



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS
BACTERIAS GRAM NEGATIVAS DEL GRUPO ESKAPE
DE AGUA Y SEDIMENTO DEL RÍO ATOYAC

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

ABIGAIL CASTRO RAMOS

DIRECTORA: D.C. FABIOLA AVELINO FLORES

SEPTIEMBRE, 2025



Agradecimientos

Quiero agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Fabiola Avelino Flores, por su apoyo, confianza y paciencia. Su guía y consejos fueron fundamentales desde el inicio de mi estancia en el laboratorio y durante todo el desarrollo de este proyecto.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP-BUAP) por el apoyo otorgado a través del proyecto Prevalencia de bacterias patógenas ESKAPE en el ambiente y su relación con la salud humana en la ciudad de Puebla, México (proyecto 100319944-VIEP2024).

A mis compañeros de laboratorio, por su dedicación y apoyo en cada muestreo y en la realización de este proyecto. También agradezco a mis amigos Ingrid, Dani y Omar por su orientación y consejos que me permitieron aprender y disfrutar mi estancia en el laboratorio.

A mis padres y mis hermanas por creer en mí, por, dedicación, por cuidarme y apoyarme en todos mis proyectos. Gracias a mi abuela Antonia y a mi familia por el apoyo incondicional que me ha brindado todos estos años.

Finalmente, a mis amigos Jesus, Elda, Etzael, Melisa y Luis por el apoyo, motivación, amistad y las aventuras compartidas.

Dedicatoria

A mi abuelo Rafael y a mis padres porque todos mis logros se los debo a ustedes.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Antecedentes generales	3
Grupo ESKAPE.....	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4
<i>Enterobacter spp.</i>	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
Mecanismo de resistencia a antibióticos.....	9
Antibióticos empleados para el tratamiento contra el grupo ESKAPE	12
Antecedentes específicos	21
Justificación	25
Objetivos	27
Metodología	28
Muestreo	28
Aislamiento y caracterización de <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Enterobacter spp.</i>	31
Aislamiento y caracterización de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
Conservación de cepas.....	32
Diseño de cebadores	33
Extracción de ADN.....	33
Reacción en cadena de la Polimerasa.....	34
Pruebas de sensibilidad antimicrobiana.....	35
Resultados	37
Aislamiento y caracterización de <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Enterobacter spp.</i>	37
Aislamiento y caracterización de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
Distribución de aislados.	41
Diseño de cebadores	43
Extracción de ADN.....	52
Reacción en Cadena de la Polimerasa	53
Pruebas de sensibilidad antimicrobiana	54
Aislados multirresistentes	61
Discusión	63

Distribución de aislados en el río Atoyac	64
Perfiles de Resistencia Antimicrobiana	66
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	66
Distribución de <i>Klebsiella pneumoniae</i> Multirresistente	67
<i>Enterobacter spp.</i>	69
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	69
Consideraciones generales.....	70
Conclusiones.....	71
Referencias	72
Anexos	81
Anexo 1.....	81
Anexo 2.....	81
Anexo 3.....	82

Abreviaturas

AK	Amikacina
AM	Imipenem
BGN	Bacterias Gram negativas
BLEE	Betalactamasas de espectro extendido
CB	Carbenicilina
CF	Cefalotina
CF	Coliformes fecales
CFX	Cefotaxima
CL	Cloranfenicol
CONAGUA	Comisión nacional del agua
CPF	Ciprofloxacina
CTZ	Ceftazidima
EMA	Enzimas modificadoras de aminoglucósidos
FEP	Cefepime
GE	Gentamicina
IPM	Imipenem
IRMA	Índice de resistencia a múltiples antibióticos
LVX	Levofloxacina
MDR	Bacterias multirresistentes
MEM	Meropenem
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NET	Netilmicina
NF	Nitrofurantoína
NMP	Número más probable
NOF	Norfloxacina
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBP	Proteínas fijadoras de Penicilinas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDR	Bacterias panresistentes
SXT	Sulfametoxazol-trimetoprim
TZP	Piperacilina-tazobactam
UFC	Unidad formadora de colonias
XDR	Bacterias con resistencia extendida

Índice de figuras

Figura 1. Protocolo de investigación.	28
Figura 2. Mapa de los puntos de muestreo	29
Figura 3. Contaminación del río Atoyac en el área metropolitana	30
Figura 4. Aspecto del Río Atoyac en Tlaxcala.....	30
Figura 5. Diagrama de temperaturas para PCR.....	35
Figura 6. Tubos positivos, con control negativo, del muestreo en punto 2 Puebla	37
Figura 7. Tubos positivos, con control negativo, del muestreo en punto 1 Tlaxcala	38
Figura 8. Crecimiento de colonias sospechosas de <i>K. pneumoniae</i>	39
Figura 9. Crecimiento de colonias sospechosas de <i>Enterobacter spp.</i>	39
Figura 10. Colonias sospechosas de <i>P. aeruginosa</i> en agar cetrimida	40
Figura 11. Porcentaje de detección de (A) <i>Klebsiella pneumoniae</i> , (B) <i>Enterobacter spp.</i> y (C) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> recuperadas de los puntos de muestreo.....	42
Figura 12. Distribución de aislados en muestras de agua y sedimentos.	43
Figura 13. Localización de los cebadores en la secuencia del gen KPHS_18810.....	44
Figura 14. Información del gen KPHS_18810 en la base de datos del NCBI	45
Figura 15. Resultados del diseño de cebadores en Primer-BLAST	45
Figura 16. Resultados del análisis de cebadores en OligoAnalyzer™	46
Figura 17. Resultados del análisis de especificidad en BLASTn.....	46
Figura 18. Localización de los cebadores en la secuencia del gen FimH	47
Figura 19. Información del gen FimH en la base de datos del NCBI.....	47
Figura 20. Resultados del diseño de cebadores en Primer-BLAST.	48
Figura 21. Resultados del análisis de cebadores en OligoAnalyzer™	48
Figura 22. Resultados del análisis de especificidad en BLASTn.....	49
Figura 23. Localización de los cebadores en la secuencia del gen PhzM.....	49
Figura 24. Información del gen pzhM en la base de datos del NCBI.....	50
Figura 25. Resultados del diseño de cebadores en Primer-BLAST.	50
Figura 26. Resultados del análisis de cebadores en OligoAnalyzer™	51
Figura 27. Resultados del análisis de especificidad en BLASTn.....	51
Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa para confirmar la extracción de ADN.....	52

Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa para la confirmación de aislados de <i>K. pneumoniae</i>	53
Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa para la confirmación de aislados de <i>K. pneumoniae</i>	54
Figura 31. Patrón de resistencia de aislados de <i>K. pneumoniae</i> de acuerdo con los puntos de muestreo.	55
Figura 32. Patrón de resistencia de aislados de <i>Enterobacter spp.</i> de acuerdo con los puntos de muestreo.	58
Figura 33. Patrón de susceptibilidad de <i>P. aeruginosa</i>	60
Figura 34. Comparación de resistencia antimicrobiana entre especies.....	61

Índice de tablas

Tabla 1. Componentes de la reacción de PCR.....	34
Tabla 2. Cebadores para detección de especies de interés.	44
Tabla 3. Perfil antimicrobiano de los aislados de <i>K. pneumoniae</i>	55
Tabla 4. Índice de resistencia a múltiples antibióticos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> . 56	
Tabla 5. Perfil antimicrobiano de <i>Enterobacter spp.</i>	57
Tabla 6. Índice de resistencia a múltiples antibióticos de <i>Enterobacter spp.</i>	58
Tabla 7. Perfil antimicrobiano de <i>P. aeruginosa</i>	59
Tabla 8. Índice de resistencia a múltiples antibióticos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60
Tabla 9. Información de los aislados confirmados de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	62

Resumen

El presente estudio evaluó la presencia de bacterias multirresistentes Gram negativas del grupo ESKAPE (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.* y *Pseudomonas aeruginosa*) en aguas y sedimentos del río Atoyac. Estas bacterias, conocidas por su capacidad de desarrollar y transferir resistencia a múltiples antibióticos, han expandido su presencia más allá de los entornos clínicos, lo que justifica la necesidad de investigar su prevalencia en ambientes naturales. El río Atoyac, catalogado como fuertemente contaminado por descargas industriales, agrícolas y urbanas, representa un ecosistema propicio para la persistencia y diseminación de estos patógenos.

Se realizaron muestreos en cuatro puntos estratégicos, abarcando zonas agrícolas y urbanas. Las muestras se procesaron mediante técnicas microbiológicas, bioquímicas y moleculares. Los aislados fueron sometidos a pruebas de sensibilidad antimicrobiana frente a diferentes familias de antibióticos. Finalmente, los resultados evidenciaron la presencia de las tres especies objetivo en todos los sitios muestreados, tanto en agua como en sedimento, con perfiles de resistencia múltiple que incluyeron betalactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y sulfamidas, entre otros.

Estos hallazgos confirman que el río Atoyac funciona como un reservorio ambiental de bacterias multirresistentes, lo que constituye una amenaza para la salud humana, animal y ambiental. De acuerdo con el enfoque One Health, de la Organización Mundial de la Salud, se enfatiza la necesidad de implementar medidas de control y vigilancia microbiológica que permitan prevenir la propagación de estos patógenos y reducir la carga de contaminantes en el ecosistema.

Abstract

This study evaluated the presence of multidrug-resistant Gram-negative bacteria from the ESKAPE group (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, and *Pseudomonas aeruginosa*) in water and sediment samples from the Atoyac River. These bacteria, known for their ability to develop and transfer resistance to multiple antibiotics, have expanded their presence beyond clinical settings, justifying the need to investigate their prevalence in natural environments. The Atoyac River, classified as heavily polluted due to industrial, agricultural, and urban discharges, represents an ecosystem conducive to the persistence and dissemination of these pathogens.

Sampling was conducted at four strategic points, covering both agricultural and urban areas. Samples were processed using microbiological, biochemical, and molecular techniques. The isolates were subjected to antimicrobial susceptibility testing against different antibiotic families. Results revealed the presence of all three target species at all sampling sites, in both water and sediment, with multidrug-resistance profiles that included β -lactams, aminoglycosides, fluoroquinolones, and sulfonamides, among others.

These findings confirm that the Atoyac River acts as an environmental reservoir of multidrug-resistant bacteria, posing a threat to human, animal, and environmental health. In line with the One Health approach of the World Health Organization, this study highlights the urgent need to implement control measures and microbiological surveillance to prevent the spread of these pathogens and reduce the pollutant load in the ecosystem.

Antecedentes generales

Grupo ESKAPE

En 2008 se propuso la sigla ESKAPE para englobar a las principales cinco familias bacterianas: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacter* (Khasapane *et al.*, 2024). Caracterizadas por poseer resistencia intrínseca y una alta capacidad para desarrollar multirresistencia (Ayobami *et al.*, 2022), este grupo de bacterias se encuentran de manera natural en la microbiota de mamíferos, suelos y agua (Savin *et al.*, 2020a). Sin embargo, han desarrollado múltiples mecanismos de adaptabilidad genérica que les han permitido desarrollarse en entornos clínicos en donde se asocian con diversas infecciones intrahospitalarias. Desde los primeros aislados en pacientes hospitalizados hasta la fecha ha aumentado la preocupación por la presencia de estas bacterias ya que los datos presentados las clasifican entre las principales causas de mortalidad y morbilidad a nivel mundial (Denissen *et al.*, 2022).

Dada la creciente alarma generada por las bacterias multirresistentes la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en 2017 una lista de patógenos resistentes a antibióticos prioritarios a nivel mundial (De Oliveira *et al.*, 2020). Los criterios de esta lista permiten enfocar las líneas de investigación para diseñar estrategias contra esta problemática y clasifican a los patógenos en tres niveles de prioridad: media, alta y crítica. Las bacterias Gram negativas (BGN) de ESKAPE: *Pseudomonas aeruginosa* (resistentes a carbapenémicos), *Klebsiella pneumoniae* (resistentes a cefalosporinas de tercera generación) y *Enterobacter spp.* (resistentes a cefalosporinas de tercera generación) están clasificadas como prioridad crítica (Denissen *et al.*, 2022). A continuación, se describe de manera general a estas especies bacterianas:

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella pneumoniae es una bacteria anaerobia facultativa perteneciente a la familia de las *Enterobacteriaceae*. Morfológicamente es un bacilo Gram negativo encapsulado y no móvil, con un tamaño de entre 0,3 y 2,0 μm de ancho y entre 0,6 y 6,0 μm de largo, Es un patógeno oportunista con un aspecto mucoso distintivo en placas de agar. Bioquímicamente, fermenta la lactosa, es catalasa positiva y citocromo oxidasa negativa (Koneman, 1997).

El genoma de *K. pneumoniae* tiene un tamaño de ~5,5 Mpb, con ~5500 genes, de los cuales ~3500 son accesibles (J. Rocha, Henriques, *et al.*, 2022). Estudios han sugerido que esta bacteria tiene un rol importante en la adquisición y transmisión de multirresistencia mediante la transferencia horizontal de genes a diferentes especies (Janssen *et al.*, 2021).

Entre sus factores de virulencia se encuentran cápsula de polisacáridos denominados antígenos K, lipopolisacáridos, fimbrias tipo 1 y 3, proteínas periféricas importantes para la adquisición de hierro y fuentes de nitrógeno, bombas de eflujo, además de la formación de biopelículas. Tiene una resistencia intrínseca a la ampicilina, carbecilina y tircacilina gracias a su producción cromosomal de la β -lactamasa SHV-1 (Denissen *et al.*, 2022).

La fisiopatología de *K. pneumoniae* está directamente relacionada con su capacidad para evadir el sistema inmunitario del huésped a través de producción de polisacáridos capsulares y lipopolisacáridos, adherirse y colonizar eficientemente su entorno con la ayuda de fimbrias, y adquirir nutrientes de su entorno a través de las membranas periféricas (Abbas *et al.*, 2024).

Esta especie tiene un gran rango de distribución ecológica, desde el intestino, superficies mucosas y piel de mamíferos, en insectos, plantas, aguas y suelos. En hospitales se ha encontrado en diversos equipos médicos. Sin embargo, al ser un organismo oportunista las poblaciones en riesgo son neonatos, adultos mayores y personas inmunocomprometidas. Esta bacteria es conocida por su capacidad para causar infecciones intrahospitalarias y su habilidad para resistir a múltiples

tratamientos con antibióticos. En hospitales se reportan infecciones trato urinarias, neumonía, infecciones en heridas quirúrgicas, sepsis; especialmente en pacientes con diabetes mellitus, alcoholismo y adicción al tabaco. Los reportes de las poblaciones afectadas por esta bacteria varían de acuerdo con las zonas geográficas. Estudios recientes la han reportado como la causa de meningitis, abscesos hepáticos y endoftalmia (Wyres *et al.*, 2020).

Las infecciones causadas por esta bacteria tienden a ser crónicas debido a la formación de biopelículas que la protegen de la respuesta inmune del hospedero y los antibióticos. Los aislamientos en ambientes hospitalarios tienden a mostrar fenotipos de resistencia a múltiples fármacos, como la producción de β -lactamasas o carbapenemasas de espectro extendido (B. Li *et al.*, 2014). Además, a diferencia de las cepas “clásicas” de *K. pneumoniae* las cepas hipervirulentas afectan a individuos jóvenes y sanos (De Oliveira Júnior & Franco, 2020). Las crecientes tasas de resistencia a antibióticos en *K. pneumoniae* son motivo de especial preocupación, ya que estas infecciones pueden dar lugar a altas tasas de mortalidad (Ferreira *et al.*, 2023).

Enterobacter spp.

El género *Enterobacter* incluye bacilos Gram negativos anaerobios facultativos de 2 μ m de longitud, móviles mediante flagelos peritricos, y pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Actualmente se han identificado 22 especies en este género: *E. aerogenes*, *E. amnigenus*, *E. arachidis*, *E. asburiae*, *E. carcinogenus*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. dissolvans*, *E. gergoviae*, *E. helveticus*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori*, *E. nimipressuralis*, *E. oryzae*, *E. pulveris*, *E. pyrinus*, *E. radicincitans*, *E. soli*, *E. taylorae* y *E. turicensis*. Entre estas especies, siete se agrupan dentro del grupo del complejo *Enterobacter cloacae*: *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori* y *E. nimipressuralis*. Esta nomenclatura se basa en la similitud de características fenotípicas y, especialmente, genotípicas, determinadas por hibridaciones ADN-ADN de todo el genoma (Davin-Regli *et al.*, 2019).

Este género posee flagelos que facilitan su movilidad, permiten formación de biopelículas, transporte de proteínas y adhesión a superficies, además secretan diferentes endotoxinas. Se encuentra en diversos ecosistemas como suelos, agua y especies vegetales, microbiota intestinal de mamíferos. Las infecciones por *Enterobacter spp.* pueden provocar meningitis, neumonía, absceso cerebral, infecciones de heridas, septicemia, infecciones urinarias e infecciones abdominales (Denissen *et al.*, 2022).

De este grupo solo determinadas especies están asociadas con infecciones intrahospitalarias. *E. aerogenes*, *E. cloacae* y *E. hormaechei* son las especies aisladas con mayor frecuencia en infecciones clínicas, especialmente en pacientes inmunodeprimidos y hospitalizados en unidades de cuidados intensivos, debido a su adaptación a los antimicrobianos y a su comportamiento como patógenos oportunistas.

E. cloacae y *E. hormaechei* son las más frecuentemente aisladas en muestras clínicas humanas. *E. asburiae* se ha descrito ocasionalmente como una bacteria con relevancia clínica, principalmente en hemocultivos, también se ha aislado del agua, suelos, plantas, alimentos, entornos hospitalarios y equipos del personal médico. *E. cloacae* se ha aislado de alimentos, especialmente en fórmulas que contienen plantas, verduras crudas y raíces. Esto se debe a el uso de aguas residuales o agua contaminada para fertilizar suelos agrícolas (Denissen *et al.*, 2022).

Estos patógenos son conocidos por su resistencia a antibióticos, principalmente debido a su adaptación al entorno hospitalario y su capacidad para adquirir fácilmente numerosos elementos móviles genéticos que contienen genes de resistencia y virulencia. Estas especies tienen una resistencia intrínseca a la ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas de primera generación y cefoxitina debido a la expresión de una β -lactamasa AmpC constitutiva. Además, se ha reportado la producción de β -lactamasas de espectro extendido en estas bacterias, lo que dificulta su tratamiento.

Los aislamientos clínicos provienen de diversas fuentes y reservorios, lo que representa una muestra de la diversidad de especies en la población. Se han aislado cepas ambientales en cuerpos de agua con resistencia imipenem, esto gracias a la producción de un plásmido derivado de IMI-2 carbapenemasa. *E. cloacae*, junto con *Escherichia coli* y *K. pneumoniae*, es una de las *Enterobacteriaceae* más comunes resistentes a las cefalosporinas de tercera generación (Davin-Regli *et al.*, 2019).

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria aeróbica Gram negativa perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*. Morfológicamente es un bacilo móvil, bioquímicamente se identifica como catalasa y oxidasa positivas (Sarkar, 2020). Con un genoma de 5,5–7 Mpb codifica una gran proporción de enzimas reguladoras importantes para el metabolismo, el transporte y el eflujo de compuestos orgánicos (Pang *et al.*, 2019). Esta capacidad de codificación del genoma de *P. aeruginosa* le confiere una gran versatilidad metabólica y una alta adaptabilidad a los cambios ambientales. Muestra resistencia a diversos antibióticos, como aminoglucósidos, quinolonas y β -lactámicos.

Capaz de sobrevivir en una gran variedad de ambientes, esta bacteria se encuentra de manera natural en suelos, agua, superficies de plantas y forma parte de la microbiota natural de los peces. Puede crecer en agua destilada y es resistente a diversos factores ambientales estresantes, incluyendo la posibilidad de causar un brote al crecer en un antiséptico concentrado (Denissen *et al.*, 2023). Es uno de los principales patógenos causantes de infecciones hospitalarias, que se atribuyen ampliamente a dispositivos médicos debido a su tendencia a proliferar en superficies húmedas (LeChevallier *et al.*, 2024).

P. aeruginosa posee factores de virulencia que se clasifican en dos grupos: mediados por la célula y secretados (Algammal *et al.*, 2020). Los factores mediados por la célula, como pili, flagelos y lipopolisacáridos, participan en la colonización, la movilidad bacteriana y la administración de proteínas a las células huésped, lo que contribuye al establecimiento de infecciones persistentes. Por otro lado, los factores secretados intensifican los procesos inflamatorios, inducen daños graves en los

tejidos, y facilitan la diseminación bacteriana, lo que acelera la progresión de la enfermedad.

Los principales mecanismos que *P. aeruginosa* utiliza para contrarrestar el ataque de antibióticos se clasifican en resistencia intrínseca, adquirida y adaptativa. La resistencia intrínseca incluye una baja permeabilidad de la membrana externa, la expresión de bombas de eflujo que expulsan los antibióticos fuera de la célula y la producción de enzimas inactivadoras de antibióticos. Por otra parte, la resistencia adquirida se logra mediante la transferencia horizontal de genes de resistencia o cambios mutacionales. Finalmente, la resistencia adaptativa implica la formación de una biopelícula en los pulmones de pacientes infectados, donde esta actúa como barrera de difusión para limitar el acceso de los antibióticos a las bacterias (Pang *et al.*, 2019).

Esta bacteria es un patógeno oportunista, asociada con infecciones nosocomiales y neumonía asociada a ventilación mecánica. Puede causar infecciones en la sangre, neumonía y partes del cuerpo después de la cirugía. Rara vez afecta a personas sanas, pero causa alta morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística e individuos inmunodeprimidos (A. J. Rocha *et al.*, 2019).

Como tratamiento común para infecciones causadas por *P. aeruginosa* se incluyen tratamientos de antibióticos simples y combinados. Sin embargo, el uso excesivo de fármacos durante el tratamiento acelera el desarrollo de cepas resistentes a múltiples antibióticos. Por lo que los tratamientos para estas infecciones se han convertido en un gran desafío debido a la capacidad de esta bacteria para resistir muchos de los antibióticos actualmente disponibles.

Las infecciones por *Pseudomonas* se consideran actualmente como una enfermedad transmitida por alimentos. Afectan a los humanos, principalmente por consumir alimentos en mal estado o listos para consumir, así como al manipular mariscos contaminados. Además, se ha reportado que las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pescado están estrechamente relacionadas con las que causan neumonía nosocomial en humanos (Algammal *et al.*, 2020). Por este motivo, diversos estudios resaltan la urgencia de desarrollar nuevos antibióticos o terapias

alternativas para tratar a los pacientes con infecciones por cepas de *P. aeruginosa* resistentes a antibióticos convencionales.

Mecanismo de resistencia a antibióticos

Para comprender mejor como las bacterias desarrollan resistencia a antibióticos debemos conocer cuáles son sus mecanismos de defensa. De forma general los mecanismos mediante los que las bacterias desarrollan resistencia se clasifican en intrínsecos y adquiridos.

Los mecanismos intrínsecos son el resultado de la interacción ancestral de microorganismos con diversas sustancias antimicrobianas. Esta interacción ha generado en las bacterias el desarrollo de mecanismos que les han permitido su supervivencia y proliferación en diferentes ambientes (Chávez-Jacobo, 2020). Por el contrario, la resistencia adquirida se da cuando una población bacteriana, que originalmente era sensible, se vuelve resistente como resultado de mutaciones genéticas o por la transferencia de elementos móviles provenientes de microorganismos con resistencia intrínseca (De Oliveira *et al.*, 2020).

Antes de comenzar a clasificar los diferentes mecanismos es necesario tomar en cuenta factores como la fisiología bacteriana, la farmacología de los antibióticos y la biología molecular de los agentes infecciosos (Koneman, 1997). El intercambio genético tiene un rol muy importante debido a que uno de los mecanismos más frecuentes que permite el intercambio de información entre bacterias (Voigt *et al.*, 2020). Los elementos genéticos móviles transportan porciones de material genético dando como resultado un mosaico de material genético en las bacterias donantes y receptoras, A nivel celular esto se expresa como la resistencia a las sustancias inhibitoras empleadas para combatir estas bacterias. En términos generales la forma en que actúan los mecanismos de resistencia se pueden englobar en tres categorías:

1. **Reducción en la concentración intracelular del fármaco.** El transporte de los antibióticos hacia el sitio de acción de la célula es primero en considerarse debido a que es importantes para todos los compuestos y todas las bacterias.

Para el presente estudio es necesario considerar la estructura de las BGN. Estas bacterias poseen una membrana plasmática interna y una membrana celular externa, entre la cual se encuentra una capa delgada de peptidoglicano. En este caso se tienen dos membranas que obstaculizan la llegada de los antibióticos a sus dianas intracelulares. En bacterias Gram positivas la estructura difiere, sin embargo, en ambas estructuras se encuentran proteínas transportadoras que facilitan la entrada y salida de diversas moléculas a través la célula. Es así como empleando estas proteínas se disminuyen las concentraciones de sustancias antimicrobianas que atacan a las bacterias.

- **Reducción de la permeabilidad:** Gracias a la estructura de las membranas de bacterias se han diseñado fármacos hidrofílicos capaces de atravesar la membrana mediante difusión a través de proteínas estructurales conocidas como porinas. Estas proteínas trabajan como transportadores inespecíficos que permiten la entrada de otras moléculas dentro de la célula bacteriana. En respuesta a esto las bacterias han modificado sus mecanismos de expresión genética para disminuir la codificación de porinas y de esta forma disminuir la permeabilidad de la membrana (B. Li *et al.*, 2014).
- **Expulsión de antimicrobianos:** Las bacterias emplean sus mecanismos de transporte para expulsar fuera de la célula las sustancias antimicrobianas. Utilizando los mecanismos de transporte activo, estos sistemas de expulsión son capaces de transportar una gran cantidad de sustancias fuera de las células y en varios casos son los responsables de la resistencia intrínseca de las bacterias. Cada especie bacteriana posee diferentes genes que codifican y regulan los sistemas de expulsión, además para aumentar su efectividad la célula puede sobreexpresar los genes que codifican a las proteínas transportadoras, aumentando así el nivel de expulsión de los antimicrobianos (Chávez-Jacobo, 2020).

2. **Protección del sitio blanco.** Muchos de los fármacos han sido diseñados con afinidad hacia un sitio blanco de manera que al unirse a este sitio específico se

desestabilicen las funciones de la célula, por lo que en respuesta a este ataque las bacterias modifican su estructura para impedir la unión del fármaco y esto lo logra de las siguientes formas.

- **Mutación de genes que codifican un sitio blanco:** Las modificaciones estructurales impiden la unión de los antimicrobianos sin afectar las demás funciones de la célula, por lo tanto, las bacterias pueden desarrollar mutaciones que vuelvan obsoletos a los antimicrobianos mientras estas continúan con el proceso de infección en el hospedero (Bengoechea & Sa Pessoa, 2019).
- **Interferencia con la unión del antimicrobiano:** Otra forma en que las bacterias protegen al sitio blanco se logra mediante la síntesis de moléculas que bloquean la unión a estos sitios. De esta manera el antimicrobiano no tiene puede realizar su función y la bacteria continua con sus procesos metabólicos. Este tipo de bloqueo se ha vuelto relevante debido a que un solo factor de resistencia puede inactivar hasta tres familias de antimicrobianos (Chávez-Jacobo, 2020).

3. **Modificación de antimicrobianos.** Como mecanismo de defensa, las bacterias tienen la capacidad de producir moléculas, que degradan o inactivan a diversos antimicrobianos reduciendo así su eficacia.

- **Modificación mediante hidrólisis:** La modificación de antimicrobianos mediante enzimas es uno de los mecanismos más eficaces que poseen las bacterias. Las enzimas producidas son capaces de degradar o modificar fármacos (A. J. Rocha *et al.*, 2019). Este mecanismo de defensa representa actualmente uno de los grandes desafíos en el diseño de estrategias contra las bacterias multirresistentes, debido a que con cada nuevo antimicrobiano las bacterias producen enzimas con un espectro de acción más amplio. Además, estas modificaciones pueden transmitirse entre bacterias a través de plásmidos, lo que facilita su propagación.

- **Adición de grupos funcionales:** Siguiendo la estrategia de moléculas modificadoras se encuentra la adición de grupos funcionales mediante enzimas (B. Li *et al.*, 2014). Estos grupos funcionales reducen la afinidad de los antimicrobianos con los sitios blanco de la bacteria. Este mecanismo se vuelve eficaz cuando se emplean ciertos antimicrobianos que son más susceptibles a estas modificaciones, como es el caso de los aminoglucósidos.

Existen más mecanismos de resistencia descritos en la literatura, sin embargo, para los objetivos del presente estudio solo se mencionan los presentados. Algunos mecanismos se consideran de forma separada, sin embargo, es muy frecuente encontrar diversos mecanismos de resistencia en un solo microorganismos (Koneman, 1997).

Antibióticos empleados para el tratamiento contra el grupo ESKAPE

Los antibióticos son un extenso grupo altamente diverso de moléculas que pueden inhibir el crecimiento (efecto bacteriostático) o provocar la muerte (efecto bactericida), específicamente de bacterias y han sido empleados durante décadas para controlar las infecciones en humanos, animales y plantas. Debido a su origen como productos derivados del metabolismo secundario bacteriano, muchos antibióticos se encuentran en la naturaleza. Dando como resultado la posibilidad de encontrar bacterias que han desarrollado mecanismos de defensa y por lo tanto de resistencia contra estas sustancias (Chávez-Jacobo, 2020). De acuerdo con la información bibliográfica en el tratamiento del grupo ESKAPE es común el uso de las siguientes familias de antimicrobianos.

Aminoglucósidos (amikacina, gentamicina, netilmicina). Los aminoglucósidos son un grupo de antibióticos bactericidas de amplio espectro que actúan principalmente contra bacterias aerobias Gram negativas. Su principal mecanismo de acción es la inhibición irreversible de la síntesis de proteínas bacterianas. Se unen a la

subunidad 30S del ribosoma bacteriano, causando una lectura errónea del ARN mensajero (ARNm) y la producción de proteínas defectuosas o incompletas (G. Wang *et al.*, 2020). Esto conduce a la disfunción celular y, finalmente, a la muerte bacteriana. Entre los principales mecanismos de resistencia se encuentran:

- **Modificación enzimática:** Las bacterias producen enzimas (acetiltransferasas, fosfotransferasas y nucleotidiltransferasas) que modifican químicamente el antibiótico, inactivándolo.
- **Alteración de los sitios de unión ribosómicos:** Las bacterias pueden mutar o modificar la subunidad 30S del ribosoma (mediante metilación), reduciendo la afinidad de unión del aminoglucósido.
- **Bombas de eflujo (efflux pumps):** Las bacterias pueden reducir la entrada del antibiótico a la célula o bombearlo activamente fuera de ella a través de bombas de eflujo, disminuyendo su concentración intracelular a niveles sub-inhibitorios.

La resistencia a los aminoglucósidos se debe principalmente a la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (*EMA*), que alteran la estructura del antibiótico y evitan su unión al ribosoma (Chávez-Jacobo, 2020). Los genes *EMA* son frecuentemente portados en plásmidos, lo que facilita su diseminación horizontal en ambientes acuáticos contaminados por aguas residuales urbanas (J. Rocha, Ferreira, *et al.*, 2022) y actividades agrícolas/ganaderas.

Carbapenémicos (imipenem, meropenem). Son antibióticos betalactámicos de amplio espectro, a menudo considerados la última línea de defensa contra bacterias Gram negativas multirresistentes. Su mecanismo de acción principal consiste en inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana, lo que conduce a su lisis y muerte (efecto bactericida) (A. J. Rocha *et al.*, 2019). Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los carbapenémicos a través de varios mecanismos:

- **Producción de carbapenemasas:** Las carbapenemasas son enzimas que hidrolizan los carbapenémicos, volviéndolos ineficaces. Las más conocidas son las KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase), NDM-1 (New Delhi Metallo-beta-lactamase), OXA, VIM e IMP (Loudermilk *et al.*, 2022).

- Alteraciones en las porinas: Son canales en la membrana externa de las bacterias Gram negativas por donde entran los antibióticos. Las bacterias pueden modificarlas o eliminarlas, impidiendo la entrada del antibiótico.
- Bombas de eflujo (efflux pumps): Sistemas que la bacteria utiliza para bombear el antibiótico fuera de la célula (Pang *et al.*, 2019).
- Hiperproducción de otras betalactamasas: Aunque los carbapenémicos son resistentes a muchas betalactamasas, una sobreproducción de algunas de ellas puede contribuir a la resistencia.

La presencia de bacterias resistentes a carbapenémicos en bacterias ambientales destaca la presión selectiva que la contaminación antropogénica ejerce sobre las comunidades microbianas. Además, indica una contaminación significativa con genes de resistencia móviles, capaces de transferirse entre diferentes especies bacterianas (Galarde-López *et al.*, 2022).

Cefalosporinas (cefalotina, cefotaxima, ceftazidima, cefepime). Son antibióticos betalactámicos bactericidas que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana al unirse a las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP) que son enzimas transpeptidasas y carboxipeptidasas esenciales para la formación del peptidoglicano. Al unirse a las PBP, las cefalosporinas inactivan estas enzimas, interrumpiendo la reticulación del peptidoglicano y llevando a la lisis y muerte de la bacteria (Cimen *et al.*, 2023). Los principales mecanismos de resistencia bacteriana incluyen:

- Producción de betalactamasas: Las bacterias producen enzimas betalactamasas (cefalosporinasas) que hidrolizan el anillo betalactámico de la cefalosporina, inactivándola.
 - Betalactamasas de espectro extendido (BLEE): hidrolizan cefalosporinas de tercera y cuarta generación, así como monobactámicos. Los genes de BLEE (como blaCTX-M, blaTEM, blaSHV) suelen estar en plásmidos, lo que facilita su diseminación horizontal entre diferentes especies bacterianas en el ambiente (G. Wang *et al.*, 2020).

- AmpC betalactamasas: Son cefalosporinas codificadas cromosómicamente en algunas bacterias Gram negativas. Su expresión puede ser inducible, lo que lleva a altos niveles de resistencia a múltiples betalactámicos, incluidas las cefalosporinas de amplio espectro.
- Carbapenemasas: Aunque su objetivo principal son los carbapenémicos, algunas carbapenemasas también pueden hidrolizar cefalosporinas.
- Modificación de las PBP: Las bacterias pueden alterar la estructura de sus PBP, disminuyendo la afinidad de unión de las cefalosporinas y haciendo que el antibiótico sea menos efectivo o ineficaz.
- Disminución de la permeabilidad: Las bacterias pueden modificar sus porinas para reducir la entrada de la cefalosporina a la célula, o activar bombas de eflujo que expulsan activamente el antibiótico fuera de la bacteria, disminuyendo su concentración intracelular (Denissen *et al.*, 2022).

Esta familia de antibióticos se clasifica en generaciones (actualmente cinco) según su espectro de actividad antimicrobiana, estabilidad frente a betalactamasas y desarrollo cronológico. Cefalotina (Primera Generación), cefotaxima y ceftazidima (Tercera Generación) y cefepime (Cuarta Generación). Los ambientes acuáticos son reservorios para la transferencia horizontal de genes de resistencia. Los plásmidos que contienen genes de BLEE y otras betalactamasas pueden ser transferidos entre diferentes especies bacterianas (J. Rocha, Ferreira, *et al.*, 2022). Si estos patógenos colonizan a humanos o animales pueden generar infecciones más difíciles de tratar con antibióticos de primera línea.

Fenicoles (cloranfenicol). Son un grupo de antibióticos caracterizados por su estructura molecular única. Actúan inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas, se unen de forma irreversible a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. Al hacerlo, impiden la acción de la enzima peptidil transferasa (esencial para la formación de enlaces peptídicos entre los aminoácidos durante la síntesis proteica). Esto interrumpe la elongación de la cadena polipeptídica y como resultado detiene

la producción de proteínas vitales para la bacteria (Davin-Regli *et al.*, 2019). Generalmente, su efecto es bacteriostático (inhiben el crecimiento bacteriano), pero a altas concentraciones pueden ser bactericidas contra algunas especies. Las bacterias han desarrollado varios mecanismos de resistencia contra esta familia de antibióticos:

- **Modificación enzimática (acetilación):** Este es el mecanismo de resistencia más común y clínicamente importante. Las bacterias producen enzimas llamadas cloranfenicol acetiltransferasas (CAT), codificadas por el gen *cat* (o *cmI*). Estas enzimas acetilan el cloranfenicol, inactivándolo y previniendo su unión al ribosoma (Okafor & Nwodo, 2023). Los genes *cat* suelen encontrarse en plásmidos o transposones, lo que facilita su diseminación horizontal.
- **Disminución de la permeabilidad:** Algunas bacterias pueden modificar sus membranas para reducir la entrada de cloranfenicol o activar bombas de eflujo que bombean el antibiótico fuera de la célula, disminuyendo su concentración intracelular (A. J. Rocha *et al.*, 2019).
- **Mutaciones en el sitio de unión ribosomal:** Menos frecuente, pero algunas bacterias pueden desarrollar mutaciones en la subunidad ribosomal 50S, reduciendo la afinidad de unión del cloranfenicol.

Debido a la similitud de los ribosomas bacterianos con los ribosomas mitocondriales eucariotas, los fenicoles pueden afectar la síntesis de proteínas en las mitocondrias de las células del huésped. Por lo que el cloranfenicol en humanos es restringido debido a su toxicidad (Okafor & Nwodo, 2023). Aunque el uso sistémico del cloranfenicol en humanos es limitado, la existencia de bacterias resistentes a este antibiótico en el ambiente es preocupante. Si estas bacterias o sus genes de resistencia se transfieren a patógenos humanos, podrían comprometer la eficacia del cloranfenicol en los casos graves en los que se utiliza como último recurso.

Fluoroquinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina, levofloxacina). Son antibióticos sintéticos de amplio espectro con efecto bactericida. Las fluoroquinolonas interfieren directamente con el ADN bacteriano, actúan inhibiendo dos enzimas bacterianas

esenciales: ADN girasa (Topoisomerasa II) y Topoisomerasa IV (G. Wang *et al.*, 2020). Los principales mecanismos de resistencia bacteriana incluyen:

- Mutaciones en los genes diana (QRDRs): Las bacterias desarrollan mutaciones puntuales en las regiones que codifican las enzimas ADN girasa (GyrA y GyrB) y Topoisomerasa IV (ParC y ParE). Estas mutaciones alteran el sitio de unión del antibiótico, reduciendo su afinidad y haciendo que la fluoroquinolona sea ineficaz.
- Bombas de eflujo (efflux pumps): Las bacterias pueden activar bombas de eflujo que bombean activamente el antibiótico fuera de la célula.
- Proteínas de protección quinolónica (Qnr): Son proteínas codificadas por genes que protegen al ADN girasa y Topoisomerasa IV del ataque de las fluoroquinolonas. Estos genes *qnr* son a menudo transportados en plásmidos, lo que facilita su transferencia horizontal entre diferentes especies bacterianas.
- Disminución de la permeabilidad: Mutaciones que reducen la expresión o alteran las porinas en la membrana externa de las bacterias Gram negativas dificultan la entrada del antibiótico.

Los genes de resistencia a fluoroquinolonas (como genes *qnr* y mutaciones en QRDRs) pueden ser transferidos entre bacterias a través de elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones. Entornos altamente contaminados se vuelven reservorios para esta transferencia horizontal de genes, lo que acelera la diseminación de la resistencia.

Nitrofuranos (nitrofurantoína). Son compuestos sintéticos, generalmente bactericidas en concentraciones elevadas y bacteriostáticos en concentraciones más bajas. A diferencia de muchos otros antibióticos, los nitrofuranos no tienen un único objetivo molecular. Una vez ingresa a la bacteria, es reducido metabólicamente por enzimas nitrorreductasas (principalmente nitrorreductasas de tipo I, codificadas por genes como *nfsA* y *nfsB*). Esta reducción genera metabolitos intermedios altamente reactivos y radicales libres. Estos metabolitos y radicales libres dañan múltiples macromoléculas bacterianas vitales: rompen las cadenas de

ADN, inhiben la síntesis de proteínas y bloquean la actividad de enzimas clave en el metabolismo bacteriano (como la acetil-coenzima A) (Khamari & Bulagonda, 2024). Aunque posee un complejo mecanismo de acción se han reportado mecanismos de resistencia:

- Mutaciones en las nitrorreductasas: Las bacterias desarrollan mutaciones en los genes que codifican las enzimas nitrorreductasas. Estas mutaciones pueden inactivar o reducir la actividad de las enzimas, impidiendo que el nitrofurano sea reducido a sus metabolitos activos tóxicos.
- Disminución de la permeabilidad: Menos común, pero se han reportado mutaciones que afectan la permeabilidad de la membrana bacteriana o la activación de bombas de eflujo que pueden reducir la concentración intracelular del nitrofurano (Davin-Regli *et al.*, 2019).

Gracias a que la resistencia a nitrofurano es a menudo cromosómica, una vez que una cepa se vuelve resistente, esta resistencia tiende a ser más estable a diferencia de la resistencia mediada por plásmidos, lo que facilita su mantenimiento en la población bacteriana en el entorno.

Penicilinas (ampicilina, carbenicilina, piperacilina-tazobactam). Son antibióticos betalactámicos derivados del hongo *Penicillium*. Son agentes bactericidas, al igual que las cefalosporinas actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. Se unen de forma covalente a las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP). Al inactivar estas PBP, las penicilinas impiden la formación del peptidoglicano, lo que lleva a la lisis y muerte de la bacteria (Cimen *et al.*, 2023). La resistencia a las penicilinas es uno de los principales problemas que enfrenta la salud, esto como resultado de los siguientes mecanismos:

- Producción de betalactamasas: Las bacterias producen enzimas llamadas betalactamasas que hidrolizan y abren el anillo betalactámico del antibiótico, inactivándolo (G. Wang *et al.*, 2020). Muchas bacterias han desarrollado y diseminado genes de betalactamasas, lo que facilita su transferencia entre especies.

- **Modificación de las PBP:** Las bacterias pueden alterar la estructura de sus proteínas fijadoras de penicilinas (PBP), de modo que las penicilinas no pueden unirse eficazmente a ellas, reduciendo o eliminando su actividad.
- **Disminución de la permeabilidad:** Algunas bacterias pueden reducir la entrada de penicilinas a la célula o activamente expulsarlas a través de bombas de eflujo.

Los genes que confieren resistencia a las penicilinas son a menudo transportados en plásmidos u otros elementos genéticos móviles. Los ambientes contaminados se vuelven un lugar ideal para la transferencia horizontal de estos genes entre diferentes especies bacterianas, incluyendo aquellas no patógenas que actúan como reservorios.

Sulfamidas (sulfametoxazol-trimetoprim). Son los primeros agentes antimicrobianos sintéticos descubiertos. Generalmente son bacteriostáticos, sin embargo, cuando se combinan con trimetoprima el efecto combinado es bactericida debido a un bloqueo secuencial. Las sulfamidas son análogos estructurales del ácido para-aminobenzoico (PABA). Las bacterias necesitan sintetizar su propio ácido fólico para la producción de nucleótidos y aminoácidos, el PABA es un precursor esencial en la vía de síntesis de ácido fólico. Las sulfamidas compiten con el PABA por la enzima dihidropteroato sintasa (DHPS), una enzima clave en esta vía metabólica. Al bloquear esta enzima, las sulfamidas impiden la síntesis de ácido fólico bacteriano, lo que detiene su crecimiento y replicación (Okafor & Nwodo, 2023). La resistencia a las sulfamidas se ha desarrollado rápidamente debido a su uso prolongado y generalizado, los mecanismos principales son:

- **Mutaciones en la dihidropteroato sintasa (DHPS):** Las bacterias pueden desarrollar mutaciones en el gen que codifica la enzima DHPS, reduciendo la afinidad de unión de la sulfamida, lo que la hace menos efectiva.
- **Adquisición de una DHPS resistente:** Las bacterias pueden adquirir genes que codifican una variante de la DHPS que es intrínsecamente resistente a las sulfamidas. Los genes *sul1*, *sul2* y *sul3* son los más comunes y se

encuentran ampliamente distribuidos en bacterias ambientales y clínicas, a menudo asociados a integrones (Okafor & Nwodo, 2023).

- Aumento de la producción de PABA: Algunas bacterias pueden sobreproducir PABA, lo que compensa la inhibición enzimática de las sulfamidas.
- Bombas de eflujo (efflux pumps): Menos común, pero algunas bacterias pueden tener bombas de eflujo que expulsan activamente las sulfamidas de la célula.

De acuerdo con la terminología de organismos internacionales la resistencia a antimicrobianos se define como: bacterias multirresistentes (MDR), bacterias que presentan resistencia adquirida al menos un compuesto de tres o más familias de antimicrobianos. Bacterias con resistencia extendida (XDR), son bacterias que muestran resistencia al menos un compuesto de todas las familias de antimicrobianos, con excepción de una o dos familias. Y Finalmente las bacterias panresistentes (PDR), aquellas bacterias con resistencia a todos los compuestos clasificados en todas las familias de antimicrobianos (Ma *et al.*, 2020).

Antecedentes específicos

En la era del Antropoceno, los ríos han sufrido un grave deterioro debido a las diversas actividades humanas que han alterado sus características físicas, químicas, biológicas e hidrológicas (Mora *et al.*, 2021). La falta de medidas efectivas para prevenir y eliminar las fuentes de contaminación, sumado al aumento acelerado de la población en ciudades y zonas rurales, generó cambios en los efluentes, disminuyendo el acceso a agua potable (L. Li *et al.*, 2022) y ha puesto en riesgo la salud de las poblaciones adyacentes a los cuerpos de agua.

En este contexto, México no ha sido la excepción. Más del 60% de sus sistemas fluviales presentaron contaminación por pesticidas, fertilizantes y continuas descargas de desechos de áreas urbanas e industriales (Mora *et al.*, 2021). Entre los ríos más contaminados del país se clasificó al río Atoyac, perteneciente a la cuenca del Balsas y ubicado en la zona central del país (Covarrubias-López *et al.*, 2023). Este río nace en las faldas del volcán Iztaccíhuatl, donde el deshielo genera la corriente de agua que atraviesa los estados de Puebla y Tlaxcala (INEGI, 2019) hasta desembocar en la presa 'Manuel Ávila Camacho', donde el agua ha sido empleada para el riego de cultivos (Bonilla *et al.*, 2015).

Durante su recorrido hasta la presa, el río recibe múltiples descargas de residuos de industrias automotrices, farmacéuticas, metalúrgicas, textiles, alimentarias, papeleras, ganaderas (Covarrubias-López *et al.*, 2023), así como el desagüe de plantas tratadoras de áreas urbanas (Castillos Díaz, 2014). De acuerdo con la Comisión Nacional del Agua, en 2018 se reportaron 18,806 NMP/100 mL de coliformes fecales (CF) en el río Atoyac (CONAGUA, 2021), superando ampliamente los niveles máximos de 250 NMP/100 mL establecidos por las Normas Oficiales Mexicanas (SEMARNAT, 2021), clasificando a este cuerpo de agua como “Fuertemente contaminado”.

Como resultado del elevado nivel de contaminación, las condiciones de este ecosistema permiten únicamente el desarrollo de microorganismos resistentes a los diversos contaminantes presentes en el cuerpo de agua. Generando un problema ambiental y de salud pública, ya que el río Atoyac atraviesa el área metropolitana

Puebla-Tlaxcala, la cuarta más grande de México, con aproximadamente 3 millones de habitantes (SEDATU *et al.*, 2024).

En este aspecto, múltiples estudios reportaron a las bacterias ESKAPE en ambientes clínicos; sin embargo, se demostró que su propagación no se limita a estos lugares. Se les encontró comúnmente en reservorios naturales como suelos, vegetales, alimentos crudos y preparados, playas, zonas marinas, ríos, lagos, presas, aguas subterráneas, sistemas de agua potable y plantas tratadoras de agua (Khasapane *et al.*, 2024). Cabe destacar que muchas de estas fueron bacterias Gram negativas (BGN), clasificadas como prioridad crítica por la Organización Mundial de la Salud (OMS), y son un indicador de contaminación fecal debido a su presencia en el tracto intestinal de humanos y animales de sangre caliente (Ejikeugwu *et al.*, 2021). El incremento de aislados multirresistentes de estas BGN representa una amenaza a nivel global (Petrosillo *et al.*, 2019). Esto como resultado de actividades humanas recreativas, económicas y el mal manejo de los residuos de hospitales y vertederos urbanos (Savin *et al.*, 2020b).

La presencia de bacterias multirresistentes en ambientes acuáticos maximiza la propagación de la resistencia. La exposición a entornos contaminados genera las condiciones idóneas para que las bacterias se adapten y evolucionen (Eger *et al.*, 2024), aprovechando los nutrientes del medio y perdiendo en el proceso los sitios diana para los que están diseñados diversos antibióticos (J. Rocha, Henriques, *et al.*, 2022). La OMS destacó que el agua es una de las principales fuentes de transmisión de enfermedades humanas, causando alrededor de 3.5 millones de muertes al año, siendo la población infantil la principal afectada (Osman *et al.*, 2024). Además, se ha documentado que las comunidades marginadas son las más afectadas por enfermedades transmitidas por agua debido a la falta de recursos y a una infraestructura inadecuada (LeChevallier *et al.*, 2024).

Esto se relaciona con uno de los grandes desafíos actuales de la salud pública: el aumento de enfermedades causadas por bacterias resistentes a antimicrobianos. Años antes de que la penicilina saliera al mercado, ya se había mencionado la capacidad de las bacterias para desarrollar resistencia a los antibióticos (Hansen,

2021). Sin embargo, el problema no se volvió relevante hasta algunas décadas después, cuando se presentaron los primeros aislamientos de bacterias resistentes en unidades hospitalarias (Hansen, 2021). Actualmente, las cifras de infecciones causadas por bacterias multirresistentes son similares a las de influenza, tuberculosis y VIH (Loudermilk *et al.*, 2022). En 2019 se registraron 1.3 millones de muertes a nivel mundial por estas bacterias (X. Wang *et al.*, 2024), y se estima que esta cifra se eleve hasta 10 millones de muertes para 2050 (Ma *et al.*, 2020).

El uso inapropiado y frecuente de antibióticos como agentes terapéuticos, sumado a su uso extensivo en el sector alimentario y ganadero, ha contribuido al desarrollo de la resistencia a antimicrobianos comunes en la medicina humana (Denissen *et al.*, 2022). Estudios previos sugieren que los países en vías de desarrollo tienen una mayor tendencia a ser afectados por la multirresistencia a antibióticos debido a los diversos problemas de sus sistemas de salud (Ayobami *et al.*, 2022).

En diferentes continentes se reportó que los cuerpos de agua contaminados no solo representan daños para las poblaciones humanas, sino que impactan en el ambiente y la calidad de los cultivos (Haldar *et al.*, 2022). De acuerdo con la OMS, la salud de las personas, animales y ecosistemas está estrechamente relacionada. Los cambios en estas relaciones pueden aumentar el riesgo de aparición y propagación de enfermedades entre especies (OMS, 2023).

Basándose en este principio, la OMS desarrolló el enfoque “One Health”, el cual considera las actividades humanas y los ecosistemas sometidos a estrés como escenarios propicios para la aparición y propagación de enfermedades (Denissen *et al.*, 2022). En este sentido, la contaminación del río Atoyac por actividades humanas y la potencial presencia de bacterias resistentes a antibióticos representan un claro ejemplo de cómo la alteración de los ecosistemas puede tener consecuencias para la salud humana y animal.

Desde la perspectiva de “One Health”, la contaminación de ambientes acuáticos por actividades humanas juega un rol importante en la diseminación de la resistencia antimicrobiana (Kraychete *et al.*, 2022). Por lo tanto, las condiciones actuales del río Atoyac constituyen un riesgo no solo para los ecosistemas y poblaciones cercanas,

sino también para todas las especies involucradas en actividades que dependen del uso del agua, como la ganadería y la agricultura (Galarde-López *et al.*, 2022).

Dirigir una investigación con este enfoque permitiría evidenciar la presencia de estas bacterias fuera del entorno hospitalario y ofrecería información clave sobre su propagación en ambientes naturales contaminados. Los datos que arrojaría tal investigación, en consecuencia, refuerzan la necesidad de abordar la contaminación del río Atoyac no solo como un problema ambiental, sino como una amenaza directa a la salud pública y la seguridad alimentaria, enmarcada dentro del enfoque “One Health”.

Justificación

Los entornos hospitalarios son ampliamente reconocidos como reservorios de bacterias multirresistentes. Sin embargo, las diversas actividades económicas y recreativas han propiciado la diseminación de estos patógenos en el ambiente, siendo los ecosistemas acuáticos los lugares en donde su presencia se ha vuelto más notoria.

Aunque se desconocen los puntos específicos de cómo estas bacterias llegan a los cuerpos de agua, los ríos se vuelven un ecosistema idóneo para el desarrollo y la diseminación de bacterias multirresistentes. Las condiciones ambientales favorecen el intercambio genético entre diferentes especies bacterianas incrementando así su resistencia a múltiples antibióticos.

En particular las bacterias Gram negativas (BGN) del grupo ESKAPE son patógenos oportunistas que causan infecciones en organismos con un sistema inmunológico comprometido y raramente afectan a huéspedes sanos. Algunas especies, como las *Enterobacterias* son reconocidas por su papel en la transferencia horizontal de genes de resistencia.

Si bien estas bacterias pueden encontrarse de forma natural en diferentes ecosistemas, diversos estudios han reportado cepas multirresistentes en cuerpos de agua, sedimentos de ríos, presas, lagos, plantas tratadoras y sistemas de drenaje. Estos reservorios naturales representan un riesgo significativo para la salud pública, ya que la continua exposición a estas fuentes de contaminación puede generar infecciones difíciles de tratar asociadas a una alta mortalidad.

En este contexto es plausible hipotetizar que el uso indebido de antibióticos en humanos y animales no solo promueve la propagación de bacterias resistentes, sino también la transferencia horizontal de genes de resistencia, poniendo en peligro la salud pública. Por lo tanto, la identificación de bacterias multirresistentes en sistemas acuáticos puede considerarse una herramienta esencial para la vigilancia y control temprano de estas bacterias en entornos donde el agua se emplea para actividades humanas.

En el estado de Puebla los estudios sobre la actividad microbiológica del río Atoyac son escasos. No obstante, basándose en los reportes de CONAGUA que indican elevados niveles de contaminación por coliformes totales ofrecen evidencia suficiente para respaldar la necesidad de realizar investigaciones que permitan evaluar el riesgo que representan estas bacterias en el río.

Finalmente, este estudio puede sentar las bases para comparar cepas ambientales con cepas hospitalarias, en un próximo estudio, lo que permitiría determinar el origen de la multirresistencia. Comprender las causas que promueven el desarrollo y la diseminación de estas bacterias es crucial para diseñar estrategias efectivas que permitan controlar este grave problema ambiental y de salud pública.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la presencia de bacterias multirresistentes Gram negativas pertenecientes al grupo ESKAPE, en aguas y sedimentos del río Atoyac, con el fin de comprender su potencial riesgo para la salud pública y generar información útil para la vigilancia microbiológica ambiental.

Objetivos específicos

- Aislar e identificar *Enterobacterias* (*Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter spp.*) en las muestras de agua y sedimento del río Atoyac, utilizando métodos microbiológicos y moleculares.
- Aislar e identificar *Pseudomonas aeruginosa* en muestras de agua y sedimentos del río Atoyac, utilizando métodos microbiológicos.
- Determinar el perfil de resistencia a antibióticos de las bacterias aisladas mediante pruebas de sensibilidad antimicrobiana.
- Diseño de cebadores para identificación molecular de *Klebsiella pneumoniae* por la técnica de PCR.

Metodología

El presente estudio comenzó con una revisión bibliográfica de artículos científicos publicados en los últimos 5 años. Con base en la información actualizada sobre el grupo ESKAPE, se procedió al diseño de la metodología de muestreo, análisis de muestras y posterior estandarización.

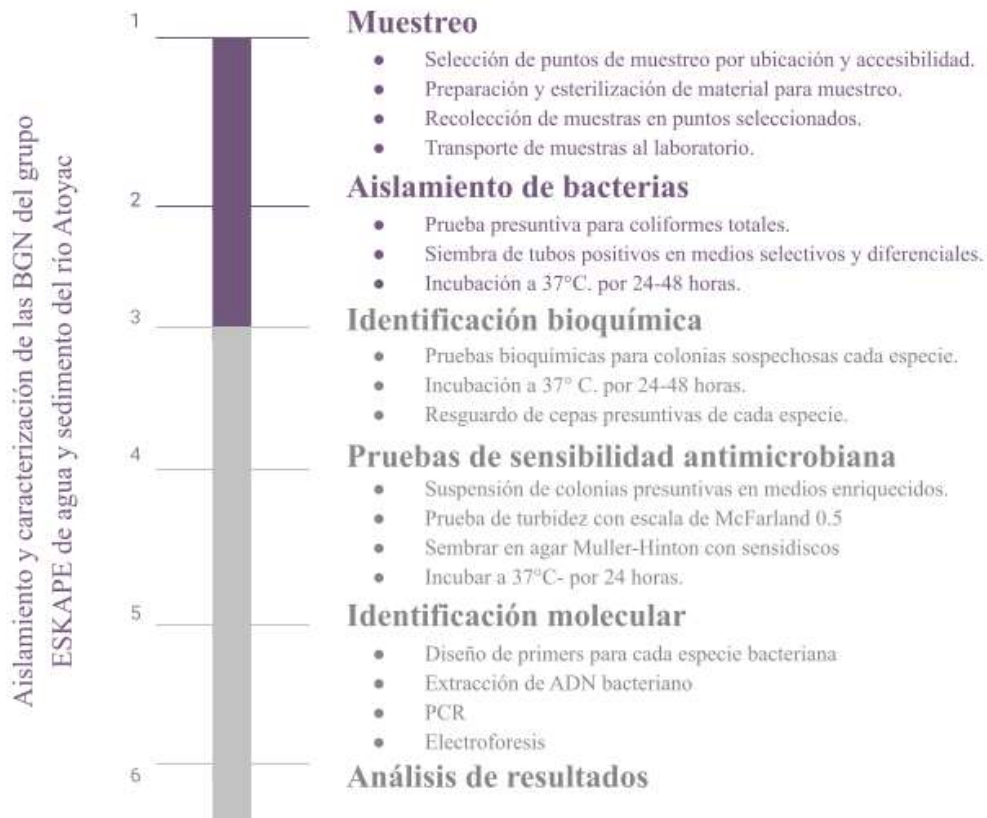


Figura 1. Protocolo de investigación.

Muestreo

El muestreo se diseñó con base en estudios previos realizados para la obtención de bacterias del grupo ESKAPE en plantas tratadoras de agua (Savin *et al.*, 2020b). Los puntos de muestreo se seleccionaron considerando dos criterios principales: la ubicación y la accesibilidad a las zonas.

El río Atoyac recorre varios kilómetros entre los estados de Puebla y Tlaxcala; por lo tanto, atraviesa zonas con diferentes características, como áreas industriales, agrícolas y metropolitanas. Con el fin de obtener un panorama más amplio sobre la calidad del agua a lo largo de su trayecto, se seleccionaron cuatro puntos de muestreo: dos en la zona agrícola del estado de Tlaxcala, donde las aguas del río están en contacto directo con cultivos y población; y dos en la zona metropolitana de Puebla, donde el río ha pasado por zonas industriales, vertederos de plantas tratadoras y el área urbana de la ciudad, siendo además una región cercana a la presa “Manuel Ávila Camacho”. En estos dos últimos puntos, la accesibilidad fue un criterio clave, ya que gran parte del cauce en zonas urbanas no es de libre acceso por motivos de seguridad pública.

Las coordenadas de los puntos de muestreo se detallan en el mapa de la Figura 2. Punto 1 Puebla: 19°01'30.4"N, 98°12'54.4"W. Punto 2 Puebla: 19°01'19.1"N, 98°13'42.4"W. Punto 1 Tlaxcala: 19°20'37.9"N, 98°10'48.8"W. Punto 2 Tlaxcala: 19°20'25.9"N, 98°12'04.9"W.

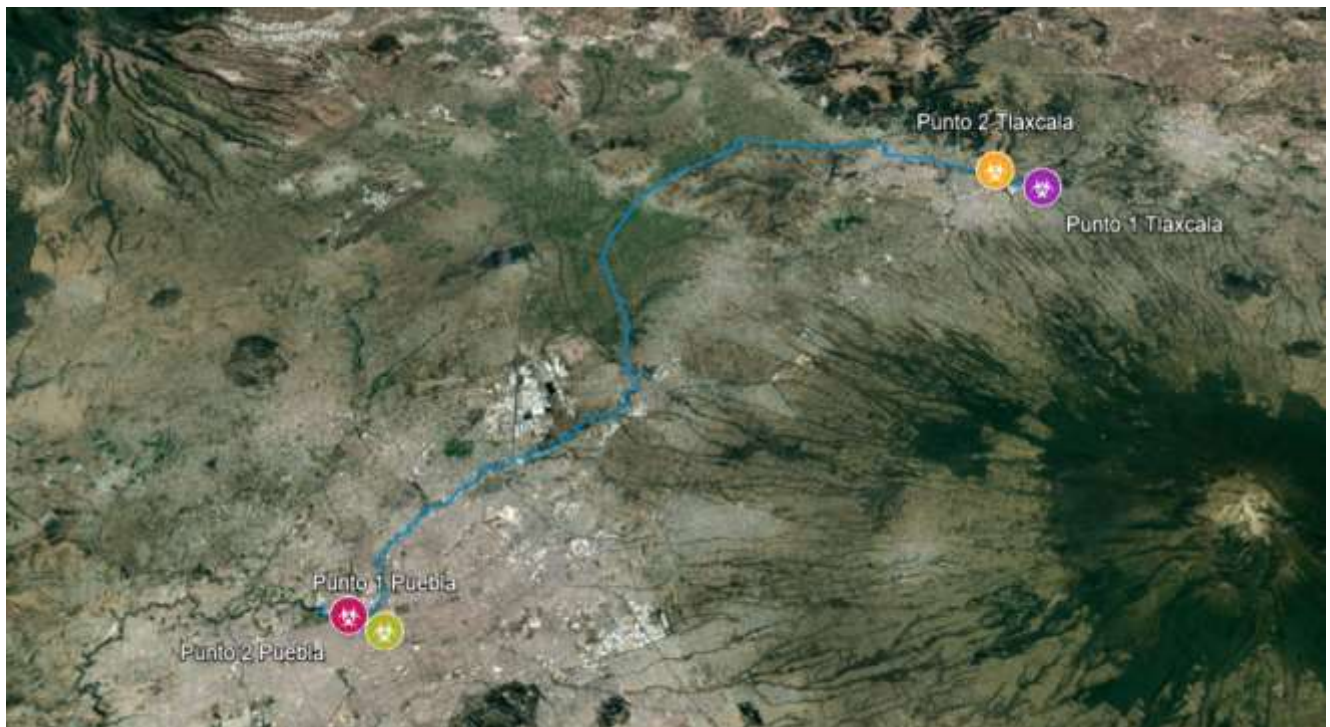


Figura 2. Mapa de los puntos de muestreo, resaltando el cauce del río Atoyac. Mapa realizado de la imagen satélite del río Atoyac, recuperado de Google Earth (2024).

En los cuatro puntos seleccionados se recolectaron muestras de agua y sedimentos del río, con el objetivo de comparar la presencia de microorganismos en cada tipo de muestra. Las muestras de agua se obtuvieron llenando directamente un recipiente de plástico estéril (1L) con agua superficial. Para la recolección de sedimentos, se colocó el recipiente cerca de la orilla del río y con ayuda de una pala de mano estéril se tomaron las muestras de lecho.



Figura 3. Contaminación del río Atoyac en el área metropolitana. El río Atoyac cruza una de las zonas urbanas más densamente pobladas de México, con aproximadamente tres millones de habitantes. Actualmente presenta una notoria coloración gris y un persistente.



Figura 4. Aspecto del Río Atoyac en Tlaxcala. En el estado de Tlaxcala, donde el río Atoyac entra en contacto con cultivos y comunidades rurales, presenta una coloración marrón y un olor desagradable persistente, indicativos de contaminación por aguas residuales.

Todas las muestras fueron etiquetadas y transportadas en frío, dentro de una hielera, inmediatamente al laboratorio de patogenicidad microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla para su análisis.

Aislamiento y caracterización de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter spp.*

Para la identificación de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter spp.* a partir de las muestras obtenidas del río Atoyac, se realizó la prueba presuntiva para coliformes mediante el método del Número Más Probable (NMP), conforme a lo establecido en la NMX-AA-042-SCFI-2015 (SEMARNAT, 2016).

En el caso de las muestras de agua, se prepararon diluciones decimales seriadas de 10^0 a 10^{-2} en tubos con 20 mL de caldo lactosado a una concentración 2X, cada uno con campana de Durham. Se inoculó un volumen de 20 mL de la muestra original en el primer tubo, y posteriormente se realizaron las diluciones. Este procedimiento se efectuó por triplicado para cada muestra.

Para las muestras de sedimento, se pesaron 10 g de muestra, los cuales se mezclaron con 90 mL de agua peptonada. La mezcla se homogeneizó mediante agitación y se dejó reposar durante 5 minutos. De esta suspensión se tomó una alícuota de 20 mL, la cual se utilizó para realizar el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Los tubos se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

A partir de los tubos positivos de la prueba presuntiva de coliformes (presencia de gas), se sembraron las muestras por estría cruzada en medios selectivos y diferenciales para el aislamiento de *Enterobacterias*.

Para la caracterización de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter spp.* los cultivos positivos se sembraron en placas de agar MacConkey y EMB (eosina azul de metileno), y se incubaron a 37 °C durante 24 a 48 horas, un par de placas por cada uno de los tubos positivos. Las colonias sospechosas fueron aisladas y

resembradas en los mismos medios, incubándose nuevamente a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, partiendo de cultivos puros, se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas para su identificación: SIM, MIO, LIA, citrato de Simmons, TSA, MR-VP y oxidasa.

Aislamiento y caracterización de *Pseudomonas aeruginosa*

Durante la estandarización de la metodología de aislamiento y caracterización de *Pseudomonas aeruginosa* se observó un mejor crecimiento de las colonias que se sembraban a partir de los tubos de caldo lactosado del método del Número Más Probable (NMP), en comparación con las colonias que se sembraron de las diluciones de las muestras de agua y sedimentos. Con estos resultados se determinó emplear la metodología de aislamiento de *Enterobacterias*, previamente descrita.

A partir de los tubos positivos para la prueba presuntiva de coliformes (presencia de gas), se sembraron las muestras por estría cruzada en un medio selectivo para *Pseudomonas aeruginosa*. Las muestras se sembraron en placas de agar cetrimida y se incubaron a 37 °C durante 24 a 48 horas, un par de placas por cada uno de los tubos positivos. Las colonias sospechosas se aislaron y resembraron bajo las mismas condiciones, y posteriormente, partiendo de cultivos puros, se realizaron las pruebas bioquímicas: SIM, citrato de Simmons, TSA y oxidasa.

Conservación de cepas

Para su conservación, los aislados de *K. pneumoniae* se incubaron en agar Luria-Bertani (LB) a 37 °C durante 24 horas. A partir de este cultivo, se prepararon tubos criogénicos con 1.5 mL de medio LB mezclado con glicerol al 30 % (v/v).

En el caso de los aislados de *P. aeruginosa* y *Enterobacter spp.* se incubaron en agar soya tripticasa (TSA) a 37°C durante 24 horas. A partir de este cultivo, se

prepararon tubos criogénicos con 1.5 mL de medio TSA mezclado con glicerol al 30 % (v/v).

Todos los tubos fueron almacenados a -18 °C para análisis posteriores.

Diseño de cebadores

La confirmación de los aislados bacterianos se llevó a cabo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para este propósito, la información necesaria para la selección de genes blanco y el diseño de cebadores (primers) se obtuvo a través de una revisión bibliográfica.

Las secuencias de los genes seleccionados se adquirieron de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). El diseño de los cebadores se realizó utilizando la herramienta Primer-BLAST disponible en el NCBI. Posteriormente, las secuencias de cebadores obtenidas fueron analizadas con el software OligoAnalyzer™ Tool de Integrated DNA Technologies (IDT) y la herramienta Blastn del NCBI. Este análisis permitió verificar que los cebadores cumplieran con los parámetros fisicoquímicos y de especificidad requeridos para su uso en PCR.

Extracción de ADN

La extracción de ADN para las *Klebsiella pneumoniae* se llevó a cabo utilizando el método de choque térmico.

Inicialmente, los aislados se sembraron en placas de agar LB y se incubaron a 37° C durante 24 horas. Posteriormente, se seleccionó una unidad formadora de colonias (UFC) con un asa bacteriológica y se resuspendió en 500 µL de agua inyectable estéril. La suspensión se homogeneizó mediante vortex hasta observar turbidez.

Las suspensiones en tubos tipo Eppendorf se sometieron a un baño maría hirviendo durante 5 minutos para inducir el choque térmico. Tras este periodo, se dejaron enfriar a temperatura ambiente (21° C) y se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 minutos. Después, el sobrenadante, que contenía el ADN, se recolectó en un nuevo tubo y se concentró en un concentrador centrífugo de la marca Eppendorf. Finalmente, las muestras de ADN se congelaron hasta su posterior análisis.

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación por PCR para *Klebsiella pneumoniae* se llevó a cabo en un volumen total de 25 µL por reacción (Tabla 1), compuesto por: 1 µL de cada cebador específico (consultar Tabla 8), 12.5 µL de GoTaq® Green Master Mix 2X, 0.5 µL de agua libre de nucleasas y 10 µL de ADN genómico extraído de cada muestra. Las reacciones se realizaron en un termociclador miniPCR™ mini8 thermal (miniPCR bio™, Massachusetts, EE.UU.).

Tabla 1. Componentes de la reacción de PCR.

Componente	Volumen (µL)
GoTaq® Green Master Mix 2X	12.5
Cebador Forward	1.0
Cebador Reverse	1.0
Agua libre de nucleasas	0.5
ADN	10.0

El programa de amplificación fue el siguiente: precalentamiento a 95° C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 90° C por 1 minuto; temperatura de hibridación específica del cebador (Tabla 2) durante 30 segundos; extensión a 72°C durante 1 minuto; y una extensión final a 72° C por 7 minutos. El esquema del programa térmico se muestra en la Figura 5.

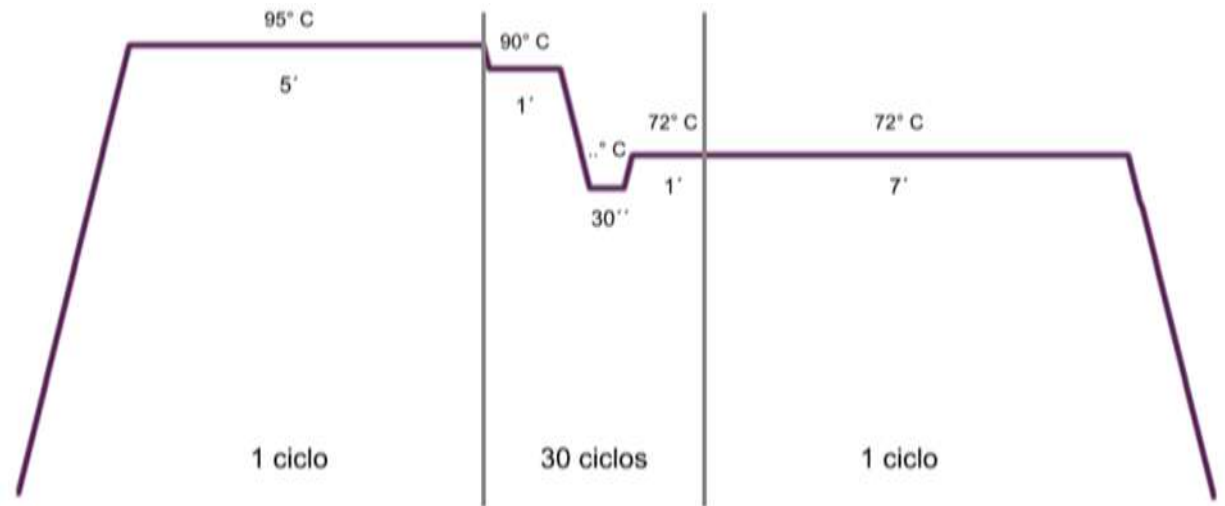


Figura 5. Diagrama de temperaturas para PCR.

Los productos de la PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Para ello, se transfirieron 12µL de ADN amplificado al gel. La electroforesis se llevó a cabo durante 135 minutos a 70 V en una solución tampón TAE 1X (40mM Tris base, 20mM ácido acético glacial (NaOAc), 2.0mM EDTA, pH 8.0). Posteriormente, el gel fue teñido con bromuro de etidio y los productos amplificados se visualizaron bajo luz ultravioleta mediante un transiluminador.

Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad a los antibióticos de los aislados microbianos se determinó utilizando la técnica de difusión de disco Kirby-Bauer (Bauer, 1966). Se preparó un inóculo estándar a partir de 2 a 3 colonias seleccionadas de un cultivo de 24 horas, suspendiéndolas en 5 mL de medio Mueller-Hinton. Estas suspensiones se incubaron a 37° C con agitación a 170 rpm durante 24 horas. Posteriormente, se transfirió una alícuota de 100 µL de cada suspensión a un tubo nuevo con medio Mueller-Hinton, incubando nuevamente a 37° C con agitación a 170 rpm durante 3

horas. Al finalizar este periodo, la turbidez de las suspensiones se ajustó y comparó con el estándar de McFarland 0.5.

Con hisopos estériles, las suspensiones ajustadas se sembraron uniformemente en la superficie de placas de agar Mueller-Hinton. Se dejó secar la superficie durante 3 a 5 minutos con la tapa de la caja Petri colocada para asegurar la absorción. Posteriormente, utilizando pinzas estériles, se colocaron los discos antimicrobianos sobre la superficie del agar. Las placas se invirtieron y se incubaron en condiciones aeróbicas a 37° C durante 18 horas.

Para *K. pneumoniae* y *Enterobacter spp.*, se utilizaron multidiscos Multibac I.D. para bacterias Gram negativas, con los siguientes antibióticos: amikacina (30 µg), ampicilina (10 µg), carbencilina (100 µg), cefalotina (30 µg), cefotaxima (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), netilmicina (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), norfloxacina (10 µg) y sulfametoxazol-trimetoprim (25 µg). Además, se incluyeron los discos de ceftriaxona (30 µg) y ceftazidima (30 µg).

Para *P. aeruginosa*, se emplearon los siguientes discos antimicrobianos: piperacilina-tazobactam (110 µg), ceftazidima (30 µg), cefepime (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), levofloxacina (5 µg), norfloxacina (10 µg) y amikacina (30 µg).

Después del periodo de incubación, el diámetro de cada zona de inhibición se midió con una regla y se registró en milímetros (mm). La interpretación de las zonas de inhibición como sensibles o resistentes se realizó conforme a los lineamientos del fabricante de los discos.

El índice de resistencia a múltiples antibióticos (IRMA) se calculó como la razón entre el número de antibióticos a los que un aislado bacteriano era resistente y el número total de antibióticos probados para dicho aislado.

Resultados

Aislamiento y caracterización de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter spp.*

Las muestras recolectadas fueron procesadas en el Laboratorio de patogenicidad microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. El procesamiento se llevó a cabo pocas horas después de su recolección, siguiendo la metodología previamente descrita para la prueba presuntiva de coliformes totales.

Tras el periodo de incubación, se observó un resultado positivo (producción de gas) en todos los tubos correspondientes a los cuatro puntos de muestreo.

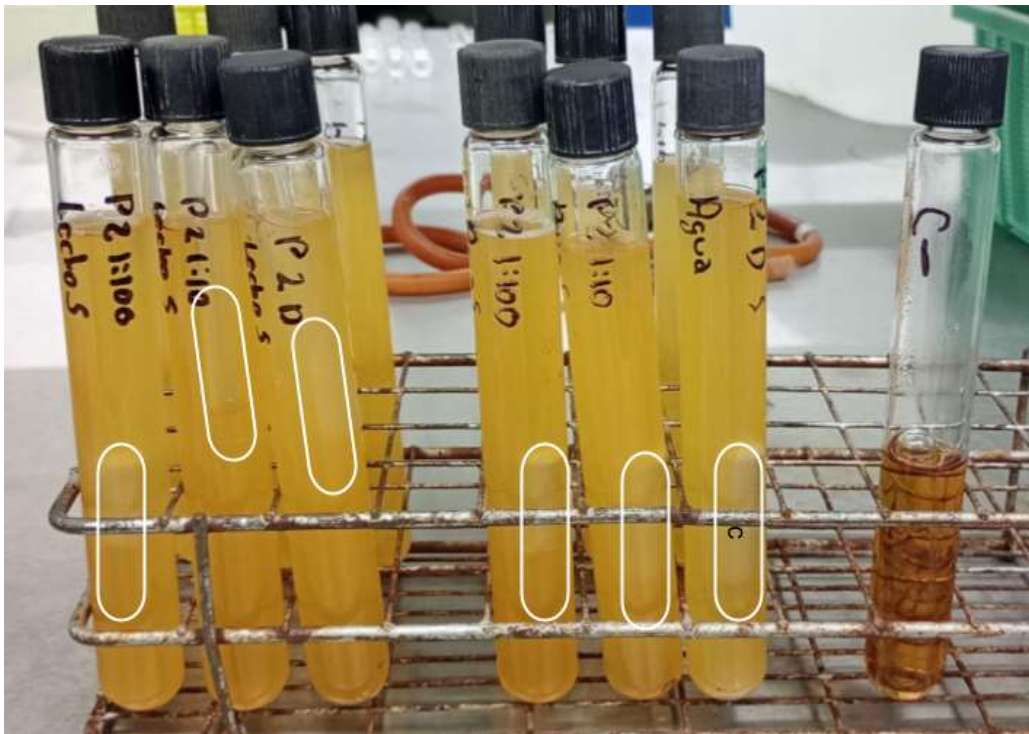


Figura 6. Tubos positivos, con control negativo, del muestreo en punto 2 Puebla. Tubos con caldo lactosado concentración 2X, incubados a 37° C durante 24 horas.

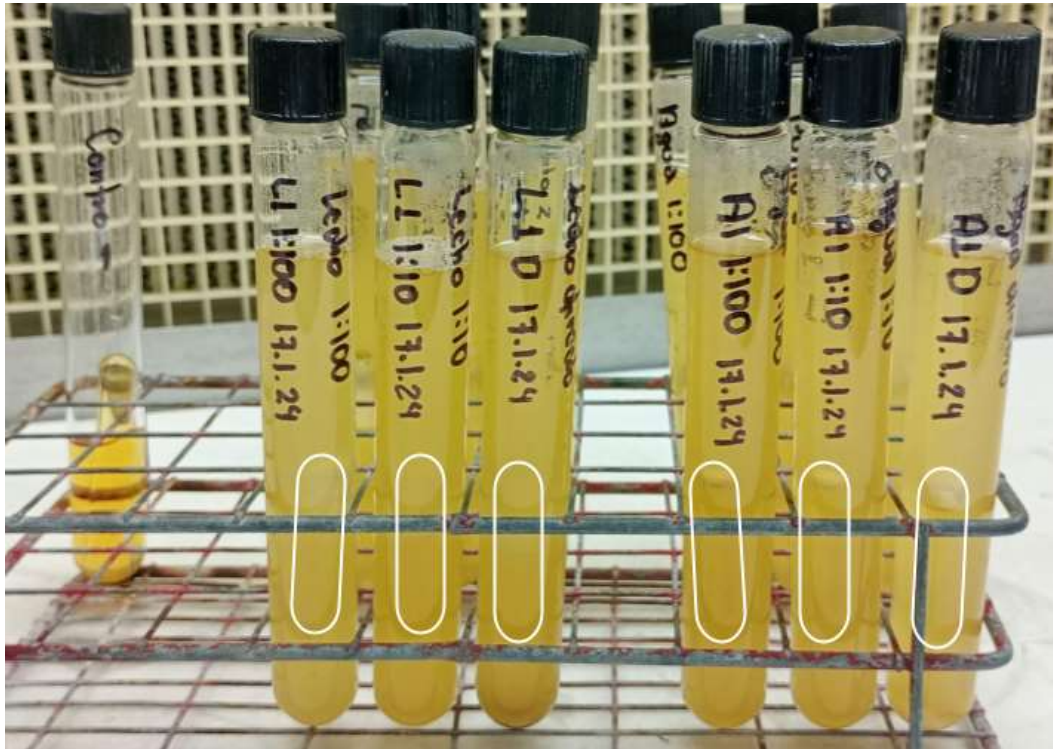


Figura 7. Tubos positivos, con control negativo, del muestreo en punto 1 Tlaxcala. Tubos con caldo lactosado concentración 2X, incubados a 37° C durante 24 horas.

De cada tubo positivo se tomó una asada y se sembró en medios de cultivo selectivos y diferenciales dirigidos a las tres especies de interés. Después del periodo de incubación, se seleccionaron las colonias sospechosas con base en su morfología característica.

Klebsiella pneumoniae

En agar MacConkey se seleccionaron colonias rosadas, indicativas de fermentación de lactosa, con aspecto mucoso. En agar EMB, se seleccionaron colonias mucoides de color marrón con centro oscuro, lo cual sugiere fermentación de lactosa con producción de ácido. Todas las colonias sospechosas fueron resembradas para su purificación y posterior análisis mediante pruebas bioquímicas.

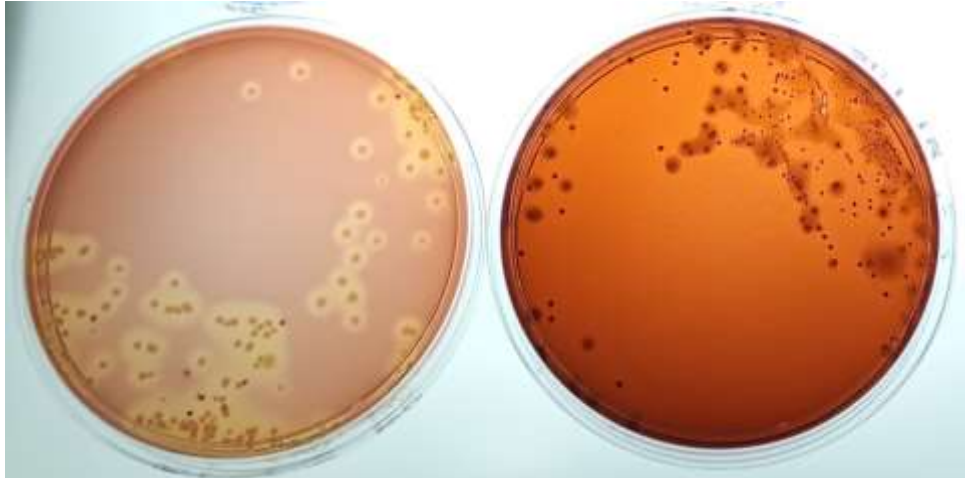


Figura 8. Crecimiento de colonias sospechosas de *K. pneumoniae* en agar MacConkey (izquierda) y agar EMB (derecha). De los tubos positivos del método de NMP se sembró la muestra por estría cruzada en medios selectivos para el aislamiento de *Klebsiella pneumoniae*, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 a 48 horas.

Enterobacter spp.

Se sembraron alícuotas en placas de agar MacConkey y EMB. En MacConkey se seleccionaron colonias grandes, convexas y de color rosado, indicativas de fermentación de lactosa. En agar EMB, se eligieron colonias que mostraron coloración púrpura o rosada, sin brillo metálico. Las colonias sospechosas fueron purificadas y posteriormente analizadas mediante pruebas bioquímicas.

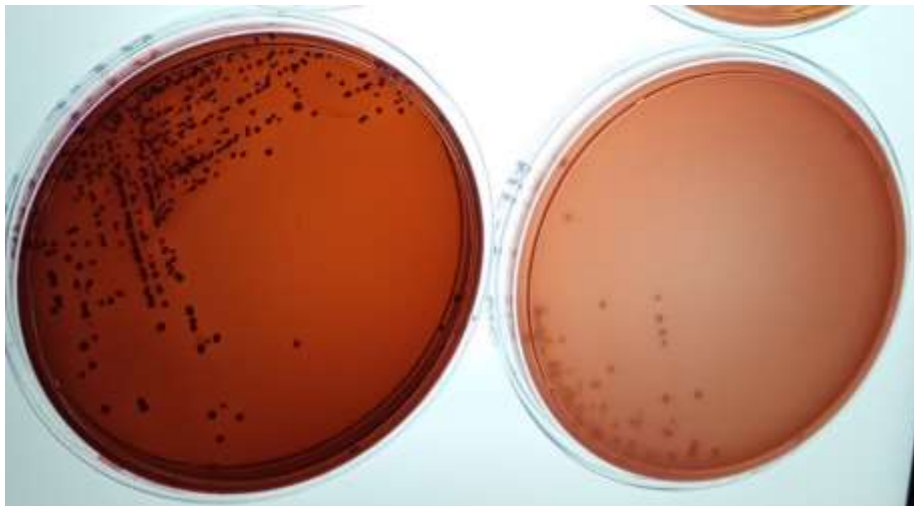


Figura 9. Crecimiento de colonias sospechosas de *Enterobacter spp.* en agar EMB (izquierda) y agar MacConkey (derecha). De los tubos positivos del método de NMP se sembró la muestra por estría cruzada en medios selectivos para el aislamiento de *Enterobacter spp.* las placas se incubaron a 37 °C durante 24 a 48 horas.

Las colonias sospechosas se sometieron a una serie de pruebas bioquímicas para su identificación. Para *Enterobacterias*, se realizaron las pruebas SIM, MIO, LIA, citrato de Simmons, TSA, MR-VP y oxidasa. Todas las pruebas se incubaron a 37°C durante 24 a 48 horas. Transcurrido este tiempo, se registraron los resultados y se resguardaron los aislados de las bacterias de interés para análisis posteriores. Los resultados de estas pruebas bioquímicas se presentan en los anexos 1-2.

Aislamiento y caracterización de *Pseudomonas aeruginosa*

Las siembras se realizaron en placas de agar cetrimida, un medio selectivo para esta especie. Transcurrido el periodo de incubación, se seleccionaron colonias sospechosas que presentaban una pigmentación fluorescente verde-amarilla y bordes irregulares, características distintivas de *P. aeruginosa*. Estas colonias fueron resembradas para su purificación y sometidas a pruebas bioquímicas para confirmar su identidad.

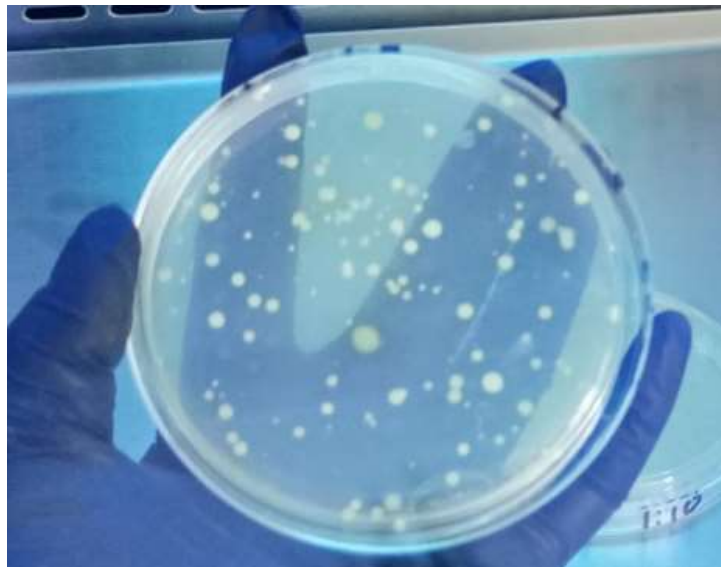


Figura 10. Colonias sospechosas de *P. aeruginosa* en agar cetrimida. De los tubos positivos del método de NMP se sembró la muestra por estría cruzada en un medio selectivo para el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 a 48 horas.

Para identificar *P. aeruginosa*, se emplearon las pruebas SIM, citrato de Simmons, TSA y oxidasa. Todas las pruebas se incubaron a 37°C durante 24 a 48 horas. Transcurrido este tiempo, se registraron los resultados y se resguardaron los aislados de las bacterias de interés para análisis posteriores. Los resultados de estas pruebas bioquímicas se presentan en el anexo 3.

Distribución de aislados.

Los resultados de las pruebas bioquímicas se analizaron para detectar la presencia de las bacterias de interés. Con el fin de garantizar aislamientos no repetitivos, se consideró un solo aislado por cada UFC sospechosa en placa Petri. Se confirmaron 12 aislados positivos para *Klebsiella pneumoniae*, de los cuales 2 (17%) correspondieron al Punto 1 Puebla; 1 (8%) al Punto 2 Puebla; 4 (33%) al Punto 1 Tlaxcala, y 5 (42%) al Punto 2 Tlaxcala. En el caso de *Enterobacter spp.* se obtuvieron 15 aislados positivos, de los cuales 1 (7%) se identificaron en el Punto 1 Puebla; 2 (13%) en el Punto 2 Puebla; 5 (33%) en el Punto 1 Tlaxcala, y 7 (47%) en el Punto 2 Tlaxcala. Finalmente, para *Pseudomonas aeruginosa*, se confirmaron 10 aislados positivos: 4 (40%) del Punto 1 Puebla; 1 (10%) del Punto 2 Puebla; 1 (10%) del Punto 1 Tlaxcala, y 4 (40%) del Punto 2 Tlaxcala.

En total se obtuvieron 37 aislados de las especies de interés. La Figura 11 muestra la distribución de estos aislados en los puntos de muestreo. De acuerdo con los resultados se determinó que la mayoría de los aislados de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter spp.* se obtuvieron en los puntos de Tlaxcala, mientras que para *Pseudomonas aeruginosa*, el 50% de las muestras se recuperaron de esta misma región.

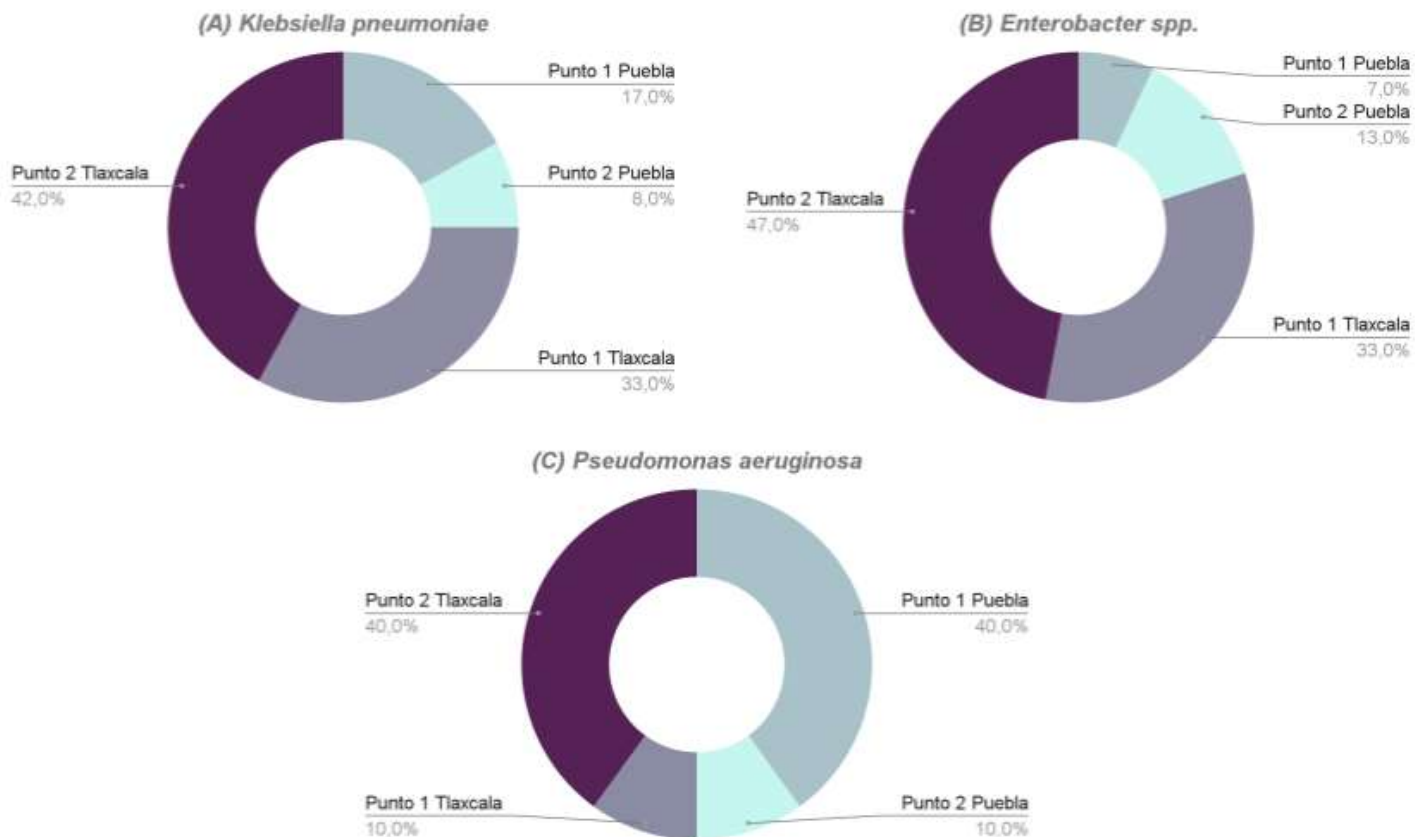


Figura 11. Porcentaje de detección de (A) *Klebsiella pneumoniae*, (B) *Enterobacter spp.* y (C) *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas de los puntos de muestreo.

Al clasificar los resultados de acuerdo con su matriz se obtuvieron un total de 21 aislados de muestras de agua, y 16 aislados de muestras de sedimento. De los 12 aislados de *Klebsiella pneumoniae*, 6 (50%) provenían de agua y 6 (50%) de sedimentos. Para *Enterobacter spp.*, de los 15 aislados, 10 (67%) se obtuvieron de agua y 5 (33%) de sedimentos. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, de los 10 aislados, 5 (50%) correspondieron a muestras de agua y 5 (50%) a sedimentos. La Figura 12 presenta la distribución de los aislados de muestras de agua y sedimento para cada especie bacteriana, categorizados por punto de muestreo.

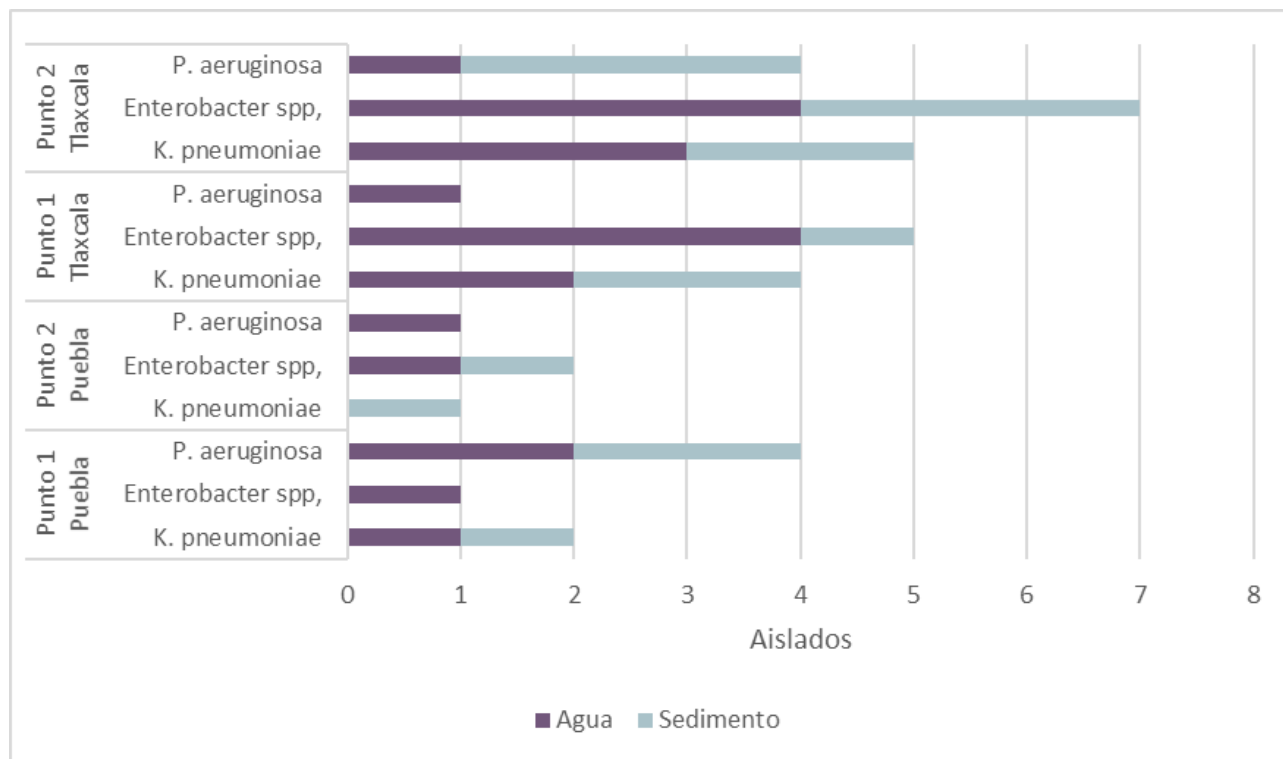


Figura 12. Distribución de aislados en muestras de agua y sedimentos.

Diseño de cebadores

La secuencia de los genes seleccionados para el diseño de cebadores se obtuvo de la base de datos del NCBI. A partir de estas secuencias, se utilizó la herramienta Primer-BLAST para generar diferentes pares de cebadores para cada gen. La selección de los cebadores se basó en los siguientes parámetros: longitud de 18 a 25 nucleótidos, contenido de citosina-guanina (GC) entre 40 % y 60 %, temperatura de alineamiento entre 55 °C y 70 °C (con una diferencia menor a 5 °C entre ambos cebadores), tamaño del amplicón, especificidad, ausencia de estructuras secundarias como horquillas, y prevención de secuencias homopoliméricas. Para la verificación de estos criterios, se emplearon los softwares OligoAnalyzer™ Tool de Integrated DNA Technologies (IDT) y Blastn del NCBI. Los cebadores seleccionados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Cebadores para detección de especies de interés.

Especie	Gen	Secuencia (5'-3')	Amplicón (nt)	Tm (°C)	Referencia
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPHS_18810	(F) GTAGGGCATTGGCTTCCAGA	245	65.0	Humberto <i>et al.</i> , 2022
		(R) ATTCCGGGCTTTCTGTCTC			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	phzM	(F) CTTTTTCCCGTTTCGCGGTTG	184	64.9	Sarkar, 2020
		(R) GACGCTGCTCACCTGATGTA			
<i>Enterobacter spp.</i>	fimH	(F) GGTAACGCGGTGTGTCCTA	334	64.4	Davin-Regli <i>et al.</i> , 2019
		(R) CGATGTCGTGACGTAACGC			

Klebsiella pneumoniae

```

>NC_016845.1:c1952486-1951866 Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286
  chromosome, complete genome

TTGGCCGAACGTACCGGCTAATTATTCCTAACCCTAACCCTGATGGCGCAGGTCAACGCG
CAGATGAGACCACTCTTAGTAACTACCGGATGGGTTTCATATTGGCCTGAATATCAGCGTGT
CACATATTAACGCGCCGACGTTTATCGATGACTGCCTGCACTATCAGCGCGGCTTTGAGGGTA
AAGCGGTGAAGCTGATGCTGGAGATCACGGAGCAGGAGCCGCTGTTGCTCAACGGGGCGGTT
GTGGACAAGCTCAATACGTTACACTCCCGCGGGTTTTCCATCGCGCTGGACGACTTTGGCACC
GGCTATTCCGGGCTTTCTGTCTC CACGAGCTGATTTTCGACTATATCAAAATCGATCAGAGTT
TTGTCGGCCGGTAACCGGGGAGCGCCGGCAAGCAAGCTGCTGGACTGCGTGATAGAGAT
GGCGCGGACGCTGCACTGCGCATCATTGCCGAGGGCGTCAAACCGAGGCCCAACGGGATT
ATCTTAATCGCCAGAATATTCATCTGCTGCAGGGCTACTATTCTGGAAGCCAATGCCCTACGT
CGCGCTGGTCATGCTCCTGCTGAGCAAACCGAAGGCGCGGATTGTCGAAGAATAA
  
```

Figura 13. Localización de los cebadores en la secuencia del gen KPHS_18810 (621 nt).

El gen blanco seleccionado para la detección de *Klebsiella pneumoniae* fue Diguanylate phosphodiesterase (KPHS_18810), el cual codifica para una proteína involucrada en la transducción de señales. Estas proteínas actúan como sensores directos de oxígeno y participan en la regulación de procesos celulares mediante la molécula efectora diguanilato cíclico (c-di-GMP, ácido diguanílico bis(3',5')-cíclico) (Humberto *et al.*, 2022). La secuencia del gen (621 nt) fue obtenida de la base de datos del NCBI (Figura 13), y a partir de ella se diseñaron los cebadores correspondientes (Figura 14).

KPHS_18810 diguanylate phosphodiesterase [*Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286*]

Gene ID: 11846897, updated on 17-Dec-2024

Summary

Gene symbol KPHS_18810
Gene description diguanylate phosphodiesterase
Locus tag KPHS_18810
Gene type protein coding
RefSeq status REVIEWED

Organism *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286* (strain: HS11286, sub-species: pneumoniae)
Lineage Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; *Klebsiella*

Genomic context

Sequence: NC_016845.1 (1951866..1952486, complement)

Gene KPHS_18810
 Location: complement(1,951,866..1,952,486)
 Length: 621 nt
 NC_016845.1 position: 1,952,039
 Gene position: 448
 CDS: YP_005226181.1
 Name: diguanylate phosphodiesterase
 Location: complement(1,951,866..1,952,486)
 [Length]
 Spun on NC_016845.1: 621 nt
 Protein length: 206 aa
 [Protein info]
 NC_016845.1 position: 1,952,039
 CDS position: 448
 Protein position: 150
 Protein sequence: AVAKLLDCVIMAR(T)LSRRIAEGVETEA
 Download FASTA: YP_005226181.1

Links & Tools
 GeneID: 11846897 (KPHS_18810)
 BLAST Protein: YP_005226181.1
 FASTA record: YP_005226181.1
 GenBank record: YP_005226181.1
 Graphical View: YP_005226181.1

Figura 14. Información del gen KPHS_18810 en la base de datos del NCBI.

Primer pair 4

	Sequence (5'-3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 2' complementarity
Forward primer	STAGGGCATGGCTTCAGAA	Plus	20	1951923	1951942	59.74	55.00	3.00	2.00
Reverse primer	ATTCGGGCTTTCCTGCTC	Minus	20	1952167	1952148	59.75	55.00	4.00	6.00
Product length	245								

Product on intended target
 +NC_016845.1 *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286* (chromosome, complete genome)

product length = 245
 Forward primer 1 STAGGGCATGGCTTCAGAA 20
 TempLate 1951923 1951942
 Reverse primer 1 ATTCGGGCTTTCCTGCTC 20
 TempLate 1952167 1952148

Figura 15. Resultados del diseño de cebadores en Primer-BLAST.

Con base en los parámetros descritos previamente, se seleccionaron los cebadores correspondientes al Par 4 (Figura 15), los cuales fueron evaluados utilizando el software OligoAnalyzer™ para detectar posibles estructuras secundarias como horquillas y dímeros (Figura 16), así como mediante BLASTn, con el fin de verificar su especificidad (Figura 17).

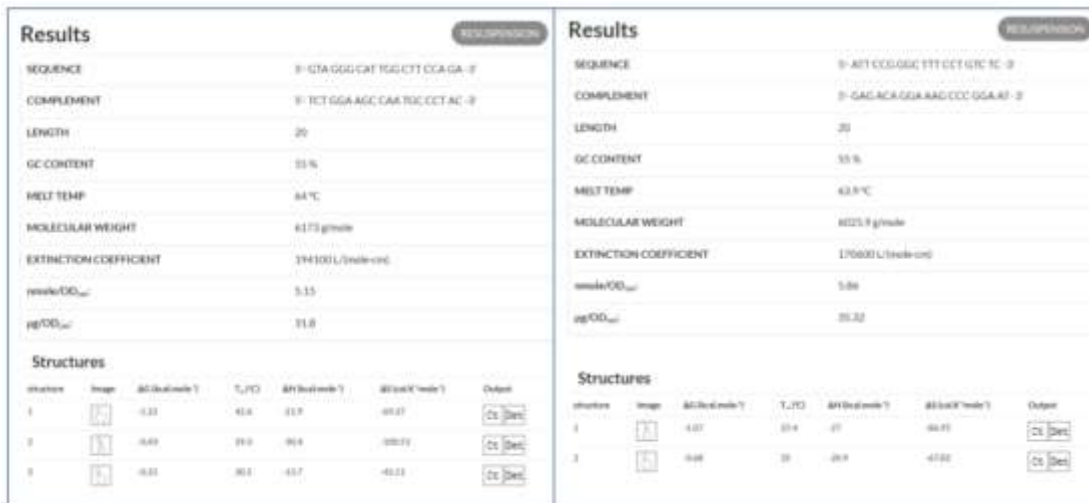


Figura 16. Resultados del análisis de cebadores en OligoAnalyzer™. A la izquierda, cebador forward; a la derecha, cebador reverse.

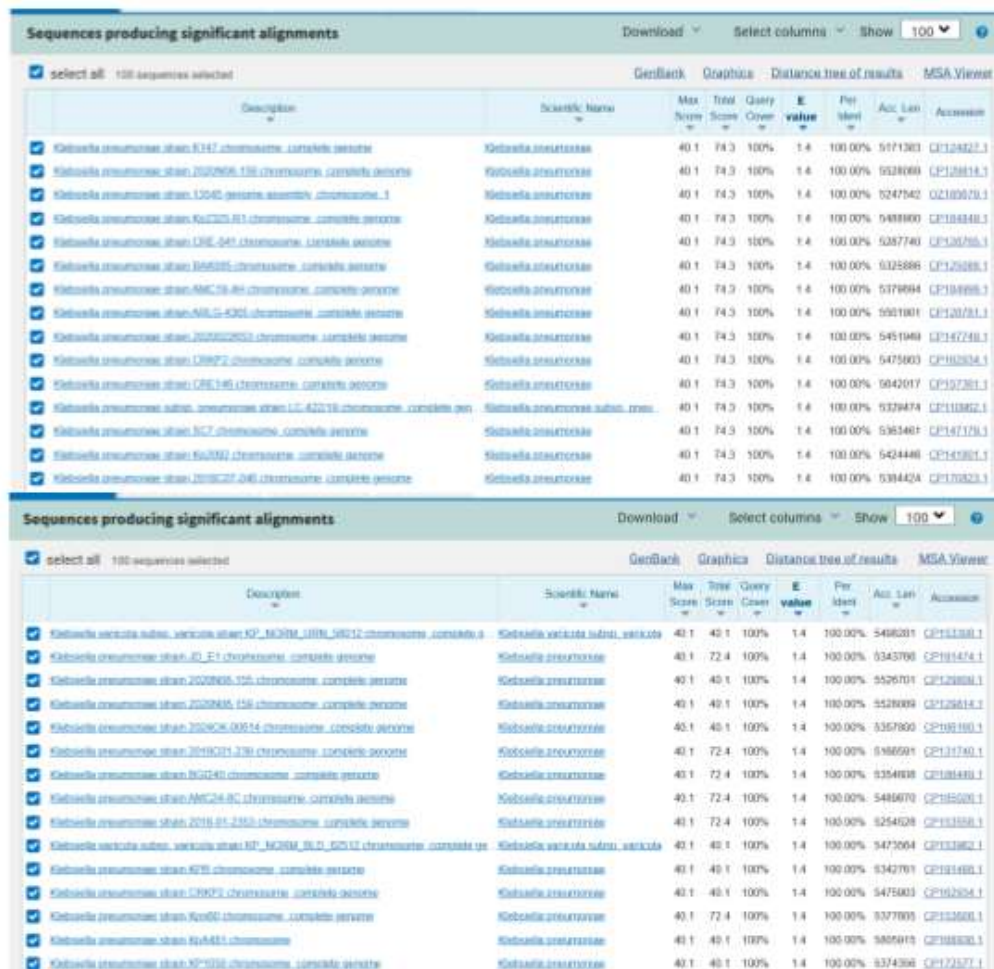


Figura 17. Resultados del análisis de especificidad en BLASTn. Parte superior: cebador forward; parte inferior: cebador reverse.

Enterobacter spp.

```
>NZ_CP081105.1:1389424-1390434 Enterobacter cancerogenus strain JY65 chromosome

ATTCCGCCGGCCCTGCTGGCGCTCGTGGCTGGTAAGCCTCCGGCTACACACGCGCTGGCGACGGTGTGTGTA
ATGAAAACGGGGTGCCGACGGATATTTTACGACCTGACCGATACCTTAAACAGCTCAAATAACCAGGTGGGTC
AGATCGTCACGCTGGGTCAGAAATCGCAGTGGGTAGGGTAAACGGGTGTGTCTTAAGGCACAACGGGCAC
CACGACCAAACGCACTATGTGACCCGATTACCCCGACCGCCACCATCGATGGCTACAAGTATCTTAACTGAA
TGACTACCTCGACGGCGCGATGAAGATAACCGACAGCTATGCCGGGCTCTTTATCCTCCGCAAAATTTATCCA
GATGGGTAGCCACCCTAACGTGGCTAAAATAAGCCGTTTCCGGTTAAGGACTCCAACCTGGTGTTCGGGCTCA
AGGTGACGCGCCGCTTCATCAATATGGTGGAGATCCCGCGTGAGACGATGTTCAAGCGTTTACGTCACGACATCG
TCGTCGGACCCCATCAACGGTACACCGGCTATACCATCAGCTACAGCGGTACCATTACGGTGCCCCAGAGCTG
CGCCATTAACGCAGGGCAAATTGTGGAATTTGACTTCGGCGATATTGGCGCGTCCGCTGTTCCAGCCAGGCGGGG
CAGGCAACCGGCCGCAAAAGGTTTCGCCCCAGAGCAAAACCGTTGCCATTAATGCACCAACGTTGAGGCGAAG
GCCTACCTGACGATGCGTATCGAAGCGGATAGCGGCAGCGTGAACGGTAAATGCTGGTGTCCGACAACAAGGA
CGTGGGGTTTATCATTGCCAACGACAGCGGTACGCCGTTAACGCCCTAACAGCCTGAGCAGCAAAATACCGTTCC
GTCTGGACGACAACGCGCAGGGCGAGGTGGGGATCCGGGCTGGCCGGTAAGCGTGACGGGCAATAAACCGAG
CGGAAGGCCGCTTACCTCGCGCGGTTATCTGCGCGTGGATTACGATTAA
```

Figura 18. Localización de los cebadores en la secuencia del gen FimH (1011 nt).

El gen seleccionado para la detección de *Enterobacter spp.* fue Type 1 fimbria D-mannose specific adhesin (FimH), el cual codifica una adhesina asociada a las fimbrias tipo 1, estructuras implicadas en la adhesión bacteriana a superficies y tejidos del hospedero (Davin-Regli *et al.*, 2019). La secuencia del gen (1011 nt) fue obtenida de la base de datos del NCBI (Figura 18), y a partir de ella se diseñaron los cebadores correspondientes (Figura 19).

Gene symbol: fimH
Gene description: type 1 fimbria D-mannose specific adhesin FimH
Locus tag: K3775_RS06495
Gene type: protein coding
Organism: Enterobacter cancerogenus (strain JY65; nat-boal; Suaeda salsa)
Lineage: Bacteria; Pseudomonadota; Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Enterobacter; Enterobacteriaceae complex

Gene: fimH
Location: 1,389,424..1,390,434
Length: 1,011 nt
NZ_CP081105.1 position: 1,390,174
Gene position: 751
CDS: WP_22071452.1
Name: type 1 fimbria D-mannose specific adhesin FimH
Location: 1,389,424..1,390,434
Length: 1,011 nt
Span on NZ_CP081105.1: 1,011 nt
Protein length: 336 aa
NZ_CP081105.1 position: 1,390,174
CDS position: 751
Protein position: 251
Protein sequence: TVAIRCTNVEAMAVLTPHREADQSSVNGNH
Download FASTA: WP_22071452.1

Figura 19. Información del gen FimH en la base de datos del NCBI.

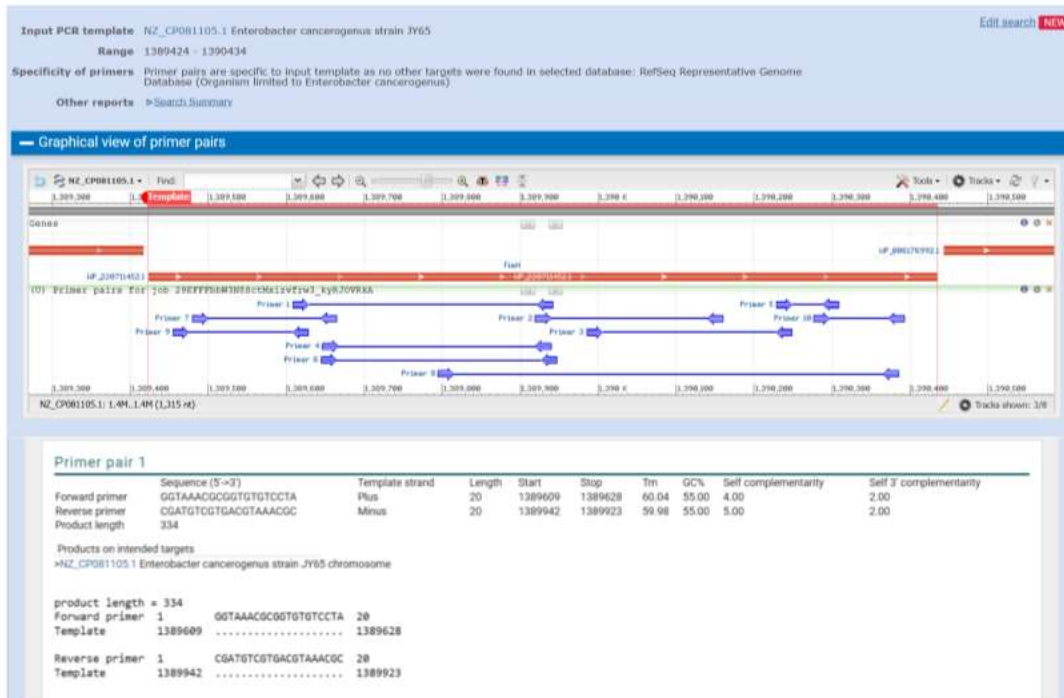


Figura 20. Resultados del diseño de cebadores en Primer-BLAST.

Con base en los parámetros descritos previamente, se seleccionaron los cebadores correspondientes al Par 1 (Figura 20), los cuales fueron evaluados utilizando el software OligoAnalyzer™ para detectar posibles estructuras secundarias como horquillas y dímeros (Figura 21), así como mediante BLASTn, con el fin de verificar su especificidad (Figura 22).



Figura 21. Resultados del análisis de cebadores en OligoAnalyzer™. A la izquierda, cebador forward; a la derecha, cebador reverse.

Sequences producing significant alignments

Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Pos. Ident	Accession
Enterobacter cloacae sensu stricto 3.2.37 chromosome, complete genome	Enterobacter.ca	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	466754	CP124481.1
Enterobacter cloacae sensu stricto GDE33 chromosome, complete genome	Enterobacter.ca	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	4798310	CP125223.1
Enterobacter cloacae sensu stricto F3AAGG05.1428 chromosome, complete genome	Enterobacter.ca	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	4821734	CP127280.1
Enterobacter cloacae sensu stricto Q7Y55-028 chromosome, complete genome	Enterobacter.ca	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	4897787	CP127277.1
Enterobacter cloacae sensu stricto MY7 chromosome, complete genome	Enterobacter.ca	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	4893729	CP134339.1
Enterobacter cloacae sensu stricto Y58 chromosome	Enterobacter.ca	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	4736664	CP101105.1
Enterobacter cloacae sensu stricto PNEC1 chromosome, complete genome	Enterobacter.ca	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	4991561	CP133230.1
Enterobacter cloacae sensu stricto UFC1 genome assembly chromosome, UFC1	Enterobacter.ca	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	4915001	LS881026.1
MSL_Sarschanka_bananae strain 7260168.654-647a-8604.6023866892_sensu stricto sensu, chro	Sarschanka.ms	36.2	36.2	100%	22	100.00%	7066116	CP220372.1
PREDICTED Arabidopsis thaliana, beta (1) locust bean derived protein LOC814440, transcri	Arabidopsis.tha	36.2	36.2	100%	22	100.00%	1209	XM_001020912.1
PREDICTED Arabidopsis thaliana, beta (1) locust bean derived protein LOC814440, transcri	Arabidopsis.tha	36.2	36.2	100%	22	100.00%	1359	XM_011070011.1
PREDICTED Arabidopsis thaliana, beta (1) locust bean derived protein LOC814440, transcri	Arabidopsis.tha	36.2	36.2	100%	22	100.00%	1103	XM_011020911.1
Musclepobacter sp. KACC 22003 chromosome, complete genome	Musclepobacte	36.2	36.2	100%	22	100.00%	4899148	CP117811.1
PREDICTED Arabidopsis thaliana, beta (1) locust bean derived protein LOC814440, transcri	Arabidopsis.tha	36.2	36.2	100%	22	100.00%	1172	XM_001020912.1

Sequences producing significant alignments

Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Pos. Ident	Accession
Enterobacter cloacae sensu stricto Y58 chromosome	Enterobacter.ca	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	4736664	CP101105.1
Enterobacter cloacae sensu stricto 3.2.37 chromosome, complete genome	Enterobacter.ca	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	466754	CP124481.1
Enterobacter cloacae sensu stricto J25 Ed1 chromosome, complete genome	Enterobacter.ca	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	4798312	CP125223.1
Enterobacter cloacae sensu stricto PNEC1 chromosome, complete genome	Enterobacter.ca	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	4991561	CP133230.1
Enterobacter cloacae sensu stricto F3AAGG05.1428 chromosome, complete genome	Enterobacter.ca	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	4821734	CP127280.1
Enterobacter cloacae sensu stricto Q7Y55-028 chromosome, complete genome	Enterobacter.ca	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	4897787	CP127277.1
Enterobacter cloacae sensu stricto UFC1 genome assembly chromosome, UFC1	Enterobacter.ca	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	4915001	LS881026.1
Enterobacter cloacae sensu stricto MY7 chromosome, complete genome	Enterobacter.ca	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	4893729	CP134339.1
Trichostema aureum, isolated GGC2 and GGC3 isolates (Str. 88134) genome, complete chr	Trichostema.aure	36.2	36.2	100%	22	100.00%	3240	XM_001020912.1
Wentobacter sp. M8162 chromosome, complete genome	Wentobacter.sp	34.2	34.2	100%	86	100.00%	4227153	CP127892.1
PREDICTED Arabidopsis thaliana, beta (1) locust bean derived protein LOC814440, transcri	Arabidopsis.tha	34.2	34.2	100%	86	100.00%	2242	XM_001020912.1
PREDICTED Arabidopsis thaliana, beta (1) locust bean derived protein LOC814440, transcri	Arabidopsis.tha	34.2	34.2	100%	86	100.00%	2654	XM_001020912.1
PREDICTED Arabidopsis thaliana, beta (1) locust bean derived protein LOC814440, transcri	Arabidopsis.tha	34.2	34.2	100%	86	100.00%	2656	XM_001020912.1
W32_Musclepobacter adhensis strain 77837131.1016-1017-1018-1019 genome assembly chr	Wentobacter.sp	34.2	34.2	100%	86	100.00%	4416661	CP235925.1
Nereocya sp. CC101228 chromosome, complete genome	Nereocya.sp.c	34.2	34.2	100%	86	100.00%	2057571	CP101228.1

Figura 22. Resultados del análisis de especificidad en BLASTn. Parte superior: cebador forward; parte inferior: cebador reverse.

Pseudomonas eruginosa

```

->NZ_CP020560.1:c748492-747284 Pseudomonas parseruginosa strain Cr1 chromosome, complete genome
ATGAGCGAACCATCGATATCCTCATCGCCGGCGCCGGCCATCGGGCGCCTCAGTTGCGCCCTGGCCCTGCACCAGGCC
GGCATCGGCAAGGTACGCTGCTGGAAAGCAGCAGCGAGATACGCCCCCTCGGGCTCGGCATCAATATCCAGCCGGCG
GCGGTGAGGGCCCTCGCCGAACCTGGGCTCGGGCCGGCGCTGGCGGCAACCGCCATCCCACCCACGAGTTGCGGCTA
CATCGACCAGAGCGGGCGCCACGGTGTGGTCCGAGCCGCGCGGGGTGGAAGCCGGCAACGCCTATCCGCAGTACTCCAT
TCACCCGCGGGAACCTGCAGATGATCCTGCTCGCCCGGGTGGCGGAADGCCTCGGCCAACAGGGCGGTACGCACCGGCCCT
CGGCGTGGAGCGCATCGAGGAGCAGCAGCGCCCGCTGATCGGTGCCCGGACGGACAGCGCAAGCCCCAGGGCGC
TCGGTGGCGATGTGCTGGTGGCGCCGATGGCATCCATTCGAAGGTGGCGCGCACCTGCATCCCGACCGAGGGCCGCG
TGTCCATGGTGGGATCACCATGTGGCGCGGGCTCACCAGTTGACCCGCTTCTCGACGGCAAGACCATGATCGTCGC
CAACGAGGACCATGGTGGCCCTGGTGGCTACCCATCTCGCCGGCCACGGCGCCGAAGGCAAGTCGGTGGTGA
CTGGGTGTGCATGGTGGCGAGCGCCGCCGCTGGCCAGCTCGAACAGGCGGACTGGAACCTGACGGCCGCTGG
AAGACGTGCTGCCGTTCTCGCCGACTGGGADCTGGGCTGGTTGACATCCGGGACCTGCTGACCCGCAACCAGTTGAT
CCTGCAGTACCCGATGGTCGACCGGATCCGCTGCCGCACTGGGGCCGGGACGATCACCTGCTCGGCAGCGCTGC
TCACCTGATGTA)CCGATGGGCGCAACGGCGCCTCGCAGGGGATCCTCGACGGCATCGAGCTGGCCGCCGTTGGC
GCGCAACGCCGACGTGGCCGGGGCCCTGCGCAATACGAGGAGCCGGCGGGCGATGGCCAACAAGATCATCTGG
CCAACCGCAACGGGAAAAAGAGGAATGGGCCGCTGCTCGGGCCGAAAACCGAGAAGAGCGCGGCGCTGGAGGGC
ATCACCGGCGAGCTACCGCAACCGAGTGGAAACGGCCGGCGTAG

```

Figura 23. Localización de los cebadores en la secuencia del gen PhzM (1209 nt).

El gen seleccionado para la detección de *Pseudomonas aeruginosa* fue pyocyanin biosynthetic protein (phzM), el cual participa en la biosíntesis de pirocianina, un metabolito secundario clave en la interacción con la superficie de las células bacterianas, así como en interacciones fisicoquímicas entre comunidades microbianas. Esta molécula puede difundirse fácilmente a través de la membrana de la célula huésped y provocar reacciones redox con otras moléculas intracelulares (Sarkar, 2020). La secuencia del gen (1209 nt) fue obtenida de la base de datos del NCBI (Figura 23), y a partir de ella se diseñaron los cebadores correspondientes (Figura 24).

phzM pyocyanin biosynthetic protein PhzM [*Pseudomonas paraeruginosa*]
Gene ID: 77219246, updated on 12-Dec-2024

Summary

Gene symbol: phzM
Gene description: pyocyanin biosynthetic protein PhzM
Locus tag: B7D75_RS03660
Gene type: protein coding
Organism: *Pseudomonas paraeruginosa* (strain Cr1)
Lineage: Bacteria; Pseudomonadati; Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; *Pseudomonas*
Old locus tag: B7D75_03660

Genomic context

General information

Gene: phzM
Location: complement(747,284..748,492)
Length: 1,209 nt
NZ_CP020560.1 position: 747,452
Gene position: 1,041
eMdb locus tag: B7D75_03660
CDS: WP_107113744.1
Name: pyocyanin biosynthetic protein PhzM
Location: complement(747,284..748,492)
Span on NZ_CP020560.1: 1,209 nt
Protein length: 402 aa
Protein info: WP_107113744.1
NZ_CP020560.1 position: 747,452
CDS position: 1,041
Protein position: 347
Protein sequence: ELAALARNADVAG(L)REYEAAGPMARK
Inferences: COORDINATES: similar to AA sequence:RefSeq:NP_252907.1

Figura 24. Información del gen pzhM en la base de datos del NCBI.

Input PCR template: NZ_CP020560.1 *Pseudomonas paraeruginosa* strain Cr1
Range: 747284 - 748492
Specificity of primers: Primer pairs are specific to input template as no other targets were found in selected database: RefSeq Representative Genome Database (Organism limited to *Pseudomonas paraeruginosa*)
Other reports: Search Summary

Graphical view of primer pairs

Primer 1: 5'-CTTTTCCCGTTCCGCGTTG-3' (Forward)
Primer 2: 3'-GACGCTGCTCACCTGATGTA-5' (Reverse)
Primer 3: 5'-GACGCTGCTCACCTGATGTA-3' (Forward)
Primer 4: 3'-CTTTTCCCGTTCCGCGTTG-5' (Reverse)

Primer pair 1

Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	Plus	20	747382	747401	60.66	55.00	4.00	0.00
Reverse primer	Minus	20	747565	747546	59.83	55.00	4.00	2.00

Products on intended targets
-NZ_CP020560.1 *Pseudomonas paraeruginosa* strain Cr1 chromosome, complete genome

product length = 184
Forward primer 1 CTTTTCCCGTTCCGCGTTG 20
Template 747382 747401
Reverse primer 1 GACGCTGCTCACCTGATGTA 20
Template 747565 747546

Figura 25. Resultados del diseño de cebadores en Primer-BLAST.

Con base en los parámetros descritos previamente, se seleccionaron los cebadores correspondientes al Par DD (Figura 25), los cuales fueron evaluados utilizando el software OligoAnalyzer™ para detectar posibles estructuras secundarias como horquillas y dímeros (Figura 26), así como mediante BLASTn, con el fin de verificar su especificidad (Figura 27).



Figura 26. Resultados del análisis de cebadores en OligoAnalyzer™. A la izquierda, cebador forward; a la derecha, cebador reverse.

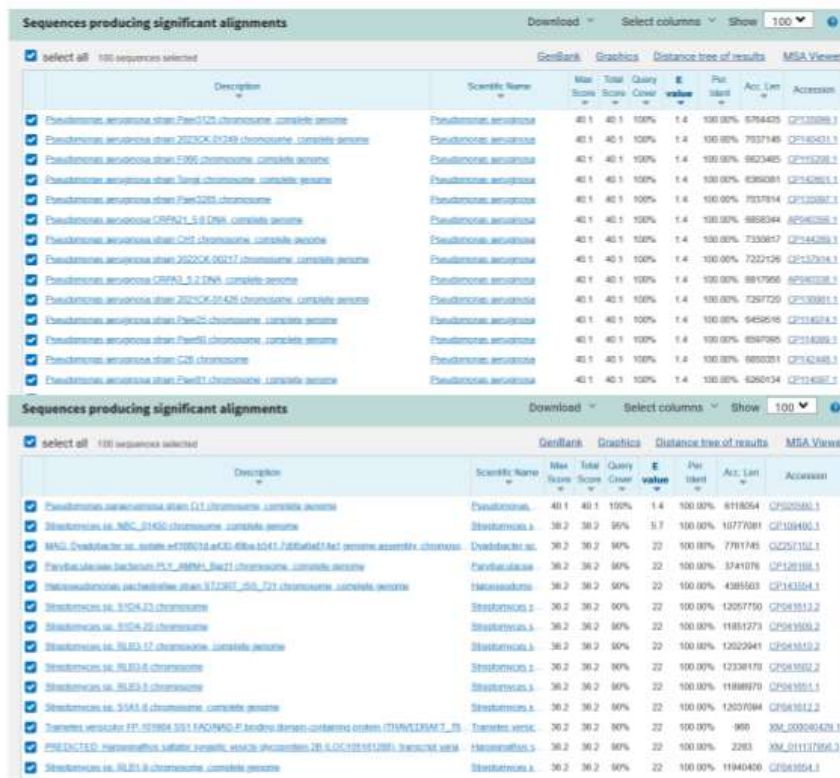


Figura 27. Resultados del análisis de especificidad en BLASTn. Parte superior: cebador forward; parte inferior: cebador reverse.

Extracción de ADN

Para confirmar la eficiencia del método de extracción, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se transfirieron 12 μ L de cada muestra de ADN al gel, y la corrida se llevó a cabo durante 80 minutos a 70 V en una solución tampón TAE 1X (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético glacial, 2.0 mM EDTA; pH 8.3). Posteriormente, el gel fue teñido con bromuro de etidio y las bandas de ADN se visualizaron bajo luz ultravioleta mediante un transiluminador. En la Figura 28 se muestran los resultados de la extracción de ADN de *Klebsiella pneumoniae*.

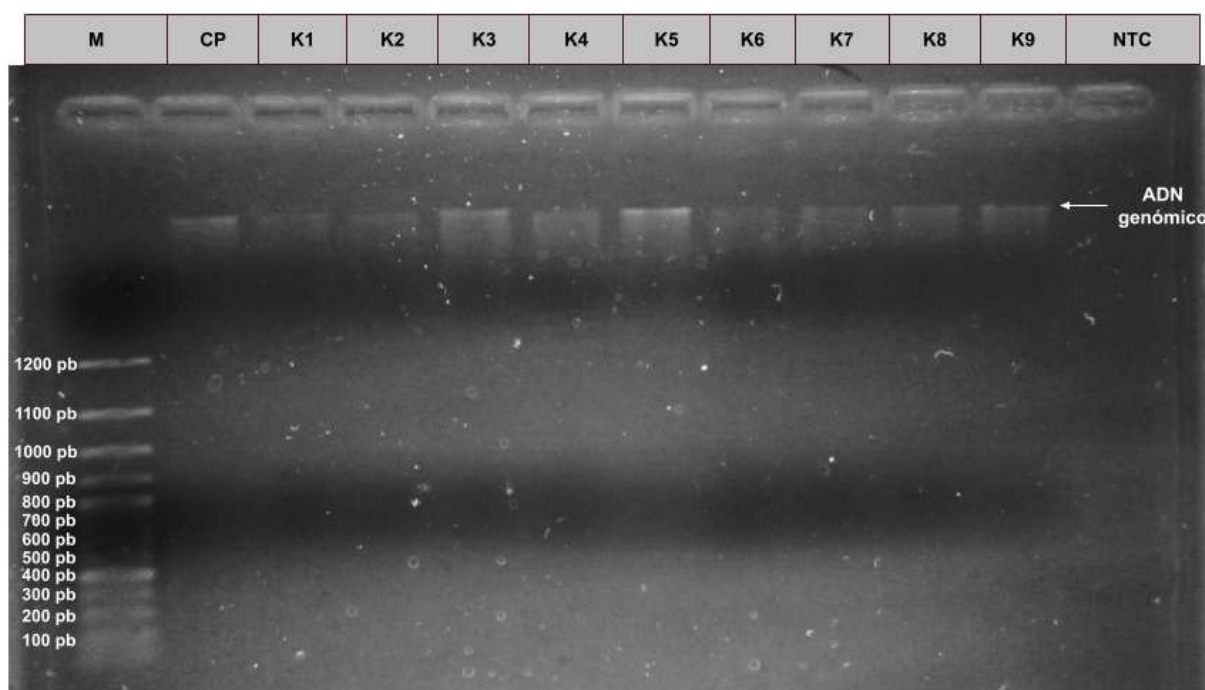


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa para confirmar la extracción de ADN. El carril M corresponde a una escalera de peso molecular de 100 pares de bases (pb). Los carriles K1-K9 contienen muestras de ADN bacteriano de aislados de *K. pneumoniae*. El carril CP es el control positivo con la cepa tipo ATCC 7603 de *Klebsiella pneumoniae*. El carril NTC es el control negativo sin ADN.

Reacción en Cadena de la Polimerasa

La PCR para *K. pneumoniae* se llevó a cabo bajo las condiciones previamente descritas, con una temperatura de alineamiento (T_m) de 65° C. De los 12 aislamientos presuntivos, se confirmó que 7 (58%) eran *Klebsiella pneumoniae*. Las Figuras 29 y 30 muestran los geles de agarosa de la PCR confirmatoria.

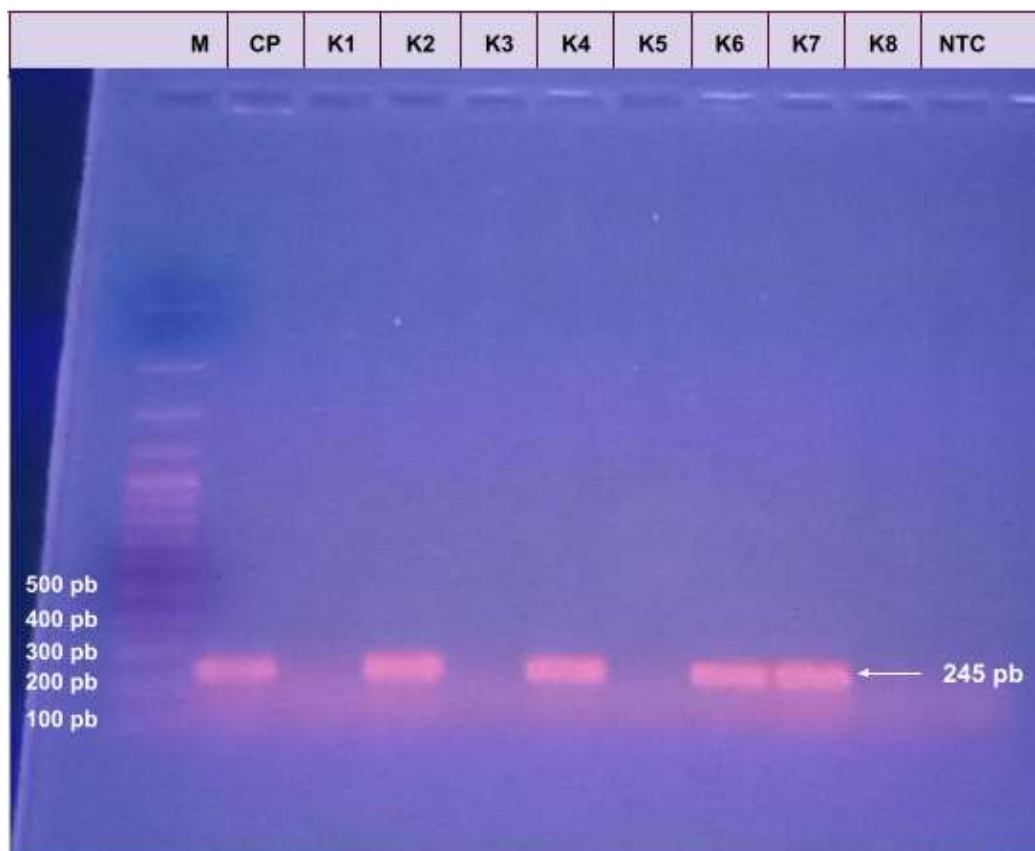


Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa para la confirmación de aislados de *K. pneumoniae*. El carril M corresponde a una escalera de peso molecular de 100 pares de bases (pb). El carril CP es el control positivo con la cepa tipo ATCC 7603 de *Klebsiella pneumoniae*. El carril K1 contiene la muestra L2 1:10; el carril K2 la muestra CR L1 1:10 17.1.24; el carril K3 la muestra A1D 17.1.24; el carril K4 la muestra A42D 17.1.24; el carril K5 la muestra M A1 1:100 17.1.24; el carril K6 la muestra CB L1 1:110 17.1.24; el carril K7 la muestra RA2 1:100 17.1.24; y el carril K8 la muestra BL2D 17.1.24. El carril NTC es el control negativo (sin ADN).

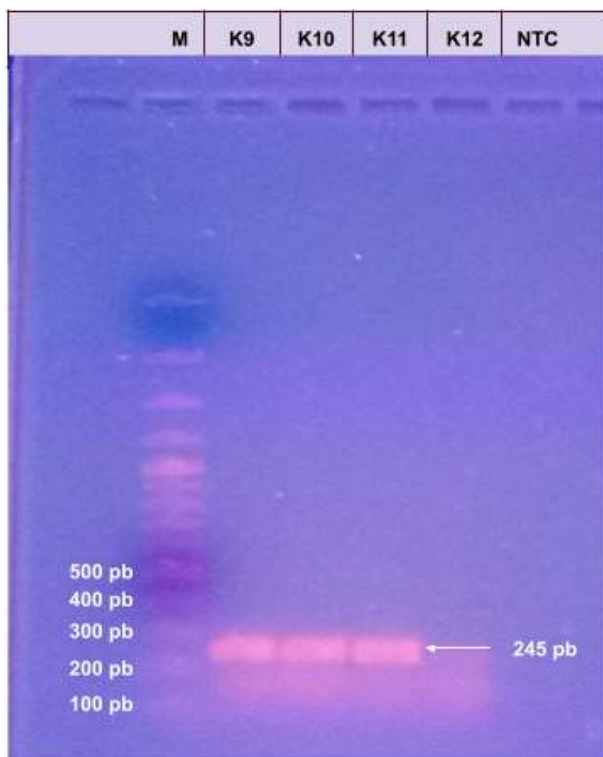


Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa para la confirmación de aislados de *K. pneumoniae*. El carril M corresponde a una escalera de peso molecular de 100 pares de bases (pb). El carril K9 contiene la muestra SL2 1:100 17.1.24; el carril K10 la muestra CB A2 1:10 17.1.24; el carril K11 la muestra P1 1:100 A5R; y el carril K12 la muestra P2 1:10 L5 R. El carril CN es el control negativo (sin ADN).

Pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

Tomando como referencia las medidas de los halos de inhibición y de acuerdo con los lineamientos de los fabricantes, los resultados se registraron como Sensible (S), Intermedio (I) o Resistente (R).

Klebsiella pneumoniae

Se evaluó el perfil de susceptibilidad a antimicrobianos de 12 aislados de *Klebsiella pneumoniae* frente a 13 antibióticos pertenecientes a siete familias de antimicrobianos. Todos los aislados (100 %) mostraron resistencia a los antibióticos analizados. El perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados de *Klebsiella pneumoniae* se muestran en la Tabla 3 y la Figura 31 muestra el patrón de resistencia de estos aislados de acuerdo con los puntos de muestreo.

Tabla 3. Perfil antimicrobiano de los aislados de *K. pneumoniae*.

Muestra	AK	GE	NET	CF	CFX	CTZ	CPF	NOF	AM	CB	STX	CL	NF
Punto 1 Puebla													
P1 1:100 A5R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
L2 1:10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Punto 2 Puebla													
P2 1:10 L5R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Punto 1 Tlaxcala													
M A1 1:100 17.1.24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A1D 17.1.24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CB L1 1:10 17.1.24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CR L1 1:10 17.1.24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Punto 2 Tlaxcala													
CB A2 1:10 17.1.24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A42D 17.1.24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
R A2 1:100 17.1.24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
BL2D 17.1.24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
SL2 1:100 17.1.24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

*amikacina (AK), gentamicina (GE), netilmicina (NET), cefalotina (CF), cefotaxima (CFX), ceftazidima (CTZ), ciprofloxacina (CPF), norfloxacina (NOF), ampicilina (AM), carbenicilina (CB), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT), cloranfenicol (CL) y nitrofurantoína (NF). Los resultados se registraron como Resistente (R).

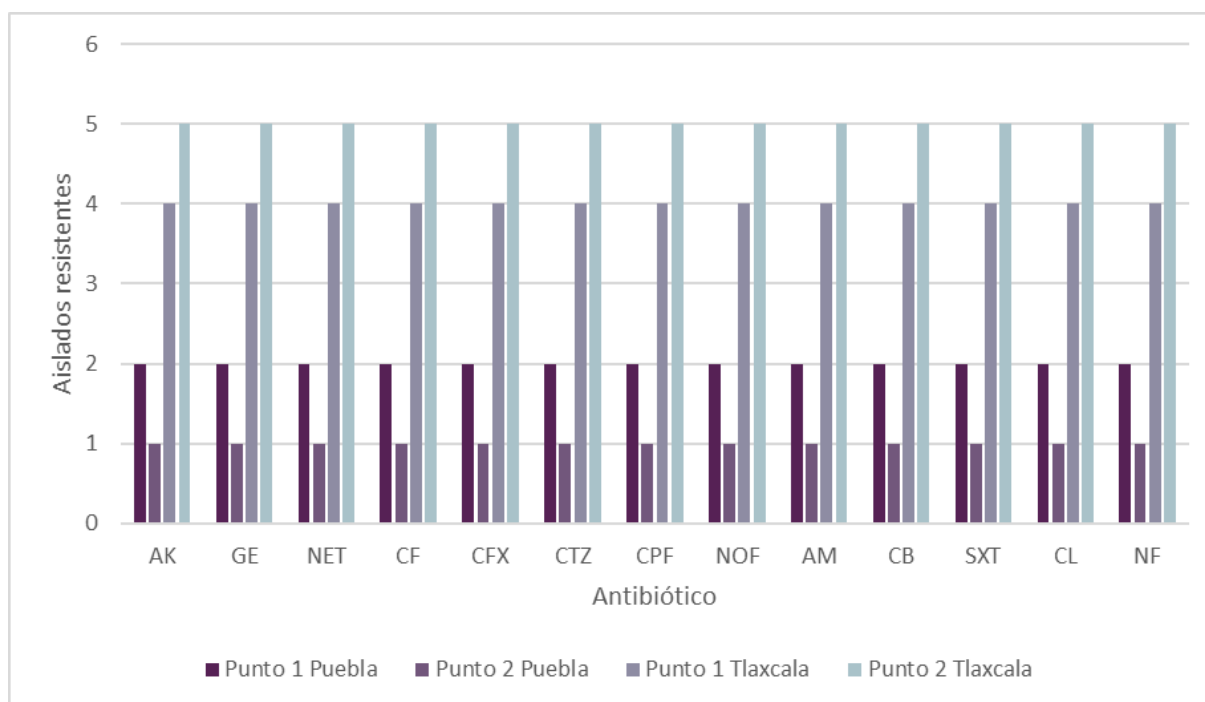


Figura 31. Patrón de resistencia de aislados de *K. pneumoniae* de acuerdo con los puntos de muestreo.

Para determinar el índice de resistencia a múltiples antibióticos (IRMA) se calculó como la razón entre el número de antibióticos a los que el aislado de *K. pneumoniae* fue resistente y el número total de antibióticos probados para dicho aislado. La tabla 4 muestra los resultados del IRMA para *Klebsiella pneumoniae*.

Tabla 4. Índice de resistencia a múltiples antibióticos de *Klebsiella pneumoniae*.

Muestra	Resistencia presentada	Antibióticos empleados	IRMA
Punto 1 Puebla			
P1 1:100 A5R	13	13	1
L2 1:10	13	13	1
Punto 2 Puebla			
P2 1:10 L5R	13	13	1
Punto 1 Tlaxcala			
M A1 1:100 17.1.24	13	13	1
A1D 17.1.24	13	13	1
CB L1 1:10 17.1.24	13	13	1
CR L1 1:10 17.1.24	13	13	1
Punto 2 Tlaxcala			
CB A2 1:10 17.1.24	13	13	1
A42D 17.1.24	13	13	1
R A2 1:100 17.1.24	13	13	1
BL2D 17.1.24	13	13	1
SL2 1:100 17.1.24	13	13	1

De acuerdo con la interpretación del índice de resistencia a múltiples antibióticos valores mayores a 0.2 sugieren que el aislado bacteriano proviene de una fuente de alto riesgo de contaminación, donde hay un uso frecuente o extensivo de antibióticos. Para el caso de los 12 aislados de *Klebsiella pneumoniae* se obtuvo un valor IRMA de 1, lo que sugiere que el río Atoyac tiene las condiciones de ser una fuente de contaminación de *Enterobacterias* multirresistentes.

Enterobacter spp.

Para *Enterobacter spp.*, se evaluó el perfil de susceptibilidad de 15 aislados frente a 13 antibióticos pertenecientes a siete familias. Los aislados mostraron una alta

tasa de resistencia del 100% a gentamicina, cefalotina y ampicilina. Además, se registró una variable de resistencia a otros antibióticos: amikacina (93 %), nitrofurantoína (93 %), netilmicina (87 %), ciprofloxacina (87 %), carbenicilina (87 %), sulfametoxazol-trimetoprim (87 %), cloranfenicol (87 %), norfloxacina (80 %), cefotaxima (73 %) y ceftazidima (73 %). Once aislados (73 %) fueron resistentes a todos los antibióticos analizados.

El perfil de sensibilidad antimicrobiana de los aislados de *Enterobacter spp.* se muestran en la tabla 5 y la Figura 32 presenta el patrón de resistencia de estos aislados de acuerdo con los puntos de muestreo.

Tabla 5. Perfil antimicrobiano de *Enterobacter spp.*

Muestra	AK	GE	NET	CF	CFX	CTZ	CPF	NOF	AM	CB	SXT	CL	NF
Punto 1 Puebla													
A1 1:10	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R
Punto 2 Puebla													
P2 1:100 L5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
P2D A5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Punto 1 Tlaxcala													
A1-1 CB	R	R	R	R	I	S	R	S	R	R	R	R	R
P A1 1:100 17.1.24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S L1 1:100 17.1.24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
R A1 1:100 17.1.24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A41 1:10 17.1.24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Punto 2 Tlaxcala													
A2-1 Cr 1	R	R	S	R	S	S	S	S	R	I	S	S	R
A2-1 Cr 2	S	R	S	R	I	S	S	S	R	S	S	S	S
CB A2D 17.1.24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CR L2D 17.1.24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CB A2 1:100 17.1.24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CR L2 1:100 17.1.24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
L2 1:10 17.1.24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

*amikacina (AK), gentamicina (GE), netilmicina (NET), cefalotina (CF), cefotaxima (CFX), ceftazidima (CTZ), ciprofloxacina (CPF), norfloxacina (NOF), ampicilina (AM), carbenicilina (CB), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT), cloranfenicol (CL) y nitrofurantoína (NF). Los resultados se registraron como Sensible (S), Intermedio (I) o Resistente (R).

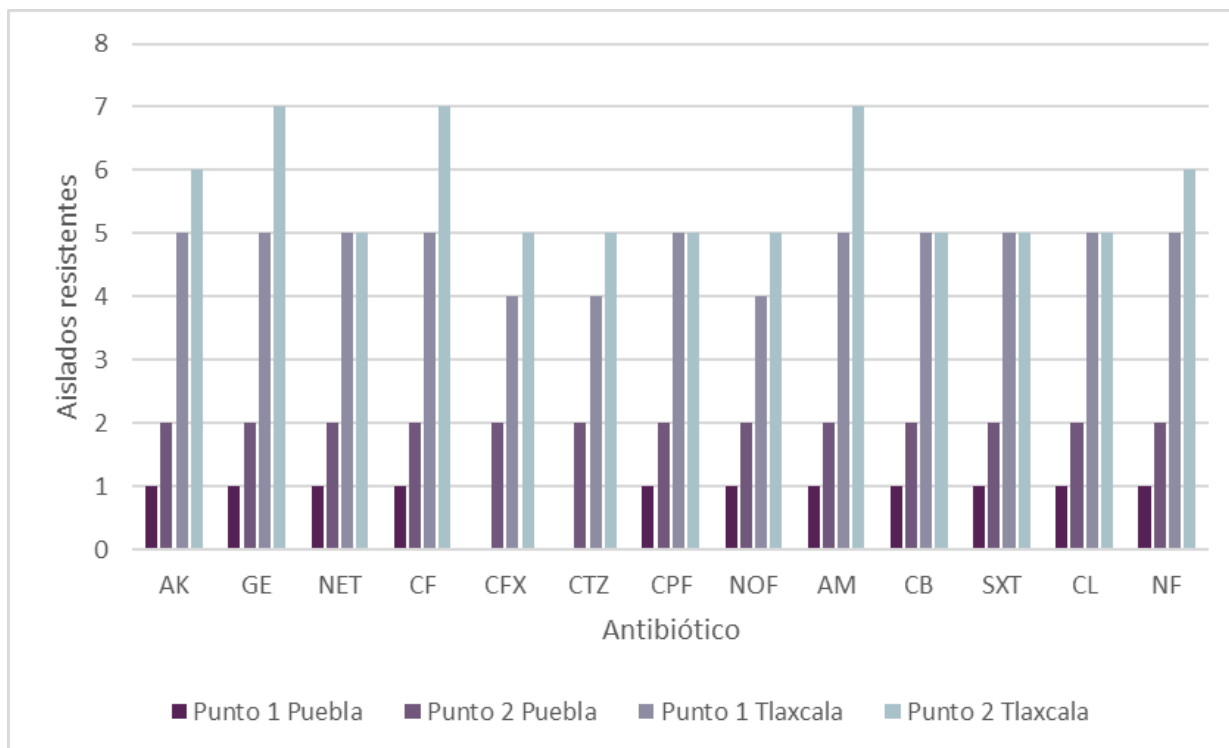


Figura 32. Patrón de resistencia de aislados de *Enterobacter* spp. de acuerdo con los puntos de muestreo.

Para determinar el IRMA de los aislados de *Enterobacter* spp. se calculó como la razón entre los antibióticos a los que un aislado fue resistente y los 13 antibióticos probados. La tabla 6 muestra los resultados del IRMA para *Enterobacter* spp.

Tabla 6. Índice de resistencia a múltiples antibióticos de *Enterobacter* spp.

Muestra	Resistencia presentada	Antibióticos empleados	IRMA
Punto 1 Puebla			
A1 1:10	12	13	0.9
Punto 2 Puebla			
P2 1:100 L5	13	13	1
P2D A5	13	13	1
Punto 1 Tlaxcala			
A1-1 CB	11	13	0.8
P A1 1:100 17.1.24	13	13	1
S L1 1:100 17.1.24	13	13	1
R A1 1:100 17.1.24	13	13	1
A41 1:10 17.1.24	13	13	1

Punto 2 Tlaxcala			
A2-1 Cr 1	6	13	0.4
A2-1 Cr 2	4	13	0.3
CB A2D 17.1.24	13	13	1
CR L2D 17.1.24	13	13	1
CB A2 1:100 17.1.24	13	13	1
CR L2 1:100 17.1.24	13	13	1
L2 1:10 17.1.24	13	13	1

Los 15 aislados de *Enterobacter spp.* mostraron valores de IRMA mayores a 0.2, sugiriendo que los aislados bacterianos provienen de una fuente de alto riesgo de contaminación, donde hay un uso frecuente o extensivo de antibióticos. Para el caso del río Atoyac estos resultados sugieren que en este ecosistema se tienen las condiciones para ser considerado como una fuente de contaminación de *Enterobacterias* multirresistentes.

Pseudomonas aeruginosa

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, se analizaron 10 aislados frente a nueve antibióticos de cinco familias antimicrobianas. Las cepas mostraron una alta tasa de sensibilidad; únicamente dos aislados presentaron resistencia intermedia: uno frente a Ceftazidima y otro frente a Cefepime. El perfil de sensibilidad antimicrobiana de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* se muestran en la tabla 7 y la Figura 33 presenta los patrones de susceptibilidad de todos los aislados de *P. aeruginosa*.

Tabla 7. Perfil antimicrobiano de *P. aeruginosa*.

Muestra	FEP	CTZ	IPM	MEM	AK	CPF	LVX	NOF	TZP
Punto 1 Puebla									
S1-4	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P1D L5	S	I	S	S	S	S	S	S	S
Punto 2 Puebla									
P2 1:10 A5	I	S	S	S	S	S	S	S	S
Punto 1 Tlaxcala									
A1-1	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Punto 2 Tlaxcala									
L2-1 c.v.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L2 1:10	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A2 1:10 17.1.24	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L2D 17.1.24	S	S	S	S	S	S	S	S	S

*cefepime (FEP), ceftazidima (CTZ), imipenem (IPM), meropenem (MEM), amikacina (AK), ciprofloxacina (CPF), levofloxacina (LVX), norfloxacina (NOF) y piperacilina-tazobactam (TZP). Los resultados se registraron como Sensible (S) e Intermedio (I).

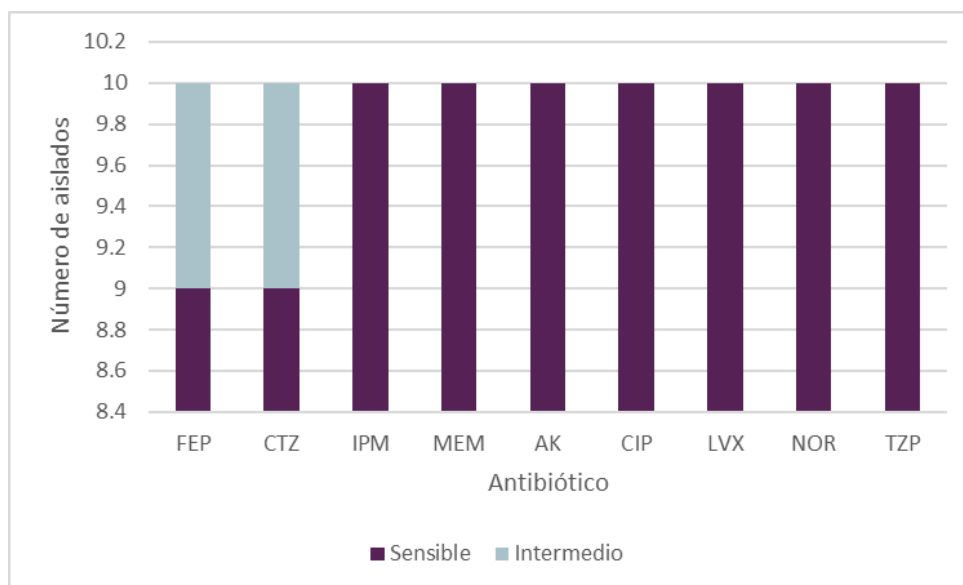


Figura 33. Patrón de susceptibilidad de *P. aeruginosa*.

Para determinar el IRMA de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* se calculó como la razón entre los antibióticos a los que un aislado fue resistente y los 9 antibióticos probados. La tabla 8 muestra los resultados del IRMA para *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla 8. Índice de resistencia a múltiples antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa*.

Muestra	Resistencia presentada	Antibióticos empleados	IRMA
Punto 1 Puebla			
S1-4	0	9	0
1	0	9	0
3	0	9	0
P1D L5	1	9	0.1
Punto 2 Puebla			
P2 1:10 A5	1	9	0.1
Punto 1 Tlaxcala			
A1-1	0	9	0
Punto 2 Tlaxcala			

L2-1 c.v.	0	9	0
L2 1:10	0	9	0
A2 1:10 17.1.24	0	9	0
L2D 17.1.24	0	9	0

Los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* presentaron valores del IRMA inferiores a 0.2. Estos hallazgos sugieren que los aislados provienen de entornos con poca exposición a antibióticos, lo cual, para el río Atoyac, podría significar que la influencia antropogénica no ha impactado considerablemente en *Pseudomonas aeruginosa*.

Aislados multirresistentes

Considerando los criterios para definir la multirresistencia (MDR), que clasifican como multirresistentes a los aislados con resistencia a tres o más clases de antimicrobianos, los resultados revelan que todos los aislados de *Klebsiella pneumoniae* (n = 12) y *Enterobacter spp.* (n = 15) cumplen con esta condición, siendo por lo tanto clasificados como cepas MDR.

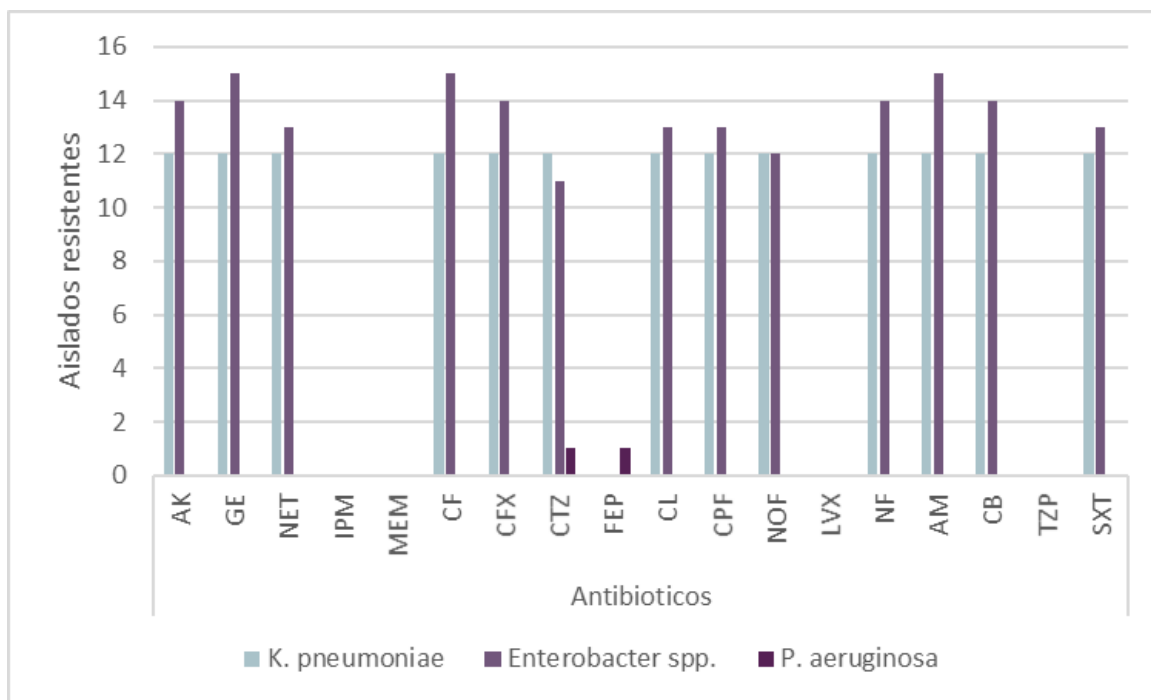


Figura 34. Comparación de resistencia antimicrobiana entre especies. El gráfico representa las cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter spp.* que mostraron resistencia a los antibióticos empleados y las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que mostraron resistencia intermedia a los antibióticos empleados.

La Figura 34 compara la resistencia antimicrobiana entre las especies estudiadas, mostrando la diferencia de resistencia entre *Enterobacterias* (*K. pneumoniae* y *Enterobacter spp.*) y *Pseudomonas aeruginosa*. Todos los aislados de *Klebsiella pneumoniae* exhibieron resistencia a los 13 antibióticos probados. Por su parte, los aislados de *Enterobacter spp.* mostraron variaciones en su resistencia a los antibióticos empleados, pero todos cumplieron con el criterio de multiresistencia. Finalmente, en el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, solo dos aislados presentaron resistencia intermedia a uno de los antibióticos evaluados.

Con la confirmación de los aislados mediante PCR y la evaluación de la sensibilidad antimicrobiana, la información correspondiente a los aislados confirmados de *Klebsiella pneumoniae* se resume en la Tabla 9.

Tabla 9. Información de los aislados confirmados de *Klebsiella pneumoniae*.

Muestra	Tipo de muestra	Punto de muestreo	MDR
P1 1:100 A5R	Agua	Punto 1 Puebla	+
CR L1 1:10 17.1.24	Sedimento	Punto 1 Tlaxcala	+
CB L1 1:10 17.1.24	Sedimento	Punto 1 Tlaxcala	+
A42D 17.1.24	Agua	Punto 2 Tlaxcala	+
RA2 1:100 17.1.124	Agua	Punto 2 Tlaxcala	+
SL2 1:100 17.1.24	Sedimento	Punto 2 Tlaxcala	+
CB A2 1:10 17.1.24	Agua	Punto 2 Tlaxcala	+

Discusión

La emergente diseminación de los patógenos del grupo ESKAPE representa una alarma de salud pública a nivel global. Aunque estos patógenos han sido ampliamente estudiados por su capacidad para causar infecciones severas y su multirresistencia en entornos hospitalarios, su presencia y adaptación en ambientes naturales son cada vez más evidentes.

En diferentes países estudios han reportado la presencia del grupo ESKAPE en cuerpos de agua; En Líbano se realizó un estudio en donde se recolectaron muestras de agua en los principales ríos del país para identificar y determinar la multirresistencia en bacterias. Los resultados mostraron la presencia de bacterias en aguas superficiales y el aumento de la propagación de genes de resistencia como consecuencia por la continua y creciente movilidad poblacional en el país y la falta generalizada de tratamiento de aguas residuales (Moussa *et al.*, 2021). Esta última parte se confirma con estudios realizados en España que han evidenciado como las plantas tratadoras de agua tienen un rol importante como reservorios para la diseminación de bacterias multirresistentes en el ambiente (Pino-Hurtado *et al.*, 2024). Incluso, la preocupación por la presencia de estas bacterias en diversos cuerpos de agua ha derivado en estudios como en el río Langat, en Malasia, en donde han estudiado una técnica que permita la rápida detección de ESKAPE y *Enterobacterias* en muestras de agua (Wan Mohtar *et al.*, 2023).

La aparición de bacterias multirresistentes en entornos ambientales es un tema complejo. Aunque ecosistemas como agua y suelos son el entorno natural de especies como las BGN del grupo ESKAPE en estudios como el realizado en Rumania, en donde se analizaron muestras provenientes de plantas tratadoras de aguas residuales que reciben descargas de hospitales, se identificaron aislados que exhiben perfiles de resistencia a múltiples antibióticos (Surleac *et al.*, 2020). Además, un meta-análisis realizado en África identificó que el grupo ESKAPE se distribuyen en diferentes continentes, con variaciones en los porcentajes de prevalencia de cada especie de acuerdo con el entorno (Khasapane *et al.*, 2024).

Estos resultados generan alarma debido a las implicaciones para la salud humana y el medio ambiente. Por lo que para comprender cómo estos microorganismos llegan y se adaptan a los sistemas acuáticos, es esencial adoptar una perspectiva amplia que considere la interacción de actividades humanas (como el uso inadecuado de antibióticos en la salud humana y animal) y el estrés generado por ambientes contaminados. Estos entornos no solo permiten la supervivencia de estas bacterias, sino que también generan las condiciones propicias para su adaptación y el intercambio genético entre diferentes especies bacterianas, actuando como reservorios para la evolución de la resistencia. Por lo tanto, es necesario adaptar las metodologías de muestreo y análisis para obtener información precisa y relevante.

Distribución de aislados en el río Atoyac.

El presente estudio se enfocó en analizar la prevalencia de las bacterias Gram negativas del grupo ESKAPE en el río Atoyac. Un reporte previo de CONAGUA entre 2012 y 2018 registró un promedio de 18,806 NMP/100 mL de coliformes fecales, clasificando al río Atoyac y sus efluentes como “fuertemente contaminados” (CONAGUA, 2021). Adicionalmente, una revisión de 2021 reportó niveles de coliformes totales por encima de 10^{12} NMP/100 mL (Mora *et al.*, 2021). Con base en estos antecedentes se diseñó el presente estudio para obtener una perspectiva general de la distribución de estos microorganismos a lo largo de los diferentes entornos por los que atraviesa este cuerpo de agua.

Para evaluar la influencia de las estaciones en la cantidad de microorganismos, los muestreos se realizaron tanto en temporada de lluvias como de sequía. De acuerdo con los resultados obtenidos para las *Enterobacterias* (*Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter spp.*), se obtuvo una mayor cantidad de aislados durante la temporada seca. Estos datos concuerdan con la investigación que se llevó a cabo en Alemania, pero en agua potable, para identificar organismos resistentes a antibióticos (Voigt *et al.*, 2020); En este estudio se observó una diferencia en la cantidad de bacterias aisladas en los diferentes muestreos. Los autores mencionan que el flujo de agua

generado por las lluvias provoca un mayor movimiento en el río, favoreciendo la dispersión y el desplazamiento de los microorganismos, por lo tanto, durante época de lluvias la cantidad de microorganismos aislados disminuye.

En contraste para *Pseudomonas aeruginosa* los aislados se obtuvieron en su mayoría durante la temporada de lluvias. Este patrón sugiere que las condiciones húmedas de esta estación favorecen los mecanismos de supervivencia y proliferación de esta bacteria. *Pseudomonas aeruginosa* es conocida por su notable capacidad de adaptación a diversos ambientes, especialmente los húmedos, lo que explica su prevalencia en cuerpos de agua. Además, su habilidad para formar biopelículas en superficies como suelos y sedimentos le proporciona un mecanismo idóneo para su adaptación y supervivencia en el entorno fluvial, condiciones que pueden verse potenciadas por el aumento del flujo y arrastre de material durante las lluvias (Sarkar, 2020).

En cuanto a la distribución geográfica de los aislados, los dos puntos en el estado de Tlaxcala brindaron información sobre la calidad del río en zonas predominantemente rurales, donde la agricultura y la ganadería son las principales actividades económicas. La selección de esta área se fundamentó en estudios como el de Haldar *et al.* (2022) en Khulna, Bangladesh, el cual resalta cómo los deficientes procesos de tratamiento de aguas residuales y sus descargas en cuerpos de agua, usados para riego, constituyen un riesgo para la salud pública. Notablemente, la mayoría de los aislados de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter spp.* se obtuvieron en los puntos de Tlaxcala, mientras que para *Pseudomonas aeruginosa*, el 50% de las muestras se recuperaron de esta misma región.

Debido a que la revisión de Mora *et al.* (2021), identificó la presencia de *Enterobacterias* en sedimentos del fondo del río, en el presente estudio se incluyó la recolección de muestras tanto de agua superficial como de sedimentos. El objetivo fue determinar si existían variaciones en las especies aisladas y sus características de resistencia entre ambas matrices. Los resultados no mostraron una variación relevante en los aislados recuperados de agua y sedimentos.

Esto concuerda con la literatura, ya que *Enterobacterias* como *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter spp.* son patógenos oportunistas que pueden encontrarse comúnmente tanto en el agua como en el suelo debido a la contaminación fecal. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, su reconocida capacidad de adaptación a diversos ambientes y su versatilidad metabólica le permiten prosperar en ambas matrices, lo que explica su presencia consistente tanto en el agua superficial como en los sedimentos.

Perfiles de Resistencia Antimicrobiana

De acuerdo con un estudio realizado en Alemania (Cimen *et al.*, 2023), se identificaron *Enterobacterias* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas. La importancia de estos hallazgos radica en que se ha demostrado que la presencia de este tipo de bacterias en ambientes acuáticos es un indicador de estos ecosistemas como reservorio para la diseminación de genes de resistencia. Por lo que mediante análisis fenotípicos y genotípicos se identificaron los genes presentes en las *Enterobacterias* aisladas para conocer los elementos genéticos involucrados en la resistencia a antibióticos.

Si bien en los estudios previamente mencionados la identificación de bacterias se realizó con métodos moleculares, en la presente investigación se emplearon técnicas microbiológicas para determinar los perfiles de resistencia de las bacterias de interés. La selección de los antibióticos para las pruebas de resistencia se basó en la información disponible sobre los antimicrobianos comúnmente utilizados para el tratamiento de infecciones causadas por estas bacterias (Denissen *et al.*, 2022), y en concordancia con las características de resistencia intrínseca de las especies de interés.

Klebsiella pneumoniae

Para *Klebsiella pneumoniae* los resultados fueron alarmantes: todos los aislados (100%) mostraron resistencia a la totalidad de los antibióticos analizados, clasificándolos como bacterias multirresistentes (MDR). Estos datos se asemejan

con los resultados obtenidos en el estudio en Rumania, en donde, se obtuvieron aislados de *Klebsiella pneumoniae* a diferentes antibióticos como betalactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, fenicoles y sulfamidas (Surleac *et al.*, 2020).

Este hallazgo subraya la gravedad de la contaminación ambiental y la intensa presión selectiva ejercida por los antimicrobianos en el ecosistema del río Atoyac. Como patógeno oportunista clave, *K. pneumoniae* es una de las principales causas de infecciones nosocomiales graves y es conocida por su capacidad para adquirir y diseminar genes de resistencia a múltiples clases de antibióticos (Surleac *et al.*, 2020). Este escenario de multirresistencia generalizada no solo convierte al río Atoyac en un reservorio crítico de bacterias multirresistentes y genes de resistencia, sino que también representa un riesgo significativo para la salud pública.

La exposición a estas bacterias a través del contacto directo con el agua, el consumo de productos irrigados con agua del río, o la diseminación aérea de bioaerosoles, podría conducir a infecciones humanas extremadamente difíciles, o incluso imposibles, de tratar con los antimicrobianos disponibles (Haldar *et al.*, 2022). La persistencia de residuos de antibióticos en el río, provenientes de efluentes urbanos, hospitalarios e industriales, así como de la escorrentía agrícola y ganadera, ejerce una presión selectiva continua, impulsando la evolución y diseminación de la resistencia (Di Cesare *et al.*, 2024). Además, estudios en Polonia, identificaron cepas hipervirulentas de *Klebsiella pneumoniae* como un importante riesgo para la salud de los trabajadores de plantas de tratamiento ya que las bacterias se pueden transmitir del agua hacia el tracto respiratorio a través de bioaerosoles (Rolbiecki *et al.*, 2021).

Distribución de *Klebsiella pneumoniae* Multirresistente

De los 12 aislados de *Klebsiella pneumoniae* del río Atoyac, 7 (58%) fueron confirmados por el método de PCR. La distribución de estas cepas confirmadas es reveladora: un aislado provino de una muestra de agua del Punto 1 en Puebla, mientras que los 6 aislados restantes se obtuvieron de la zona de Tlaxcala. Específicamente, dos aislados correspondieron a muestras de sedimentos del

Punto 1 en Tlaxcala, y los cuatro aislados restantes se recuperaron del Punto 2 en Tlaxcala (tres de muestras de agua y uno de sedimentos).

La relativa ausencia de *K. pneumoniae* confirmada en el punto de muestreo de Puebla podría sugerir que la elevada carga de contaminantes y la alta toxicidad en las zonas más urbanizadas de la metrópolis de Puebla actúan como un factor limitante para el desarrollo y la proliferación de patógenos bacterianos como *K. pneumoniae* en esos ecosistemas. Sin embargo, esta inferencia debe tomarse con cautela debido a que se ha mencionado previamente la presencia de metales en ambientes acuáticos como un factor de desarrollo para *Enterobacterias* (Cimen *et al.*, 2023). Además de los reportes previos en el río en donde se ha identificado elevados niveles de contaminación por metales en el río Atoyac (Castillos Díaz, 2014).

Estos resultados resaltan la importancia de mantener un monitoreo continuo de estos puntos, ya que la presencia de incluso unos pocos aislados de *K. pneumoniae* multirresistente podría ser un indicio temprano del establecimiento de focos de desarrollo y diseminación de bacterias con resistencia a múltiples fármacos. Esta situación pone en riesgo la salud pública, especialmente dada la prolongada exposición de las comunidades aledañas al río.

En contraste, la mayor prevalencia de *K. pneumoniae* confirmada en los puntos de Tlaxcala es particularmente preocupante. En estas secciones, el río Atoyac exhibe una coloración marrón y un olor desagradable persistente, señales inequívocas de una contaminación grave por aguas residuales. La situación se agrava aún más por la cercanía del cauce a cultivos y su uso documentado para el riego en la industria agrícola. Estos datos se vuelven más alarmantes al considerar las evidencias de estudios previos que han demostrado la presencia de cepas multirresistentes en alimentos crudos como vegetales (Hartantyo *et al.*, 2020), estableciendo un claro vínculo entre la contaminación del agua, la agricultura y la seguridad alimentaria.

Enterobacter spp.

La información obtenida de *Enterobacter spp.*, en el presente estudio muestra similitudes con los resultados obtenidos en un estudio de un sistema fluvial en Alemania, en el cual el objetivo fue determinar la presencia de antibióticos en aguas residuales (Voigt *et al.*, 2020). Los resultados del estudio alemán clasificaron a la mayoría de los aislados como bacterias multirresistentes (MDR), sin embargo, el patrón de resistencia a los antibióticos empleados variaba en cada aislado.

En el presente estudio, los datos de que once de los 15 aislados (73%) de *Enterobacter spp.* son resistentes a todos los antibióticos analizados, con valores del índice de resistencia múltiple a los antibióticos mayores a 0.2, es un hallazgo crítico que destaca la severidad del problema de la multirresistencia en el río Atoyac. *Enterobacter spp.* es un patógeno oportunista conocido por su capacidad intrínseca y adquirida de desarrollar resistencia a múltiples clases de antibióticos, lo que los convierte en una amenaza constante (Moussa *et al.*, 2021).

Pseudomonas aeruginosa

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, a diferencia de los patrones de multirresistencia observados en *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter spp.*, los resultados para esta especie revelaron una alta tasa de sensibilidad a los antibióticos probados. Solo dos aislados presentaron resistencia intermedia: uno frente a ceftazidima y otro frente a cefepime.

Estos resultados sugieren que, aunque *P. aeruginosa* es una especie naturalmente resistente a muchos compuestos antimicrobianos, en este entorno específico del río Atoyac aún no presenta una presión selectiva significativa que favorezca su conversión en una cepa multirresistente. No obstante, su versatilidad genética y capacidad para adquirir genes de resistencia recomiendan un monitoreo constante, especialmente ante la presencia de otras bacterias multirresistentes en el mismo ecosistema (Denissen *et al.*, 2023).

Consideraciones generales

Estudios genómicos sugieren que el intercambio genético entre entornos fuera de los hospitales es un evento poco frecuente, y que la aparición de linajes resistentes y virulentos ocurre principalmente en ambientes hospitalarios (Thorpe *et al.*, 2022). Esta hipótesis se apoya en la evidencia de flujos genéticos similares entre aislados clínicos y cuerpos de agua cercanos a hospitales (Janssen *et al.*, 2021). Si bien esta perspectiva no debe descartarse para el presente estudio, es crucial profundizar en análisis genómicos que permitan comprender si existen relaciones entre las cepas hospitalarias y las ambientales del río Atoyac. Estos análisis podrían dilucidar el origen de estos patógenos, determinar si presentan ventajas competitivas sobre la microbiota ambiental o si poseen alguna característica que facilite el intercambio de material genético.

Además, para conocer la verdadera extensión del flujo genético, se necesita un muestreo más amplio que abarque un mayor número de puntos a lo largo del río. Al comprender el origen de estas cepas resistentes, se podrán implementar medidas eficaces de control y vigilancia que eviten la transmisión entre humanos, animales y el medio ambiente.

En resumen, los hallazgos del presente estudio sugieren que el río Atoyac actúa como un reservorio ambiental de bacterias resistentes y, potencialmente, de genes de resistencia transferibles, lo cual representa un riesgo latente para la salud humana y animal. La presión selectiva ejercida por contaminantes antropogénicos, como descargas urbanas, hospitalarias e industriales, probablemente favorece la emergencia y persistencia de estos microorganismos resistentes.

En este contexto, es imperativo que los organismos responsables presten atención a las prácticas para controlar la propagación de estos patógenos de una fuente a otra (Khasapane *et al.*, 2024). Asimismo, se vuelve indispensable establecer programas robustos de vigilancia microbiológica ambiental y promover políticas públicas efectivas enfocadas en el manejo adecuado de residuos y el uso responsable de antimicrobianos para salvaguardar la salud de las comunidades aledañas y el ecosistema del río.

Conclusiones

Los resultados de este estudio confirman la presencia de *Enterobacterias* (*Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter spp.*) y *Pseudomonas aeruginosa* en muestras de agua y sedimento del río Atoyac, cumpliendo con los objetivos de identificación planteados. Esta detección subraya la relevancia de estos grupos bacterianos en el ecosistema fluvial.

Respecto a la determinación de perfiles de resistencia a antibióticos, los resultados evidenciaron un patrón preocupante: los aislados de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter spp.* mostraron una multirresistencia (MDR) significativa a múltiples familias de antibióticos clínicamente relevantes. En contraste, *Pseudomonas aeruginosa* presentó una alta sensibilidad general, aunque la identificación de dos aislados con resistencia intermedia es una señal de alerta que requiere seguimiento.

El índice de resistencia a múltiples antibióticos (ÍRMA) evidencio que la microbiota del río Atoyac está influenciado por actividades antropogénicas, lo que convierte a este cuerpo de agua en un reservorio ambiental de bacterias multirresistentes.

Adicionalmente, se logró el diseño exitoso de cebadores específicos para la identificación molecular de *Klebsiella pneumoniae* mediante la técnica de PCR, lo que representa una herramienta valiosa para futuras investigaciones y vigilancia en la región.

En conjunto, estos hallazgos confirman que el río Atoyac actúa como un reservorio ambiental de bacterias resistentes y, potencialmente, de genes de resistencia transferibles. Esta situación representa un riesgo latente y significativo para la salud pública y animal, ya que estas bacterias pueden diseminarse a través de la exposición directa o indirecta. La alta prevalencia de multirresistencia, especialmente en el grupo ESKAPE, sugiere que la presión selectiva de contaminantes antropogénicos está favoreciendo la emergencia y persistencia de estos microorganismos resistentes.

Referencias

- Abbas, R., Chakkour, M., Zein El Dine, H., Obaseki, E. F., Obeid, S. T., Jezzini, A., Ghssein, G., & Ezzeddine, Z. (2024). General Overview of Klebsiella pneumonia: Epidemiology and the Role of Siderophores in Its Pathogenicity. *Biology*, 13(2).
- Algammal, A. M., Mabrok, M., Sivaramasamy, E., Youssef, F. M., Atwa, M. H., El-kholy, A. W., Hetta, H. F., & Hozzein, W. N. (2020). Emerging MDR-*Pseudomonas aeruginosa* in fish commonly harbor oprL and toxA virulence genes and bla TEM, bla CTX-M, and tetA antibiotic-resistance genes. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12.
- Ayobami, O., Brinkwirth, S., Eckmanns, T., & Markwart, R. (2022). Antibiotic resistance in hospital-acquired ESKAPE-E infections in low- and lower-middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Emerging Microbes and Infections*, 11(1), 443–451.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, 45(4), 493–496.
- Bengoechea, J. A., & Sa Pessoa, J. (2019). *Klebsiella pneumoniae* infection biology: Living to counteract host defences. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(2), 123–144.
- Bonilla, M., Ayala, A., González, S., Santamaría, J., & Silva, S. (2015). Calidad fisicoquímica del agua del distrito de riego 030 “Valsequillo” para riego agrícola. *Revista Iberoamericana de Producción Académica y Gestión Educativa*, 2(4), 1–29.
- Castillos Díaz, L. (2014). Perfiles de resistencia a antibióticos y metales pesados en bacterias mesófilas como indicador biológico de contaminación en ríos del municipio de Puebla [Tesis de maestría, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/6304>

- Chávez-Jacobo, V. M. (2020). La batalla contra las superbacterias: No más antimicrobianos, no hay ESKAPE. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 23, 1–11.
- Cimen, C., Noster, J., Stelzer, Y., Rump, A., Sattler, J., Berends, M., Voss, A., & Hamprecht, A. (2023). Surface water in Lower Saxony: A reservoir for multidrug-resistant Enterobacterales. *One Health*, 17(May), 100606.
- CONAGUA. (2021). Diagnóstico de la calidad del agua del río Atoyac y sus afluentes Puebla.
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/859857/2._Diagnostico_de_la_Calidad_del_Agua_del_r_o_Atoyac_y_sus_Afluentes.pdf
- Covarrubias-López, A. C., García-Suastegui, W. A., Valencia-Quintana, R., Avelino-Flores, F., Méndez-Bermúdez, A., & Handal-Silva, A. (2023). Human Impact in the Watershed of the Atoyac River in the Metropolitan Area of Puebla, Mexico. *Sustainability*, 15(13), 1–16.
- Davin-Regli, A., Lavigne, J. P., & Pagès, J. M. (2019). Enterobacter spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(4).
- De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., & Walker, M. J. (2020). Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3).
- De Oliveira Júnior, N. G., & Franco, O. L. (2020). Promising strategies for future treatment of *Klebsiella pneumoniae* biofilms. *Future Microbiology*, 15(1), 63–79.
- Denissen, J., Reyneke, B., Barnard, T., Khan, S., & Khan, W. (2023). Risk assessment of *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa* in environmental water sources: Development of surrogate models for antibiotic resistance genes. *Science of the Total Environment*, 901(March), 166217.

- Denissen, J., Reyneke, B., Waso-Reyneke, M., Havenga, B., Barnard, T., Khan, S., & Khan, W. (2022). Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 244(June), 114006.
- Di Cesare, A., Cornacchia, A., Sbaffi, T., Sabatino, R., Corno, G., Cammà, C., Calistri, P., & Pomilio, F. (2024). Treated wastewater: A hotspot for multidrug- and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Environmental Pollution*, 359(April), 1–8.
- Eger, E., Homeier-Bachmann, T., Adade, E., Dreyer, S., Heiden, S. E., Lübcke, P., Tawiah, P. O., Sylverken, A. A., Knauf, S., & Schaufler, K. (2024). Carbapenem- and cefiderocol-resistant Enterobacterales in surface water in Kumasi, Ashanti Region, Ghana. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 6(2), 1–5.
- Ejikeugwu, C., Nworie, O., Saki, M., Al-Dahmoshi, H. O. M., Al-Khafaji, N. S. K., Ezeador, C., Nwakaeze, E., Eze, P., Oni, E., Obi, C., Iroha, I., Esimone, C., & Adikwu, M. U. (2021). Metallo- β -lactamase and AmpC genes in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from abattoir and poultry origin in Nigeria. *BMC Microbiology*, 21(1), 1–9.
- Ferreira, C., Luzietti, L., Ribeirinho-Soares, S., Nunes, O. C., Vaz-Moreira, I., & Manaia, C. M. (2023). Survival of clinical and environmental carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST147 in surface water. *Environmental Research*, 237(June).
- Galarde-López, M., Velazquez-Meza, M. E., Bobadilla-Del-valle, M., Carrillo-Quiroz, B. A., Cornejo-Juárez, P., Ponce-De-león, A., Sassoé-González, A., & Alpuche-Aranda, C. M. (2022). Surveillance of Antimicrobial Resistance in Hospital Wastewater: Identification of Carbapenemase-Producing *Klebsiella* spp. *Antibiotics*, 11(3).
- Google Earth. (2024). Vista aérea del río Atoyac a la altura de Puebla, Tlaxcala. [Imagen de satélite]. Recuperado de

<https://earth.google.com/web/@19.18258391,-98.23980217,2210.42079177a,114673.03668229d,30y,-0h,0t,0r/data=CgRCAggBMigKJgokCiAxdIzhZEM3MGNFaGtoNVJSVknmcVhpdnpnN01Fa2RuVSACOGMKATBCAggASgg1di09AIQAQ>

Haldar, K., Kujawa-Roeleveld, K., Hofstra, N., Datta, D. K., & Rijnaarts, H. (2022). Microbial contamination in surface water and potential health risks for peri-urban farmers of the Bengal delta. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 244(June), 114002.

Hansen, G. T. (2021). Continuous Evolution: Perspective on the Epidemiology of Carbapenemase Resistance Among Enterobacterales and Other Gram-Negative Bacteria. *Infectious Diseases and Therapy*, 10(1), 75–92.

Hartantyo, S. H. P., Chau, M. L., Koh, T. H., Yap, M., Yi, T., Cao, D. Y. H., Gutiérrez, R. A., & Ng, L. C. (2020). Foodborne klebsiella pneumoniae: Virulence potential, antibiotic resistance, and risks to food safety. *Journal of Food Protection*, 83(7), 1096–1103.

Humberto, B. C., Jesús, S. S., Elena, C. A., Luis, L. A., Josefina, D. B., Alejandro, A. V., Elvira, G. G., Paola, B. I., Rayo, M. O., Rigoberto, H. C., & Ulises, G. R. (2022). PCR system for the correct differentiation of the main bacterial species of the Klebsiella pneumoniae complex. *Archives of Microbiology*, 204(1), 1–5.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2019). Cuenca hidrológica Alto Atoyac. Humedales [Informe]. INEGI. https://www.inegi.org.mx/contenido/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/702825189884.pdf

Janssen, L., de Almeida, F. M., Damasceno, T. A. S., Baptista, R. de P., Pappas, G. J., de Campos, T. A., & Martins, V. de P. (2021). A Novel Multidrug Resistant, Non-Tn4401 Genetic Element-Bearing, Strain of Klebsiella pneumoniae Isolated From an Urban Lake With Drinking and Recreational Water Reuse. *Frontiers in Microbiology*, 12(November), 1–12.

- Khamari, B., & Bulagonda, E. P. (2024). Unlocking Nitrofurantoin: Understanding Molecular Mechanisms of Action and Resistance in Enterobacterales. *Medical Principles and Practice*, 121–137.
- Khasapane, N. G., Nkhebenyane, S. J., Kgaugelo, L., Thekiso, O., & Ramatla, T. (2024). “One Health” Perspective on Prevalence of ESKAPE Pathogens in Africa: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pathogens*, 13(9).
- Koneman, E. W. (1997). *Koneman Diagnostico Microbiológico: Texto y atlas en color*. Ed. médica panamericana.
- Kraychete, G. B., Botelho, L. A. B., Monteiro-Dias, P. V., de Araújo, W. J., Oliveira, C. J. B., Carvalho-Assef, A. P. D., Albano, R. M., Picão, R. C., & Bonelli, R. R. (2022). qnrVC occurs in different genetic contexts in *Klebsiella* and *Enterobacter* strains isolated from Brazilian coastal waters. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 31, 38–44.
- LeChevallier, M. W., Prosser, T., & Stevens, M. (2024). Opportunistic Pathogens in Drinking Water Distribution Systems—A Review. *Microorganisms*, 12(5).
- Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z., & Zhou, D. (2014). Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiology*, 9(9), 1071–1081.
- Li, L., He, Z., Liang, T., Sheng, T., Zhang, F., Wu, D., & Ma, F. (2022). Colonization of biofilm in wastewater treatment: A review. *Environmental Pollution*, 293(11), 118514.
- Loudermilk, E. M., Kotay, S. M., Barry, K. E., Parikh, H. I., Colosi, L. M., & Mathers, A. J. (2022). Tracking *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene as an indicator of antimicrobial resistance dissemination from a hospital to surface water via a municipal wastewater treatment plant. *Water Research*, 213, 118151.
- Ma, Y. X., Wang, C. Y., Li, Y. Y., Li, J., Wan, Q. Q., Chen, J. H., Tay, F. R., & Niu, L. N. (2020). Considerations and Caveats in Combating ESKAPE Pathogens against Nosocomial Infections. *Advanced Science*, 7(1).

- Mora, A., García-Gamboa, M., Sánchez-Luna, M. S., Gloria-García, L., Cervantes-Avilés, P., & Mahlkecht, J. (2021). A review of the current environmental status and human health implications of one of the most polluted rivers of Mexico: The Atoyac River, Puebla. *Science of the Total Environment*, 782, 146788.
- Moussa, J., Abboud, E., & Tokajian, S. (2021). The dissemination of antimicrobial resistance determinants in surface water sources in Lebanon. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(9), 1–15.
- Okafor, J. U., & Nwodo, U. U. (2023). Molecular Characterization of Antibiotic Resistance Determinants in *Klebsiella pneumoniae* Isolates Recovered from Hospital Effluents in the Eastern Cape Province, South Africa. *Antibiotics*, 12(7), 1139.
- Organización Mundial de la Salud. (2023). Una sola salud [Hoja informativa]. OMS. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/one-health>
- Osman, M., Daaboul, D., Tajani, A. G., El Omari, K., Bisha, B., Hassan, J., Cazer, C. L., Fiorella, K. J., Karah, N., Abbara, A., Hamze, M., Cummings, K. J., Naas, T., & Kassem, I. I. (2024). Multidrug-resistant pathogens contaminate river water used in irrigation in disenfranchised communities. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 36, 175–180.
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177–192.
- Petrosillo, N., Taglietti, F., & Granata, G. (2019). Treatment options for colistin resistant *klebsiella pneumoniae*: Present and future. *Journal of Clinical Medicine*, 8(7).
- Pino-Hurtado, M., Fernández-Fernández, R., Campaña-Burguet, A., González-Azcona, C., Lozano, C., Zarazaga, M., & Torres, C. (2024). A Surveillance Study of Culturable and Antimicrobial-Resistant Bacteria in Two Urban WWTPs in Northern Spain. *Antibiotics*, 13(10).

- Rocha, A. J., De Oliveira Barsottini, M. R., Rocha, R. R., Laurindo, M. V., De Moraes, F. L. L., & Da Rocha, S. L. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: Virulence factors and antibiotic resistance Genes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62, 1–15.
- Rocha, J., Ferreira, C., Mil-Homens, D., Busquets, A., Fialho, A. M., Henriques, I., Gomila, M., & Manaia, C. M. (2022). Third generation cephalosporin-resistant *Klebsiella pneumoniae* thriving in patients and in wastewater: what do they have in common? *BMC Genomics*, 23(1), 1–14.
- Rocha, J., Henriques, I., Gomila, M., & Manaia, C. M. (2022). Common and distinctive genomic features of *Klebsiella pneumoniae* thriving in the natural environment or in clinical settings. *Scientific Reports*, 12(1), 1–10.
- Rolbiecki, D., Harnisz, M., Korzeniewska, E., Buta, M., Hubeny, J., & Zieliński, W. (2021). Detection of carbapenemase-producing, hypervirulent *Klebsiella* spp. in wastewater and their potential transmission to river water and WWTP employees. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 237.
- Sarkar, S. (2020). Release mechanisms and molecular interactions of *Pseudomonas aeruginosa* extracellular DNA. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(15), 6549–6564.
- Savin, M., Bierbaum, G., Hammerl, A., Heinemann, C., Parcina, M., & Sib, E. (2020a). ESKAPE bacteria and extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from wastewater and process water from German poultry slaughterhouses. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(8), 1-18.
- Savin, M., Bierbaum, G., Hammerl, J. A., Heinemann, C., Parcina, M., Sib, E., Voigt, A., & Kreyenschmidt, J. (2020b). Antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial residues in wastewater and process water from German pig slaughterhouses and their receiving municipal wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 727, 138788.

Secretaría de Desarrollo Agrario, Territorial y Urbano, Consejo Nacional de Población, & Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2024). Metrópolis de México 2020. Gobierno de México. Recuperado de <https://www.gob.mx/sedatu/documentos/metropolis-de-mexico-2020?state=published>

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2016). Norma Mexicana NMX-AA-042-SCFI-2015, ANÁLISIS DE AGUA-ENUMERACIÓN DE ORGANISMOS COLIFORMES TOTALES, ORGANISMOS COLIFORMES FECALES (TERMOTOLERANTES) Y ESCHERICHIA COLI-MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE EN TUBOS MÚLTIPLES (CANCELA A LA NMX-AA-42-1987). Diario Oficial de la Federación.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2022). 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. Diario Oficial de la Federación. Recuperado de https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5645374&fecha=11/03/2022

Surleac, M., Barbu, I. C., Paraschiv, S., Popa, L. I., Gheorghe, I., Marutescu, L., Popa, M., Sarbu, I., Talapan, D., Nita, M., Iancu, A. V., Arbune, M., Manole, A., Nicolescu, S., Sandulescu, O., Streinu-Cercel, A., Otelea, D., & Chifiriuc, M. C. (2020). Whole genome sequencing snapshot of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from hospitals and receiving wastewater treatment plants in Southern Romania. *PLoS ONE*, 15(1), 1–17.

Thorpe, H. A., Booton, R., Kallonen, T., Gibbon, M. J., Couto, N., Passet, V., López-Fernández, S., Rodrigues, C., Matthews, L., Mitchell, S., Reeve, R., David, S., Merla, C., Corbella, M., Ferrari, C., Comandatore, F., Marone, P., Brisse, S., Sasser, D., ... Feil, E. J. (2022). A large-scale genomic snapshot of *Klebsiella* spp. isolates in Northern Italy reveals limited transmission between clinical and non-clinical settings. *Nature Microbiology*, 7(12), 2054–2067.

- Voigt, A. M., Ciorba, P., Döhla, M., Exner, M., Felder, C., Lenz-Plet, F., Sib, E., Skutlarek, D., Schmithausen, R. M., & Faerber, H. A. (2020). The investigation of antibiotic residues, antibiotic resistance genes and antibiotic-resistant organisms in a drinking water reservoir system in Germany. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 224(2020), 113449.
- Wan Mohtar, W. H. M., Mohd Razali, M. A., Mazlan, M. A., Ahmad Rozaini, A. Z., Mooraltharan, S. A. P., Abdul Hamid, A., & Buyong, M. R. (2023). Rapid detection of ESKAPE and enteric bacteria using tapered dielectrophoresis and their presence in urban water cycle. *Process Safety and Environmental Protection*, 177(April), 427–435.
- Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., & Wang, H. (2020). The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17), 1–17.
- Wang, X., Zhang, H., Yu, S., Li, D., Gillings, M. R., Ren, H., Mao, D., Guo, J., & Luo, Y. (2024). Inter-plasmid transfer of antibiotic resistance genes accelerates antibiotic resistance in bacterial pathogens. *ISME Journal*, 18(1).
- Wyres, K. L., Lam, M. M. C., & Holt, K. E. (2020). Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology*, 18(6), 344–359.

Anexos

Anexo 1. Resultados de la identificación bioquímica para *Klebsiella pneumoniae*.

Muestra	Oxidasa	Indol	Rojo de metilo	Voges-Proskauer	Citrato	Motilidad	H2S	Acido en glucosa	Gas en glucosa	Fermentación de azúcares
Punto 1 Puebla										
P1 1:100 A5R	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
L2 1:10	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
Punto 2 Puebla										
P2 1:10 L5R	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
Punto 1 Tlaxcala										
M A1 1:100 17.1.24	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
A1D 17.1.24	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
CB L1 1:10 17.1.24	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
CR L1 1:10 17.1.24	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
Punto 2 Tlaxcala										
CB A2 1:10 17.1.24	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
A42D 17.1.24	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
R A2 1:100 17.1.24	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
BL2D 17.1.24	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
SL2 1:100 17.1.24	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+

Anexo 2. Resultados de la identificación bioquímica para *Enterobacter spp.*

Muestra	Oxidasa	Indol	Rojo de metilo	Voges-Proskauer	Citrato	Motilidad	H2S	Acido en glucosa	Gas en glucosa	Fermentación de azúcares
Punto 1 Puebla										
A1 1:10	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
Punto 2 Puebla										
P2 1:100 L5	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+
P2D A5	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+
Punto 1 Tlaxcala										
A1-1 CB	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+

P A1 1:100 17.1.24	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+
S L1 1:100 17.1.24	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
R A1 1:100 17.1.24	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
A41 1:10 17.1.24	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
Punto 2 Tlaxcala										
A2-1 Cr 1	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
A2-1 Cr 2	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
CB A2D 17.1.24	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
CR L2D 17.1.24	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
CB A2 1:100 17.1.24	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
CR L2 1:100 17.1.24	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
L2 1:10 17.1.24	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-

Anexo 3. Resultados de la identificación bioquímica para *Pseudomonas aeruginosa*.

Muestra	Fluorescencia	Oxidasa	Indol	Citrato	H2S	Movilidad
Punto 1 Puebla						
S1-4	+	+	-	+	-	+
1	+	+	-	+	-	+
3	+	+	-	+	+	+
P1D L5	+	+	+	+	-	+
Punto 2 Puebla						
P2 1:10 A5	+	+	-	+	+	+
Punto 1 Tlaxcala						
A1-1	+	+	-	+	-	+
Punto 2 Tlaxcala						
L2-1 c.v.	+	+	-	+	-	+
L2 1:10	+	+	-	+	+	+
A2 1:10 17.1.24	+	+	+	+	-	+
L2D 17.1.24	+	+	-	+	-	+