



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE  
PATÓGENOS PRESENTES EN AGUA RESIDUAL  
EN EL RÍO NEXAPA”**

**"ISOLATION AND IDENTIFICATION OF  
PATHOGENS PRESENT IN WASTEWATER IN THE  
NEXAPA RIVER"**

Tesis que para obtener el título de

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

**OMAR VÁSQUEZ JIMÉNEZ**

DIRECTOR:

**NORMA ELENA ROJAS RUIZ**

COORDIRECTOR:

**LUIS RAMIRO CASO VARGAS**

AGOSTO 2024



## AGRADECIMIENTOS

En esta página quiero agradecer a las personas que con su apoyo y esfuerzo hicieron posible la realización de este proyecto de investigación. Personas que se han mostrado resilientes, empáticas y me han dado un brazo del cuál sujetarme en aquellas tribulaciones que arribaron mientras llevaba a cabo cada aspecto de esta tesis.

En primer lugar, agradezco a los profesores que me dieron el conocimiento necesario y despertaron en mí la pasión por la investigación, Dr. Carlos, Dr. Eduardo, Dra. Abigail y Dr. Antonino, sin su ayuda no podría haber empezado este largo camino y agradezco enormemente que en todo momento estuvieron dispuestos a ayudarme y aclarar dudas impedían mis avances.

Quiero dedicar unas palabras especiales para mi asesora, la Doctora Norma Elena, pues ella fue quién me motivó y apoyó en la conclusión de este proyecto, fue en el momento aquél en el que pensé en rendirme que ella me hizo ver el norte y me apoyó a pesar de las dificultades, nunca olvidaré su nobleza y entereza.

A las personas que hicieron mi estancia en la universidad y me aconsejaron en este proyecto también les dedico este agradecimiento, Luis, Noel, Josué, Yasiel, Gabriela, Andrea, Christina y Juan, son muy grandes amigos que tuve la fortuna de conocer y sé que me ven como una persona que siempre avanza, pero sólo me fue posible avanzar porque ustedes estuvieron a mi lado.

A mi familia, les dedico estas páginas y espero que al leer por esta investigación vean su influencia y crianza plasmadas, mis tías Victoria, Teresa, mis hermanos Ladislao, Eddie, Sofía y Aldair, espero de todo corazón enorgullecerlos.

Finalmente quiero agradecer a las dos mujeres más importantes de mi vida, a mi madre, que me dio la vida y un motivo para esforzarme día con día, pasamos momentos muy difíciles pero sólo te doblaste para orar y esa enseñanza me ha acompañado siempre, nunca te olvido madre y tus consejos me acompañan diariamente, quiero volverme en un adulto que pueda apoyarte como tú me apoyaste toda la vida, por último pero no menos importante la mujer que me acompaña, que cuida de mí y de quien yo cuido, me refiero a Brenda, mi esposa y compañera de aventuras, eres la persona que me acompañó en mis puntos más bajos, nunca me dejaste rendirme con este proyecto y tengo la certeza que sin tu apoyo, esta investigación no se habría podido completar, quiero dedicar estas últimas palabras para preguntarte nuevamente ¿Me acompañarás hasta el fin del mundo?

A todas las personas que hicieron este proyecto realidad les agradezco y espero que esta investigación cumpla con sus expectativas.

**Atentamente: Omar, hijo de Ladislao y Minerva.**

# CONTENIDO

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 Importancia del agua	1
1.2 Contaminación del agua	1
1.3 Géneros bacterianos patógenos de interés presentes en agua	3
1.3.1 Género <i>Salmonella</i>	3
1.3.2 Género <i>Shigella</i>	6
1.3.3 Género <i>Vibrio</i> y <i>Vibrio cholerae</i>	8
1.4 El problema de la resistencia a los antimicrobianos: Grupo ESKAPE	9
1.5 Antibióticos	14
1.5.1 Grupos de antibióticos	14
1.5.2 Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos.	21
1.5.2.1 Principales mecanismos de resistencia en bacterias a los betalactámicos	22
1.5.2.2 Mecanismos de resistencia a los glucopéptidos	23
1.5.2.3 Mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos	23
1.5.2.4 Mecanismos de resistencia a los nitrofuranos	23
1.5.2.5 Mecanismos de resistencia a las quinolonas	24
1.5.2.6 Mecanismos de resistencia a Sulfamidas	24
1.6 Métodos de identificación bacteriana	24
<b>2. OBJETIVOS.</b>	27
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	28
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	29
4.1 Zona de estudio.	29
4.2 Toma de muestras.	30
4.3 Medios de cultivo selectivos.	31
4.4 Condiciones nutricionales empleadas para el aislamiento de microorganismos patógenos de interés	31
4.4.1 Medios de cultivo selectivos	32
4.5 Aislamiento de microorganismos de interés en muestras de agua residual	33
4.6 Conservación de cepas por ultracongelación	34
4.7 Pruebas de resistencia a antibióticos	34
4.8 Análisis estadístico	36
<b>5. RESULTADOS.</b>	37
5.1 Características fisicoquímicas del agua en los sitios de muestreo	37
5.1.1 Análisis fisicoquímico del agua en el primer muestreo	39
5.1.2 Análisis fisicoquímico del agua en el segundo muestreo	39
5.1.3 Análisis fisicoquímico del agua en el tercer muestreo	40
5.2 Determinación de microorganismos presentes en tres muestreos independientes de agua	41
5.2.1 Determinación de microorganismos en el primer muestreo	45
5.2.2 Determinación de microorganismos en el segundo muestreo	46
5.2.3 Determinación de microorganismos en el tercer muestreo	48
5.3 Selección de cepas de microorganismos patógenos de interés	49
5.4 Pruebas de resistencia a antibióticos	53
5.5 Análisis estadístico	58
5.5.1 Prueba de muestras pareadas para el medio agar SS	61
5.5.2 Prueba de muestras pareadas para Agar EMB	62

5.5.3 Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas para Agar TCBS	64
<b>6. DISCUSIÓN.</b>	69
<b>7. CONCLUSIÓN.</b>	73
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.</b>	74

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Prevalencia de fiebre tifoidea en México durante el periodo de 2005 a 2022.	5
<b>Figura 2.</b> Prevalencia de fiebre paratifoidea y otras salmonelosis en México durante el periodo de 2005 a 2022.	5
<b>Figura 3.</b> Visualización de la toxina shiga (subunidades A y B).	7
<b>Figura 4.</b> Clasificación general de los principales serogrupos de <i>Vibrio cholerae</i> .	9
<b>Figura 5.</b> Clasificación de aminoglucósidos.	17
<b>Figura 6.</b> Red hidrográfica de la subcuenca RH18Ae, correspondiente al Río Nexapa en escala 1:50 000	29
<b>Figura 7.</b> Comparación de la carga bacteriana obtenida en el primer muestreo en dos condiciones nutricionales.	45
<b>Figura 8.</b> Comparación de la carga bacteriana obtenida en el segundo muestreo en tres condiciones nutricionales.	47
<b>Figura 9.</b> Comparación de la carga bacteriana obtenida en el segundo muestreo en tres condiciones nutricionales.	49
<b>Figura 10.</b> Aislamiento de colonias con morfología correspondiente a <i>Salmonella</i> spp	51
<b>Figura 11.</b> Aislamiento de morfologías coloniales correspondientes a <i>E. coli</i> en agar EMB.	52
<b>Figura 12.</b> Aislamiento de morfologías coloniales correspondientes a <i>Vibrio cholerae</i> en agar TCBS.	53
<b>Figura 13.</b> Número de cepas resistentes, con sensibilidad intermedia y sensible para cada antimicrobiano probado.	58
<b>Figura 14.</b> Prueba de Tukey para las condiciones nutricionales probadas.	67
<b>Figura 15.</b> Gráfica de las funciones quantile de los medios de cultivo probados.	67
<b>Figura 16.</b> Media y desviación estándar para las condiciones nutricionales probadas.	68

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Patologías más comunes relacionadas a bacterias del grupo ESKAPE.	11
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de quinolonas.	18
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de los Anfenicoles.	19
<b>Tabla 4.</b> Coordenadas de los sitios de muestreo en el río Nexapa	30
<b>Tabla 5.</b> Medios de cultivo empleados en el desarrollo experimental.	31
<b>Tabla 6.</b> Morfología colonial aislada en cada medio de cultivo	34
<b>Tabla 7.</b> Concentraciones de los antibióticos probados.	35
<b>Tabla 8.</b> Características fisicoquímicas del agua muestreada en los tres periodos de muestreo.	38
<b>Tabla 9.</b> Cuenta Viable de microorganismos (UFC•mL <sup>-1</sup> ) en logaritmo base de 10, desviación estándar y coeficiente de variación en los medios Agar SS, Agar EMB y Agar TCBS.	43
<b>Tabla 10.</b> Cuenta Viable de microorganismos (UFC•mL <sup>-1</sup> ) en logaritmo base de 10, desviación estándar y coeficiente de por cada morfología presuntiva.	44
<b>Tabla 11.</b> Morfologías coloniales de interés aisladas en cada medio de cultivo.	50
<b>Tabla 12.</b> Morfologías coloniales de interés aisladas en cada medio de cultivo.	54
<b>Tabla 13.</b> Prueba de resistencia a antimicrobianos en las cepas aisladas	57
<b>Tabla 14.</b> Prueba de Shapiro-Wilk en muestras procesadas en Agar SS	59
<b>Tabla 15.</b> Prueba de Shapiro-Wilk en muestras procesadas en Agar EMB	59
<b>Tabla 16.</b> Prueba de Shapiro-Wilk en muestras procesadas en Agar TCBS	60
<b>Tabla 17.</b> Prueba de muestras emparejadas en medio Agar SS	62
<b>Tabla 18.</b> Prueba de muestras emparejadas en muestras procesadas en Agar EMB	63
<b>Tabla 19.</b> Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas Log <sub>10</sub> UFC•mL <sup>-1</sup> (M1) - Log <sub>10</sub> UFC•mL <sup>-1</sup> (M2) en Agar TCBS	65
<b>Tabla 20.</b> Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas Log <sub>10</sub> UFC•mL <sup>-1</sup> (M2) - Log <sub>10</sub> UFC•mL <sup>-1</sup> (M3) en Agar TCBS	66
<b>Tabla 21.</b> Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas Log <sub>10</sub> UFC•mL <sup>-1</sup> (M1) - Log <sub>10</sub> UFC•mL <sup>-1</sup> (M3) en Agar TCBS	66

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico  
β-láctamicos: betalactámicos  
Agar EMB: *Eosin Methylene Blue* agar/ Agar Eosina y Azul de Metileno  
Agar SS: Agar Salmonella Shigella  
Agar TCBS: Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa  
AK: Amikacina  
D-Alanil-D-Alanina: Dextrógiro-Alanil-Dextrógiro-Alanina  
AM: Ampicilina  
ARN: Ácido ribonucleico  
ATP: Adenosín Trifosfato o Trifosfato de Adenosina  
°C: Grados celsius  
Caldo LB: Caldo Luria Bertani  
CAP: *College of American Pathologists / Colegio de Patólogos Americanos*  
CB: Carbencilina  
CDC: *Centers for Disease Control and Prevention / Centro para el Control y Prevención de Enfermedades*  
CF: Cefalotina  
CFX: Cefotaxima  
CL: Cloranfenicol  
CLSI: *Clinical & Laboratory Standards Institute / Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio*  
CMI: Concentración Mínima Inhibitoria  
CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono  
*E. coli: Escherichia coli*  
CONAGUA: Comisión Nacional del Agua  
CPF: Ciprofloxacino  
D-glucosa: Glucosa dextrorrotatoria  
DBO: Demanda Bioquímica de Oxígeno  
DGE: Dirección General de Epidemiología  
EFSA: *European Food Safety Authority / Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria*  
ESKAPE: *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa y Enterobacter*  
FF: Florfenicol  
g: gramo  
GE: Gentamicina  
ICUAP-BUAP: Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla  
INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía  
*lpaB: Type 3 secretion system translocon protein / Proteína translocón del sistema de secreción tipo 3*  
*lpaC: Type 3 secretion system translocon protein / Proteína translocón del sistema de secreción tipo 3*  
Latitud N: Latitud Norte

Log10: Logaritmo base 10  
 Longitud O: Longitud Oeste  
 LY333328: *Oritavancin* / Oritavancina  
 MALDI-TOF: Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight / La desorción/ionización láser asistida por matriz de absorción de energía láser para crear iones  
 mg/L: miligramo por litro  
 µg: microgramo  
 µg/mL: microgramo/ mililitro  
 mL: mililitro  
 µL: microlitro  
 mm: milímetro  
 µS/cm: microSiemens por centímetro  
 N<sub>2</sub>: nitrógeno molecular o dinitrógeno  
 NET: Netilmicina  
 NF: Nitrofurantoína  
 NfsA: Nitro/quinona reductasa dependiente de Nicotiamida-Adenina dinucleótido fosfato  
 NfsB: Nitroreductasa dependiente de Nicotiamida-Adenina dinucleótido fosfato  
 NGS: Secuenciación de Próxima Generación  
 NMP: Número más probable  
 NMP/mL: Número más probable por mililitro  
 NMX: Normas Mexicanas  
 NOF: Norfloxacino  
 NOM: Normas Oficiales Mexicanas  
 O<sub>2</sub>: Dioxígeno, oxígeno molecular, oxígeno diatómico u oxígeno gaseoso  
 OMS: Organización Mundial de la Salud  
 Opp: Oligopéptido permeasa  
 OPS: Organización Panamericana de la Salud  
 OqxAB: Transportador de membrana de bomba de eflujo de quinolona y olaquindox  
*L-Ornitina: Levógiro-Ornitina*  
 PABA: Ácido P-aminobenzoico, Ácido paraaminobenzoico  
 PBP: *Penicilin-Binding-Protein* / Proteínas ligadas a penicilina  
 PCR: *Polymerase chain reaction* / Reacción en Cadena de la Polimerasa  
 pH: Potencial de Hidrógeno  
*S. pneumoniae: Streptococcus pneumoniae*  
 RND: Resistencia-Nodulación-División  
 rpm: revolución por minuto  
*S. dysenteriae: Shigella dysenteriae*  
*S. flexneri: Shigella flexneri*  
*S. sonnei: Shigella sonnei*  
*Salmonella spp.:* Especies de *Salmonella*  
 SEDUE: Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología  
 SEMARNAT: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales de México  
*Shigella spp.:* Especies de *Shigella*  
 SINA: Sistema Nacional de Información del Agua

Spp.: Es la sigla en plural de especies  
STX: Sulfametoxazol/Trimetroprim  
TAP: Tlanfenicol  
UFC: Unidad Formadora de Colonias  
UFC/mL: Unidades Formadoras de Colonias/mililitro  
*V. alginolyticus*: *Vibrio alginolyticus*  
*V. carchariae*: *Vibrio carchariae*  
*V. cincinnatiensis*: *Vibrio cincinnatiensis*  
*V. damsela*: *Vibrio damsela*  
*V. fluviales*: *Vibrio fluviales*  
*V. furnisii*: *Vibrio furnisii*  
*V. hollisae*: *Vibrio hollisae*  
*V. metschnikovii*: *Vibrio metschnikovii*  
*V. mimicus*: *Vibrio mimicus*  
*V. parahaemolyticus*: *Vibrio parahaemolyticus*  
*V. vulnificus*: *Vibrio vulnificus*  
*V. cholerae*: *Vibrio cholerae*  
VanA: D-alanine--(R)-lactate ligase  
VanB: D-alanine--(R)-lactate ligase  
VanC: D-alanine--D-serine ligase  
VanD: D-alanine--(R)-lactate ligase  
VanE: D-alanine--D-serine ligase  
VanG: D-alanine--D-serine ligase

## RESUMEN

En el año 2017 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó un listado de bacterias patógenas multiresistentes contra las cuales se requiere encontrar antibióticos eficaces. En ella se encuentran 12 familias bacterianas clasificadas en prioridades crítica, elevada y media incluyendo bacterias del grupo ESKAPE, el cual está integrado por: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp*, todas ellas de importancia médica. En los nosocomios estas bacterias son los principales agentes causales de infecciones que pueden conducir a la muerte en los pacientes inmunocomprometidos. Las bacterias del grupo ESKAPE son capaces de desarrollarse en diversos ecosistemas; se han aislado de agua, aire y suelo. En México e internacionalmente, la presencia de *Escherichia coli* (*E. coli*) y las denominadas coliformes totales, son empleados como indicadores biológicos de contaminación fecal, por lo que se utilizan para evaluar la calidad del agua de acuerdo con los límites establecidos en la normatividad. En este trabajo se determinaron los niveles de contaminación bacteriana, así como parámetros fisicoquímicos de aguas superficiales provenientes de una sección de la subcuenca del Nexapa que recorre la Mixteca poblana. Se efectuaron tres muestreos en siete puntos a lo largo de la ribera del río en los cuales se cuantificó el crecimiento de microorganismos en los agares SS, EMB y TCBS con el fin de aislar e identificar *Salmonella* y *Shigella*, *E. coli* y *V. cholerae*, respectivamente. Algunos aislados bacterianos se seleccionaron para determinar su perfil de resistencia a antimicrobianos. Además, fueron medidos la temperatura, el pH, la conductividad, la DBO y el OD. Los datos obtenidos de la cuantificación de los microorganismos fueron analizados estadísticamente, para determinar la diferencia significativa entre las condiciones nutricionales empleadas. Los resultados indicaron la presencia de las siguientes bacterias: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* y los géneros *Salmonella spp* y *Shigella spp*. Se encontraron diferencias significativas en la cantidad de microorganismos aislados en el medio TCBS con respecto al Agar SS y Agar EMB.

## ABSTRACT

In 2017, the World Health Organization (WHO) published a list of multidrug-resistant pathogenic bacteria against which effective antibiotics must be found. It contains 12 families of bacteria that are classified as critical, high and medium priorities, including bacteria from the ESKAPE group, which is made up of *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter spp*, all of which are of medical importance. In hospitals, these bacteria are the main cause of infections that can lead to death, especially in immunocompromised patients. In addition, the members of the ESKAPE group can thrive in different ecosystems; they have been isolated from water, air and soil. In Mexico and internationally, the presence of *Escherichia coli* (*E. coli*) and the so-called total coliform bacteria are used as biological indicators of fecal contamination, which is why they are used to evaluate water quality according to the limits established in regulations. In this work, the degree of bacterial contamination and the physico-chemical parameters of the surface water of a section of the Nexapa sub-basin, which runs through the Mixteca poblana, were determined. Three samples were collected at seven sites along the riverbank to quantify the growth of microorganisms on SS, EMB and TCBS agars to isolate and identify *Salmonella* and *Shigella*, *E. coli* and *V. cholerae*, respectively. Some bacterial isolates were further selected for the determination of their antimicrobial resistance profile. In addition, temperature, pH, conductivity, BOD and DO were measured. The data obtained from the quantification of the microorganisms were statistically analyzed to determine the significant difference between the nutritional conditions used. The results showed the presence of the following bacteria: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* and the genera *Salmonella* spp and *Shigella* spp. Significant differences were found in microbial counts isolated on the TCBS medium compared to SS agar and EMB agar.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Importancia del agua

La CONAGUA define al agua como un recurso natural renovable que, aunque puede obtenerse mediante procesos naturales, parte de esta se deposita en acuíferos con largos periodos de renovación, por lo que se puede considerar que no es un recurso renovable (CONAGUA, 2021).

De los 1,386 millones de kilómetros cúbicos de agua presente en el planeta, solamente 35 millones son de agua dulce, lo que representa el 2.5% del total del agua, del cual sólo aproximadamente el 30% está disponible para el consumo humano, ya que el resto se encuentra en forma de nieve, hielo o glaciares o se encuentra en acuíferos inaccesibles (Clarke & King, 2004).

En 2020 el Sistema Nacional de Información del Agua (SINA) reportó un total de volúmenes concesionados de 89,600 hectómetros cúbicos, distribuidos en un 76% para uso agrícola, ganadería y acuacultura, 15% para el abastecimiento público, 5% para la industria autoabastecida (la que toma el agua directamente de los ríos) y 4% para termoeléctricas (excluyendo hidroelectricidad) (IMCO, 2023).

La destrucción de fuentes naturales de agua, el crecimiento poblacional e industrial, la distribución inequitativa de este recurso, contaminación del agua y la extracción insostenible de la misma de diversos cuerpos de agua como lo son los ríos y lagos son las principales razones que llevan a la escasez de agua en ciertos países (Liu, *et al.*, 2017).

## 1.2 Contaminación del agua

Schweitzer y Noblet definen la contaminación del agua como la presencia de componentes o factores químicos, físicos o biológicos que causan condiciones de deterioro en los cuerpos de agua e impiden su uso para fines benéficos (Schweitzer y Noblet, 2018).

Los orígenes de la contaminación pueden venir de fuentes puntuales o no puntuales. Las fuentes puntuales son aquellas que se pueden ubicar en sitios específicos e inamovibles, como lo son las plantas de tratamiento de aguas residuales, fábricas, plantas de energía, minas, refinerías, etc. En el caso de las fuentes no puntuales son aquellas que aportan contaminantes al agua y que están distribuidas en una amplia zona geográfica y que no se pueden ubicar en un sitio específico, por ejemplo, las escorrentías de aguas agrícolas o pluviales (Yang *et al.*, 2010).

La contaminación se puede presentar de manera natural, por deslaves, erupciones volcánicas o caída de hojas por temporada, pero en su mayoría es influenciada por la actividad antropogénica.

Las aguas residuales son aguas caracterizadas por su composición variada, resultante de descargas provenientes de diversos usos como municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, y también incluyen aquellas originadas en fraccionamientos y otros usos específicos. Se trata de una amalgama de líquidos que, tras su utilización, presentan una diversidad de contaminantes, los cuales pueden incluir materia orgánica, sustancias químicas, microorganismos patógenos, entre otros elementos (Romero *et al.*, 2009).

Las aguas residuales son una reserva importante de microorganismos resistentes a antimicrobianos, ya que en ellas hay bacterias resistentes de origen humano (por ejemplo, residuos hospitalarios), animales (emisiones ganaderas) o residuos agrícolas. Los antimicrobianos residuales presentes en estas aguas pueden contribuir al desarrollo y propagación de microorganismos multidrogorresistentes al generar presión selectiva en las bacterias, aunque esto sigue siendo investigado (World Health Organization, 2017).

De acuerdo con los datos de la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) en México durante 2020 sólo el 12% del agua residual fue tratada (CONAGUA, 2021).

Es necesario implementar medidas integrales para la gestión de aguas residuales, que incluyan desde la prevención y reducción de la generación de contaminantes hasta la implementación de sistemas de tratamiento y disposición final adecuada (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2015).

En México la NOM-001-SEMARNAT-2021 establece los límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores propiedad de la nación. Con respecto a la presencia y límites permisibles de microorganismos en este documento se establece un límite permisible para *E. coli* en aguas residuales tratadas de 250 NMP/100 mL como promedio mensual, 500 NMP/100 mL como promedio diario y 600 NMP/100 mL para el valor inmediato en ríos, arroyos, canales y drenes (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2021)

Los microorganismos son componentes clave en el estudio de la calidad del agua, incluyendo las aguas residuales. Algunos de los microorganismos patógenos son agentes causales de infecciones y pueden ser transmitidos a través del agua. Ejemplo de estos microorganismos patógenos son: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Giardia* spp., y *Cryptosporidium* spp., entre otros (Cázares & Alcántara, 2014).

Las regulaciones y normativas en México respecto a la presencia de los microorganismos patógenos en aguas residuales se encuentran en constante actualización y ajuste de acuerdo con las necesidades y avances en la investigación científica.

### **1.3 Géneros bacterianos patógenos de interés presentes en agua**

#### **1.3.1 Género *Salmonella***

Son microorganismos Gram negativos de la familia *Enterobacteriaceae*, integrada por una sola especie, son anaerobios facultativos, no esporulados. Existen dos especies, *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, la segunda es considerada como una de las principales bacterias patógenas y consta de varias subespecies, cada subespecie se divide en serotipos de acuerdo con el tipo de antígeno, puede ser H (flagelar) u O (somático), el antígeno H se conforma por la proteína más abundante del flagelo, mientras que el antígeno O está conformado por una cadena repetida de polisacáridos que forma parte del lipopolisacárido (Brenner 2000, Popa & Papa, 2021). Son generalmente móviles por flagelos peritricos, utilizan citrato como única fuente de carbono y poseen metabolismo de tipo oxidativo y

fermentativo. Se han descrito más de 2,500 serotipos de *Salmonella*, basándose en la identidad de su genoma (Judd *et al.*, 2019, Fernádes *et al.*, 2022). La mayoría de los serotipos de *Salmonella* crecen en un rango de temperatura que va desde 5°C a 47°C, con una temperatura óptima entre 35°C a 37°C, algunas pueden llegar a crecer a 2°C o 4°C y hasta 54°C. El pH de crecimiento oscila entre 4 a 9 con un óptimo entre 6.5 y 7.5 (Gonzalez & Alós, 2014).

Existen dos variedades de importancia clínica de *Salmonella enterica* serovar Typhy, la cual es causante de la fiebre tifoidea y *Salmonella enterica* no tiphy la cual causa sintomatología propia de la gastroenteritis como es la diarrea, en pacientes inmunocomprometidos, puede causar salmonelosis invasiva (Rice, 2008).

*Salmonella* se reconoce mundialmente como el principal agente etiológico de enfermedades transmitidas por agua y alimentos, el Centro para el control y prevención de enfermedades de los Estados Unidos (CDC) y la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA) reportan anualmente más de 1,000,000 y 100,000 infecciones por *Salmonella* no tifoidea respectivamente (CDC-FDA, 2018; EFSA, 2019). En México la Dirección General de Epidemiología (DGE) reportó para 2022 14,404 casos de fiebre tifoidea y 52,382 casos de fiebre paratifoidea y otras salmonelosis a nivel nacional (DGE, 2023). En las figuras 1 y 2 se muestra la prevalencia de estas enfermedades durante el periodo 2005-2022, se puede observar que el mayor número de casos para la fiebre tifoidea se presentó en el año 2012 (Figura 1).

Para el caso de la prevalencia de la fiebre paratifoidea y otras salmonelosis el año con mayor número de casos fue el 2010 (Figura 2).



**Figura 1.** Prevalencia de fiebre tifoidea en México durante el periodo de 2005 a 2022.

Elaboración propia con información de la Dirección General de Epidemiología (DGE) en Anuarios de Morbilidad 1984-2022.



**Figura 2.** Prevalencia de fiebre paratifoidea y otras salmonelosis en México durante el periodo de 2005 a 2022.

Elaboración propia con información de la Dirección General de Epidemiología (DGE) en Anuarios de Morbilidad 1984-2022.

Las bacterias del género *Salmonella* son resistentes a factores ambientales y muestran un factor estacional, presentándose con mayor frecuencia cuando existen temperatura y precipitaciones elevadas en mayor medida cuando concurren temperaturas y precipitaciones elevadas (lluvias, tormentas o monzones), siendo el caso de regiones tropicales o subtropicales (Simental & Martínez-Urtaza, 2008).

### **1.3.2 Género *Shigella***

El género *Shigella* está formado por bacilos Gram negativos inmóviles, anaerobios facultativos no esporulados, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Se observa una actividad bioquímica reducida, en conjunto, una actividad citocromo-oxidasa negativa, además de una fermentación de glucosa sin producción de gas (Anselmo *et al.*, 2020). El género *Shigella* se puede dividir en cuatro subgrupos, A, B, C y D, correspondiendo a *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei* respectivamente. Los subgéneros se tienen 54 serotipos que se diferencian entre sí por sus características bioquímicas (como fermentación del D-manitol y producción de indol) y estructura antigénica (como el antígeno O de la capa de lipopolisacáridos en la superficie celular bacteriana) (Halimeh *et al.*, 2021). Más del 75% de las infecciones en países industrializados se atribuyen a *S. sonnei*, por otra parte, *S. flexneri* es el subgrupo predominante en Asia, África y Sudamérica, se ha reportado que los cuadros más severos de shigelosis se producen por *S. dysenteriae* del serotipo 1, endémica y epidémica de la India (González & Alós, 2015).

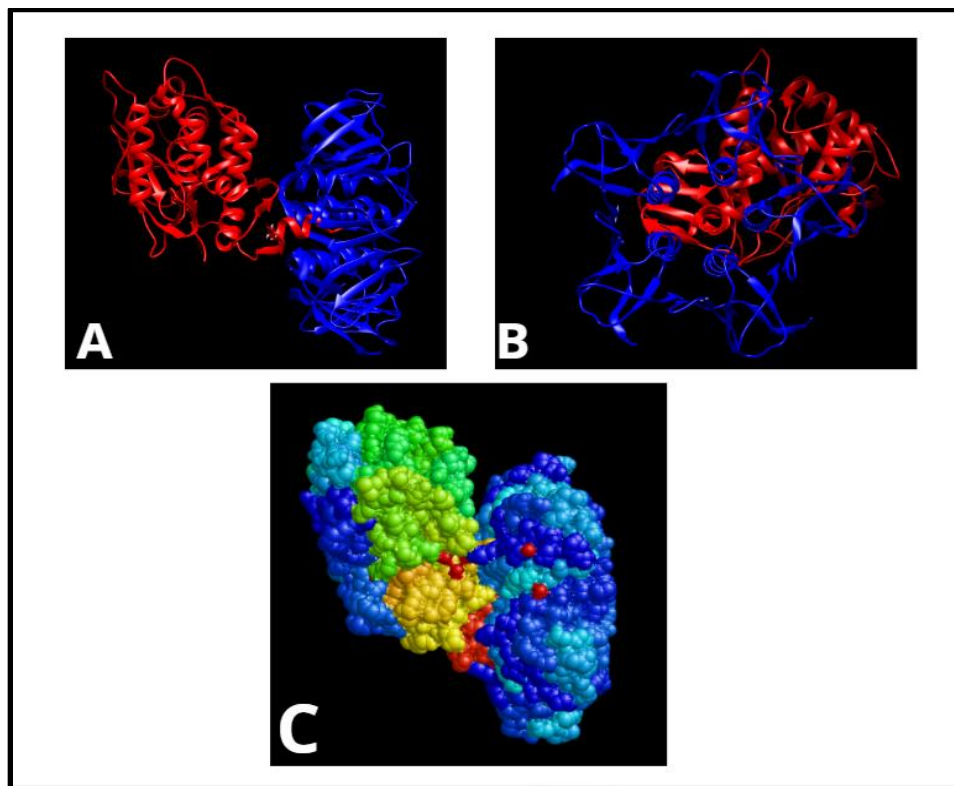
La patogenicidad de *Shigella* está asociada a su habilidad para invadir y colonizar el epitelio intestinal humano mediante factores de virulencia, causando invasión de las células del epitelio, evasión del fagosoma y apoptosis en los macrófagos. Es considerado el enteropatógeno bacteriano más transmisible asociados al consumo de agua o alimentos contaminados (Guzman, *et al.*, 2013).

La dosis infectiva es muy baja, ya que se necesitan menos de 100 microorganismos viables para producir la enfermedad, lo que facilita la diseminación en ausencia de medidas adecuadas de control (falta de cocción en cárnicos, consumo de lácteos sin pasteurizar, falta de higiene en establecimientos alimentarios, etc.), en fase

aguda la excreción fecal es máxima, se ha reportado que esta bacteria puede permanecer viable hasta 5 meses en superficies inanimadas (Kramer *et al.*, 2006). Esta bacteria forma poros a través de la membrana de las células del epitelio intestinal, permitiendo la penetración de la bacteria al citoplasma del enterocito, luego se multiplican e infectan células adyacentes a través de protrusiones, sin tomar contacto con el medio extracelular, destruyendo las células del huésped (Blair *et al.*, 2015).

La toxina Shiga es una de las toxinas bacterianas más potentes que se conocen, está presente en *S. dysenteriae* y algunos serotipos de *E. coli*, esta proteína cuenta con dos subunidades principales, una subunidad A unida no covalentemente a un pentámero de cinco subunidades B idénticas (Melton, 2014). La subunidad A daña el ribosoma de la célula eucariota y detiene la síntesis proteica en las células epiteliales, mientras que el pentámero B se une al receptor celular, globotriaosilceramida, que se encuentra principalmente en células endoteliales, aunque existen otros receptores (Di, *et al.*, 2011).

En la Figura 3 se muestran las subunidades A y B que conforman a la toxina Shiga.



**Figura 3.** Visualización de la toxina shiga (subunidades A y B).

A) Estructura de la toxina shiga, en rojo la subunidad A, en azul se muestran las 5 subunidades B.

B) Visualización de las 5 subunidades B de frente.

C) Superficie molecular de la toxina.

Elaboración propia empleando el software Chimera 1.17.1.

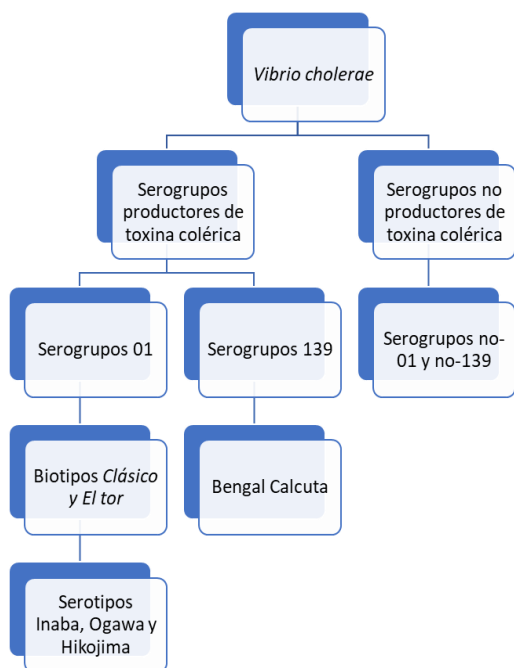
*Shigella* tiene una alta prevalencia a nivel mundial, la OMS ha reportado que existen 80 millones de casos anualmente y causa 700000 muertes (World Health Organization, 2022a).

### 1.3.3 Género *Vibrio* y *Vibrio cholerae*

Son bacterias Gram negativas del grupo de las "Gamma proteobacterias", que proliferan en los ambientes salados, por ejemplo, el agua de mar (Yoon & Waters, 2019). Comúnmente se encuentran en ambientes cálidos de mar y estuario. Aproximadamente una docena de especies de *Vibrio* pueden causar enfermedad en los seres humanos (Betancor *et al.*, 2006), como lo son *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. hollisae*, *V. cincinnatiensis*, *V. furnisii*, *V. damsela*, *V. metschnikovii* y *V. carchariae* (Ceccarelli *et al.*, 2019).

*Vibrio cholerae* pertenece a la familia *Vibrionaceae*. Es un bacilo curvo, Gram negativo, anaerobio facultativo y con capacidad de movimiento debido a la presencia de un flagelo polar. Su tamaño es de 1-3 micras ( $\mu\text{m}$ ) de largo por 0,5-0,8  $\mu\text{m}$  de ancho. Existen dos serogrupos capaces de producir cólera, el O1 y el O139 o *Bengala*, y estos serogrupos son productores de la enterotoxina colérica siendo los responsables de brotes epidémicos, y aquellos que no producen toxina colérica se encuentran presentes en casos aislados como enteritis (Baldauf *et al.*, 2015).

En la Figura 4 se muestran los principales serogrupos de *Vibrio cholerae*



**Figura 4.** Clasificación general de los principales serogrupos de *Vibrio cholerae*.  
Elaboración propia con información de Fernández *et al.*, 2009.

El serogrupo O1 presenta dos biotipos: el *Clásico* y *El Tor*, y cada uno de ellos posee 3 serotipos: *Inaba*, *Ogawa* y *Hikojima*; si bien este último es poco frecuente, aunque posee los determinantes antigénicos de los otros dos y, por su inestabilidad, acaba convirtiéndose en alguno de los otros serotipos. Otros serogrupos distintos al O1 y O139 pueden ser patógenos. Además, los serotipos que no producen la enterotoxina colérica también pueden causar enfermedades en humanos como enteritis (Farina, *et al.*, 2010).

#### 1.4 El problema de la resistencia antimicrobiana: Grupo ESKAPE

La resistencia de los microorganismos a los antibióticos representa un problema de salud a nivel mundial y complica la selección de tratamientos adecuados para las infecciones ocasionadas por estos microorganismos (Santos *et al.*, 2020). La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en el año 2017 una lista de microorganismos prioritarios resistentes a antibióticos (World Health Organization,

2017), en la cual se encuentran 12 familias de bacterias que son consideradas peligrosas para la salud humana y que son divididas en tres categorías de acuerdo a la necesidad del desarrollo de nuevos antibióticos para el tratamiento de las infecciones causadas por ellos y a su capacidad para ocasionar daño a la salud, por lo que se dividen en prioridad crítica, elevada y media (World Health Organization, 2017; Tacconelli et al., 2018).

El grupo ESKAPE, se encuentra en la categoría de prioridad crítica y está conformado por las bacterias *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp, las cuales son de importancia clínica debido a que son multiresistentes a antibióticos y pueden causar graves complicaciones en pacientes inmunocomprometidos, afectando principalmente a pacientes en el ambiente intrahospitalario que necesitan ventiladores o catéteres intravenosos (Rice et al., 2008; Tacconelli et al., 2018). En las categorías de prioridad elevada y media se encuentran bacterias cuya resistencia a los antibióticos sigue incrementando y que pueden ser adquiridos en la comunidad o por la ingesta de alimentos contaminados con los microorganismos, como es el caso de *Salmonella* spp y *Shigella* spp.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud la resistencia a los antimicrobianos ocurre cuando los microorganismos están expuestos a estos y sufren cambios adquiriendo resistencia a los antimicrobianos (World Health Organization, 2016).

La resistencia a los antimicrobianos hace que las infecciones comunes que amenazan la vida sean difíciles o imposibles de tratar, en la actualidad ha aumentado mundialmente y presentan consecuencias socioeconómicas y de salud pública importantes (Stover et al., 2000).

Se ha estimado que las bacterias resistentes a los antibióticos causan anualmente 700,000 muertes y se espera un incremento a 10 millones para el 2050 (O'Neill, 2014).

Algunas de las patologías que ocasionan las bacterias ESKAPE son: cistitis, pielonefritis, colitis asociada a antibióticos (*Enterococcus faecium*), foliculitis, abscesos, sinusitis, neumonía (*Staphylococcus aureus*), neumonía nosocomial,

pielonefritis, meningitis (*Klebsiella pneumoniae*), otitis externa, úlceras cutáneas, infección pulmonar crónica, queratitis (*Pseudomonas aeruginosa*), diarrea, fiebre tifoidea y paratifoidea (*Enterobacter* spp.) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Patologías más comunes relacionadas a bacterias del grupo ESKAPE.

Elaboración propia con información de Rose *et al.*, 2020; Barer *et al.*, 2018.

Patología	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterobacter</i> spp
Abscesos	-	X	X	X	X	-
Bacteremia	X	X	X	X	X	X
Celulitis infecciosa		X	-	X	X	X
Cistitis	-	X	X	X	X	X
Colitis	-	-	-	-	-	X
Diarrea infecciosa	X	-	-	-	-	X
Endocarditis	X	X	-	-	X	X
Fiebre tifoidea	-	-	-	-	-	X
Foliculitis	-	X	-	-	X	X
Meningitis	-	-	X	X	X	X
Neumonía	X	X	X	X	X	X
Otitis	-	X	X	-	X	X
Osteomielitis	-	X	-	-	-	X
Pielonefritis	X	X	X	X	X	X
Queratitis	-	-	-	-	X	X
Sinusitis	-	X	-	-	X	-

Úlceras  
cutáneas

X

X

X

X

X

X

---

“X” = Indican que la bacteria es uno de los causantes principales de la patología indicada.

“-” = No se relaciona esta bacteria con la patología indicada

Se ha reportado que las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella* spp han demostrado tener mayores niveles de resistencia a distintas generaciones de antibióticos, suponiendo así un riesgo para la salud de la población (Poirel *et al.*, 2018). Se considera que la administración indiscriminada de los antibióticos desde su desarrollo y empleo a principios del siglo XX ha sido contraproducente y ha contribuido al incremento de la multiresistencia a los antibióticos en bacterias (Calva, 2019, Chávez *et al.*, 2015). Se define a la multiresistencia como la ausencia de sensibilidad a un antibiótico de tres o más familias (Camacho, 2023).

Los mecanismos de resistencia que presentan las bacterias ante los antibióticos varían según la especie y son capaces de ser transmitidos a otras bacterias ya sea de forma horizontal o verticalmente a las siguientes generaciones:

1.- La transferencia horizontal de genes en bacterias es un proceso fundamental estudiado por su papel en la rápida evolución bacteriana y en la propagación de genes de interés clínico y biotecnológico, incluyendo los de resistencia a antibióticos y factores de virulencia. Este fenómeno permite la adquisición de nuevos genes en el genoma bacteriano a través de mecanismos diferentes como la transformación, la transducción y la conjugación (Thomas y Nielsen, 2005).

- a) La transformación es un proceso en el cual las bacterias adquieren genes del ambiente circundante a través de la toma activa de ADN del medio ambiente y su incorporación al genoma bacteriano (Kidane *et al.*, 2012). Experimentos realizados por Croucher y colaboradores en el año 2011 demostraron que la transformación de *S. pneumoniae* con fragmentos de ADN provenientes de cepas resistentes a antibióticos resultó en la adquisición de genes de resistencia en cepas sensibles, lo que evidencia la importancia de la

transformación en la propagación de genes de resistencia (Croucher *et al.*, 2011).

- b) La transducción es un mecanismo en bacterias que implica la transferencia de genes bacterianos a través de bacteriófagos. Los bacteriófagos pueden encontrarse en dos estados funcionales; siendo líticos aquellos que ingresan a la bacteria, se replican y ocasionan lisis celular o lisógenicos los que son capaces de recombinar su material genético con el de la bacteria, en este caso no ocurrirá lisis y el material genético recombinado será copiado y transmitido en cada replicación celular bacteriana y podrá conferir ciertas características como la resistencia a los antibióticos (Domínguez, 2020). Estos virus actúan como vectores para la transferencia de genes y pueden llevar genes de resistencia a antibióticos u otros genes que confieran ciertas capacidades (Chiang, 2019).
- c) La conjugación es un mecanismo basado en el intercambio unidireccional de información genética de una bacteria donante a una bacteria receptora por medio de un pili sexual e involucra el paso de moléculas de ADN circular extracromosómico llamadas plásmidos, que contienen genes adicionales implicados en la resistencia a antibióticos, los cuales se replicarán cada vez que la bacteria receptora se duplique (Bentacor *et al.*, 2006).

2.- Transferencia vertical de genes: Es el fenómeno en el cual se transmite la información genética parental a la progenie, los organismos procariontes se reproducen asexualmente mediante gemación o fisión binaria, debido a esto el cromosoma que se encuentra en las células hijas es idéntico al de las células madre y no se presenta variación genética (Parker *et al.*, 2016). Pese a no presentarse diferencia genética de la célula madre, las mutaciones, así como las modificaciones mediante elementos genéticos móviles y genes adquiridos mediante transferencia horizontal se heredan a la célula hija, lo que mantiene la variabilidad genética y les permite adaptarse de mejor manera a su entorno (Lorenzo-Díaz, *et al.*, 2017).

## 1.5 Antibióticos

Son moléculas naturales, sintéticas o semisintéticas capaces de inducir la muerte o la detención del crecimiento de bacterias y otros microorganismos (Mohr, 2016).

Para determinar si una bacteria es sensible o resistente a un antibiótico en particular es necesario determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI): se define como la concentración más baja (en  $\mu\text{g/mL}$ ) de un antibiótico que inhibe el crecimiento de una determinada cepa bacteriana (CLSI, 2017). Este parámetro sirve para interpretar antibiogramas, siguiendo las normas de interpretación establecidas por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés), reportándose si la cepa es Sensible, Intermedia o Resistente, seguido de la CMI en  $\mu\text{g/mL}$  (CLSI, 2017).

- Sensible: Se nombra así a los microorganismos cuyo crecimiento está inhibido por la concentración que el fármaco alcanza en sangre (concentración sérica) usando la dosis habitual.
- Intermedia: Significa que el crecimiento del microorganismo se ve inhibido solamente a la dosis máxima recomendada.
- Resistente: Son aquellos microorganismos que se muestran resistentes a los niveles séricos del fármaco que se alcanzan normalmente.

### 1.5.1 Grupos de antibióticos

Los antibióticos se pueden clasificar de diversas maneras, por su actividad se dividen en dos grupos (Patil, 2021):

- 1) Bacteriostáticos: Aquellos que impiden el desarrollo y la multiplicación de las bacterias sin llegar a destruir las células.
- 2) Bactericidas: Aquellos con efectos letales en sus mecanismos de acción, llevando a la lisis celular.

También se pueden clasificar por su mecanismo de acción y se describen a continuación.

- 1) **Betalactámicos:** Esta familia de antibióticos se define químicamente por presentar un anillo betalactámico, que consiste en un anillo heterocíclico conformado por tres átomos de carbono y un átomo de nitrógeno (Suárez *et al.*, 2008). Estos pueden formar asociaciones con otros grupos orgánicos como anillo secundario, lo que deriva en su clasificación estructural principal, este anillo determina su mecanismo de acción, también su escasa toxicidad directa y el principal mecanismo de resistencia de esta familia de antibióticos (Astocondor, 2018).

Estos antibióticos son bactericidas y producen su efecto principalmente mediante dos mecanismos: la inhibición de la síntesis de pared bacteriana y la inducción de autólisis bacteriana. El anillo betalactámico es capaz de unirse al sitio activo de las enzimas transpeptidasas que se encargan de la última fase en la síntesis de pared celular, debido a su similitud con el sustrato que es reconocido por las enzimas el cual es un pentapéptido, el resultado de esta unión es la inhibición de la síntesis de la pared celular, por esta capacidad de unión son conocidas como proteínas ligadas a penicilina o PBP (García y Navarro, 2006). Se ha reportado que la actividad de los betalactámicos se ve reducida en bacterias productoras de betalactamasas, (enzimas que inactivan los betalactámicos), que son comunes en ciertas bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* (Glen, 2021).

- 2) **Antibióticos de tipo Glucopéptidos:** Los glucopéptidos son moléculas de estructura química compleja, que cuentan con un heptapéptido como estructura central. Estos antibióticos actúan sobre la pared celular de las bacterias, inhibiendo la síntesis de peptidoglicano, se emplean principalmente en el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos Gram positivos (Butler *et al.*, 2014).

Esta familia se integra por la vancomicina, teicoplanina, avoparcina y en los últimos años se ha estudiado *in vitro* un nuevo antibiótico el LY333328 (Van Bambeke *et al.*, 2004).

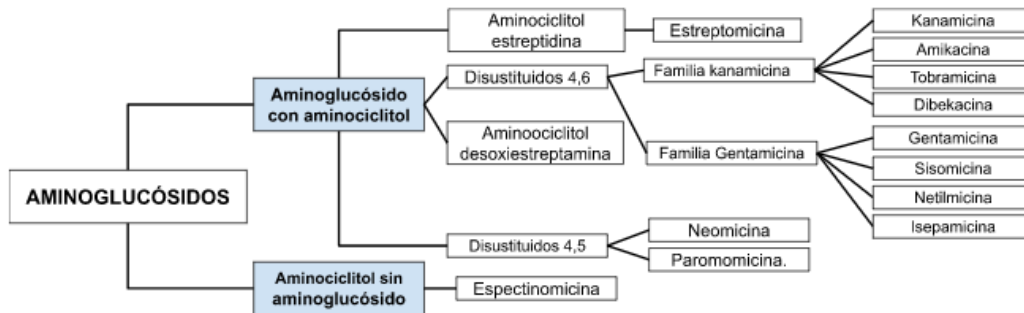
- Vancomicina: Es un antibiótico glucopéptido tricíclico que inhibe la síntesis de la pared celular en especies bacterianas sensibles, mediante la unión de elevada afinidad con el extremo D-Alanil-D-Alanina de las unidades precursoras de la pared celular, adicionalmente afecta la permeabilidad de la membrana celular bacteriana y la síntesis del ARN (Vandecasteele *et al.*, 2013). Se ha reportado resistencia cruzada sólo con la teicoplanina (Butler *et al.*, 2014).

Este antibiótico es efectivo contra diversas especies del género *Streptococcus* spp, *Staphylococcus aureus* productores y no productores de penicilinasas y *Enterococcus* spp. Otros microorganismos sensibles son: *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus* sp, *Actinomyces* sp, *Clostridium* sp, incluyendo *Clostridium difficile*, *Difteroides* y *Bacillus* sp (Marsot, 2012).

- Teicoplanina: Es un antibiótico glicopéptido parecido a la vancomicina, con un espectro de acción similar a esta, es activa contra *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina y es más efectiva frente a enterococos, con actividad bactericida en Gram positivos tanto aerobios como anaerobios, activa frente a estafilococos (incluidos los resistentes a meticilina y otros betalactámicos), estreptococos, enterococos, *Listeria monocytogenes*, micrococos, corinebacterias del grupo J/K y anaerobios Grampositivos, incluidos *Clostridium difficile* y *peptococcus* (Matsumoto, 2013).

3) Antibióticos de tipo Aminoglucósidos: Este grupo de antibióticos comprende a los bactericidas cuya estructura química está compuesta por aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un alcohol cíclico hexagonal con grupos amino (aminociclitol) (Pualomino y Pachón, 2003). Los aminoglucósidos se clasifican en dos grupos según el componente aminociclitol con el que cuentan, puede ser estreptidina o desoxiestreptamina como se muestra a continuación (Figura 5).

Los aminoglucósidos presentan actividad bactericida frente a bacilos aerobios Gram negativos, entre los que se encuentran Enterobacterias y bacilos no fermentadores, tales como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.



**Figura 5.** Clasificación de aminoglucósidos.

Elaboración propia con información de Alarcón, 2020; Garneau & Labby, 2016.

Los aminoglucósidos presentan actividad bactericida frente a bacilos aerobios Gram negativos, entre los que se encuentran Enterobacterias y bacilos no fermentadores, tales como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.

Estos antibióticos actúan uniéndose a la subunidad ribosomal 30s, por lo que inhiben la síntesis de proteínas bacterianas, si bien esta acción por sí sola los caracterizaría como bacteriostáticos, se les considera bactericidas porque aumentan la expresión del transportador oligo peptídico permeasa (opp), lo que genera un mayor gasto de ATP y conduce a la muerte celular (Krause *et al.*, 2016).

- 4) Antibióticos de tipo Nitrofuranos: Este es un grupo de antimicrobianos de origen sintético, derivan de un furano al cual se le ha añadido un compuesto nitro en su estructura, son activos contra parásitos, bacterias Gram positivas y Gram negativas, generalmente *Citrobacter* spp., Estreptococos de grupo B, Enterococos, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*,

*Klebsiella pneumoniae*, y *Enterobacter* spp. (Saxena *et al.*, 2023), ha mostrado ser activo frente a Enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido y enterococos resistentes a vancomicina (Tulara *et al.*, 2018), sin embargo, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Serratia*, *Acinetobacter*, y *Pseudomonas* spp son altamente resistentes a este antibiótico (Castañeda *et al.*, 2016).

Los mecanismos de acción son dos: el primero implica evitar la formación de acetyl-CoA a partir de piruvato, inhibiendo así el metabolismo de carbohidratos y el segundo es la formación de metabolitos intermedios a partir de la reducción enzimática de los nitrofuranos, dichos metabolitos originan la ruptura del ADN bacteriano (Martínez-Puchol, *et al*, 2020).

- 5) Antibióticos de tipo Quinolonas: Las quinolonas son un grupo de antibióticos sintéticos cuya estructura está formada por dos anillos, contando con un nitrógeno en la posición 1, un grupo carbonilo en la posición 4 y con un grupo carboxilo en la posición 3 (Pham *et al.*, 2019), se ha visto que su potencia y espectro aumentan significativamente cuando se les adiciona un átomo de flúor en la posición 6 (Ruiz *et al.*, 2019). Se pueden clasificar por generaciones (Tabla 2) y cuentan con un amplio espectro de actividad antimicrobiana.

Mecanismo de acción de las quinolonas: Esta familia de antibióticos tiene actividad bactericida uniéndose a las enzimas Topoisomerasas bacterianas, concretamente la Topoisomerasa II (ADN-girasa) en Gram negativos y la Topoisomerasa IV en Gram positivos (Hooper & Jacoby, 2015), las cuales son enzimas necesarias para la síntesis de ADN (Jacoby, 2005).

**Tabla 2.** Clasificación de quinolonas.  
Elaboración propia con información de Mella *et al.*, 2000.

<b>Clasificación</b>	<b>Antimicrobiano</b>	<b>Espectro</b>
Primera generación.	Ácido nalidíxico, ácido pipemídico, ácido oxolónico, ácido piromídico, acroxacino,	Enterobacterias

	cinoxacino y rosoxacino.	
Segunda generación (Fluoroquinolonas).	Ciprofloxacina, norfloxacino, enoxacina, perfloxacina, fleroxacina, lomefloxacina, ofloxacina y rufloxacina.	Gram negativos como estafilococos, Gram positivos y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
Tercera generación (derivados bifluorados y trifluorados)	Levofloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina, sparfloxacina, tosufloxacina, pazufloxacina y grepafloxacina.	Enterobacterias, Neumococos, Pseudomonas y bacterias intracelulares.
Cuarta generación	Trovafloxacina (retirada), gemifloxacina, moxifloxacina y clinafloxacina.	Estafilococos, Pseudomonas, Enterobacterias y Anaerobios.

Mecanismo de acción de las quinolonas: Esta familia de antibióticos tiene actividad bactericida uniéndose a las enzimas Topoisomerasas bacterianas, concretamente la Topoisomerasa II (ADN-girasa) en Gram negativos y la Topoisomerasa IV en Gram positivos (Hooper & Jacoby, 2015), las cuales son enzimas necesarias para la síntesis de ADN (Jacoby, 2005).

- 6) Antibióticos de tipo Anfenicoles: Estos antibióticos pertenecen a la clase de los inhibidores de la síntesis proteica, en las células bacterianas (Ucedo *et al.*, 2007). La clasificación de los anfenicoles se basa en la estructura química de la molécula y se dividen en tres grupos: la cloramfenicol (CAP), la tianfenicol (TAP) y la Florfenicol (FF) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Clasificación de los Anfenicoles.  
Elaboración propia con información de Lopardo, 2020.

Antimicrobiano	Descripción	Espectro de acción
Cloramfenicol	Es un antibiótico natural, de amplio espectro, bacteriostático	Microorganismos Gram positivos como <i>Streptococcus pneumoniae</i> y Gram negativos aerobios y anaerobios como <i>Salmonella</i> spp, bacterias atípicas como <i>Mycoplasma</i> spp. y espiroquetas
	Es un antibiótico para uso sistémico, de	Microorganismos Gram positivos como <i>Clostridium</i> spp. y Gram

Tianfenicol	amplio espectro	negativos anaerobios como <i>Escherichia coli</i>
Florfenicol	Es un antibiótico sintético de amplio espectro, funciona como un agente bacteriostático.	Microorganismos Gram positivos y Gram negativos aislados de animales domésticos como <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>

El mecanismo de acción de los anfenicoles se basa en la inhibición de la síntesis de proteínas en las células bacterianas. Estos antibióticos se unen a la subunidad ribosomal 50S y evitan que se unan los aminoácidos necesarios para la formación de la proteína. La inhibición de la síntesis de proteínas resulta en la muerte de la célula bacteriana (Pilehvar *et al.*, 2016). Se ha reportado que la resistencia a los anfenicoles está en aumento, especialmente en las bacterias aisladas de animales y humanos, además, se ha demostrado que la resistencia puede ser transmitida horizontalmente entre diferentes especies bacterianas (Aminov, 2011).

- 7) Antibióticos de tipo Sulfamidas: Los antibióticos del tipo sulfas son un grupo de antibióticos bacteriostáticos sintéticos de amplio espectro, con utilidad para tratamientos de infecciones bacterianas Gram positivos y negativos, aunque actualmente con efectividad reducida por la adquisición de mecanismos de resistencia (Lopardo, 2020). Estos antibióticos pertenecen a la clase de los inhibidores de la síntesis de ácido fólico, gracias a que son análogos estructurales del ácido P-aminobenzoico, lo que les confiere la capacidad de detener la síntesis del ácido fólico en las células bacterianas (Carta *et al.*, 2012, Lopardo, 2020).

La clasificación de las sulfas se basa en la estructura química de la molécula y se dividen en dos grupos principales: las sulfonamidas y las sulfonas, las sulfonamidas pueden catalogarse según su uso clínico en sulfamidas de acción corta (Sulfisoxazol, sulfafurazol, sulfametoxazol, entre otros), de acción prolongada (Sulfametoxipiridina, sulfameter y sulfadoxina), de uso tópico (Sulfadiazina argéntica y acetato de mafenida) o de acción en el tracto

digestivo (Sulfasuxidina, sulfaguanidina, sulfatalidina y sulfasalazina) (Petri, W.A., Jr. 2017).

- Las sulfonamidas son el grupo más conocido de sulfas y se han utilizado durante décadas para tratar una amplia variedad de infecciones bacterianas, incluyendo infecciones del tracto urinario, infecciones respiratorias y meningitis (Supuran, 2017).
- Las sulfonas son otro grupo de sulfas que se han utilizado para tratar infecciones bacterianas, especialmente la lepra. La dapsona es un ejemplo común de sulfona (Konduru *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que la resistencia a las sulfas está en aumento, especialmente en las bacterias aisladas de animales y humanos (Sköld *et al.*, 2001). Además, se ha demostrado que la resistencia a las sulfas puede ser transmitida horizontalmente entre diferentes especies bacterianas (Barlow & Hall, 2003).

### **1.5.2 Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos**

Los microorganismos han evolucionado y pueden contar con diversos mecanismos para evitar que los antibióticos sean eficaces, lo que disminuye la eficacia de los tratamientos (Reynoso, *etal.*, 2021; Camacho, 2023) entre los cuales se encuentran:

1. Bombas de expulsión: Permiten que el antibiótico no se acumule en el microorganismo
2. Neutralización: Empleando enzimas que inactivan a los antibióticos
3. Alteración o modificación del sitio blanco: modificaciones en el sitio de acción que implican pérdida de afinidad.
4. Reducción en la permeabilidad: Conducen a limitar el ingreso de los antibióticos.
5. Disminución en la expresión de porinas: Retarda el acceso de los antibióticos a través de la membrana al interior de la célula.

### 1.5.2.1 Principales mecanismos de resistencia en bacterias a los betalactámicos

La resistencia a esta familia de antibióticos se presenta mediante tres mecanismos principales, los cuales son:

- 1) Producción de betalactamasas (enzimas capaces de hidrolizar el anillo betalactámico previo a su unión con las transpeptidasas): Este es el principal mecanismo de resistencia contra los betalactámicos, en especial en microorganismos Gram negativos, también pueden producirlas bacterias Gram positivas y bacterias anaerobias. La producción de estas enzimas puede estar codificada en plásmidos (Wu *et al.*, 2018) o en el cromosoma bacteriano (Vergidis *et al.*, 2017).
- 2) Modificación de la diana en las proteínas ligadas a penicilina (PBP): Diferentes alteraciones en la PBP como mutaciones o modificación en la afinidad pueden dificultar la unión del anillo betalactámico a la proteína, disminuyendo así su actividad, siendo este el principal mecanismo de resistencia en los microorganismos Gram positivos como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Streptococcus pneumoniae* y *Enterococcus faecium* (Aguayo *et al.*, 2018).
- 3) Alteraciones en la permeabilidad y bombas de expulsión: Las membranas celulares son selectivamente permeables, por lo que la tasa de difusión pasiva de moléculas a través de la membrana es sumamente importante (Honigmann & Pralle, 2016). Los cambios en la permeabilidad de la membrana se relacionan con diferentes factores, como pH, temperatura o carga eléctrica, por lo que moléculas pequeñas sin carga, como el CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, o moléculas con alta solubilidad en grasas, como el etanol, cruzan las membranas prácticamente sin dificultad por difusión pasiva (Kabra, *et al.*, 2019). Se ha reportado que los microorganismos Gram negativos son generalmente más resistentes a los antibióticos que los Gram positivos, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* presentan bombas de expulsión capaces de expulsar antibióticos de manera muy eficiente, determinando su resistencia intrínseca a muchos antibióticos (Poole, 2001, Singh *et al.*, 2022).

### **1.5.2.2 Mecanismos de resistencia a los glucopéptidos**

Los glucopéptidos tienen un mecanismo de acción basado en su unión al dipéptido terminal D-alanina-D-alanina precursor del peptidoglucano, inhibiendo así la síntesis de la pared celular (Zeng *et al.*, 2016). En *Enterococcus* se ha reportado la resistencia adquirida por la incorporación de distintos operones del complejo genético van (Li *et al.*, 2022), denominados vanA, vanB, vanC, vanD, vanE y vanG. Este complejo genético modifica la diana D-Alanil-D-Alanina transformándola en D-Alanil-D-Lactato o D-Alanil-D-Serina, con menor afinidad por la vancomicina y la teicoplanina (Arias *et al.*, 2012) afectando la capacidad de unión de los glucopéptidos a la pared celular bacteriana (Corbel, 2022).

### **1.5.2.3 Mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos**

Dentro de los mecanismos de resistencia a estos antibióticos se ha reportado la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (acetilasas, fosfotransferasas y adenilasas, entre otras), disminución en la asimilación de antibióticos y alteración de las proteínas diana ribosomales que modifican su estructura disminuyendo su afinidad (Shakya *et al.*, 2007).

### **1.5.2.4 Mecanismos de resistencia a los nitrofuranos**

Los nitrofuranos necesitan ser activados por enzimas nitroreductasas para llevar a cabo su función, las enzimas implicadas en la activación son nfsA y nfsB (Le & Rakonjac, 2021). Se ha reportado que en *Escherichia coli* las alteraciones genéticas o postraduccionales que disminuyen o eliminan la actividad catalítica de estas nitroreductasas están relacionadas con el desarrollo de resistencia a los nitrofuranos (Vervoort *et al.*, 2014, Le & Rakonjac, 2021).

Se ha descrito el rol de las bombas de expulsión en la resistencia a nitrofuranos, un caso específico es el de la bomba de expulsión OqxAB, transportador perteneciente a la familia RND (resistencia-nodulación-división) que permite desarrollar resistencia a nitrofurantoína (Ho *et al.*, 2015).

### **1.5.2.5 Mecanismos de resistencia a las quinolonas**

Se han reportado que pueden presentar dos mecanismos, la mutación de los genes que codifican para la Topoisomerasa II y la Topoisomerasa IV, lo que crea las regiones determinantes de la resistencia a quinolonas, modificando la diana objetivo de las quinolonas (Chávez-Jacobo *et al.*, 2015). Alteraciones en la permeabilidad de la membrana disminuyen la penetración intracelular del antibiótico, presentando también actividad de transportadores activos endógenos que inducen la expulsión de estos antibióticos al medio extracelular (Bearden *et al.*, 2001).

### **1.5.2.6 Mecanismos de resistencia a Sulfamidas**

La resistencia a antibióticos del tipo sulfamidas es generalizado, esto quiere decir que cuando se presenta afecta a todos los fármacos pertenecientes a este grupo (Sköld, 2000), existen diferentes mecanismos que determinan la resistencia bacteriana a las sulfamidas como la disminución de permeabilidad, expulsión activa o por alteraciones enzimáticas que por hiperproducción o una vía alternativa permiten la síntesis de ácido fólico (Pérez & Iglesias, 2003).

## **1.6 Métodos de identificación bacteriana**

La identificación precisa de bacterias es esencial en microbiología, ya que proporciona la información crucial para comprender su papel en la salud humana, la ecología microbiana y la respuesta a enfermedades infecciosas (Cruz *et al.*, 2015).

Para identificar una cepa bacteriana se emplean métodos: observación de características morfológicas, tinción de Gram, pruebas bioquímicas, técnicas moleculares y uso de sistemas automatizados.

- 1) Características morfológicas: La observación de las características morfológicas de las colonias bacterianas en medios de cultivo proporciona información inicial para la identificación bacteriana (Bergey *et al.*, 2020) y permite, de igual forma, evaluar la calidad de la muestra, así como su

disposición, movilidad o formación de biopelículas (Gobernado & López, 2003).

- 2) Tinción de Gram: La técnica de tinción de Gram es un procedimiento microbiológico fundamental desarrollado por el bacteriólogo Danés Hans Christian Gram en 1884. Esta técnica permite la clasificación de bacterias en dos grupos principales: Gram positivas y Gram negativas, basándose en las diferencias en la composición de la pared celular (Tripathi & Sapra, 2023). La tinción de Gram permite una identificación preliminar de las bacterias según su reacción a los diferentes colorantes: Las bacterias Gram positivas se tiñen de color violeta oscuro o púrpura, mientras que las bacterias Gram negativas se tiñen de color rojo o rosa.
- 3) Pruebas bioquímicas: Las pruebas bioquímicas se basan en las características metabólicas de las bacterias y se utilizan en su identificación (Franco et al., 2019). Estas pruebas evalúan la capacidad de fermentar azúcares específicos, producir enzimas y otros metabolitos. Las pruebas de fermentación más usadas son: las pruebas de oxidación-fermentación de azúcares como la glucosa, prueba de crecimiento en caldo lactosado, empleo de citrato como fuente de carbono en medio Citrato de Simmons, prueba de movilidad en Agar Motilidad-Indol-Ornitina (Marcobal, A. *et al.*, 2006; Magni, *et al.*, 2008).
- 4) Técnicas moleculares: Las técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han revolucionado la identificación bacteriana (Spratt 2004). La PCR permite amplificar y detectar secuencias de ADN específicas de las bacterias, lo que brinda una identificación más precisa y rápida. Además, la secuenciación del ADN y la comparación con bases de datos genómicas permiten una identificación más precisa (Galluzzi *et al.*, 2007).

La secuenciación de nueva generación ha permitido la identificación precisa de bacterias a través del análisis de múltiples regiones del genoma bacteriano (Emerson *et al.*, 2008). Esta tecnología ha mejorado la resolución y la velocidad de la identificación bacteriana.

La metagenómica permite el estudio de comunidades bacterianas completas presentes en muestras ambientales o biológicas sin la necesidad de cultivo bacteriano (Galluzzi *et al.*, 2007, Franco *et al.*, 2019). Esta técnica ha revelado la diversidad bacteriana oculta y su función en diferentes entornos.

- 5) Sistemas de identificación automatizados: Los sistemas de identificación automatizados, como el sistema VITEK o el sistema MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer), combinan técnicas bioquímicas y moleculares para la identificación rápida y precisa de bacterias. Estos sistemas analizan múltiples parámetros y comparan los resultados con bases de datos para identificar bacterias de interés (Seng *et al.*, 2009).

MALDI-TOF es una técnica que tiene 30 años de haber sido desarrollada, en la actualidad es empleada para la identificación de microorganismos patógenos de interés, se basa en el análisis del perfil de proteínas de los microorganismos patógenos (Seng, *et al.*, 2009). Este método permite la identificación de moléculas de interés mediante la determinación de su relación masa/carga, así como los fragmentos generados de esta (García, *et al.*, 2012).

## 2. OBJETIVOS

### General

- Monitorear la presencia de algunos microorganismos patógenos de interés en tres muestreos independientes del agua del Río Nexapa y determinar su fenotipo de resistencia a antibióticos.

### Específicos

- Determinar la cantidad de microorganismos presentes en diferentes condiciones nutricionales en tres periodos de muestreo.
- Aislar microorganismos patógenos de interés en las diferentes condiciones nutricionales.
- Generar un cepario con microorganismos de interés aislados a partir de las muestras de agua.
- Determinar la resistencia o susceptibilidad a antimicrobianos de los microorganismos patógenos aislados mediante antibiogramas.
- Analizar mediante pruebas estadísticas las diferencias entre los muestreos en las diferentes condiciones nutricionales empleadas.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El río Nexapa es un cuerpo de agua que está relacionado con diversas actividades económicas, como son las prácticas agrícolas, para las cuales se emplea el agua para el riego de cultivos, los cuales son distribuidos para su venta en el país o son exportados, este río también permite el desarrollo urbano e industrial y es punto de interés para actividades recreativas como el canotaje. Por lo mencionado, es muy importante conocer las características fisicoquímicas y la calidad microbiológica de este cuerpo de agua.

El uso indiscriminado de los antimicrobianos y la eliminación inadecuada en cuerpos de agua han causado la selección de microorganismos resistentes a antibióticos. Por lo anterior, hay que determinar el perfil de resistencia de los microorganismos patógenos presentes en este cuerpo de agua y describir su fluctuación en diferentes alturas del río.

Investigar la presencia de bacterias patógenas en el río Nexapa proporcionará información crucial para la implementación de medidas de control y prevención de las enfermedades causadas por microorganismos de importancia en la salud humana y ecosistémica, los cuales pueden transmitirse a través del agua o de los alimentos contaminados por el agua.

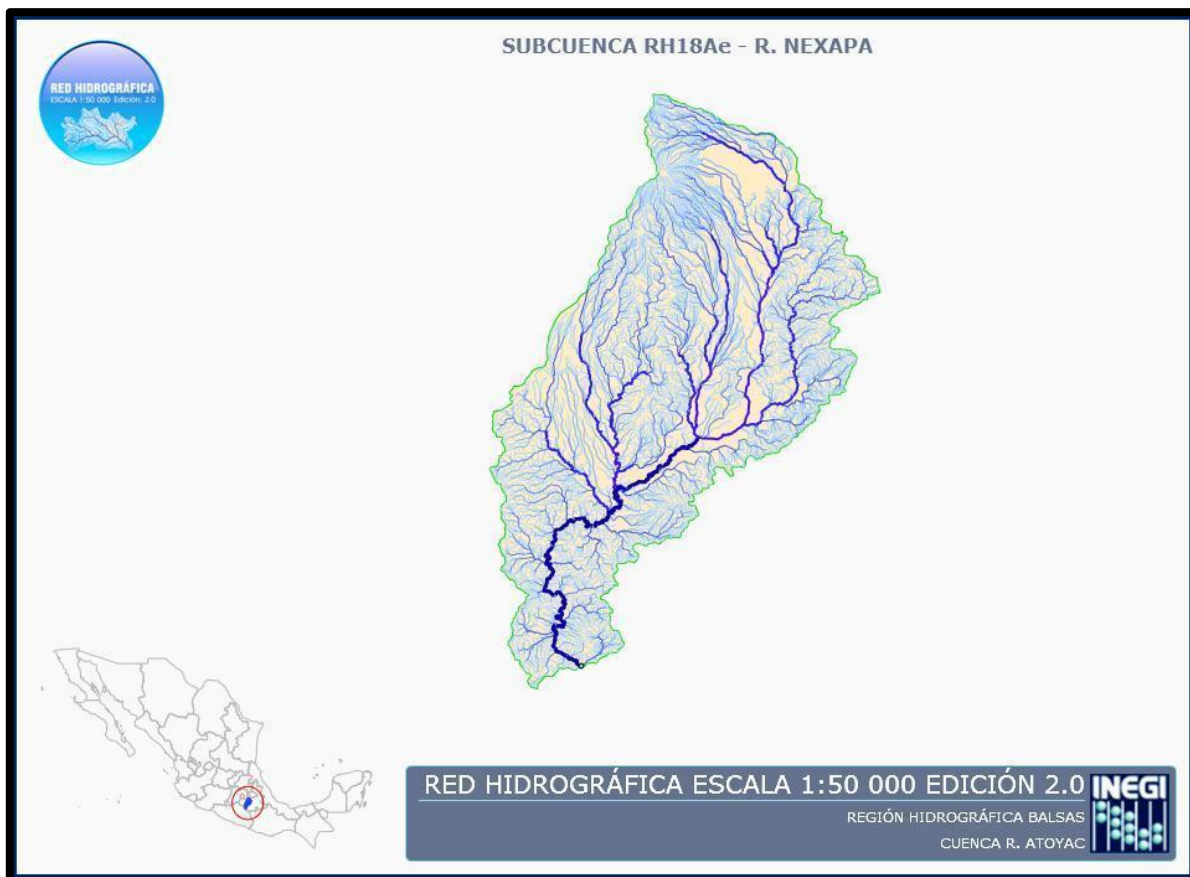
En este estudio se determinará la presencia de algunas bacterias patógenas que se pueden transmitir a través del agua y que son responsables de diversas enfermedades gastrointestinales de importancia a nivel nacional como son las enterobacterias: *Shigella* spp, *Salmonella* spp, *Vibrio* spp y *E. coli*.

El conocimiento de la calidad microbiológica del agua del Río Nexapa posibilitará la toma de decisiones con respecto al uso de este cuerpo de agua, lo cual podría influir en la mejora de la calidad de vida de la comunidad.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Zona de estudio

El Río Nexapa es una corriente de agua superficial ubicada a una altitud de 800 metros sobre el nivel del mar en Puebla, México con latitud 19°13.694' N y longitud 98°41.612' O, se origina en la falda oriental del volcán Popocatepetl aproximadamente a 20 kilómetros al norte del municipio de Atlixco, pertenece a la cuenca Río Alto Atoyac de la Reserva Hidrológica Balsas (Navarro y Cruz, 2023). Este cuerpo de agua recibe aportaciones del río Cantarras y de las barrancas “La Leona” y “Cuescomate”, cuenta con una segunda fuente acuífera, que, a pesar de no nacer ahí, es proveniente de la presa Miguel Alemán Camacho (CNA, 2005) (Figura 6).



**Figura 6.** Red hidrográfica de la subcuenca RH18Ae, correspondiente al Río Nexapa en escala 1:50 000, se incluyen las aguas superficiales y subterráneas que conforman la red. Tomado del Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2010.

## 4.2 Toma de muestras de agua residual

Las muestras de agua fueron proporcionadas por el grupo de investigación del Dr. Eduardo Torres Ramírez del Laboratorio de Bioinorgánica Aplicada del Centro de Química del ICUAP. Los muestreos se realizaron de acuerdo con lo descrito en las normas NMX-AA-003-1980 “Aguas residuales – Muestreos” y NMX-AA-014-1980 “Cuerpos receptores – Muestreos”. Se realizaron tres muestreos en el periodo que comprende entre enero de 2022 y agosto de 2022. Los sitios de toma de muestra fueron determinados de acuerdo con los datos de investigaciones previas y con la información del Dr. Jorge Herrera (Tabla 4), el área de muestreo comprendió el cuerpo de agua Río Nexapa, desde el sur de la ciudad de Atlixco hasta el centro de la ciudad de Izúcar de Matamoros.

**Tabla 4.** Coordenadas de los sitios de muestreo en el río Nexapa.  
Elaboración propia con información de Reynoso, 2023.

Nombre del lugar de muestreo	Coordenadas	
	Latitud Norte	Longitud oeste
1	18° 57' 1.38" N	98° 23' 23.34" O
2	18° 54' 14.40" N	98° 22' 38.76" O
3	18° 48' 41.46" N	98° 25' 53.04" O
4	18° 37' 36.18" N	98° 28' 8.22" O
5	18° 34' 2.88" N	98° 28' 22.38" O
6	18° 33' 59.56" N	98° 28' 25.19" O
7	18° 33' 56.70" N	98° 28' 28.09" O

Se recolectó una muestra de 1 litro en cada uno de los 7 puntos seleccionados del Río Nexapa, las muestras fueron transportadas en una hielera al laboratorio a 4°C para conservar la viabilidad de los microorganismos.

### 4.3 Características fisicoquímicas del agua

Se realizó la medición *in situ* de los siguientes parámetros fisicoquímicos a las muestras de agua en los puntos seleccionados: conductividad, pH, oxígeno disuelto y temperatura. Estos parámetros fueron medidos por los integrantes del equipo de investigación a cargo del Dr. Eduardo Torres Ramírez del Centro de Química del ICUAP-BUAP empleando una sonda de conductividad HANNA instruments (HI3001). La Demanda Bioquímica de Oxígeno fue determinada de acuerdo con la NMX-AA-028-SCFI-2001.

### 4.4 Condiciones nutricionales empleadas para el aislamiento de microorganismos patógenos de interés

Se utilizaron medios de cultivo nutritivos, selectivos y diferenciales para el aislamiento y desarrollo de los microorganismos presentes en muestras de agua de origen residual del río Nexapa. Los medios de cultivo empleados se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5.** Medios de cultivo empleados en el desarrollo experimental.  
Elaboración propia.

Medio de cultivo	Propósito	Tipo de medio	Marca
<b>Caldo Luria Bertani (LB)</b>	Cultivo de microorganismos en general	Enriquecimiento	MCDLAB
<b>Agar Muller-Hinton</b>	Ensayos de resistencia a antimicrobianos	Nutritivo	Becton Dickinson
<b>Agar Salmonella y Shigella (SS)</b>	Cultivo selectivo de <i>Salmonella</i> spp. y <i>Shigella</i> spp.	Selectivo y diferencial	MCDLAB
<b>Agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS)</b>	Aislamiento y desarrollo de <i>Vibrio cholerae</i>	Selectivo y diferencial	Becton Dickinson
<b>Agar Eosina Azul</b>	Cultivo de	Selectivo	Becton Dickinson

#### 4. 4. 1 Medios de cultivo selectivos

- Agar Salmonella- Shigella: Es un medio diferencial y selectivo que inhibe el crecimiento de la mayoría de los coliformes y permite el crecimiento de especies de *Salmonella* y *Shigella*. Es un medio empleado para la detección de bacterias productoras de H<sub>2</sub>S tales como *Proteus* spp. y algunas cepas de *Salmonella*. El medio fue preparado de acuerdo con las especificaciones del proveedor, para lo cual el medio fue resuspendido en agua tridestilada, fue homogenizado por 5 minutos y calentado en agitación hasta ebullición durante 1 minuto. Este medio no debe ser esterilizado en autoclave.
- Agar eosina azul de metileno: EMB Agar se basa en una fórmula originalmente descrita por Holt-Harris y Teague en 1916. Este medio contiene colorantes de azul de metileno y eosina. Los coliformes producen colonias de color negro azulado, mientras que las colonias de *Salmonella* y *Shigella* son incoloras o de color ámbar transparente. En este medio las colonias de *Escherichia coli* pueden exhibir un brillo verde metálico característico debido a la rápida fermentación de la lactosa. El medio fue preparado de la siguiente manera, el polvo del medio de cultivo fue resuspendido en agua tridestilada, fue homogenizado por 5 minutos en agitación y esterilizado en autoclave.
- Agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS): Es un medio selectivo de diferenciación para el aislamiento y cultivo de *Vibrio cholerae* y otras especies *Vibrio* a partir de muestras clínicas y de otras clases. Es un medio de cultivo altamente selectivo, cumple con los requisitos nutritivos de las especies de *Vibrio* spp. Para la preparación del medio, el polvo fue pesado y resuspendido en agua tridestilada, se homogenizó por 5 minutos y fue calentado en agitación hasta ebullición durante 1 minuto. Este medio no debe ser esterilizado en autoclave.

## 4.5 Aislamiento de microorganismos de interés en muestras de agua residual

Para realizar el aislamiento y cuantificación de los microorganismos presentes en las muestras de agua se utilizó la técnica de diluciones seriadas, colocando 100 µL de muestra y 900 µL de agua tridestilada estéril, los factores de dilución empleados fueron desde  $1 \times 10^{-1}$  al  $1 \times 10^{-5}$ .

Las muestras fueron inoculadas en Cajas Petri conteniendo 25 mL de los medios de cultivo: Agar SS, Agar EMB y Agar TCBS, se colocaron 100 µL de la dilución correspondiente de la muestra de agua y se sembraron por la técnica de extensión en placa con un asa de vidrio de Digrafsky, las cajas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C, transcurrido el periodo de incubación se realizó la cuantificación de los microorganismos aislados.

Para el aislamiento de morfologías coloniales de interés en las condiciones nutricionales empleadas (Agar SS, Agar EMB y Agar TCBS) se seleccionaron morfologías correspondientes a presuntivos microorganismos patógenos, de acuerdo con las fichas técnicas del proveedor. Para el caso del medio de cultivo agar SS se seleccionaron las morfologías coloniales presuntivas del género *Salmonella* spp de coloración negra y del género *Shigella* spp translúcidas de color claro. En agar EMB se seleccionaron las colonias de morfología correspondiente a *E. coli* de color verde metálico y se exceptuaron aquellas que presentaron coloración azul o grisácea (*Proteus* spp.). En agar TCBS fueron seleccionadas las morfologías correspondientes a *Vibrio cholerae* las cuales eran colonias de color amarillo con superficie rugosa (Tabla 6). Se obtuvieron cultivos puros de las bacterias de interés aisladas y se elaboró un cepario.

**Tabla 6.** Morfología colonial aislada en cada medio de cultivo.  
Elaboración propia con información (Murray *et al.*, 2003).

<b>Morfología colonial</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Microorganismo según ficha técnica del medio</b>
Pequeña, irregular con borde ondulado, opaca con coloración negra sin brillo, lisa, elevada y suave	Agar SS	<i>Salmonella</i> spp.
Pequeña, circular con borde entero, opaca sin pigmentación, lisa, convexa y mucoide	Agar SS	<i>Shigella</i> spp.
Pequeña, irregular con borde ondulado, opaca con pigmentación amarilla, lisa, plana y suave	Agar TCBS	<i>Vibrio cholerae</i>
Verde metálico	Agar EMB	<i>Escherichia coli</i>

#### **4.6 Conservación de cepas por ultracongelación**

Se seleccionaron cepas bacterianas de interés, las cuales fueron inoculadas en 3 mL de medio de cultivo LB, los cultivos fueron incubados en agitación durante 18 horas a 37°C, transcurrido el tiempo de incubación, los cultivos fueron colocados en tubos eppendorf de 1.5 mL, posteriormente fueron centrifugados a 11,000 rpm durante 5 minutos, se desechó la fase acuosa para después resuspender el pellet en 500 µL de glicerol al 50% estéril, se centrifugó nuevamente a 11,000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante para volver a resuspender el pellet en 500 µL de glicerol, las muestras fueron centrifugadas a 11,000 rpm por 5 minutos y se desechó el sobrenadante para realizar una última resuspensión en 200 µL de glicerol, las cepas fueron almacenadas en un ultracongelador a -80°C.

#### **4.7 Pruebas de resistencia a antibióticos**

Las pruebas de resistencia a antibióticos se llevaron a cabo mediante antibiogramas por la técnica de difusión en agar (disco-placa) de Kirby-Bauer. Este método consiste en depositar discos de papel secante impregnados con diferentes antibióticos en cajas petri previamente inoculadas con el microorganismo a probar.

Para los ensayos de resistencia a antibióticos se seleccionaron 38 cepas bacterianas aisladas de microorganismos de interés, pertenecientes a los géneros *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Vibrio cholerae* y *E. coli*, las cuales fueron inoculadas en tubos conteniendo 3 mL de medio LB durante 24 horas a 37°C, se realizaron diluciones seriadas con solución salina hasta alcanzar la turbidez equivalente al tubo de 0.5 en la escala de McFarlan, se prepararon cajas Petri con agar Mueller Hinton, se tomaron 100 µL de cada cultivo y se inoculó la caja Petri mediante agotamiento con espátula de Drigalsky de vidrio, posteriormente se colocaron los sensidiscos de antimicrobianos serie 2 para Gram negativos de la marca Multibac, las pruebas se incubaron a 37°C durante 18 horas. Al término de la incubación se midieron los halos de inhibición y se determinaron las resistencias presentes para cada cepa bacteriana probada.

Los sensidiscos contenían 12 antibióticos con las siguientes concentraciones: (Tabla 7).

**Tabla 7.** Concentraciones de los antibióticos probados.  
Elaboración propia.

<b>Antibiótico</b>	<b>Concentración</b>
Amikacina (AK)	30 µg
Ampicilina (AM)	10 µg
Carbencilina (CB)	100 µg
Cefalotina (CF)	30 µg
Cefotaxima (CFX)	30 µg
Ciprofloxacino (CPF)	5 µg
Cloranfenicol (CL)	30 µg
Gentamicina (GE)	10 µg
Netilmicina (NET)	30 µg
Nitrofurantoína (NF)	300 µg
Norfloxacino (NOF)	10 µg
Sulfametoxazol/Trimetroprim (STX)	25 µg

## **4.8 Análisis estadístico**

Los datos microbiológicos obtenidos en esta investigación serán analizados para determinar si tienen una distribución normal, en este caso se aplicará una prueba de estadística descriptiva (t de student para muestras pareadas o ANOVA), si los resultados muestran que la distribución no es normal se someterán a análisis no paramétricos (Prueba de rangos con signo de Wilcoxon y prueba de Friedman) para determinar si existen diferencias significativas entre los muestreos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Características fisicoquímicas del agua en los sitios de muestreo

Se realizaron tres muestreos de agua en 7 puntos seleccionados del río Nexapa durante el periodo que comprende enero de 2022 a agosto de 2022. La toma de las muestras de agua se realizó según lo descrito en materiales y métodos. El primer muestreo se realizó el 22 de enero del 2022, el segundo muestreo fue llevado a cabo el 05 de mayo de 2022 y el tercer muestreo el 10 de agosto de 2022, en los muestreos independientes se determinaron características fisicoquímicas del agua en los puntos seleccionados (Tabla 8).

Los resultados indicaron que el agua de los sitios de muestreo presentó variabilidad en los valores de cada parámetro medido (Temperatura, pH, conductividad, DBO y oxígeno disuelto), lo cual puede ser un reflejo de la situación ambiental en cada punto, ya que en cada uno de los puntos de muestreo se reciben residuos de diferente naturaleza y cantidad, lo que finalmente podría afectar la naturaleza y carga microbiana. En el caso del pH el punto en el tercer muestro presentó el pH más básico 8.67, la mayor temperatura se registró en el punto 6 durante el muestreo 2 con 30.7°C, en el caso de la conductividad para el punto 6 en el tercer muestreo se obtuvo la mayor conductividad con 2290  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , para el caso de la DBO el valor más alto fue en el punto 2 durante el primer muestreó con 468.5 mg/L y para el caso del oxígeno disuelto el punto 1 presentó el valor más alto en el primer muestreo con 7.5 mg/L.

**Tabla 8.** Características fisicoquímicas del agua muestreada en los tres periodos de muestreo.

Elaboración propia, empleando información de Reynoso, 2023.

Sitio de muestreo	Muestreo	pH	Temperatura (°C)	Conductividad (μS/cm)	DBO (mg/L)	Oxígeno Disuelto (mg/L)
1	1	7.86	15.3	485	134	7.5
	2	7.81	17.7	495	102	7.4
	3	7.7	17.3	478	90	2.8
2	1	7.39	16.4	794	468.5	6
	2	7.63	22.1	1424	197.5	0.8
	3	7.5	20	1172	150	1
3	1	7.82	17.1	1306	369	6.5
	2	7.93	22.8	1327	98	4.2
	3	7.84	20.6	1147	30	4.9
4	1	7.95	17.2	1332	250.5	6
	2	7.97	23.8	1190	209.5	5.3
	3	7.79	21.2	1075	60	7.3
5	1	-	-	-	-	-
	2	7.86	26.6	1206	139	4.2
	3	8.67	22.9	1128	60	4.7

<b>6</b>	<b>1</b>	7.69	25.4	2240	340	2.5
	<b>2</b>	7.93	30.7	2170	359.5	1.6
	<b>3</b>	6.1	27	2290	285	2.2
<b>7</b>	<b>1</b>	7.77	22.8	1467	186.5	3.5
	<b>2</b>	7.78	28.8	1268	119	0.3
	<b>3</b>	7	23.9	1205	240	0.8

“-” = Los valores no fueron reportados.

El primer valor corresponde al primer periodo de muestreo, el segundo valor corresponde al segundo periodo de muestreo y el tercer valor pertenece al tercer periodo de muestreo.

### 5.1.1 Análisis fisicoquímico del agua en el primer muestreo

En este muestreo los resultados indicaron que el pH oscilo entre un mínimo de 7.39 y teniendo como valor máximo 7.95 en el punto de muestreo número 4, con respecto a la temperatura osciló entre los 15.3 °C y los 25.4 °C, el menor valor para la conductividad fue registrada en el primer punto de muestreo con 485  $\mu$ S/cm y la mayor fue de 2240  $\mu$ S/cm en el sexto punto de muestreo, para la DBO el máximo valor fue el obtenido para el punto 2 con 468.5 mg/L, en el caso del oxígeno disuelto tuvo un máximo valor de 7.5 mg/L en el primer punto y un mínimo de 2.5 mg/L en el punto 6, (Tabla 8).

### 5.1.2 Análisis fisicoquímicos del agua en el segundo muestreo

Para el segundo muestreo para el pH se obtuvieron valores que oscilaron en un rango de 7.63 como mínimo a 7.97 como máximo valor difiriendo ligeramente respecto al primer punto de muestreo, cuyo máximo pH fue de 7.95, para el parámetro de la temperatura, el punto que obtuvo el menor valor fue el primer sitio

de muestreo con 17.7 °C y el mayor valor el sexto punto de muestreo con 30.7 °C, que son temperaturas mayores a las presentes en el primer muestreo, con respecto a la conductividad se obtuvieron valores desde 495  $\mu\text{S/cm}$  hasta los 2170  $\mu\text{S/cm}$ , siendo el sexto punto de muestreo el que presentó una mayor conductividad, lo cual es menor con respecto al máximo valor obtenido en el sexto punto durante el primer muestreo (2,240  $\mu\text{S/cm}$ ), para la DBO el mínimo presente fue de 98 en el punto 3 y el máximo obtenido fue de 359.5 en el punto 6, estos resultados fueron menores a los obtenidos para el primer muestreo, en el caso del oxígeno disuelto se obtuvieron valores de 0.3 mg/L en el punto número 7 y un máximo de 7.4 mg/L en el punto número 1, estos resultados son menores comparándolos con los obtenidos en el primer muestreo (2.5 a 7.5 mg/L), (Tabla 8).

### **5.1.3 Análisis fisicoquímico del agua en el tercer muestreo**

El análisis de los parámetros fisicoquímicos en el tercer muestreo indicaron diversos picos máximos y mínimos que superan a los dos muestreos anteriores, en el punto de muestreo número 6 se presentó la mayor acidez con un pH de 6.1, mientras que el más alcalino fue en el punto 5 con 8.67, estos cambios en el pH se pueden relacionar a factores como la temperatura, los carbonatos disueltos o la actividad microbiana (Gutiérrez *et al.*, 2015), el menor valor obtenido para la temperatura se obtuvo en el punto de muestreo número 1 con 17.3 °C y un máximo de 27°C, para el caso de la conductividad el menor valor fue para el punto 1 con 478  $\mu\text{S/cm}$  y un máximo de 2290  $\mu\text{S/cm}$  para el punto 6, estos valores son menores a los obtenidos en el segundo muestreo (2,240  $\mu\text{S/cm}$ ). En el caso de la demanda bioquímica de oxígeno se obtuvieron los valores más bajos de los tres muestreos, siendo el menor de 30 mg/mL en el tercer punto de muestreo, el cual fue menor con respecto a los otros dos muestreos con 134 mg/mL (primer muestreo en el punto 1) y 98 mg/mL (segundo muestreo en el tercer punto). Con respecto al oxígeno disuelto el menor valor obtenido fue en el punto 7 con 0.8 mg/mL, lo cual es la menor cantidad obtenida con respecto a los otros dos muestreos y el máximo fue de 7.3 mg/mL (Tabla 8).

## 5.2 Determinación de microorganismos presentes

El agua proveniente de los diferentes puntos durante los tres muestreos se analizó mediante métodos microbiológicos como la inoculación de las diluciones seriadas en tres condiciones nutricionales (Agar SS, Agar EMB y Agar TCBS), para la determinación del número de Unidades Formadoras de Colonias ( $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) de los microorganismos presentes en el agua. Los resultados de la cuenta viable ( $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) fueron convertidos en logaritmo base 10 para facilitar su interpretación (Tabla 9). Los resultados indicaron que, en el medio Agar SS, la menor cantidad de microorganismos aislados fue durante el tercer muestreo en el punto 5 con un  $\log_{10} (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 4.0$ , la mayor cantidad de microorganismos en este medio fue  $\log_{10} (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 6.46$  para el punto 5 en el primer muestreo, en el caso del medio Agar EMB la menor cantidad de microorganismos fue en el segundo muestreo en el punto 1 con  $\log_{10} (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 5.23$ , el valor más alto en este medio fue en el tercer muestreo en el punto 1 con un  $\log_{10} (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 6.0$ , para la condición nutricional Agar TCBS no se observó crecimiento bacteriano durante el primer muestreo, por lo que no se obtuvieron datos de cuenta viable en los puntos seleccionados, en el segundo muestreo la menor cantidad de microorganismos fue para los puntos 3 y 5 con un  $\log_{10} (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 3.0$ , en el caso del tercer muestreo el punto 5 presentó también un  $\log_{10} (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 3.0$  y la mayor cantidad de microorganismos para este medio fue en el tercer muestreo en el punto 2 con un  $\log_{10} (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 5.05$  (Tabla 9).

Al realizar la determinación de la cuenta viable  $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  de morfologías de interés (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., y *E. coli*) en las condiciones nutricionales probadas, se observó que el aislamiento de *Salmonella* spp en los tres muestreos fue variable, ya que en los muestreos 1 y 3 hubo puntos en los que no hubo cuenta viable, pero en el segundo muestreo en todos los puntos se aisló a *Salmonella* spp con un valor mínimo de  $\log_{10} (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 2.70$  en el punto 2, la máxima cantidad de microorganismos de esta bacteria fue en el tercer muestreo en el punto 6 con  $\log_{10} (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 4.78$ . En el caso de *Shigella* spp se encontró presente en los tres muestreos con un mínimo de  $\log_{10} (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 4.0$  durante el tercer muestreo en

el punto 5 y un máximo de  $\log_{10} (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 6.54$  en el tercer muestreo en el punto 2, esta bacteria mostró una alta prevalencia en todos los puntos muestreados. Los resultados indicaron que la bacteria *E. coli* estuvo presente en los muestreos 1 y 2 en todos los puntos con un mínimo de  $\log_{10} (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 3.70$  durante el muestreo 2 en el punto 5 y un máximo de  $\log_{10} (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 5.70$  en el primer muestreo en el punto 3. En el caso del tercer muestreo sólo se determinó la presencia de esta bacteria en los puntos 3 y 4 (Tabla 10).

**Tabla 9.** Cuenta Viable de microorganismos (UFC•mL<sup>-1</sup>) en logaritmo base de 10, desviación estándar y coeficiente de variación en los medios Agar SS, Agar EMB y Agar TCBS.  
Elaboración propia.

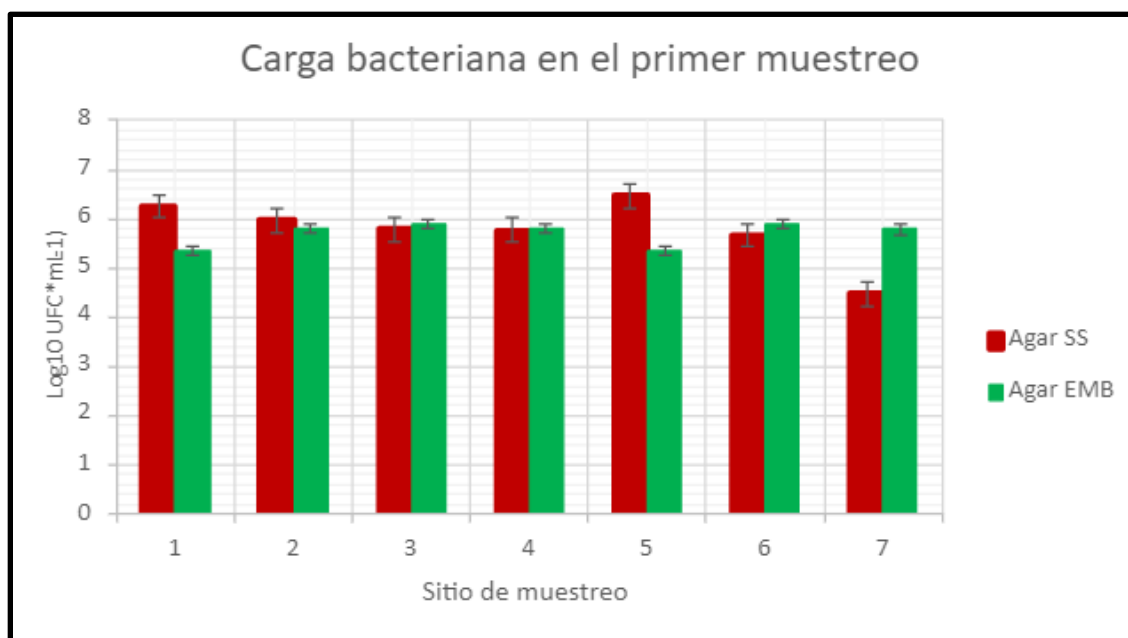
Puntos de muestreo	Agar SS						Agar EMB						Agar TCBS ( <i>Vibrio cholerae</i> )					
	Log (UFC•mL <sup>-1</sup> ) M1	Log (UFC•mL <sup>-1</sup> ) M2	Log (UFC•mL <sup>-1</sup> ) M3	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)	Log (UFC•mL <sup>-1</sup> ) M1	Log (UFC•mL <sup>-1</sup> ) M2	Log (UFC•mL <sup>-1</sup> ) M3	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)	Log (UFC•mL <sup>-1</sup> ) M1	Log (UFC•mL <sup>-1</sup> ) M2	Log (UFC•mL <sup>-1</sup> ) M3	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
1	6.26	4.78	5.89	5.64	0.769	13.63	5.350	5.23	6.00	5.53	0.41	7.49	0.00	3.08	4.94	2.67	2.50	93.36
2	5.97	5.00	6.80	5.92	0.900	15.21	5.787	5.78	5.78	5.78	0.00	0.09	0.00	3.18	5.05	2.74	2.55	93.10
3	5.78	5.60	5.98	5.79	0.190	3.29	5.903	5.85	5.85	5.86	0.03	0.57	0.00	3.00	4.79	2.60	2.42	93.21
4	5.77	5.70	4.48	5.32	0.727	13.68	5.806	5.68	5.68	5.72	0.07	1.26	0.00	3.30	3.16	2.15	1.87	86.67
5	6.46	4.11	4.00	4.86	1.388	28.58	5.342	5.25	5.25	5.28	0.05	1.01	0.00	3.00	3.00	2.00	1.73	86.60
6	5.67	5.45	6.08	5.73	0.320	5.59	5.903	5.95	5.95	5.93	0.03	0.44	0.00	3.99	4.70	2.90	2.53	87.48
7	4.48	5.24	4.78	4.83	0.385	7.96	5.778	5.49	5.49	5.59	0.16	2.93	0.00	3.90	4.20	2.70	2.34	86.78

**Tabla 10.** Cuenta Viable de microorganismos (UFC•mL<sup>-1</sup>) en logaritmo base de 10, desviación estándar y coeficiente de por cada morfología presuntiva.  
Elaboración propia.

Puntos de muestreo	<i>Salmonella spp.</i>						<i>Shigella spp.</i>						<i>E. coli</i>					
	Log (UFC•ml-1) M1	Log (UFC•ml-1) M2	Log (UFC•ml-1) M3	Media	Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)	Log (UFC•ml-1) M1	Log (UFC•ml-1) M2	Log (UFC•ml-1) M3	Media	Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)	Log (UFC•ml-1) M1	Log (UFC•ml-1) M2	Log (UFC•ml-1) M3	Media	Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)
1	0.00	3.18	4.70	2.63	2.40	91.33	5.90	4.60	5.56	5.35	0.67	12.58	4.60	4.08	0.00	2.89	2.52	87.07
2	0.00	4.18	4.70	2.96	2.58	87.05	5.81	4.70	6.54	5.68	0.93	16.34	5.48	4.85	0.00	3.44	3.00	87.09
3	5.30	2.70	0.00	2.67	2.65	99.40	5.48	4.60	5.46	5.18	0.50	9.67	5.70	5.30	5.30	5.43	0.23	4.23
4	4.00	3.40	0.00	2.47	2.16	87.46	5.54	4.30	4.48	4.77	0.67	14.09	4.48	4.00	4.00	4.16	0.28	6.62
5	0.00	3.48	0.00	1.16	2.01	173.21	4.61	4.78	4.00	4.46	0.41	9.18	4.48	3.70	0.00	2.73	2.39	87.77
6	0.00	4.51	4.78	3.09	2.68	86.71	5.85	5.20	5.41	5.49	0.33	5.95	5.60	4.60	0.00	3.40	2.99	87.84
7	0.00	4.45	0.00	1.48	2.57	173.21	4.23	5.00	4.60	4.61	0.38	8.35	5.00	4.38	0.00	3.13	2.73	87.17

### 5.2.1 Determinación de microorganismos en el primer muestreo

La cuenta viable de las unidades formadoras de colonias ( $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de los microorganismos aislados fue determinada en los medios Agar SS, Agar EMB y Agar TCBS. En la figura 7 se muestra el comparativo en unidades logarítmicas de la carga microbiana obtenida en las tres condiciones nutricionales probadas. Durante el primer muestreo no hubo cuenta viable en el medio Agar TCBS (Tabla 9), en los medios Agar SS y Agar EMB se encontraron valores similares en la cantidad de microorganismos presentes en el punto de muestreo 4, la mayor cantidad de microorganismos se obtuvo en el medio de cultivo Agar SS en el punto 5 con un  $\log_{10} (\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}) = 6.46$  (Tabla 9 y figura 7).



**Figura 7.** Comparación de la carga bacteriana obtenida en el primer muestreo en dos condiciones nutricionales.  
Elaboración propia, 2023.

En el primer muestreo en medio Agar SS se observó la presencia de colonias con morfologías correspondientes a *Shigella* spp en todos los puntos de muestreo, mientras que las morfologías correspondientes a *Salmonella* spp sólo se encontraron en los puntos 3 con un  $\text{Log } 10 (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 5.30$  y para el punto 4 un  $\text{Log } 10 (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 4.0$  (tabla 10).

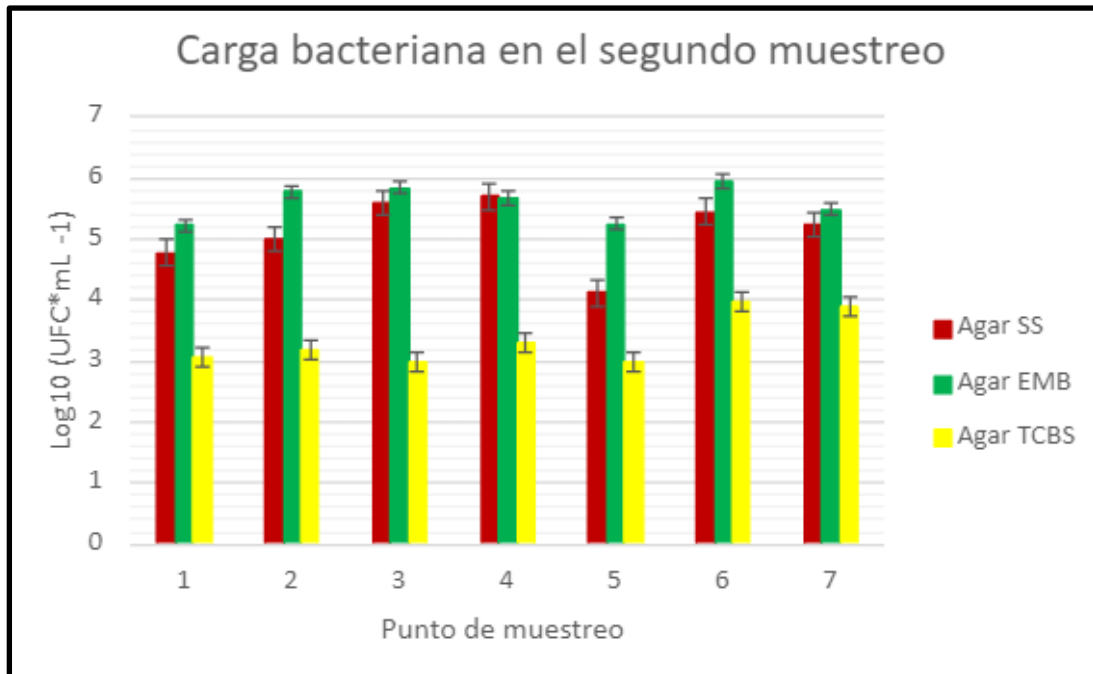
En Agar EMB durante el primer muestreo se observó la presencia de colonias con morfología correspondiente a *E. coli* en todos los puntos de muestreo con un valor máximo de  $\text{Log } 10 (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 5.70$  en el tercer punto de muestreo y un valor mínimo de  $\text{Log } 10 (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 4.48$  en los puntos 4 y 5 (tabla 10).

### **5.2.2 Determinación de microorganismos en el segundo muestreo**

Los resultados del segundo muestreo indicaron que en el medio de cultivo agar SS, se obtuvo un valor máximo de  $\text{Log } 10 (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 5.70$  en el punto 4, y el menor fue de  $\text{Log } 10 (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 4.11$  en el punto 5 (Tabla 9). Para el medio EMB los valores de las unidades formadoras de colonias de los microorganismos aislados siguieron un patrón similar a las del primer muestreo, el valor mínimo obtenido fue en el primer punto de muestreo con un  $\text{Log } 10 (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 5.23$  y un valor máximo de  $\text{Log } 10 (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 5.95$  en el punto 6. En agar TCBS se observó crecimiento de colonias en la mayoría de los puntos de muestreo, encontrándose la mínima cantidad en los puntos 3 y 5 con un  $\text{Log } 10 (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 3.0$ , el punto con la mayor cantidad de colonias en el punto 6 con un  $\text{Log } 10 (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 3.99$  (tabla 9). Los resultados en logaritmos base 10 de las ( $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) de los microorganismos aislados y presentados en la tabla 9 fueron graficados (Figura 8).

En la figura 8 se muestra el comparativo de la carga microbiana en las tres condiciones nutricionales probadas, en los medios Agar SS y Agar EMB. Durante el segundo muestreo se observó una mayor cantidad de microorganismos en el medio Agar EMB con un máximo valor del  $\text{Log } 10 (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 5.95$ , este medio de cultivo no es selectivo diferencial en comparación con el Agar SS y el Agar TCBS, por lo que permitió el crecimiento de la mayoría de las enterobacterias, incluyendo entre ellas a *Proteus* spp. y *E. coli*. Para el caso del medio de cultivo selectivo diferencial Agar TCBS se obtuvieron valores menores de las unidades

formadoras de colonias con un del Log 10 (UFC•mL<sup>-1</sup>) = 3.99 correspondientes a las especies pertenecientes al género *Vibrio* spp.



**Figura 8.** Comparación de la carga bacteriana obtenida en el segundo muestreo en tres condiciones nutricionales.  
Elaboración propia, 2023.

En el medio Agar SS se observó la presencia de morfologías coloniales correspondientes a *Salmonella* spp. en todos los puntos de muestreo en menor cantidad con respecto a las morfologías correspondientes a *Shigella* spp., para el caso de la bacteria *Salmonella* spp., se obtuvo un valor mínimo de Log 10 (UFC•mL<sup>-1</sup>) = 2.70 para el punto 3 y un valor máximo de Log 10 (UFC•mL<sup>-1</sup>) = 4.51 para el punto 6, mientras que el valor mínimo para morfologías de *Shigella* spp fue de Log 10 (UFC•mL<sup>-1</sup>) = 4.30 para el punto 4 y el máximo valor se encontró en el punto 6 con Log 10 (UFC•mL<sup>-1</sup>) = 5.20 (tabla 10).

En todos los puntos de muestreo hubo presencia de *E. coli*, obteniendo un valor mínimo de Log 10 (UFC•mL<sup>-1</sup>) = 3.70 en el punto 5 de muestreo y un máximo Log 10 (UFC•mL<sup>-1</sup>) = 5.30 en el tercer sitio de muestreo y (Tabla 10).

### 5.2.3 Determinación de microorganismos en el tercer muestreo

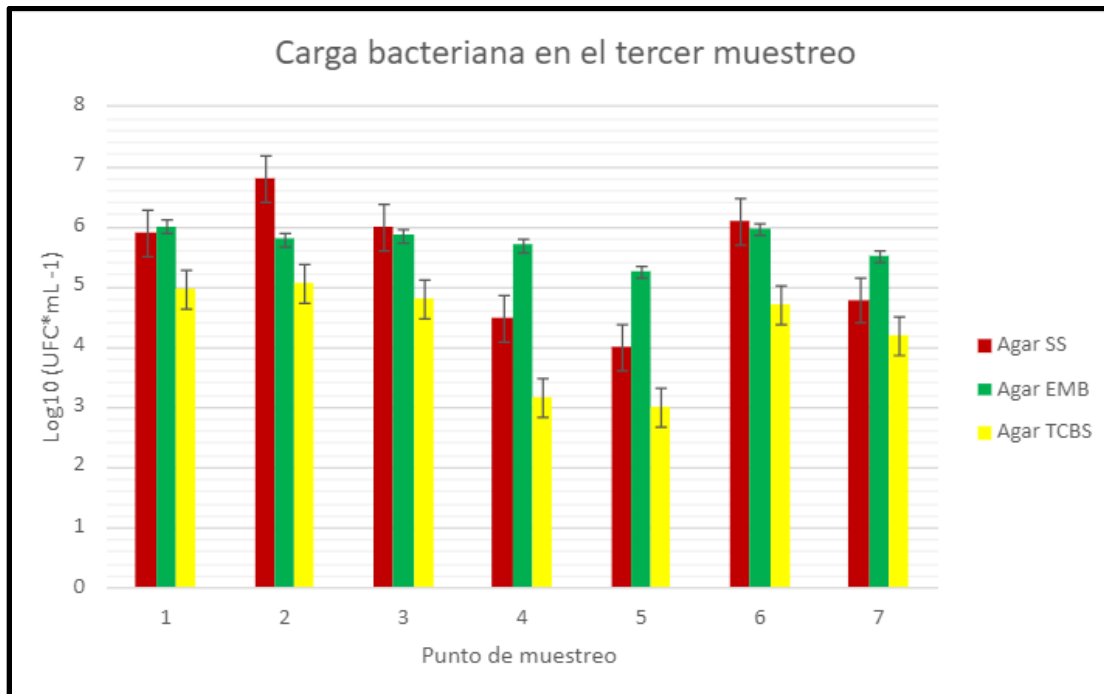
En el tercer muestreo los valores del Log 10 (UFC\*mL<sup>-1</sup>) en los medios de cultivo probados se mantuvieron cercanas a las obtenidas en el segundo muestreo con un ligero incremento en el Log 10 (UFC\*mL<sup>-1</sup>) en Agar TCBS, presentando un valor máximo en el punto 2 con un Log 10 (UFC\*mL<sup>-1</sup>) = 5.05 y un valor mínimo de Log 10 (UFC\*mL<sup>-1</sup>) = 3.0 en el quinto sitio, para el agar EMB se obtuvieron valores similares en casi todos los puntos de muestreo, siendo el de mayor cantidad el primer punto con un Log 10 (UFC\*mL<sup>-1</sup>) = 6.0 y el de menor cantidad el punto 5 con un Log 10 (UFC\*mL<sup>-1</sup>) = 5.25. En agar SS el valor mínimo se observó en el sitio 5 con un Log 10 (UFC\*mL<sup>-1</sup>) = 4.0, siendo ligeramente menor al valor mínimo obtenido en el segundo muestreo con un Log 10 (UFC\*mL<sup>-1</sup>) = 4.11 en el mismo punto de muestreo, y presentando un valor máximo de Log 10 (UFC\*mL<sup>-1</sup>) = 6.80 en el segundo punto (tabla 9).

Las morfologías correspondientes a *Salmonella* spp. fueron aisladas solamente en los puntos 1, 2 y 6, el mínimo valor de su presencia fue Log 10 (UFC\*mL<sup>-1</sup>) = 4.70 para los puntos 1 y 2 y su máximo valor para *Salmonella* spp. fue de Log 10 (UFC\*mL<sup>-1</sup>) = 4.78 en el punto 6, mientras que para *Shigella* spp. se observaron en todos los puntos de muestreo, con valores que iban desde Log 10 (UFC\*mL<sup>-1</sup>) = 4.0 en el punto 5 hasta Log 10 (UFC\*mL<sup>-1</sup>) = 6.54 en el segundo punto, valor superior a los obtenidos en el primer y segundo muestreo (tabla 10).

En el caso de la bacteria *E. coli* sólo se encontró presente en los puntos 3 y 4, con un valor de Log 10 (UFC\*mL<sup>-1</sup>) = 5.30 y Log 10 (UFC\*mL<sup>-1</sup>) = 4.0 respectivamente (tabla 10).

En la figura 9 se muestra el comparativo de la carga microbiana en las tres condiciones nutricionales probadas durante el tercer muestreo, en los tres medios de cultivo se presentó crecimiento bacteriano, pero en el medio Agar TCBS hubo una menor cantidad del Log 10 (UFC\*mL<sup>-1</sup>) en todos los sitios de muestreo. Los medios Agar SS y Agar EMB presentaron valores similares en los sitios de muestreo 1, 3 y 6, mientras que en los puntos 2, 4, 5 y 7 hubo una diferencia notable en cuanto al Log 10 (UFC\*mL<sup>-1</sup>) en los medios de cultivo. La mayor cantidad de

microorganismos se encontró en el medio de cultivo Agar SS en el segundo punto de muestreo con un  $\text{Log}_{10} (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}) = 6.54$  (tabla 10 y figura 9).



**Figura 9.** Comparación de la carga bacteriana obtenida en el segundo muestreo en tres condiciones nutricionales.  
Elaboración propia, 2023.

### 5.3 Selección de cepas de microorganismos patógenos de interés

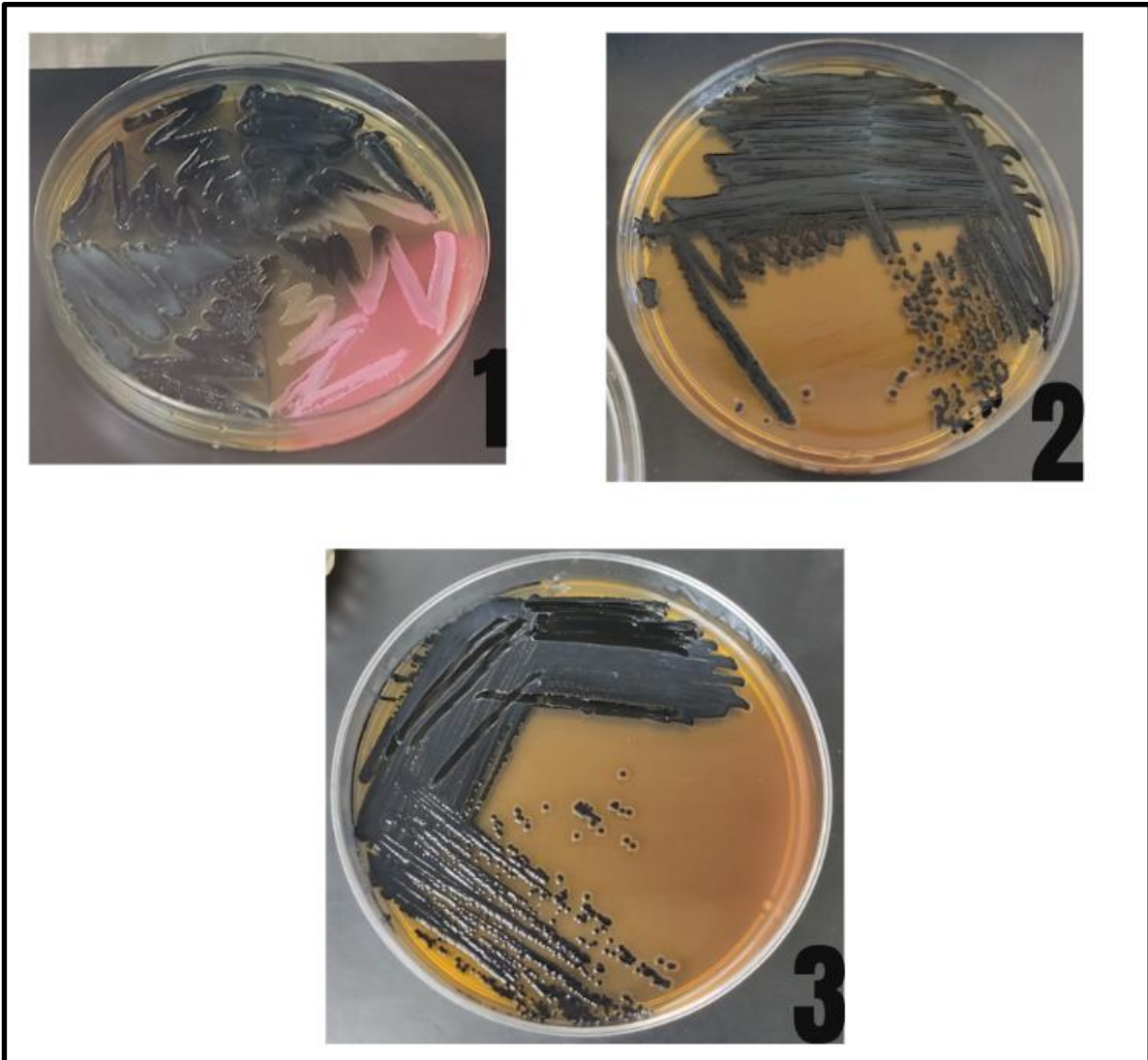
En las condiciones nutricionales empleadas en esta investigación se seleccionaron cepas de bacterias correspondientes a bacterias patógenas de interés que son causantes de enfermedades gastrointestinales y que pueden ser transmitidos por el agua contaminada: *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Vibrio Cholerae*.

Se aislaron 51 cepas, las morfologías de las cepas seleccionadas fue de acuerdo las descripciones de las fichas técnicas de los medios de cultivo empleados (tabla 11).

**Tabla 11.** Morfologías coloniales de interés aisladas en cada medio de cultivo.  
Elaboración propia.

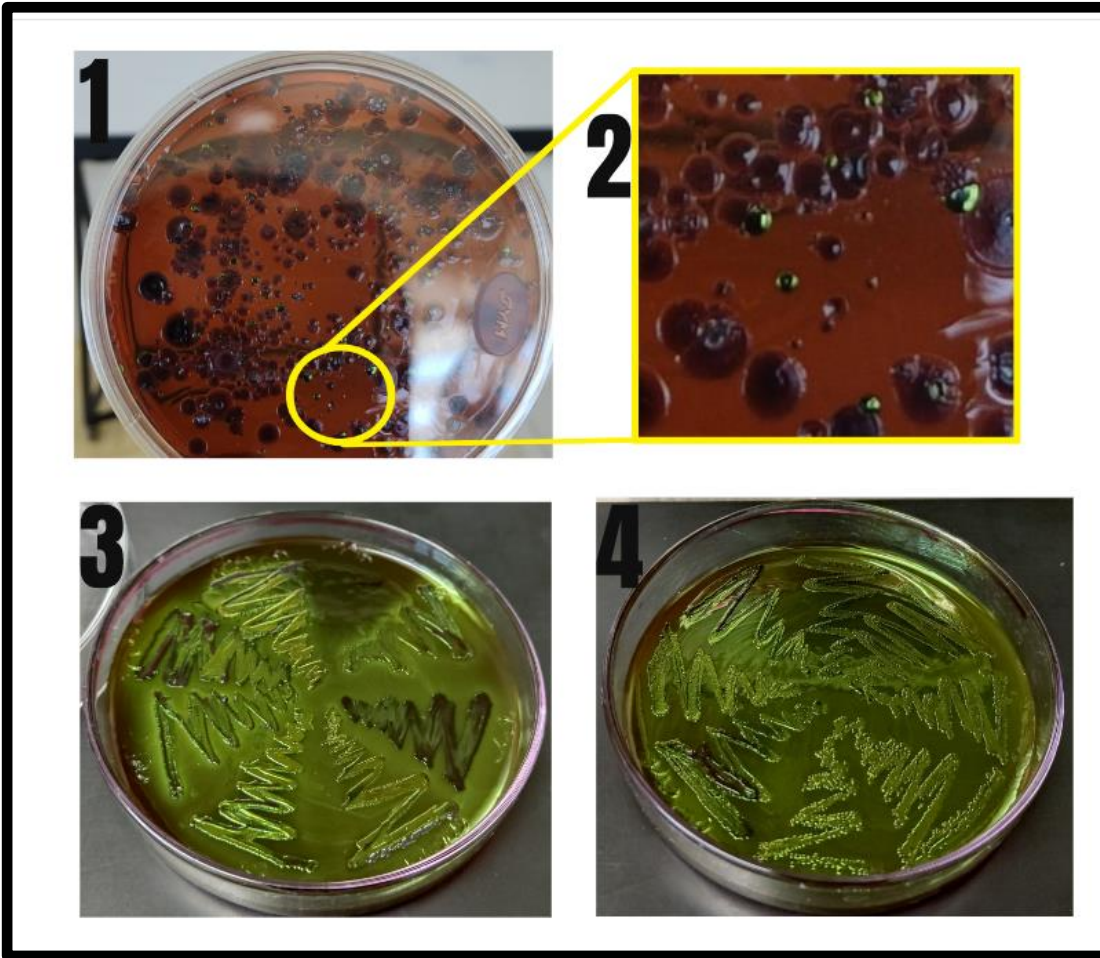
<b>Morfología</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Microorganismo aislado según ficha técnica del medio de cultivo</b>
Pequeña, irregular con borde ondulado, opaca con coloración negra sin brillo, lisa, elevada y suave	Agar SS	<i>Salmonella</i> spp.
Pequeña, circular con borde entero, opaca sin pigmentación, lisa, convexa y mucoide	Agar SS	<i>Shigella</i> spp.
Pequeña, irregular con borde ondulado, opaca con pigmentación amarilla, lisa, plana y suave	Agar TCBS	<i>Vibrio cholerae</i>
Puntiforme, circular con borde entero, opaca, brillante con pigmentación verde, lisa, plana y suave	Agar EMB	<i>E. coli</i>

En agar SS se seleccionaron morfologías correspondientes a bacterias del género *Salmonella* y *Shigella*, de acuerdo con la ficha técnica del medio de cultivo empleado las colonias incoloras corresponden a *Shigella* spp. o *Salmonella* spp. no productora de ácido sulfhídrico y las colonias negras corresponden a *Salmonella* spp. o enterobacterias productoras de ácido sulfhídrico estas fueron aisladas mediante estría cruzada hasta obtener colonias puras (Figura 10).



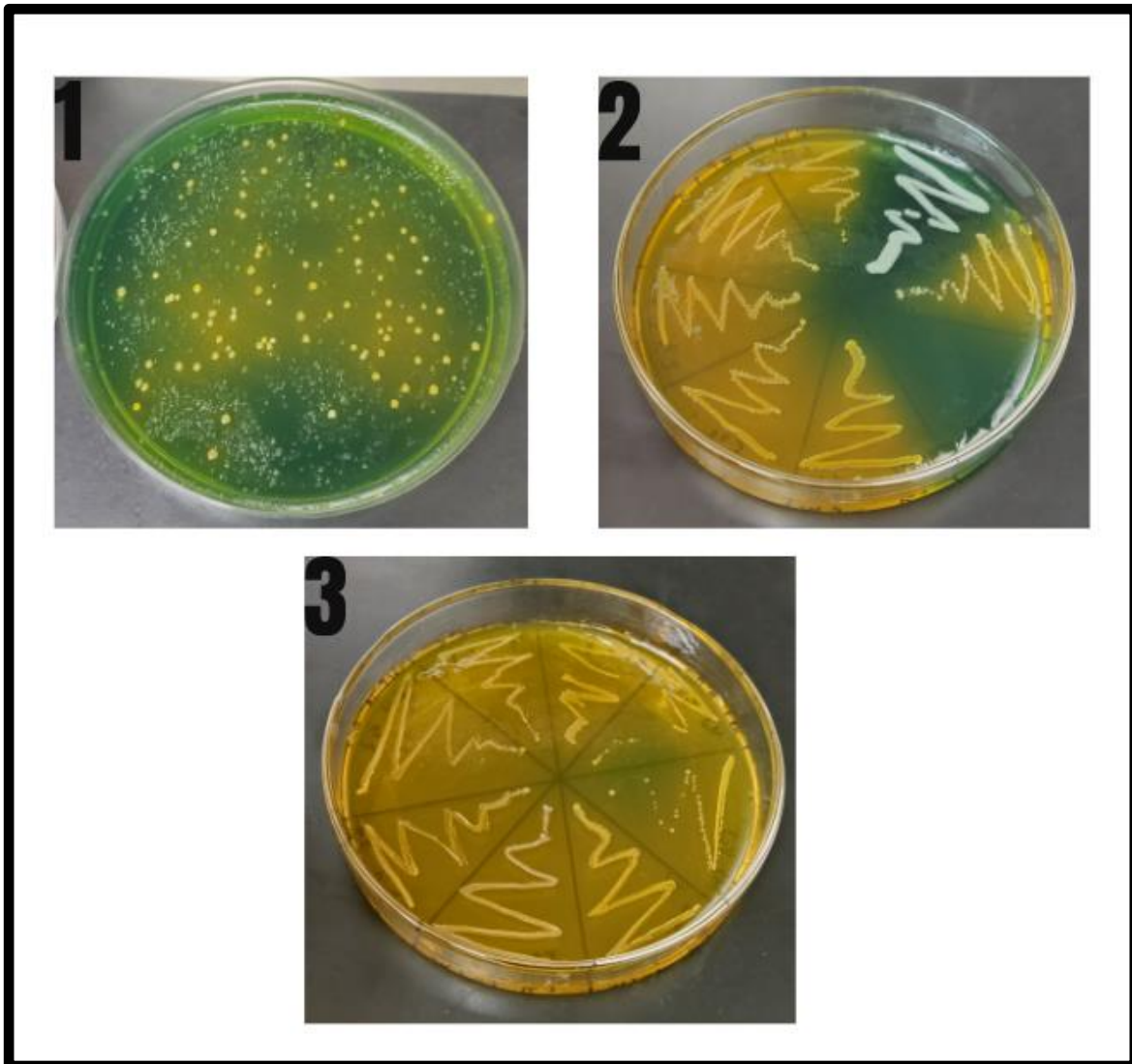
**Figura 10.** Aislamiento de colonias con morfología correspondiente a *Salmonella* spp. productora de ácido sulfhídrico en agar SS (cepa M6Sa5). 1) Sembrado en cola de ratón de las colonias de interés. 2) Aislamiento mediante estría cruzada de una cepa pura productora de ácido sulfhídrico. 3) Colonias puras productoras de ácido sulfhídrico.

En el medio EMB se seleccionaron las colonias verdes metálico, correspondientes, según la ficha técnica, a *E. coli* que produce este color debido a la fermentación de lactosa (Figura 11).



**Figura 11.** Aislamiento de morfologías coloniales correspondientes a *E. coli* en agar EMB.  
1) Colonia seleccionada en placa con cultivo masivo mediante diluciones seriadas. 2) Acercamiento a las colonias mediante zoom digital. 3,4) Cultivo puro sembrado mediante la técnica de sembrado cola de ratón.

Las morfologías correspondientes a *Vibrio cholerae* en el medio de cultivo TCBS presentan una coloración amarilla debido a su capacidad fermentativa de la sacarosa, virando por su producción de ácido y gas (Figura 12).



**Figura 12.** Aislamiento de morfologías coloniales correspondientes a *Vibrio cholerae* en agar TCBS. 1) Colonia seleccionada en placa con cultivo masivo mediante diluciones seriadas. 2) Cultivo puro mediante la técnica de sembrado por cola de ratón de cepas de *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus*. 3) Cultivos puros de cepas de *Vibrio cholerae*

#### 5.4 Pruebas de resistencia a antibióticos

Para el análisis de resistencia a los antibióticos se seleccionaron 41 cepas de un total de 51 bacterias aisladas, los cuales incluyen bacterias patógenas de los géneros *Salmonella*, *Shigella*, así como *Vibrio cholerae* y *E. coli* en la tabla 12 se muestran los microorganismos seleccionados y su punto de aislamiento.

**Tabla 12.** Morfologías coloniales de interés aisladas en cada medio de cultivo.  
Elaboración propia.

Número	Nombre de la cepa	Punto de aislamiento en el río	Muestreo	Microorganismo
1	M1Sh3	1	1	<i>Shigella</i> sp.
2	M1Sh4	1	1	<i>Shigella</i> sp.
3	M1Sh7	1	1	<i>Shigella</i> sp.
4	M1Sh5	1	2	<i>Shigella</i> sp.
5	M1Sa8	1	3	<i>Salmonella</i> sp.
6	M2Ec2	2	2	<i>E. coli</i>
7	M2Ec3	2	2	<i>E. coli</i>
8	M2Ec4	2	2	<i>E. coli</i>
9	M2VC1	2	2	<i>Vibrio cholerae</i>
19	M2Sh6	2		<i>Shigella</i> sp.
11	M2Sa3	2		<i>Salmonella</i> sp.
12	M3Sa1	3	1	<i>Salmonella</i> sp.
13	M3Sa4	3		<i>Salmonella</i> sp.
14	M3Sa5	3	2	<i>Salmonella</i> sp.
15	M3Sa6	3	2	<i>Salmonella</i> sp.
16	M3Sa8	3	2	<i>Salmonella</i> sp.
17	M3Ec1	3	1	<i>E. coli</i>
18	M3Sh3	3	3	<i>Shigella</i> sp.
19	M3Sh4	3	2	<i>Shigella</i> sp.
20	M3Sh6	3	2	<i>Shigella</i> sp.
21	M4Sa1	4	1	<i>Salmonella</i> sp.
22	M4Sa2	4	2	<i>Salmonella</i> sp.

23	M4Sa3	4	3	<i>Salmonella</i> sp.
24	M4Sa7	4	2	<i>Salmonella</i> sp.
25	M4Sh3	4	2	<i>Shigella</i> sp.
26	M4Sh5	4	3	<i>Shigella</i> sp.
27	M5Ec1	5	2	<i>E. coli</i>
28	M5Vc6	5	3	<i>E. coli</i>
29	M6Sh1	6	1	<i>Shigella</i> sp.
30	M6Sh2	6	2	<i>Shigella</i> sp.
31	M6Sh3	6	2	<i>Shigella</i> sp.
32	M6Sh6	6	1	<i>Shigella</i> sp.
33	M6Vc3	6	2	<i>Vibrio cholerae</i>
34	M6Sa5	6	3	<i>Salmonella</i> sp.
35	M6Sa6	6	2	<i>Salmonella</i> sp.
36	M6Sa7	6	2	<i>Salmonella</i> sp.
37	M7Sa1	7	2	<i>Salmonella</i> sp.
38	M7Sa2	7	3	<i>Salmonella</i> sp.
39	M7Sa3	7	3	<i>Salmonella</i> sp.
40	M7Sh1	7	3	<i>E. coli</i>
41	M7Sh2	7	2	<i>Shigella</i> sp.

Los resultados muestran que 20 cepas fueron resistentes a 7 o más antimicrobianos, siendo las cepas con mayor resistencia M4Sa3, M7Sa3 y M5Vc6, resistentes a 11 de los 12 antimicrobianos probados, y las cepas más susceptibles fueron M3Sa1 y M4Sa1, siendo sensibles a 9 de los 12 antimicrobianos empleados (tabla 13).

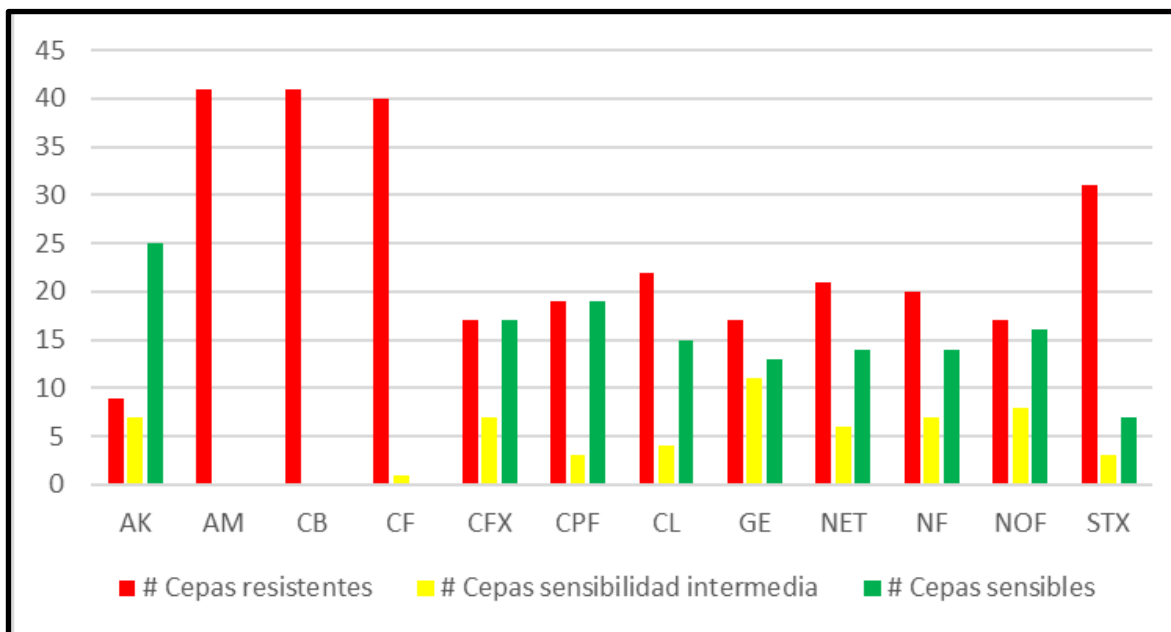
Los antibióticos a los que las bacterias presentaron menor resistencia fueron: Amikacina (9 cepas resistentes), Cefotaxima (17 cepas resistentes), Gentamicina (17 cepas resistentes) y Norfloxacino (17 cepas resistentes). Los antibióticos a los que las bacterias presentaron una mayor resistencia fueron: Ampicilina (41 cepas resistentes), Carbenicilina (41 cepas resistentes) y Cefalotina (40 cepas resistentes) (tabla 13).

La medida de los halos de inhibición se muestra en la tabla 13, las cepas sensibles presentan halos de inhibición  $\geq 0.5$  a  $0.3$  cm, las cepas intermedias presentan un halo de inhibición entre  $0.2$  cm y las cepas resistentes muestran halos de inhibición  $\leq 0.1$ cm.

**Tabla 13.** Prueba de resistencia a antimicrobianos en las cepas aisladas.  
Elaboración propia.

Cepa	Antibiótico (Halo de inhibición) (cm)											
	AK	AM	CB	CF	CFX	CPF	CL	GE	NET	NF	NOF	STX
M1Sh3	S (0.5)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.5)	R (0)	S (0.5)	S (0.5)	R (0)	S (0.5)	R (0)
M1Sh4	S (0.4)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.4)	R (0)	S (0.5)	S (0.5)	R (0)	S (0.5)	R (0)
M1Sh7	S (0.4)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.4)	R (0)	R (0.1)	R (0)	R (0)	S (0.5)	R (0)
M1Sh5	S (0.3)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.3)	R (0)	I (0.2)	S (0.4)	R (0)	S (0.4)	R (0)
M1Sa8	R (0.1)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0.1)	S (0.3)	S (0.3)	R (0.1)	R (0.1)	R (0)	I (0.2)	I (0.2)
M2Ec2	S (0.4)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.5)	R (0)	R (0)	S (0.3)	S (0.5)	R (0)	R (0)
M2Ec3	I (0.2)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0.1)	R (0)	S (0.4)	I (0.2)	R (0.1)	S (0.3)	I (0.2)	R (0)
M2Ec4	S (0.3)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.5)	R (0)	S (0.4)	R (0.1)	I (0.2)	S (0.3)	I (0.2)
M2VC1	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.3)	S (0.5)	R (0.1)	R (0)	S (0.5)	S (0.3)	I (0.2)
M2Sh6	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.3)	R (0)	S (0.4)	I (0.2)	S (0.3)	I (0.2)	R (0)
M2Sa3	S (0.3)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.3)	R (0)	I (0.2)	S (0.3)	S (0.4)	S (0.3)	S (0.3)
M3Sa1	S (0.4)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.5)	S (0.5)	S (0.5)	S (0.3)	S (0.3)	S (0.3)	S (0.5)
M3Sa4	R (0.1)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.3)	R (0)	I (0.2)	R (0)	R (0)
M3Sa5	S (0.4)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.5)	S (0.4)	I (0.2)	S (0.3)	R (0.1)	S (0.3)
M3Sa6	S (0.3)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.5)	R (0.1)	S (0.5)	S (0.3)	S (0.3)	S (0.4)	R (0.1)
M3Sa8	S (0.4)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.4)	S (0.3)	S (0.3)	I (0.2)	I (0.2)	S (0.3)	I (0.2)
M3Ec1	S (0.3)	R (0)	R (0)	R (0.1)	I (0.2)	R (0)	S (0.4)	S (0.3)	R (0.1)	S (0.5)	R (0.1)	S (0.5)
M3Sh3	R (0.1)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.4)	S (0.4)	R (0.1)	I (0.2)	R (0)	R (0)	S (0.3)	R (0)
M3Sh4	S (0.3)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.3)	I (0.2)	S (0.4)	S (0.3)	S (0.3)	R (0)	S (0.3)
M3Sh6	S (0.4)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.4)	R (0)	S (0.4)	R (0.1)	I (0.2)	S (0.3)	R (0)
M4Sa1	S (0.3)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.5)	S (0.4)	S (0.4)	S (0.3)	S (0.3)	S (0.3)	S (0.4)
M4Sa2	S (0.3)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.4)	S (0.3)	R (0)	R (0)	R (0)	I (0.2)	R (0)
M4Sa3	I (0.2)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0.1)	R (0)
M4Sa7	S (0.3)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	I (0.2)	R (0.1)	R (0.1)	I (0.2)	I (0.2)	I (0.2)	I (0.2)
M4Sh3	S (0.3)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	I (0.2)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.3)	I (0.2)
M4Sh5	S (0.3)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.4)	R (0)	R (0.1)	S (0.3)	R (0)	R (0.1)
M5Ec1	S (0.3)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.3)	S (0.4)	S (0.3)	I (0.2)	I (0.2)	I (0.2)	S (0.3)
M5Vc6	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0.1)	I (0.2)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0.1)
M6Sh1	S (0.5)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	I (0.2)	S (0.3)	S (0.3)	S (0.3)	I (0.2)	R (0)	S (0.3)
M6Sh2	R (0.1)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	I (0.2)	I (0.2)	R (0)	R (0.1)	R (0.1)	R (0)	I (0.2)
M6Sh3	S (0.3)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.4)	R (0.1)	R (0)	I (0.2)	R (0)	I (0.2)	R (0)
M6Sh6	S (0.3)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (0.3)	R (0)	S (0.3)	S (0.3)	R (0)	S (0.4)

De las 41 cepas estudiadas en el análisis de resistencia o sensibilidad a los antibióticos, todas mostraron ser resistentes a Ampicilina y Carbenicilina, 40 cepas fueron resistentes al antibiótico Cefalotina y 31 cepas fueron resistentes a Sulfametoxazol. El antibiótico al que las cepas mostraron tener una sensibilidad intermedia fue la Gentamicina con 11 cepas, seguido de Norfloxacino con 8 cepas. El antibiótico más efectivo contra las cepas probadas fue la Amikacina con 25 cepas sensibles, 7 intermedias y 9 resistentes, seguido de Ciprofloxacino con 19 cepas sensibles, 3 intermedias y 19 resistentes y de Cefotaxima con 17 cepas sensibles, 7 intermedias y 17 resistentes (Figura 13).



**Figura 13.** Número de cepas resistentes, con sensibilidad intermedia y sensible para cada antimicrobiano probado. Elaboración propia, 2024.

## 5.5 Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico los datos fueron agrupados tomando en cuenta los medios de cultivo empleados, con la finalidad de conocer si las medias obtenidas entre los muestreos de las unidades formadoras de colonias en las condiciones nutricionales probadas eran diferentes en cada periodo de muestreo, para lo cual los datos se sometieron a la prueba de Shapiro-Wilk esto debido a que cada grupo

comprendía menos de 30 datos, los resultados en medio agar SS indicaron una distribución normal con  $p \geq 0.050$  (Tabla 14).

**Tabla 14.** Prueba de Shapiro-Wilk en muestras procesadas en Agar SS  
Elaboración propia empleando los datos de la Tabla 9 recopilados y analizados en IBM SPSS Statistics.

	<b>Estadístico</b>	<b>Grados de libertad (gl)</b>	<b>Significancia (Sig.)</b>
Log10 UFC*mL <sup>-1</sup> (M1)	0.853	7	0.130
Log10 UFC*mL <sup>-1</sup> (M2)	0.923	7	0.492
Log10 UFC*mL <sup>-1</sup> (M3)	0.931	7	0.556

M1= Muestreo 1

M2= Muestreo 2

M3= Muestreo 3

Nota. En la prueba Shapiro-Wilk en Agar SS, se determina una Hipótesis Nula H<sub>0</sub>=datos tienen distribución normal y una Hipótesis Alternativa H<sub>A</sub>=datos NO tienen una distribución normal, donde si  $p < 0.050$  se rechaza H<sub>0</sub> y se acepta H<sub>A</sub> y si  $p \geq 0.050$  aceptamos H<sub>0</sub> y rechazamos H<sub>A</sub>.

Al realizar la prueba de Shapiro-Wilk para las muestras procesadas en el medio de cultivo en Agar EMB, se obtuvieron los siguientes resultados, dos muestreos tuvieron valores para  $p \geq 0.050$  y un muestreo con un valor para  $p < 0.050$  (Tabla 15).

**Tabla 15.** Prueba de Shapiro-Wilk en muestras procesadas en Agar EMB  
Elaboración propia empleando los datos de la tabla 9 recopilados y analizados en IBM SPSS Statistics.

	<b>Estadístico</b>	<b>Grados de libertad (gl)</b>	<b>Significancia (Sig.)</b>
Log10 UFC*mL <sup>-1</sup> (M1)	0.759	7	0.016
Log10 UFC*mL <sup>-1</sup> (M2)	0.910	7	0.398

Log10 UFC*mL <sup>-1</sup> (M3)	0.933	7	0.579
------------------------------------	-------	---	-------

M1= Muestreo 1

M2= Muestreo 2

M3= Muestreo 3

Nota. En la prueba Shapiro-Wilk en Agar EMB, se determina una Hipótesis Nula H0=datos tienen distribución normal y una Hipótesis Alternativa HA=datos NO tienen una distribución normal, donde si  $p < 0.050$  se rechaza H0 y se acepta HA y si  $p \geq 0.050$  se acepta H0 y es rechazada HA.

Para realizar la prueba de Shapiro-Wilk en medio Agar TCBS no se emplearon los datos del primer muestreo debido a que no se observó crecimiento de Unidades Formadoras de Colonias en este medio, por lo cual se utilizaron los resultados del segundo y tercer muestreo para realizar las pruebas de normalidad, los resultados indicaron que los datos del segundo muestreo tuvieron un valor para  $p < 0.050$  y los del tercer muestreo un valor para  $p \geq 0.050$  (Tabla 16), por lo que en este caso se optó por utilizar pruebas NO paramétricas, debido a que los resultados no presentaban una distribución normal.

**Tabla 16.** Prueba de Shapiro-Wilk en muestras procesadas en Agar TCBS  
Elaboración propia empleando los datos de la tabla 9 recopilados y analizados en IBM SPSS Statistics.

	Estadístico	Grados de libertad (gl)	Significancia (Sig.)
Log10 UFC*mL <sup>-1</sup> (M1)	.	7	.
Log10 UFC*mL <sup>-1</sup> (M2)	0.796	7	0.038
Log10 UFC*mL <sup>-1</sup> (M3)	0.826	7	0.074

. =Sin datos relevantes

M1= Muestreo 1

M2= Muestreo 2

M3= Muestreo 3

Nota. En la prueba Shapiro-Wilk en Agar TCBS, se determina una Hipótesis Nula H0=datos tienen distribución normal y una Hipótesis Alternativa HA=datos NO tienen una distribución normal, donde si  $p < 0.050$  se rechaza H0 y se acepta HA y si  $p \geq 0.050$  aceptamos H0 y rechazamos HA.

### 5.5.1 Prueba de muestras pareadas para el medio agar SS

Los datos de los logaritmos en base de 10 de las Unidades Formadoras de Colonias ( $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) obtenidos durante los tres muestreos (M1, M2 Y M3) en el medio Agar SS se sometieron a pruebas de muestras emparejadas para investigar si las medias presentaban una diferencia significativa (Tabla 17) por lo que en este caso se estableció que:

La hipótesis Nula  $H_0$ = Las medias son iguales y no hay diferencia significativa entre los logaritmos base 10 de las unidades formadoras de colonias entre los muestreos durante los tres periodos del año [ $\text{Log}_{10} \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  (M1),  $\text{Log}_{10} \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  (M2), y  $\text{Log}_{10} \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  (M3)].

La Hipótesis Alternativa  $H_A$ = Las medias son diferentes por lo que sí existe diferencia significativa entre los logaritmos base 10 de las unidades formadoras de colonias entre los muestreos durante los tres periodos del año [ $\text{Log}_{10} \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  (M1),  $\text{Log}_{10} \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  (M2), y  $\text{Log}_{10} \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  (M3)].

Si  $p \geq 0.050$  se acepta  $H_0$  y se rechaza  $H_A$  y si  $p < 0.050$  se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_A$ , con esta información y objetivos establecidos se realizaron las pruebas pareadas obteniendo que  $p$  de dos factores para cada emparejamiento fue mayor a 0.050, por lo que se rechaza  $H_A$  y se acepta  $H_0$ .

**Tabla 17.** Prueba de muestras emparejadas en medio Agar SS  
Elaboración propia empleando los datos de la tabla 9 recopilados y analizados en IBM SPSS Statistics.

		Diferencias emparejadas					t	gl	Significancia	
		Media	Desviación Estándar	Media de error	95% de intervalo de confianza de la diferencia				P de un factor	P de dos factores
					Inferior	Superior				
Par 1	Log10 UFC*mL <sup>-1</sup> (M1)- Log10 UFC*mL <sup>-1</sup> (M2)	0.64253	1.03240	0.39021	-0.31229	1.59735	1.647	6	0.075	0.151
Par 2	Log10 UFC*mL <sup>-1</sup> (M2)- Log10 UFC*mL <sup>-1</sup> (M3)	-0.30310	1.00720	0.38068	-1.23460	0.62840	-0.796	6	0.228	0.456
Par 3	Log10 UFC*mL <sup>-1</sup> (M1)- Log10 UFC*mL <sup>-1</sup> (M3)	0.33943	1.15793	0.43766	-0.73148	1.41033	0.776	6	0.234	0.467

M1= Muestreo 1  
M2= Muestreo 2  
M3= Muestreo 3

Por lo tanto, las medias son similares y no hay diferencia significativa entre los logaritmos en base 10 de los muestreos, con esto se concluye que en los tres periodos del año no varía significativamente la carga microbiana para el medio selectivo Agar SS entre los 7 puntos de muestreo.

### 5.5.2 Prueba de muestras pareadas para Agar EMB

Los datos de los Log10 de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC\*mL<sup>-1</sup>) obtenidos durante los tres muestreos en el medio Agar EMB se sometieron a

pruebas de muestras emparejadas para averiguar si las medias presentaban una diferencia significativa (Tabla 18), por lo que en este caso se estableció que:

La Hipótesis Alternativa H<sub>0</sub>= Las medias son iguales y no hay diferencia significativa entre los logaritmos en base de 10 de las unidades formadoras de colonias entre los muestreos durante los tres periodos del año [Log<sub>10</sub> UFC\*mL<sup>-1</sup> (M1), Log<sub>10</sub> UFC\*mL<sup>-1</sup> (M2), y Log<sub>10</sub> UFC\*mL<sup>-1</sup> (M3)].

Hipótesis Alternativa H<sub>A</sub>= Las medias son diferentes por lo que sí existe diferencia significativa entre los logaritmos base 10 de las unidades formadoras de colonias entre los muestreos durante los tres periodos del año [Log<sub>10</sub> UFC\*mL<sup>-1</sup> (M1), Log<sub>10</sub> UFC\*mL<sup>-1</sup> (M2), y Log<sub>10</sub> UFC\*mL<sup>-1</sup> (M3)].

Si  $p \geq 0.050$  se acepta H<sub>0</sub> y se rechaza H<sub>A</sub> y si  $p < 0.050$  se rechaza H<sub>0</sub> y se acepta H<sub>A</sub>, con esta información y objetivos establecidos se realizaron las pruebas pareadas obteniendo que p de dos factores para cada emparejamiento fue mayor a 0.050, por lo que se rechaza H<sub>A</sub> y se acepta H<sub>0</sub>.

**Tabla 18.** Prueba de muestras emparejadas en muestras procesadas en Agar EMB  
Elaboración propia empleando como fuente los datos de la tabla 17 recopilados y analizados en IBM SPSS Statistics.

		Diferencias emparejadas					t	gl	Significancia	
		Media	Desviación Estándar	Media de error	95% de intervalo de confianza de la diferencia				P de un factor	P de dos factores
					Inferior	Superior				
Par 1	Log <sub>10</sub> UFC*mL <sup>-1</sup> (M1)- Log <sub>10</sub> UFC*mL <sup>-1</sup> (M2)	0.0917 2	0.10463	0.395 5	- 0.0050 6	0.18849	2.319	6	0.030	0.060
Par 2	Log <sub>10</sub> UFC*mL <sup>-1</sup> (M2)- Log <sub>10</sub> UFC*mL <sup>-1</sup> (M3)	- 0.1099 4	0.29086	0.109 94	- 0.3789 4	0.15907	- 1.000	6	0.178	0.356

Par 3	Log10 UFC*mL <sup>-1</sup> (M1)- Log10 UFC*mL <sup>-1</sup> (M3)	- 0.0182 2	0.29723	0.112 34	- 0.2993 11	0.25667	- 0.256 67	6	0.438	0.876
----------	---	------------------	---------	-------------	-------------------	---------	------------------	---	-------	-------

M1= Muestreo 1  
M2= Muestreo 2  
M3= Muestreo 3

Por lo tanto, las medias son similares y no hay diferencia significativa entre los logaritmos en base 10 de los muestreos, con esto se concluye que en los tres periodos del año no varía significativamente la carga microbiana para el medio selectivo Agar EMB entre los 7 puntos de muestreo.

### 5.5.3 Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas para Agar TCBS

Los datos de los Log10 de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC\*mL<sup>-1</sup>) obtenidos durante los tres muestreos en el medio Agar TCBS se sometieron a un análisis con pruebas no paramétricas, se empleó la prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas, con el objetivo de investigar si la mediana presenta una diferencia significativa entre Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M1) - Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M2) (Tabla 19), Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M2) - Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M3) (Tabla 20) y Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M1) - Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M3) (Tabla 21), por lo que en este caso se establecieron tres hipótesis nulas y 3 hipótesis alternativas:

Primer caso de comparación Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M1) - Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M2)

H0= La mediana de diferencias entre Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M1) - Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M2) es igual a 0.

HA= La mediana de diferencias entre Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M1) - Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M2) no es igual a 0.

Segundo caso de comparación Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M2) - Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M3)

H0= La mediana de diferencias entre  $\text{Log}_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  (M2) -  $\text{Log}_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  (M3) es igual a 0.

HA= La mediana de diferencias entre  $\text{Log}_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  (M2) -  $\text{Log}_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  (M3) no es igual a 0.

Tercer caso de comparación  $\text{Log}_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  (M1) -  $\text{Log}_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  (M3)

H0= La mediana de diferencias entre  $\text{Log}_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  (M1) -  $\text{Log}_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  (M3) es igual a 0.

HA= La mediana de diferencias entre  $\text{Log}_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  (M1) -  $\text{Log}_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  (M3) no es igual a 0.

En los tres casos, se aplica que si  $p \geq 0.050$  se acepta H0 y se rechaza HA y si  $p < 0.050$  se rechaza H0 y se acepta HA, con esta información y objetivos establecidos se realiza prueba no paramétrica obteniendo que el valor de significancia es menor a 0.050, por lo que se rechaza H0 y se acepta HA.

**Tabla 19.** Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas  $\text{Log}_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  (M1) -  $\text{Log}_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  (M2) en Agar TCBS.  
Elaboración propia empleando los datos de la tabla 9 recopilados y analizados en IBM SPSS Statistics.

<b>N total</b>	<b>7</b>
Estadísticos de prueba	28.000
Error estándar	5.906
Estadístico de prueba estandarizado	2.371
Sig asintótica (Prueba bilateral)	0.018

**Tabla 20.** Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M2) - Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M3) en Agar TCBS  
Elaboración propia empleando los datos de la tabla 9 recopilados y analizados en IBM SPSS Statistics.

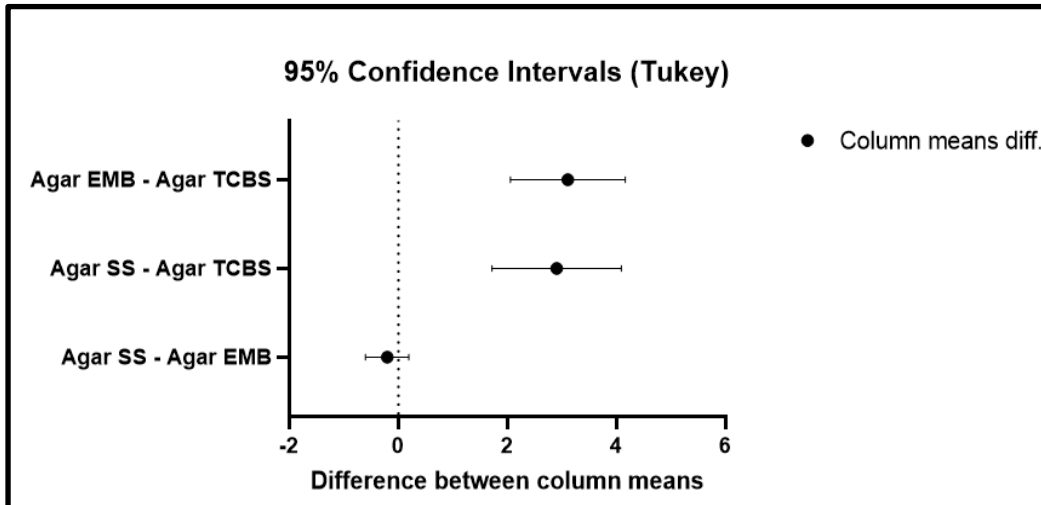
<b>N total</b>	<b>7</b>
Estadísticos de prueba	20.000
Error estándar	4.770
Estadístico de prueba estandarizado	1.992
Sig asintótica (Prueba bilateral)	0.046

**Tabla 21.** Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M1) - Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M3) en Agar TCBS  
Elaboración propia empleando datos de la tabla 9 recopilados y analizados en IBM SPSS Statistics.

<b>N total</b>	<b>7</b>
Estadísticos de prueba	0.000
Error estándar	5.916
Estadístico de prueba estandarizado	-2.366
Sig asintótica (Prueba bilateral)	0.018

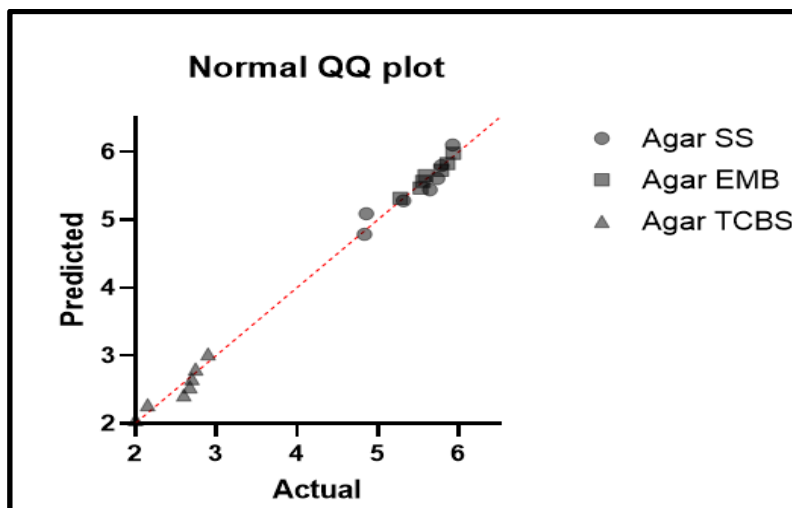
Al realizar las comparaciones de las medianas Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M1) - Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M2), Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M2) - Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M3) y Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M1) - Log10 UFC\*mL<sup>-1</sup> (M3) se encontró diferencia significativa entre las medianas en los tres periodos del año en la carga microbiana para el medio diferencial TCBS en los 7 puntos de muestreo.

Al realizar la prueba de Tukey, los resultados indicaron que en los medios Agar SS-EMB no se encontraron diferencias significativas, pero en el caso de los medios Agar SS-TCBS y Agar EMB-TCBS si se encontraron diferencias significativas (Figura 14).



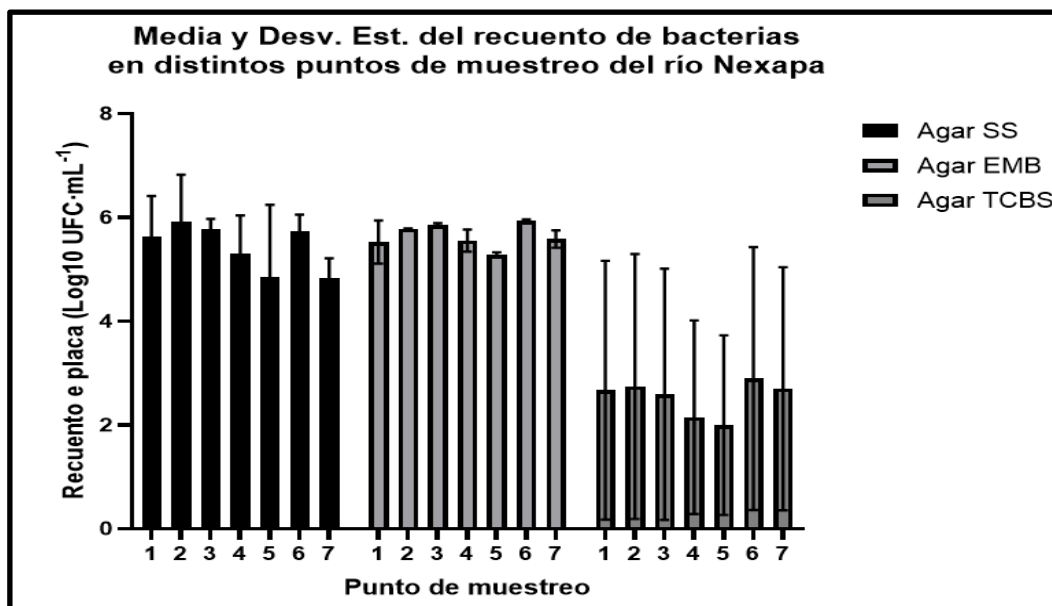
**Figura 14.** Prueba de Tukey para las condiciones nutricionales probadas.  
Elaboración propia

Al realizar la gráfica de las funciones cuantile de una muestra vs la de la otra Log 10 (UFC\*mL<sup>-1</sup>) obtenidos en cada medio de cultivo probado, se puede observar que los resultados para los medios Agar SS y EMB tienen una distribución similar en comparación con el medio TCBS (Figura 15).



**Figura 15.** Gráfica de las funciones cuantile de los medios de cultivo probados.  
Elaboración propia

Las medias y desviaciones estándar indican que en medio TCBS existe diferencia significativa con respecto a los medios Agar SS y EMB (Figura 16).



**Figura 16.** Media y desviación estándar para las condiciones nutricionales probadas.  
Elaboración propia

## 6. DISCUSIÓN

El río Nexapa atraviesa la ciudad de Izúcar de Matamoros y no cuenta con restricciones de acceso para los habitantes de la ciudad, por lo cual es necesario que las características fisicoquímicas y microbiológicas, sean adecuadas, ya que de lo contrario podría representar un peligro para la población.

La determinación de los parámetros fisicoquímicos evidenció que la temperatura osciló entre 16.6 °C y 30.7 °C, valores que se encuentran dentro de los límites permisibles para los ríos según la NOM-001-SEMARNAT-2021 donde se establece que el límite permisible es de 35 °C (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2021).

A pesar de que este rango de temperatura está por debajo de los límites permitidos, podría tener implicaciones significativas en la calidad y salud del ecosistema, se ha reportado que las variaciones en la temperatura influyen directamente en las tasas de crecimiento y actividad metabólica de los microorganismos presentes en el río (Morales, 2018). En el caso de temperaturas altas propician el crecimiento de organismos como algas nocivas y cianobacterias, lo que provoca una disminución en la capacidad del agua para retener oxígeno (Cantoral *et al.*, 2017). Mientras que, a bajas temperaturas, se ha observado que disminuye la velocidad de algunas reacciones químicas, por lo que pueden afectarse los procesos biogeoquímicos en el agua, la descomposición de la materia orgánica y la disponibilidad de nutrientes (De la Mora *et al.*, 2020).

Los resultados obtenidos con respecto al valor de enteropatógenos presentes en el agua revelan que, para *E. coli* se obtuvo un valor máximo de  $5 \times 10^5$  UFC\*mL<sup>-1</sup> (Log 10 UFC\*mL<sup>-1</sup> = 5.70) esta cantidad es mayor a la reportada Olivas-Enríquez y colaboradores en 2011 para el río Bravo con una cantidad de  $2.8 \times 10^4$  UFC\*mL<sup>-1</sup> (Log 10 UFC\*mL<sup>-1</sup> = 4.48), esto se puede deber a la contaminación del agua del río y a un tratamiento insuficiente de las aguas (Navarro y Cruz, 2023).

Para la bacteria *Salmonella* spp. se obtuvo un valor máximo de  $6 \times 10^4$  UFC\*mL<sup>-1</sup> (Log 10 UFC\*mL<sup>-1</sup> = 4.77), siendo este menor a lo reportado por Rojas *et al.* de  $8 \times 10^6$  UFC\*mL<sup>-1</sup> (Log 10 UFC\*mL<sup>-1</sup> = 6.90) para muestras de agua de la laguna de

Chapulco, Puebla (Rojas, *et al.*, 2016). Un aspecto importante que considerar es que, a pesar de la relevancia de las bacterias patógenas en los cuerpos de agua, éstas no son contempladas en las Normativas mexicanas ya que no se establece un número permisible para la presencia de bacterias patógenas como las del género *Salmonella* en aguas residuales, las Normas Oficiales mexicanas sólo se contemplan la presencia o ausencia de estos microorganismos (Secretaría de Salud, 2014).

En el caso del género *Shigella* el máximo valor obtenido en los muestreos fue de  $3.5 \times 10^6$  UFC\*mL<sup>-1</sup> (Log 10 UFC\*mL<sup>-1</sup> = 6.90), esta cantidad resultó menor a la reportada por Pastor y colaboradores en 2015 para muestras del río Los Taponés, de la subcuenca río San Juan, Argentina donde ellos obtuvieron valores de  $1 \times 10^{13}$  UFC\*mL<sup>-1</sup>, la diferencia en estos valores se debe a que el río Los Taponés recibe descargas industriales y cloacales de la planta depuradora de sólidos del Bajo Segura, esto hace evidente que la cantidad de microorganismos patógenos presentes en los cuerpos de agua varía dependiendo del origen de las descargas (Pastor *et al.*, 2015).

Para el caso de la bacteria *Vibrio cholerae* aislada en agar TCBS, los resultados indicaron que el valor máximo de su presencia en las muestras fue de  $1.12 \times 10^5$  UFC\*mL<sup>-1</sup> (Log 10 UFC\*mL<sup>-1</sup> = 5.05), para este microorganismo no existe un límite permisible en las Normas Oficiales Mexicanas de índole ambiental, sin embargo, en la Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA1-1993, Bienes y servicios. Productos de la pesca. Moluscos bivalvos frescos-refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias, se estipula que esta bacteria debe estar ausente en cualquier alimento (Secretaría de Salud, 1993).

En este trabajo fue interesante que el aislamiento de *Vibrio cholerae* presuntiva fue a partir del segundo muestreo, ya que en el primer muestreo no hubo cuenta viable de esta bacteria en Agar TCBS, la literatura reporta que las razones principales de la presencia de *V. cholerae* en los cuerpos de agua dulce son la contaminación directa con descargas humanas y el cambio climático, de acuerdo con la OMS se han reportado brotes de *Vibrio cholerae* en países en vías de desarrollo

relacionadas a lluvias, ciclones, inundaciones o sequías (World Health Organization, 2022).

Determinar la presencia de especies enteropatógenas en muestras ambientales que pueden estar en contacto con los seres humanos o animales homeotermos es de suma importancia, ya que algunas de ellas son agentes causales de enfermedades como las diarreas agudas, fiebre o incluso la muerte (Cabral *et al.*, 2010). Las bacterias *Salmonella* spp y *Shigella* spp se encuentran dentro de la lista de microorganismos de alta prioridad debido a que han desarrollado multidrogorresistencia (World Health Organization, 2024), en otras bacterias como *E. coli* se ha reportado también que existen mecanismos de resistencia codificados en genes capaces de transferirse horizontalmente a otras bacterias (Tao *et al.*, 2022).

Los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad a antibióticos indicaron que las cepas presentes río arriba (primeros tres puntos de muestreo) son más sensibles que las presentes en los últimos sitios, presentando igual o más resistencia en diferentes géneros bacterianos.

Se ha reportado que globalmente las enterobacterias presentan alta resistencia a ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprim y ácido nalidíxico (Mosquito *et al.*, 2011), en este trabajo se probaron ampicilina y sulfametoxazol-trimetoprim, siendo así que el 95% de las cepas probadas fueron resistentes a la ampicilina, en aislados de origen clínico se ha presentado una alta resistencia a ampicilina para cepas de *Klebsiella pneumoniae* (Oliveira *et al.*, 2022). Para el antibiótico sulfametoxazol-trimetoprim, se encontró que el 77% de las cepas probadas presentaron resistencia a este antibiótico, siendo un valor superior a reportes realizados para *E. coli* con un 59.2% (Guajardo *et al.*, 2009).

Es importante realizar futuras investigaciones para determinar los mecanismos de transferencia que presentan las cepas aisladas, ya que los genes que confieren la resistencia pueden encontrarse en el ADN cromosómico o plasmídico y podrían transmitirse mediante el contacto célula a célula, transposones o por microvesículas (Lerminiaux & Cameron, 2019).

En el reciente año se ha reportado un incremento en los casos de shigelosis resistente a antimicrobianos de primera línea en Estados Unidos (World Health Organization, 2022), la estrategia que se ha utilizado para estudiar los casos de resistencia a antibióticos es principalmente el aislamiento de las cepas presentes en nosocomios (Santos *et al.*, 2020; Nowbuth *et al.*, 2023). En este estudio se realizó el aislamiento de microorganismos presentes en río Nexapa y la determinación de su perfil de resistencia a antibióticos, este conocimiento puede servir de apoyo a los responsables sanitarios de la región, para el uso adecuado de antibióticos.

Al realizar el análisis estadístico de los resultados de la presencia de microorganismos en las diferentes condiciones nutricionales empleadas se encontró que existieron diferencias significativas entre el medio TCBS en comparación con los otros dos medios utilizados para el aislamiento de microorganismos, esto se debe a que el medio de cultivo TCBS es de tipo selectivo y contiene compuestos inhibidores de crecimiento de otras bacterias no deseadas, por ejemplo algunas otras enterobacterias y favorece el desarrollo de aquellos de interés, en este caso del género *Vibrio* spp (Bonnet *et al.*, 2020).

## 7. CONCLUSIÓN

El periodo con mayor carga bacteriana fue el tercer muestreo en el segundo punto de toma de muestra, sin embargo, los valores de las variables fisicoquímicas temperatura y oxígeno disuelto fueron similares en los tres periodos de muestreo.

A través del empleo de medios selectivos y diferenciales se logró exitosamente el aislamiento presuntivo de microorganismos de interés médico como los pertenecientes a los géneros *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Vibrio* spp., los cuales son agentes causales de enfermedades gastrointestinales, así como el aislamiento de la bacteria *E. coli*, la cual es un indicador biológico de la contaminación del agua con materia de origen fecal. En este trabajo el empleo de las pruebas bioquímicas permitió la identificación y confirmación de las cepas aisladas como pertenecientes a los géneros *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Vibrio* spp., por lo que los métodos microbiológicos y bioquímicos resultaron ser eficaces para la identificación bacteriana de microorganismos de interés, aunque en la actualidad se utilicen principalmente técnicas moleculares para este fin.

Es indispensable un adecuado tratamiento del agua del Río Nexapa ya que los análisis microbiológicos demostraron la presencia de bacterias patógenas resistentes a diversos antibióticos, por lo que el agua representa un potencial foco de infección para la población, además de ser un medio que favorece la transferencia horizontal de genes de resistencia a los antibióticos.

Este estudio sirve como piedra angular para investigaciones posteriores, por ejemplo, la identificación de los genes implicados en la resistencia a los antibióticos en los géneros bacterianos aislados, además se pueden plantear estrategias para trabajar en conjunto con el municipio de Izúcar de Matamoros que permitan disminuir la carga bacteriana y la presencia de bacterias patógenas en el efluente.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguayo-Reyes, Alejandro, Quezada-Aguiluz, Mario, Mella, Sergio, Riedel, Gisela, Opazo-Capurro, Andrés, Bello-Toledo, Helia, Domínguez, Mariana, & González-Rocha, Gerardo. (2018). Bases moleculares de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. *Revista chilena de infectología*, 35(1), 7-14. <https://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182018000100007>
- Alarcón, L. M. T. (2020). Design and characterization of a biosensor for the detection of aminoglycoside compounds with codon-readthrough activity (Doctoral dissertation, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey)
- Aminov R. I. (2011). Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Frontiers in microbiology*, 2, 158. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00158>
- Anselmo, R. J., Ojeda, P. A., & Barrios, H. A. (2020). Detección y susceptibilidad antimicrobiana de *Shigella* spp. en ensaladas preparadas, listas para consumir. *Información tecnológica*, 31(1), 13-20. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642020000100013>
- Arias, C. A., & Murray, B. E. (2012). The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 10(4), 266-278.
- Astocondor, S. L. (2018). Betalactamasas: la evolución del problema. *Revista Peruana de Investigación en Salud*, 2(2), 42-49.
- Baldauf, K. J., Royal, J. M., Hamorsky, K. T., & Matoba, N. (2015). Cholera toxin B: one subunit with many pharmaceutical applications. *Toxins*, 7(3), 974–996. <https://doi.org/10.3390/toxins7030974>
- Barlow, M., & Hall, B. G. (2003). Experimental prediction of the natural evolution of antibiotic resistance. *Genetics*, 163(4), 1237–1241. <https://doi.org/10.1093/genetics/163.4.1237>
- Bearden, D. T., & Danziger, L. H. (2001). Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 21(10P2), 224S-232S.
- Bergey D. H. & Holt J. G. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (Ninth). Williams & Wilkins.
- Betancor, L., Gadea, M. and Flores, K. ed., 2006. *Genética bacteriana*. En: *Temas de Bacteriología y Virología Médica*, 1st ed. [online] Uruguay: Instituto de higiene, departamento de bacteriología y virología. Disponible en: <<http://www.higiene.edu.uy/cefa/cefaed2006.htm>> [Consultado el 7 Abril 2023].
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2019). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New microbes and new infections*, 34, 100622. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622>
- Brenner, F. W, Villar R. G, Angulo F. J, Tauxe, R., Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol*, 38:2465–7. doi: 10.1128/JCM.38.7.2465-2467.2000.

- Butler, M. S., Hansford, K. A., Blaskovich, M. A., Halai, R., & Cooper, M. A. (2014). Glycopeptide antibiotics: back to the future. *The Journal of Antibiotics*, 67(9), 631-644.
- Cabral, J. P. S. (2010). Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(10), 3657–3703. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph7103657>
- Camacho, S. L. (2023). Resistencia bacteriana, una crisis actual [Bacterial resistance, a current crisis.]. *Revista Española de Salud Pública*, 97, e202302013.
- Cantoral Uriza, Enrique Arturo, Asencio Martínez, Antonia Dolores, & Aboal Sanjurjo, Marina. (2017). Cianotoxinas: efectos ambientales y sanitarios. Medidas de prevención. *Hidrobiológica*, 27(2), 241-251.
- Carta, F., Scozzafava, A., & Supuran, C. T. (2012). Sulfonamides: a patent review (2008–2012). *Expert opinion on therapeutic patents*, 22(7), 747-758.
- Castañeda, J., Gómez, K., Corrales, L., Cortés, S. (2016). Perfil de resistencia a antibióticos en bacterias que presentan la enzima NDM-1 y sus mecanismos asociados: una revisión sistemática. *Nova*, 14(25), 95-111.
- Cázares, M., & Alcántara, A. (2014). Análisis Microbiológico de la Calidad del Agua de Ciudad Nezahualcóytl, acorde a la norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994. In Congreso Iberoamericano de Ciencia, Tecnología, Innovación y Educación. Argentina (p. 30).
- CDC-FDA. 2018. Center for disease control and prevention. Food and drug administration. Salmonella. Multistate outbreak of Salmonella Adelaide infections linked to pre-cut melon. USA. <https://www.cdc.gov/salmonella/adelaide-06-18/index.html>
- Ceccarelli, D., Amaro, C., Romalde, J. L., Suffredini, E., & Vezzulli, L. (2019). *Vibrio species*. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (pp. 347–388). wiley. <https://doi.org/10.1128/9781555819972.ch13>.
- Chávez-Jacobo, Víctor M., Ramírez-Díaz, Martha I., Silva-Sánchez, Jesús, & Cervantes, Carlos. (2015). Resistencia Bacteriana a Quinolonas: Determinantes Codificados en Plásmidos. *REB. Revista de educación bioquímica*, 34(1), 4-9. Recuperado en 15 de junio de 2024, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-19952015000100004&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-19952015000100004&lng=es&tlng=es).
- Chiang, Y. N., Penadés, J. R., & Chen, J. (2019). Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. *PLoS pathogens*, 15(8), e1007878. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007878>
- Clarke, R. and King, J. (2004). *The water Atlas*. Myriad Editions Limited. ISBN: 9781844071333.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100. 27ma ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/> [ Links ]
- CNA 2005. Diagnóstico Preliminar de la Cuenca del río Nexapa (Estado de Puebla), Comisión Nacional del Agua, Delegación Regional Puebla, 2005.
- Corbel, A., & Rabaud, C. (2022). Glucopéptidos. *EMC-Tratado de Medicina*, 26(2), 1-5.
- Croucher, N. J., Harris, S. R., Fraser, C., Quail, M. A., Burton, J., van der Linden, M., McGee, L., von Gottberg, A., Song, J. H., Ko, K. S., Pichon, B., Baker, S., Parry, C. M.,

- Lambertsen, L. M., Shahinas, D., Pillai, D. R., Mitchell, T. J., Dougan, G., Tomasz, A., Klugman, K. P., ...
- Bentley, S. D. (2011). Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science* (New York, N.Y.), 331(6016), 430–434. <https://doi.org/10.1126/science.1198545>
- Cruz-Leyva, María Concepción de la, Zamudio-Maya, Marcela, Corona-Cruz, Alma Irene, González-de la Cruz, José Ulises, & Rojas-Herrera, Rafael Antonio. (2015). Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 2(4), 99-115. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-90282015000100008&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-90282015000100008&lng=es&tlng=es).
- De La Mora-Orozco, C., Saucedo-Terán, R. A., González-Acuña, I. J., Gómez-Rosales, S., & Flores-López, H. E. (2020). Efecto de la temperatura del agua sobre la constante de velocidad de reacción de los contaminantes en un humedal construido para el tratamiento de aguas residuales porcícolas. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 11, 1–17. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11s2.4681>
- DGE (Dirección General de Epidemiología). (2023). Anuario de Morbilidad, 1984 -2022. <https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/index.html>
- Di, R., Kyu, E., Shete, V., Saidasan, H., Kahn, P. C., & Tumer, N. E. (2011). Identification of amino acids critical for the cytotoxicity of Shiga toxin 1 and 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 57(4), 525–539. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.12.006>
- EFSA. (2019). Salmonella control in poultry flocks and its public health impact. *EFSA Journal*, 17. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5596>
- Emerson D., Agulto L., Liu H., Liu L. (2008). Identifying and Characterizing Bacteria in an Era of Genomics and Proteomics. *Bioscience*, 58:925–936. doi: 10.1641/B581006.
- Farina, C., Marini, F., Schiaffino, E., Luzzi, I., Dionisi, A. M., Leoni, F., Ottaviani, D., & Bordoni, S. (2010). A fatal *Vibrio cholerae* O37 enteritis. *Journal of Medical Microbiology*, doi:10.1099/jmm.0.023093-0
- Fernandes, S. A., Tavechio, A. T., Ghilardi, Â. C. R., Almeida, E. A., Silva, J. M. L. D., Camargo, C. H., & Tiba-Casas, M. R. (2022). Salmonella enterica serotypes from human and nonhuman sources in Sao Paulo State, Brazil, 2004-2020. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 64, e66. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202264066>
- Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., Kaushik, K. S., Salehi, B., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Antolak, H., Dybka-Śtepień, K., Leszczewicz, M., Relison Tintino, S., Alexandrino de Souza, V. C., Sharifi-Rad, J., Coutinho, H. D. M., Martins, N., & Rodrigues, C. F. (2019). Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms-From Past to Present. *Microorganisms*, 7(5), 130. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130>
- Galluzzi L., Magnani M., Saunders N., Harms C., Bruce I.J. (2007). Current molecular techniques for the detection of microbial pathogens. *Sci. Prog.*, 90:29–50. doi: 10.3184/003685007780440521.

- García de Lomas J, Navarro D. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. En (García Rodríguez Ed) Antimicrobianos en Medicina. Barcelona- Prous Science. 2ª Edición 2006: 13-23
- García, P., Allende, F., Legarraga, P., Huilcaman, M. & Solari, S. (2012). Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. *Revista chilena de infectología*, 29(3), 263-272. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000300003>
- Garneau, T. S., & Labby, K. J. (2016). Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives. *MedChemComm*, 7(1), 11–27. <https://doi.org/10.1039/C5MD00344J>
- Glen, K. A., & Lamont, I. L. (2021).  $\beta$ -lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Future Prospects. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(12), 1638. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121638>
- Gobernado, M., & López-Hontangas, J. L. (2003). Identificación bacteriana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21, 54–60. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-identificacion-bacteriana-13059086>
- González-Torralba, A., & Alós, J.-I. (2015). Shigelosis, la importancia de la higiene en la prevención. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(3), 143–144. doi: 10.1016/j.eimc.2014.11.001
- Guajardo-Lara, Claudia Elena, González-Martínez, Pedro Mario, & Ayala-Gaytán, Juan Jacobo. (2009). Resistencia antimicrobiana en la infección urinaria por *Escherichia coli* adquirida en la comunidad: ¿Cuál antibiótico voy a usar?. *Salud Pública de México*, 51(2), 155-159. Recuperado en 13 de julio de 2024, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-36342009000200012&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342009000200012&lng=es&tlng=es).
- Guzman-Herrador, B. R., Nilsen, E., Cudjoe, K. S., Jensvoll, L., Kvamme, J. M., Lindegård Aanstad, A., Lindstedt, B. A., Nygård, K., Severinsen, G., Werner-Johansen, Ø., Wester, A. L., Wiklund, M., & Vold, L. (2013). A *Shigella sonnei* outbreak traced to imported basil--the importance of good typing tools and produce traceability systems, Norway, 2011. *Euro surveillance: bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 18(49), 20650. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.49.20650>
- Halimeh, F.B., Rafei, R., Osman, M. et al. Historical, current, and emerging tools for identification and serotyping of *Shigella*. *Braz J Microbiol* 52, 2043–2055 (2021). <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00573-5>
- Ho, P. L., Ng, K. Y., Lo, W. U., Law, P. Y., Lai, E. L., Wang, Y., & Chow, K. H. (2015). Plasmid-Mediated OqxAB Is an Important Mechanism for Nitrofurantoin Resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(1), 537–543. <https://doi.org/10.1128/AAC.02156-15>
- Honigmann A, Pralle A. (2016). Compartmentalization of the cell membrane. *Journal of molecular biology*. 428: 4739-4748.
- Hooper, D. C., & Jacoby, G. A. (2015). Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354(1), 12–31. <https://doi.org/10.1111/nyas.12830>

- Instituto Nacional de Estadística y Geografía - INEGI. (2010). Red hidrográfica edición 2.0. Región H. Balsas.
- Instituto Mexicano para la Competitividad (IMCO). (2023, 7 de febrero). Aguas en México: ¿escasez o mala gestión? <https://goo.su/WFhu>.
- Jacoby G. A. (2005). Mechanisms of resistance to quinolones. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 41 Suppl 2, S120–S126. <https://doi.org/10.1086/428052>
- Judd, M. C., Hoekstra, R. M., Mahon, B. E., Fields, P. I., Wong, K. K., (2019). Epidemiologic patterns of human Salmonella serotype diversity in the USA, 1996-2016. *Epidemiol Infect.* 147:e187.
- Kabra, R., Chauhan, N., Kumar, A., Ingale, P., & Singh, S. (2019). Efflux pumps and antimicrobial resistance: Paradoxical components in systems genomics. *Progress in biophysics and molecular biology*, 141, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.07.008>
- Konduru, N. K., Dey, S., Sajid, M., Owais, M., & Ahmed, N. (2013). Synthesis and antibacterial and antifungal evaluation of some chalcone based sulfones and bisulfones. *European journal of medicinal chemistry*, 59, 23-30.
- Kramer, A., Schwebke, I. & Kampf, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 6, 130 (2006). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-130>
- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(6), a027029. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029>
- Le, V. V. H., & Rakonjac, J. (2021). Nitrofurans: Revival of an "old" drug class in the fight against antibiotic resistance. *PLoS pathogens*, 17(7), e1009663. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009663>
- Lerminiaux, N. A., & Cameron, A. D. S. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian journal of microbiology*, 65(1), 34–44. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>
- Li, G., Walker, M. J., & De Oliveira, D. M. P. (2022). Vancomycin Resistance in *Enterococcus* and *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms*, 11(1), 24. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010024>
- Liu, J., Yang, H., Gosling, S.N., Kummu, M., Flörke, M., Pfister, S., Hanasaki, N., Wada, Y., Zhang, X., Zheng, C., Alcamo, J. and Oki, T. (2017), Water scarcity assessments in the past, present, and future. *Earth's Future*, 5: 545-559. <https://doi.org/10.1002/2016EF000518>
- Lopardo, H. A. (2020). Antibióticos. Libros de Cátedra.
- Lorenzo-Díaz, F., Fernández-López, C., Lurz, R., Bravo, A., & Espinosa, M. (2017). Crosstalk between vertical and horizontal gene transfer: plasmid replication control by a conjugative relaxase. *Nucleic acids research*, 45(13), 7774–7785. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx450>
- Magni, C., García-Quintans, N., Martín, M., de Mendoza, D., & López, P. (2008). Sistemas de utilización del citrato en bacterias ácido lácticas.

- Marcobal, A., de las Rivas, B. & Muñoz, R. Methods for the Detection of Bacteria Producing Biogenic Amines on Foods: A Survey. *J. Verbr. Lebensm.* 1, 187–196 (2006). <https://doi.org/10.1007/s00003-006-0035-0>
- Marsot, A., Boulamery, A., Bruguerolle, B., & Simon, N. (2012). Vancomycin: a review of population pharmacokinetic analyses. *Clinical pharmacokinetics*, 51(1), 1–13. <https://doi.org/10.2165/11596390-000000000-00000>
- Martínez-Puchol, Sandra, Pons, María J., Ruiz-Roldán, Lidia, Laureano-Adame, Laura, Corujo, Alfredo, Ochoa, Theresa J., & Ruiz, Joaquim. (2020). Resistencia a nitrofuranos en *Salmonella enterica* aisladas de carne para consumo humano. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 37(1), 99-103. <https://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2020.371.4745>
- Matsumoto, K., Kanazawa, N., Watanabe, E., Yokoyama, Y., Fukamizu, T., Shimodozono, Y., Maeda, C., Yasuda, T., Kakihana, Y., Ikawa, K., Morikawa, N., & Takeda, Y. (2013). Development of initial loading procedure for teicoplanin in critically ill patients with severe infections. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 36(6), 1024–1026. <https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00911>
- Mella, S., ACUÑA, G., PEREZ, C., LABARCA, J., GONZALEZ, G., BELLO, H., & ZEMELMAN, R. (2000). Quinolonas: Aspectos generales sobre su estructura y clasificación. *Revista chilena de infectología*, 17(1), 53-66.
- Melton-Celsa A. R. (2014). Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiology spectrum*, 2(4), 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013>
- Mohr K. I. (2016). History of Antibiotics Research. *Current topics in microbiology and immunology*, 398, 237–272. [https://doi.org/10.1007/82\\_2016\\_499](https://doi.org/10.1007/82_2016_499)
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L., & Ochoa, T. J. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. In *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 28(4), <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2011.284.430>
- Morales-Durán, N., Torre-González, A. D. L., García-Sánchez, V., & Chávez, C. (2018). Estudio de la calidad bacteriológica y parámetros fisicoquímicos del agua del Distrito de Riego 023. *Tecnología y ciencias del agua*, 9(1), 53-67.
- Murray P. R. Baron E. J. & American Society for Microbiology. (2003). *Manual of clinical microbiology* (8th ed.). ASM Press.
- Navarro, A y Cruz, J. (2023). La importancia de los ríos pequeños: el caso del río Nexapa. En Asael Ortiz, *Agua para la vida* (pp. 96-115). Consejo Editorial. Universidad Autónoma de Hidalgo. Consultado en: <https://doi.org/10.29057/books.126>
- Nowbuth, A. A., Asombang, A. W., Tazinkeng, N. N., Makinde, O. Y., & Sheets, L. R. (2023). Antimicrobial resistance from a One Health perspective in Zambia: a systematic review. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 12(1), 1–12. <https://doi.bibliotecabuap.eloqim.com/10.1186/s13756-023-01224-0>
- O'Neill J. (2014). Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *The review on antimicrobial resistance*.
- Parker N., Schneegurt M., Thi tu A., Forster B., Lister P. (2016). *Microbiology* (1.a ed.). XanEdu Publishing Inc. ISBN-13: 978--1--938168--14--7

- Pastor, Alejandra; Varela, Patricia Graciela; Bianchi, Virginia Angélica; Durando, Patricia Evelina. (2015). Calidad Bacteriológica del Agua del Río San Juan en zonas aledañas a la desembocadura del Arroyo Los Taponos (San Juan, Argentina); Asociación de Ciencias Naturales del Litoral; *Natura Neotropicalis*; 46(1), 7-24.
- Patil, M. S., & Patel, P. (2021). Bactericidal and Bacteriostatic Antibiotics. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.99546
- Pérez-Trallero, E., & Iglesias, L. (2003). Formación médica continuada Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. In *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 21(9).
- Petri W.A., Jr. (2017). Sulfonamidas, trimetoprim-sulfametoxazol, quinolonas y fármacos para las infecciones de vías urinarias. Brunton L.L., & Chabner B.A., & Knollmann B.C. (Eds.), *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 12e. McGraw Hill.  
<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1882&sectionid=138616593>
- Pham, T. D., Ziora, Z. M., & Blaskovich, M. A. (2019). Quinolone antibiotics. *Medchemcomm*, 10(10), 1719-1739.
- Pilehvar, S., Gielkens, K., Trashin, S. A., Dardenne, F., Blust, R., & De Wael, K. (2016). (Electro)Sensing of Phenicol Antibiotics—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(14), 2416–2429. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.845140>
- Poole, K. (2001). Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 3(2), 255-264.
- Popa, G. L., & Papa, M. I. (2021). Salmonella spp. infection - a continuous threat worldwide. *Germs*, 11(1), 88–96. <https://doi.org/10.18683/germs.2021.1244>
- Pualomino, J., & Pachón, J. (2003). Aminoglucósidos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(2), 105–115. doi: 10.1016/s0213-005x(03)72893-6
- Reynoso, E. C., Laschi, S., Palchetti, I., Torres, E. (2021). Advances in Antimicrobial Resistance Monitoring Using Sensors and Biosensors: A Review. *Chemosensors*, 1(9), 232. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9080232>
- Reynoso Camargo, E. (2023). Diagnóstico de la problemática ambiental asociada a la resistencia microbiana a sulfonamidas en la región del Río Nexapa, Puebla. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/19128>
- Rice L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *The Journal of infectious diseases*, 197(8), 1079–1081. <https://doi.org/10.1086/533452>
- Rojas, N.E., Muñoz, G., Sosa, A., Baqueiro, I., 2016. Determinación de la calidad microbiológica del agua de la Laguna Chapulco, Puebla. *Investigación y Ciencia* 68: 29-35. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6137636>
- Romero, M., Colín, A., Sánchez, E., & Ortiz, M. (2009). Wastewater treatment by an artificial wetlands pilot system: evaluation of the organic charge removal. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 25(3), 157-167. Recuperado en 13 de diciembre de 2023, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-49992009000300004&lng=es&tng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992009000300004&lng=es&tng=en).

- Ruiz J. (2019). Transferable Mechanisms of Quinolone Resistance from 1998 Onward. *Clinical microbiology reviews*, 32(4), e00007-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00007-19>
- Santos Zonta, Franciele do Nascimento, Roque, Márcia da Silva, Soares da Silva, Ruan Gabriel, Ritter, Amanda Gabrieli, & Jacobsen, Fernanda Tondello. (2020). Colonización por ESKAPES y características clínicas de pacientes en estado crítico. *Enfermería Global*, 19(59), 214-254. Epub 10 de agosto de 2020. <https://dx.doi.org/10.6018/eglobal.406691>
- Saxena, D., Maitra, R., Bormon, R. et al. (2023). Tackling the outer membrane: facilitating compound entry into Gram-negative bacterial pathogens. *npj Antimicrob Resist* 1, 17. <https://doi.org/10.1038/s44259-023-00016-1>
- Secretaría de Economía. Dirección General de Normas (DGN). (2001). NMX-AA-028-SCFI-2001. Análisis De Agua - Determinación De La Demanda Bioquímica De Oxígeno En Aguas Naturales, Residuales (DBO5) Y Residuales Tratadas - Método De Prueba.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2015). Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave, de Desempeño Ambiental y de Crecimiento Verde. Ciudad de México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2021). NORMA Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-2021, Que establece los límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores propiedad de la nación. Ciudad de México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Secretaría de Salud (SSA). (1993). NOM-031-SSA1-1993, Bienes y servicios. Productos de la pesca. Moluscos bivalvos frescos-refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias. Ciudad de México. Secretaría de Salud
- Secretaría de Salud (SSA). (2014). NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos: Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Ciudad de México. Secretaría de Salud.
- Schweitzer, Linda & Noblet, James. (2018). Water Contamination and Pollution. 10.1016/B978-0-12-809270-5.00011-X.
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain J M, et al. Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 543-51
- Shakya, T., & Wright, G. D. (2007). Mechanisms of aminoglycoside antibiotic resistance. *Aminoglycoside Antibiotics: From Chemical Biology to Drug Discovery*, 119-140.
- Simental, L., & Martinez-Urtaza, J. (2008). Climate patterns governing the presence and permanence of salmonellae in coastal areas of Bahia de Todos Santos, Mexico. *Applied and environmental microbiology*, 74(19), 5918–5924. <https://doi.org/10.1128/AEM.01139-08>
- Singh, A., Shahid, M., Khan, P. A., Khan, H. M., & Sami, H. (2022). An Overview on Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Beta-Lactam Resistance in Gram-Negative Bacteria: Threats and Challenges*, 3-15.

- Sköld O. (2000). Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 3(3), 155–160. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0146>
- Spratt D.A. (2004). Significance of bacterial identification by molecular biology methods. *Endod. Top.* 9:5–14. doi: 10.1111/j.1601-1546.2004.00106.x
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., ... Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959–964. <https://doi.org/10.1038/35023079>
- Suárez, C. J., Lolans, K., Villegas, M. V., & Quinn, J. P. (2005). Mechanisms of resistance to beta-lactams in some common Gram-negative bacteria causing nosocomial infections. *Expert review of anti-infective therapy*, 3(6), 915–922. <https://doi.org/10.1586/14787210.3.6.915>
- Supuran, C. T. (2017). sulfonamides. *Molecules*, 22(10), 1642.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., ... WHO Pathogens Priority List Working Group (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet. Infectious diseases*, 18(3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Tao, S., Chen, H., Li, N., Wang, T., & Liang, W. (2022). The Spread of Antibiotic Resistance Genes In Vivo Model. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale*, 2022, 3348695. <https://doi.org/10.1155/2022/3348695>
- Tripathi, N., & Sapra, A. (2023). Gram Staining. In *StatPearls*. StatPearls Publishing
- Tulara, N. K. (2018). Nitrofurantoin and fosfomycin for extended spectrum beta-lactamases producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of global infectious diseases*, 10(1), 19.
- Ucedo, M. Á. B. (2007). Anfenicoles/fenicoles. In *Antimicrobianos y antiparasitarios en medicina veterinaria* (pp. 235-248). Intermédica Editorial.
- Van Bambeke, F., Carryn, S., Seral, C., Chanteux, H., Tyteca, D., Mingeot-Leclercq, M. P., & Tulkens, P. M. (2004). Cellular pharmacokinetics and pharmacodynamics of the glycopeptide antibiotic oritavancin (LY333328) in a model of J774 mouse macrophages. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(8), 2853–2860. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.2853-2860.2004>
- Vandecasteele, S. J., De Vriese, A. S., & Tacconelli, E. (2013). The pharmacokinetics and pharmacodynamics of vancomycin in clinical practice: evidence and uncertainties. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(4), 743-748.
- Vergidis, P., & Falagas, M. E. (2017). Beta-Lactamase Inhibitors. In *Kucers' The Use of Antibiotics* (pp. 225-253). CRC Press.
- Vervoort J, Xavier BB, Stewardson A, Coenen S, Godycki-Cwirko M, Adriaenssens N, et al. An in vitro deletion in ribE encoding lumazine synthase contributes to nitrofurantoin

- resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58 (12):7225–33. doi: 10.1128/AAC.03952-14
- World Health Organization: WHO. (2017). The World is running out of antibiotics, WHO report confirms. World Health Organization. From <https://www.who.int/news/item/20-09-2017-the-world-is-running-out-of-antibiotics-who-report-confirms>
- World Health Organization: WHO. (2022a). Extensively Drug-resistant *Shigella sonnei* infection – Europe-European Region (EURO). Accessed 24 March 2022. <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2022-DON364>
- World Health Organization (2022b). Disease Outbreak News; Cholera – Global situation. Available at: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2022-DON426>
- World Health Organization (2024). Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>
- Wu, C., Lin, C., Zhu, X., Liu, H., Zhou, W., Lu, J., Zhu, L., Bao, Q., Cheng, C., & Hu, Y. (2018). The  $\beta$ -Lactamase Gene Profile and a Plasmid-Carrying Multiple Heavy Metal Resistance Genes of *Enterobacter cloacae*. *International journal of genomics*, 2018, 4989602. <https://doi.org/10.1155/2018/4989602>
- Yang, Y., Yan, B., Shen, W. (2010). Assessment of point and nonpoint sources pollution in Songhua River Basin, Northeast China by using revised water quality model. *Chin. Geogr. Sci.* 20, 30–36. <https://doi.org/10.1007/s11769-010-0030-3>
- Yoon, S. H., & Waters, C. M. (2019). *Vibrio cholerae*. *Trends in microbiology*, 27(9), 806–807. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.005>
- Zeng, D., Debabov, D., Hartsell, T. L., Cano, R. J., Adams, S., Schuyler, J. A., McMillan, R., & Pace, J. L. (2016). Approved Glycopeptide Antibacterial Drugs: Mechanism of Action and Resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(12), a026989. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026989>