



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TÍTULO DE LA TESIS

IMPORTANCIA DE LA DETECCIÓN DE BACTERIAS
RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS EN EL RÍO ALSESECA,
PUEBLA.

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:
JAFET MORALES CASTILLO

DIRECTORA: DRA. EDITH CHÁVEZ BRAVO

MAYO, 2023

DEDICATORIA

A mi madre, todo lo que soy te lo debo a ti, gracias por tu apoyo incondicional, por creer y confiar en mí. Prometo dedicarte más logros.

A mi padre, quien fue parte de todo esto. Tu apoyo significo mucho para mí.

A Diana, quién a pesar de no estar presente, te llevó bien guardada en mi corazón. Nadie más que tú estuvo presente en los momentos más felices y estresantes de mi carrera. Gracias por todo.

A mí, porque a pesar de los momentos sin sentido, de las malas rachas, los días de confusión y los momentos complicados, salimos adelante.

¡SI SE PUDO!

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	8
II.	JUSTIFICACIÓN.....	9
III.	PREGUNTA CIENTÍFICA.....	10
IV.	HIPÓTESIS.....	10
V.	OBJETIVOS.....	10
1.	MARCO TEÓRICO.....	11
	1.1 Aguas residuales	
	1.2 Descargas de aguas residuales en Latinoamérica	
	1.3 Descarga y reutilización del agua residual en México	
	1.4 Problemas de salud debido a la contaminación biológica del agua	
	1.5 Métodos para el análisis de microorganismos presentes en las aguas residuales en México	
	1.6 Resistencia antimicrobiana (RAM)	
2.	MARCO CONCEPTUAL.....	17
	2.1 Perspectiva sobre el Río Alseseca	
	2.2 Problemática de las aguas residuales en el estado de Puebla	
	2.3 Bacterias presentes en las aguas residuales del estado de Puebla que son de importancia médica	
	2.4 La Organización Mundial de la Salud (OMS) respecto a bacterias patógenas resistentes a antimicrobianos	
3.	DIAGRAMA DE TRABAJO.....	21
4.	MARCO METODOLÓGICO.....	21
	4.1 Reconocimiento del área de estudio	
	4.2 Toma de muestra de agua residual	
	4.3 Registro de los factores físicos del agua	

4.4	Análisis microbiológico para determinar la calidad del agua residual	
4.5	Identificación de cepas bacterianas en las muestras de aguas residuales	
4.6	Identificación microbiológica	
4.7	Prueba de susceptibilidad para determinar la RAM	
5.	RESULTADOS	29
5.1	Punto de muestreo	
5.2	Colecta de la muestra de agua residual	
5.3	Toma de los parámetros físicos del agua	
5.4	Calidad microbiológica del agua residual	
5.5	Identificación bacteriana	
5.6	Prueba de susceptibilidad antimicrobiana	
6.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
7.	CONCLUSIONES	50
8.	AGRADECIMIENTOS	51
9.	BIBLIOGRAFÍA	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Conjunto de Normas Oficiales Mexicanas (NOM) para la regulación y control de las aguas residuales

Tabla 2. Parámetros físicos del agua registrados en cada periodo de muestreo

Tabla 3. NMP del punto de muestro comparado con el límite máximo permisible estipulado por la NOM-001-SEMARNAT-2021

Tabla 4. Antimicrobianos utilizados para Gram (+) y Gram (-) con su respectiva concentración mínima inhibitoria (CMI)

Tabla 5. Número de bacterias Gram (+) y Gram (-) identificadas en el agua residual

Tabla 6. Comparación de la multirresistencia en los géneros bacterianos Gram (+)

Tabla 7. Comparación de la multirresistencia en los géneros bacterianos Gram (-)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama establecido para la realización del trabajo de investigación.

Figura 2. Mapa general del Río Alseseca. (Tomado de: INEGI 2019)

Figura 3. Materiales utilizados para la toma de muestra de agua residual.

Figura 4. Equipo “CONDUTRONIC PC18” para el registro de los parámetros físicos del agua.

Figura 5. Método del NMP para la búsqueda de coliformes totales y fecales (Tomado de: Elaboración propia)

Figura 6. Método de dilución utilizado para el análisis microbiológico del agua residual (SS=Solución Salina; AR=Agua Residual) (Tomado de: Elaboración propia)

Figura 7. Materiales y medio de cultivo requeridos para la siembra de la muestra de agua.

Figura 8. Características morfológicas coloniales. (Tomado de: Elaboración propia)

Figura 9. Metodología de la tinción de Gram para la diferenciación de bacterias Gram (+) y Gram (-) (Tomado de: Elaboración propia)

Figura 10. Pruebas bioquímicas y medios con agar Mc, EMB y SS para la confirmación de bacterias Gram (-) (Tomado de: Elaboración propia)

Figura 11. Método de Kirby-Bauer para determinar la susceptibilidad antimicrobiana.

Figura 12. Punto de muestreo: los “Fuertes” seleccionado a partir de los criterios de inclusión.

Figura 13. Muestras del agua residual.

Figura 14. Toma de muestra de agua residual del punto de muestreo para los períodos correspondientes.

Figura 15. Contaminación por coliformes fecales debido a la presencia de *Escherichia coli*

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Comparación de cepas Gram (+) y Gram (-) del efluente, recuperadas en dos períodos estacionales.

Gráfica 2. Géneros identificados y cantidad de aislamientos para el 1er muestreo.

Gráfica 3. Géneros identificados y cantidad de aislamientos para el 2do muestreo.

Gráfica 4. Porcentaje de la susceptibilidad antimicrobiana en las bacterias Gram (+).

Gráfica 5. Porcentaje de la susceptibilidad antimicrobiana en las bacterias Gram (-).

Gráfica 6. Porcentaje de la resistencia (R) antimicrobiana en los géneros pertenecientes a Gram (+).

Gráfica 7. Porcentaje de la resistencia (R) antimicrobiana en los géneros pertenecientes a Gram (-).

Gráfica 8. Porcentaje de la sensibilidad (S) antimicrobiana en los géneros pertenecientes a Gram (+).

Gráfica 9. Porcentaje de la sensibilidad (S) antimicrobiana en los géneros pertenecientes a Gram (-).

Gráfica 10. Comparación de la resistencia (R) de las bacterias Gram (+) ante los diferentes tipos de antibióticos.

Gráfica 11. Comparación de la resistencia (R) de las bacterias Gram (-) ante los diferentes tipos de antibióticos.

Gráfica 12. Comparación de la sensibilidad (S) de las bacterias Gram (+) ante los diferentes tipos de antibióticos.

Gráfica 13. Comparación de la sensibilidad (S) de las bacterias Gram (-) ante los diferentes tipos de antibióticos.

- **RESUMEN**

El río Alseseca es uno de los ríos más contaminados del estado de Puebla, en él se vierten aguas residuales de diferentes orígenes, principalmente: municipales, industriales y hospitalarios. La poca eficiencia en el tratamiento de estas aguas residuales ha ocasionado que la comunidad aledaña se encuentre expuesta a la presencia de parásitos, virus, bacterias y hongos que suelen causar enfermedades infecciosas. La potencial existencia de bacterias patógenas que presentan algún tipo de resistencia a los antimicrobianos en las aguas residuales es un riesgo que afecta a la salud pública, debido a las infecciones que pueden ocasionar y la poca o nula eficiencia de los antimicrobianos ante estas infecciones. Para determinar si en el río Alseseca existe la presencia de bacterias resistentes a antibióticos, se tomó una muestra de agua residual en “los Fuertes” y se procesó en el Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del CICM-ICUAP para determinar su calidad microbiológica estipulada por la NOM-112-SSA1-1994. Se aislaron e identificaron a nivel de género las cepas bacterianas de las muestras de agua y se les determinó su resistencia a antibióticos. Los resultados del estudio revelaron que el agua residual del río Alseseca se encuentra fuera de los límites permisibles de 1,000 a 2,000 NMP/100, presentando >16,000 NMP/100 ml de CT y CF. Entre las cepas bacterianas aisladas se identificaron a géneros como: *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Shigella*, *Streptococcus*, *Escherichia* entre otros. En las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana las bacterias grampositivas presentaron resistencia a penicilina (P), ampicilina (AM) y cefalotina (CF), las bacterias gramnegativas presentaron resistencia a ampicilina (AM). Los géneros *Bacillus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* presentaron resistencia ≥ 3 antibióticos, por lo que, se consideraron multirresistentes. Por todo lo anterior, se sugiere que la contaminación del agua residual del río representa un foco de infección por la presencia patógenos resistentes a antibióticos capaces de causar enfermedades gastrointestinales, siendo un problema para la salud pública, puesto que podría existir un aumento en la incidencia de enfermedades infecciosas provocadas por estos patógenos que se encuentran en el agua residual del río Alseseca.

I. INTRODUCCIÓN

El agua es uno de los elementos más importantes e indispensables de la naturaleza, todos los seres vivos dependen de este recurso debido a sus propiedades intrínsecas y por desempeñar una importante labor en todas las reacciones físicas y químicas. El uso y consumo global de este recurso hídrico ha incrementado intensivamente durante las últimas décadas debido a factores como: *el crecimiento demográfico, la urbanización, el uso en casa-habitación, la agricultura y la industria* (Sánchez, 2017), esto ha ocasionado un déficit en cuanto a la cobertura y calidad de este recurso, que generalmente tiende a concentrarse en grupos vulnerables de bajos recursos y que resulta en una carencia en cuanto a un servicio adecuado de agua, saneamiento e higiene, teniendo consecuencias importantes para asegurar la salud o la enfermedad de la población (OPS, 2017). El abastecimiento de agua para uso y consumo humano de buena calidad es fundamental para prevenir y evitar la transmisión de enfermedades infecciosas (Pacheco *et al.*, 2004), especialmente en grupos vulnerables y para la población en general. El deterioro y contaminación del agua, que conlleva una alteración fisicoquímica, ha ocasionado la presencia de microorganismos patógenos causantes de enfermedades infecciosas ocasionadas por virus, bacterias y hongos (de la Peña *et al.*, 2013). Estas aguas comúnmente son contaminadas con desechos humanos, animales o compuestos químicos (Novelo *et al.*, 2014) y habitualmente son vertidas en ecosistemas abiertos como lo son ríos, lagos y lagunas, alterando por completo a los ecosistemas presentes, ocasionando un desequilibrio ecológico, teniendo como resultado un impacto negativo sobre las especies que lo conforman, incluidas al hombre. El clima y otros cambios ambientales son también un factor importante en la aparición y reaparición de enfermedades infecciosas relacionadas con el agua. Este factor es capaz de expandir la distribución geográfica de estas enfermedades y extender la temporada de transmisión, por lo que influyen directamente en la morbilidad y mortalidad de estas enfermedades (OPS, 2017).

II. JUSTIFICACIÓN

El río Alseseca por su ubicación dentro del municipio de Puebla resulta de gran importancia para la ciudad puesto que se ha convertido en un cuerpo receptor de desechos sólidos y de descargas de aguas residuales municipales e industriales a lo largo de su recorrido, provocando su degradación y contaminación (Méndez, 1999). Las descargas de estas aguas residuales con un tratamiento poco eficiente o un nulo tratamiento, da lugar a un reservorio de microorganismos que son capaces de infectar y transmitir enfermedades a organismos que se encuentran cercanos y en constante contacto con el efluente. Estos microorganismos patógenos son capaces de adquirir resistencia a antimicrobianos mediante la activación de genes por los diferentes mecanismos presentes en estos microorganismos, esto debido a la constante presión selectiva derivada de los diferentes desechos contaminantes que se encuentran presentes en las aguas residuales. Este proceso de adquisición de resistencia da lugar a microorganismos altamente patógenos que presentan una resistencia o multirresistencia a un cierto tipo o varios antibióticos, que son capaces de ocasionar problemas graves de salud pública, principalmente aumentando la incidencia de enfermedades infecciosas de mayor intensidad, teniendo como resultado en el incremento de la dificultad en el tratamiento, debido a la poca eficiencia de los antimicrobianos usados habitualmente y aumentando los costos en el tratamiento de estas enfermedades infecciosas, culminando en un aumento de la mortalidad en la población.

Determinar la presencia de microorganismos patógenos con resistencia a antimicrobianos provenientes de un ecosistema abierto, como lo es el Río Alseseca, determinará que el cuerpo de agua presenta las características adecuadas para dar lugar a un reservorio de bacterias patógenas multirresistentes, que puede ocasionar una serie de problemas en la Salud Pública de las comunidades aledañas al efluente y en general al estado de Puebla.

III. PREGUNTA CIENTÍFICA

¿Qué bacterias patógenas de humanos con resistencia antimicrobiana, están presentes en el agua residual del Río Alseseca?

IV. HIPÓTESIS

H_1 . En el agua residual del Río Alseseca existen bacterias patógenas de humanos con resistencia a antibióticos, lo que representa un riesgo a la salud de la comunidad aledaña.

H_0 . En el agua residual del Río Alseseca no existen bacterias patógenas de humanos con resistencia a antibióticos, por lo que no son un riesgo a la salud de la comunidad aledaña.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar la presencia de bacterias patógenas de humanos con resistencia a antibióticos en el Río Alseseca

Objetivos específicos

- Seleccionar la zona de estudio e implementar criterios de inclusión y exclusión para la toma de muestra de agua residual.
- Registrar los parámetros físicos del agua residual (temperatura, pH y conductividad) durante verano-otoño 2022.
- Determinar la calidad microbiológica del agua residual mediante la técnica del Número Más Probable (NMP) e identificar a nivel de género las cepas bacterianas.
- Determinar y comparar la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas bacterianas aisladas del agua residual.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Aguas Residuales

Por definición, se entiende que las aguas residuales son aguas provenientes de actividades domésticas, industriales, comerciales, agrícolas, pecuarias o de cualquier otra actividad que, por el uso de que han sido objeto, contienen materia orgánica y otras sustancias químicas que alteran su calidad original (SEDEMA, 2014). La composición de las aguas residuales, por lo tanto, es muy variable debido a los diversos factores que la afectan, en general consisten en dos componentes, un efluente líquido y un constituyente sólido, conocido como lodo (Reynolds, 2002). Estas aguas residuales también contienen elementos contaminantes que causan un impacto ambiental y ponen en riesgo la salud del hombre. Los principales contaminantes que pueden ser encontrados dentro de estas aguas, de manera disuelta o suspendida, se agrupan en: *materia orgánica con grado variable de biodegradabilidad, compuestos nitrogenados de origen orgánico y/o mineral, compuestos fosforados de origen mineral y microorganismos compuestos por organismos saprofitos y patógenos* (Rojas, 2002). La contaminación por aguas residuales es uno de los mayores retos que la humanidad enfrenta en términos ambientales y de salud en la actualidad.

1.2 Descargas de aguas residuales en Latinoamérica

El creciente desarrollo urbano en Latinoamérica ha implicado un aumento en la producción de aguas residuales que tienen como principal desemboque los cuerpos de agua, como ríos, lagunas o mares. Estas aguas residuales tienen diferentes orígenes, de las cuales destacan las actividades: *domésticas, municipales e industriales*. La descarga de estas aguas residuales, han tenido consecuencias graves sobre los ecosistemas y recientemente sobre la salud humana. En Latinoamérica, muchas corrientes son receptoras de descargas directas de residuos domésticos e industriales (Reynolds, 2001), del cual 70% de las aguas residuales no son tratadas. El agua es extraída, usada y devuelta completamente contaminada a los diferentes cuerpos de agua, dentro del cual destaca como principal desemboque los ríos. La contaminación de los ríos debido

a la incorporación de microorganismos, productos químicos y residuos industriales genera graves problemas de carácter ecológico, social y económico, los cuales van deteriorando la calidad del agua y disminuyendo su disponibilidad (González, 2008). En promedio los países desarrollados tratan el 70% de sus aguas residuales, mientras los países de ingreso medio alto tratan el 38% y los de ingreso medio bajo el 28% (Allaoui *et al.*, 2015). Desde el punto de vista de la salud pública las aguas residuales son responsables del 80% de las defunciones en los países en vías de desarrollo. Esta situación se encuentra estrechamente relacionada con las bajas coberturas en el alcantarillado y el inadecuado tratamiento y disposición final de las aguas en estos países (OPS, 2002).

1.3 Descarga y reutilización del agua residual en México

Los recursos hídricos en México, al igual que en el resto del mundo, se encuentran bajo una creciente presión debido al aumento en el uso significativo de este recurso por las diferentes actividades productivas que se encuentran en el país. Este problema ha perjudicado gravemente la disponibilidad del agua que se ha originado por la falta de coordinación entre usuarios y autoridades, aunado a la falta de un adecuado tratamiento y reúso de las aguas residuales generadas. El saneamiento de las aguas residuales es de gran relevancia para poder asegurar su recolección, conducción, tratamiento y adecuada disposición en los cuerpos receptores, en condiciones de no perjudicar al medio ambiente y la salud de la población (de la Peña *et al.*, 2013). El tratamiento de aguas residuales tiene como objetivo remover y reducir las cargas contaminantes de este líquido vital, además de jugar un papel importante en el uso, manejo y conservación del agua. Un tratamiento adecuado tiene grandes beneficios a los ecosistemas, reduciendo la emisión de sustancias nocivas; además, el agua residual puede ser una fuente de nutrientes y de otros materiales recuperables, incluso de energía (SEDEMA, 2014). Debido a que los beneficios de contar con la disponibilidad de agua de calidad son innumerables, en México se ha creado un marco normativo que se encarga de regular las descargas de aguas residuales a los cuerpos receptores a

través de las siguientes Normas Oficiales Mexicanas (NOM), siendo de carácter obligatorio (Tabla 1):

Tabla 1. Conjunto de Normas Oficiales Mexicanas (NOM) para la regulación y control de las aguas residuales.

NOM	Descripción
<p>NOM-001-Semarnat-1996 *Actualmente: NOM-001-SEMARNAT-2021</p>	<p>Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas o bienes nacionales.</p>
<p>NOM-002-Semarnat-1996</p>	<p>Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en la descarga de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal.</p>
<p>NOM-003-Semarnat-1997</p>	<p>Establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios públicos.</p>
<p>NOM-004-Semarnat-2001</p>	<p>Establece las especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes en lodos y biosólidos para su aprovechamiento y disposición final.</p>

A partir de la creación de las normativas, se fomentó el desarrollo de instrumentos legales, económicos y tecnológicos que favorecieron y estimularon el reúso del agua residual tratada, específicamente en aquellas actividades en las que no se requiere agua de primer uso, para un correcto aprovechamiento de este recurso hídrico (CONAGUA, 2012).

1.4 Problemas de salud debido a la contaminación biológica del agua

Las aguas residuales, además de estar compuestas por sustancias químicas y materia orgánica, también podemos encontrar en ellas organismos vivos como lo son: virus, bacterias, parásitos y hongos; que son capaces de infectar y transmitir enfermedades a los seres humanos. Estos organismos patogénicos se originan en individuos infectados o en animales tanto domésticos como salvajes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha determinado que a nivel mundial se han generado 280 000 muertes asociadas a enfermedades de carácter hídrico y se estima que el 4% del total de las muertes en el mundo están relacionadas con la calidad del agua, higiene y saneamiento (Pérez-Cordón *et al.*, 2008). Por lo que, el agua que no es segura para beber y la contaminación a través del desecho inadecuado de aguas residuales son responsables del incremento de la mortalidad por enfermedades como la diarrea o gastroenteritis, que se encuentran entre las tres principales causas de muerte en el mundo y en Latinoamérica (Reynolds, 2002). Las enfermedades diarreicas agudas (EDA) son una de las diez causas principales de muerte por año en Latinoamérica (Del Puerto *et al.*, 1999) que se relacionan con los problemas de la calidad y saneamiento del agua. Particularmente podemos encontrar en las aguas residuales bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* y *Staphylococcus*, microorganismos que, en muchos casos, son agentes de enfermedades infecciosas (Nuñez & Moretton, 2006). Estas bacterias son capaces de sobrevivir e infectar a individuos mediante diferentes métodos, principalmente por la ingesta de agua contaminada.

1.5 Métodos para el análisis de microorganismos presentes en las aguas residuales en México

La OMS ha establecido que la ausencia de cualquier microorganismo en el agua potable para consumo humano debe ser un parámetro utilizado como guía de la calidad del agua. Con base en lo establecido por la OMS, en México se ha creado un Norma Mexicana siendo la NOM-112-SSA1-1994 que establece el método microbiológico para estimar el número de coliformes presentes en productos alimenticios, alimentos procesados y agua de diferente origen, por medio del cálculo del Número Más Probable (NMP). Sin embargo, esta norma solamente regula la presencia de bacterias en aguas residuales sin considerar la presencia de otros microorganismos igualmente patógenos. La mayoría de las normativas en Latinoamérica solamente incluyen el análisis de bacterias en aguas residuales, aunque es necesario desarrollar nuevos métodos para analizar la presencia y concentración de virus y de parásitos, ya que también están relacionados con enfermedades de origen hídrico (Venegas *et al.*, 2014). Como indicadores bacterianos, se considera *Escherichia coli* como el más específico de contaminación fecal. Para indicadores de contaminación parasitaria se ha propuesto el análisis de los protozoos *Giardia* y *Cryptosporidium*, aunque también se sugiere el uso de esporas de *Clostridium* (Payment, 1993). Para evaluar la presencia de virus de origen entérico se ha sugerido el uso de bacteriófagos F específicos, colífagos somáticos y fagos de *Bacteroides fragilis*, ya que estos presentan un comportamiento similar al de algunos virus patógenos causantes de enfermedades de origen hídrico (AWPRC, 1991). Estos indicadores deben ser incluidos dentro de las normativas y tomados en cuenta, con el fin de determinar aquellos ecosistemas que presentan microorganismos patógenos capaces de provocar enfermedades infecciosas y tomar acción sobre ellos.

1.6 Resistencia antimicrobiana (RAM)

La resistencia antimicrobiana (RAM) es un proceso completamente natural e intrínseco (Blair et al., 2014) dentro de la biología de los microorganismos como lo son de virus, bacterias y hongos. El incremento de la RAM durante los últimos años nos indica que existen nuevos métodos por los cuales estos microorganismos están adquiriendo una gran resistencia frente a los actuales tratamientos. La resistencia adquirida, es dada mediante mecanismos como la *modificación del sitio de efecto del antimicrobiano*, *hidrólisis/degradación enzimática e impermeabilidad*, que es consecuente de la alta presión selectiva que tienen estos microorganismos y que se derivan de acciones como el uso inadecuado de antimicrobianos y la automedicación (Founou, 2017).

La facilidad con la que estos microorganismos realizan la adquisición y transferencia de genes de resistencia por diferentes métodos: *mutación*, *transducción*, *conjugación* y *transformación*, han ocasionado la creación de bacterias multirresistentes en un período de tiempo muy corto; estos microorganismos también pueden ser denominadas como superbacterias (Chávez-Jacobo, 2020).

El incremento de la RAM es un problema de nivel mundial, ya que es responsable del aumento de los costos de atención médica, la duración de la estadía en los hospitales, la morbilidad y la mortalidad tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo (Gulen et al., 2015). Debido a este incremento, se han registrado un total de 700 000 casos de RAM, superando las cifras de otras enfermedades como el cáncer, cólera, diabetes y diarrea (Giono-Cerezo, 2020). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que la RAM ocasionará 10 millones de muertes por año para el 2050 y una reducción entre 2 y 5 % del producto interno bruto en algunos países (OMS, 2011).

2. MARCO CONCEPTUAL

2.1 Perspectiva sobre el Río Alseseca

El río Alseseca se encuentra ubicado en el municipio de Puebla en la zona oriente, haciendo un recorrido de norte a sur dentro de la mancha urbana. Iniciando en las faldas de la montaña Malintzi ($19^{\circ} 05' 59''$ N y $98^{\circ} 05' 24''$ O) y desembocando en la localidad de San Francisco Totimehuacan, en la presa Manuel Ávila Camacho ($18^{\circ} 57' 21''$ N y $98^{\circ} 11' 13''$ longitud O), con una longitud de cauce principal de 30.491 km (Tapia *et al.*, 2006). Históricamente el río Alseseca fue un recurso de agua importante a inicios de la construcción de Puebla de los Ángeles, utilizada principalmente para asentamientos y como delimitación entre territorios (González, 1995). Sin embargo, el incremento de la población y el creciente desarrollo económico derivado de fábricas y empresas de diferentes rubros, provocaron un desequilibrio ecológico dentro de los principales ríos presentes en la ciudad de Puebla. A lo largo de los años, el río Alseseca ha sufrido un deterioro debido al vertedero de aguas residuales provenientes de procesos industriales y asentamientos humanos. Dentro de los principales giros que se encuentran en la actividad industrial son: alimentos, textil, química, petroquímica, automotriz, papelera, bebidas, hierro y acero, farmacéutica, curtido de pieles, metalmecánica, siderúrgica y servicios. El río Alseseca cuenta con una ubicación de gran importancia para la ciudad puesto que se ha convertido en un cuerpo receptor de desechos sólidos y de descargas de aguas residuales municipales e industriales. Se ha demostrado mediante pruebas de toxicidad que la calidad del agua del río Alseseca posee un coeficiente alto de correlación entre parámetros fisicoquímicos y toxicológicos (Saldaña *et al.*, 2002), lo cual lo hace un río altamente contaminado.

2.2 Problemática de las aguas residuales en el estado de Puebla

En el estado de Puebla ha existido un incremento poblacional durante los últimos años, se ha registrado que del año 1900 al 2020, la cantidad de habitantes en Puebla es de seis veces mayor. De acuerdo con los últimos reportes del INEGI, el estado de Puebla cuenta con 6,583,278 millones de habitantes y un número total de 1,713,381 viviendas particulares habitadas, ocupando para ambos casos el 5° lugar a nivel nacional. Del número total de viviendas, solamente el 60% disponen de agua entubada (INEGI, 2020). De igual manera, en Puebla ha existido un aumento en cuanto al número de unidades económicas registradas, con un total de 215,140 unidades que resultan de la suma de grandes, medianas, pequeñas y microempresas (INEGI, 2009) que, en su mayoría, se encuentran ubicadas en los trece parques industriales de la ciudad y que tienen diversos giros: textil, metal, mecánica, química, embotelladoras, alimentarias, farmacéuticas, etc. Este incremento poblacional combinada con el aumento de unidades económicas, lleva consigo un aumento en la demanda de altos volúmenes de agua para el consumo humano y otras actividades de igual importancia. Como consecuencia, se han generado una gran cantidad de aguas residuales que constituyen focos de infección y toxicidad para la salud humana, así como para el ambiente (Bonilla *et al.*,2013).

Los hospitales poblanos también conforman un sector importante dentro del estado. Sus aguas residuales son mezclas complejas de sustancias químicas y biológicas altamente contaminantes y que comúnmente se descargan en los sistemas de drenaje municipal sin tratamiento previo, o bien, son tratadas en Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) convencionales que no están diseñadas para eliminar por completo estos contaminantes (Jaén-Gil *et al.*, 2019). La contaminación que presentan las aguas residuales que provienen de los diferentes sectores del estado y que no se encuentran entubadas, genera un importante riesgo para la salud de los habitantes que se encuentran relativamente cercanas a estos efluentes (Bonilla *et al.*,2013). La Secretaría de Sustentabilidad y Ordenamiento Territorial ha informado que de las 278 PTAR presentes en el

estado, solamente 35 funcionan y se encuentran dentro de la norma (Camacho, 2013) y de las cinco PTAR del Sistema Operador de Agua Potable y Alcantarillado de Puebla (SOAPAP) que existen en la capital poblana, solamente funcionan al 60% de su capacidad. La combinación de todos estos factores ha tenido como resultado una complicación en el manejo de aguas residuales en el estado de Puebla, generando una alta contaminación en los ríos presentes en la capital, ocasionando un alto impacto social, económico y, sobre todo, ecológico.

2.3 Bacterias de importancia médica recuperadas de aguas residuales del estado de Puebla

Las aguas residuales del estado de Puebla se caracterizan por contener una alta concentración de sustancias tóxicas (Gutiérrez, 2014) y por presentar aguas residuales con mezclas de desechos complejos y peligrosos por el gran número de contaminantes producto del desarrollo industrial del estado (Romo *et al.*, 2005). En el estado podemos encontrar ríos de interés con un alto índice de contaminación como lo son los ríos San Francisco, Atoyac y Alseseca. La CONAGUA ha clasificado estos ríos como fuertemente contaminados, considerando los análisis microbiológicos que contemplan una alta carga de coliformes fecales, como *Escherichia coli* y *enterococos*, siendo considerados como indicadores de contaminación biológica. También se ha demostrado la presencia de *Salmonella spp.* con resistencia a alguna clase de antibiótico en los principales ríos del estado (Tejeda, 2021) que son capaces de provocar enfermedades gastrointestinales, siendo un riesgo más para la sociedad en general.

2.4 La Organización Mundial de la Salud (OMS) respecto a bacterias patógenas resistentes a antimicrobianos

La OMS ha determinado que la RAM es un problema de nivel mundial, especialmente alarmante debido a la rápida propagación de bacterias multirresistentes y panresistentes (denominadas también «superbacterias») que provocan infecciones que no pueden tratarse con los medicamentos antimicrobianos comúnmente utilizados, como los antibióticos. Los antibióticos son

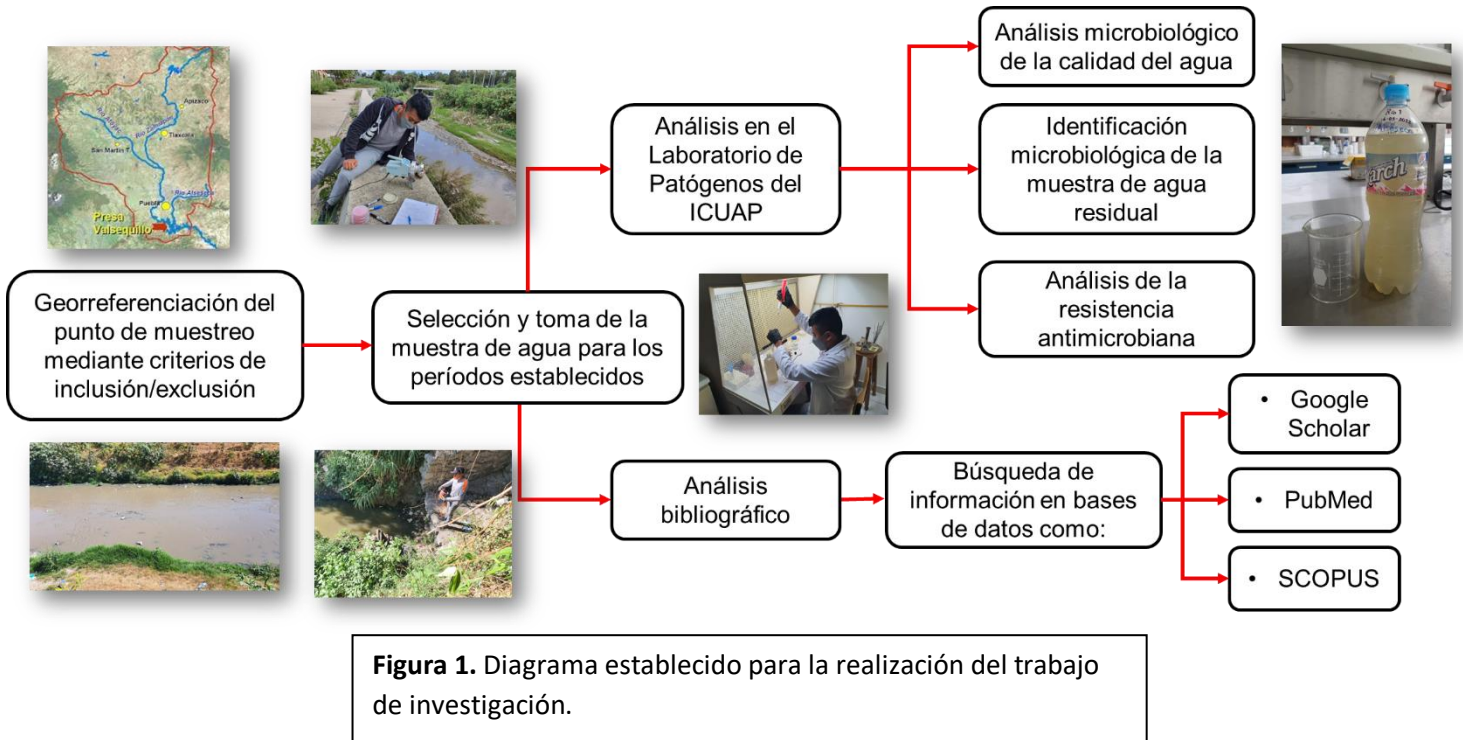
cada vez más ineficaces, a medida que la farmacorresistencia se propaga por todo el mundo, lo que conduce a un incremento de infecciones difíciles de tratar y al aumento de la mortalidad.

Por lo tanto, la OMS ha determinado que la RAM es una de las 10 principales amenazas de salud pública a la que se enfrenta la humanidad, siendo una amenaza para el desarrollo mundial que requiere de medidas multisectoriales urgentes para poder lograr los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). La OMS colabora estrechamente con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) en el enfoque «Una salud» para promover prácticas óptimas que permitan reducir la RAM y ralentizar su progresión. También, en el plano mundial, los países se han comprometido en la Asamblea Mundial de la Salud de 2015 a aplicar el marco establecido en el Plan de Acción Mundial (PAM) sobre la RAM y a la elaboración y aplicación de planes de acción nacionales multisectoriales.

La OMS también puso en marcha el Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (GLASS, por sus siglas en inglés) en 2015, que ofrece un enfoque normalizado para la recopilación, análisis, interpretación e intercambio de datos por los países, territorios y zonas, permitiendo supervisar la situación de los sistemas nacionales de vigilancia nuevos o existentes, permitiendo generar conocimiento y determinar las estrategias adecuadas para combatir la RAM.

Finalmente, la Alianza Mundial para la Investigación y Desarrollo de Antibióticos (GARDP), es una iniciativa en conjunta con la OMS y la Iniciativa de Medicamentos para las Enfermedades Desatendidas (DNDi), que fomenta la investigación y el desarrollo mediante alianzas público-privadas. Esta alianza tiene como objeto, que para el 2025 se deben elaborar y distribuir cinco nuevos tratamientos contra las bacterias farmacorresistentes que representan una amenaza mayor (OMS,2020).

3. DIAGRAMA DE TRABAJO



4. MARCO METODOLÓGICO

4.1 Reconocimiento del área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en la cuenca del río Alseseca que se encuentra localizada entre las coordenadas 19°12'55.14" y 18°56'51.08" latitud norte y 98°02'00" y 98°11'14" latitud oeste de la ciudad de Puebla, durante su recorrido se encuentran asentamientos industriales y casas-habitación y geográficamente se localizan tres hospitales cercanos al efluente: el hospital Militar Regional de Puebla, el hospital Los Pilares y el hospital General IMSS zona 20 y dos clínicas de atención: la Clínica Médica y Quirúrgica ABC y la Clínica Materno Infantil.

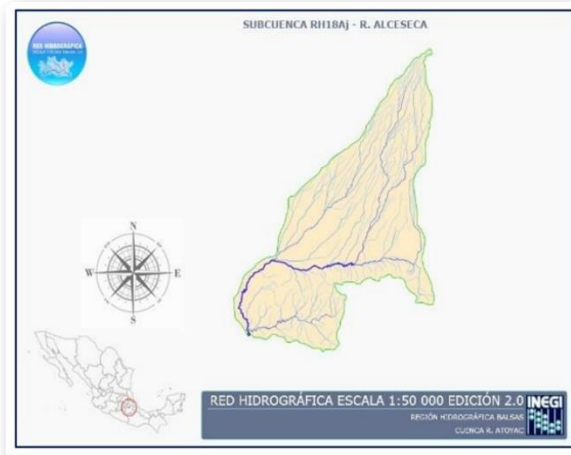


Figura 2. Mapa general del Río Alseseca. (Tomado de: INEGI 2019)

4.2 Toma de muestra de agua residual

La colecta de agua residual se llevó a cabo bajo la Norma Mexicana *NMX-AA-003* que establece los lineamientos generales y recomendaciones para el muestreo de aguas residuales. Se estableció un monitoreo piloto para determinar la carga bacteriana del punto de muestreo y establecer el número de diluciones para el correcto análisis de la muestra. La toma de muestra de agua residual se llevó a cabo mediante el uso de una cubeta, una soga de 10 m y un embudo. La muestra de agua residual obtenida se almacenó en una botella de plástico completamente estéril, con capacidad para 1 L. Se utilizó una hielera para el resguardo hacia el Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del Instituto de Investigación en Ciencias Microbiológicas (Figura 3).



Figura 3. Materiales utilizados para la toma de muestra de agua residual.

4.3 Registro de los factores físicos del agua

Para la toma de los parámetros físicos del agua se utilizó el muestreador “CONDUTRONIC PC18” (Figura 4) otorgado por el Instituto de Ciencias Químicas. El equipo cuenta con la capacidad para medir la *temperatura*, el *pH* y la *conductividad* a partir de la muestra de agua residual.



Figura 4. Equipo “CONDUTRONIC PC18” para el registro de los parámetros físicos del agua.

4.4 Análisis microbiológico para determinar la calidad del agua residual

Se analizó la calidad microbiológica de la muestra de agua residual utilizando el método establecido en la Norma Oficial Mexicana *NOM-112-SSA1-1994* para estimar el Número Más Probable (NMP) de coliformes totales y fecales. Esta prueba fue aplicada directamente del agua residual tomada del punto de muestreo sin ningún tipo de dilución. Se utilizaron los siguientes medios de cultivo: *caldo lactosado* en concentración *2x* para coliformes presuntivos, *verde brillante con bilis al 2%* para coliformes totales y *caldo EC* para coliformes fecales (Figura 5). La confirmación de los coliformes fecales se realizó mediante la siembra de los tubos positivos obtenidos en el *caldo EC* hacia medio *MacConkey*.

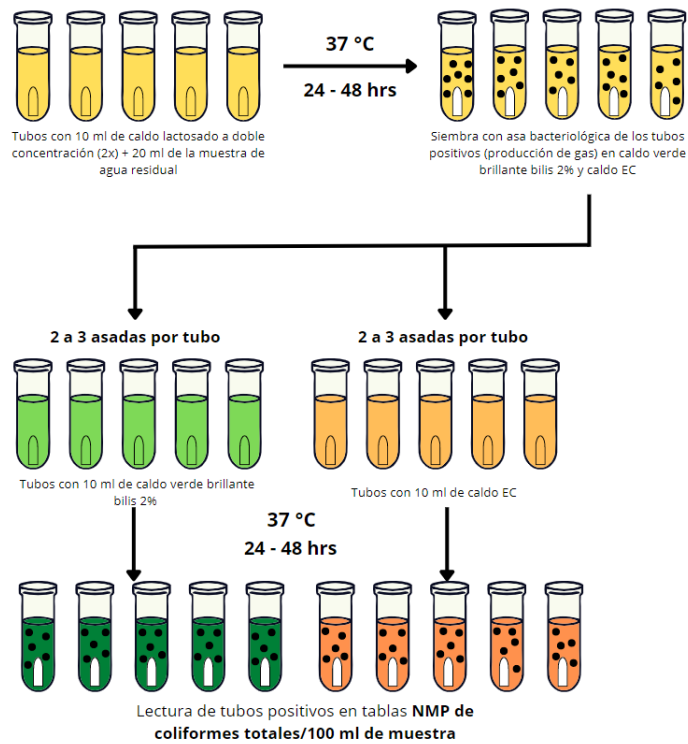


Figura 5. Método del NMP para la búsqueda de coliformes totales y fecales (Tomado de: Elaboración propia)

4.5 Identificación de cepas bacterianas en las muestras de aguas residuales

La preparación de la muestra de agua residual para la identificación de las cepas bacterianas se llevó a cabo realizando diluciones 1:9, obteniendo un total de 5 diferentes soluciones (Figura 6).

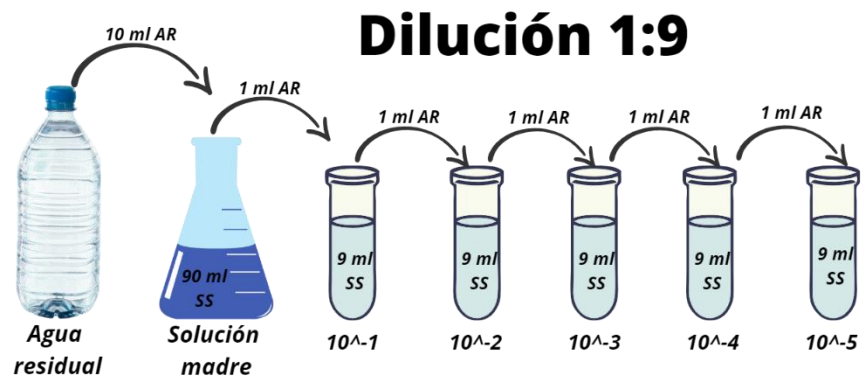


Figura 6. Método de dilución utilizado para el análisis microbiológico del agua residual (SS=Solución Salina; AR=Agua Residual) (Tomado de: Elaboración propia)

A partir de cada solución obtenida, se procedió a tomar 1 ml mediante el uso de una micropipeta con capacidad de 100 μ l – 1000 μ l para posteriormente realizar un sembrado masivo por triplicado en medio *agar nutritivo* (Figura 7). El conteo de UFC's se llevó a cabo de manera visual.

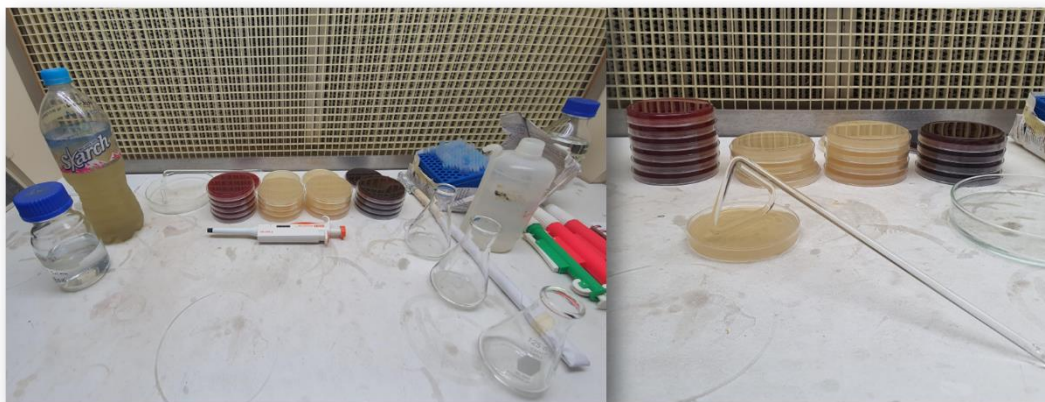


Figura 7. Materiales y medio de cultivo requeridos para la siembra de la muestra de agua.

Para obtener el *número total de colonias* \times ml, se utilizó la siguiente fórmula:

$$UFC = \# \text{ de colonias} \times 1 \text{ ml} \times \text{inverso de la solución}$$

Para la identificación de las cepas bacterianas se utilizaron las soluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} . Se tomó 1 ml de cada solución para realizar un sembrado masivo por duplicado en medios diferenciales *McConkey* y *EMB*.

Se analizó el crecimiento de cada placa sembrada una vez pasadas las 24 hrs. La selección de colonias para su identificación se llevó a cabo mediante un análisis visual, tomando en cuenta factores como: *la morfología, el borde, la superficie y la elevación* de cada colonia (Figura 8).















<p>Colonia completa</p> <ul style="list-style-type: none"> • Puntiforme  • Circular  • Rizoide  • Irregular  • Filamentosa  	<p>Borde</p> <ul style="list-style-type: none"> • Entero  • Ondulado  • Lobulado  • Filamentoso  • Rizado 
<p>Superficie</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lisa, brillante • Rugosa • Arrugada • Seca • Pulverulenta 	<p>Elevación</p> <ul style="list-style-type: none"> • Plana  • Elevada  • Convexa  • Pulvinada  • Umbonada 

Figura 8. Características morfológicas coloniales.
(Tomado de: Elaboración propia)

Las colonias seleccionadas fueron resembradas por estría cruzada sobre el medio del que se obtuvieron.

4.6 Identificación microbiológica

La identificación microbiológica se llevó a cabo utilizando una serie de pruebas que nos proporcionan los datos adecuados para su correcta identificación. En primera instancia se utilizó la tinción de Gram para determinar bacterias Gram (+) y Gram (-), al igual que la morfología al microscopio de cada cepa bacteriana (*cocos* y *bacilos*) (Figura 9).

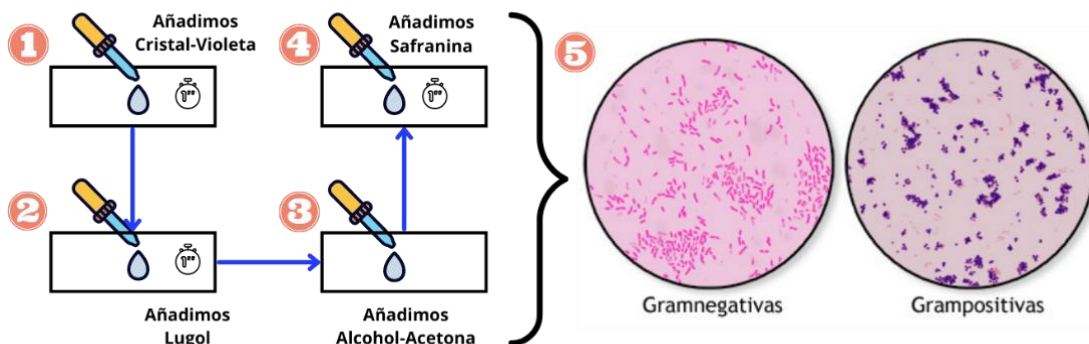


Figura 9. Metodología de la tinción de Gram para la diferenciación de bacterias Gram (+) y Gram (-) (Tomado de: Elaboración propia)

Las bacterias resultantes como Gram (+), tomando en cuenta la morfología al microscopio, se sembraron sobre medios selectivos agar *sangre* y medio *Baird Parker*. Las bacterias resultantes como Gram (-) se sembraron en pruebas bioquímicas: *MIO*, *Citrato*, *LIA*, *TSI* y *MR-VP*. Los resultados fueron interpretados utilizando las diferentes tablas de identificación disponibles. El sembrado en medios selectivos *Salmonella-Shigella*, *MacConkey* y *EMB* fueron complementarias y confirmativas en la identificación de las cepas bacterianas Gram (-).

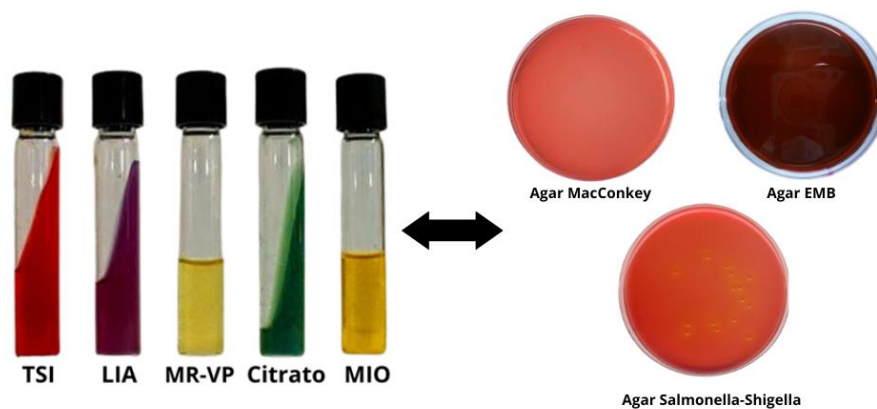


Figura 10. Pruebas bioquímicas y medios con agar Mc, EMB y SS para la confirmación de bacterias Gram (-) (Tomado de: Elaboración propia)

4.7 Prueba de susceptibilidad para determinar la RAM

El análisis de la resistencia antimicrobiana se llevó a cabo utilizando la prueba del antibiograma por la técnica de difusión en agar (disco-placa) basado en el método de *Kirby-Bauer*. Esta es una prueba estándar recomendada por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) para la determinación de la susceptibilidad bacteriana a los antimicrobianos (Jorgensen & Ferrara, 1998).

Las cepas bacterianas sometidas a la prueba de susceptibilidad se sembraron en tubos con *agua peptonada* y se incubaron a 35°C durante 12 a 24 hrs para conseguir o superar la turbidez 0.5 de la escala de McFarland.

Una vez ajustado el inóculo a la turbidez 0.5 de McFarland, se procedieron a utilizar hisopos de algodón estériles para obtener la muestra. El inóculo fue

sembrado en placas Petri con medio *Mueller-Hinton* deslizando el hisopo por toda la superficie, rotando la placa para obtener una siembra uniforme y posteriormente se dejaron secar de 3 a 5 minutos antes de colocar los discos.

Los discos se obtuvieron de “Investigación Diagnóstica: Laboratorio de Reactivos para Diagnóstico” y fueron aplicados manualmente con pinzas estériles, colocados sobre el centro de la placa y presionando ligeramente sobre la superficie del agar (Figura 10). Se incubaron inmediatamente a 35°C durante 18 a 24 hrs. Transcurrido el tiempo de incubación, los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición.



Figura 11. Método de Kirby-Bauer para determinar la susceptibilidad antimicrobiana.

5. RESULTADOS

5.1 Punto de muestreo

La selección del punto de muestreo se llevó a cabo mediante los siguientes factores de inclusión: *la presencia de un área hospitalaria cercana al efluente, la cercanía del cuerpo de agua a casas-habitación y un área geográfica accesible para la toma de agua y toma de los factores físicos del agua.* El punto denominado como “Los Fuertes”, con coordenadas 18°99’64” y -98°18’82” cumplió con los criterios de inclusión establecidos, por lo que fue seleccionado como punto de muestreo (Figura 11).



Figura 12. Punto de muestreo: los “Fuertes” seleccionado a partir de los criterios de inclusión.

5.2 Colecta de la muestra de agua residual

Se obtuvieron un total de 2 muestras de agua residual recolectadas del río Alseseca (Figura 12). La primera toma de muestra de agua residual se realizó el 16 de mayo del 2022 correspondiendo al “1er muestreo” y la segunda toma de muestra se realizó el 16 de septiembre del 2022 correspondiendo al “2do muestreo” (Figura 13).

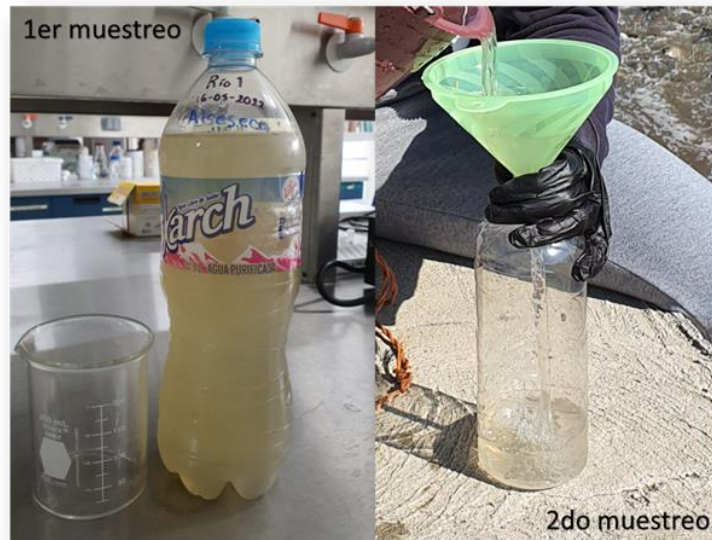


Figura 13. Muestras del agua residual.



Figura 14. Toma de muestra de agua residual del punto de muestreo para los períodos correspondientes.

5.3 Toma de los parámetros físicos del agua

Los parámetros físicos de la muestra de agua residual fueron tomados inmediatamente después de la recolección de la muestra para cada uno de los períodos (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros físicos del agua registrados en cada periodo de muestreo.

	<i>1er muestreo</i>	<i>2do muestreo</i>
<i>pH</i>	7.86	8.5
<i>Conductividad</i>	510 $\mu S/cm$	542 $\mu S/cm$
<i>Temperatura</i>	20°C	19°C

5.4 Calidad microbiológica del agua residual

La calidad microbiológica del agua residual del punto de muestreo determinó un número superior de 16,000 *NMP/100 ml* de coliformes totales y fecales. Se sugiere la presencia de *Escherichia coli* debido al crecimiento positivo que presento sobre medio *MacConkey* a partir de la resiembra de los tubos positivos de *caldo EC* (Figura 14). El número obtenido de NMP se comparó con el valor instantáneo estipulado por la NOM-001-SEMARNAT-2021, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Para determinar la contaminación por patógenos se toma como indicador a los coliformes fecales. El límite máximo permisible para las descargas de aguas residuales es de 250 y 500 como NMP de coliformes fecales por cada 100 *ml* para el promedio mensual y diario, obteniendo un número de valor instantáneo de 600 como NMP de coliformes fecales.

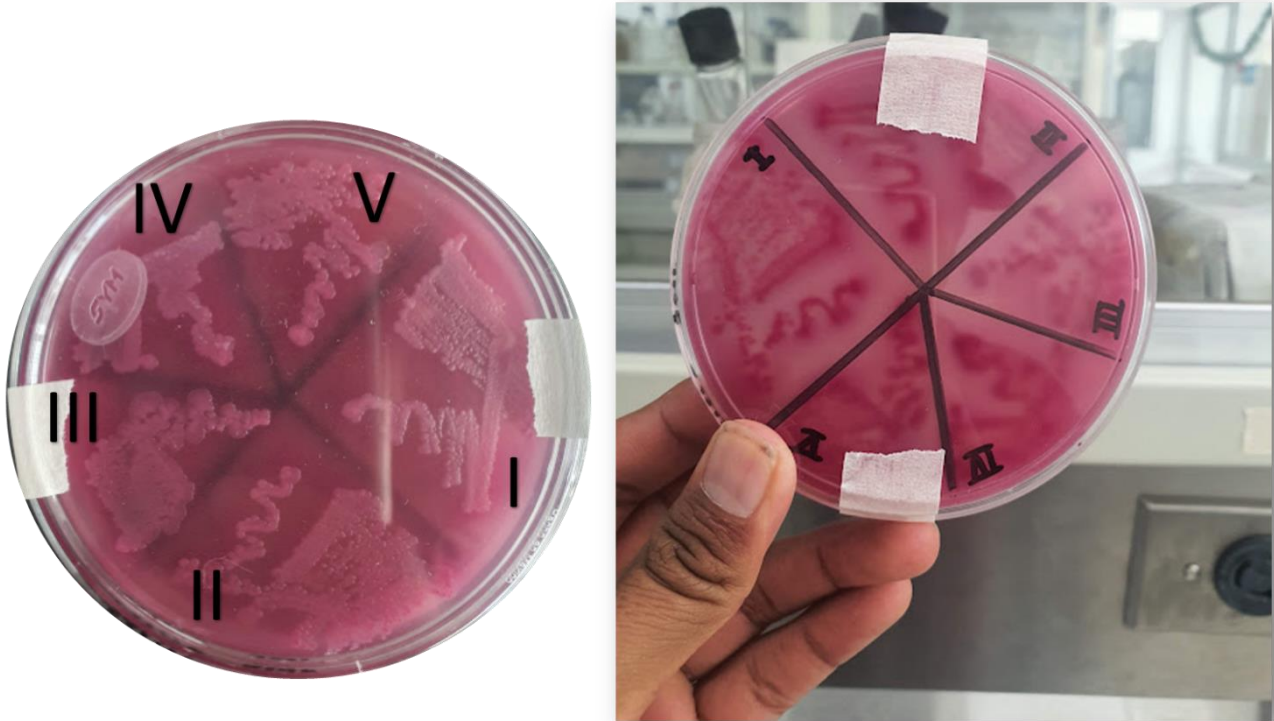


Figura 15. Contaminación por coliformes fecales debido a la presencia de *Escherichia coli*

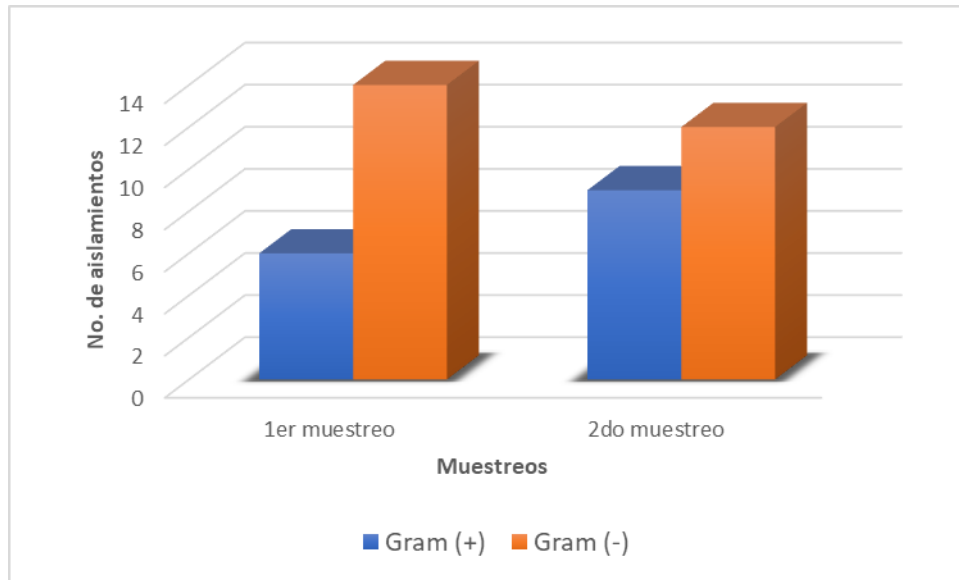
El NMP obtenido a partir de la muestra de agua residual del punto de muestreo superó los límites máximos permisibles estipulados en la norma (Tabla 3).

Tabla 3. NMP del punto de muestro comparado con el límite máximo permisible estipulado por la NOM-001-SEMARNAT-2021.

NMP obtenido del punto de muestreo	Límite máximo permisible de NMP establecido por la NOM-001-SEMARNAT-2021
16,000 NMP/100 ml	600 NMP/100 ml

5.5 Identificación bacteriana en las muestras de agua

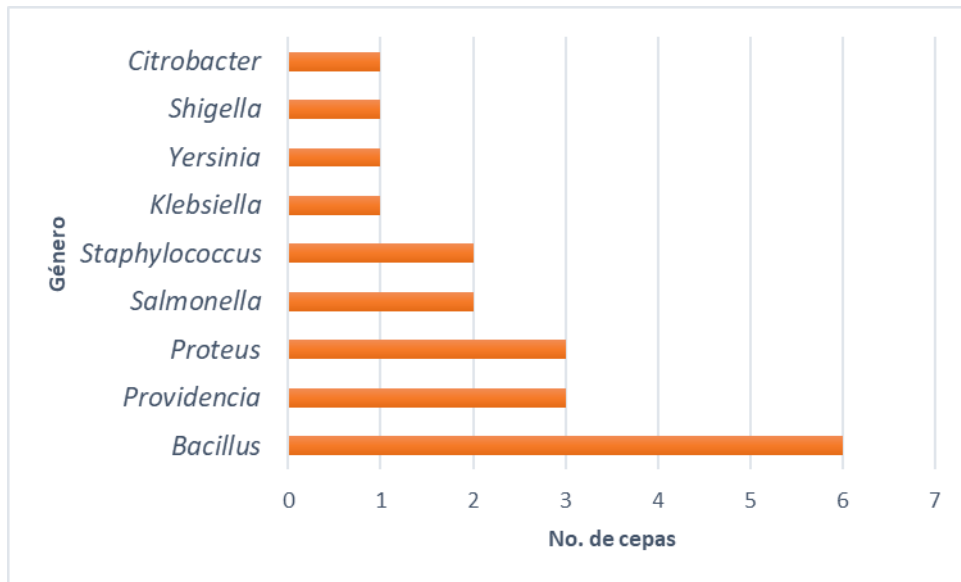
Para el “1er muestreo” se aislaron un total de 6 cepas bacterianas pertenecientes a Gram (+) (30%) y 14 cepas bacterianas pertenecientes a Gram (-) (70%). Para el “2do muestreo” se aislaron un total de 9 cepas bacterianas pertenecientes a Gram (+) (43%) y 12 cepas bacterianas pertenecientes a Gram (-) (57%) (Gráfica 1).



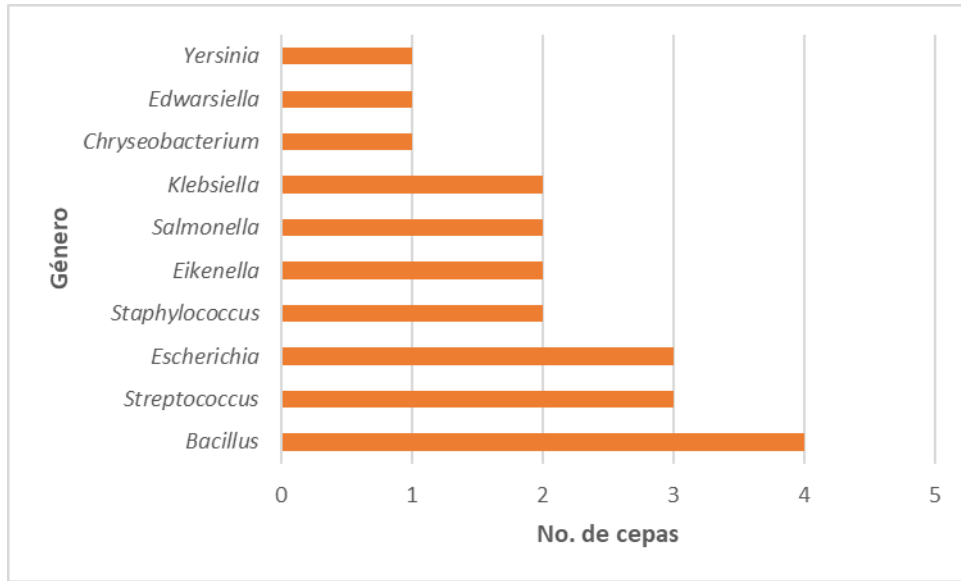
Gráfica 1. Comparación de cepas Gram (+) y Gram (-) del efluente, recuperadas en dos períodos estacionales.

Se aislaron un total de 9 géneros para el “1er muestreo” de los cuáles 3 géneros son pertenecientes a *Enterobacterias* (15%), siendo *Citrobacter*, *Salmonella* y *Shigella*. Los géneros restantes fueron representados por el género *Bacillus* (30%) que representó el género con mayor cantidad de aislamiento seguido de los géneros *Klebsiella* (5%), *Yersinia* (5%) y *Citrobacter* (5%) que representaron los géneros con menor cantidad de aislamiento (Gráfica 2). Para el “2do muestreo” se aislaron un total de 10 géneros, de los cuáles 2 géneros son pertenecientes a *Enterobacterias* (24%) siendo *Escherichia* y *Salmonella*. Los géneros restantes fueron representados de igual manera por el género *Bacillus* (17%) que también representó el género con mayor cantidad de aislamiento, seguido de los géneros

Chryseobacterium (5%), *Edwardsiella* (5%) y *Yersinia* (5%) que representaron los géneros con menor cantidad de aislamiento (Gráfica 3).



Gráfica 2. Géneros identificados y cantidad de aislamientos para el 1er muestreo.



Gráfica 3. Géneros identificados y cantidad de aislamientos para el 2do muestreo.

5.6 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas bacterianas

Se utilizaron un total de 18 antimicrobianos para la prueba de susceptibilidad. Se emplearon 12 antimicrobianos para Gram (+) y Gram (-) respectivamente. Cada antimicrobiano presentó su respectiva concentración en μg , que está en función de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) que se encuentra determinada por el laboratorio de origen de los sensidiscos utilizados (Tabla 4).

Tabla 4. Antimicrobianos utilizados para Gram (+) y Gram (-) con su respectiva concentración mínima inhibitoria (CMI).

Gram (+)	CMI	Gram (-)	CMI
Clindamicina (CLM)	30 μg	Amikacina (AK)	30 μg
Dicloxacilina (DC)	1 μg	Carbenicilina (CB)	100 μg
Eritromicina (E)	15 μg	Cloronfenicol (CL)	30 μg
Penicilina (P)	10 U	Netilmicina (NET)	30 μg
Tetraciclina (TE)	30 μg	Nitrofurontaina (NF)	300 μg
Vancomicina (VA)	30 μg	Norfloxacina (NOF)	10 μg
Ampicilina (AM)	10 μg	Ampicilina (AM)	10 μg
Cefalotina (CF)	30 μg	Cefalotina (CF)	30 μg
Cefotoxima (CFX)	30 μg	Cefotoxima (CFX)	30 μg
Ciprofloxacina (CPF)	5 μg	Ciprofloxacina (CPF)	5 μg
Gentamicina (GE)	10 μg	Gentamicina (GE)	10 μg
Sulfametoxazol/Trimetoprim (SXT)	25 μg	Sulfametoxazol/Trimetoprim (SXT)	25 μg

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana fueron aplicadas en base al número de aislamientos obtenidos para cada cepa bacteriana de los medios de cultivo. Para bacterias Gram (+) se aplicaron en total 8 pruebas de susceptibilidad antimicrobiana; al género *Staphylococcus* se aplicó 1 prueba de susceptibilidad, para *Streptococcus* se aplicaron 3 diferentes pruebas de susceptibilidad y para *Bacillus* 4 diferentes pruebas de susceptibilidad. Para bacterias Gram (-) se aplicaron en total 11 pruebas de susceptibilidad antimicrobiana; a los géneros *Chryseobacterium* y *Edwardsiella* se aplicaron 1 prueba de susceptibilidad, para *Eikenella*, *Salmonella* y *Klebsiella* se aplicaron 2 pruebas diferentes de

susceptibilidad y para *Escherichia* se aplicaron 3 pruebas diferentes de susceptibilidad (Tabla 5).

Tabla 5. Número de bacterias Gram (+) y Gram (-) identificadas en el agua residual.

Gram (+)	Pruebas de susceptibilidad aplicadas	Gram (-)	Pruebas de susceptibilidad aplicadas
<i>Staphylococcus</i>	1	<i>Chryseobacterium</i>	1
<i>Streptococcus</i>	3	<i>Edwardsiella</i>	1
<i>Bacillus</i>	4	<i>Eikenella</i>	2
		<i>Salmonella</i>	2
		<i>Klebsiella</i>	2
		<i>Escherichia</i>	3

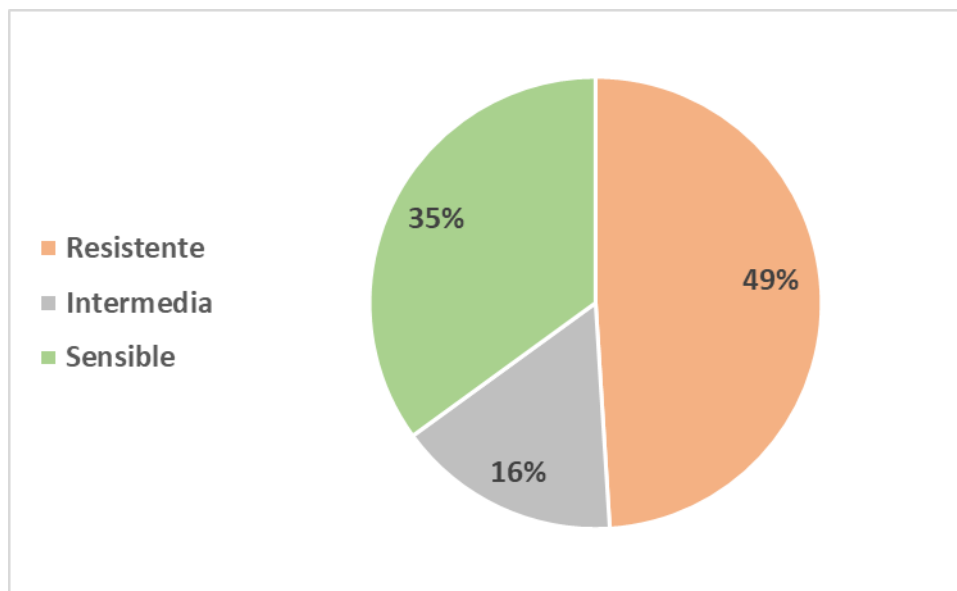
Las zonas que presentaron un halo de inhibición alrededor de los discos impregnados con los respectivos antimicrobianos, fueron medidas utilizando una regla estándar sobre el reverso de la placa. Se compararon los diámetros de los halos de inhibición con las CMI's, para determinar la categoría de cada cepa sometida a la prueba de susceptibilidad. Dependiendo de los resultados, se han establecido 3 categorías principales, que varía dependiendo del antibiótico utilizado:

- **Sensible (S):** Indica que la infección ocasionada por la cepa para la que se ha determinado la CMI (*aprox. de 30 a 35 mm*) puede tratarse de forma adecuada empleando las dosis habituales del antimicrobiano.
- **Intermedio (I):** Indica que el halo traducido en valores de CMI (*inferior a 15 mm*), se aproxima a las concentraciones de antimicrobianos alcanzables y que puede esperarse eficacia clínica en aquellas

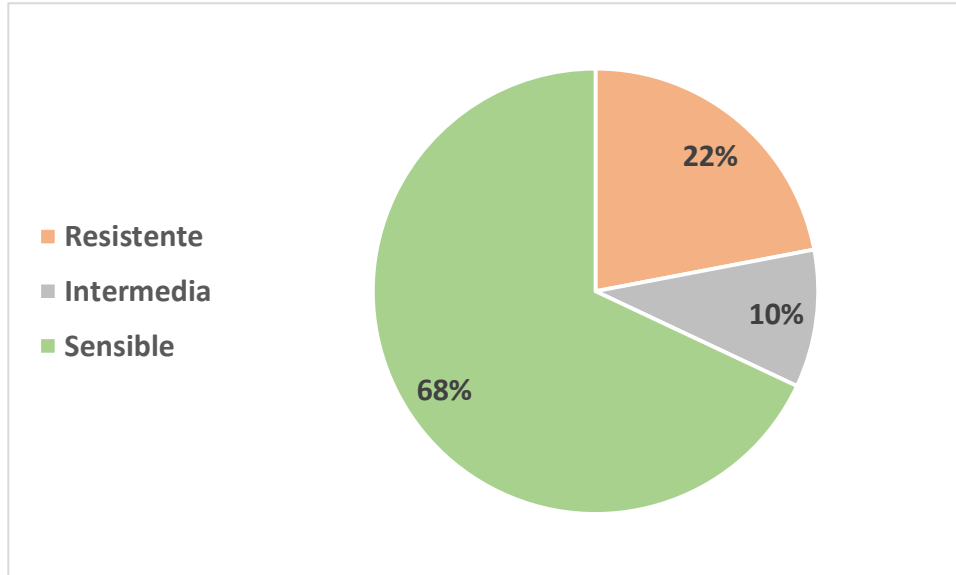
localizaciones que se alcanzan altas concentraciones de antimicrobiano o cuando se emplean dosis más elevadas de lo habitual.

- **Resistente (R):** Se refiere a aquellos microorganismos que no son inhibidos por las concentraciones habitualmente alcanzadas en sangre/tejidos del correspondiente antimicrobiano, o a aquellos microorganismos en los que existen mecanismos de resistencia específicos.

Las bacterias Gram (+) presentaron una mayor resistencia (49%) que susceptibilidad (35%) a los antimicrobianos (Gráfica 4). Las bacterias Gram (-) presentaron una mayor susceptibilidad (68%) que resistencia (22%) a los antimicrobianos (Gráfica 5).

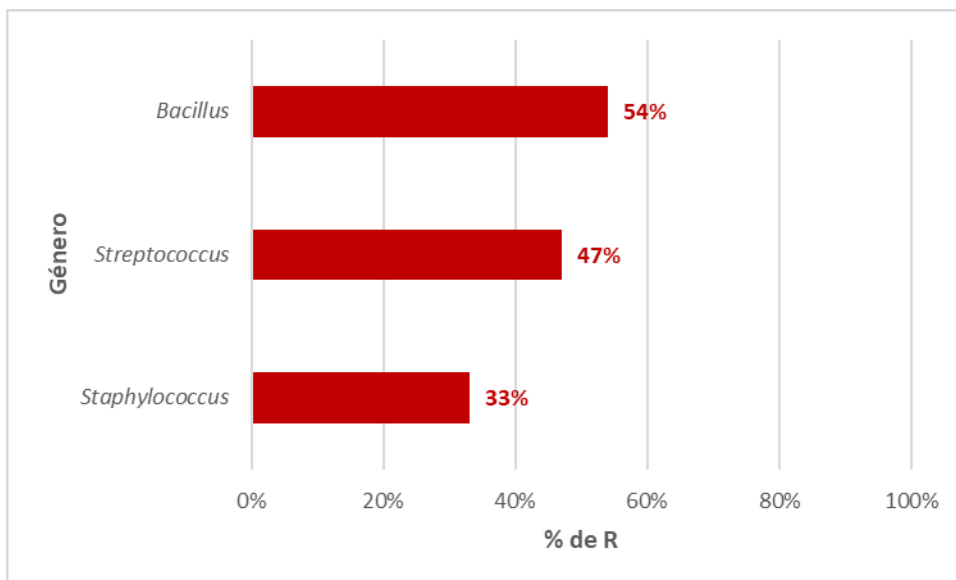


Gráfica 4. Porcentaje de los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en las bacterias Gram (+).



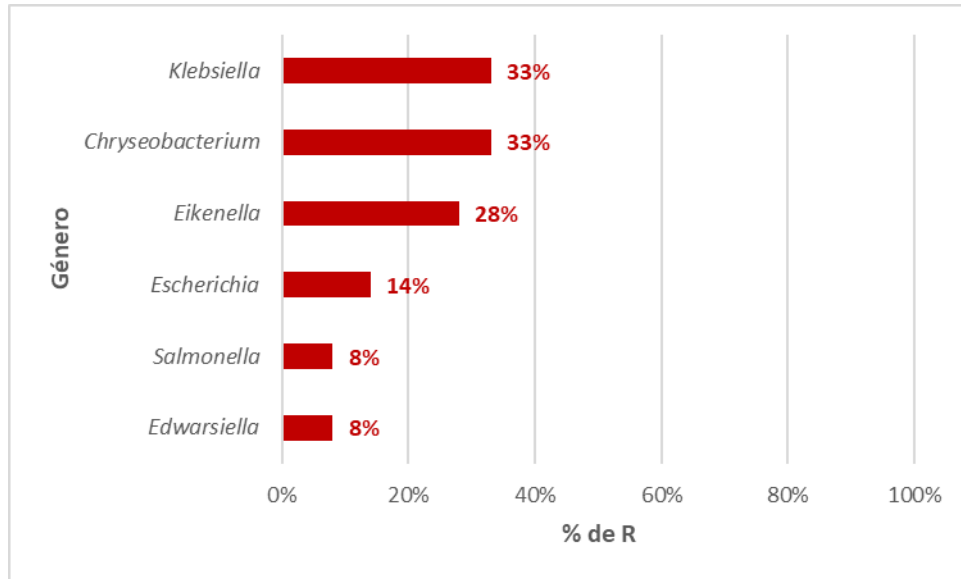
Gráfica 5. Porcentaje de los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en las bacterias Gram (-).

Se realizó la comparación de resistencia antimicrobiana de los géneros bacterianos Gram (+) encontrando con mayor porcentaje de resistencia las cepas del género *Bacillus* con un 54%, seguidos por las cepas del género *Streptococcus* con un 47% y un 33% para las cepas bacterianas del género *Staphylococcus* (Gráfica 6).



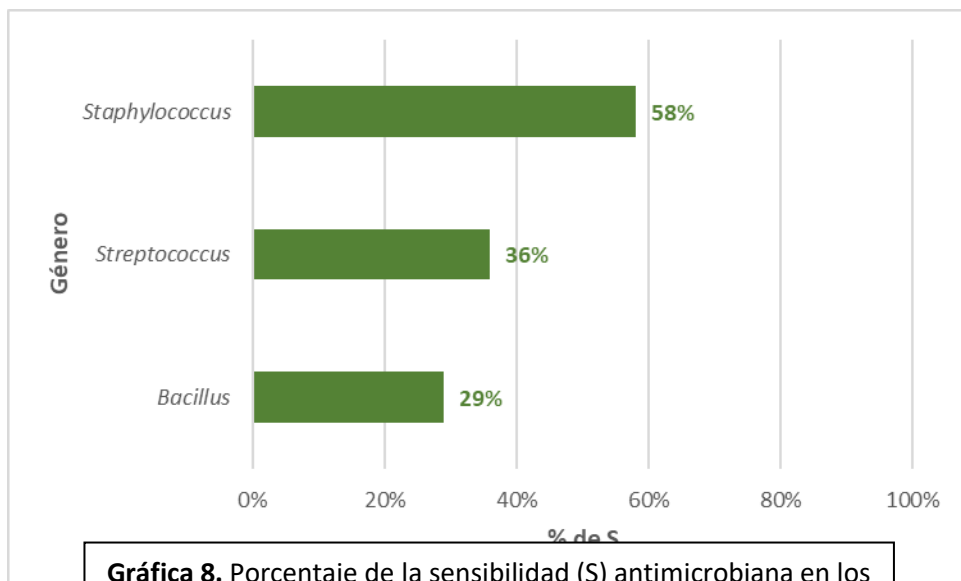
Gráfica 6. Porcentaje de la resistencia (R) antimicrobiana en los géneros pertenecientes a Gram (+).

Para los géneros bacterianos Gram (-), se encontró una resistencia a los antimicrobianos del 33% en los géneros *Klebsiella* y *Chryseobacterium*, seguido de las cepas del género *Eikenella* con un 28%, el género *Escherichia* con un 14% y los géneros *Salmonella* y *Edwarsiella* con una resistencia del 8% (Gráfica 7).



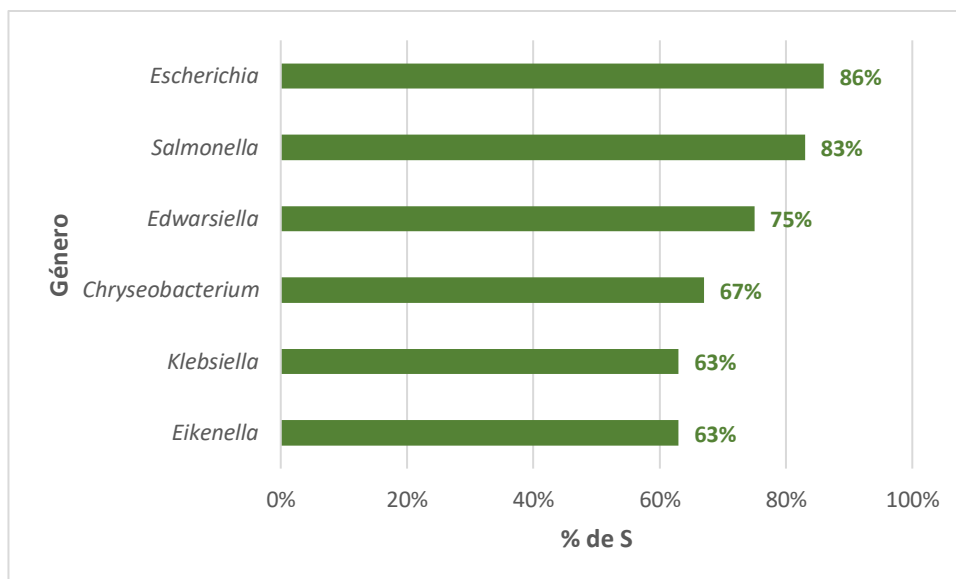
Gráfica 7. Porcentaje de la resistencia (R) antimicrobiana en los géneros pertenecientes a Gram (-).

Se realizó el análisis de la sensibilidad antimicrobiana de los géneros bacterianos Gram (+) encontrando con mayor porcentaje de sensibilidad el género *Staphylococcus* con un 58%, seguido de las cepas del género *Streptococcus* con un 36% y el género *Bacillus* con una sensibilidad del 29% (Gráfica 8).



Gráfica 8. Porcentaje de la sensibilidad (S) antimicrobiana en los géneros pertenecientes a Gram (+).

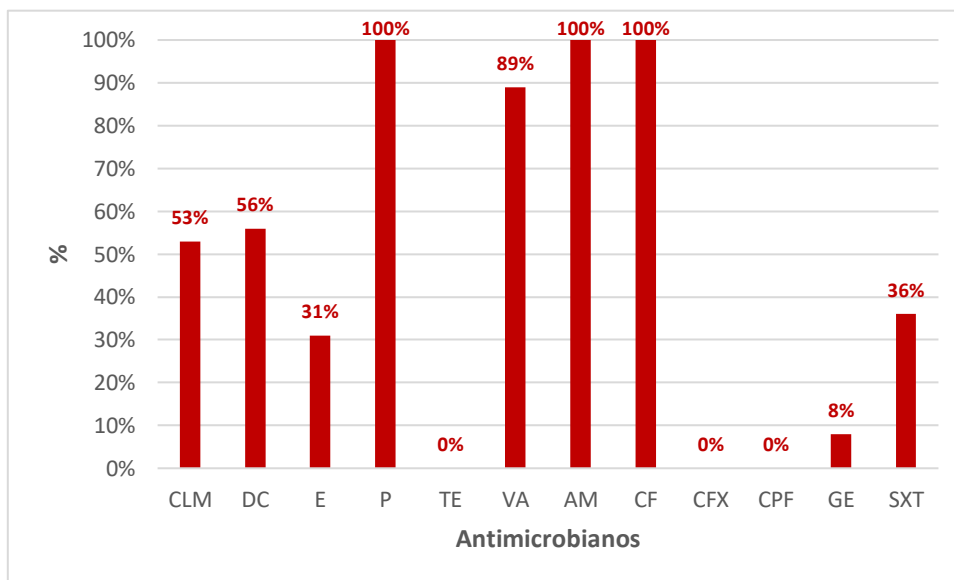
Para los géneros bacterianos Gram (-), se encontró un mayor porcentaje de sensibilidad a los antimicrobianos en el género *Escherichia* del 86%, seguido de las cepas del género *Salmonella* del 83%, el género *Edwardsiella* con el 75%, el género *Chryseobacterium* con el 67% y los géneros *Klebsiella* y *Eikenella* presentaron una sensibilidad del 63% (Gráfica 9).



Gráfica 9. Porcentaje de la sensibilidad (S) antimicrobiana en los géneros pertenecientes a Gram (-).

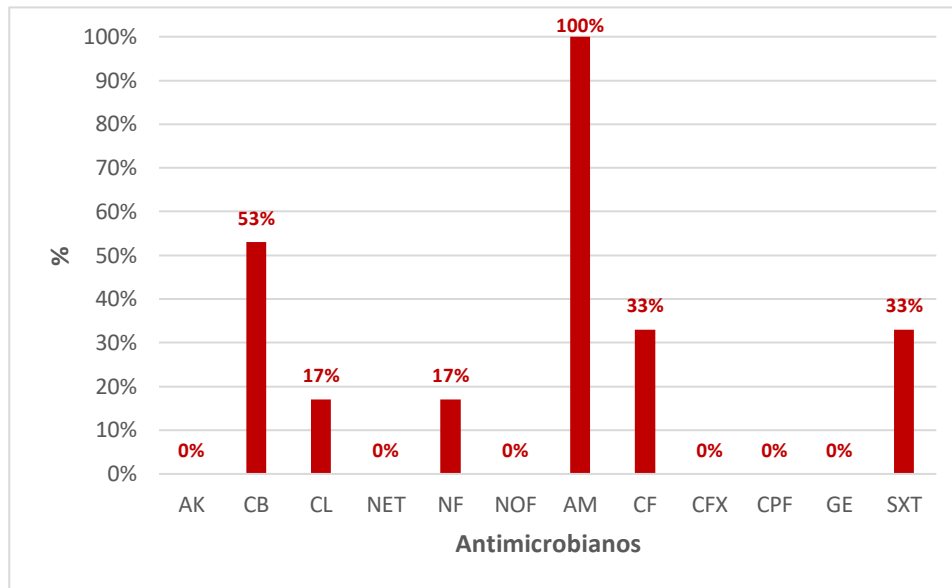
5.7 Resistencia y susceptibilidad a los antimicrobianos

El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), anteriormente conocido como “El Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS),” ha establecido la realización de pruebas de rutina de susceptibilidad antimicrobiana ante 12 antibióticos con su CMI para bacterias gram (+). En los resultados de este estudio 9/12 antibióticos no presentaron una acción inhibitoria ante las cepas aisladas del río Alseseca. Del total de cepas gram (+) el 100% presentó resistencia a penicilina (P), ampicilina (AM) y cefalotina (CF), un 89% de las cepas fue resistente a vancomicina (VA), un 56% a dicloxacilina (DC), un 53% a clindamicina (CLM), un 36% a sulfametoxazol/trimetoprim (SXT), un 31% a eritromicina (E) y el 8% a gentamicina (GE) (Gráfica 10).



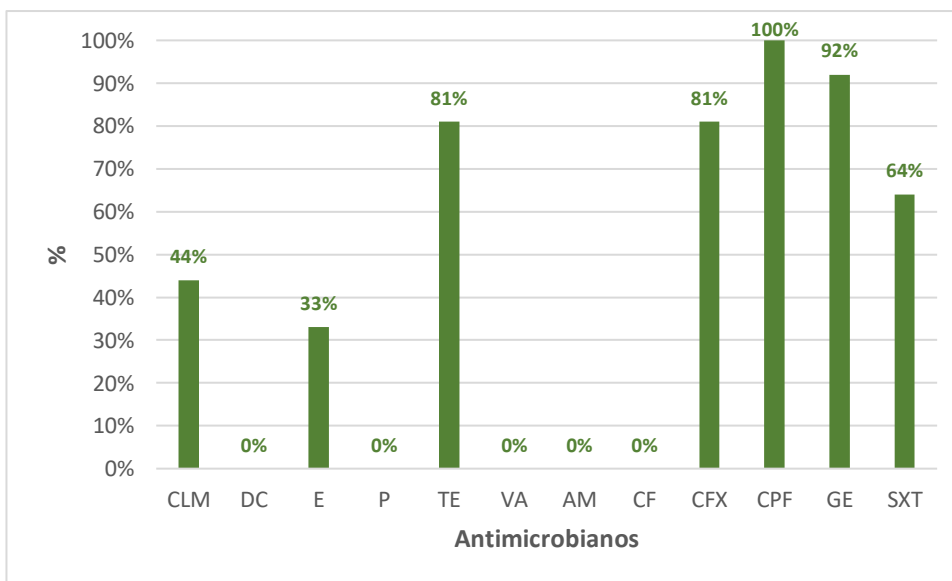
Gráfica 10. Análisis de la resistencia (R) de las bacterias Gram (+) ante los diferentes tipos de antibióticos.

Para bacterias Gram (-), los resultados de este estudio determinaron que 6/12 antibióticos no presentaron una acción inhibitoria ante las cepas aisladas del río Alseseca. Del total de cepas gram (-) el 100% presentó resistencia a la penicilina, un 53% de las cepas fue resistente a la carbenicilina, un 33% a cefalotina y sulfametoxazol/trimetoprim y un 17% a cloronfenicol y nitrofurontaina (Gráfica 11).



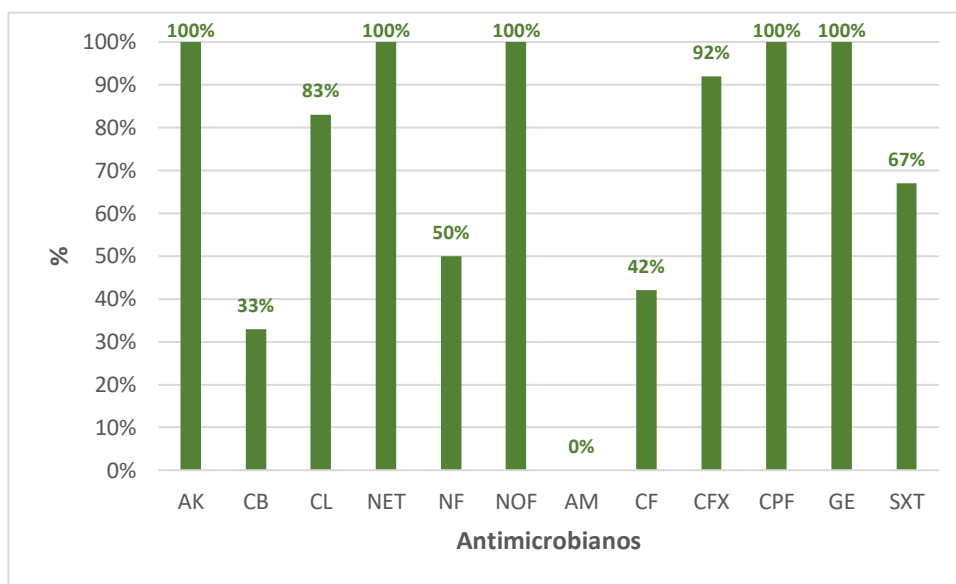
Gráfica 11. Análisis de resistencia (R) de las bacterias Gram (-) ante los diferentes tipos antibióticos.

Las cepas Gram (+) aisladas del río Alseseca fueron sensibles a 7/12 antibióticos. Ante la presencia de ciprofloxacina (CPF) presentó una acción inhibitoria de un 100% seguido por el 92% de las cepas que fue sensible a gentamicina (GE), un 81% a tetraciclina (TE) y cefotaxima (CFX), un 64% a sulfametoxazol/trimetoprim (SXT), un 44% a clindamicina (CLM) y un 33% a eritromicina (E) (Gráfica 12).



Gráfica 12. Análisis de la sensibilidad (S) de las bacterias Gram (+) ante los diferentes tipos de antibióticos.

Para bacterias Gram (-), los resultados de este estudio determinaron que 11/12 antibióticos presentaron una acción inhibitoria ante las cepas aisladas del río Alseseca. Del total de cepas gram (-) el 100% presentó sensibilidad a la amikacina (AK), netilmicina (NET), norfloxacin (NOF), ciprofloxacina (CPF) y gentamicina (GE), el 92% de las cepas fue sensible a cefotaxima (CFX), un 83% a cloranfenicol (CL), un 67% a sulfametoxazol/trimetoprim (SXT), un 50% a nitrofurantoína (NF), un 42% a cefalotina (CF) y un 33% a carbenicilina (CB) (Gráfica 13).



Gráfica 13. Comparación de la sensibilidad (S) de las bacterias Gram (-) ante los diferentes tipos de antibióticos.

5.8 Multirresistencia en las cepas aisladas del agua residual

En las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, presentar resistencia superior a 3 antimicrobianos se consideró como una “*multirresistencia*”. Los géneros bacterianos Gram (+) presentaron multirresistencia, destacando el género *Bacillus* con resistencia a más de 4 antibióticos siendo: dicloxacilina (DC), penicilina (P), vancomicina (VA), ampicilina (AM) y cefalotina (CF). Seguido del género *Staphylococcus* que también presentó resistencia a más de 4 antibióticos siendo: penicilina (P), vancomicina (VA), ampicilina (AM) y cefalotina (CF). Finalmente, el género *Streptococcus* presentó resistencia a 3 antibióticos, siendo: penicilina (P), ampicilina (AM) y cefalotina (CF) (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación de la multirresistencia en los géneros bacterianos Gram (+)

Género	Antimicrobianos				
	(DC)	(P)	(VA)	(AM)	(CF)
<i>Bacillus</i>	R	R	R	R	R
<i>Streptococcus</i>	-	R	-	R	R
<i>Staphylococcus</i>	-	R	R	R	R

Los géneros bacterianos Gram (-), el género *Chryseobacterium* fue el único que presentó resistencia a más de 4 antibióticos, siendo: carbenicilina (CB), ampicilina (AM), cefalotina (CF) y sulfametoxazol/trimetoprim (SXT) (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación de la multirresistencia en los géneros bacterianos Gram (-)

Género	Antimicrobianos			
	(CB)	(AM)	(CF)	(SXT)
<i>Chryseobacterium</i>	R	R	R	R

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La evaluación de la calidad de las aguas residuales del estado de Puebla es un tema de interés debido al aumento del volumen y la concentración de las cargas contaminantes en los cuerpos receptores derivado del crecimiento poblacional y de las actividades económicas que se ha registrado en los últimos años (SEGOB, 2021). Los microorganismos presentes en el agua residual toman un papel importante en la contaminación ambiental debido a los problemas de salud pública que han ocasionado, es por ello por lo que en México existe un cuadro normativo que determina y regula la presencia de coliformes totales y fecales, organismos que funcionan como indicador de contaminación bacteriana y degradación de los cuerpos de agua (Fernández *et al.*, 2001). Particularmente la NOM-001-SEMARNAT-2021 es la encargada de establecer los límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales, específicamente para microorganismos CF y CT del cual determina un límite permisible de 600 NMP/100 ml. Esta cifra fue superada para este estudio con un NMP de 16,000 NMP/100 ml, determinando que para el agua residual del río Alseseca, se encuentra altamente contaminadas por microorganismos patógenos, poniendo en riesgo la salud de las comunidades cercanas al efluente.

Por otro lado, en el agua residual podemos encontrar microorganismos, que además de ser patógenos, pueden llegar a presentar un cierto tipo de resistencia a los antimicrobianos. La creciente prevalencia de los microorganismos resistentes tiene una notable repercusión en la salud pública ya que condiciona el incremento de los índices de morbilidad y mortalidad por infecciones, prolonga la enfermedad y el incremento sustancial de los costos sanitarios (Harbarth & Samore, 2005). El desarrollo de bacterias resistentes se ha visto influida por factores como los parámetros físicos, químicos y biológicos de las aguas residuales ya que juegan un papel importante en la activación, modulación o represión de genes de resistencia en las bacterias patógenas (Goñi-Urriza *et al.*, 2000). Particularmente, se ha sugerido que los factores físicos que fueron tomados para este estudio como lo son la temperatura, el pH y la conductividad de las aguas residuales

influyen en el desarrollo de resistencia antimicrobiana (Martínez-Bauza, 2021); de hecho, cualquier variación en la composición del agua residual como la presencia de metales pesados, solventes y/o residuos de antibióticos afecta la dinámica microbiana, propiciando el desarrollo de bacterias resistentes (Rose *et al.*, 2001).

Entre la gran variedad de microorganismos que podemos encontrar dentro de las aguas residuales, podemos diferenciar en bacterias grampositivas y gramnegativas. La cantidad de aislamientos fue superior para bacterias gramnegativas que, para bacterias grampositivas, coincidiendo con Campo-Vera *et al.*, 2017 así como con Sánchez & Gonzáles, 2008, quienes realizaron pruebas similares de aislamientos provenientes de aguas residuales. Para la identificación bacteriana, se utilizaron métodos de identificación como la siembra en medios selectivos y diferenciales, el análisis de la morfología colonial como la forma, color, borde, centro, superficie y elevación; además de la utilización de pruebas bioquímicas en el caso de bacterias gramnegativas. Se ha sustentado que el uso de pruebas bioquímicas diferenciales convencionales junto con el uso de tablas y claves es complementaria en la identificación de bacterias gramnegativas (Camacho *et al.*, 2009).

En cuanto a microorganismos pertenecientes a bacterias grampositivas que producen infecciones humanas frecuentes son, en su mayoría, cocos: estafilococos, estreptococos (incluidos neumococos) y enterococos. Estas las podemos encontrar tanto en ecosistemas abiertos como en medios nosocomiales (Casellas, 2011). El género *Bacillus*, perteneciente también a bacterias grampositivas, destaca por haber obtenido el mayor número de aislamientos para este estudio, coincidiendo con Martínez *et al.*, 2006 quién menciona que este género predomina en aislamientos derivados de aguas residuales y que suelen presentar una resistencia mayor a 3 antimicrobianos, siendo principalmente resistente a la eritromicina, penicilina y cefotaxima (Martínez *et al.*, 2010). Existen datos publicados por diferentes Sistemas de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana en América Latina que coinciden en que bacterias grampositivas, tales como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus pneumoniae* y *Enterococcus* spp.,

son las de mayores índices de resistencia a los antimicrobianos. Particularmente se ha destacado a *S. aureus*, ya que ha demostrado resistencia a la penicilina en todos los aislamientos de origen hospitalario y resistencia en más del 85% de los aislamientos de origen comunitario debido a la adquisición de genes que codifican enzimas, conocidas como betalactamasas, que inactivan la penicilina y sus derivados, como aminopenicilinas y carboxipenicilinas (Alemán, 2013). América Latina es una de las regiones más perjudicadas por la resistencia a la penicilina, según los datos de la vigilancia epidemiológica del grupo SIREVA coordinado por la Organización Panamericana de la Salud (Hortal *et al.*, 2000). La proporción de aislados hospitalarios resistentes a ciprofloxacina puede llegar hasta un 90%.

Por otro lado, tenemos presentes a microorganismos pertenecientes a bacterias gramnegativas, en donde se presenta fundamentalmente a la familia *Enterobacteriaceae* y bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNNF) ya que son de gran importancia clínica. Para la familia *Enterobacteriaceae* se destaca la presencia de especies como *E. coli* y *P. mirabilis* como causa de infecciones urinarias. Estas bacterias las podemos encontrar tanto en el medio ambiente como en sitios hospitalarios (Casellas, 2011). Para la bacteria de *E. coli* se ha registrado su aislamiento en diversos estudios de aguas residuales (Tapia *et al.*, 2006; Miranda, 2020) puesto que es un indicador de contaminación reciente de coliformes fecales, debido a que suelen localizarse abundantemente en heces tanto de animales como de humanos (Soto *et al.*, 2016). La presencia de este bacilo gramnegativo es de importancia clínica, ya que es causante del 50% de los casos de diarrea, además de presentar la característica de ser una bacteria capaz de persistir en el medio ambiente por meses e inclusive por años (Norazah *et al.*, 1998). Cepas como *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Shigella* spp., algunas de ellas aisladas para este estudio, también son representativas de esta familia y de igual manera son causantes de infecciones que suelen presentar una resistencia múltiple (Casellas, 2011). Las bacterias gramnegativas suelen presentar resistencia de entre el 60 y 80% a antimicrobianos como lo son al: cloranfenicol, ceftriaxona y cefotaxima, otros más suelen presentar una resistencia de hasta el 100% a antimicrobianos como: cefalexina, kanamicina, amikacina y

norfloxacin, particularmente en cepas como *Acinetobacter* spp., *Neisseria* spp. y *Pseudomonas* spp. (Martínez *et al.*, 2010). La producción de betalactamasas es uno de los mecanismos más importantes en el área clínica en la resistencia a betalactámicos para bacterias gramnegativas, seguido de la disminución de la permeabilidad en la pared celular debido a la presencia de una membrana externa por encima del peptidoglicano y las bombas de eflujo, que generalmente tienden a aumentar las CIM de los antimicrobianos. Las betalactamasas capaces de ampliar el espectro de hidrólisis de la penicilinasas fueron denominadas betalactamasas de espectro ampliado (BLEA), siendo casi siempre de codificación plasmídica y transferibles a otras bacterias por conjugación. Aunque en un inicio la resistencia bacteriana se atribuía a las mutaciones cromosómicas, hoy en día se conoce que este fenómeno está más comúnmente asociado a elementos extracromosomales adquiridos a partir de otra bacteria o del ambiente (Celis-Bustos *et al.*, 2017). Posteriormente al surgir una serie nueva de betalactamasas capaces de hidrolizar cefalosporinas y extender el espectro de hidrólisis con respecto a las BLEA, fueron denominadas betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (Casellas, 2011). Es importante, ya que se debe prestarse atención a la aparición en América Latina de aislados de *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli* elaboradores de toxina Shiga y de *Vibrio cholerae* productores de BLEE (Casellas *et al.*, 2003).

Diversos investigadores han planteado que bacterias filogenéticamente diversas, ampliamente distribuidas en el ambiente, muestran capacidades de subsistir frente a antibióticos naturales y sintéticos. De esta manera, constituyen reservorios naturales de genes codificadores de resistencia, que pueden ser transferidos horizontalmente a microorganismos patógenos, que comparten el mismo hábitat (Ronconi *et al.*, 2002; Dantas *et al.*, 2008). El uso indiscriminado de diferentes antibióticos para el tratamiento de enfermedades en la población se ha convertido en un factor importante en el desarrollo de resistencia microbiana, llevando consigo una repercusión de la salud humana que compromete la calidad higiénico-sanitaria del ambiente (MacMillan, 2001), es por ello por lo que, aunque el ambiente es un factor importante en el desarrollo de bacterias resistentes, también se ha sugerido que la resistencia puede surgir durante el tratamiento con

antibióticos (Rice, 2006). El hecho de haber obtenido aislamientos de cepas bacterianas con resistencia a antimicrobianos nos evidencia que las bacterias resistentes se encuentran circulando en el ambiente y no se limitan solamente al ámbito hospitalario. Esta situación agrava el panorama sobre bacterias resistentes, debido a la facilidad con la que estos microorganismos pueden interactuar con otros organismos, incrementando el número de infecciones tanto en animales como en personas.

7. CONCLUSIONES

- Los resultados de la calidad microbiológica revelaron que el agua residual del río Alseseca se encuentra fuera de los valores señalados en la NOM-001-SEMARNAT-2021 presentando límites superiores a los permisibles de CT, CF y se sugiere la presencia de *E. coli*. Esto sugiere una inmediata atención para el control y vigilancia de los parámetros que determinan la sanidad del agua.
- Se aislaron diferentes géneros bacterianos del río Alseseca destacando cepas del género *Bacillus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* que son pertenecientes a bacterias grampositivas y *Chryseobacterium* que es perteneciente a bacterias gramnegativas debido a que presentaron una resistencia mayor a 3 antimicrobianos considerándose como multirresistentes.
- Todos los aislamientos bacterianos presentaron una resistencia a la ampicilina, siendo el antimicrobiano menos eficiente en las pruebas de susceptibilidad. La ciprofloxacina presentó susceptibilidad en todos los aislamientos bacterianos siendo el antimicrobiano de mayor eficiencia.
- El género *Bacillus* presentó mayor resistencia (54%) respecto a bacterias grampositivas. Los géneros *Klebsiella* y *Chryseobacterium* presentaron la mayor resistencia (33% para cada una) respecto a bacterias gramnegativas.
- Debido a la presencia de bacterias resistentes a antimicrobianos, el río Alseseca representa un foco de infección para las comunidades que se encuentran cercanas al efluente. Existe un riesgo latente por adquirir enfermedades gastrointestinales como las diarreas, provocando una incidencia en la morbilidad y/o mortalidad de la población.
- Las condiciones físicas y microbiológicas del agua residual del río Alseseca conllevan a determinar que este cuerpo hídrico es un reservorio de bacterias resistentes donde pueden proliferar y/o adquirir resistencia otras cepas bacterianas de interés médico, ocasionando a futuro graves problemas en la salud de la población.

8. AGRADECIMIENTOS

- A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por acogerme, vincularme y apoyarme durante mi carrera universitaria.
- A la Facultad de Ciencias Biológicas, por brindarme una educación de calidad mediante un cuerpo académico de excelencia.
- Al Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas, por brindarme las herramientas necesarias para llevar a cabo la presente investigación.
- A mi directora de tesis, quién me recibió con los brazos abiertos y me animo en los momentos de confusión.
- A mis colegas del Laboratorio de Patogenicidad Microbiana: Omar, Gaby, Montsi y Julio, quiénes hicieron más amena mi estancia.
- A mi familia, por estar presente en todo momento, ustedes son la base de mi vida.
- A mi abuela Vicky, por ser una de las personas más importantes y vitales en mi vida.
- A mi tía Lupita, por escucharme en todo momento y hacerme saber que todo estaba bien.
- A mis amigos universitarios, que sin ellos no habría disfrutado la etapa de universitario, algunos de ellos tan presentes en mi corazón.
- A mi amiga Cheli, por estar presente en estos momentos de tensión. Por apoyarme, guiarme, enseñarme y brindarme una amistad invaluable para mí.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ Alemán, M. G. (2013). Resistencia antimicrobiana, una amenaza mundial. *Revista Cubana de Pediatría*, 85(4), 414-417.
- ❖ AWPRC Study group on health related water microbiology. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res* 1991; 25(5):529-45.
- ❖ Bonilla, M. N., Gómez, S. E. S., Maldonado, C. C., & Torres, R. C. S. (2013). Calidad del agua residual no entubada vertida por dos parques industriales en la ciudad de Puebla, México. *RIDE Revista Iberoamericana para la Investigación y el Desarrollo Educativo*, 4(7), 1-36.
- ❖ Casellas, J. M., Tomé, G., Bantar, C., Bertolini, P., Blázquez, N., Borda, N., ... & Wolff, L. (2003). Argentinean collaborative multicenter study on the in vitro comparative activity of piperacillin-tazobactam against selected bacterial isolates recovered from hospitalized patients. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 47(3), 527-537.
- ❖ Celis Bustos, Y. A., Rubio, V. V., & Camacho Navarro, M. M. (2017). Perspectiva histórica del origen evolutivo de la resistencia a antibióticos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(2), 105-117.
- ❖ Conagua, "Asociación Público-Privada. Agua Potable y Saneamiento", Reunión Nacional de Infraestructura Hidráulica 2012.
- ❖ Costa, P. D. O., Atta, E. H., & Silva, A. R. A. D. (2015). Infection with multidrug-resistant gram-negative bacteria in a pediatric oncology intensive care unit: risk factors and outcomes. *Jornal de pediatria*, 91, 435-441.
- ❖ del Puerto Rodríguez, A. M., Concepción Rojas, M., & Iglesias Fernández, A. M. (1999). Calidad del agua y enfermedades de transmisión digestiva. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 15(5), 495-502.
- ❖ De la Peña, M. E., Ducci, J., & Zamora, V. (2013). Tratamiento de aguas residuales en México. Nota técnica IDB-TN-521, 12.
- ❖ Fredrickson, J. K., J. M. Zachara, D. L. Balkwill, D. Kennedy, S. M. W. Li, H. M. Kostandarithes, M. J. Daly, M. F. Romine, and F. J. Brockman. 2004. Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose

sediments at the Hanford Site, Washington state. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4230-4241.

- ❖ Goñi-Urriza, M., Capdepuy, M., Arpin, C., Raymond, N., Caumette, P., & Quentin, C. (2000). Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine Enterobacteriaceae and Aeromonas spp. *Applied and environmental Microbiology*, 66(1), 125-132.
- ❖ Gutiérrez López, E. (2014). Determinación de la capacidad de asimilación de contaminantes en la presa Manuel Ávila Camacho, Puebla.
- ❖ Guzmán, G. P., Avelino, F. F., Rivera-Tapia, J. A., Castañeda, R. E., Chávez, B. E. 2007. Resistencia a antimicrobianos y a metales pesados en cepas de Escherichia coli aisladas del río Alseseca. *Lat. De Microbiología* 48(2): 203-210.
- ❖ Harbarth, S., & Samore, M. H. (2005). Antimicrobial resistance determinants and future control. *Emerging infectious diseases*, 11(6), 794.
- ❖ Hortal M, Ruvinsky R, Rossi A, Agudelo CI, Castañeda E, Brandileone C. Impact of Streptococcus pneumoniae on pneumonia in Latin American children. SIREVA-Vigía Group. *Rev Panam Salud Publica.* 2000;8(3):185–95
- ❖ Ibarra, F., Bascope, S., Bazán, Y., Bejarano, H., Bustamante, R., Cadima, M., & Peláez, C. (2005). Susceptibilidad y resistencia de las salmonellas a los antimicrobianos en la ciudad de Cochabamba. *Gac Med Bol*, 28(1), 3-7.
- ❖ Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (1998). Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 973-980.
- ❖ MacMillan, J.R, 2001. Aquaculture and antibiotic resistance: a negligible public health risk? *WorldAquacult.* 32, 49–50.
- ❖ Mantilla, G., Collí, J., Pozo, F., & Rivas, A. (2002). Saneamiento y salud: impacto de las enfermedades diarreicas agudas en la Península de Yucatán. In XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental 27-31 October, 2002, Cancun, Mexico.

- ❖ María, A., Villasana, S., Pulido-flores, G., Monks, S., José, A., Martínez, G., & Villegas, C. (2009). Toxicológica de la degradación ambiental DEL RÍO. 34, 880–887
- ❖ Martínez, A., Cruz, M., Veranes, O., Carballo, M. E., Salgado, I., Olivares, S., ... & Rodríguez, D. (2010). Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almeyda. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 41, 1-10.
- ❖ Martínez Bauza, J. M. (2021). Evaluación de los patógenos ESKAPE en el ambiente y su relación con la salud pública (Master's thesis, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).
- ❖ Martínez, R. J., Wang, Y., Raimondo, M. A., Coombs, J. M., Barkay, T. and Sobecky, P. A. 2006. Horizontal gene transfer of PIB-type atpases among bacteria isolated from radionuclide and metal-contaminated subsurface soils. Applied and Environmental Microbiology. 72 (5): 3111-3118.
- ❖ Méndez RMA. Aspectos históricos y químicos de la contaminación del río Atoyac. AlephZero 1999; 5: 10-15
- ❖ Norazah, A., Rahizan, I., Zainuddin, T., Rohani, M. Y., & Kamel, A. G. M. (1998). Enteropathogenic Escherichia coli in raw and cooked food. Southeast Asian journal of tropical medicine and public health, 29, 91-93.
- ❖ Novelo, R. I. M., Ávila, J. G. P., Borges, E. R. C., SANSORES, S. A. C., Borges, E. D. R. V., & VARGAS, D. M. C. (2018). Calidad microbiológica de pozos de abastecimiento de agua potable en Yucatán, México.
- ❖ Núñez, L., & Moreton, J. (2006). Perfil microbiológico y resistencia bacteriana a desinfectantes en aguas residuales de hospital. Higiene y Sanidad Ambiental, 6, 197-201.
- ❖ Secretaría de Gobernación. (2021) Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-2021, que establece los límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos. Diario Oficial de la Federación.
https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5645374&fecha=11/03/2022#gsc.tab=0

- ❖ Pacheco J., Cabrera A. y Pérez R. (2004). Diagnóstico de la calidad del agua subterránea en los sistemas municipales de abastecimiento en el estado de Yucatán. "Revista Académica de la Facultad de Ingeniería". Universidad Autónoma de Yucatán, 8(2), 165-179.
- ❖ Palhares, J. C. P., Kich, J. D., Bessa, M. C., Biesus, L. L., Berno, L. G., & Triques, N. J. (2014). Salmonella and antimicrobial resistance in an animal-based agriculture river system. *Science of the Total Environment*, 472, 654-661.
- ❖ Payment, P., & Franco, E. (1993). Clostridium perfringens and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Applied and environmental microbiology*, 59(8), 2418-2424.
- ❖ Pérez-Cordón G, Rosales M, Valdez R, Vargas-Vásquez F, Cordova O. Detección de parásitos intestinales en agua y alimentos de Trujillo, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2008;25 (1):144-148.
- ❖ Rice, L. B. (2006). Challenges in identifying new antimicrobial agents effective for treating infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical infectious diseases*, 43(Supplement_2), S100-S105.
- ❖ Rojas, R. (2002). Sistemas de tratamiento de aguas residuales. *Gestión integral de tratamiento de aguas residuales*, 1(1), 8-15.
- ❖ Rose, J. B., Epstein, P. R., Lipp, E. K., Sherman, B. H., Bernard, S. M., & Patz, J. A. (2001). Climate variability and change in the United States: potential impacts on water-and foodborne diseases caused by microbiologic agents. *Environmental health perspectives*, 109(suppl 2), 211-221.
- ❖ Bonilla, M. N. (2015). Calidad fisicoquímica del agua del distrito de riego 030" Valsequillo" para riego agrícola. *Revista Iberoamericana de Producción Académica y Gestión Educativa*, 2(4).

- ❖ Tapia, J. A. R., Ramírez, L. C., Cortés, M. G., & Cerezo, S. G. (2006). Diagnóstico de enterobacterias en el río Alseseca. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 49(1), 20-22.
- ❖ Tejeda Hernández, M. A. (2021). Investigación de *Salmonella* spp en agua de los ríos Alseseca, Atoyac y San Francisco de la ciudad de Puebla y de su resistencia a antibióticos.
- ❖ SALDAÑA, P., ALCOCER, V., LERDO, A., & GÓMEZ, M. (2002). Calidad del agua en colectores de la ciudad de Puebla y la aplicación de análisis de toxicidad. In XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, México.
- ❖ Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *BioMed research international*, 2016.
- ❖ Soto Varela, Z., Pérez Lavalle, L., & Estrada Alvarado, D. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. *Revista Salud Uninorte*, 32(1), 105-122.
- ❖ Venegas, C., Mercado, M., & Campos, M. C. (2014). Evaluación de la calidad microbiológica del agua para consumo y del agua residual en una población de Bogotá (Colombia). *Biosalud*, 13(2), 24-35.