Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas

“Investigación de *Salmonella* spp en agua de los ríos Alseseca, Atoyac y San Francisco de la Ciudad de Puebla y de su resistencia a antibióticos”

Tesina presentada para obtener el grado de:

Especialidad en Tecnología e Inocuidad de los Alimentos

Presenta:

IAL. Mónica Adriana Tejeda Hernández

Director de tesina

D. en C. Fausto Tejeda Trujillo

Codirector de tesina

D. en C. Raúl Ávila Sosa Sánchez

Enero, 2021

Comité evaluador

D.en C. Carlos Enrique Ochoa Velasco

D. en C. Teresa Soledad Cid Pérez

M.S.P. Carlos Cabrera Maldonado

ÍNDICE

1. Índice de figuras y tablas 4

2. Resumen 5

3. Introducción 6

4. Antecedentes

4.1. Ríos 8

4.2. Ríos del estado de Puebla 13

4.3. Ríos como vehículo de microorganismos patógenos 17

4.4. *Salmonella* spp 20

4.5. Samonelosis 20

4.6. *Salmonella* spp en el agua 21

5. Justificación 23

6. Objetivos

6.1. Objetivo general 24

6.2. Objetivos específicos 24

7. Metodología

7.1. Diagrama general de trabajo 25

7.2. Materiales y cuadro de métodos 26

7.3. Descripción de métodos 27

8. Resultados y discusión 32

9. Conclusiones 39

10. Recomendaciones 40

11. Bibliografía 41

1. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

1. Vertiente Oriental o del Golfo. Tomada de agua.org.mx 9
2. Vertiente Occidental o del Pacífico. Tomada de agua.org.mx 11
3. Vertiente interior. Tomada de agua.org.mx 12
4. Ciclo hidrológico del río Atoyac. Tomada de dalelacara.org 14
5. De izquierda a derecha 1. Río Atoyac, 2. Río San Francisco, 3. Río Alseseca. Tomada de inegi.org.mx/temas/hidrografía 16
6. Puntos de muestro de la Red de medición de calidad de agua. Tomada de CONAGUA.gob.mx 18
7. Resistencia de *Salmonella* spp a diferentes antibióticos 35
8. Comportamiento de resistencia a diferentes antibióticos 36
9. Sensibilidad de *Salmonella* spp a diferentes antibióticos 37
10. Comportamiento de sensibilidad a diferentes antibióticos 38

Tablas

1. Equipo utilizado 26
2. Métodos utilizados 26
3. Puntos de muestro ubicados en los 3 ríos de estudio 29
4. Puntos de muestreo positivos a *Salmonella* spp 32
5. Antibióticos utilizados 33
6. Comportamiento con antibióticos en color verde indicando sensibilidad y rojo resistencia 34

2. RESUMEN

La ciudad de Puebla cuenta con 3 ríos principales: el río Alseseca, San Francisco y Atoyac, siendo este último el de mayor importancia debido a que en su trayecto cruza 22 municipios poblanos, 47 municipios tlaxcaltecas y 108 centros urbanos; con un impacto en más de 2.8 millones de habitantes dentro de un territorio de 401 mil hectáreas. Tras la realización de diversos estudios, el río Atoyac ha sido declarado clínicamente muerto por lo que en la actualidad se considera un riesgo sanitario para la población. El objetivo del estudio consistió en evaluar la presencia de *Salmonella* spp en el agua de estos 3 ríos, así como su comportamiento ante diversos antibióticos. Se realizó la toma de muestra a través de la exposición de hisopos de Moore durante 24h en 19 puntos a lo largo de los 3 ríos, se siguió la metodología establecida en el Apéndice A Normativo de la NOM-210-SSA1-2014, las cepas que se recuperaron se sembraron por el método de Kirby-Bauer para observar su comportamiento ante diversos antibióticos. 5 de los 19 puntos de muestreo (26%) fueron positivos para este patógeno. Asimismo, se recuperaron 19 cepas de *Salmonella* spp, de las cuales, el 90% provenían del río Alseseca y el 10% restante del río Atoyac. Del total de cepas recuperadas, el 100% de ellas fueron resistentes al menos a 2 antibióticos, siendo uno de ellos trimetoprim-sulfametoxazol, mientras que el 84% fue sensible a cefotaxima. La cepa con la mayor multiresistencia fue recuperada en el transcurso del río Alseseca por la colonia La Margarita.

3. INTRODUCCIÓN

Se define río como la corriente natural de agua que fluye por un lecho, desde un lugar elevado a otro más bajo (1). En México existen aproximadamente 42 ríos principales los cuales transcurren en 3 vertientes: Vertiente Oriental o del Golfo, Vertiente Occidental o del Pacífico y Vertiente interior (2), siendo los ríos que conforman esta última vertiente los únicos que no desembocan en el océano. Para el Estado de Puebla, las aguas superficiales son divididas en 4 regiones: Región hidrológica RH27 “Tuxpan-Nautla”, Región hidrológica RH28 “Papaloapan”, Región hidrológica RH26 “Pánuco” y Región hidrológica RH18 “Balsas” (3), presentándose en esta última región los ríos Alseseca, San Francisco y Atoyac, los cuales son de interés para este proyecto.

Desde la década de los años sesenta, el río San Francisco se encuentra entubado a lo largo de su cruce por la ciudad de Puebla debido a su contaminación no controlada, olores desagradables e inundaciones ocasionadas a los habitantes de la región. El cauce de este río se une al cauce del río Atoyac al final del bulevar 5 de mayo para proseguir hasta la presa de Valsequillo, por otro lado, el río Alseseca baja por el volcán de la Malinche, cruza la zona oriente y en conjunto con el río Atoyac llenan la presa mencionada. El río Atoyac es el de mayor importancia en el estado debido a su longitud y extensión, este río posteriormente se convertirá en el río Balsas el cual desemboca en el Océano Pacífico.

La Comisión Nacional de Agua (CONAGUA) actualmente lleva a cabo análisis microbiológicos que contemplan la carga de coliformes fecales, clasificando así a las aguas de ríos en: agua excelente, agua de buena calidad, agua aceptable, agua contaminada y agua fuertemente contaminada (5). Los puntos de muestreo utilizados en este proyecto han sido clasificados por la CONAGUA como fuertemente contaminada, lo que se convierte en un riesgo sanitario para la población que llega a hacer uso y/o consumo del agua proveniente de estos 3 ríos.

En un estudio transversal, realizado en 2013, se evaluó un sistema fluvial utilizado para la agricultura y el consumo animal que consta de 1,345 hectáreas, se recuperó *Salmonella* spp en el 62.7% de las 384 muestras analizadas; asimismo, se observó

un comportamiento proporcional con respecto al número de cepas de *Salmonella* spp recuperadas y la densidad animal por hectárea muestreada. De estas cepas, el 49.5% fueron resistentes a por lo menos un antibiótico y el 18% fueron catalogados como cepas multirresistentes, estos resultados indican una estrecha relación entre la agricultura animal y la resistencia a los antibióticos (14).

En México se cuenta con muy pocos datos acerca de la presencia de este patógeno en las aguas de los ríos, sin embargo, es de suma importancia la investigación de *Salmonella* spp y de su comportamiento ante diversos antibióticos, debido a la fácil diseminación de este patógeno a los diferentes sectores a través del agua.

4. ANTECENDENTES

4.1. Ríos

Río se define como la corriente natural de agua que fluye por un lecho, desde un lugar elevado a otro más bajo, en su mayoría desembocan en el mar o en un lago, existen ríos que desaparecen debido a que sus aguas son filtradas en la tierra o se evaporan (1).

De acuerdo con la información emitida por el Fondo para la Comunicación y la Educación Ambiental, A.C. en México existen aproximadamente 42 ríos principales los cuales transcurren en 3 vertientes:

Vertiente Oriental o del Golfo

Compuesta por 46 ríos importantes (ver Figura 1) en los que se encuentran:

Río Bravo. Con una longitud de 2,001 km, nace en las montañas rocallosas y desemboca en el Golfo de México, gran parte de su recorrido está en Estados Unidos, funge como frontera entre este país y México (2).

Río Pánuco. Con una longitud de 60 km, nace en la cuenca oriental de la Meseta de Anáhuac y desemboca en el Golfo de México (2).

Río Papaloapan. Con una longitud de 900 km, nace en la unión con río Tehuacán y el río Quiotepec, cruza la Sierra Madre Oriental y desemboca en el Golfo de México a la altura del puerto de Alvarado (2).

Coatzacoalcos. Con una longitud de 325 km, nace en la Sierra Atravesada, se provee con aguas de las montañas del Istmo de Tehuantepec y desemboca en el Golfo de México a la altura de Coatzacoalcos (2).

Río Tonalá. Con una longitud de 84 km, nace en la unión del río Tanochapa y del Zanapa, desemboca en el Golfo de México entre Veracruz y Tabasco siendo un límite natural para estos estados (2).

Grijalva. Con una longitud de 600 km, nace de la unión de los ríos Selegua y Grandagalpa en la sierra de los Cuchumatanes en Guatemala, al entrar a territorio

mexicano se le conoce como río Rincón del Tigre, llega a Tuxtla Gutiérrez y después al estado de Tabasco en donde desemboca en el Golfo de México después de unirse con el caudal del río Usumacinta (2).

Usumacinta. Con una longitud de 1,110 km, nace en las partes altas de la Sierra Madre, en el departamento de Totonicapán en Guatemala, cruza por Quiché y llega al norte de Guatemala, en donde sirve como frontera entre este país y México, se adentra en el estado de Tabasco y se une con el río Grijalva para desembocar en el Golfo de México (2).

Figura 1. Vertiente Oriental o del Golfo. Tomada de agua.org.mx

Vertiente Occidental o del Pacífico

Compuesta por aproximadamente 100 ríos (ver Figura 2), el río Balsas y Lerma-Santiago son algunos de los que se destacan debido a su caudal.

Río Balsas. Con una longitud de 771 km, nace en la unión de los ríos San Martín y Zahuapan en el estado de México, fluye por los estados de Puebla, Tlaxcala,

Michoacán y Guerrero, en donde es conocido como río Atoyac, su cuenca forma una depresión que lleva el mismo nombre y desemboca en el Océano Pacífico con el nombre de río Zacatula en Guerrero (2)

Río Lerma. Con una longitud de 965 km se considera como el río más largo de México, nace al pie del Nevado de Toluca en el estado de México, desemboca en el lago de Chapala, en donde se origina el río Santiago que desemboca en el Océano Pacífico cerca del puerto de San Blas (2)

Río Yaqui. Con una longitud de 410 km, nace en la Sierra Madre Occidental en la unión de los ríos Bavispe y Papigochi, en donde serpentea hasta desembocar en el puerto de Guaymas (2)

Río Mayo. Con una longitud de 175 km, nace en el Concheño en la Sierra Tarahumara, desciende hacia Sonora en donde se une con el río Cedros para llegar a la ciudad de Álamos, desembocando en el Mar Cortez o Golfo de California (2)

Río Colorado Con una longitud de 2,730 km, nace en las Rocallosas y la mayoría de su recorrido se encuentra en Estados Unidos, para por los estados de Sonora y Baja California en donde sirve como límite fronterizo con México, desemboca en el Golfo de California (2).

Figura 2. Vertiente Occidental o del Pacífico. Tomada de agua.org.mx

Vertiente Interior

Sistemas endorreicos, sin salida al mar, conformado por cuencas cerradas, el sistema más importante es el del río Nazas-Aguanaval, (ver Figura 3).

Río Nazas. Con una longitud de 560 km, nace en la Sierra Madre Occidental, fluye por los estados de Durango y Coahuila desembocando en la laguna de Mayrán, esta laguna da su nombre a la región conocida como la Comarca Lagunera (2).

Río Aguanaval. Con una longitud de 500 km, conformado por tres vertientes, río Chico, Lazos y Trujillo, este río cruza por el estado de Durango y desemboca en la laguna de Viesca en Coahuila (2).

Río Carmen. Con una longitud de 282 km, nace al sureste del Ejido Benito Juárez Chihuahua, junto con otros ríos, el río Carmen es utilizado para llenar la presa Las Lajas y desemboca en la laguna de los Patos en el estado de Chihuahua (2).

Figura 3. Vertiente interior. Tomada de agua.org.mx

4.2. Ríos del estado de Puebla

Dentro del estado de Puebla las aguas superficiales se distribuyen en cuatro regiones hidrológicas:

Región hidrológica RH18 “Balsas”

Abarca parcialmente los estados de México, Puebla y Tlaxcala, dentro del estado de Puebla esta región cubre el 59% de la superficie estatal (6), drena aguas del centro y sur de la entidad hacia el río Atoyac el posteriormente se convertirá en el Río Balsas y finalmente desembocará en el océano Pacífico. Algunos de los ríos que se cobijan en esta región son: río Atoyac, Grande de Amazucac y Tlapaneco con 57.23%, 1.03% y 0.86% respectivamente (7).

Región hidrológica RH27 “Tuxpan-Nautla”

Abarca el 24% de la superficie estatal, drena aguas del norte de la entidad hacia el Golfo de México. Algunos de los ríos que se cobijan en esta región son: río Tecolutla, Cazones, Tuxpan y Nautla con 16.56%, 3.43%, 2.64%, 1.01%, respectivamente (7).

Región hidrológica RH28 “Papaloapan”

Abarca el 17% de la superficie estatal, drena aguas del extremo sureste de la entidad hacia el Golfo de México. Algunos de los ríos que se cobijan en esta región son: Río Papaloapan y Jamapa con 15.28% y 1.45%, respectivamente (7).

Región hidrológica RH26 “Pánuco”

Abarca el 0.51% de la superficie estatal junto con la cuenca río Moctezuma, drena aguas de una pequeña porción del territorio colindante con el estado de Hidalgo. Sus principales lagunas son: El Salado, Totolcingo, Grande, Chica, Ajolotla, Alchichica, Aljojuca y La Preciosa. Sus principales presas son: Manuel Ávila Camacho, ubicada en Valsequillo, Nexapa, La Soledad, Boqueroncitos, San Felipe, Peña Colorada (7).

Río Atoyac

Nace en la Sierra Nevada en el estado de Puebla, entra al estado de Tlaxcala y vuelve a territorio poblano para regar el Valle de Puebla-Tlaxcala, es utilizado para llenar la presa Manuel Ávila Camacho, también conocida como presa de Valsequillo, al sur de la ciudad. Con respecto a su densidad demográfica el Rio Atoyac abarca 22 municipios poblanos, 47 tlaxcaltecas, 108 centros urbanos y más de 2.8 millones de habitantes en un territorio de 401 mil hectáreas (4).

El Río Atoyac se expande a lo largo del estado en pequeños arroyos, ver Figura 4, las rutas gruesas en la parte superior de esta figura marcan, del lado izquierdo, como el río baja del volcán Iztaccíhuatl y del lado derecho la ruta del río Zahuapan, las cuales se unirán para formar lo que actualmente se conoce como río Atoyac, la línea gruesa en la parte inferior de la figura se observa el río Alseseca y en las líneas tenues se encuentran otros ríos, arroyos y barranquillas. En rojo se localiza la zona muestreada en este trabajo.

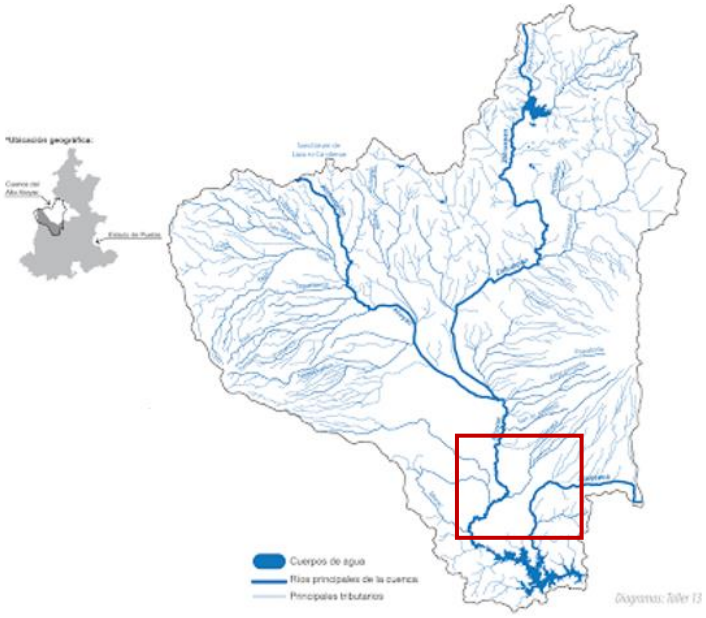


Figura 4. Ciclo hidrológico del río Atoyac. Tomada de dalelacara.org, modificada por Mónica Adriana Tejeda Hernández

El río Atoyac ha sido estudiado desde 1986 por la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), en 2013 por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y en la actualidad por la CONAGUA, entre muchas otras instituciones y universidades, todas concluyendo que el río se encuentra diagnosticado como clínicamente muerto pues los resultados de análisis fisicoquímicos y microbiológicos arrojan datos muy por encima de lo recomendable (4).

El río Atoyac es contaminado por aproximadamente 50 municipios de Tlaxcala y Puebla, y por al menos mil industrias que no cuentan con plantas de tratamiento o bien sus plantas no se encuentran funcionando adecuadamente lo que ha provocado significantes cambios en el rio como lo su color, olor y la presencia de grandes cantidades de metales, químicos, así como la ausencia de vida en el este río.

Río Alseseca

Es uno de los ríos que nacen en el volcán de la Malinche en el estado de Tlaxcala, se ubica al oriente de la ciudad de puebla recorriendo la zona urbana de norte a sur, desemboca en la presa de Valsequillo y cuenta con una longitud de aproximadamente 30 km (8)

Río San Francisco

Su corriente proviene del volcán de la Malinche y baja por el actual bulevar 5 de mayo, surtía de agua dulce a las Cieneguillas y al centro de la ciudad, este río servía como referencia ya que partía a la ciudad de Puebla en dos, el oriente compuesto por barrios como Xonaca, La Cruz y Analco y al poniente se ubicaron las villas españolas. En sus inicios la industria no contaminaba en gran medida al río y bastaba con el proceso de recuperación natural del río para mantenerlo en equilibrio, conforme fue pasando el tiempo y con la llegada de la introducción de químicos para teñir las telas, se rompe el equilibrio del río aunado al aumento poblacional y al uso del río como un lugar para desechos domésticos. Fue hasta

inicios del siglo XX cuando el río perdió por completo su frescura y las aguas se tornaron turbias, desembocando todo esto en el río Atoyac.

Debido a los olores que se desprendía del rio y a las muchas inundaciones ocurridas en la ciudad por el desbordamiento de este se decide, a finales de los sesenta, entubarlo, lo que represento un gran costo económico, cultural y social, el río ha permanecido así desde entonces (9).

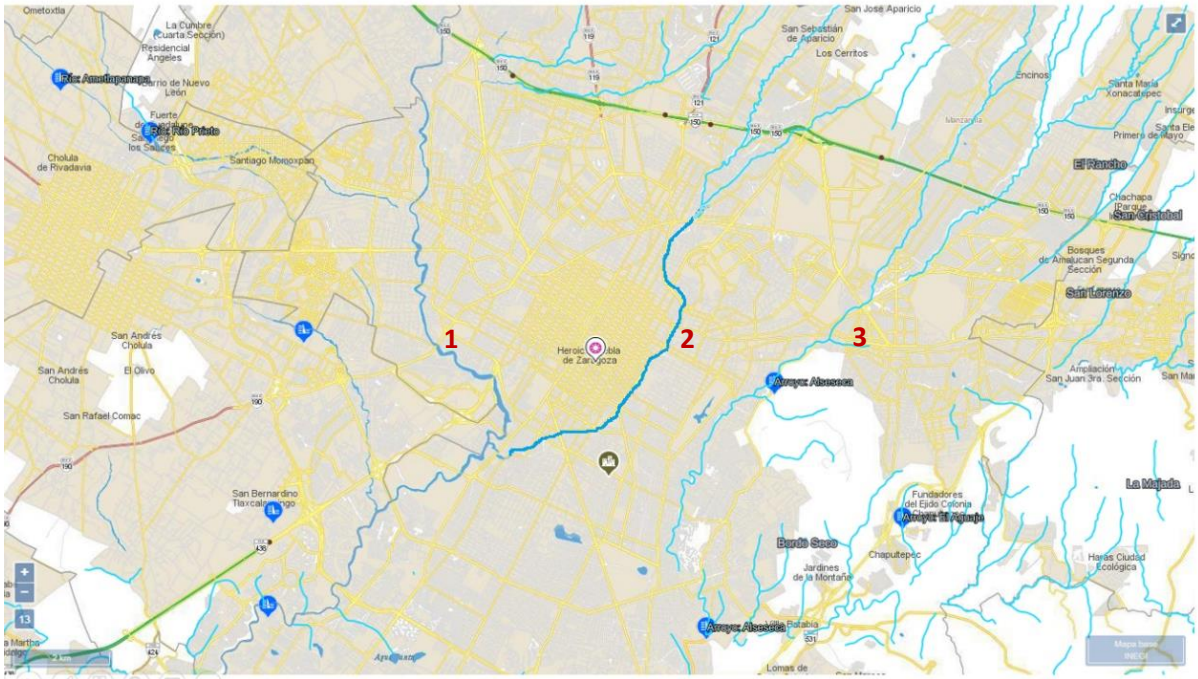


Figura 5. De izquierda a derecha 1. Río Atoyac, 2. Río San Francisco, 3. Río Alseseca. Tomada de inegi.org.mx/temas/hidrografía modificada por Mónica Adriana Tejeda Hernández

4.3. Ríos como vehículo de microorganismos patógenos

Entre algunos de los ríos presentes en Puebla se destacan: el Atoyac, San Lorenzo, Necaxa, Cazones, Rabanillo, Nexapa, Xochiac, Acatlán, Alseseca y Mixteco, el río Atoyac por ejemplo es uno de los ríos más contaminados de nuestro país. Se ha demostrado que existe una relación proporcional entre el aumento de los niveles de bacterias coliformes totales y el aumento en las enfermedades gastrointestinales en las personas que viven en las comunidades cercanas (10).

Actualmente la CONAGUA cuenta con una red nacional de medición de la calidad de agua cuyo objetivo es proveer resultados confiables legalmente defendibles y oportunos que puedan transformarse en información para la toma de decisiones sobre el manejo del recurso hídrico (15). Consta de aproximadamente 5,000 sitios de muestreos de los cuales 101 son puntos de muestreos localizados en los ríos de Puebla, como parámetros bacteriológicos se han considerado la búsqueda de: coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Enterococos* considerando los siguientes rangos de clasificación: Agua excelente <100 NMP/100ml, buena calidad de 100-200 NMP/100ml, aceptable de 200-1,000 NMP/100ml, contaminada de 1,000-10,000NMP/ml y fuertemente contaminada ≥10,000 NMP/ml (16).

La CONAGUA ha concluido que a nivel nacional el 30% de los puntos de muestro se encuentran en la clasificación fuertemente contaminados, 22% contaminada, 16% aceptable, 4% buena calidad y 28% excelente calidad con respecto al indicador de coliformes fecales en 2019. En la región No. 4, Rio Balsas, el 58% se clasificó como fuertemente contaminadas, 13.4% contaminada, 8.9% aceptable, 2.4% buena calidad y 17.2% excelente calidad, siendo esta región la más contaminada a nivel nacional y la región de estudio de este trabajo (17).

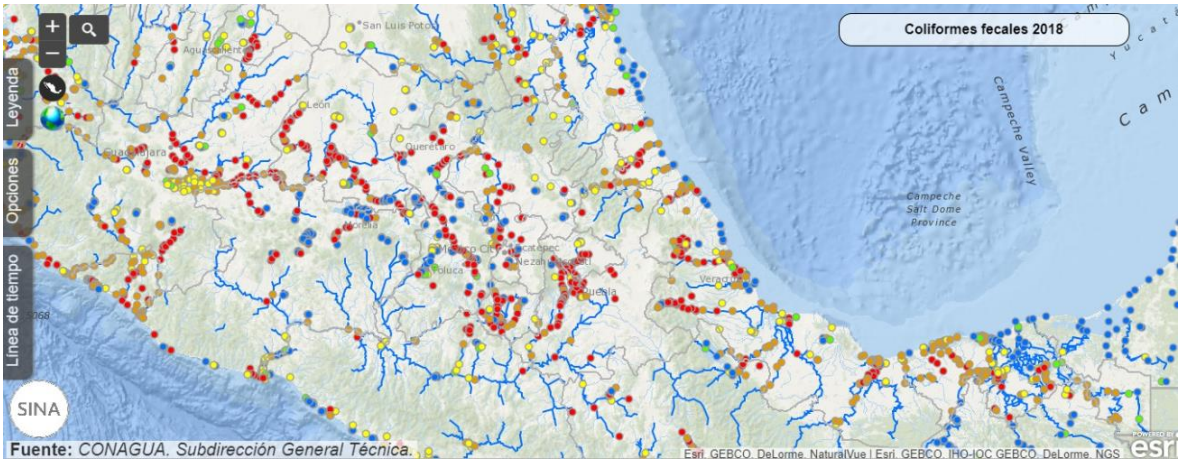


Figura 6. Puntos de muestro de la Red de medición de calidad de agua. Tomada de CONAGUA.gob.mx

En la Figura 6, se encuentran en azul, aquellos puntos con un agua bacteriológicamente excelente, verde para agua con buena calidad, amarillo para agua aceptable, naranja para agua contaminada y rojo para agua fuertemente contaminada. Considerando a los ríos Atoyac, Alseseca y San Francisco se puede observar en la Figura 6 que en su mayoría los puntos se han clasificado como agua fuertemente contaminada.

Considerando un nivel internacional, se han realizado estudios en los ríos Aliakmon y Axion ubicados en Grecia en donde se han recuperado hasta 19 serotipos diferentes de *Salmonella* spp en casi el 30% de las muestras, estos ríos se consideran como fuentes potenciales de contaminación para el hombre y los animales (11). Por otra parte, en otro estudio realizado en aguas de ríos y lagos de Grecia, se recuperaron 79 cepas de *Salmonella* spp. resistentes a 20 antibióticos, así como se observó el comportamiento simbiótico que tienen *Salmonella* spp. y *E. coli* en donde 5 de las cepas de *Salmonella* spp pudieron transferir el factor R al receptor de *E. coli* provocando la transferencia de la resistencia a ciertos antibióticos (12).

En Addis Ababa, Etiopia las aguas residuales de los hospitales son descargadas en los ríos aledaños a ellos, en 2019 se recolectaron 24 muestras en diversos puntos de los ríos y de dichas descargas, se pudieron recolectar 54 cepas pertenecientes

a los siguientes géneros bacterianos: *E. coli* (32%), *Salmonella* spp. (23%), *Klebsiella pneumonie* (15%), *Enterobacter aerogenes* (11%), *Citrobacter* (7%), *Klebsiella oxytoca* (6%) y *Enterobacter cloacae* (6%). Las cepas recolectadas del Hospital de Especialidad Tikur Anbessa fueron resistentes hasta a 12 antibióticos, es por lo que se concluye que aquellas enterobacterias que son aisladas de las aguas residuales de los hospitales son resistentes a antibióticos de uso común lo que significaría un problema de salud pública debido a la diseminación de estos microorganismos (13).

Por otra parte, en 2013 se realizó un estudio transversal en donde se evaluó un sistema fluvial utilizado para la agricultura y consumo animal que consta de 1345 hectáreas de donde se recuperó *Salmonella* spp en el 62.7% de las 384 muestras analizadas, se observó un comportamiento proporcional con respecto al número de cepas de *Salmonella* spp recuperadas y la densidad animal por hectárea muestreada. De estas cepas el 49.5% fueron resistentes a por lo menos un antibiótico y 18% fueron catalogados como cepas multirresistentes, estos resultados indican una estrecha relación entre la agricultura animal y la resistencia a los antibióticos (14).

En una región agrícola en el estado de California Estados Unidos, la cual utiliza el agua de los ríos, lagos y arroyos para el riego de los cultivos, se realizaron muestreos durante 2 años en 30 diferentes puntos, en donde se observó la presencia de *Salmonella* spp en el 65% de las muestras analizadas, a su vez existieron 14 sitios en los que *Salmonella* spp estuvo presente el 90% del tiempo en el que se realizó el estudio existiendo una prevalencia ligeramente menor a finales de otoño (29).

En México hay muy pocos datos acerca de la investigación de este patógeno en las aguas de los ríos por lo que es de suma importancia el estudio de *Salmonella* spp*,* así como de su comportamiento ante antibióticos debido a la fácil diseminación de este patógeno a los diferentes sectores a través del agua.

4.4. *Salmonella* spp

Estudiada por primera vez por el científico Daniel Elmer Salomon, esta bacteria es un bacilo Gram negativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae,* aerobios o anaerobios facultativos, móviles, su temperatura óptima de desarrollo se sitúa entre de 35 y 37°C con un margen que va desde los 6°C, con tiempos de generación largos hasta los 45°C, se desarrolla activamente con un pH cercano a la neutralidad, su pH óptimo va de 6.5-7.5 donde se consideran limitantes para su desarrollo un pH inferior a 3.8 y superior a 9.0, su actividad de agua óptima es de 0.99 (10).

Su hábitat es el tracto intestinal de los humanos, animales de abasto, de compañía, roedores, aves etc. Incluso se ha recuperado del sedimento aguas de estanque, de riego, así como de manos, superficies y utensilios de cocina entre otros. *Salmonella* spp se destaca entre los microorganismos patógenos debido a su prevalencia, causante de salmonelosis, la cual hoy en día es una de las enfermedades más comunes de transmisión por los alimentos y una de las principales cuatro causas de enfermedades diarreica (18).

Este género contiene alrededor de 2,500 diferentes serovares todos considerados potencialmente patógenos para el hombre, siendo *S. enteritidis* la de mayor interés en la salud pública (24), se considera que este género está formado por dos especies: *Salmonella entérica y Salmonella bongori,* esta última engloba 6 subespecies: *entérica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *índica* (19).

4.5. Salmonelosis

La salmonelosis es un proceso infeccioso en donde la clínica en el hombre puede ir desde formas muy agudas que pueden terminar fatalmente hasta casos muy leves o del todo asintomáticos. El periodo de incubación puede variar desde 3 hasta 72 horas, con una tendencia de 12-20 horas, esto va a depender de diversos factores como son el, número de microorganimos consumidos, su virulencia y la susceptibilidad del individuo entre los más importantes. Dentro de un mismo brote es posible observar periodos de incubación extremos (22).

Los síntomas entre los individuos más susceptibles suelen aparecer abruptamente iniciándose con dolor abdominal en la parte alta, náuseas, vómito y diarrea. Hay sensación de malestar intenso y cefalea fuerte, sin embargo, el proceso puede hacerse septicémico y presentarse una elevación de la temperatura de 38-39°C, en algunos casos la diarrea puede ser sanguinolenta e incluso el cuadro clínico puede conducir a una meningitis salmonelósica (22) Las infecciones gastrointestinales normalmente se relacionan a los serovares que existen en los animales y en las personas, con una tasa de mortalidad situada entre 0.1 y 0.2% (23).

Existen dos tipos de enfermedad, la gastrointestinal con síntomas como vómito, diarrea, cólicos y fiebre, con una duración máxima de una semana para personas aparentemente sanas, mientras que para aquellas personas que se encuentren inmunocomprometidas este patógeno puede diseminarse a otros órganos causando enfermedades más graves; La segunda es tifoidea, generalmente se presenta con fiebre alta, dolor de cabeza, letargo y en ocasiones erupciones, se puede contraer por el consumo de aguas contaminadas, se estima que en 2014 hubo 21 millones de casos ocasionando 222,000 muertes por fiebre tifoidea en el mundo (24).

4.6. *Salmonella* spp en el agua

Salmonella spp puede multiplicarse en aguas de ríos contaminados por aguas de albañal bajo condiciones favorables, cabe mencionar que se consideran una multitud de factores que deciden en última instancia el destino final de los microorganismos presentes (20), pero puede esperarse una sobrevivencia lo bastante larga bajo ciertas circunstancias lo cual conduciría a un peligro actual a la población que hace uso de estas aguas.

Se ha observado la presencia y persistencia de *Salmonella* spp en aguas superficiales tales como ríos, lagos y estanques, mientras que las aguas subterráneas han demostrado ofrecer una mejor calidad microbiana para el riego (25).

Debido a la frecuencia con la que se han recuperado *Salmonella* spp de muestras de aguas superficiales, 65% de las moderadamente contaminadas, 38% mínimamente contaminadas y 44% de las no contaminadas con desechos orgánicos, se apoya la posibilidad de que este microorganismo se multiplique y de que lleve ahí una vida libre en condiciones naturales (20).

Se ha demostrado que *S. entérica* tiene la capacidad de transmitirse a las raíces de las plantas a través del agua de riego utilizada y posteriormente a las partes comestibles de ellas (21). Por lo tanto, el aislamiento de *Salmonella* spp a partir de agua de ríos conduce a la conclusión de que cualquier agua natural sobre la superficie de la tierra no puede manejarse con el carácter de potable.

5. JUSTIFICACIÓN

Tomando como fundamento los resultados emitidos por la CONAGUA en 2019, es de esperarse altos niveles de enterobacterias en los ríos de la ciudad de Puebla y en acuerdo con el Centro de Control y Prevención de enfermedades (CDC, por sus siglas en ingles) de EE. UU., *Salmonella* spp. se encuentra entre las primeras cinco bacterias causantes de enfermedades por consumo de agua y alimentos contaminados, ya que esta puede ser excretada por pacientes enfermos, convalecientes y/o portadores.

Considerando que el agua de los ríos se encuentra fuertemente contaminada por los desechos generados por la población y la industria aunado a malas prácticas como el riego de cosechas con agua de ríos, la utilización de esta para uso y/o consumo humano en algunas comunidades o para la hidratación de los ganados, es fácil poder encontrar prácticas que favorezcan la contaminación del agua y alimentos con bacterias multirresistentes ocasionando que estan causen un daño a la salud pública. En este trabajo, se realizaron muestreos de los ríos Alseseca, Atoyac y San Francisco ubicados en la ciudad de Puebla con el objetivo de recuperar cepas de *Salmonella* spp y observar su resistencia a los antibióticos.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Investigar la presencia de *Salmonella* spp*.* en muestras de aguas obtenidas de los tres ríos que cruzan la ciudad de Puebla.

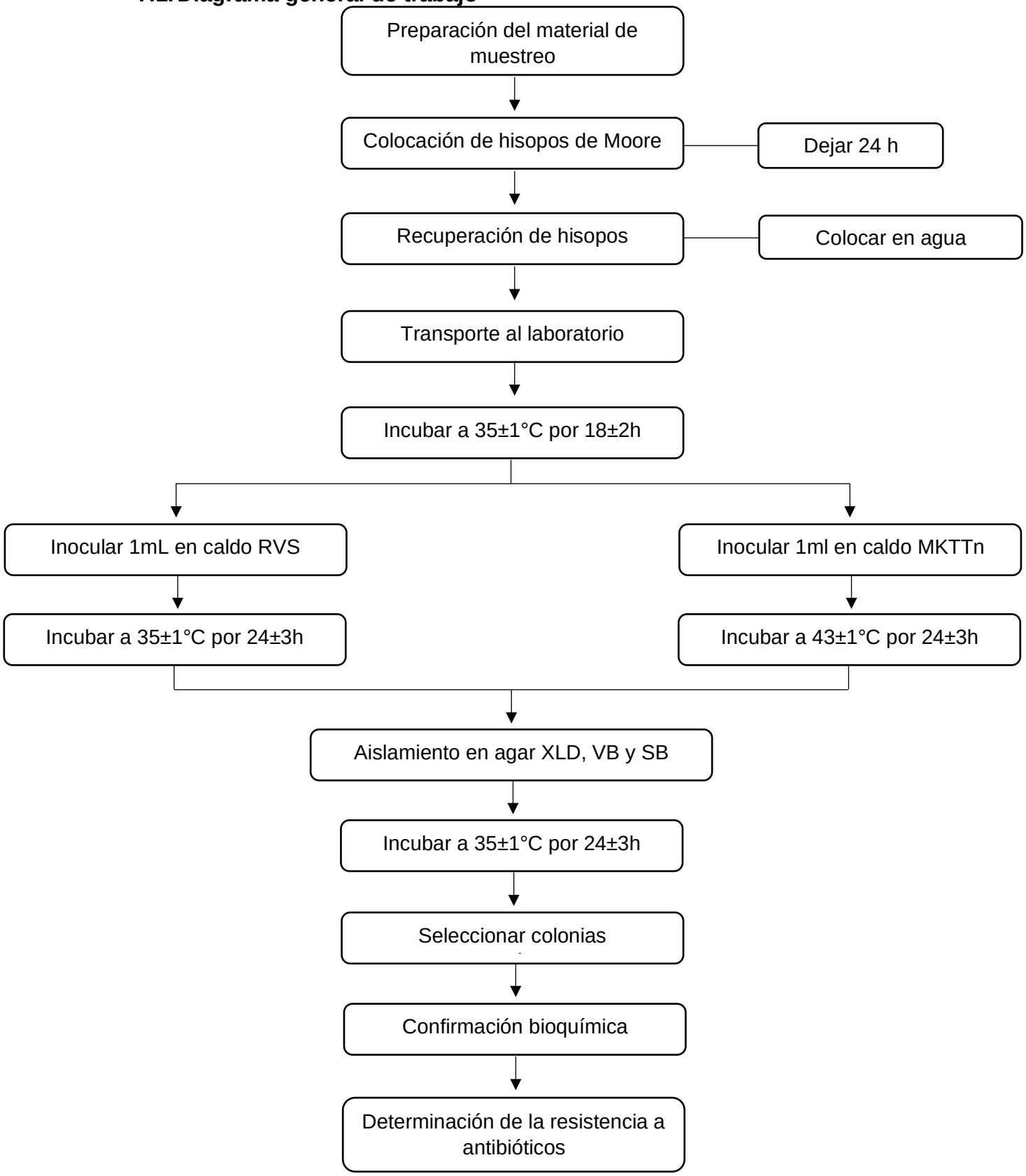
6.2. Objetivos específicos

Recuperar cepas de *Salmonella* spp de las muestras de aguas obtenidas de ríos que cruzan la ciudad de Puebla

Realizar la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos de uso común para determinar la resistencia a antibióticos de las cepas recuperadas.

7. METODOLOGÍA

7.1. Diagrama general de trabajo



Fuente: Diseño del estudio

7.2. Materiales y cuadro de métodos

Material de vidrio y reactivos de grado analítico los necesarios para cada determinación

Tabla 1. Equipo utilizado

Equipo	Modelo	Marca
Autoclave	E-20C	EPIXA
Baño María	NC	RIOSSA
Báscula digital	TA302	TRAVELER
Incubadora	NC	RIOSSA
pH metro	35624-00	OAKLON
Pipeta 100µl	11Z1920	BRAND
Pipeta 1000µl	822660285	CLINIPET
Termómetro	76 MM	LAUKA
Termómetro	350	LAUKA
Vortex mixer	VM-1000	DIGISYSTEM

NC. No contiene

Tabla 2. Métodos utilizados

Determinación	Método	Referencia
Toma y manejo de muestras	Modificación de la técnica de muestreo para la detección de *Vibrio cholerae* en agua y alimentos.	Manual de técnicas y procedimientos para la detección de *Vibrio cholerae* en agua y alimentos (26).
Aislamiento de *Salmonella* spp	Pre-enriquecimiento Enriquecimiento Aislamiento Confirmación bioquímica Pruebas serológicas	Apéndice A de la NOM-210-SSA1-2014 (28).
Determinación de resistencia a antibióticos	Técnica de Kirby-Bauer	Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized disc method (27).

7.3. Descripción de métodos

Diseño de la investigación:

Experimental

Tipo de estudio:

Observacional transversal

Tamaño de muestra

19 isopos

Sede y lugar de muestreo

19 puntos ubicados dentro de la ciudad de puebla distribuidos de acuerdo a lo descrito en la Tabla 3

Periodo de muestreo

15 de marzo 2019 – 16 de marzo del 2019

Criterios de inclusión

Isopos con una exposición mínima de 24h colocados en los ríos Atoyac, Alseseca y San Francisco

Criterios de exclusión

Isopos con una exposición menor a 24h y/o que no hayan sido colocados en los ríos Atoyac, Alseseca y San Francisco

Criterios de eliminación

Isopos que hayan sido arrastrados por el caudal del río

Análisis estadístico de la información

Estadística simple con interpretación de gráficos

Preanalítico

Se realizó el muestreo utilizando hisopos de Moore, los cuales fueron elaborados a mano con tela tipo gasa de aproximadamente 30x30cm doblados entre sí, a estos se les coció una hilaza la cual fue utilizada para fijar el hisopo al río. Se colocaron hisopos en 19 puntos a lo largo de tres ríos, ver Tabla 3, 7 hisopos sobre el río Alseseca, 10 sobre el río Atoyac y 2 sobre el río San Francisco de la ciudad de Puebla el día 15 de marzo del 2020 y se dejaron por un periodo de 24 h. Se ha demostrado que la cantidad mínima recomendada para nuestros microbiológicos de agua de ríos es de 10 litros (30) por lo que el uso de los hisopos hace que el muestro sea más representativo, una vez transcurrido este tiempo, fueron transferidos a frascos de boca ancha y tapa de rosca con agua peptonada para poder ser transportados, al laboratorio LERIM ubicado en Francisco I. Madero 310-1, La Libertad,72130, Puebla, Puebla.

Tabla 3. Puntos de muestro ubicados en los 3 ríos de estudio

No.	Zona	Coordenadas	Área
1	Atoyac	19°05'41.9"N 98°14'12.1"W	Obreros independientes
2	Atoyac	19°04'07.8"N 98°14'31.2"W	Puente México
3	Atoyac	19°03'12.6"N 98°14'26.7"W	25 poniente
4	Atoyac	19°02'31.3"N 98°14'16.0"W	Triángulo
5	Atoyac	19°01'06.5"N 98°13'58.4"W	Angelópolis
6	Atoyac	19°01'11.9"N 98°13'53.8"W	Agua azul
7	Atoyac	19°01'19.3"N 98°13'43.1"W	Metropolitano
8	Atoyac	19°01'29.8"N 98°13'29.9"W	Cúmulo de virgo
9	Atoyac	19°00'47.3"N 98°14'46.8"W	Barroco
10	Atoyac	18°59'51.5"N 98°15'28.2"W	Periférico
11	Alseseca	18°58'10.2"N 98°11'22.3"W	Periférico/Valsequillo
12	Alseseca	18°59'12.5"N 98°11'07.8"W	Valle de los Ángeles
13	Alseseca	18°59'43.6"N 98°11'13.1"W	Post La Margarita
14	Alseseca	19°00'42.1"N 98°11'21.9"W	Pre La Margarita
15	Alseseca	19°01'43.8"N 98°10'54.6"W	Parque ecológico
16	Alseseca	19°02'42.2"N 98°09'35.6"W	Seminario
17	Alseseca	19°03'57.3"N 98°09'09.3"W	Bosques de Manzanilla
18	San Francisco	19°01'28.8"N 98°12'57.3"W	Plaza Américas
19	San Francisco	19°01'17.7"N 98°13'12.5"W	Av. Nacional

Analítico

Pre-enriquecimiento

Los frascos de agua peptonada que con los hisopos de Moore se incubaron a 35±2°C por 18±2 h.

Enriquecimiento

Partiendo del agua peptonada se transfirió 1ml a caldo RVS y caldo MKTT incubando a 35±1°C por 24±3 h y 43±1°C por 24±3 h respectivamente.

Aislamiento

De los tubos positivos en la etapa de enriquecimiento y con ayuda de un asa de 10µl se inoculó en agar XLD, agar VB y agar SB y se dejaron incubar a 35±1°C hasta por 48±3 h.

Confirmación bioquímica

Se seleccionaron las colonias que cumplían con la siguiente descripción: Agar XLD, aquellas colonias circulares con bordes definidos de color rosa con centro negro, planas y con un diámetro de 1-2 mm. Agar VB, aquellas colonias circulares con bordes definidos de color rosa o transparente por el vire del medio a rosa convexa y en ocasiones planas y con un diámetro de 1 hasta 3 mm. Agar SB, aquellas colonias circulares con o bordes definidos de color negro-plata con presencia de un halo plateado, planas y con diámetro de 1 hasta 3 mm

Las colonias sospechosas se inocularon en tubos con agar TSI, LIA por estría en la superficie inclinada y por punción en el fondo y MIO por punción, se incubo a 35±1°C por 24±3 h. Se considero como positivas para *Salmonella* spp a aquellas con las siguientes reacciones: Agar TSI, en el fondo se observó vire del indicador debido a la fermentación de la glucosa, en la superficie del medio se observó un color rojo más intenso que el medio original debido a la no fermentación de la lactosa ni de la sacarosa, en la mayoría de los casos se observó coloración negra a lo largo de la punción debido a la producción de ácido sulfhídrico. Agar LIA, se observó intensificación del color púrpura en todo el tubo por la descarboxilación de la lisina,

la mayoría de las cepas de *Salmonella* spp*.* produjeron ácido sulfhídrico a lo largo de la punción. Medio MIO, se observa un color gris-púrpura debido a la descarboxilación de la ornitina, se consideraron como negativos aquellos cultivos que produjeron claramente color amarillo en el fondo del medio.

Prueba de sensibilidad a los antimicrobianos para determinar resistencia a antibióticos.

De las cepas identificadas como *Salmonella* spp se realizaron suspensiones y se inocularon, por el método de Kirby-Bauer, en cajas con Agar Mueller Hilton con previa prueba de esterilidad, se colocó un sensidisco Multibac ID Gram Negativos Serie 2 y se dejó incubar por 24±3 h, terminado este tiempo se realizaron mediciones a los halos de inhibición observados.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El 26% de las 19 muestras analizadas fueron positivas para *Salmonella* spp, es importante mencionar que durante el proceso de las muestras en las cajas con Agar Verde Brillante se desarrolló swarming, siendo este muy invasivo en las cajas lo que dificulto el aislamiento del patógeno de interés, este comportamiento es una característica importante para el género *Proteus spp,* confirmando posteriormente su presencia en el 26% de las muestras analizadas mediante su aislamiento e identificación bioquímica.

En la Tabla 4 se observan los 5 puntos positivos a *Salmonella* spp junto con el número de cepas recuperadas por punto. Se recuperó *Salmonella* spp del 10% de las muestras del río Atoyac, 57% de las muestras del río Alseseca y no se recuperó este patógeno del río San Francisco cabe aclarar que durante el muestreo y la recolección de los hisopos este Rio fue en donde se observó lo siguiente: caudal más bajo, agua ligeramente cristalina, lo suficiente para ver vegetación dentro del río, sin aromas desagradables, siendo sus hiposos los menos sucios.

Tabla 4. Puntos de muestreo positivos a *Salmonella* spp

No.	Zona	Área	Cepas recuperadas
9	Atoyac	Barroco	2
11	Alseseca	Periférico/Valsequillo	7
12	Alseseca	Valle de los Ángeles	3
13	Alseseca	Post La Margarita	1
14	Alseseca	Pre La Margarita	6
		Total	19

Por otro lado, el agua de los ríos Atoyac y Alseseca, presentaba un color café-negro, con agua muy turbia y se pudo observar la formación de una masa negra en la orilla del río Atoyac, ambos desprendían olores desagradables y se lograron ver animales muertos a orillas de estos ríos

En la Tabla 5 se describen los 12 antibióticos utilizados, así como la abreviatura empleada.

Tabla 5. Antibióticos utilizados

Abreviatura	Antibiótico
AK	Amikacina
AM	Ampicilina
CB	Carbenicilina
CF	Cefalotina
CFX	Cefotaxima
CPF	Ciprofloxacina
CL	Cloranfenicol
GE	Gentamicina
NET	Netilmicina
NF	Nitrofurantoína
NOF	Norfloxacina
SXT	Trimetoprim Sulfametoxazol

La Tabla 6 describe en color verde aquellas bacterias sensibles al antibiótico señalado y en rojo aquellas resistentes al antibiótico, esto en función del diámetro, en milímetros, de inhibición medido y las indicaciones del fabricante del sensidisco

Tabla 6. Comportamiento con antibióticos en color verde indicando sensibilidad y rojo resistencia

No	AM	AK	CB	GE	CF	NET	CFX	CPF	NOF	CL	SXT	NF
1	25	16	21	12	23	14	31	20	22	23	23	17
2	20	14	20	10	25	12	31	16	20	25	22	20
3	22	20	25	10	23	12	20	0	18	20	23	19
4	20	19	24	16	24	13	29	15	16	23	18	16
5	18	16	23	16	22	14	30	15	18	25	20	17
6	20	20	25	18	23	16	30	16	20	26	24	19
7	19	19	22	20	23	18	31	20	16	20	20	17
8	19	16	20	16	20	16	28	19	20	24	20	18
9	18	17	22	14	25	18	31	19	18	22	18	22
10	18	16	20	14	18	14	25	21	20	20	18	16
11	20	16	22	12	22	16	26	22	19	24	20	20
12	16	14	20	12	20	14	27	21	22	20	16	15
13	15	13	20	14	20	14	25	20	16	20	16	18
14	17	18	21	16	23	18	30	27	23	22	20	19
15	17	18	24	14	19	14	31	25	25	0	0	17
16	18	18	22	16	21	14	26	21	0	0	0	16
17	18	18	23	16	25	8	31	23	21	24	20	17
18	0	20	0	16	23	13	28	17	17	0	0	15
19	0	14	0	12	16	11	27	20	14	0	10	18

Fuente: Resultados de laboratorio

En la Figura 7 se puede observar que el 100% de las cepas recuperadas de *Salmonella* spp mostro resistencia a por lo menos 2 antibióticos, el 16% de las cepas fueron resistentes a 2 antibióticos, mientras que el 84% restante fue resistente a 4 o más antibióticos, las cepas No. 13 y 19 ambas recuperadas en el rio Alsea a la altura de la colonia La Margarita mostraron la mayor multiresistencia con 10 antibióticos.

La multiresistencia de la *Salmonella* spp recuperada de ambientes acuáticos se ha visto incrementada en los últimos años en diversos países, tal es el caso de Grecia en un estudio publicado en 2012 se realizaron muestreos a 2 ríos, con un total de

240 muestras se recuperaron 28 cepas de *Salmonella* spp*, S. enteritidis* (23), *S. thompson* (3) and *S. virchow* (2), en donde se observó una multiresistencia del 34.8% de las *S. enteritidis* y en el 100% *de las S. Virchow* aisladas (34). Por otro lado, en Brazil en un periodo contemplado de octubre 2006 a octubre 2010 se recuperaron 241 cepas de *Salmonella* spp de las cuales el 57.7% mostro resistencia a por lo menos 2 antibióticos, 34.6% a 3 y el resto a 4 antibióticos (14)

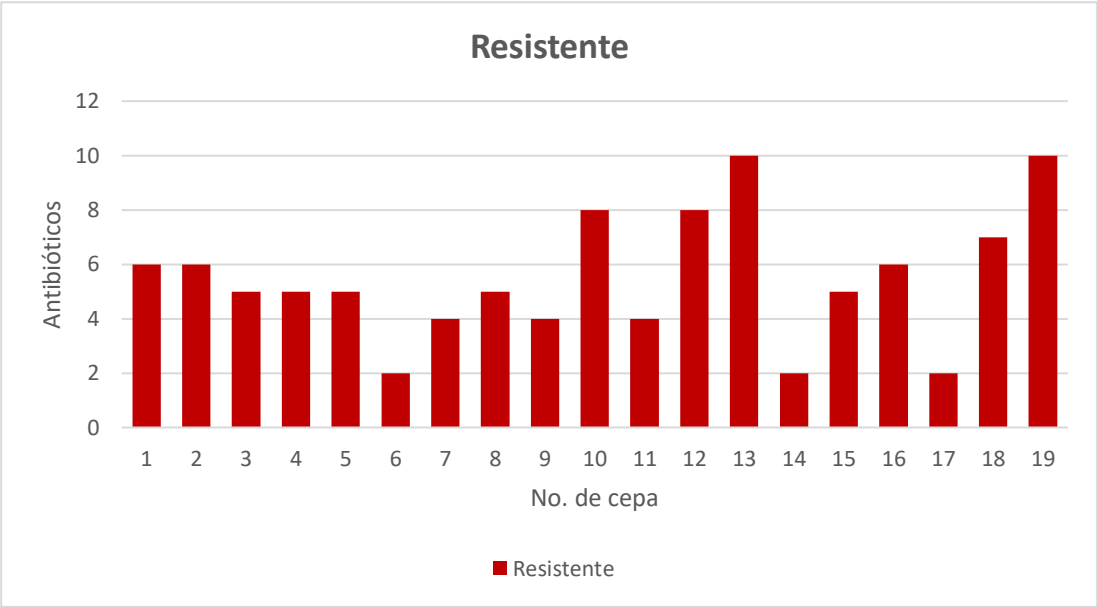


Figura 7. Resistencia de Salmonella spp a diferentes antibióticos

Fuente: Resultados de laboratorio

La Figura 8 demuestra el comportamiento que se obtuvo con las cepas de *Salmonella* spp recuperadas, el 100% de las cepas fue resistente a Trimetoprim Sulfametoxazol, seguido por Carbenicilina con un 79% de resistencia mostrada, resultado similar al obtenido en un estudio publicado en 2006 en donde de 72 muestras analizadas del rio Alsesca se obtuvieron 100 cepas de diferentes tipos de enterobacterias de las cuales el 87.9% fue resistente a Carbenicilina (8). Netilmicina y Ciprofloxacina fue el 3er antibiótico con mayor porcentaje de resistencia con 63% de las cepas recuperadas, el antibiótico con menor porcentaje de resistencia fue Cefotaxima en donde solo el 16% mostro resistencia a él.

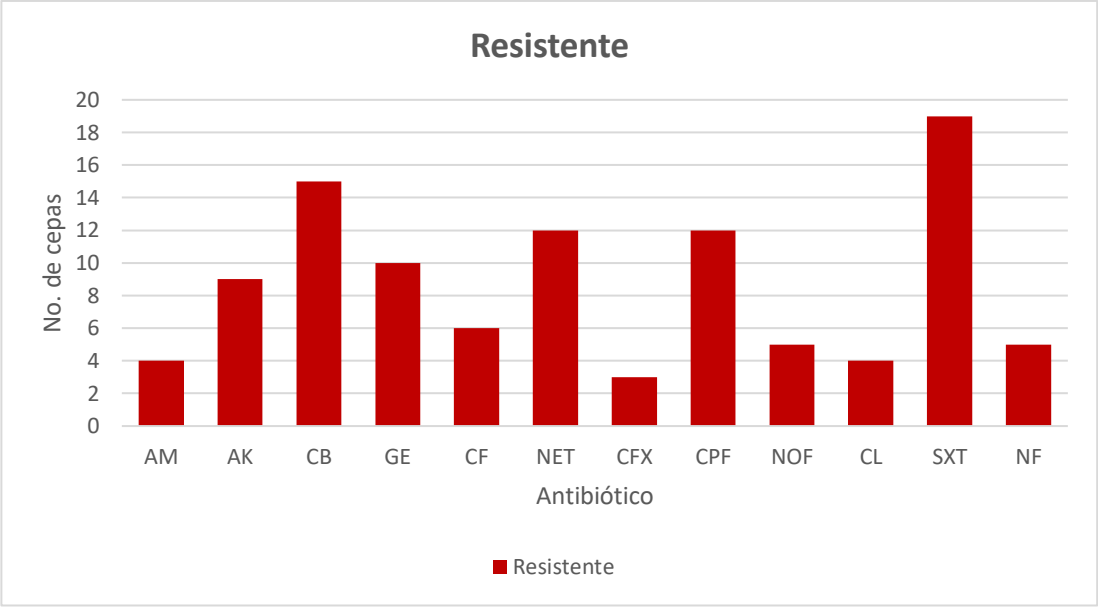


Figura 8. Comportamiento de resistencia a diferentes antibióticos

Fuente: Resultados de laboratorio

Como se observa en la Figura 9 todas las cepas de *Salmonella* spp fueron sensibles a por lo menos 2 antibióticos, mientras que 3 cepas fueron sensibles hasta a 10 antibióticos. Con respecto al comportamiento en los antibióticos, ninguna cepa recuperada fue sensible a Trimetoprim Sulfametoxazol mientras que Cefotaxima fue el antibiótico con mejor inhibición para este patógeno con el 84% de las cepas sensibles a él, seguido por Amikacina y Cloranfenicol con el 79% de sensibilidad como se señala en la Figura 10.

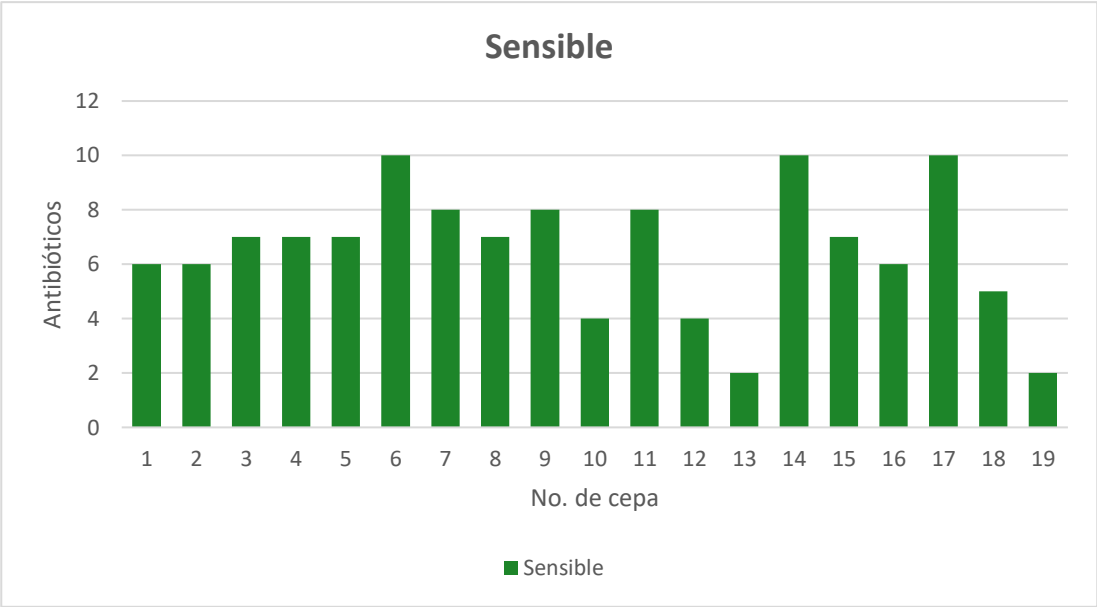


Figura 9. Sensibilidad de *Salmonella* spp a diferentes antibióticos

Fuente: Resultados de laboratorio

De las 10 muestras provenientes del río Atoyac sólo se recuperó *Salmonella* spp en el 10% de ellas, obteniendo 2 cepas ambas mostraron el mismo comportamiento de resistencia-sensibilidad a los antibióticos utilizados, el porcentaje de recuperación es bajo, sin embargo el ambiente en el que las bacterias se encuentran en este río son extremas, esto sin duda tiene repercusión en la recuperación del microorganismo de interés, en el 100% de las muestras se recuperó una carga considerable de bacterias coliformes, lo que supone la alta carga microbiana en el río, en acuerdo con los resultados emitidos en 2018 por la CONAGUA a través de la red nacional de medición de calidad del agua.

Sin embargo, la alta densidad de bacterias coliformes en el río Atoyac, nos sigue sugiriendo un riesgo potencial a la salud, mismo que es reportado en 2013 en un estudio de modelos ecológicos aplicado en los municipios de Nativitas, San Miguel Xoxtla, Santa Apolonia Teacalco, Tepetitla, Tetlatlahuca y Tlaltenango los cuales se ubican dentro del transcurso del rio Atoyac con dirección a la ciudad de Puebla y en donde se concluye que existe una relación directa entre la tasa de enfermedades gastrointestinales y los niveles de contaminación en estos municipios (31).

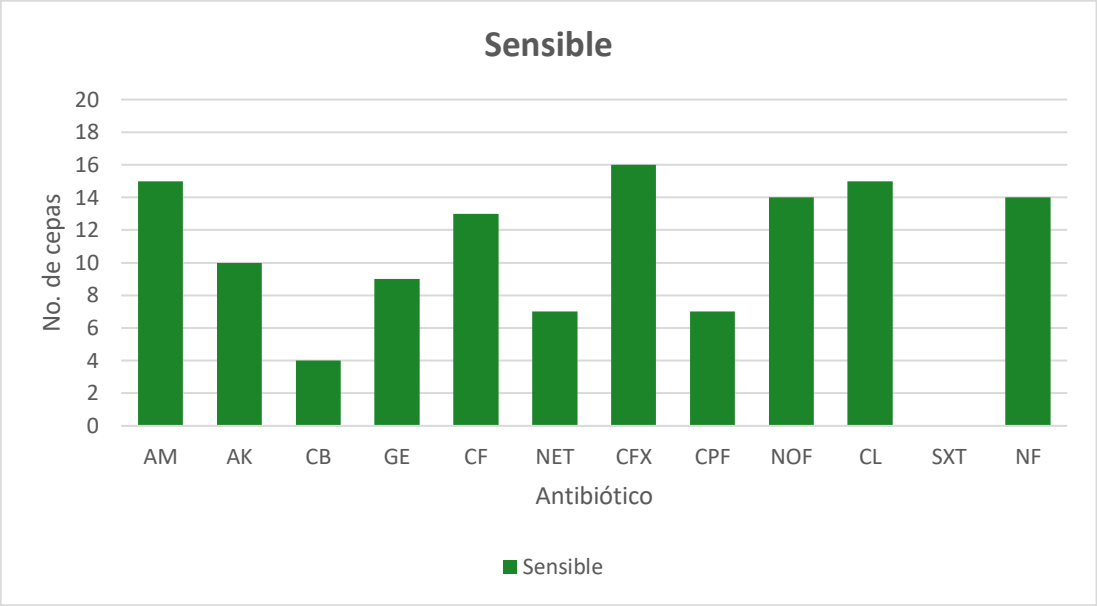


Figura 10. Comportamiento de sensibilidad a diferentes antibióticos

Fuente: Resultados de laboratorio

Para el procesamiento de las muestras, se puede observar cómo se utilizaron 2 medios de enriquecimiento selectivo y 3 diferentes Agares para el aislamiento de *Salmonella* spp (XLD, VB y SB), se hace de esta forma debido a la selectividad de estos, siendo XLD el medio menos selectivo, seguido por VB y el más selectivo SB. El 100% de las cepas recuperadas tuvieron un enriquecimiento en caldo MKTT, el 10% se recuperó de Agar SB, 58% de Agar XLD y 31% en VB. Se considera entonces, para este tipo de matriz, que la mejor ruta para la recuperación de *Salmonella* spp es: Pre-enriquecimiento en Agua Peptonada, enriquecimiento selectivo en Caldo MKTT y aislamiento en Agar XLD. Ruta similar se propone en 2014 en un estudio realizado en EEUU para un monitoreo de un sistema de riego en una zona agrícola, utilizando caldo soya tripticasa como pre enriquecimiento seguido de un ensayo por PCR aquellas que fueran positivas fueron enriquecidas en Caldo MKTT como enriquecimiento selectivo para después poder ser aisladas en 3 diferentes XDL, SB y agar entérico Hektoen (35).

9. CONCLUSIONES

- Se recuperó *Salmonella* spp en el 26% de los puntos de muestreo ubicados en los ríos Alseseca, Atoyac y San Francisco.
- El 89% de las cepas de *Salmonella* spp recuperadas fueron obtenidas del río Alseseca.
- No se recuperaron cepas de *Salmonella* spp a partir del río San Francisco.
- El 100% de las cepas de *Salmonella* spp recuperadas son resistentes a por lo menos 2 antibióticos
- El 100% de las cepas de *Salmonella* spp recuperadas son resistentes a Trimetoprim Sulfametoxazol.
- La cepa con mayor multiresistencia fue recuperada en el transcurso del río Alseseca por la colonia La Margarita
- El 84% de las cepas de *Salmonella* spp recuperadas son sensibles a Cefotaxima.

10. RECOMENDACIONES

Para futuros estudios de *Salmonella* spp en ríos se recomienda realizar el muestro con ayuda de hisopos de Moore previamente esterilizados, utilizar agua peptonada para la fase de pre-enriquecimiento, caldo MKTTn como fase de enriquecimiento selectivo y para realizar el aislamiento agar XLD o VB adicionado con Sulfadiazina con el objetivo de inhibir flora asociada como *Proteus* spp

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Enciclopedia Ambiental Ambientum. (2018). España. Agua, Ríos. ,https://www.ambientum.com/enciclopedia_medioambiental/aguas/rios.asp
2. Fondo para la comunicación y la Educación Ambiental A.C., (2015), México, Cuerpos de Agua, https://agua.org.mx/cuerpos-de-agua/#vertiente-oriental-o-del-golfo
3. Gutiérrez Herrera, L., (2003), Regiones naturales y de planeación para el estado de Puebla, Análisis económico. XVIII (37). 257-296. ISSN: 0185-3937. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=413/41303713
4. Mastreta, S. (2017). México. Nexos, Atoyac, un río clínicamente muerto, https://www.nexos.com.mx/?p=32776
5. Comisión Nacional del Agua. (2019). México, Calidad del agua en México, https://www.gob.mx/conagua/articulos/calidad-del-agua
6. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2019). México. Cuenca Hidrológica Alto Atoyac. https://www.inegi.org.mx/contenido/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/702825189884.pdf
7. Martínez Andrés. (2019). México, Hidrología del Estado de Puebla. Https://www.paratodomexico.com/estados-de-mexico/estado-puebla/hidrologia-puebla.html
8. Rivera Tapia, J.A., Cedillo Ramírez, L., Guzmán Cortés, M., Giono Cerezo, S. (2006). Diagnóstico de enterobacterias en el río Alseseca. Revista de la Facultad de medicina, 49 (enero-febrero). https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2006/un061f.pdf.
9. Villanueva Lomelí, D., (2019). Río San Francisco. El Sol de Puebla. https://www.elsoldepuebla.com.mx/analisis/rio-san-francisco-4439111.html.
10. Fernadez Escartin, E. (2008). Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. México: Universidad Autónoma de Querétaro.
11. Arvanitidou, M., Kanellou, K., & Vagiona, D. G. (2005). Diversity of *Salmonella* spp. and fungi in northern Greek rivers and their correlation to fecal pollution

indicators. *Environmental Research*, *99*(2), 278–284. https://doi.org/10.1016/j.envres.2005.01.002

12. Arvanitidou, M., Tsakris, A., Constantinidis, T. C., & Katsouyannopoulos, V. C. (1997). Transferable antibiotic resistance among *Salmonella* strains isolated from surface waters. *Water Research*, *31*(5), 1112–1116. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00340-5
13. Tesfaye, H., Alemayehu, H., Desta, A. F., & Eguale, T. (2019). Antimicrobial susceptibility profile of selected Enterobacteriaceae in wastewater samples from health facilities, abattoir, downstream rivers and a WWTP in Addis Ababa, Ethiopia. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, *8*(1). https://doi.org/10.1186/s13756-019-0588-1
14. Palhares, J. C. P., Kich, J. D., Bessa, M. C., Biesus, L. L., Berno, L. G., & Triques, N. J. (2014). *Salmonella* and antimicrobial resistance in an animal-based agriculture river system. *Science of the Total Environment*, *472*, 654–661. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.052
15. Comisión Nacional del Agua, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2019). Red Nacional de Medición de la Calidad del Agua. http://sina.conagua.gob.mx/sina/mapas/Calidaddelagua.pdf
16. Comisión Nacional del Agua, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2019). Red Nacional de Medición de la Calidad del Agua. http://sina.conagua.gob.mx/sina/tema.php?tema=calidadAgua&ver=reporte&o=5&n=nacional.a
17. Comisión Nacional del Agua, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2019). Red Nacional de Medición de la Calidad del Agua. http://sina.conagua.gob.mx/sina/tema.php?tema=calidadAgua&ver=grafica&o=3&n=nacional.
18. Rodríguez, G. M. O., Márquez, G. M. y Hernández, M C., (2013), *Salmonella* en Riesgos Asociados al consumo de alimentos, 1ra edición, Universidad de Guadalajara, México p.51-91.

19. Tindal, B. J., Grimont, P.A.D., Garrity, G. M., y E-uze, J. P., (2005), Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella,* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55, p.521-524.
20. Fernández-Escartin, E., (1981), Microbiología Sanitaria Aguay Alimentos, Universidad de Guadalajara, p. 665-666
21. Levantesi, C., Bonadonna, L., Briancesco, R., Grohmann, E., Toze, S., & Tandoi, V. (2012), *Salmonella* in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission. *Food Research International*. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.037
22. Fernández-Escartin, E., (1981), Microbiología Sanitaria Aguay Alimentos, Universidad de Guadalajara, p. 704-706
23. Lucero Mejía J. E., (2016), Incidencia y comportamiento de *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes* en queso ranchero, Universidad Autónoma de Querétaro, p 18-19.
24. Food Safety. (2020). Salmonella. Junio, 05, 2020, de 3M Sitio web: https://www.3m.com.mx/3M/es_MX/food-safety-la/biblioteca-de-documentos/microorganismos/salmonella/
25. Liu, H., Whitehouse, C. A., & Li, B. (2018). Presence and Persistence of *Salmonella* in Water: The Impact on Microbial Quality of Water and Food Safety. *Frontiers in Public Health*, *6*. https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00159
26. Manual de técnicas y procedimientos para la detección de *Vibrio cholelerae* en agua y alimentos, (2018), Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. Ciudad de México. Segunda Edición.
27. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M., (1966), Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am. J. Clin. Pathol, p. 45: 493.
28. Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Fecha de publicación en el Diario Oficial de la Federación: 26/06/2015

29. Cooley MB, Quiñones B, Oryang D, Mandrell RE and Gorski L (2014) Prevalence of shiga toxin producing *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and *Listeria monocytogenes* at public access watershed sites in a California Central Coast agricultural region. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. **4**:30. doi: 10.3389/fcimb.2014.00030
30. Sharma M, Handy ET, East CL, Kim S, Jiang C, Callahan MT, et al. (2020) Prevalence of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in non-traditional irrigation waters in the Mid-Atlantic United States is affected by water type, season, and recovery method. PLoS ONE 15(3): e0229365. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229365
31. Morales Novelo, J. A., Rodríguez Tapia, L., Torres Ayala, F., (2013), Modelo de contaminación del río Atoyac e incidencia de enfermedades en la región de Puebla-Tlaxcala, http://www.amica.com.mx/issn/archivos/113.pdf
32. Dale la cara al Atoyac (2018). México, Observatorio, Infografías https://www.dalelacara.org/observatorio/infografias
33. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2010), México, Datos, Hidrografías https://www.inegi.org.mx/temas/hidrografia/#Mapa
34. Economou, Vangelis Gousia, Panagiota Kansouzidou, Athina Sakkas, Hercules Karanis, Panagiotis Papadopoulou, Chrissanthy. (2013). Prevalence, antimicrobial resistance and relation to indicator and pathogenic microorganisms of Salmonella enterica isolated from surface waters within an agricultural landscape. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 216, 435-444.
35. Li, Baoguang Vellidis, George Liu, Huanli Jay-Russell, Michele Zhao, Shaohua Hu, Zonglin Wright, Anita Elkins, Christopher A., (2014). Diversity and antimicrobial resistance of Salmonella enterica isolates from surface water in southeastern United States. Applied and Environmental Microbiology, 80, 6355-6365.