., Lim, S.-Y., & Kim, D.-H. (2013). FrnE, a Cadmium-Inducible Protein in Deinococcus radiodurans, Is Characterized as a Disulfide Isomerase Chaperone *In Vitro* and for Its Role in Oxidative Stress Tolerance *In Vivo*. *Journal of Bacteriology*, *195*(12), 2880–2886. https://doi.org/10.1128/JB.01503-12

Khan, A. R., Park, G.-S., Asaf, S., Hong, S.-J., Jung, B. K., & Shin, J.-H. (2017). Complete genome analysis of Serratia marcescens RSC-14: A plant growth-promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. *PLOS ONE*, *12*(2), e0171534. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171534

Khan, A. R., Ullah, I., Khan, A. L., Park, G.-S., Waqas, M., Hong, S.-J., Jung, B. K., Kwak, Y., Lee, I.-J., & Shin, J.-H. (2015). Improvement in phytoremediation potential of Solanum nigrum under cadmium contamination through

endophytic-assisted *Serratia* sp. RSC-14 inoculation. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(18), 14032–14042. https://doi.org/10.1007/s11356-015-4647-8

Khan, Z., Elahi, A., Bukhari, D. A., & Rehman, A. (2022). Cadmium sources, toxicity, resistance and removal by microorganisms-A potential strategy for cadmium eradication. *Journal of Saudi Chemical Society*, *26*(6), 101569. https://doi.org/10.1016/j.jscs.2022.101569

Khan, Z., Nisar, M. A., Hussain, S. Z., Arshad, M. N., & Rehman, A. (2015). Cadmium resistance mechanism in *Escherichia coli* P4 and its potential use to bioremediate environmental cadmium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(24), 10745–10757. https://doi.org/10.1007/s00253-015-6901-x

Kobras, C. M., Fenton, A. K., & Sheppard, S. K. (2021). Next-generation microbiology: From comparative genomics to gene function. *Genome Biology*, *22*(1), 123. https://doi.org/10.1186/s13059-021-02344-9

Kolaj-Robin, O., Russell, D., Hayes, K. A., Pembroke, J. T., & Soulimane, T. (2015). Cation Diffusion Facilitator family: Structure and function. *FEBS Letters*, *589*(12), 1283–1295. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.007

Kozlov, A. M., Aberer, A. J., & Stamatakis, A. (2015). ExaML version 3: a tool for phylogenomic analyses on supercomputers. Bioinformatics, 31(15), 2577-2579. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv184

Kubier, A., Wilkin, R. T., & Pichler, T. (2019). Cadmium in soils and groundwater: A review. *Applied Geochemistry*, *108*, 104388. https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2019.104388

Kück, P., & Longo, G. C. (2014). FASconCAT-G: Extensive functions for multiple sequence alignment preparations concerning phylogenetic studies. *Frontiers in Zoology*, *11*(1), 81. https://doi.org/10.1186/s12983-014-0081-x

Kumar, S., & Sharma, A. (2019). Cadmium toxicity: Effects on human reproduction and fertility. *Reviews on Environmental Health*, *34*(4), 327–338. https://doi.org/10.1515/reveh-2019-0016

Kumari, D., Qian, X.-Y., Pan, X., Achal, V., Li, Q., & Gadd, G. M. (2016). Microbially-induced Carbonate Precipitation for Immobilization of Toxic Metals. En *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 94, pp. 79–108). Elsevier. https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2015.12.002

Kuraku, S., Zmasek, C. M., Nishimura, O., & Katoh, K. (2013). aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. *Nucleic Acids Research*, *41*(W1), W22–W28. https://doi.org/10.1093/nar/gkt389

Kvam, V. M., Liu, P., & Si, Y. (2012). A comparison of statistical methods for detecting differentially expressed genes from RNA-seq data. *American Journal of Botany*, *99*(2), 248–256. https://doi.org/10.3732/ajb.1100340

Lan, Y., Liu, M., Song, Y., Cao, Y., Li, F., Luo, D., & Qiao, D. (2023). Distribution, characterization, and evolution of heavy metal resistance genes and Tn7-like associated heavy metal resistance Gene Island of Burkholderia. Frontiers in Microbiology, 14, 1252127. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1252127

Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, *9*(4), 357–359. https://doi.org/10.1038/nmeth.1923

Lata, S., Sharma, S., & Kaur, S. (2023). OMICS Approaches in Mitigating Metal Toxicity in Comparison to Conventional Techniques Used in Cadmium Bioremediation. *Water, Air, & Soil Pollution*, *234*(3), 148. https://doi.org/10.1007/s11270-023-06145-7

Ledda, C. (2018). Cadmium exposure and prostate cancer insights mechanisms and perspectives. *Frontiers in Bioscience*, *23*(9), 1687–1700. https://doi.org/10.2741/4667

Lee, J., Hiibel, S. R., Reardon, K. F., & Wood, T. K. (2010). Identification of stress-related proteins in Escherichia coli using the pollutant cis-dichloroethylene.

Journal of Applied Microbiology, *108*(6), 2088–2102. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04611.x

Lee, S. M., Grass, G., Haney, C. J., Fan, B., Rosen, B. P., Anton, A., Nies, D. H., & Rensing, C. (2002). Functional analysis of the Escherichia coli zinc transporter ZitB. *FEMS Microbiology Letters*, *215*(2), 273–278. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11402.x

Li, H. (2013). *Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM* (No. arXiv:1303.3997). arXiv. https://doi.org/10.48550/arXiv.1303.3997

Liang, B., Feng, Y., Ji, X., Li, C., Li, Q., Zeng, Z., & Wang, Y. (2025). Isolation and characterization of cadmium-resistant Bacillus cereus strains from Cd-contaminated mining areas for potential bioremediation applications. *Frontiers in Microbiology*, *16*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1550830

Liao, P., Satten, G. A., & Hu, Y.-J. (2017). PhredEM: A Phred-Score-Informed Genotype-Calling Approach for Next-Generation Sequencing Studies. *Genetic epidemiology*, *41*(5), 375–387. https://doi.org/10.1002/gepi.22048

Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, *30*(7), 923–930. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656

Lima, A. I. G., Corticeiro, S. C., & De Almeida Paula Figueira, E. M. (2006). Glutathione-mediated cadmium sequestration in Rhizobium leguminosarum. *Enzyme and Microbial Technology*, *39*(4), 763–769. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.12.009

Lima de Silva, A. A., de Carvalho, M. A. R., de Souza, S. A. L., Dias, P. M. T., da Silva Filho, R. G., de Meirelles Saramago, C. S., de Melo Bento, C. A., & 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/S1517-838220120004000047

Limcharoensuk, T., Sooksawat, N., Sumarnrote, A., Awutpet, T., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., & Auesukaree, C. (2015). Bioaccumulation and biosorption of Cd2+ and Zn2+ by bacteria isolated from a zinc mine in Thailand. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *122*, 322–330. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.08.013

Lindsey, R. L., Gladney, L. M., Huang, A. D., Griswold, T., Katz, L. S., Dinsmore, B. A., Im, M. S., Kucerova, Z., Smith, P. A., Lane, C., & Carleton, H. A. (2023). Rapid identification of enteric bacteria from whole genome sequences using average nucleotide identity metrics. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1225207. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1225207

Liu, H., Zhang, Y., Wang, Y., Xie, X., & Shi, Q. (2021). The Connection between Czc and Cad Systems Involved in Cadmium Resistance in Pseudomonas putida. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(18), 9697. https://doi.org/10.3390/ijms22189697

Lopes, A. T. S., Albuquerque, G. R., & Maciel, B. M. (2018). Multiplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous quantification of Salmonella spp., Escherichia coli, and Staphylococcus aureus in different food matrices: Advantages and disadvantages. *BioMed research international, 2018*(1), 6104015. https://doi.org/10.1155/2018/6104015

Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 550. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8

Madeira, F., Madhusoodanan, N., Lee, J., Eusebi, A., Niewielska, A., Tivey, A. R. N., Lopez, R., & Butcher, S. (2024). The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. *Nucleic Acids Research*, *52*(W1), W521–W525. https://doi.org/10.1093/nar/gkae241

Makui, H., Roig, E., Cole, S. T., Helmann, J. D., Gros, P., & Cellier, M. F. M. (2000). Identification of the Escherichia coli K-12 Nramp orthologue (MntH) as a

selective divalent metal ion transporter. *Molecular Microbiology*, *35*(5), 1065–1078. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01774.x

Manara, A., DalCorso, G., Baliardini, C., Farinati, S., Cecconi, D., & Furini, A. (2012). Pseudomonas putida Response to Cadmium: Changes in Membrane and Cytosolic Proteomes. *Journal of Proteome Research*, *11*(8), 4169–4179. https://doi.org/10.1021/pr300281f

Malone, J. H., & Oliver, B. (2011). Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. BMC biology, 9(1), 34. https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-34

Mar, S. S., & Okazaki, M. (2012). Investigation of Cd contents in several phosphate rocks used for the production of fertilizer. *Microchemical Journal*, *104*, 17–21. https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.03.020

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, *17*(1), Article 1. https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200

Maslowska, K. H., Makiela-Dzbenska, K., & Fijalkowska, I. J. (2019). The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *60*(4), 368–384. https://doi.org/10.1002/em.22267

Mathivanan, K., Chandirika, J. U., Vinothkanna, A., Yin, H., Liu, X., & Meng, D. (2021). Bacterial adaptive strategies to cope with metal toxicity in the contaminated environment – A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *226*, 112863. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112863

Mathivanan, K., & Rajaram, R. (2014). Isolation and characterisation of cadmium-resistant bacteria from an industrially polluted coastal ecosystem on the southeast coast of India. *Chemistry and Ecology*, *30*(7), 622–635. https://doi.org/10.1080/02757540.2014.889125

Maynaud, G., Brunel, B., Yashiro, E., Mergeay, M., Cleyet-Marel, J.-C., & Le Quéré, A. (2014). CadA of Mesorhizobium metallidurans isolated from a zinc-rich

mining soil is a PIB-2-type ATPase involved in cadmium and zinc resistance. *Research in Microbiology*, *165*(3), 175–189. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.02.001

Mitrić, A., & Castellano, I. (2023). Targeting gamma-glutamyl transpeptidase: A pleiotropic enzyme involved in glutathione metabolism and in the control of redox homeostasis. *Free Radical Biology and Medicine*, *208*, 672–683. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.09.020

Montanini, B., Blaudez, D., Jeandroz, S., Sanders, D., & Chalot, M. (2007). Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: Improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics*, *8*(1), 107. https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-107

Monsieurs, P., Moors, H., Van Houdt, R., Janssen, P.J., Janssen, A., Coninx, I., Mergeay, M. and Leys, N. (2011). Heavy metal resistance in Cupriavidus metallidurans CH34 is governed by an intricate transcriptional network. *Biometals*, 24(6), 1133-1151. https://doi.org/10.1007/s10534-011-9473-y

Munkelt, D., Grass, G., & Nies, D. H. (2004). The Chromosomally Encoded Cation Diffusion Facilitator Proteins DmeF and FieF from Wautersia metallidurans CH34 Are Transporters of Broad Metal Specificity. *Journal of Bacteriology*, *186*(23), 8036–8043. https://doi.org/10.1128/JB.186.23.8036-8043.2004

Néron, B., Littner, E., Haudiquet, M., Perrin, A., Cury, J., & Rocha, E. P. C. (2022). IntegronFinder 2.0: Identification and Analysis of Integrons across Bacteria, with a Focus on Antibiotic Resistance in Klebsiella. *Microorganisms*, *10*(4), Article 4. https://doi.org/10.3390/microorganisms10040700

Nies, D. H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, *27*(2–3), 313–339. https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00048-2

Nnaji, N. D., Anyanwu, C. U., Miri, T., & Onyeaka, H. (2024a). Mechanisms of Heavy Metal Tolerance in Bacteria: A Review. *Sustainability*, *16*(24), 11124. https://doi.org/10.3390/su162411124

Nnaji, N. D., Anyanwu, C. U., Miri, T., & Onyeaka, H. (2024b). Mechanisms of Heavy Metal Tolerance in Bacteria: A Review. *Sustainability*, *16*(24), Article 24. https://doi.org/10.3390/su162411124

Noll, M., & Lutsenko, S. (2000). Expression of ZntA, a Zinc-Transporting P1-Type ATPase, is Specifically Regulated by Zinc and Cadmium. *IUBMB Life*, *49*(4), 297–302. https://doi.org/10.1080/15216540050033168

Oger, C., Mahillon, J., & Petit, F. (2003). Distribution and diversity of a cadmium resistance (cadA) determinant and occurrence of IS257 insertion sequences in Staphylococcal bacteria isolated from a contaminated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiology Ecology*, *43*(2), 173–183. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01056.x

Okkeri, J., & Haltia, T. (2006). The metal-binding sites of the zinc-transporting P-type ATPase of *Escherichia coli*. Lys693 and Asp714 in the seventh and eighth transmembrane segments of ZntA contribute to the coupling of metal binding and ATPase activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1757*(11), 1485–1495. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2006.06.008

Ouyang, P., Wang, Y., Peng, X., Shi, X., Chen, X., Li, Z., & Ma, Y. (2024). Harnessing plant-beneficial bacterial encapsulation: A sustainable strategy for facilitating cadmium bioaccumulation in *Medicago sativa*. *Journal of Hazardous Materials*, *476*, 135232. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.135232

Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almabrazi, H. G., Pedersen, K. F., Lin, Y., Garretson, J., McEntaggart, N. O., Sailor, C. A., Dawson, R. B., & Peek, A. S. (2008). IDT SciTools: A suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research*, *36*(Web Server issue), W163–W169. https://doi.org/10.1093/nar/gkn198

Pagnanelli, F., Cruz Viggi, C., & Toro, L. (2010). Isolation and quantification of cadmium removal mechanisms in batch reactors inoculated by sulphate reducing

bacteria: Biosorption versus bioprecipitation. *Bioresource Technology*, *101*(9), 2981–2987. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.009

Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Rensing, C., Kristiansson, E., & Larsson, D. G. J. (2014). BacMet: Antibacterial biocide and metal resistance genes database. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1), D737–D743. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1252

Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*, *25*(7), 1043–1055. https://doi.org/10.1101/gr.186072.114

Peana, M., Pelucelli, A., Chasapis, C. T., Perlepes, S. P., Bekiari, V., Medici, S., & Zoroddu, M. A. (2022). Biological Effects of Human Exposure to Environmental Cadmium. *Biomolecules*, *13*(1), 36. https://doi.org/10.3390/biom13010036

Permina, E. A., Kazakov, A. E., Kalinina, O. V., & Gelfand, M. S. (2006). Comparative genomics of regulation of heavy metal resistance in Eubacteria. BMC microbiology, 6(1), 49. https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-49

Petrarca, P., Ammendola, S., Pasquali, P., & Battistoni, A. (2010). The Zur-Regulated ZinT Protein Is an Auxiliary Component of the High-Affinity ZnuABC Zinc Transporter That Facilitates Metal Recruitment during Severe Zinc Shortage. *Journal of Bacteriology*, *192*(6), 1553–1564. https://doi.org/10.1128/jb.01310-09

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*(9), e45.

Priyadarshanee, M., & Das, S. (2021). Biosorption and removal of toxic heavy metals by metal tolerating bacteria for bioremediation of metal contamination: A comprehensive review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *9*(1), 104686. https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104686

Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A., & Korobeynikov, A. (2020). Using SPAdes De Novo Assembler. *Current Protocols in Bioinformatics*, *70*(1), e102. https://doi.org/10.1002/cpbi.102

Qin, W., Zhao, J., Yu, X., Liu, X., Chu, X., Tian, J., & Wu, N. (2019). Improving Cadmium Resistance in Escherichia coli Through Continuous Genome Evolution. *Frontiers in Microbiology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00278

R Core Team. (2025). *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (Versión 4.4.3) [Software]. R Foundation for Statistical Computing. https://www.R-project.org/

Ramakrishnan, S., Muruganraj, T., Majumdar, R., & Sugumar, S. (2023). Study of Cadmium Metal Resistance in Stenotrophomonas maltophilia. *Indian Journal of Microbiology*, *63*(1), 91–99. https://doi.org/10.1007/s12088-023-01066-9

Rambaut, A. (2025). *Rambaut/figtree* [Java]. https://github.com/rambaut/figtree (Obra original publicada en 2015)

Raghavan, D., Patinharekkara, S. C., Elampilay, S. T., Payatatti, V. K. I., Charles, S., Veeraraghavan, S., ... & Anitha, S. J. (2023). New insights into bacterial Zn homeostasis and molecular architecture of the metal resistome in soil polluted with nano zinc oxide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 263, 115222. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115222

Rapaport, F., Khanin, R., Liang, Y., Pirun, M., Krek, A., Zumbo, P., Mason, C. E., Socci, N. D., & Betel, D. (2013). Comprehensive evaluation of differential gene expression analysis methods for RNA-seq data. *Genome Biology*, *14*(9), 3158. https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-9-r95

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

Rensing, C., & Mitra, B. (2007). Zinc, Cadmium, and Lead Resistance and Homeostasis. En D. H. Nies & S. Silver (Eds.), *Molecular Microbiology of Heavy Metals* (Vol. 6, pp. 321–341). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/7171_2006_083

Rensing, C., Mitra, B., & Rosen, B. P. (1997). The zntA gene of Escherichia coli encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(26), 14326–14331.

Riesco, R., & Trujillo, M. E. (2024). Update on the proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *74*(3), 006300. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006300

Rocha, D. J. P. G., Castro, T. L. P., Aguiar, E. R. G. R., & Pacheco, L. G. C. (2020). Gene Expression Analysis in Bacteria by RT-qPCR. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *2065*, 119–137. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_10

Rocha, E. R., Tzianabos, A. O., & Smith, C. J. (2007). Thioredoxin Reductase Is Essential for Thiol/Disulfide Redox Control and Oxidative Stress Survival of the Anaerobe Bacteroides fragilis. *Journal of Bacteriology*, *189*(22), 8015–8023. https://doi.org/10.1128/jb.00714-07

Saathoff, M., Kosol, S., Semmler, T., Tedin, K., Dimos, N., Kupke, J., Seidel, M., Ghazisaeedi, F., Jonske, M. C., Wolf, S. A., Kuropka, B., Czyszczoń, W., Ghilarov, D., Grätz, S., Heddle, J. G., Loll, B., Süssmuth, R. D., & Fulde, M. (2023). Gene amplifications cause high-level resistance against albicidin in gram-negative bacteria. *PLOS Biology*, *21*(8), e3002186. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002186

Satarug, S., Garrett, S. H., Sens, M. A., & Sens, D. A. (2010). Cadmium, Environmental Exposure, and Health Outcomes. *Environmental Health Perspectives*, *118*(2), 182–190. https://doi.org/10.1289/ehp.0901234

Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, *2020*, baaa062. https://doi.org/10.1093/database/baaa062

Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, *30*(14), 2068–2069. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153

Seemann, T. (2025). *Tseemann/abricate* [Perl]. https://github.com/tseemann/abricate (Obra original publicada en 2014)

Serment-Guerrero, J., Dominguez-Monroy, V., Davila-Becerril, J., Morales-Avila, E., & Fuentes-Lorenzo, J. L. (2020). Induction of the SOS response of *Escherichia coli* in repair-defective strains by several genotoxic agents. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *854–855*, 503196. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503196

Shamim, S., Rehman, A., & Qazi, M. H. (2014). Cadmium-Resistance Mechanism in the Bacteria Cupriavidus metallidurans CH34 and Pseudomonas putida mt2. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *67*(2), 149–157. https://doi.org/10.1007/s00244-014-0009-7

Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples)†. *Biometrika*, *52*(3–4), 591–611. https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591

Sharma, M., Sharma, S., Paavan, Gupta, M., Goyal, S., Talukder, D., Akhtar, Mohd. S., Kumar, R., Umar, A., Alkhanjaf, A. A. M., & Baskoutas, S. (2023). Mechanisms of microbial resistance against cadmium – a review. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, *22*(1), 13–30. https://doi.org/10.1007/s40201-023-00887-6

Shi, J.-J., Shi, Y., Feng, Y.-L., Li, Q., Chen, W.-Q., Zhang, W.-J., & Li, H.-Q. (2019). Anthropogenic cadmium cycles and emissions in Mainland China 1990–2015. *Journal of Cleaner Production*, *230*, 1256–1265. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.05.166

Shi, Z., Zhang, Z., Yuan, M., Wang, S., Yang, M., Yao, Q., Ba, W., Zhao, J., & Xie, B. (2020). Characterization of a high cadmium accumulating soil bacterium,

Cupriavidus sp. WS2. *Chemosphere*, *247*, 125834. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125834

Smith, C. J., & Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS microbiology ecology*, 67(1), 6-20. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x

Stafford, S. J., Humphreys, D. P., & Lund, P. A. (1999). Mutations in dsbA and dsbB, but not dsbC, lead to an enhanced sensitivity of Escherichia coli to Hg2+ and Cd2+. *FEMS Microbiology Letters*, *174*(1), 179–184. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13566.x

Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, *30*(9), 1312–1313. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033

Stojnev, T., Harichová, J., Ferianc, P., & Nyström, T. (2007). Function of a Novel Cadmium-Induced YodA Protein in Escherichia coli. *Current Microbiology*, *55*(2), 99–104. https://doi.org/10.1007/s00284-006-0516-5

Su, C., Xiang, Z., Liu, Y., Zhao, X., Sun, Y., Li, Z., Li, L., Chang, F., Chen, T., Wen, X., Zhou, Y., & Zhao, F. (2016). Analysis of the genomic sequences and metabolites of Serratia surfactantfaciens sp. Nov. YD25T that simultaneously produces prodigiosin and serrawettin W2. *BMC Genomics*, *17*(1), 865. https://doi.org/10.1186/s12864-016-3171-7

Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(43), 15545–15550. https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102

Sun, H., Li, Y., Gao, S., Shi, G., Cao, L., Li, X., Li, T., Li, T., Wang, M., Li, E., Liu, J., Ni, H., Chen, Y., & Liu, Y. (2025). Identification of key chromium resistance

genes in *Cellulomonas* using transcriptomics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *291*, 117843. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2025.117843

Taboada, B., Estrada, K., Ciria, R., & Merino, E. (2018). Operon-mapper: A web server for precise operon identification in bacterial and archaeal genomes. *Bioinformatics*, *34*(23), 4118–4120. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty496

Tamayo-Figueroa, D. P., Castillo, E., & Brandão, P. F. B. (2019). Metal and metalloid immobilization by microbiologically induced carbonates precipitation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *35*(4), 58. https://doi.org/10.1007/s11274-019-2626-9

Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy Metal Toxicity and the Environment. En A. Luch (Ed.), *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology* (Vol. 101, pp. 133–164). Springer Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6

Thai, T. D., Lim, W., & Na, D. (2023). Synthetic bacteria for the detection and bioremediation of heavy metals. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *11*, 1178680. https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1178680

Thornton, B., & Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, *39*(2), 145–154. https://doi.org/10.1002/bmb.20461

Trajanovska, S., Britz, M. L., & Bhave, M. (1997). Detection of heavy metal ion resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from a lead-contaminated site. Biodegradation, 8(2), 113-124. https://doi.org/10.1023/A:1008212614677

Tseng, A. S., Roberts, M. C., Weissman, S. J., & Rabinowitz, P. M. (2023). Study of heavy metal resistance genes in Escherichia coli isolates from a marine ecosystem with a history of environmental pollution (arsenic, cadmium, copper, and mercury). *PLOS ONE*, *18*(11), e0294565. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294565

Tukey, J. W. (1949). Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. *Biometrics*, *5*(2), 99–114. https://doi.org/10.2307/3001913

Van Dongen, S. (2008). Graph Clustering Via a Discrete Uncoupling Process. *SIAM Journal on Matrix Analysis and Applications*, *30*(1), 121–141. https://doi.org/10.1137/040608635

Veselovsky, V. A., Dyachkova, M. S., Bespiatykh, D. A., Yunes, R. A., Shitikov, E. A., Polyaeva, P. S., Danilenko, V. N., Olekhnovich, E. I., & Klimina, K. M. (2022). The Gene Expression Profile Differs in Growth Phases of the Bifidobacterium Longum Culture. *Microorganisms*, *10*(8), 1683. https://doi.org/10.3390/microorganisms10081683

Vigonsky, E., Fish, I., Livnat-Levanon, N., Ovcharenko, E., Ben-Tal, N., & Lewinson, O. (2015). Metal binding spectrum and model structure of the Bacillus anthracis virulence determinant MntA. *Metallomics*, *7*(10), 1407–1419. https://doi.org/10.1039/c5mt00100e

Wang, A., & Crowley, D. E. (2005). Global Gene Expression Responses to Cadmium Toxicity in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, *187*(9), 3259–3266. https://doi.org/10.1128/JB.187.9.3259-3266.2005

Wang, P., & Wang, F. (2023). A proposed metric set for evaluation of genome assembly quality. *Trends in Genetics*, *39*(3), 175–186. https://doi.org/10.1016/j.tig.2022.10.005

Wen, S., Yin, F., Liu, C., Dang, Y., Sun, D., & Li, P. (2023). Integrated analysis of transcriptomic and protein-protein interaction data reveals cadmium stress response in *Geobacter sulfurreducens*. *Environmental Research*, *218*, 115063. https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.115063

Williams, C. R., Baccarella, A., Parrish, J. Z., & Kim, C. C. (2017). Empirical assessment of analysis workflows for differential expression analysis of human samples using RNA-Seq. *BMC Bioinformatics*, *18*(1), 38. https://doi.org/10.1186/s12859-016-1457-z

Williams, D. J., Grimont, P. A. D., Cazares, A., Grimont, F., Ageron, E., Pettigrew, K. A., Cazares, D., Njamkepo, E., Weill, F.-X., Heinz, E., Holden, M. T. G., Thomson, N. R., & Coulthurst, S. J. (2022). The genus Serratia revisited by genomics. *Nature Communications*, *13*(1), 5195. https://doi.org/10.1038/s41467-022-32929-2

Wu, B., Hou, S., Peng, D., Wang, Y., Wang, C., Xu, F., & Xu, H. (2018). Response of soil micro-ecology to different levels of cadmium in alkaline soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *166*, 116–122. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.076

Wu, P., Rane, N. R., Xing, C., Patil, S. M., Roh, H.-S., Jeon, B.-H., & Li, X. (2022). Integrative chemical and omics analyses reveal copper biosorption and tolerance mechanisms of *Bacillus cereus* strain T6. *Journal of Hazardous Materials*, *435*, 129002. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129002

Wu, X., Yalowich, J. C., & Hasinoff, B. B. (2011). Cadmium is a catalytic inhibitor of DNA topoisomerase II. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *105*(6), 833–838. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.02.007

Xia, J., Luo, Y., Chen, M., Liu, Y., Wang, Z., Deng, S., Xu, J., Han, Y., Sun, J., Jiang, L., Song, H., & Cheng, C. (2023). Characterization of a DsbA family protein reveals its crucial role in oxidative stress tolerance of Listeria monocytogenes. *Microbiology Spectrum*, *11*(6), e03060-23. https://doi.org/10.1128/spectrum.03060-23

Xie, Z., & Tang, H. (2017). ISEScan: Automated identification of insertion sequence elements in prokaryotic genomes. *Bioinformatics*, *33*(21), 3340–3347. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx433

Xu, F., & Wang, D. (2023). Bioremediation potential and primary mechanism of *Sporosarcina pasteurii* for cadmium (Cd) and lead (Pb) in contaminated tailings. *Chemistry and Ecology*, *39*(5), 484–505. https://doi.org/10.1080/02757540.2023.2202659

Xu, Y., Shu, G., Liu, Z., Wang, Z., Lei, H., Zheng, Q., Kang, H. and Chen, L. (2024). Preliminary study on screening and genetic characterization of lactic acid bacteria strains with cadmium, lead, and chromium removal potentials. *Fermentation, 10*(1), 41. https://doi.org/10.3390/fermentation10010041

Yang, S.-H., Chen, S.-T., Liang, C., Shi, Y.-H., & Chen, Q.-S. (2022). Effects of Cadmium Exposure on Leydig Cells and Blood Vessels in Mouse Testis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(4), 2416. https://doi.org/10.3390/ijerph19042416

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, *13*(1), 134. https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134

Yu, G. (2024). Thirteen years of clusterProfiler. *The Innovation*, *5*(6). https://doi.org/10.1016/j.xinn.2024.100722

Yun, J. J., Heisler, L. E., Hwang, I. I. L., Wilkins, O., Lau, S. K., Hyrcza, M., Jayabalasingham, B., Jin, J., McLaurin, J., Tsao, M.-S., & Der, S. D. (2006). Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, *34*(12), e85. https://doi.org/10.1093/nar/gkl400

Zhang, B., Pan, N., Fan, X., Lu, L., & Wang, X. (2021). Real-time effects of Cd(Ⅱ) on the cellular membrane permeability. *The Analyst*, *146*(19), 5973–5979. https://doi.org/10.1039/D1AN00827G

Zhang, Y., Chen, S., Hao, X., Su, J.Q., Xue, X., Yan, Y., Zhu, Y.G. and Ye, J. (2016). Transcriptomic analysis reveals adaptive responses of an Enterobacteriaceae strain LSJC7 to arsenic exposure. Frontiers in microbiology, 7, 636. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00636

Zhao, D., Wang, P., & Zhao, F.-J. (2023). Dietary cadmium exposure, risks to human health and mitigation strategies. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *53*(8), 939–963. https://doi.org/10.1080/10643389.2022.2099192

Zheng, C., Zhai, Y., Qiu, J., Wang, M., Xu, Z., Chen, X., Zhou, X., & Jiao, X. (2024). ZntA maintains zinc and cadmium homeostasis and promotes oxidative stress resistance and virulence in Vibrio parahaemolyticus. *Gut Microbes*, *16*(1), 2327377. https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2327377

Zhu, J., Huang, Q., Peng, X., Zhou, X., Gao, S., Li, Y., Luo, X., Zhao, Y., Rensing, C., Su, J., & Cai, P. (2022). MRG chip: a high-throughput qPCR-based tool for assessment of the heavy metal (loid) resistome. *Environmental Science & Technology*, *56*(15), 10656-10667. https://doi.org/10.1021/acs.est.2c00488

Zhu, G., Tan, W., Xie, L., Ma, C., Chen, X., Zhang, S., & Wei, Y. (2022). Mechanisms underlying the inhibitory effects of Cd2+ on prodigiosin synthesis in Serratia marcescens KMR-3. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *236*, 111978. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.111978

Zhu, G., Xie, L., Tan, W., Ma, C., & Wei, Y. (2022). Cd2+ tolerance and removal mechanisms of Serratia marcescens KMR-3. *Journal of Biotechnology*, *359*, 65–74. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.09.019