



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA**

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

“La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra”



**DIAGNÓSTICO DE LA PROBLEMÁTICA AMBIENTAL ASOCIADA A LA
RESISTENCIA MICROBIANA A SULFONAMIDAS EN LA REGIÓN DEL RÍO NEXAPA,
PUEBLA.**

TESIS

Que para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

EDUARDO CANEK REYNOSO CAMARGO

Director de tesis:
Dr. Eduardo Torres Ramírez



Agosto 2023



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



"La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra"

**DIAGNÓSTICO DE LA PROBLEMÁTICA AMBIENTAL ASOCIADA A LA
RESISTENCIA MICROBIANA A SULFONAMIDAS EN LA REGIÓN DEL RÍO NEXAPA,
PUEBLA.**

TESIS

Que para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

EDUARDO CANEK REYNOSO CAMARGO

Comité Tutorial:

Director	Dr. Eduardo Torres Ramírez
Co-Directora Externa	Dra. Ilaria Palchetti
Tutor	Dr. Ricardo Darío Peña Moreno
Integrante Comité Tutorial	Dra. Rosalba Ramírez Rodríguez
Integrante Comité Tutorial	Dr. J Santos Hernández Zepeda
Integrante Comité Tutorial	Dra. María Lilia Cedillo Ramírez

Agosto 2023

RESUMEN

La problemática de la resistencia a los antimicrobianos, en la actualidad, es considerada uno de los principales retos y amenazas en salud pública pero esta situación se extiende al ámbito económico y ecosistémico, pues tiene implicaciones directas e indirectas que repercuten de manera interrelacionada en su correcto funcionamiento. La resistencia a los antimicrobianos debe abordarse desde un enfoque integral considerando factores sociales, ambientales y tecnológicos partiendo desde un ámbito local y regional para poder entenderla y escalarla a un estrato estatal e incluso nacional por lo que en este trabajo se propone un diagnóstico de la presencia de genes de resistencia a sulfonamidas *sul1*, *sul2*, *sul3* y *sul4* en uno de los ríos más contaminados de Puebla, el río Nexapa. Se realizaron tres muestreos de agua de río en siete diferentes sitios del sistema hidrológico de Atlixco-Izúcar de Matamoros, a cada muestra se realizó un análisis de calidad de agua y la determinación de la presencia de los genes de resistencia a sulfonamidas mediante técnicas analíticas (PCR, electroforesis y biosensores electroquímicos). Adicionalmente, para poder desarrollar el diagnóstico se utilizó el modelo fuerzas motrices-presión-estado-impacto-respuesta, usando además herramientas metodológicas que abordan la problemática de manera sistémica, estas son sistemas de información geográfica, evaluación hidrográfica de la cuenca del Río Nexapa y análisis del discurso de los principales gobiernos municipales de la región. Se encontraron los genes de resistencia *sul1*, *sul2* y *sul3* en todos los sitios muestreados presentando variaciones en su presencia en los distintos periodos de muestreo. Mediante el análisis social y ambiental, se determinó que no hay el interés por parte de las administraciones municipales en combatir la problemática de la resistencia, además de que la alteración hidrológica, orografía en la región y variables fisicoquímicos y contaminantes del agua (temperatura, oxígeno disuelto, fósforo, magnesio y níquel) tienen un impacto en la proliferación y diseminación de los genes de resistencia. Este trabajo ofrece mecanismos para guiar acciones futuras y promover conciencia sobre la importancia de abordar la resistencia a los antimicrobianos de manera coordinada, enfatizando un enfoque integral e interdisciplinario proporcionando respuestas para desarrollar estrategias de vigilancia más profundas para hacer frente a este desafío emergente que afecta la salud pública, el medio ambiente y la economía a nivel regional, federal y global.

Palabras clave: resistencia a los antimicrobianos, resistencia a sulfonamidas, vigilancia ambiental, DPSIR, contaminación del agua

AGRADEZCO AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
(CONACyT) POR EL APOYO ECONÓMICO A TRAVÉS DE LA BECA
OTORGADA PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO

A LA BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA (BUAP)
POR DEJARME FORMAR PARTE DE ESTA GRAN INSTITUCIÓN

AL INSTITUTO DE CIENCIAS (ICUAP) POR POSIBILITAR MI
DESARROLLO PROFESIONAL

AL POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES POR PREPARARME
ACADÉMICAMENTE

AL CONSEJO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DEL ESTADO DE PUEBLA
(CONCyTEP) POR EL APOYO Y ESTIMULOS ECONÓMICOS

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que, directa o indirectamente, participaron en la realización de este trabajo y han formado parte de mi vida.

Al Doctor Eduardo Torres por el impulso, ánimo y grandes consejos para mi formación profesional.

A todo mi comité tutorial que encaminaron esta investigación, Dra. Rosalba, Dr. Ricardo, Dra. Lilia, Dr. J. Santos.

A la Doctora Norma Rojas que me apoyó en todo momento, y siempre estuvo ahí en los momentos más difíciles. Sus enseñanzas fueron un aporte fundamental, así como al Doctor Mario que su valioso aporte

A todos mis compañeros del laboratorio de Bionorgánica Aplicada, José Luis, Ixel, Luis, Gaby, Adriana, Alexis, Eren, Miguel Ángel y Ale.

A todo el equipo que me apoyó en mi preparación en la Universidad de Florencia, Patrick, Martin, Elisabetta, Emma, los Lorenzos, Nico, Serena y principalmente a la Dra. Ilaria Palchetti que sin su ayuda no me hubiera podido desarrollar académicamente.

A la Doctora Yaselda que nunca dejó de impulsarme y brindarme todo el apoyo que necesitaba en todo momento de mi formación.

A mis amigos y compañeros de generación por pertenecer a tan valiosas personas, Itzel, Maricarmen, Nit, Cris, Gina, Ingrid, Omar, Eliud, Sayra y todos los demás que por alguna situación no mencionara.

DEDICATORIAS

Este trabajo te lo dedico esencialmente a ti Yas, sin tu amor, apoyo, paciencia cariño y sabiduría no lo hubiera podido lograr. Eres la persona más importante y agradezco infinitamente que me dejes formar parte de tu vida y crecer en todos los aspectos a tu lado.

A toda mi familia, principalmente a mi mamá que nunca dejó de ser pilar y guía en mi vida. A mi papá y hermana que han sido parte de mi vida.

Este logro no solo es mío sino de todas las personas que estuvieron a mi lado en cada paso y contribuyeron en cada palabra.

CONTENIDO.

I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN.....	2
III. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	2
IV. HIPÓTESIS.....	3
V. OBJETIVOS.....	3
5.1. OBJETIVO GENERAL	3
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	3
VI. MARCO REFERENCIAL	3
6.1. RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS	3
6.1.1. <i>Mecanismos biológicos y genéticos de resistencia a los antimicrobianos</i>	5
6.1.2. <i>Aspectos ambientales de la resistencia a los antimicrobianos</i>	7
6.1.3. <i>Algunos aspectos sociales, económicos y políticos de la resistencia a los antimicrobianos</i>	10
6.1.4. <i>Generalidades sobre sulfonamidas y los genes de resistencia en microorganismos</i>	11
6.2. MARCO LEGISLATIVO	13
6.2.1. <i>Situación internacional de la resistencia a los antimicrobianos</i>	13
6.2.2. <i>Situación en México y la estrategia nacional contra la resistencia a los antimicrobianos</i>	14
6.3. MONITOREO Y VIGILANCIA AMBIENTAL DE MICROORGANISMOS RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS.....	15
6.3.1. <i>Programas de monitoreo para determinar la presencia de microorganismos resistentes</i>	15
6.3.2. <i>Técnicas de detección de RAM</i>	15
6.4. ANÁLISIS HIDROMÉTRICO Y MORFOMÉTRICO	17
6.5. TIPO DE INVESTIGACIÓN Y ENFOQUE EPISTEMOLÓGICO	19
6.5.1. <i>Tipos de investigación</i>	19
6.5.2. <i>Enfoque epistemológico y paradigma</i>	19
VII. DISEÑO EXPERIMENTAL	20
7.1. ZONA DE ESTUDIO	20
7.1.1. <i>Delimitación de la zona de estudio</i>	20
7.1.2. <i>Evaluación de parámetros morfométricos</i>	22
7.1.3. <i>Estimación de la alteración hidrológica</i>	23
7.2. EVALUACIÓN DE LAS DINÁMICAS SOCIALES	23
7.2.1. <i>Análisis del discurso de los gobiernos municipales</i>	23
7.3. ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE AGUA	25
7.3.1. <i>Toma de muestras</i>	25
7.3.2. <i>Caracterización de agua</i>	25
7.3.3. <i>Extracción de ADN libre y de microorganismos en el agua</i>	26
7.3.4. <i>Electroforesis de ADN total</i>	27
7.3.5. <i>Análisis por PCR</i>	27
7.4. DESARROLLO DEL BIOSENSOR	29
7.4.1. <i>Protocolo para la fabricación del biosensor y detección de genes sul1 y sul4</i>	29
7.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
7.6. DIAGNÓSTICO DE LA PROBLEMÁTICA AMBIENTAL	32
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	34
8.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO Y PARÁMETROS AMBIENTALES	34
8.1.1. <i>Zona de estudio</i>	34
8.1.2. <i>Elevación, temperatura y precipitación en la zona de estudio</i>	38
8.1.3. <i>Análisis de parámetros morfométricos</i>	40

8.1.4. Alteración hidrológica.....	44
8.2. EVALUACIÓN DE LAS DINÁMICAS SOCIALES	45
8.2.1. Análisis del discurso	45
8.3. CARACTERIZACIÓN DE AGUA.....	52
8.3.1. Parámetros en la toma de muestra	53
8.3.2 Evaluación de la calidad de agua.....	56
8.4. ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS GENES DE RESISTENCIA A SULFONAMIDAS	61
8.4.1. Extracción de ADN total.....	61
8.4.2. Análisis por PCR de los genes de resistencia a sulfonamidas.....	62
8.5. EVALUACIÓN DEL BIOSENSOR.	69
8.5.1. Análisis de repetibilidad.....	70
8.5.2. Análisis de selectividad para el gen <i>sul1</i>	71
8.5.3. Evaluación del biosensor en células modelo de <i>E. coli</i>	71
8.5.4. Detección del gen <i>sul1</i> en muestras de agua del Río Nexapa.....	73
8.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	74
8.6.1. ANOVA y LSD de Fisher	74
8.6.2. Análisis de correlación de Spearman	75
8.7. DIAGNÓSTICO DE LA PROBLEMÁTICA	76
8.7.1. Fuerzas motrices.	77
8.7.2. Presiones.....	78
8.7.3. Estado	79
8.7.4. Impacto.....	80
8.7.5. Respuestas	81
8.7.6. Complejidad y diagnóstico de la RAM.....	83
IX. CONCLUSIONES.....	84
X. REFERENCIAS	86
ANEXO 1. ESTACIONES CLIMATOLÓGICAS ALEDAÑAS AL RÍO NEXAPA.	102
ANEXO 2. SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE LOS GENES DE RESISTENCIA A SULFONAMIDAS Y LAS REGIONES UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS POR PCR.	104
ANEXO 3. MATERIALES, SOLUCIONES E INSTRUMENTOS UTILIZADOS PARA LA FABRICACIÓN DEL BIOSENSOR.	106
ANEXO 4. RESULTADO DE LA MEDICIÓN DE LA CARACTERIZACIÓN DEL AGUA.	109
ANEXO 5. RESULTADOS DE ELECTROFORESIS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL	110
ANEXO 6. CONTROLES PARA PCR PARA LOS GENES DE RESISTENCIA A SULFONAMIDAS.....	111
ANEXO 7. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA Y ACTIVIDADES ACADÉMICAS DE DIFUSIÓN	112
6.1. ARTÍCULO EN REVISTA JCR.....	112
6.2. CAPÍTULO DE LIBRO EN EDITORIAL ELSEVIER.....	120
6.3. ARTÍCULO DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA	123
6.4. ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN ACADÉMICA INTERNACIONAL.....	124
6.5. PARTICIPACIÓN EN CONGRESO INTERNACIONAL.....	125
6.6. SEMINARIOS DE AVANCE DE TESIS	126
6.7. RETRIBUCIÓN SOCIAL	127

I. INTRODUCCIÓN

El uso de antimicrobianos ayuda al tratamiento y prevención de infecciones y enfermedades relacionadas con virus, hongos y bacterias (Pruden et al., 2018). Actualmente, el tema de los antimicrobianos ha cobrado gran relevancia, pues si bien en materia de salud pública pueden alargar la vida de las personas en al menos 20 años (O'Neill, 2016), el abuso en su consumo puede provocar resistencia microbiana y esto acarrear una serie de problemas que van desde la muerte de las personas que no cuentan con tratamiento adecuado para tratar las infecciones (Sims & Kasprzyk-Hordern, 2020); hasta alteraciones en los ecosistemas por la presencia de microorganismos resistentes (Pruden et al., 2018) y severos problemas económicos en todos los estratos sociales (Roope et al., 2019).

Recientemente la resistencia a los antimicrobianos se ha presentado como uno de los grandes retos y problemas del siglo XXI, debido al impacto en la salud y economía, tanto regional como global, colocando esta situación al nivel del cambio climático (Roope et al., 2019).

Las sulfonamidas son uno de los primeros antibióticos en incorporarse comercialmente para el tratamiento de infecciones bacterianas (Sköld, 2000) y fueron ampliamente usadas en la Segunda Guerra Mundial (D. Davenport, 2012). La presencia de microorganismos resistentes a sulfonamidas ha sido reportada desde mediados del siglo XX (Akiba et al., 1960) y principalmente se expresa en bacterias que afectan el sistema gastrointestinal (Perreten & Boerlin, 2003). El mecanismo de resistencia es llevado a cabo principalmente por la mutación de la enzima dihidropteroato sintasa, expresado por los genes de resistencia *Sul*, parte del grupo de enzimas necesarias para la síntesis de ácido fólico, esencial para que los microorganismos se desarrollen. Actualmente, son el principal antibiótico usado para el tratamiento de infecciones gastrointestinales en el ganado vacuno y porcino (Perreten & Boerlin, 2003).

Los microorganismos resistentes a sulfonamidas han sido encontrados en todos los compartimentos ambientales y en prácticamente todos los continentes por lo que su amplia distribución y el uso no controlado en el ganado crean un problema complejo de estudiar y controlar, tanto en la salud pública como en los ecosistemas (Lin et al., 2015).

La detección de microorganismos resistentes comúnmente se realiza mediante pruebas de sensibilidad a antibióticos basados en el cultivo de las muestras de microorganismos de interés recolectados, con la posterior caracterización y amplificación de los genes diana aislados (Anjum et al., 2018; McLain et al., 2016). Esto conlleva varios días en obtener un resultado que exponga la posible resistencia en las muestras analizadas, para el caso de los humanos y mamíferos el esperar tanto tiempo para conocer si es apropiado o no dar un medicamento puede ser crucial, por lo que el uso de técnicas alternativas ha tomado gran fuerza en los últimos años. Los métodos moleculares (PCR) y biosensores han estado jugando un papel esencial desde la última década debido a su robustez, selectividad, especificidad, rapidez y fácil operación (van Belkum et al., 2020).

Debido a la gran importancia del monitoreo y vigilancia ambiental en la resistencia a los antimicrobianos, por el potencial de propagación en los diferentes ambientes y organismos, en este trabajo se propone la elaboración de un biosensor para detectar genes de resistencia a las

sulfonamidas en agua del río Nexapa, Puebla, así como el diagnóstico de la problemática ambiental y social asociada al uso de antimicrobianos en la región, basado en el esquema *fuerzas motrices-presión-estado-impacto-respuesta*.

II. JUSTIFICACIÓN

Debido a la actual problemática que la resistencia a los antimicrobianos, por parte de los microorganismos genera en los ecosistemas, sociedad y economía (Queenan et al., 2016); se han desarrollado, en el ámbito legislativo nacional e internacional, estrategias y marcos de referencia (European Commission, 2017; SEGOB, 2018; WHO, 2001, 2015) que exhortan e impulsan el estudio para entender, combatir y solucionar la resistencia a los antimicrobianos; es necesario describir e indagar las causas y repercusiones, tanto en el ambiente como en la sociedad, que propician dicha resistencia.

Para hacer un diagnóstico pertinente de la problemática se deben incluir, dentro del sistema de estudio de la resistencia a los antimicrobianos, programas de monitoreo integrales y eficientes (Hendriksen et al., 2019), ya que, este punto es clave dentro de la Estrategia Nacional de Acción Contra la Resistencia a los Antimicrobianos (SEGOB, 2018) resaltando la importancia de una identificación temprana de agentes etiológicos y patrones de susceptibilidad antimicrobiana, pues se deben desarrollar métodos de detección rápidos y oportunos que aseguren la presencia de microorganismos resistentes.

Actualmente, las metodologías para determinar específicamente la resistencia de ciertas bacterias toman algunos días, ya que las muestras se deben aislar y posteriormente realizarse pruebas de sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos (AST, por sus siglas en inglés) (Nisa et al., 2019). Metodologías de rápida detección para determinar si ciertos microorganismos son resistentes a determinados antimicrobianos es un factor fundamental para establecer un pronto diagnóstico, no solo a nivel de salud pública, sino también en el ambiente, alimentos y agua, tanto para beber como residuales.

Tomando en cuenta el rol que juega en la sociedad y ecosistemas, la complejidad de la problemática y a las múltiples disciplinas que interactúan, este trabajo busca no solo determinar la presencia de resistencia a antimicrobianos en diferentes escenarios, sino relacionar las posibles complicaciones sociales y ambientales si no se toman las medidas pertinentes, tales como cuadros epidemiológicos o aumento de la tasa de mortalidad por infecciones mal diagnosticadas y proporcionar técnicas de detección que impulsen la rápida determinación para la correcta aplicación de antimicrobianos y evitar el uso indebido e inadecuado.

III. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿Cuál es la situación del río Nexapa con respecto a la presencia de los genes de resistencia a sulfonamidas?
- ¿Qué actividades sociales y qué factores ambientales favorecen la presencia y proliferación de los genes de resistencia a sulfonamidas en el río Nexapa?

IV. HIPÓTESIS

Los genes de resistencia *sul1*, *sul2* y *sul3* se encuentran distribuidos en el río Nexapa principalmente por la deficiencia en la aplicación de políticas públicas en materia de combate a la resistencia a los antimicrobianos, desconocimiento de la población en cuanto a las afectaciones producidas por la resistencia a los antimicrobianos, uso, disposición y tratamiento inadecuados de antimicrobianos en el sector agropecuario y clínico, y condiciones ambientales que favorecen la proliferación de microorganismos resistentes.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Generar un diagnóstico integral de la problemática de la resistencia a sulfonamidas resultado de la interrelación de los factores sociales y ambientales en el río Nexapa

5.2. Objetivos particulares

- Desarrollar y aplicar técnicas analíticas para la detección selectiva, eficiente y rápida de los genes *sul1*, *sul2*, *sul3* y *sul4*
- Identificar y documentar las condiciones ambientales y sociales que favorecen la presencia y distribución de genes de resistencia a sulfonamidas
- Reconocer y determinar las interrelaciones de las variables que inciden en la presencia de genes de resistencia a sulfonamidas en las aguas del río Nexapa

VI. MARCO REFERENCIAL

6.1. Resistencia a los antimicrobianos

Entre los años 1930s y 1950s, en Estados Unidos de América, hubo un declive, el más grande en la historia de ese país, en el número de muertes por enfermedades infecciosas (neumonía, influenza y tuberculosis), esto debido a la incorporación en la práctica clínica de los antimicrobianos (AM) (en 1935 sulfonamida, 1941 la penicilina y en 1943 la estreptomicina) (Aminov, 2017). Este tipo de prácticas demuestran la importancia en el uso de antimicrobianos, ya que actualmente, muertes por cáncer, enfermedades del corazón, diabetes y Alzheimer tienen tasas más elevadas que por enfermedades infecciosas (J. Xu et al., 2018).

Si bien, los AM han sido y siguen siendo de gran ayuda para tratar enfermedades infecciosas, hay diversos factores (naturales y antrópicos) que han propiciado que estos AM tengan menor o nula eficacia a la hora de tratar infecciones, una de las principales razones es la resistencia (Pruden et al., 2018).

La Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) define a la resistencia a los antimicrobianos (RAM) como el “fenómeno por el cual un microorganismo deja

de ser afectado por un AM al que anteriormente era sensible” (WHO, 2015) y surge por la mutación del microorganismo al estímulo de los antimicrobianos o por la adquisición del gen de resistencia.

Los antimicrobianos son nombrados de acuerdo al microorganismo diana al que está dirigido el fármaco, por ejemplo: Antifúngicos (hongos), antiparasitarios (parásitos), antivíricos (virus) y el principal de los AM que son los antibióticos, dirigidos a combatir a las bacterias (Asif, 2017).

Hablar de resistencia en los microorganismos, es hablar de la evolución a lo largo de la historia, pues gracias a la adaptación, estos organismos han resistido a una amplia variedad de cambios en el ambiente desde hace aproximadamente 3 mil millones de años (Lebreton et al., 2017), por lo que esta modificación de su material genético y estructura celular es un proceso natural (Swift et al., 2019).

En los inicios del siglo XX fue el comienzo en la incorporación en la práctica clínica de los antibióticos, especialmente la penicilina que es considerada el gran descubrimiento de ese siglo (Marinho et al., 2016), pero el primer antibiótico en ser utilizado con actividad terapéutica fue el prontosil (**Figura 1**), considerado el primer fármaco en actuar selectivamente sobre bacterias, además de tener actividad sistémica (Sköld, 2000), la gran revolución vino con este antibiótico del tipo sulfonamidas en el año 1932 (Domagk, 1935) y su amplio uso en la segunda guerra mundial por el ejército británico para tratar diferentes infecciones aunque posteriormente fue desplazada por el uso de la penicilina (D. Davenport, 2012).

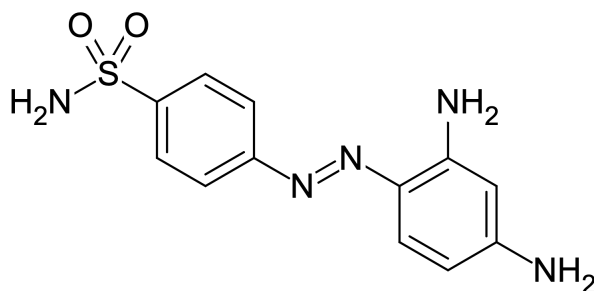


Figura 1. Estructura molecular del antibiótico de la clase sulfonamidas, Prontosil.

A mediados del siglo pasado se llegó a creer, con la incorporación de nuevos antibióticos, que la lucha contra las enfermedades infecciosas había terminado, pero, por el contrario, a finales de ese siglo y con el descubrimiento de nuevas cepas resistentes, el problema aumentó, debido a que, por ejemplo, una bacteria puede ser resistente a gran cantidad de antibióticos y por lo tanto su patogenicidad aumenta radicalmente (Davies & Davies, 2010).

En la actualidad se calcula que mueren más de 700 000 personas al año por RAM y se estima que para 2050 morirán anualmente 50 millones de personas (O'Neill, 2016). Tan solo en la Unión Europea y Estados Unidos mueren aproximadamente 50 mil personas anualmente, siendo los países menos desarrollados los de mayor tasa de muertes por RAM (Vikesland et al., 2017). La problemática de la RAM es cada vez más grande, el número de infecciones que son difíciles

de tratar y en algunos casos imposibles, provocando mayor gasto y desecho en medicamento, así como estadías prolongadas en hospitales (Collignon et al., 2015).

Dos tercios de la producción mundial de AM (aproximadamente 100 000 toneladas) está destinada a los animales de labranza y consumo humano (Hellen et al., 2015). Al ser estos animales destinados para alimento, la cadena alimenticia termina siendo uno de los principales factores en contribuir a la resistencia a los antimicrobianos en humanos y animales domésticos (Aarestrup et al., 2008; Hammerum et al., 2007; JETACAR, 1999).

Si bien la resistencia es un fenómeno o “consecuencia” natural, se ha demostrado que la resistencia microbiana y genética a los antimicrobianos se intensifica considerablemente donde hay actividades antrópicas, especialmente donde existe el uso y disposición de antimicrobianos (Vikesland et al., 2017).

6.1.1. Mecanismos biológicos y genéticos de resistencia a los antimicrobianos

Una de las principales desventajas ocasionadas por la RAM con respecto a otros contaminantes, es que la resistencia en los microorganismos es autorreplicable y no pueden ser mitigados o eliminados del ambiente. Por ejemplo, los genes resistentes de una bacteria pueden sobrevivir en presencia de un antibiótico, posteriormente ser compartidos o incorporados al interior de otra célula bacteriana y rápidamente multiplicarse (Vikesland et al., 2017), dejando un panorama desalentador sobre cómo erradicar este problema en diferentes ambientes como animales, hospitales y humanos (**Figura 2**).

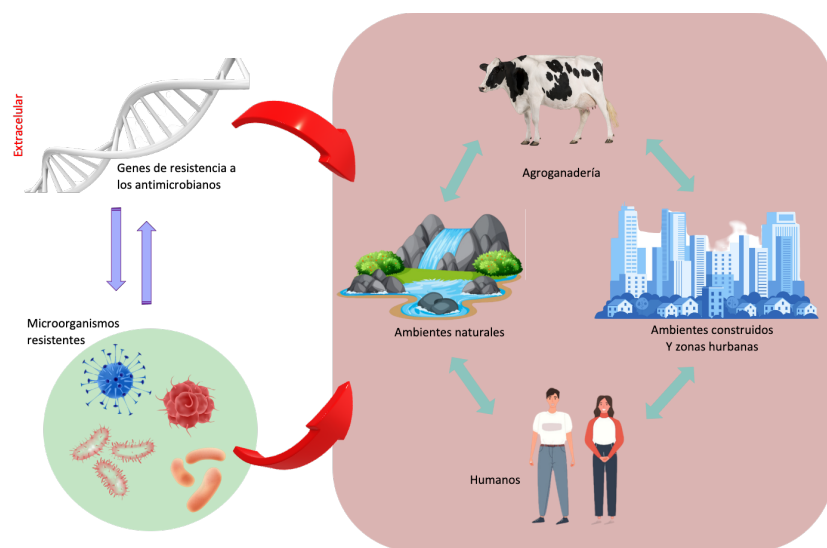


Figura 2. Principales ambientes donde se diseminan los genes de RAM (elaboración propia, 2023; con información de (Vikesland et al., 2017)).

La variabilidad genética de las bacterias que resisten a los AM se pueden compartir por dos vías, una por vía vertical, es decir, mediante “expansión clonal” que refiere a la herencia del material genético, en este caso la resistencia, hacia la descendencia; la segunda es mediante vía horizontal, que es por transferencia de elementos genéticamente móviles (por ejemplo: plásmidos, integrones o transposones) de otros microorganismos de la comunidad, tres son los

mecanismos por esta vía: 1) *transformación*, que consiste en la adquisición, por parte de una célula competente, de ADN extracelular (genes de resistencia antimicrobiana) que ha sido liberado de otra célula, tras una lesión y rompimiento de la membrana celular, cabe destacar que este material genético puede asociarse con macromoléculas ambientales (materia orgánica o arcilla) persistiendo algún tiempo para posteriormente ser captado por una nueva célula; 2) la *transducción* involucra un intermediario (bacteriófago) que adquiere el material genético resistente de la célula que ha invadido, al producirse la lisis celular el bacteriófago infecta a una nueva célula incorporando estos genes a su genoma; 3) el mecanismo de *conjugación* requiere la combinación de dos células y el intercambio de material genético móvil (plásmido) que codifica genes de resistencia (Török et al., 2016; Vikesland et al., 2017). En la **Figura 3** se ejemplifican estos tres mecanismos.

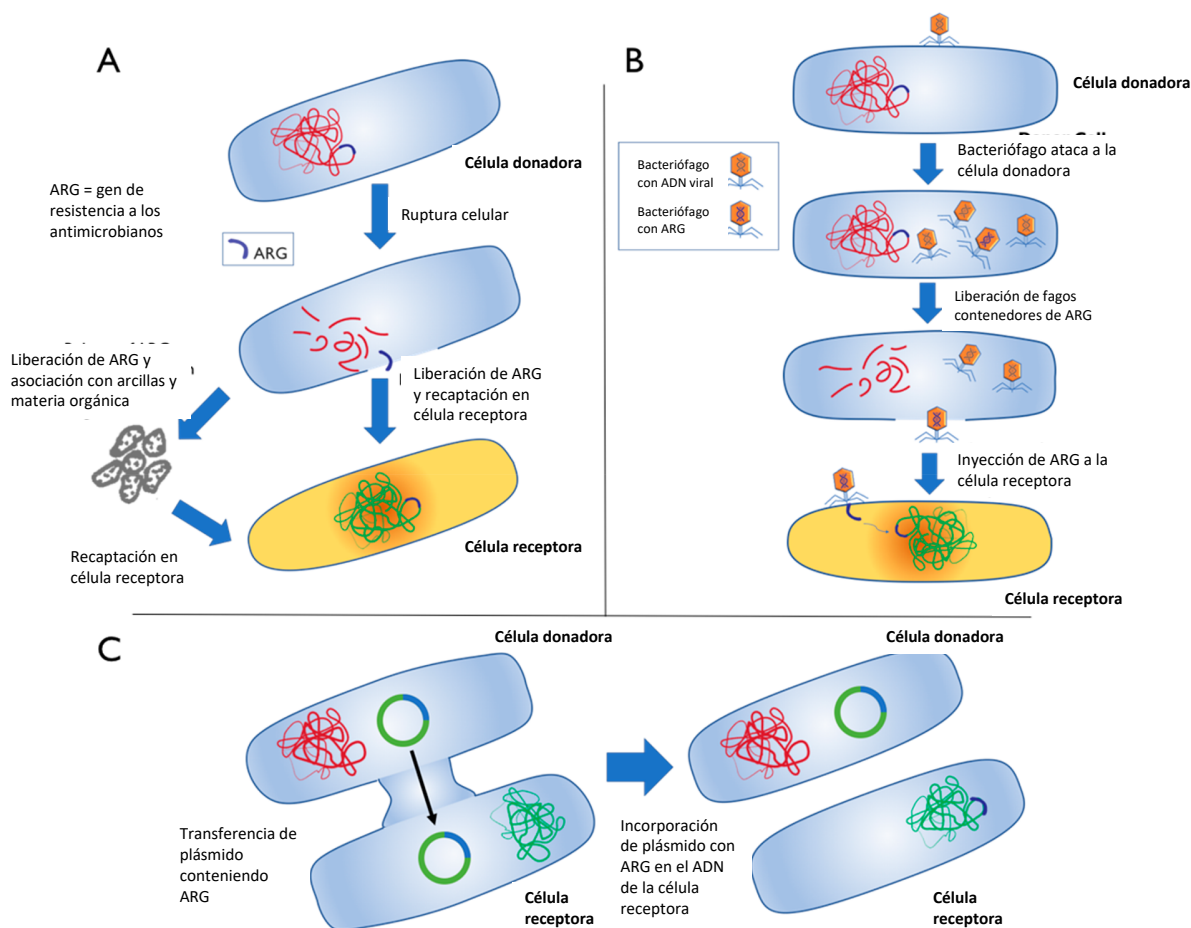


Figura 3. Esquema de los tres principales mecanismos de transferencia de genes de resistencia a los antimicrobianos por vía horizontal. A) transformación, B) transducción, y C) conjugación (imagen tomada de (Vikesland et al., 2017)).

Los mecanismos biológicos de resistencia celular a los antimicrobianos, es decir las distintas funciones que desarrollan los microorganismos para evitar que los AM surtan efecto, se pueden llevar a cabo mediante: modificación del objetivo antimicrobiano, degradación o modificación química de la molécula antimicrobiana, reducción selectiva de la absorción

antimicrobiana, exportación activa del antimicrobiano mediante bombas de eflujo y uso de vías y enzimas alternativas (Blair et al., 2015; Davies & Davies, 2010; Török et al., 2016):

Los integrones juegan el principal rol en la adquisición y diseminación de genes de resistencia, ya que cuentan con la capacidad de introducir y escindir de manera autónoma, elementos genéticos conocidos como *cassettes*, estos mecanismos ayudan a la bacteria a adaptarse rápidamente a las presiones de selección, incluida la adquisición de fenotipos de resistencia (Razavi et al., 2017). Los genes que codifican la resistencia a casi todas las familias de antibióticos han sido acumulados por integrones de clase 1 en los últimos 100 años (Sabaté & Prats, 2002).

6.1.2. Aspectos ambientales de la resistencia a los antimicrobianos

Para entender la complejidad del flujo de la RAM en el ambiente, es necesario conocer y evaluar la fuente, base de su transporte y destino, debido a que los humanos, animales y ambiente son reservorios y medios para desarrollar la resistencia (Pruden et al., 2018). En la **Figura 4** se muestran los posibles flujos e interacciones que los microorganismos realizan para una posible resistencia, cada reservorio tiene una dinámica compleja diferente debido a sus procesos ecológico-microbiológico por lo que cada uno determina los niveles de prevalencia de la resistencia.

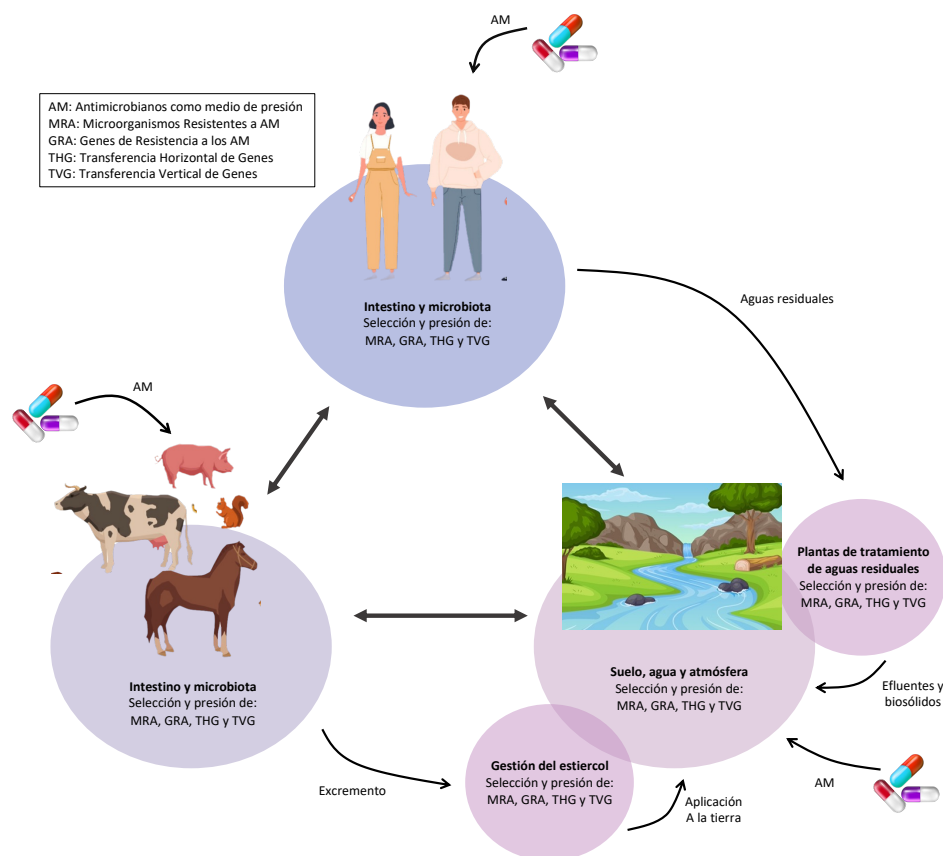


Figura 4. Flujos e interacciones en diferentes reservorios que realizan los microorganismos y sus biomoléculas para diseminar la RAM (elaboración propia, 2023; con información de (Pruden et al., 2018)).

Los ambientes reciben antibióticos de muy diversas fuentes, por un lado, la aplicación directa para la producción de frutas, verduras y la acuicultura, y de forma “indirecta” de la industria farmacéutica, de las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARs) y de estiércol animal (Singer et al., 2019) (**Figura 4**). Estudios aseguran que la resistencia a los antimicrobianos no se limita a ambientes hospitalarios o de mal uso de antibióticos, sino que la mayor parte de las resistencias provienen de cepas de ambientes naturales, como hábitats de suelo y agua (Osińska et al., 2020). Algunas de las causas plausibles de la resistencia a los antimicrobianos son, como ya se mencionaron, el uso excesivo en animales de consumo humano (reses, cerdos, pollos y peces), mascotas y humanos; además de la venta de los mismos sin receta médica, incremento de los viajes internacionales, pobre higiene y deficiencia en los servicios sanitarios, pues los residuos fecales y de manufactura farmacéutica portan metabolitos y/o antibióticos inalterados que son transportados a los ambientes naturales y a las PTARs (Aslam et al., 2018). En animales se ha proyectado que en 2030 se incremente un 67% su uso en los países más poblados del mundo (Aslam et al., 2018).

Las PTARs son consideradas las principales diseminadoras de genes de resistencia, en ellas tanto las bacterias como los genes no pueden ser removidos y migran a los ecosistemas a través de las descargas de las aguas tratadas influyendo en la evolución de comunidades microbianas (Osińska et al., 2020). En la **Figura 5** se muestran las rutas de los genes de resistencia como contaminantes y como de forma directa e indirecta estos terminan en los sistemas acuáticos donde son diseminados nuevamente tanto en ecosistemas naturales como lagos, aguas subterráneas y suelo (Vikesland et al., 2017).

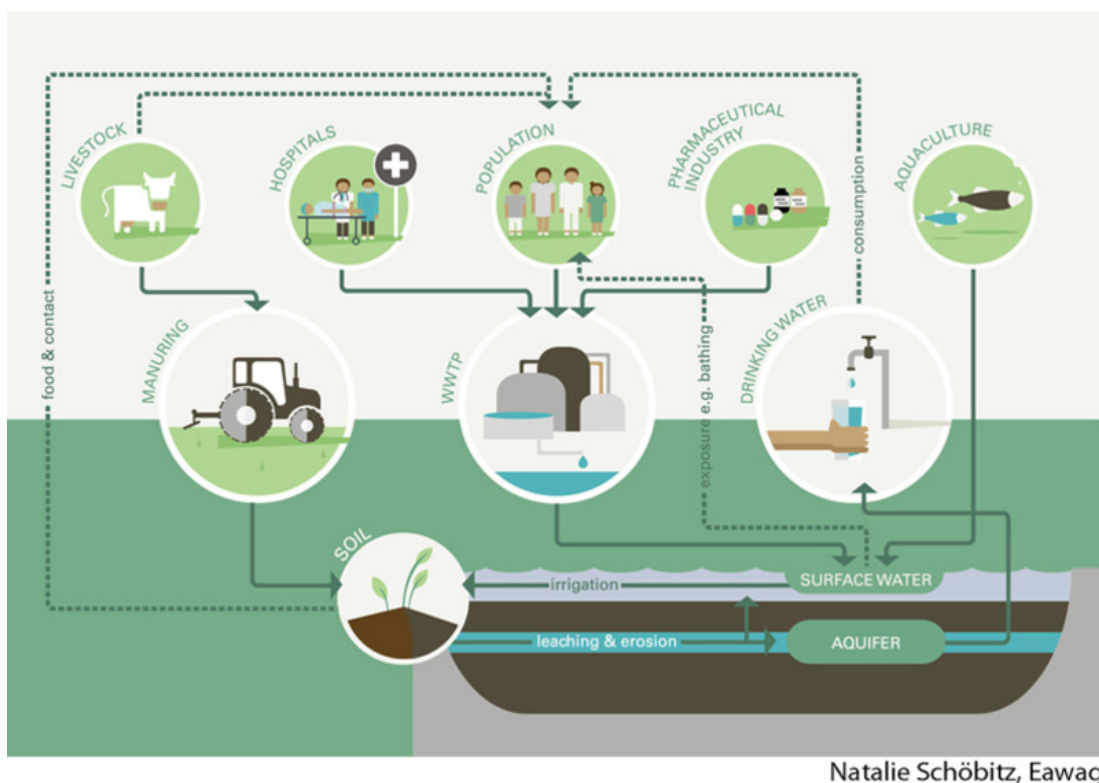


Figura 5. Actividades y sitios puntuales y no puntuales del flujo y transferencia de genes de resistencia (imagen tomada de (Vikesland et al., 2017)).

Uno de los principales factores por lo que la resistencia a los antimicrobianos en la vida silvestre se lleva a cabo, es por contacto con fuentes antrópicas como la actividad agropecuaria y acuícola y por contacto con aguas residual, pues contaminan el ambiente con AM, microorganismos resistentes y sus biomoléculas (Arnold et al., 2016). Estas fuentes incluyen residuos en comida de ganado y aves, aguas provenientes de PTARs, agua de escorrentía de las granjas, tanques de lodos y campos fertilizados con estiércol, todo esto contribuye en gran medida a que los microorganismos resistentes terminen contaminando las aguas de consumo humano, a los animales silvestres y al suelo (**Figura 6**). Además de que factores como el tiempo y ubicación de los microorganismos propensos a la resistencia son fundamentales para modificar su genética, adaptarse y resistir a los AM (Arnold et al., 2016; Fahrenfeld et al., 2013; Swift et al., 2019).

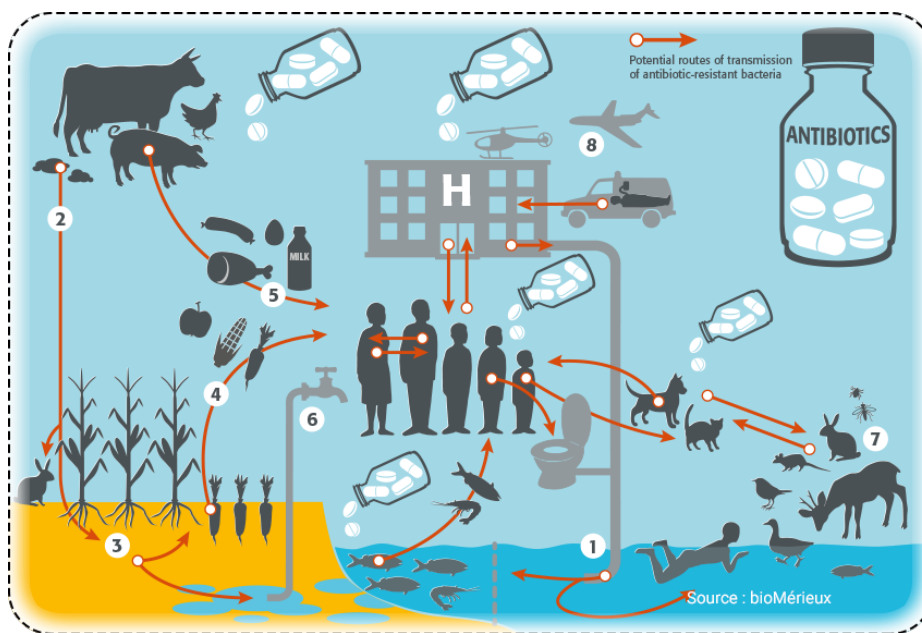


Figura 6. Movimiento y diseminación de AM en ambientes naturales (imagen tomada de (biomerieux.com)).

Existen factores y rutas que propician la resistencia en los microorganismos a partir de sustancias químicas, estas se pueden dividir en los siguientes grupos o clases: 1) *antimicrobianos* (AM) (antibióticos, antifúngicos, antivirales y antiparasitarios); 2) *metales pesados*; 3) *biocidas* (por ejemplo, surfactantes o desinfectantes) y; 4) este último grupo son otras sustancias químicas en donde son seleccionados *genes* de resistencia, por ejemplo: sustancias *naturales* derivadas de plantas y sustancias *xenobióticas* como los solventes orgánicos (Singer et al., 2016). Para conferir la resistencia a estas sustancias químicas se desarrolla un fenómeno de gran importancia ecológica y clínica en los microorganismos, en donde se co-seleccionan los genes necesarios (Baker-Austin et al., 2006; Singer et al., 2016). Son dos las vías o mecanismos de *co-selección*, la *co-resistencia* y la *resistencia cruzada*. En la primera un gen seleccionado promueve la resistencia en otro gen, aunque en la mayoría de los casos este mecanismo no sea una ventaja en la resistencia para el AM (Johnson et al., 2016). La resistencia cruzada es el proceso en el que un gen determinado puede ofrecer “protección” o resistencia hacia la sustancia o múltiples sustancias químicas, en este caso los AM (Curiao et al., 2016).

6.1.3. Algunos aspectos sociales, económicos y políticos de la resistencia a los antimicrobianos

Debido a la creciente aparición de cepas resistentes a antibióticos en diferentes partes del mundo y sin aparente conexión (por ejemplo, en Estados Unidos y China donde se presentaron cepas de *E. coli* resistentes a colistina en un corto periodo de tiempo (Y. Liu et al., 2016; McGann et al., 2016)) han provocado temor, ya que en la actualidad se desarrolla una era postantimicrobianos, que es retornar a la era en la que no se tenían los antimicrobianos y las enfermedades y muerte por infecciones microbiológicas se disparan alarmantemente (Vikesland et al., 2017). Por motivos como este, la WHO propone un Plan de Acción Global Contra la Resistencia Antimicrobiana (WHO, 2015).

Se estima que los costos asociados con las infecciones que no pueden ser tratadas con antibióticos es 1.6 billones de euros por año en la Unión Europea (European Commission, n.d.), mientras que en Estados Unidos es de 55 billones de dólares anuales (Gandra et al., 2017). Para el 2050, el costo económico por la resistencia de los microorganismos a nivel global será de 100 trillones de dólares (O'Neill, 2016). El consumo promedio de antibióticos por persona en la unión europea es superior al 2 % diario (Singer et al., 2016).

Recientemente Collignon *et al.* establecieron que solo el 28 % de la problemática de la resistencia a los antimicrobianos es provocada por la variación en el uso de antibióticos y que más del 30 % es atribuido a la corrupción, estableciendo que esta problemática es el principal factor socioeconómico que desemboca en la resistencia a los antimicrobianos (Collignon et al., 2015). Un ejemplo que puede explicar esto, es el gasto en salud destinado al sector privado, si se incrementa un 10 % en dicho gasto, la resistencia microbiana disminuye un 20 %, por lo que países con mal manejo de las finanzas y corrupción en el sector de la salud pública, contribuyen a aumentar los niveles de RAM (Collignon et al., 2015).

Hay una clara asociación entre el consumo excesivo y descontrolado de antimicrobianos en la población mundial con el aumento significativo de bacterias resistentes, pero se ha determinado en países desarrollados como Inglaterra, en donde la regulación en el uso y reducción de antibióticos revierte el proceso de crecimiento de microorganismos resistentes (Enne et al., 2001), por este motivo, es que en ese trabajo se afirma que los procedimientos sanitarios de prevención y control en el uso de antibióticos no son suficientes para combatir esta alarmante situación que actualmente es considerada el principal reto en cuestión salud globalmente (K. Wang et al., 2019).

Las actividades antrópicas son el principal factor que propicia la resistencia en el ambiente y los microorganismos han desarrollado por su cuenta no solo los mecanismos para resistir a los AM, sino que para poder esparcir y dejar en la descendencia los genes y mecanismos adaptativos, por ejemplo, se han encontrado genes de RAM en muestras de PTARs sin presencia de antibióticos (Svobodová et al., 2018), lo que indica que los AM estimulan cambios en la estructura de una población bacteriana. La remoción de AM y sus productos de transformación no es suficiente en términos de evitar que los genes de resistencia se dispersen en los diferentes compartimentos ambientales, especialmente los ecosistemas acuáticos que reciben los cuerpos de agua provenientes de las PTARs (Osińska et al., 2020). Incluso estudios recientes señalan que los pájaros de vida silvestre son diseminadores de la resistencia a los antibióticos (J. Wu et al., 2018).

Tres son los componentes esenciales para evitar el esparcimiento tanto de genes como de bacterias RAM, 1) el monitoreo, 2) la evaluación del riesgo y 3) la mitigación.

6.1.4. Generalidades sobre sulfonamidas y los genes de resistencia en microorganismos

Las sulfonamidas (**Tabla 1**) son un grupo de sustancias químicas sintéticas que actúan como inhibidores competitivos sobre la enzima dihidropteroato sintasa (DHPS) perteneciente a la ruta metabólica del ácido fólico (Sánchez-Osuna et al., 2019).

Tabla 1. Estructura química de las sulfonamidas (elaboración propia, 2023).

Nombre	Estructura molecular
Estructura base de sulfonamidas	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{R}^1 - \text{S} - \text{N} - \text{R}^3 \\ \\ \text{R}^2 \end{array}$
Sulfametoxazol	
Sulfatiazol	
Sulfisomidina	
Sulfacetamida	
Sulfabenzamida	
Sulfadiazina	
Sulfafurazol	
Sulfapiridina	

Las células de mamíferos no dependen de la síntesis endógena de ácido fólico y carecen de DHPS. En cambio, estas células tienen un sistema de absorción de folato de la cual, la mayoría de los procariotas carecen (Sköld, 2000).

Las sulfonamidas fueron los primeros antibióticos sintéticos en actuar sistémicamente sobre los microorganismos, en 1932 prontosil rumbrum (**Figura 1**) fue la primera de las sulfonamidas probadas experimentalmente en conejos infectados con *Streptococcus pyogenes* (Sköld, 2000), aunque actualmente está descontinuado.

Hasta la década de los 1970s las sulfonamidas se utilizaban solas y fue hasta esa década y ampliamente en la de los 1980s que se comenzó a administrar sulfametoxazol en combinación con trimetoprim debido a que su potencia para tratar infecciones urinarias y gastrointestinales fue disminuyendo (Enne et al., 2001) indicando claramente la evolución de mecanismos de resistencia especializado para impedir que estas sustancias puedan competir e inhibir la síntesis de ácido fólico.

Actualmente las sulfonamidas están catalogadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como el segundo grupo de importancia médica, después de los catalogados como “importancia crítica” (Doyle et al., 2013; World Health Organization, 2019).

Los genes de resistencia a sulfonamidas (*Sul*) se originaron a partir de la movilización de los genes *FolP* de las bacterias *Leptoespiraceae* a las *Rhodobiaceae* (Sánchez-Osuna et al., 2019). Este gen es el responsable de transcribir la enzima DHPS. El gen *sul1* fue el primero de los genes de resistencia descubierto y reportado en los años 1950s (Akiba et al., 1960) y tiene la capacidad de transferirse mediante plásmidos, ya que está presente en la región conservada del integrón de clase 1 (*IntI1*) que es muy abundante en microorganismos entéricos y puede integrar y contener la mayoría de los genes de resistencia (Sabaté & Prats, 2002). El *sul1* ha sido encontrado en muestras de hospitales y aguas residuales (Gupta et al., 2019) por lo que su presencia en el ambiente es persistente y recalcitrante debido a que es el gen dominante en la mayoría de los estudios de aguas residuales (Osińska et al., 2020).

Los genes *sul2* y *sul3* fueron identificados en los años 1970s (Rådström & Swedberg, 1988), el primero es encontrado en plásmidos no conjugativos del tipo *IncA/C/Q* (S. Wu et al., 2010) pero tiene la capacidad de ser transponible en el material genético de la célula, esto le da la capacidad de incorporarse a secuencias de integrones y poderse transferir a otras células de forma horizontal (W.-J. Zhang et al., 2014). El gen *sul3* se encuentra predominantemente en plásmidos conjugativos del tipo *pVP440* (Perreten & Boerlin, 2003), por lo que fácilmente puede replicarse y transmitirse de la célula donadora a otra célula receptora que no cuente con esta información de resistencia (Vikesland et al., 2017).

Los genes de resistencia a sulfonamidas, aunque pueden estar presentes en diferentes partes de la célula bacteriana (plásmido o cromosoma) pueden ser incorporados fácilmente al principal integrón que puede albergar en paquetes de genes de resistencia, los genes para combatir la presencia de las sulfonamidas en el medio donde se encuentren las células (Escudero et al., 2015; Florence et al., 2007; Hughes & Andersson, 2017). La presión que ejerce esta clase de antibióticos sobre los microorganismos, empieza desde la membrana celular, mediante la bomba de eflujo, incluso se ha determinado que los genes responsables de expresar estas proteínas

(*OprM* and *OprI*) pueden mutar para evitar la entrada de los AM a la célula (Köhler et al., 1996), pero si logran introducirse, se desemboca la señal del *cassette* del integrón *IntI* (donde están presentes los genes) que contiene diferentes mecanismos cascada para expresar la información de resistencia, tanto para la integración y escisión (por parte de la integrasa) de los genes, así como de un “promotor” (*AttI* y *AttC*) que se encarga de generar la señal (dentro del integrón) para la expresión de los genes *cassette* (Escudero et al., 2015; Razavi et al., 2017).

Los genes *sul1* y *sul2* son las formas predominantes en las muestras clínicas de pacientes hospitalizados (Rådström et al., 1991) y el gen *sul3* tiene mayor importancia en granjas y ambientes de crianza de animales de consumo humano, ya que prominentemente se encuentra en cerdos, vacas y pollos (Perreten & Boerlin, 2003). Es importante destacar que estos genes están ampliamente distribuidos en ambientes donde hay actividad humana, principalmente en ríos, lagos y PTARs (Guo et al., 2017; Osińska et al., 2020; Pazda et al., 2019).

Recientemente Razavi y colaboradores identificaron un nuevo gen de resistencia a sulfonamidas denominado *sul4* (Razavi et al., 2017), este gen es encontrado principalmente en ambientes naturales como suelo, sedimento y agua en zonas aledañas donde hay una fuerte actividad humana. El origen de este gen de resistencia tuvo una mutación y evolución diferente a los otros 3 genes de resistencia a sulfonamidas, pues hasta el momento no está presente en ninguna de las bacterias entéricas, solo se ha determinado su presencia en bacterias *Cloroflexi* (Razavi et al., 2017; Sánchez-Osuna et al., 2019). Es interesante este gen pues no se ha encontrado en ningún ambiente hospitalario, remarcando su importancia en la evolución de resistencia, aunque es evidente la aparición de este gen por las actividades antrópicas, este es un claro ejemplo de que los ambientes naturales pueden sufrir alteraciones en los ecosistemas y en todas las especies que en ellos habitan.

Para uso veterinario, las sulfonamidas son los antibióticos más vendidos en países como China y los pertenecientes a la Unión Europea (N. Wang et al., 2014), esto debido principalmente al bajo costo (Kools et al., 2008). Actualmente las sulfonamidas están clasificadas como de “alta prioridad” en los medicamentos de uso veterinario debido a su alto potencial de llegar a los ambientes naturales (Heuer & Smalla, 2007). El uso de sulfonamidas con respecto a otros antibióticos es muy variado dependiendo la región donde consuma, por ejemplo, en Suiza representa un 12 % del total de antibióticos consumidos y en China un 6 % (Pazda et al., 2019).

6.2. Marco legislativo

6.2.1. Situación internacional de la resistencia a los antimicrobianos

Si bien la lucha contra RAM no es un tema reciente, fue en 2011 con la Comisión Europea (European Commission, 2011), en 2013 en el Reino Unido (Department of Health/DEFRA, 2013) y en 2015 con la WHO (WHO, 2015) se establecieron los primeros esfuerzos, estrategias y planes de acción contra la RAM. Estos planes intentan abarcar todos los rubros en los que influye la RAM, como son la educación, higiene personal, vigilancia, investigación científica, salud humana y animal, por mencionar algunos.

A partir de la 70ª Asamblea General de Naciones Unidas y de la Reunión de Alto Nivel sobre Resistencia a los Antimicrobianos derivó en el objetivo 3 de la agenda 2030. “Garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades, a fin de generar estilos de vida saludable que eviten la automedicación y promuevan el desarrollo de medicamentos”. Uno de los principales problemas a la hora de responder preguntas fundamentales acerca de la resistencia a los antimicrobianos en el ambiente es la ausencia y vacío de planes de acción en los ecosistemas naturales ante microorganismos resistentes, ya que estos planes están dirigidos principalmente evitar el mal uso de medicamentos y que los microorganismos resistentes no lleguen a infectar a la población (Singer et al., 2016).

6.2.2. Situación en México y la estrategia nacional contra la resistencia a los antimicrobianos

El primer reporte en México de RAM fue en el año 1973 donde una cepa de *Salmonella Typhi* tuvo varios cuadros diarreicos, al analizarla se encontró que era resistente a cloranfenicol, tetraciclina, estreptomycin y a sulfonamidas, a partir de este hecho, se reportaron continuas cepas multiresistentes y los investigadores mexicanos han tratado de describir varios de los mecanismos de infecciones hospitalarias y de la relación en el consumo de AM y la RAM (Rodríguez-Noriega et al., 2014)

En la 1a. Sesión Extraordinaria celebrada el día 9 de mayo de 2018, el Pleno del Consejo de Salubridad General, acordó emitir el siguiente acuerdo, declarando como obligatorio la Estrategia Nacional de Acción Contra la Resistencia a los Antimicrobianos (SEGOB, 2018). Cinco son los objetivos de dicha estrategia, en el primero establece la concientización y comprensión de la Resistencia Antimicrobiana (RAM), mediante capacitación, educación y comunicación efectiva; el segundo en reforzar el conocimiento y la evidencia de la RAM, a través de la vigilancia y la investigación; tercero, a partir de medidas preventivas como la higiene, reducir la incidencia de las infecciones; el cuarto objetivo es sobre el uso óptimo de los agentes antimicrobianos mediante su uso racional; el último, es muy relevante, pues establece la evaluación económica del problema, con el fin de asegurar la inversión sostenible para abordar la RAM, esto incluye el desarrollo de nuevos medicamentos y herramientas de diagnóstico.

El tema de la resistencia ha adquirido gran interés en México, debido al riesgo que representan las enfermedades que no pueden ser tratadas y a las pérdidas económicas que esto conlleva. En 2018 se lanzó el Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA) que busca crear esfuerzos y vincular a universidades y hospitales para conocer el estado actual del panorama de los niveles de RAM (Meza et al., 2018). Desde 2018 se ha establecido una red (Red-PUCRA) de 14 instituciones hospitalarias de 6 estados de la república mexicana que han informado acerca de cepas aisladas, patrones de susceptibilidad y consumo de antibióticos. En el informe se detalla que se han aislado cepas de bacterias Gram negativas como *E. Coli* y *K. pneumoniae*, siendo ampicilina y sulfametoxazol de los principales antimicrobianos con resistencia en las AST y la cefalosporina es el principal antibiótico consumido en los hospitales de la red (Meza et al., 2018).

6.3. Monitoreo y vigilancia ambiental de microorganismos resistentes a antimicrobianos

La importancia en la vigilancia de la RAM tiene un gran impacto en todos los sectores sociales, económicos y políticos pues los datos recopilados en la vigilancia, tanto cuantitativos como cualitativos, son necesarios para la información acerca del estado del problema, así como para la toma de decisiones en la terapia clínica, las rutas a seguir en la elaboración de políticas y la evaluación de los planes de acción para la lucha contra la RAM (Marinho et al., 2016).

En la vida silvestre y los ambientes es necesario hacer evaluaciones que monitoreen la presencia de RAM pues los animales silvestres pueden diseminar esta problemática a zonas donde comúnmente no hay presencia de microorganismos resistentes (Arnold et al., 2016; Swift et al., 2019).

6.3.1. Programas de monitoreo para determinar la presencia de microorganismos resistentes

En 1995 Dinamarca fue el primer país en realizar monitoreos continuos y sistemáticos del consumo de medicamentos antimicrobianos y los agentes antimicrobianos resistentes en animales, alimentos y humanos (Hammerum et al., 2007). Este programa ha contribuido, no solo en Dinamarca sino también en países de la unión europea, en la disminución del uso de varios agentes antimicrobianos en animales destinados como alimento humano, principal promotor de la resistencia a los microorganismos (Hammerum et al., 2007).

Regulaciones en el monitoreo ambiental contribuye significativamente al desarrollo de planes de acción contra la resistencia de antimicrobianos a nivel nacional y global y predecir posibles cuadros epidemiológicos (Singer et al., 2016).

En el Reglamento Interior del Consejo de Salubridad General (CSG), artículo 9 fracción II, este organismo (CSG) tiene la facultad de “aprobar los acuerdos necesarios y demás disposiciones generales de **observancia obligatoria** en el país en materia de salubridad general”(SEGOB, 2018).

Para estimar las concentraciones de patógenos que puedan, por diferentes rutas ambientales (alimentos, agua, aire), exponer y causar enfermedades infecciosas, es necesario evaluar el riesgo cuantitativo microbiológico (QMRA, por sus siglas en inglés) y relacionarlo con la resistencia antimicrobiana (Pruden et al., 2018). QMRA puede ser clave en el desarrollo de estrategias de prevención, mitigación y esparcimiento de la resistencia a los antimicrobianos (Vikesland et al., 2017).

La evaluación integral de los recursos hídricos tiene como objetivo aprovechar el uso de modelos conceptuales y numéricos para informar la planificación del agua y la toma de decisiones (Zare et al., 2019). Esto significa que se emplean diferentes métodos y herramientas para enfocarse en diferentes aspectos del sistema (por ejemplo, sociales, económicos, ecológicos, hidrológicos) de los problemas del agua.

6.3.2. Técnicas de detección de RAM

La gran diversidad de microorganismos patógenos cambia su composición constantemente, lo cual dificulta más la eficacia de los antimicrobianos y su detección en el ambiente natural, hospitalario, granjas agroganaderas y PTARs (Humphries & Hindler, 2016).

Antes de indagar sobre las técnicas utilizadas para la detección de enfermedades infecciosas, es importante conocer las prácticas para la determinación de la infección, ya que esto conlleva a un posible mal diagnóstico y uso inadecuado de antimicrobianos, favoreciendo y propiciando la resistencia. En la **Figura 7** se describe la dinámica de la práctica clínica actual, especialmente para el diagnóstico en muestras de orina (aunque puede ser aplicado a cualquier tipo de monitoreo), y las nuevas tecnologías que podrían evitar y disminuir la crisis de resistencia. Inicialmente, después de obtener las muestras de orina es administrado inmediatamente un antibiótico de amplio espectro, seguido de la identificación y aislamiento del patógeno, típicamente cultivado en agar cromogénico, lo que lleva a una clasificación ambigua, pues puede haber varios patógenos y el proceso debe repetirse (Leonard et al., 2018).

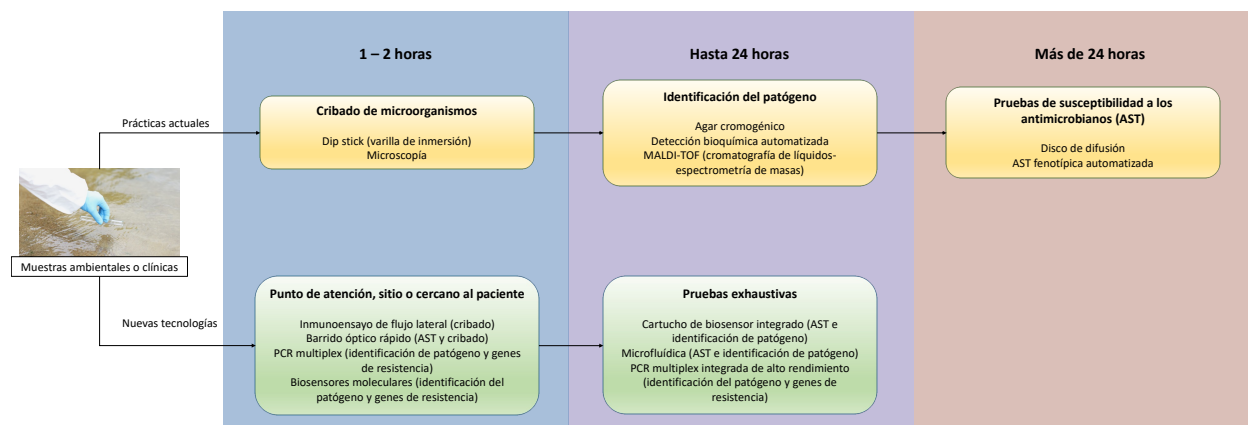


Figura 7. Dinámica en el diagnóstico, caracterización de enfermedades infecciosas y RAM (elaboración propia, 2023; con información de (M. Davenport et al., 2017; Leonard et al., 2018)).

Según las directrices internacionales de los comités y sociedades científicas de medicina, las AST deben realizarse en casos de infecciones graves que pongan en peligro la vida, de recaídas de infecciones, de terapias antibióticas a largo plazo y de resistencia conocida de los microorganismos a determinados antibióticos o a la vigilancia epidemiológica (Gajdács et al., 2017). Los análisis rutinarios de las AST se basan en el crecimiento bacteriano en presencia de diversos compuestos antimicrobianos, los más comunes son los métodos de dilución en caldo o en agar y de disco de difusión (Jorgensen & Turnidge, 2015). Las AST son de suma importancia, pues con ella se determina la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) de un antimicrobiano, en bacterias el MIC es el punto en el cual un antibiótico ha inhibido efectivamente el crecimiento de una bacteria (El-Halfawy & Valvano, 2015). Un inconveniente de las AST tradicionales es que requieren de 18 a 24 horas antes de que se disponga de información sobre la resistencia, constituyendo una desventaja para la intervención terapéutica selectiva oportuna y la aplicación de medidas de control de la infección (Vrioni et al., 2018).

Actualmente, métodos basados en ácidos nucleicos, como secuenciación de ADN, metagenómica, reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y la desorción con láser asistida por una matriz – tiempo de vuelo (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés) se ocupan para acelerar los procesos de identificación de las especies patógenas, monitoreando el flujo y movimiento de la resistencia bacteriana, a nivel genético, dentro y entre los diferentes compartimentos ambientales. Solo hasta tener bien identificados los patógenos se recurre a

pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (AST, por sus siglas en inglés), resultando en la correcta administración del medicamento (M. Davenport et al., 2017; Leonard et al., 2018).

Los inconvenientes de los métodos basados en ácidos nucleicos es que requieren de personas altamente calificadas para operar los instrumentos de medición y que tienen costo elevado, además de que no se notifica la susceptibilidad a los antimicrobianos y no es posible determinar las pautas emergentes de resistencia limitando el uso clínico de nuevos agentes antimicrobianos (Burnham et al., 2017; Vikesland et al., 2017). A pesar de lo anterior, las diferentes técnicas de PCR (punto final y tiempo real) en la actualidad son las pruebas estándar en los laboratorios donde se requiera determinar genes específicos de resistencia.

Actualmente una de las técnicas que ha tomado gran relevancia y uso para determinar RAM son los biosensores (van Belkum et al., 2020). Los biosensores son dispositivos que se integran por un elemento de biorreconocimiento acoplado a un elemento de detección llamado transductor físico-químico. El elemento de biorreconocimiento es muy específico para la muestra que se va a analizar, la respuesta generada por la interacción entre el elemento de biorreconocimiento y el analito se transforma en una señal medible por el transductor (Thévenot et al., 2001). Los biosensores pueden clasificarse según el mecanismo de interacción con la especie biológica a reconocer (**Figura 8**) o también por el tipo de señal generada por el transductor físico-químico (Bettazzi et al., 2017). Varias son las ventajas en el uso de biosensores, entre las que destacan, alta especificidad, bajo costo, corto tiempo y fácil operación, además que con estos dispositivos se pueden realizar AST de manera rápida y eficiente, detectar células completas de microorganismos resistentes y determinar genes específicos de RAM (Gupta et al., 2019; Hannah et al., 2019). Debido a este potencial, estos dispositivos de detección se han convertido en metodologías que influyen ampliamente en el diagnóstico de posibles infecciones que no son fácilmente tratables con los antimicrobianos comerciales y en complejas matrices biológicas (Leonard et al., 2018; Reynoso et al., 2021; Yoo & Lee, 2016).

6.4. Análisis hidrométrico y morfométrico

La evaluación y análisis morfométrico e hidrométrico son herramientas fundamentales para el estudio de una cuenca hidrográfica y su función hidrológica (Cruz Romero et al., 2015). Con ello se puede conocer el comportamiento hidrogeológico y cuantificar los cambios en el agua superficial y subterránea de la cuenca o región en estudio (ya sea un municipio, subcuenca o incluso microcuenca), teniendo muchas aplicaciones como son el conocer el potencial de recursos, inundaciones, erosión, sequías y perturbaciones tectónicas (Resmi et al., 2019; Shen et al., 2017). La influencia de las condiciones climatológicas junto con la naturaleza del suelo y la cobertura vegetal se puede cuantificar para comprender y cuantificar el comportamiento morfodinámico y como es la respuesta hidrológica (Chinu et al., 2019; Cruz Romero et al., 2015). Con lo descrito anteriormente la morfometría puede ser descrita como la medición y el análisis matemático de la configuración de la superficie de la tierra, figura y dimensión de las formas terrestres (Rai et al., 2017).

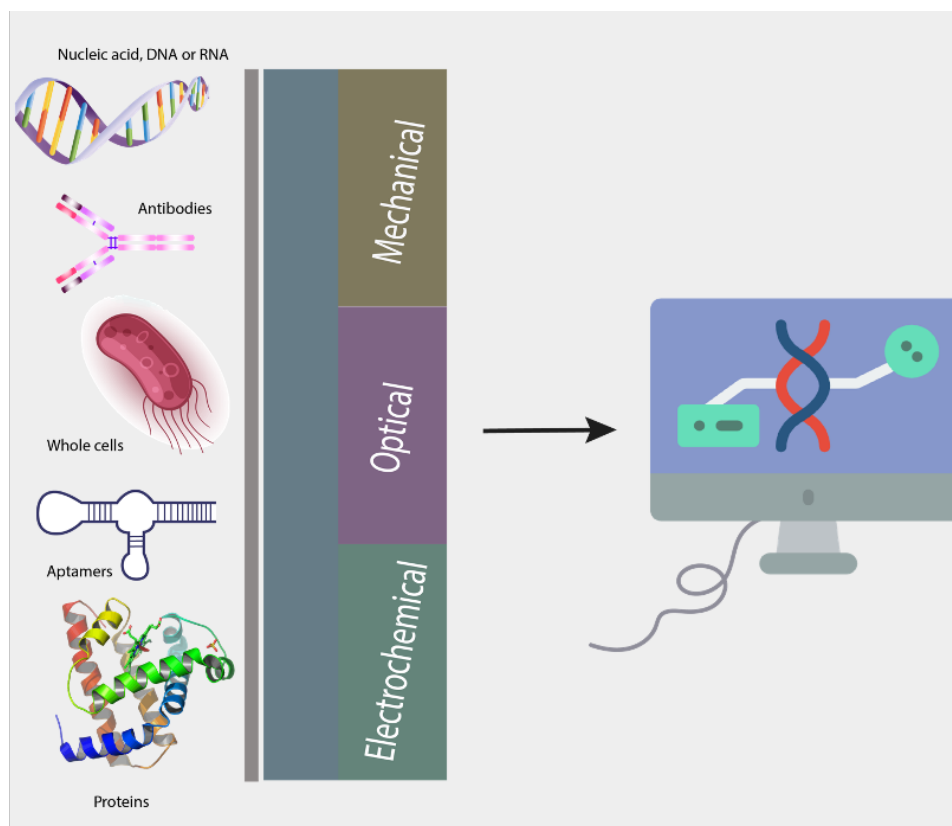


Figura 8. Tipos de biosensores de acuerdo con las distintas clases de elementos de biorreconocimiento y tipos de transductores (elaboración propia, 2023; con información de (Bettazzi et al., 2017)).

Gracias a los avances en los sistemas de información geográfica (SIG) y la accesibilidad a los modelos digitales de elevación (MDE) se ha mejorado la aplicación de la modelación del medio ambiente y los sistemas terrestres como la delimitación de las cuencas hidrográficas y establecimiento de la red de drenajes tanto superficiales como subterráneos (Chinu et al., 2019).

El agua, es uno de los recursos más importante que existe globalmente, ya que está implícito en prácticamente todos los procesos biogeoquímicos del planeta y es esencial para el equilibrio ecológico (Geressu et al., 2020), además de que gran parte de los problemas de salud están relacionados con la contaminación del recurso hídrico y el potencial para esparcir enfermedades (Sims & Kasprzyk-Hordern, 2020). Otras situaciones que involucran el análisis morfológico y la problemática del agua son las sequías y las inundaciones, además de que se estima que las siguientes guerras serán por los problemas relacionados con este recurso y las delimitaciones territoriales que de ello surjan (Schillinger et al., 2020). Regiones con una gestión adecuada e integrada en todos los sectores de la población posibilitará una mejor calidad de vida, no solo en las poblaciones si no en los diferentes ambientes, ya que como se mencionó anteriormente, el equilibrio ecosistémico tendrá un cause apropiado (Sade et al., 2016).

Este tipo de herramientas son necesarias para el estudio holístico y de integración para conocer el estado del recurso hídrico que impacta directamente a las poblaciones y a los ecosistemas y por consiguiente a la dispersión de antimicrobianos, posibilitando la propuesta de

marcos de referencia y gestión integrada de los recursos hídricos como respuesta a las presiones que se tienen sobre el ambiente.

6.5. Tipo de investigación y enfoque epistemológico

6.5.1. Tipos de investigación

El estudio de la problemática en la presencia de resistencia a sulfonamidas en los cuerpos de agua del río Nexapa fue evaluado mediante un enfoque metodológico mixto, es decir, de manera cuantitativa y cualitativa, ya que, por un lado, al desarrollar un biosensor capaz de detectar y cuantificar los genes de resistencia a sulfonamidas, se deben evaluar los rendimientos en los diferentes procesos de elaboración del dispositivo, también se medirán diferentes variables ambientales como temperatura y precipitación en la región y parámetros fisicoquímicos del agua como pH y conductividad, por mencionar algunos. En cuanto al análisis cualitativo, se pretende obtener información detallada del problema mediante la búsqueda de información del análisis discursivo de personajes clave y tomadores de decisiones, así como integrar observaciones y mediciones sobre el recurso hídrico en el Río Nexapa con las distintas actividades humanas que impactan en el estado de la problemática y las posibles respuestas e intervenciones que se desarrollen (Hernández-Sampieri & Mendoza, 2018).

El estudio tiene varios niveles de investigación, por un lado, es experimental, como ya se explicó, se desarrolla un biosensor evaluando diferentes materiales y elementos de biorreconocimiento para determinar cuáles presentan mejor desempeño en la detección de los genes de resistencia a sulfonamidas, así como el monitoreo, mediante la detección por PCR de los cuatro genes de resistencia a sulfonamidas mediante técnicas de extracción y amplificación de ADN. También, la investigación es de tipo correlacional y explicativa, ya que, se pretende asociar las variables ambientales (fisicoquímicas y climáticas) y sociales mediante el comportamiento y presencia de genes de resistencia y la dinámica de uso y manejo de antibióticos y agua por parte de la población, trabajadores agropecuarios y de servicios de salud cerca de los lugares designados como muestreo del río Nexapa para explicar las causas en la distribución de la problemática y los posibles impactos por su presencia. Por último, para conocer y entender la dinámica del problema en estudio es necesario evaluar la presencia y distribución en distintas estaciones del año y ubicaciones, por lo que es también una investigación longitudinal o evolutiva (Cauas, 2015; Hernández-Sampieri & Mendoza, 2018).

6.5.2. Enfoque epistemológico y paradigma

Para identificar la problemática asociada a la resistencia que han adquirido los microorganismos a los diferentes antimicrobianos en los últimos años es necesario identificar temas disciplinarios y abordar dicha problemática con un lenguaje común e interrelacionado, desde una perspectiva ecológica, biotecnológica, antrópica, político-económica y salud pública (Batterman et al., 2009; Vikesland et al., 2017).

Este trabajo pretende alcanzar las bases del constructivismo, pues trata de formar no solo una versión de los hechos individuales, como se hace siguiendo un paradigma positivista-reduccionista, sino adquirir, de manera holística los hechos como un sistema complejo,

exponiendo todas las posibles interrelaciones que un sistema abierto demanda investigar. La investigación realizada tiene una realidad en forma de múltiples construcciones, pues conjuga una variedad de personas de diferentes disciplinas (químicos, biólogos, especialistas en salud, matemáticos, antropólogos), que interactúan formando una entidad única y actuando de forma interdisciplinaria hacia un fin común, que es evaluar y diagnosticar el problema ambiental asociado a la resistencia a los antimicrobianos, especialmente a sulfonamidas, mediante todas las posibles interacciones ambientales y socioeconómicas, utilizando un lenguaje común consensado en todas las etapas de la investigación (Padrón, 2007).

Aquí se utilizan metodologías cuantitativas para determinar los genes de resistencia y otros contaminantes presentes en el agua, siendo estas mediciones indicativo del comportamiento de los microorganismos en la zona de estudio. Estas mediciones son parte del análisis sistémico, en donde se presentan también análisis de tipo cualitativo, como es la revisión de hechos del comportamiento de las autoridades sanitarias en la lucha contra la resistencia a los antimicrobianos. Finalmente, se considerará el ámbito político que es pieza clave en la problemática sistémica. Se puede observar que coexisten múltiples construcciones mentales que tienen su base en comportamientos sociales y experiencias individuales y colectivas específicas de la región (García, 2006; Moreno Jiménez et al., 2001).

Todo lo anterior debe ser evaluado en la totalidad de los subsistemas, delimitando para construir un sistema único. Es destacable la íntima interacción que se tiene, entre el investigador y el objeto de estudio, en donde la construcción de la investigación y la problemática avanza conforme a los hallazgos resolutorios de la problemática.

VII. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el desarrollo de las metodologías y cumplimiento de los objetivos propuestos, se dividieron las actividades en tres diferentes fases (fase de campo, fase de laboratorio y fase de gabinete) (**Figura 9**). Las actividades en las distintas fases se desarrollarán sin un orden cronológico definido.

7.1. Zona de estudio

7.1.1. Delimitación de la zona de estudio

Para la delimitación de la zona de estudio se obtuvo el polígono de la cuenca del Río Nexapa (RH18Ae) de la página Simulador de Flujos de Áreas de Cuencas Hidrográficas (SIATL) (INEGI, 2019). Para generar el MDE se utilizaron las cartas topográficas 1:50,000 de la página del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) (INEGI, 2015). A partir del MDE y la información de las estaciones climatológicas aledañas a la región (**ANEXO 1**) se modeló la precipitación mediante el método de interpolación *kriging ordinario*, y para generar el mapa de temperatura se relacionaron los valores de elevación y temperatura media anual obtenidos de las estaciones climatológicas y se integraron al MDE. Para generar los mapas y el MDE se utilizó el programa ArcGIS (10.2.2), *surfer* (13) y *Didger* (5).

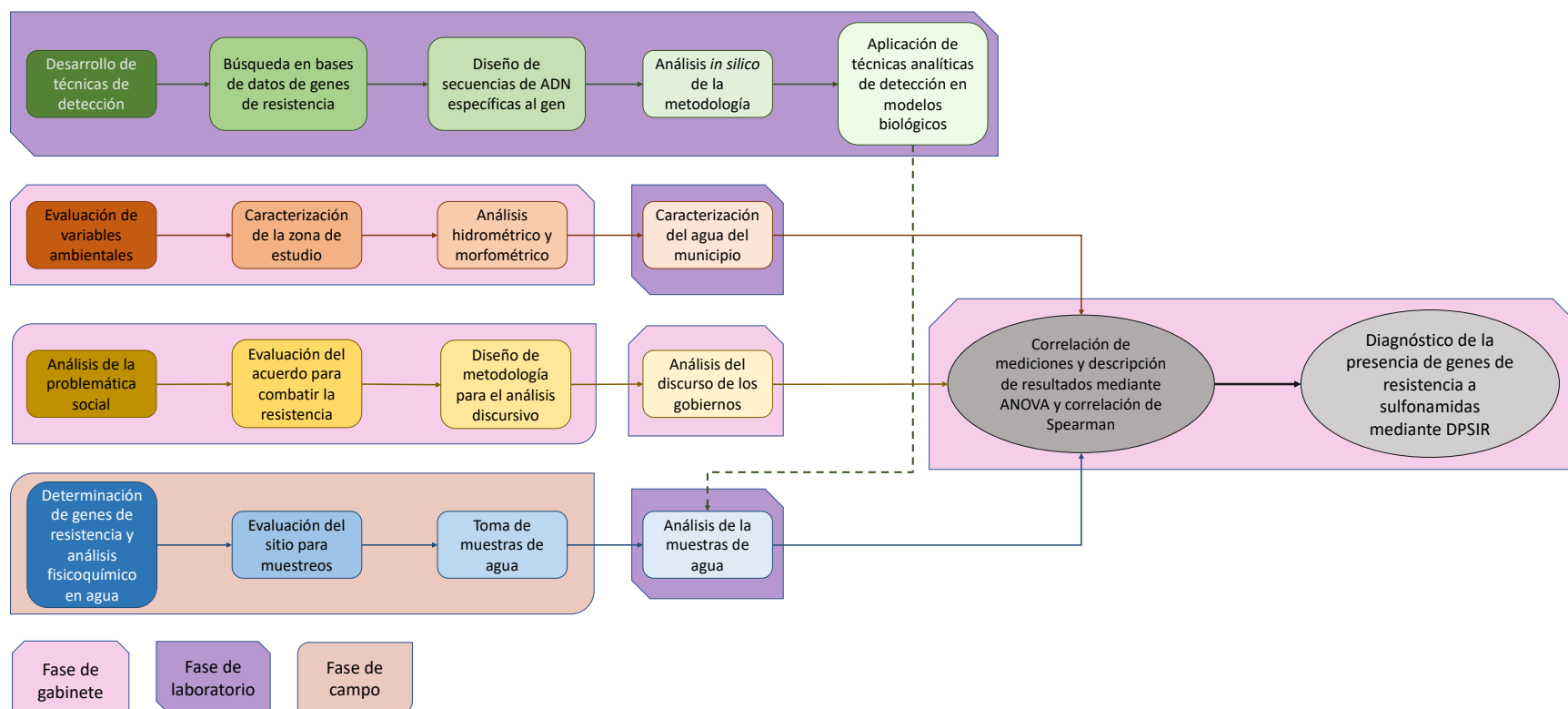


Figura 9. Estrategia metodológica (Elaboración propia, 2023).

7.1.2. Evaluación de parámetros morfométricos

Los parámetros morfométricos evaluados y calculados en este trabajo se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Parámetros morfométricos para evaluar y método de análisis.

Variable	Parámetro	Método de evaluación	Referencia
	Cuenca	SIATL	(INEGI, 2019)
	Elevaciones (msnm)	ArcGIS 10.2.2	(Meza-Rodríguez, 2006)
	Descripción de la cuenca	ArcGIS 10.2.2	(Meza-Rodríguez, 2006)
	Clasificación	ArcGIS 10.2.2	(Meza-Rodríguez, 2006)
	Forma de la cuenca	ArcGIS 10.2.2	(Meza-Rodríguez, 2006)
	Tipo de drenaje	ArcGIS 10.2.2	(Meza-Rodríguez, 2006)
A	Área de la cuenca (km ²)	ArcGIS 10.2.2	(Meza-Rodríguez, 2006)
P	Perímetro (km)	ArcGIS 10.2.2	(Meza-Rodríguez, 2006)
H	Altura media (msnm)	ArcGIS 10.2.2	(Meza-Rodríguez, 2006)
R	Relieve (msnm)	$R = H_{max} - H_{min}$	(Schumm, 1956; Shen et al., 2017)
	Pendiente (%)	ArcGIS 10.2.2	(Meza-Rodríguez, 2006)
	Pendiente principal (%)	ArcGIS 10.2.2	(Meza-Rodríguez, 2006)
La	Longitud (Km)	ArcGIS 10.2.2	(Meza-Rodríguez, 2006)
Ic	Índice de compacidad (adimensional)	$Ic = 0.282 \frac{P}{\sqrt{A}}$	(Shen et al., 2017)
Rf	Índice de forma (adimensional)	$Rf = \frac{A}{La^2}$	(Horton, 1932; Shen et al., 2017)
	Curva hipsométrica	ArcGIS 10.2.2	(Meza-Rodríguez, 2006)
	Orden	Numeración en cuanto a su jerarquía	(Shen et al., 2017; Strahler, 1952)
Nw	Número de escurrimientos	ArcGIS 10.2.2	(Meza-Rodríguez, 2006)
Le	Longitud de escurrimientos (km)	ArcGIS 10.2.2	(Meza-Rodríguez, 2006)
	Longitud del escurrimiento principal (km)	ArcGIS 10.2.2	(Meza-Rodríguez, 2006)
Dd	Densidad de drenaje (km/km ²)	$Dd = \frac{Le}{A}$	(Horton, 1932; Shen et al., 2017)
Cf	Densidad hidrológica (n/km ²)	$C_f = \frac{N_w}{A}$	(Meza-Rodríguez, 2006)
R _B	Relación de bifurcación (adimensional)	$R_B = \frac{Ni}{Ni + 1}$	(Meza-Rodríguez, 2006)
Tc	Tiempo de concentración (horas)	$T_c = \left(\frac{(0.87)(C_f)^3}{H_{max}} \right)^{0.385}$	(Meza-Rodríguez, 2006)

El programa *ArcGIS* (10.2.2) se utilizó para calcular la morfometría de los siguientes parámetros, área total, altura media, elevaciones, relieve, % de pendiente, número, longitud y

pendiente de escurrimientos. Una vez generados estos parámetros y con las fórmulas de la **Tabla 2** se calculó la densidad de drenaje, densidad hidrológica, índice de forma, índice de compacidad y el tiempo de concentración. También se evaluaron parámetros no cuantitativos a partir de los mapas generados en *ArcGIS* como el número de orden, descripción, clasificación, forma de la cuenca y tipo de drenaje.

7.1.3. Estimación de la alteración hidrológica

La alteración del recurso hídrico se ha visto severamente afectada desde mediados del siglo anterior debido al aumento exponencial de la población, las diversas actividades socioeconómicas que desarrolla y las necesidades del recurso hídrico que esta demanda (García Romero, 2020; Salazar Corrales, 2022). Para comprobar si existe alteración del régimen hidrológico por la infraestructura en diversas actividades humanas (infraestructura hidroeléctrica e hidráulica) se siguió la metodología descrita en el apéndice “B” “procedimiento para la determinación de la alteración del régimen hidrológico natural en una corriente por la presencia de infraestructura” de la norma mexicana NMX-AA-159-SCFI-2012 “que establece el procedimiento para la determinación del caudal ecológico en cuencas hidrológicas” (SECOFI, 2012). Se seleccionó la estación hidrométrica 18293 perteneciente al Banco Nacional de Datos de Aguas Superficiales (BANDAS), localizada al noroeste de la cuenca hidrológica Río Nexapa justo en las faldas del volcán Popocatepetl (CONAGUA, 2016), para obtener los datos del gasto medio mensual en el periodo de 1959 al 2005 y con ellos poder observar el estado natural (régimen hidrológico natural, RHN) y actual (régimen hidrológico alterado, RHA). Se calculó el régimen de caudal ecológico mensual y anual, los percentiles 10 y 90 como límites del caudal y se compararon los valores del RHA y RHN para determinar en qué años hubo alteración en el régimen hidrológico.

7.2. Evaluación de las dinámicas sociales

7.2.1. Análisis del discurso de los gobiernos municipales

La evaluación de la construcción y estructura del discurso que los gobiernos municipales tienen con respecto a la RAM es importante para conocer las posturas y planes de acción, por lo que para este trabajo se utilizaron, como fuente de información, los informes de gobierno del periodo previo a la aplicación del acuerdo en el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional contra la RAM (2014-2018) y el periodo siguiente (2018-2021) en los municipios de Izúcar de Matamoros y Atlixco, que son los principales municipios de la región del acuífero del Río Nexapa y donde previamente se ha determinado la presencia de antibióticos y microorganismos resistentes (CONAGUA, 2018). Los informes de gobierno se obtuvieron del portal de transparencia estatal “Sistema de Solicitudes de Información del Estado de Puebla” (INFOMEX Puebla)¹ y mediante la plataforma nacional de transparencia (PNT)².

¹ <https://puebla.infomex.org.mx>

² <https://consultapublicamx.plataformadetransparencia.org.mx/vut-web/faces/view/consultaPublica.xhtml#inicio>

Cada municipio y administración, en el periodo de gestión, representa su propia complejidad, así como la naturaleza del documento a analizar por lo que la evaluación de los textos se realizó de manera particular, donde los datos evaluados representan un panorama del interés o apatía de los gobiernos por enfocar esfuerzos en combatir la RAM (Soler Castillo, 2011).

Para el análisis de los informes es necesario establecer categorías que posibiliten el ordenamiento de los textos comparados, estas categorías fueron seleccionadas a partir de los temas primarios establecidos en los objetivos de la Estrategia Nacional contra la RAM e información bibliográfica (O'Neill, 2016; SEGOB, 2018; Vikesland et al., 2017). Una herramienta destacada para conocer la información y perspectiva de los gobiernos municipales en sus respectivos períodos activos y generar un panorama de las ideologías políticas y su postura con respecto a la RAM es el uso de la codificación temática (García-Caro et al., 2010). Esta herramienta ha sido seleccionada para determinar el conjunto de palabras que están relacionadas al discurso de los gobernantes, las cuales también servirán como un indicador para evaluar su relación directa o no en la RAM. En la **Tabla 3** se resumen las categorías, códigos e indicadores utilizados en el análisis del discurso.

Tabla 3. Categorías y elementos de codificación para el análisis del discurso de los municipios de Atlixco e Izúcar de Matamoros.

Categoría	Código	Indicador	
		Directo	Indirecto
Sistema hídrico	Agua		x
	Planta de tratamiento de agua	x	
	Saneamiento	x	
	Drenaje	x	
Salud	Medicamento/medicina		x
	Antibiótico	x	
	Antimicrobiano	x	
	Hospital		x
	Salud		x
	Higiene		x
	Microorganismo	x	
	Infección	x	
	Bacteria	x	
	Residuo		x
Agricultura y ganadería	Veterinario		x
	Ganadería		x
	Plaguicida		x
	Granja		x
Educación ambiental	Conciencia ambiental		x
	Inversión sostenible		x

Fuente: Elaboración propia con base en información metodológica (Mullet, 2018; Van Dijk, 2015) y fundamental de la RAM (Aslam et al., 2018; O'Neill, 2016; Vikesland et al., 2017).

Nota: De acuerdo con las fuentes mencionadas se han considerado como indicadores directos aquellos códigos que se relacionan y tienen injerencia directa con la RAM y como indirectos los que son de materia general pero que se involucran en la RAM de manera indirecta.

A cada código se atribuye, de acuerdo con el indicador, un valor ponderado (2 para directo y 1 para indirecto) que representa el equivalente al interés de cada administración para cada municipio para atender la RAM, los códigos que no están presentes se consideran como 0. El valor máximo que cada municipio puede tener es de 28. Con cada código se realizó un análisis de frecuencia de palabras. Cada palabra fue evaluada particularmente en el texto estableciendo si el contexto del código tenía o no pertinencia con respecto a la RAM. Si el contexto del código no tuvo ninguna relación con la RAM se marcó como no pertinente y no fue utilizado para contabilizarlo como valor ponderado en la codificación temática.

7.3. Análisis y caracterización de agua

7.3.1. Toma de muestras

Los muestreos se realizaron de acuerdo con lo descrito en las normas NMX-AA-003-1980 “Aguas residuales – Muestreos” y NMX-AA-014-1980 “Cuerpos receptores – Muestreos”. con una frecuencia de una vez cada tres meses durante un año. Los sitios de muestreos fueron determinados de acuerdo con muestreos de investigaciones previas y con la información de Dr. Jorge Antonio Herrera Cárdenas, jefe del Departamento de Investigación y Desarrollo de la Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros.

7.3.2. Caracterización de agua

A cada muestra tomada se le midió directamente en sitio la conductividad, el potencial de iones hidrógeno (pH), la temperatura, oxígeno disuelto y sólidos totales, utilizando una sonda de conductividad *HANNA instruments* (HI3001).

Para la caracterización del agua se determinaron los siguientes parámetros: fosfato, sulfato, níquel, hierro, calcio, nitrato, cloro libre, magnesio y demanda química de oxígeno (DQO) mediante test basados en procedimientos convencionales mostrados en la **Tabla 4** y un fotómetro electrónico *HANNA instruments Hi83325-01*, a la longitud de onda específica para cada sustancia. La demanda biológica de oxígeno (DBO) se determinó conforme a lo descrito OECD 301 “guideline for testing of chemicals” publicado por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD, por sus siglas en inglés) (OECD, 2001) y la medición se realizó mediante un espectrofotómetro UV-Vis *Varian Cary Eclipse* a 650 nm. Para todos los parámetros se tomaron los niveles máximos descritos en la norma NOM-001-SEMARNAT-2021 “que establece los límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores propiedad de la nación”. Estos parámetros servirán no solo para conocer el grado de contaminación del agua sino también para saber la posible relación de cada uno de los compuestos con la presencia de RAM.

Tabla 4. Parámetros determinados, kit y longitud de onda utilizados.

Sustancia a determinar	Número de kit	Longitud de onda (nm)
Fosfato	HI 93713-01	610
Sulfato	HI 93751-01	466
Hierro	HI 93746-01	575
Calcio	HI 937521-01	466
Nitrato	HI 93728-01	525
Cloro	HI 93701-01	525
Magnesio	HI 937520-01	466
DQO	HI 93754C-25	610

7.3.3. Extracción de ADN libre y de microorganismos en el agua

De cada una de las muestras de agua recolectadas se filtraron 250 mL con papel filtro Whatman #1 para separar las partículas grandes, posteriormente se microfiltró con el sistema mostrado en la **Figura 10** para retener las bacterias en la membrana de ésteres mezclados de celulosa con tamaño de poro de 0.45 μm (*Millipore*, HAWP04700); para cada membrana se microfiltraron volúmenes de 50 mL. Estas membranas con las bacterias se resuspendieron en 5 mL de solución salina al 0.9% y se dejan en incubación a 37°C por 24 h.



Figura 10. Sistema de microfiltración.

Transcurrido el tiempo de incubación se tomaron 1.5 mL de cada muestra (esto se realiza por duplicado) y se centrifugaron a 11000 rpm por 5 minutos para separar y precipitar las células bacterianas. Una vez terminado el tiempo, se retiró la fase líquida por decantación y al precipitado se adicionaron 150 μL de solución amortiguadora de lisis (100 mM de EDTA, 100 mM de NaCl y 50 mM de Tris-HCl; ajustado a pH 8) y 100 μg de lisozima, la solución se homogenizó y se incubó por 10 minutos a 37 °C; al término del tiempo se adicionaron 22 μL de sarcosil al 20% y 175 μL de solución de Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico, se invirtieron los tubos suavemente y se

centrifugaron por 5 minutos a 11000 rpm; cuando el proceso de centrifugación fue completado, se retiró la fase acuosa del tubo y se colocó en un tubo limpio, a esta solución se añadió 1 volumen igual al de la fase acuosa de la solución de Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico, se invirtieron los tubos varias veces y se centrifugó durante 5 minutos a 11000 rpm; se realizó una tercera extracción con cloroformo añadiendo 1 volumen igual al de la fase acuosa invirtiendo los tubos varias veces y se centrifugó por 5 minutos a 11000 rpm; se retiró nuevamente la fase acuosa y al volumen recuperado se adicionó 1 volumen igual de etanol absoluto y 0.1 volúmenes (10% de la fase acuosa) de acetato de sodio 3 M pH 7 y los tubos se colocaron a -20 °C durante 10 minutos, al término del tiempo los tubos se centrifugaron a 11000 rpm durante 5 minutos; cuando el ciclo de centrifugación terminó se observa un precipitado claro y se desecha todo el líquido del tubo; finalmente, se adicionan 200 µL de etanol al 70% para lavar todo el posible etanol absoluto que pudiera quedar en el tubo y se desecha este etanol y el precipitado se resuspende con 25 µL de agua libre de nucleasas.

7.3.4. Electroforesis de ADN total

Las muestras de ADN total obtenidas a partir de microorganismos presentes en el agua de los muestreos se verificaron para observar si la extracción fue correcta o si hay suficiente material genético para la evaluación. Brevemente se describe el procedimiento.

Es necesario preparar una solución amortiguadora de TBE (tris/borato/EDTA) 10x (para 1 litro de solución se disuelven en agua tridestilada, 56 g de ácido bórico, 40 mL de EDTA 0.5 M pH 8 y 108 g de tris base) esta solución se diluyó 50 veces y se utilizó como solución amortiguadora de trabajo TBE 0.5x. Posteriormente, se preparó un gel de agarosa al 0.8% en TBE 0.5x y se vertió el volumen necesario de TBE 0.5x en la cámara de electroforesis para que el gel de agarosa estuviera sumergido totalmente (**Figura 11a**). Por otro lado, se mezclaron las muestras de ADN total, extraídas previamente, con el *buffer* de carga (*SmartGlow Loading Dye with Safe Green Stain for DNA Gel Electrophoresis, Accuris*). Esto se realizó adicionando 1 µL del *buffer* de carga y 3 µL de la muestra de ADN total (**Figura 11b**). Después de mezcladas las dos soluciones se depositó el volumen en el pozo del gel de agarosa que está dentro de la celda de electroforesis (**Figura 11c**). Para correr la electroforesis es necesario que el gel de agarosa esté del lado del polo negativo en la celda. Las condiciones de corrimiento en la celda de electroforesis fueron 90 V por 50 minutos. Al término del tiempo el gel fue revelado en un transiluminador ultravioleta a 302 nm.

7.3.5. Análisis por PCR

Las muestras de ADN total extraídas de los muestreos en agua del Río Nexapa fueron analizadas para detectar la presencia de los cuatro genes de resistencia a sulfonamidas. Para cada uno de los genes se diseñó un par de cebadores para amplificar la región del gen a detectar, estos cuatro pares de cebadores se muestran en la **Tabla 5**.

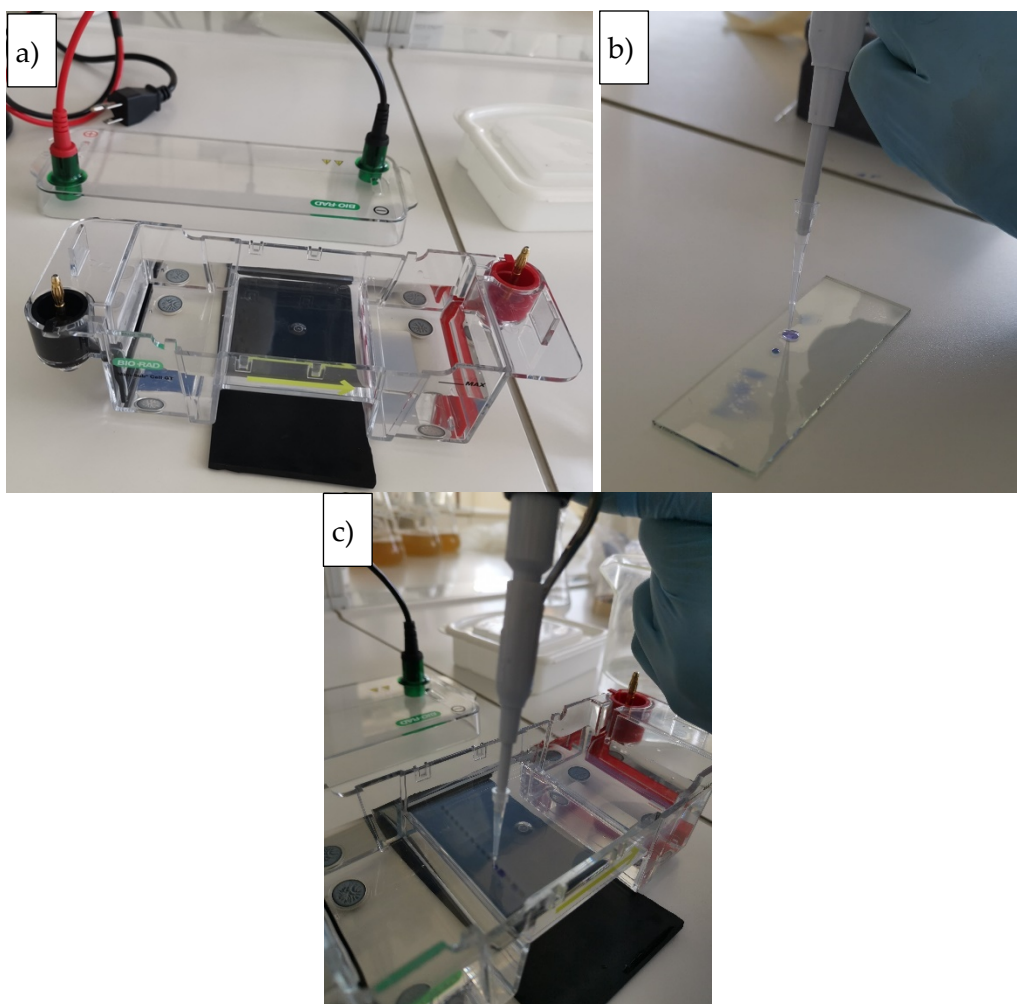


Figura 11. a) Cámara de electroforesis; b) preparación de la mezcla del *buffer* de carga y muestra de ADN total para electroforesis; c) aplicación de las muestras de ADN total sobre el gel de agarosa.

Tabla 5. Cebadores para los 4 genes de resistencia a sulfonamidas.

Gen	Sentido	Antisentido
<i>sul1</i>	GCCGATGAGATCAGACGTATTG	CTCGAAGAACCGCACAATCT
<i>sul2</i>	TCGGCATCGTCAACATAACC	CTGCTGAACCGCGAATATAGAG
<i>sul3</i>	CGCTTCCAGTAATCCTGATACA	CTGCAAGAGTTGGTGCTAAAC
<i>sul4</i>	CCACACTAACCAGCTTCAAATG	AGTTCTTCCTCTGCGCTTATAG

Para determinar la especificidad de los cebadores con sus genes diana, estos oligonucleótidos fueron analizados mediante el programa BLAST (Standard Nucleotide BLAST program³). Este programa analiza y califica el alineamiento de las secuencias nucleotídicas dadas para determinar el grado de igualdad, *in silico*, con respecto a todas las secuencias nucleotídicas, independientemente del tipo de organismo, que estén dadas de alta en el

³ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

programa. En el **ANEXO 2** se muestran el organismo, la referencia de origen, la secuencia completa, la ubicación y el amplicón (secuencia nucleotídica amplificada) de cada uno de los cuatro genes de resistencia a sulfonamidas.

Para realizar la PCR se adicionaron 1 μ L de la solución de ADN total, 0.5 μ L de cada uno de los dos cebadores del gen (cada gen se debe hacer por separado) y 23 μ L de la mezcla maestra de ADN taq polimerasa (*DreamTaq Green PCR Master Mix*) la cual contiene todos los componentes para llevar a cabo la amplificación de los genes a detectar. Esta solución fue colocada en un termociclador (*T100 thermal cycler, Biorad*) con las siguientes condiciones:

1. 94 °C por 1 minuto 30 segundos
2. 94 °C por 30 segundos
3. 52 °C por 45 segundos
4. De 52 °C a 65 °C por 30 segundos
5. 72 °C por 1 minuto
6. Del paso 2 al 5 se repitió 29 veces el ciclo
7. 72 °C por 4 minutos
8. Se bajó la temperatura a 12 °C

Al final del preceso en el termociclador, las muestras fueron sometidas a las mismas condiciones del apartado **7.3.4. Electroforesis de ADN total** modificando la concentración del gel de agarosa de 0.8% a 1.5%, con un tiempo final de 90 minutos.

7.4. Desarrollo del biosensor

La determinación de los cuatro genes de resistencia para todas las muestras de agua obtenidas en el Río Nexapa se analizaron mediante la técnica de PCR. Alternativamente, se propone una técnica basada en la detección electroquímica con la fabricación de un biosensor que utiliza secuencias de ADN inmovilizadas sobre partículas magnéticas, esto precedido con la amplificación isotérmica (amplificación mediada por recombinasa polimerasa, RPA por sus siglas en inglés). Esta tecnología alternativa reduce los tiempos de análisis, reactivos e instrumental utilizado y se propone para la detección de los genes *sul1* y *sul4* que son actualmente los genes de mayor interés para medir, genotípicamente, la resistencia a sulfonamidas.

Para desarrollar el biosensor se diseñaron secuencias nucleotídicas específicas para para la región del gen diana (sonda de captura y sonda señal). En el **ANEXO 3** se detallan los materiales utilizados y su preparación, así como las secuencias nucleotídicas que se utilizaron.

7.4.1. Protocolo para la fabricación del biosensor y detección de genes *sul1* y *sul4*

En la **Figura 12** se esquematiza el procedimiento general de ensamble de todos los componentes del biosensor con la posterior medición electroquímica de la respuesta en la señal producida.

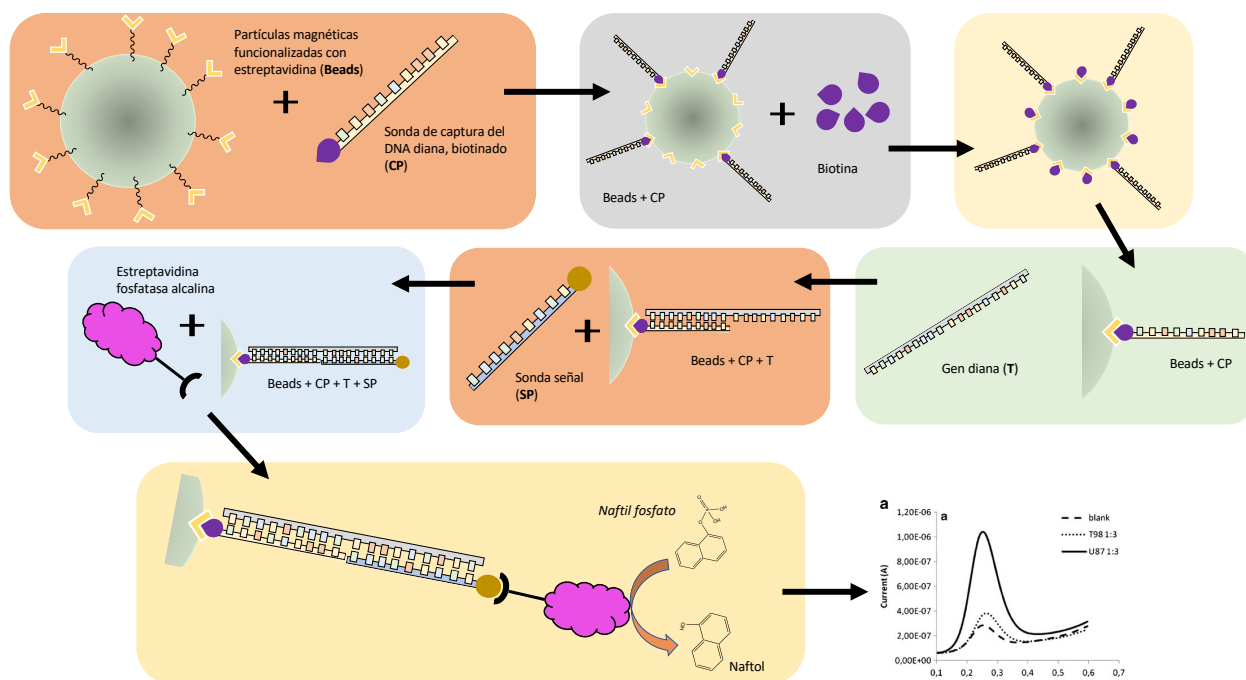


Figura 12. Esquema general de la fabricación del biosensor y la medición de los genes de resistencia (elaboración propia, 2023).

A continuación, se describe detalladamente el protocolo de fabricación del biosensor partiendo de la funcionalización de las partículas magnéticas (**Beads**) con la sonda de captura (**CP**), posteriormente la inmovilización de la secuencia diana (**T**) y finalmente, los parámetros y la medición mediante electroquímica de los genes *sul1* y *sul4*.

7.4.1.1. Funcionalización de partículas magnéticas

1. Se toma el frasco de las **Beads** y se aplica vórtex por alrededor de un minuto, se comprueba visualmente, después del tiempo, si la solución es homogénea y las paredes del frasco no contienen partículas adheridas.
2. En un vial eppendorf de 1.5 mL se colocan 50 μL de las **Beads**.
3. Se coloca el vial en un magneto y se esperan 2 minutos para retirar la solución buffer.
4. Se lavan las partículas magnéticas con 200 μL de **B&W-2X**, vórtex por 5 segundos, se colocan nuevamente en el magneto por 2 minutos y se retira la solución procurando no perturbar la solución para que las partículas no se separen del magneto. Se realiza este paso una vez más.
5. Se toma el vial de **CP** (4 μL) y se centrifuga (10000 rpm) para adherir la gota al fondo del vial.
6. Se adicionan 200 μL de **B&W-1X** al vial de **CP** y vórtex por 5 segundos (la concentración final de **CP** es de 1 μM).
7. Se toman 200 μL de la solución de **CP** y se adicionan al vial de las **Beads**, se aplica vórtex por 10 segundos.
8. Se deja incubar por 30 minutos a temperatura ambiente en un rotador.

9. Al término del tiempo se coloca la solución en el magneto por 2 minutos y se retira el líquido teniendo cuidado de no tocar las paredes con la pipeta para no separar las **Beads** del magneto.
10. Se lavan tres veces las **Beads** funcionalizadas con **CP**; (200 µL), dos veces con **B&W-1X** y una vez con **B&W-1X + Tween**.
11. Se adicionan 200 µL de la solución de **Biotina** a las partículas magnéticas y se aplica vórtex por 10 segundos.
12. Se deja incubar por 30 minutos a temperatura ambiente en el rotador.
13. Al término del tiempo se coloca el vial en el magneto por 2 minutos y se retira la solución
14. Lavar 2 veces con **B&W-1X + Tween**.
15. Se resuspenden las **Beads**, ya funcionalizadas y bloqueadas con la **Biotina**, con 250 µL de **B&W-1X + Tween** y se conservan en refrigeración (2-8 °C).

7.4.1.2. Inmovilización del gen diana y la sonda señal sobre las partículas magnéticas

1. Se toman los viales previamente preparados de **SP** y el **T** (**ANEXO 2**) y se centrifugaron a 10000 rpm por 2 minutos.
2. A la solución **SP** se adicionan 522 µL de **PBS** (la concentración final es de 383 nM).
3. Dependiendo de la concentración a la que se desea detectar o preparar una curva de calibración del **T** se adiciona el volumen necesario de **PBS**, por ejemplo, si se desea una concentración de 20 nM se adicionan 980 µL de **PBS** al vial que contiene los 20 µL de **T** previamente preparado a 1 µM.
4. En otro vial se adicionan 30 µL de **SP** + 30 µL de **T** (esto se realiza para cada nivel de concentración que se desea preparar). Adicional a las muestras **T**, se prepara un blanco con 30 µL de **SP** + 30 µL de **PBS**.
5. Se calienta en un termo mezclador a 99 °C 300 rpm por 5 minutos.
6. Se colocan los viales en un baño de hielo por 1 minuto.
7. Por otro lado, Se toman 10 µL de las **Beads** funcionalizadas con **CP** y se colocan en un vial de 1.5 mL y se realizan tres lavados; (200 µL) dos con **PBS + Tween** y uno con **PBS**.
8. Se toman 50 µL de la mezcla de **SP** + **T** y se adiciona este volumen a los 10 µL de las **Beads** funcionalizadas con **CP**.
9. Se incuba la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente en el rotador.
10. Después del tiempo se lavan tres veces; (200 µL) dos con **DEA + Tween** y uno con **DEA**.
11. Se toma el vial de enzima (**E**) y se adicionan 992 µL de **DEA**.
12. Se adicionan 50 µL al vial de las **Beads** + **CP** + **SP** + **T**.
13. Se incuba en el rotador por 15 minutos a temperatura ambiente.
14. En el tiempo de incubación se prepara la solución **S**.
15. Después del tiempo de incubación, las **Beads** + **CP** + **SP** + **T** + **E** son lavadas tres veces; (200 µL) dos con **DEA + Tween** y uno con **DEA**.
16. Finalmente, las **Beads** + **CP** + **SP** + **T** + **E** son resuspendidas con 50 µL de **DEA** y se mantiene a temperatura de refrigeración (2 - 8°C) hasta su análisis electroquímico.

7.4.1.3. Medición electroquímica

1. En un electrodo serigrafado con carbono se colocan 10 μL de la solución de las **Beads + CP + SP + T + E** (antes de colocar el volumen de la solución aplicar vórtex por 10 segundos). Este volumen se deposita en el electrodo de trabajo que es el del centro (**Figura ANEXO3-1**). Se debe tomar en cuenta que debajo del electrodo debe permanecer un magneto para asegurar que las partículas magnéticas funcionalizadas permanezcan inmovilizadas.
2. Adicionar 60 μL de la solución de sustrato (**S**) sobre la superficie del electrodo (toda la gota debe cubrir los tres electrodos y reaccionar con los 10 μL depositados previamente en el electrodo de trabajo).
3. Al momento de colocar la solución **S** cronometrar exactamente 3 minutos para que se lleve a cabo la reacción catalítica de oxidación del 1-naftil fosfato a 1-naftol.
4. Después de los 3 minutos se realizó la medición electroquímica mediante DPV (potenciostato, *Princeton Applied Research 263A*) a partir de las condiciones instrumentales mostradas en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Condiciones instrumentales para la medición del sustrato enzimático sobre la superficie del electrodo

Condiciones de medición	
Celda apagada después de la medición	Si
Tiempo de modulación (≥ 0.002 s)	0.0622
Intervalo de tiempo (≥ 0.10 s)	0.229
Potenciales	
Potencial inicial (V)	-0.1
Potencial final (V)	0.6
Potencial de paso	0.00675
Amplitud de modulación	0.0939
Potencial de espera (V)	0.1

7.5. Análisis estadístico

Todos los datos cuantitativos de la caracterización del agua y parámetros ambientales fueron tratados con estadística descriptiva y se aplicó análisis de varianza con un intervalo de confianza del 95 % para conocer si existen diferencias en las medias de los datos medidos en los intervalos de tiempo. Para observar y describir la relación que existe entre los parámetros ambientales y la presencia de los genes de resistencia en los diferentes puntos de muestreo y los diferentes muestreos realizados se aplicó un análisis de *Correlación de Spearman*. Todos los análisis estadísticos se realizaron en *Minitab 18*.

7.6. Diagnóstico de la problemática ambiental

Para integrar las observaciones, mediciones y datos recopilados durante el desarrollo de esta investigación, se utilizó el modelo *fuerza motriz-presión-estado-impacto-respuesta* (DPSIR, por sus siglas en inglés). El diagnóstico de la problemática de la presencia de microorganismos

resistentes y sus biomoléculas a sulfonamidas está basado en la interrelación de factores sociales, económicos y ambientales que modifican la dinámica del sistema de manera negativa o positiva dependiendo de las variables que intervengan (Zare et al., 2019). Para hacer la caracterización socioeconómica del sistema de estudio, se obtuvieron datos estadísticos de INEGI, Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social (CONEVAL), Consejo Nacional de Población (CONAPO) y el Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal (INAFED), con el fin de conocer el índice demográfico, marginación, pobreza, educación, salud, infraestructura social, economía, comercio, servicios públicos, que nos ofrezcan los datos relevantes a considerar en la presente investigación; además de tesis y trabajos realizados previamente en la zona por diversos grupos de investigación. En la **Figura 13** se esquematizan los diferentes indicadores de los apartados que integran el modelo DPSIR.

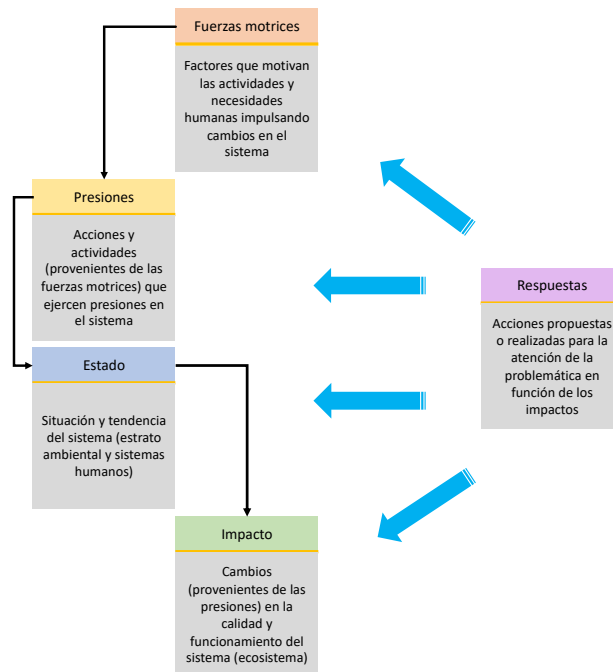


Figura 13. Esquema de los apartados del modelo DPSIR (elaboración propia, 2023, con información de (Lhermie et al., 2019)).

Con el modelo DPSIR se pretende establecer un marco de referencia que ayude a responder a las interrogantes generadas en la evaluación, interviniendo y planificando, cómo la problemática de la RAM tiene implicaciones sistémicas en el río Nexapa y que este marco pueda ser utilizado por los tomadores de decisiones, no solo de los ámbitos municipal, sino estatal para que el abordaje interrelacionado se aplique de manera holística.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1. Caracterización de la zona de estudio y parámetros ambientales

8.1.1. Zona de estudio

El Río Nexapa nace desde la vertiente Oriental del Volcán Iztaccíhuatl y en las vertientes Oriental y Sur del Volcán Popocatepetl. Este río es la corriente principal de la cuenca hidrológica Río Nexapa, también llamada subcuenca de Huaquechula, ubicada al poniente del estado de Puebla, en la región hidrológica número 18 “Río Atoyac”, en la región del Balsas y tiene una superficie de 4,214.25 km², y se encuentra delimitada por las siguientes regiones y cuencas hidrológicas: al Norte por la cuenca hidrológica Río Alto Atoyac y por la Región Hidrológica número 26 Pánuco; al Sur y Este por la cuenca hidrológica Río Bajo Atoyac; y al Oeste por la cuenca hidrológica Río Amacuzac (**Figura 14**) (CONAGUA, 2011). El río atraviesa, dentro de la cuenca, 13 municipios que interactúan y contribuyen en el uso y manejo del recurso hídrico, modificando intrínsecamente los parámetros morfométricos y de disponibilidad y contaminación del agua (CONAGUA, 2018).

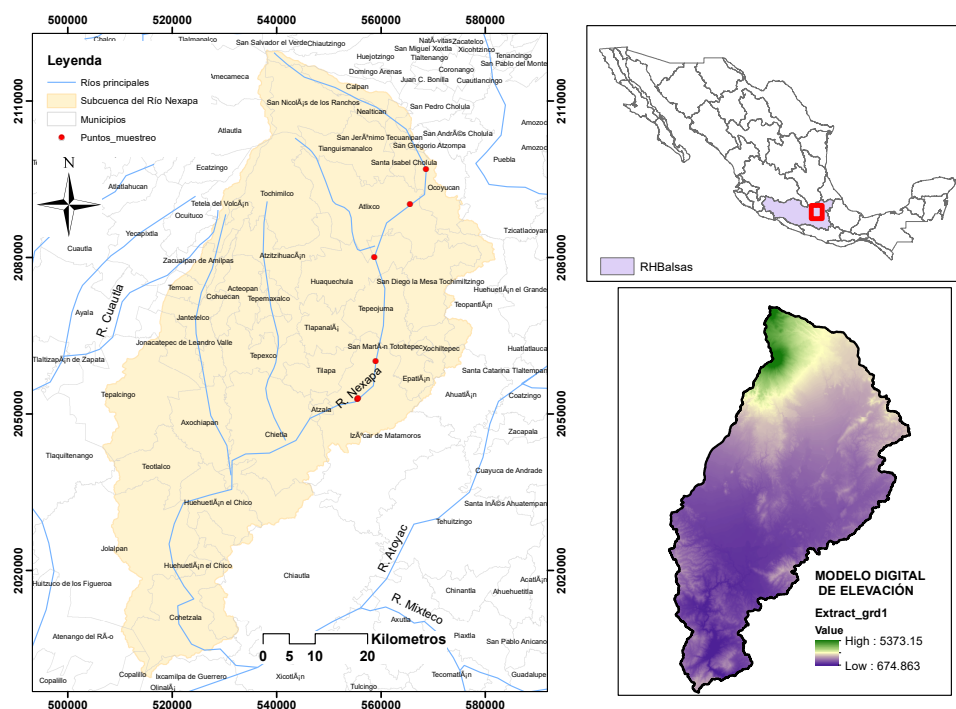


Figura 14. Ubicación del río Nexapa dentro de la cuenca Río Nexapa y puntos de muestreo (elaboración propia, 2023).

Con ayuda del Dr. Jorge Antonio Herrera Cárdenas, jefe del Departamento de Investigación y Desarrollo de la Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros y de trabajos previos de monitoreo de agua en el río Nexapa (Navarro et al., 2013, 2014) se seleccionaron 7 sitios para la toma de muestras (**Figura 14**). En la **Tabla 7** se muestran las coordenadas de los puntos de muestreo seleccionados. El primer sitio de muestreo está ubicado previo a la zona urbana de

Atlixco cercano al nacimiento de agua proveniente de las faldas del volcán Iztaccíhuatl, por sus características esta agua es tomada como referencia para los análisis de caracterización (**Figura 15**).

Tabla 7. Coordenadas de los puntos de muestreo en el río Nexapa.

Nombre del punto de muestreo	Coordenadas	
	Latitud Norte	Latitud oeste
S1	18° 57.023'	98° 23.398'
S2	18° 54.247'	98° 22.646'
S3	18° 48.691'	98° 25.884'
S4	18° 37.603'	98° 28.137'
S5	18° 34.048'	98° 28.373'
S6	18° 34.048'	98° 28.373'
S7	18° 53.980'	98° 28.438'



Figura 15. Sitio de muestreo 1 (S1) (fotografía propia, 2023).

El punto de muestreo 2 se encuentra sobre el río Nexapa, a un costado del lugar de recolección de la muestra hay una casa donde habita solo una persona, dentro de la propiedad hay cultivos de cilantro listos para cosechar, el agua de irrigación para los cultivos no es proveniente del río, la obtienen de aguas subterráneas y la almacena para su uso a un lado de su hogar (**Figura 16**). Este punto tenía un olor bastante desagradable y el agua no era en absoluto transparente, tenía un tono grisáceo, esto debido a que cerca del lugar hay una vertiente del Río Atoyac, uno de los ríos con mayor carga de contaminantes en México (Mora et al., 2021).



Figura 16. Sitio de muestreo 2 (S2) (fotografías propias, 2023).

Cerca del tercer punto de muestreo, no hay población que habite ahí, pero hay bastante movimiento y actividad económica, pues por un lado hay una granja ganadera con alrededor de 100 cabezas de ganado, tal vez más, ya que no se pudo observar un panorama completo dentro de la granja, por lo que hay un fuerte indicio de uso de antibióticos; por otro lado, hay una granja de diversos productos agrícolas, principalmente orégano. Estas dos actividades económicas propician la contaminación del río, ya que se observa demasiado sucia el agua e incluso con presencia de espuma (**Figura 17**).



Figura 17. Sitio de muestreo 3 (S3) (fotografías propias, 2023).

De los siete sitios de muestreo, el cuarto es el que concentra la mayor cantidad de personas viviendo cerca del lugar de recolección de agua. Se observó que hay bastantes carencias a nivel de comunicación, ya que el acceso es bastante complicado pues no existe camino para acceder a sus hogares, incluso hay un puente provisional muy peligroso para cruzar el río, pero es el único acceso que tiene la población para llegar a sus hogares del lado más cercano al camino pavimentado (**Figura 18**). De acuerdo a nuestro informante los asentamientos cercanos al río son irregulares, por lo que la marginación es evidente, hay poca atención en mantener el lugar limpio y la mayoría de los hogares tienen animales domésticos y pequeñas granjas; la descargas de sus aguas residuales es directa al río, sin ningún tratamiento previo, por lo que si la población utiliza antimicrobianos estos pasan directamente al agua del río de forma inalterada o metabolizada con sustancias que pueden ser incluso más activas generando una presión fuerte en el sistema.



Figura 18. Sitio de muestreo 4 (fotografías propias, 2023).

El punto de muestreo 5 está 500 metros antes de la descarga de la planta de tratamiento de aguas residuales de Izúcar de Matamoros (**Figura 19a**). El sexto punto de muestreo se encuentra directamente en la descarga de la planta de tratamiento al río (**Figura 19b**), es importante resaltar que la planta de tratamiento no estaba en funcionamiento a la hora de los muestreos por lo que las descargas de la ciudad de Izúcar van directo al río sin ningún tipo de tratamiento, esto influye demasiado en el olor extremadamente desagradable que desprende el lugar. El agua del sitio siete de muestreo fue tomada aproximadamente 500 metros posterior a la descarga municipal para así poder evaluar comparativamente. con el agua del sitio de muestreo 6, la capacidad del agua para purificarse después de la PTAR (**Figura 20**).

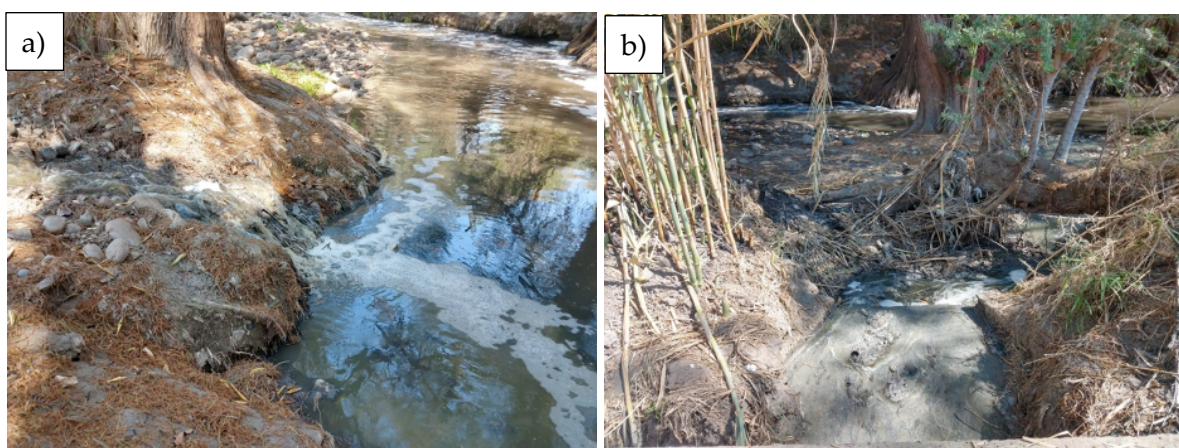


Figura 19. a) Sitio de muestreo 5 (S5) y b) sitio de muestreo 6 (S6) (fotografías propias, 2023).



Figura 20. Sitio de muestreo 7 (S7) (fotografía propia, 2023).

8.1.2. Elevación, temperatura y precipitación en la zona de estudio

La temperatura media anual de cada una de las 58 estaciones climatológicas mostradas en **ANEXO 1** se relacionó con su respectiva elevación en msnm, observando que tienen una relación relativamente aceptable ($R^2 = 0.67$) (**Figura 21**), por lo que a mayor altura en la cuenca la temperatura disminuye, como se observa en el mapa de isotermas de la **Figura 22**. La temperatura media anual determinada para la región del río Nexapa (de Atlixco a Izúcar de Matamoros) es de 20°C.

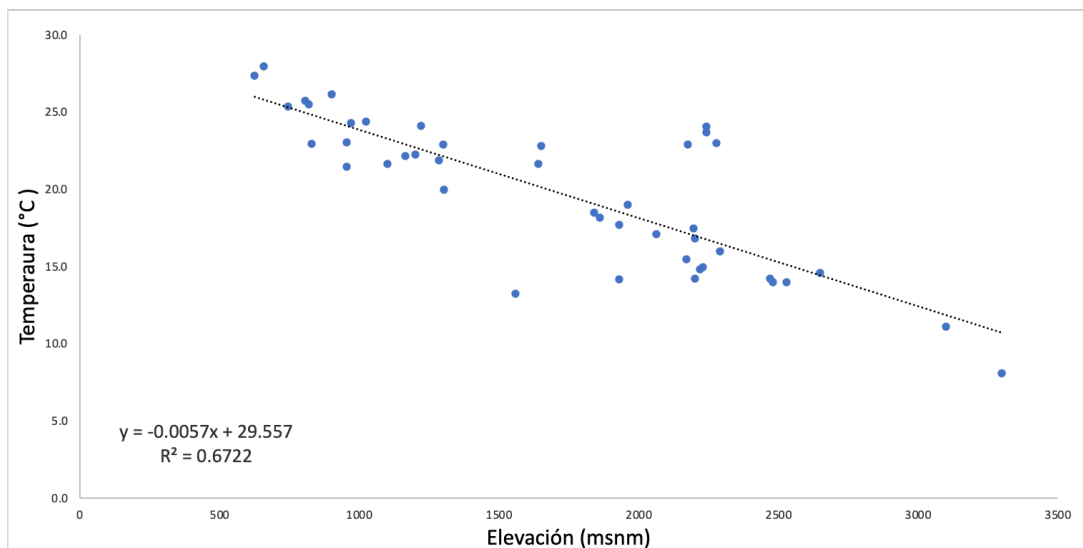


Figura 21. Relación de temperatura y elevación en el río Nexapa (elaboración propia, 2023).

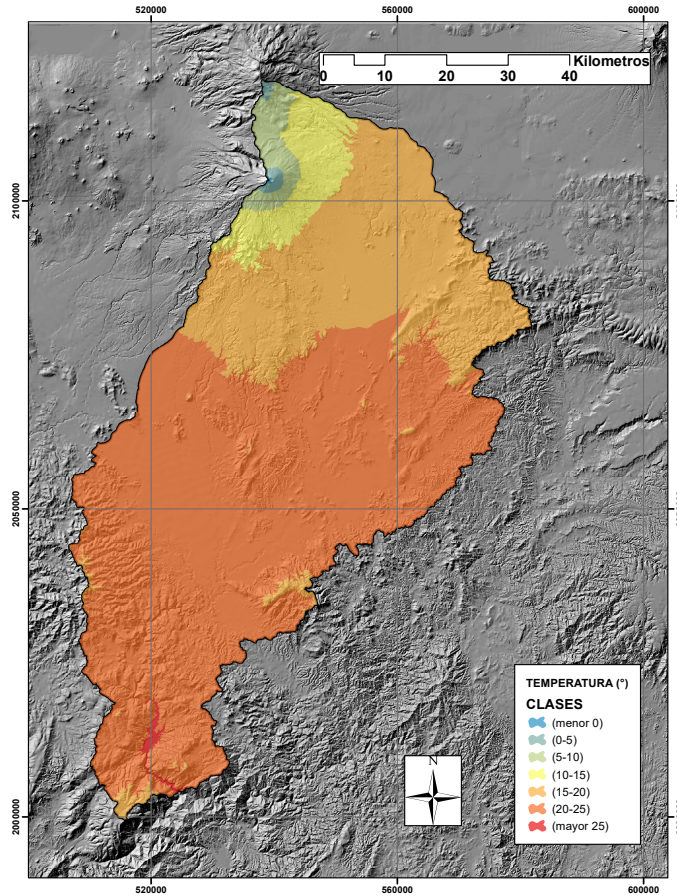


Figura 22. Mapa de temperatura en la cuenca Río Nexapa (elaboración propia, 2023).

Después de aplicar la modelación por *kriging ordinario* se obtuvo el mapa de precipitación (isoyetas) (**Figura 23**) observándose que en las zonas más elevadas (zona de los volcanes Iztaccíhuatl-Popocatepetl) es donde mayor cantidad de precipitación se produce anualmente. En la región del río Nexapa, donde se realizaron la mayoría de los muestreos, la precipitación promedio es menor (893 mm) que en la zona de los volcanes, por lo que en los sitios de muestreo, al no tener gran cantidad de precipitaciones puede favorecer que las corrientes no crezcan lo suficiente como para “lavar” las distintas áreas circundantes del río y por consiguiente acumularse los contaminantes (plaguicidas, metales pesados, nutrientes agrícolas y medicamentos antimicrobianos de las descargas cercanas) e incluso los microorganismo y así estos puedan interactuar y compartir genes de resistencia mediante transferencia horizontal (Collignon et al., 2018).

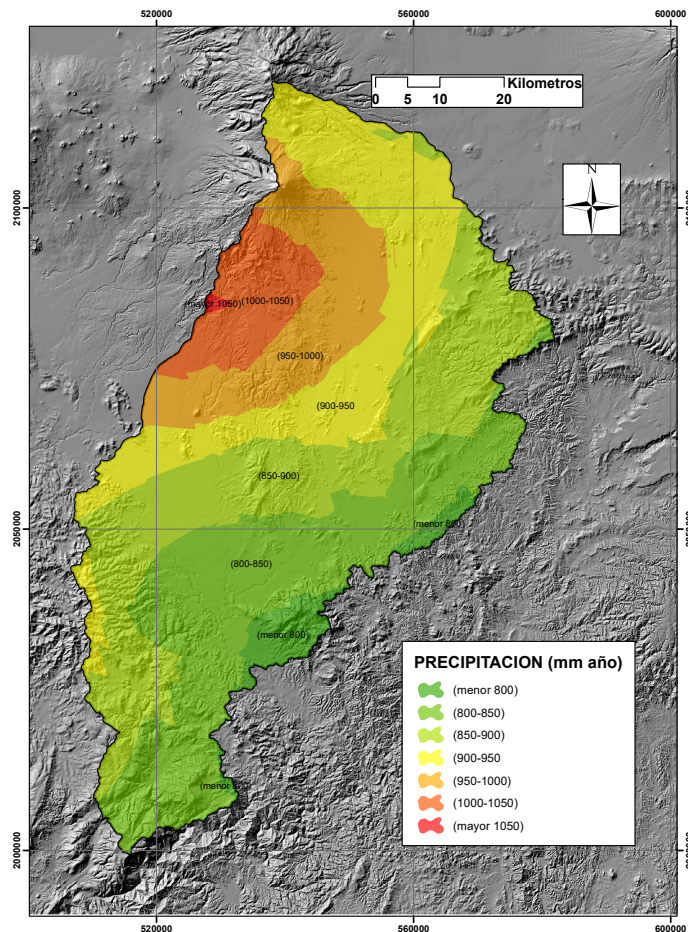


Figura 23. Precipitación media anual en la cuenca Río Nexapa (elaboración propia, 2023).

8.1.3. Análisis de parámetros morfométricos

El análisis cuantitativo de los parámetros morfométricos es de gran utilidad en la evaluación de las cuencas hidrográficas, ya que con este análisis se pueden establecer prioridades en cuanto a la conservación del suelo y el agua, y la gestión de los recursos naturales y poder estimar el estado del recurso hídrico y sus alteraciones y con esto describir factores que impulsen las distintas problemáticas ambientales, en este caso la resistencia a los antimicrobianos. La geología, el relieve, cobertura vegetal, topología, tipo de suelo y el clima son los principales determinantes del funcionamiento de los ecosistemas, principalmente de agua, a una escala o nivel de cuenca (Horton, 1932; Schumm, 1956; Strahler, 1952).

En la **Tabla 8** se muestran todos los valores de los parámetros calculados para la caracterización de la cuenca. El río Nexapa es una corriente perenne alimentada por una gran cantidad de escurrimientos (red de drenaje). Es importante establecer el número de orden de la cuenca para conocer el potencial erosivo y de transporte de contaminantes (de origen natural y antrópico) en el río. El orden se relaciona con el nivel de los escurrimientos en cuanto a su jerarquía de las ramificaciones de la red de la cuenca. En el caso de la zona de estudio, el escurrimiento en los puntos de muestreo 1 y 2 es de orden 5 y en los sitios de muestreo 3, 4, 5 y 6 el orden es 6 (**Figura 24**), estos órdenes son elevados, observándose que el río tiene muchas

contribuciones de otros órdenes menores y que el río atraviesa por diferentes regiones teniendo un mayor desarrollo fluvial, por consiguiente esto impacta en la calidad de agua incrementándose su contaminación conforme se avanza río abajo (Campos-Aranda, 1998; Horton, 1945).

Tabla 8. Parámetros y descripción en la caracterización de la cuenca del Río Nexapa
(elaboración propia, 2023)

Parámetro	Descripción
Cuenca	Río Nexapa
Elevaciones (msnm)	674.8 - 5373.1
Descripción de la cuenca	Grande
Clasificación	Exorreica
Forma de la Cuenca	Oval-Oblonga a rectangular oblonga
Tipo de drenaje	Dendrítico
Área (km ²)	4437.2
Perímetro (km)	408.2
Altura media (msnm)	1633.7
Relieve (msnm)	4698.2
Pendiente de la cuenca (%)	18.9
Longitud de la cuenca (km)	114.5
Índice de compacidad (adimensional)	1.728
Índice de forma (adimensional)	0.338
Curva hipsométrica	Cuenca erosionada o cuenca de valle
Número orden	7
Número de escurrimientos	8863
Longitud de los escurrimientos (km)	8870
Longitud del escurrimiento principal (km)	208.95
Densidad drenaje (km/km ²)	0.0471
Densidad hidrológica (n/km ²)	1.997
Relación de bifurcación (RB adimensional)	(H) 2.74 (S)1.98
Pendiente del río principal (%)	8.32
Tiempo de concentración (h)	17.49

La cuenca Río Nexapa tiene un área de 4437 km² y un perímetro de 408 km, por lo que se considera una cuenca grande (las cuencas grandes se caracterizan por tener una extensión de entre 2500 a 5000 km²). La altura media de la cuenca es de 1634 msnm con elevaciones que van de los 675 a los 5373 msnm, lo cual es una altura considerable y que puede influir en la temperatura y precipitaciones, tal como se observa en las **Figuras 22 y 23**, esto debido que se encuentran dos de las regiones más altas del país, el Iztaccíhuatl y el Popocatepetl.

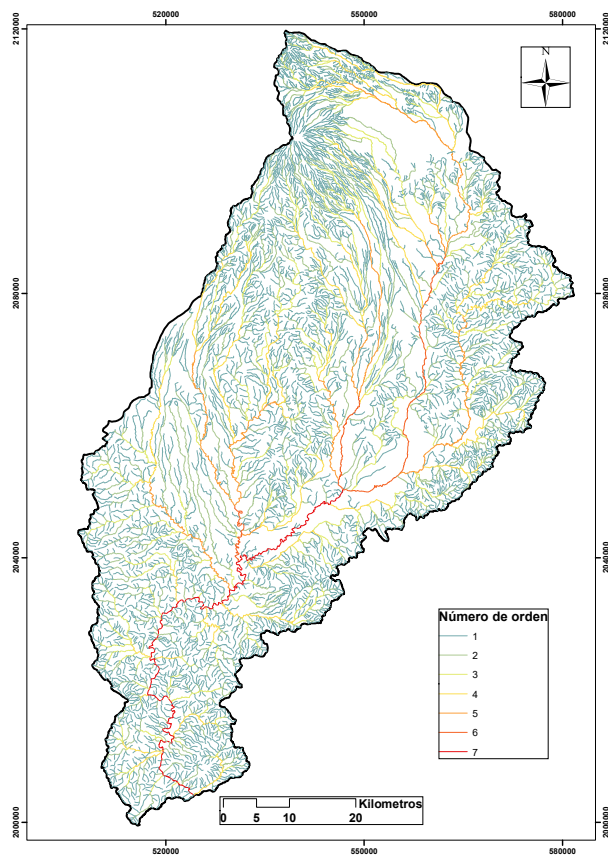


Figura 24. Escurrimiento y número de orden en la cuenca Río Nexapa (elaboración propia, 2023).

El relieve de la cuenca tiene gran influencia sobre la respuesta hidrológica y en gran medida sobre el escurrimiento superficial. Al relieve lo acompaña la pendiente, este es un factor importante en el impulso del escurrimiento, la relación de infiltración y la humedad del suelo, relacionando este parámetro con fenómenos erosivos que se manifiestan en la superficie, por lo que se puede decir que a mayor pendiente menor será la duración de concentración del agua de escorrentía en la red de drenaje y afluentes del curso principal (Campos-Aranda, 1998; Guerra & González, 2002). El relieve en la cuenca es de 4698 msnm, un valor elevado pero comprensible si se retoma el hecho de que hay uno de los puntos más altos de México, la pendiente tiene un valor elevado (19%) debido a la contribución de los volcanes, este valor de pendiente indica que la cuenca Río Nexapa está fuertemente accidentada por lo que la duración de concentración del agua en la red de drenaje es muy poca y el potencial erosivo es grande debido a que no hay buena infiltración ni humedad en el suelo pues el tiempo de retención es muy poco.

Para conocer la irregularidad de la cuenca y entender si hay mayores probabilidades de que crezcan o acumulen los niveles hídricos se debe calcular el índice de compacidad mediante la relación entre el perímetro de la cuenca y su circunferencia. Hay tres clases de formas de cuenca de acuerdo al cálculo de índice de compacidad, en el caso de la cuenca Río Nexapa el valor del índice es 1.72 por lo que la cuenca se considera oval – oblonga a rectangular oblonga, por lo que se hace evidente que la escorrentía se extenderá con el tiempo y se producirá un pico de

inundación menor que si la cuenca tuviera una forma circular (Campos-Aranda, 1998). La distribución y arreglo geométrico de los ríos que contribuyen e integran la red hidrográfica lo comprende el índice de forma. El índice de forma en la cuenca fue de 0.34, lo que indica laderas largas y una red hidrológica encañonada de pendientes altas y con forma alargada predominando las escorrentías con alta densidad de drenaje (Guerra & González, 2002).

La curva hipsométrica representa el área drenada que varía dependiendo de la altura y su superficie, estos datos tienen relación con la temperatura y las precipitaciones. La curva hipsométrica representa, gráficamente, las elevaciones del terreno en función a la superficie correspondiente y permite estimar el equilibrio dinámico potencial de la cuenca, la etapa geológica y el ciclo erosivo de la cuenca, los tres estados o etapas de una cuenca respecto a la curva hipsométrica son *etapa 1 de desequilibrio* que son cuencas geológicamente jóvenes, llamada cuenca de meseta o de montaña; *etapa 2 de equilibrio*, cuenca geológicamente madura, cuenca de pie de montaña; *etapa 3 cuenca erosionada*, cuenca de valle (**Figura 25a**). En este caso es una cuenca erosionada debido al patrón de la curva hipsométrica mostrado en la **Figura 25b** y la cual tiene relación con el número de orden mostrado en la **Figura 24**, ya que a mayor número de orden (orden 5 y 6 en la fracción del río estudiado) mayor será el poder de erosión.

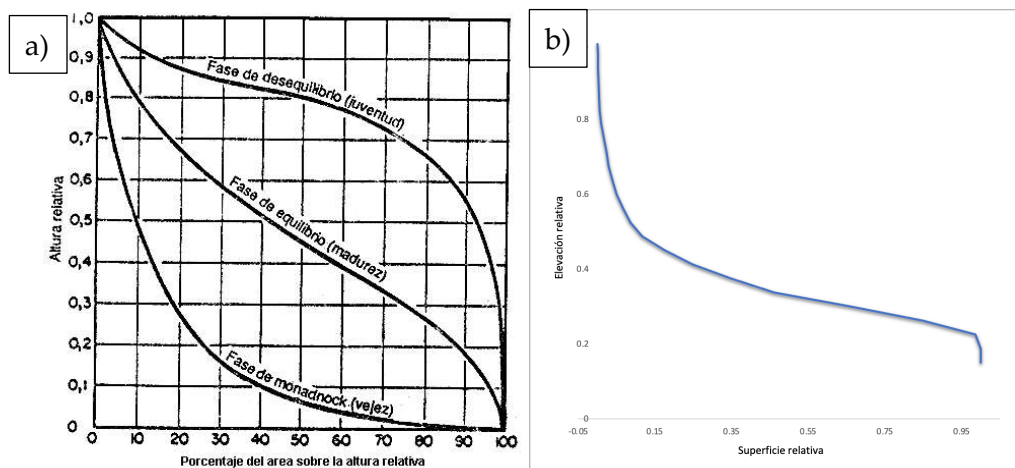


Figura 25. a) Clasificación de la curva hipsométrica; **b)** Curva hipsométrica de la cuenca Río Nexapa (elaboración propia 2020).

La densidad de drenaje manifiesta la morfología de la cuenca relacionando el área total de la cuenca con la longitud de los escurrimientos, este parámetro expresa el flujo y transferencia (en velocidad) de sedimentos a través del agua en la cuenca, las áreas de mayor superficie promueven una mayor escorrentía, cobertura vegetal escasa, suelos impermeables y generación de sedimentos. La cobertura vegetal y el uso del suelo influyen en la densidad del drenaje, cuando no hay mucha cobertura vegetal el entorno está expuesto a las precipitaciones aumentando las tasas erosivas y disección del paisaje, propiciando, por ende, una escorrentía más rápida (Horton, 1945; Meza-Rodríguez, 2006). En la **Figura 26** se observa el mapa de densidad de drenaje (0.05 km/km^2) de la cuenca Río Nexapa, donde la zona más elevada, la del volcán Popocatepetl, presenta la densidad de drenaje más alta, esto era de esperarse respecto a la relación que hay entre elevación y temperatura en la cuenca **Figura 22**.

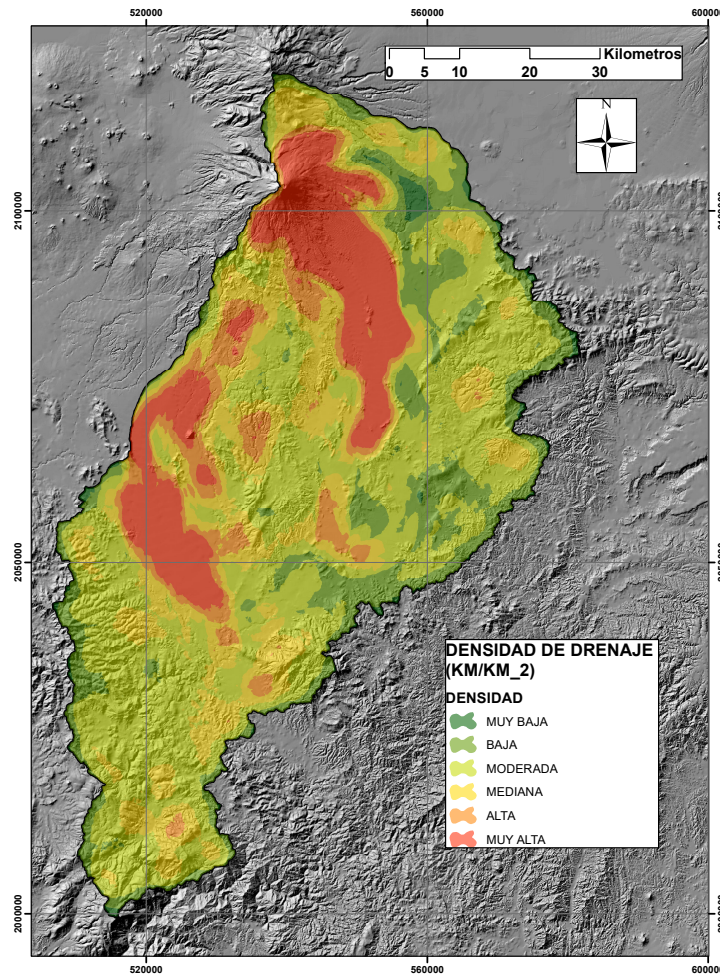


Figura 26. Densidad de drenaje de la cuenca Río Nexapa (elaboración propia, 2020).

Finalmente, el tiempo de concentración, también llamado tiempo de equilibrio, es el tiempo que demora una gota de lluvia en trasladarse desde el punto más alejado (inicial) de la cuenca hasta la desembocadura de la misma, cuanto menor es el tiempo de concentración el gasto es intenso con secciones rápidas a diferencia de los tiempos de concentración largos gastos atenuados y recesiones sostenidas, considerando que no existe evaporación y que la superficie es impermeable (Meza-Rodríguez, 2006). El tiempo de concentración en la cuenca en estudio es de 17.5 h, se podría pensar que el tiempo es elevado, pero si consideramos que la longitud del escurrimiento principal es de 208 km, una gota de lluvia transita 11 kilómetros por hora desde el inicio de la cuenca hasta la desembocadura de la misma.

8.1.4. Alteración hidrológica

En la **Figura 27** se muestra el gráfico del gasto medio mensual durante el periodo de 1959 al 2005, en el gráfico se determinó el periodo correspondiente al RHN (1959-1968) y el RHA (1969-2005), esto con base en la diferencia de la tendencia del gasto a través del tiempo. Con los dos grupos de datos, se organizó cada grupo en caudales mensuales para su respectivo año, posteriormente se calcularon, en el RHN, los percentiles 10 y 90 para cada mes del año y anual.

Los datos agrupados, tanto mensual (**Tabla 9**) como anual (**Tabla 10**), del RHA se verificaron con el RHN para evaluar si se encontraban dentro o fuera del régimen de caudal ordinario máximo (P90, percentil 90) y mínimo (P10, percentil 10). En la cuenca Río Nexapa, en todos los meses del año el caudal se encuentra alterado al igual que en el anual, en donde ninguno de los años evaluados cumplió con los parámetros de alteración. El índice global del estado del régimen hidrológico (mensual y anual) tuvo un 3% de cumplimiento, por lo que se considera que está hidrológicamente alterado.

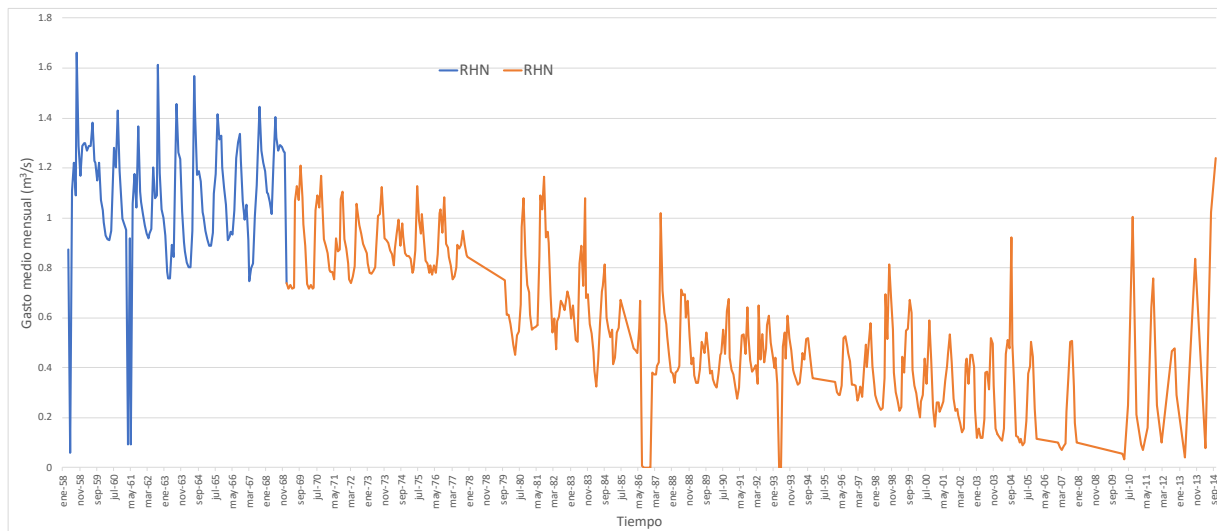


Figura 27. Histórico del gasto medio mensual (m³/s) en la estación hidrométrica 18293.

8.2. Evaluación de las dinámicas sociales

8.2.1. Análisis del discurso

Para poder interpretar y entender los textos de los discursos de Izúcar y Atlixco es necesario conocer las principales actividades económicas y la situación social de cada región, esto ayuda a la comprensión de los intereses y dirección de la gestión con un propósito real o intrínseco en combatir la RAM.

De acuerdo con los datos del Informe Anual Sobre la Situación de Pobreza y Rezago Social, para 2018 la población del municipio de Atlixco era de 134 720 personas con una superficie de 294 km² teniendo una densidad poblacional de 458 personas por km² (INAFED, 2010a; SEDESOL, 2013a). En Izúcar de Matamoros, los habitantes en 2018 fueron 73 629 en una superficie de 539 km² por lo que por km² habitan 136 personas (CONAGUA, 2018; INAFED, 2010b). Hay una diferencia observable en cuanto a la densidad poblacional por km², en ambos casos la mayor densidad se encuentra en las ciudades principales, 68% en el caso de la ciudad de Atlixco (SEDESOL, 2013a) y 60% en la ciudad de Izúcar de Matamoros (SEDESOL, 2013b).

Tabla 9. Porcentaje de cumplimiento mensual.

Parámetros	Caudal medio natural (m³/s)		Caudal medio actual (m³/s)	Mediana	Número de meses que cumplen	Total de meses	Porcentaje de cumplimiento	Clases
	P10	P90						
Enero	0.92	1.12	0.50	0.40	0	33	0%	ALTERADO
Febrero	0.82	1.12	0.47	0.41	2	33	6%	ALTERADO
Marzo	0.68	1.09	0.44	0.37	9	33	27%	ALTERADO
Abril	0.80	1.04	0.44	0.39	2	33	6%	ALTERADO
Mayo	0.75	1.23	0.47	0.43	7	33	21%	ALTERADO
Junio	0.99	1.42	0.65	0.55	5	33	15%	ALTERADO
Julio	1.13	1.33	0.67	0.65	0	33	0%	ALTERADO
Agosto	1.09	1.42	0.65	0.56	0	33	0%	ALTERADO
Septiembre	1.18	1.46	0.75	0.64	1	33	3%	ALTERADO
Octubre	1.14	1.29	0.67	0.62	0	33	0%	ALTERADO
Noviembre	1.03	1.22	0.57	0.50	0	33	0%	ALTERADO
Diciembre	0.98	1.19	0.51	0.39	0	33	0%	ALTERADO
Total mensual					26	396	7%	ALTERADO

Tabla 10. Porcentaje de cumplimiento anual.

Parámetro	Caudal medio natural (m³/s)		Caudal medio actual (m³/s)	Número de años que cumplen	Total de años	Porcentaje de cumplimiento	Clase
	P10	P90					
Anual	12.00	14.61	6.793	0	33	0.00%	ALTERADO

En la **Figura 28** se muestra la comparación de las cuatro principales actividades económicas de acuerdo al % de la población económicamente activa, en esta figura se observa que la principal actividad económica en ambos municipios es la agricultura, ganadería, aprovechamiento forestal, pesca y caza; la diferencia radica en que en Atlixco la principal actividad es la agricultura y el aprovechamiento forestal y en Izúcar de Matamoros la principal actividad es la ganadería (INAFED, 2010a, 2010b).

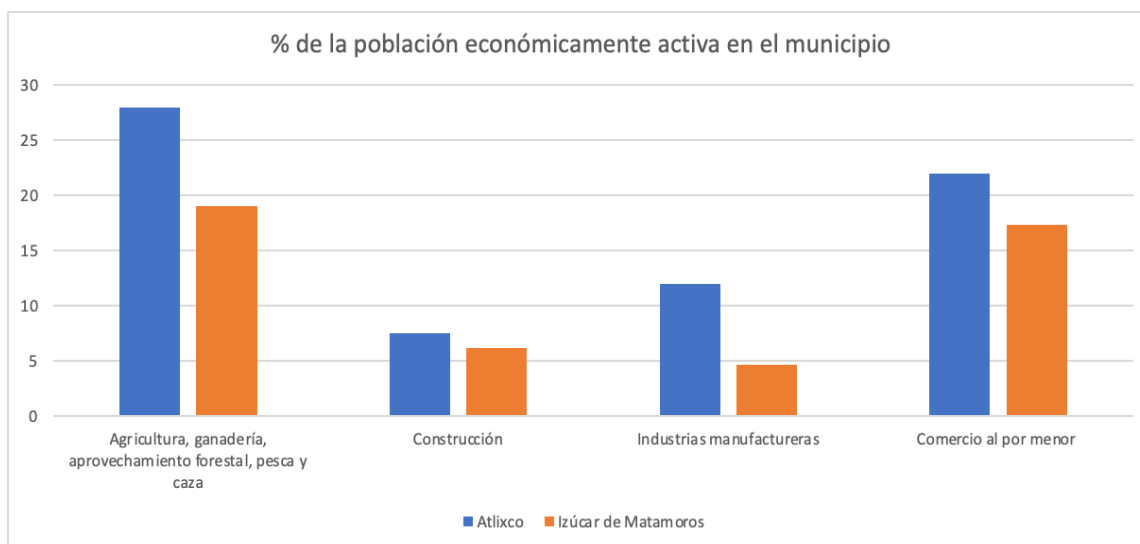


Figura 28. Comparación de las actividades económicas en los municipios (elaboración propia, 2023; con información de (INAFED, 2010a, 2010b)).

La evaluación de los códigos para cada categoría ponderados con respecto a la RAM se presenta en la **Tabla 11**. La discrepancia de valores en el periodo 2014-2018 para los dos municipios de Atlixco (9) e Izúcar (10) no representa una diferencia con respecto al interés de los municipios sobre la RAM, pero por sí mismos los valores ponderados con respecto al valor máximo posible (28) están por debajo del 40% (32% Atlixco y 36% Izúcar) por lo que en el periodo previo a la incorporación de la Estrategia Nacional hay un impulso reducido para luchar contra la problemática sistémica. Para el caso del periodo 2018-2021 en Izúcar de Matamoros es notorio la disminución del interés para combatir la resistencia ya que se obtuvo un valor ponderado de 4 (14%), es decir 22% menos que en la administración previa; para el caso de Atlixco se observó un 50% (14) del interés respecto al valor máximo, esto representa un aumento del 18%, por lo que, aunque no es de forma directa, el interés implícito en combatir la RAM en el estado de Atlixco queda documentado notoriamente comparado con el estado de Izúcar de Matamoros.

En el análisis del discurso de los informes de gobierno se buscó mediante las categorías establecidas en la **Tabla 3**, que los códigos que estuvieran incluidos, fueran parte de la agenda gubernamental y que tuvieran relación con la problemática asociada con la RAM como parte de indicadores en los objetivos de la Estrategia Nacional y el Plan de Acción Global contra la RAM (SEGOB, 2018; WHO, 2015).

8.2.1.1. Sistema hídrico

El agua es el principal medio para transportar, esparcir y desarrollar la resistencia, ya que es ocupada en todas las actividades antrópicas y naturales por lo que su vigilancia, en cuanto a presencia de microorganismos y genes de resistencia, es uno de los principales objetivos en la Estrategia Nacional y planes globales para combatir la RAM (SEGOB, 2018). La política hídrica en México tiene un enfoque que consiste en generar abastecimiento y provisión para la población, pero también la de salvaguardar la salud de la población debido a la relación ecosistémica que tiene esta sustancia (Martínez-Austria & Vargas-Hidalgo, 2017), por lo que en la Estrategia

Nacional se aterriza, como uno de los objetivos centrales, la vigilancia de la RAM en diferentes ambientes, especialmente en el sistema hídrico, para generar datos útiles para contrarrestar la problemática asociada a la RAM (SEGOB, 2018). La vigilancia no solo debe servir para monitorear la presencia de RAM sino como indicador del estado actual del problema y como respuesta a los actores clave y tomadores de decisiones para resolverlos.

Tabla 11. Resultados de la evaluación de la codificación temática para el valor ponderado de cada municipio en los dos periodos de análisis.

Categoría	Código	Atlixco		Izúcar de Matamoros	
		(2014-2018)	(2018-2021)	(2014-2018)	(2018-2021)
Sistema hídrico	Agua	1	1	1	1
	Planta de tratamiento de agua	0	2	2	0
	Saneamiento	0	2	0	0
	Drenaje	2	2	2	2
Salud	Medicamento/medicina	1	1	1	0
	Antibiótico	0	0	0	0
	Antimicrobiano	0	0	0	0
	Hospital	1	0	0	0
	Salud	1	1	1	1
	Higiene	0	0	0	0
	Microorganismo	0	0	0	0
	Infección	0	0	0	0
	Bacteria	0	2	0	0
	Residuo	1	1	1	0
Agricultura y ganadería	Veterinario	1	0	0	0
	Ganadería	0	0	1	0
	Plaguicida	0	0	0	0
	Granja	0	0	0	0
Educación ambiental	Conciencia ambiental	1	1	1	0
	Inversión sostenible/sustentable	0	1	0	0
Valor total		9	14	10	4

Un punto de gran importancia es el correcto funcionamiento de las PTARs, ya que en ellas se genera el medio propicio e ideal para transferir, de manera horizontal, genes de resistencia entre diferentes tipos de microorganismos, además de que si no existen los suficientes procesos de tratamiento o si no está la planta en correcto funcionamiento, hay una gran cantidad de antimicrobianos, principalmente antibióticos, que son promotores de la RAM por lo que el incremento de microorganismos resistentes puede ser exponencial. El saneamiento es de gran relevancia debido a que el agua debe cumplir ciertos estándares para su utilización en la población, ya que, si no es así, esto puede representar un severo problema de salud pública y

económica, debido a la relación que se tiene con la cantidad de enfermedades infecciosas (Gastañaga, 2018).

Para la categoría *sistema hídrico* el código agua es el resultado con mayor incidencia en ambos municipios (**Figura 29**). En el periodo 2014-2018, la palabra drenaje aparece pertinentemente en igual número en los dos municipios del estado de Puebla, pero en el periodo 2018-2021, en Atlixco, la incidencia fue del doble que en el periodo previo. Es importante mencionar que la palabra saneamiento no apareció en ninguna ocasión en los dos municipios, pero en el periodo 2014-2018 si aparece de manera pertinente en dos ocasiones solo para el municipio de Atlixco.

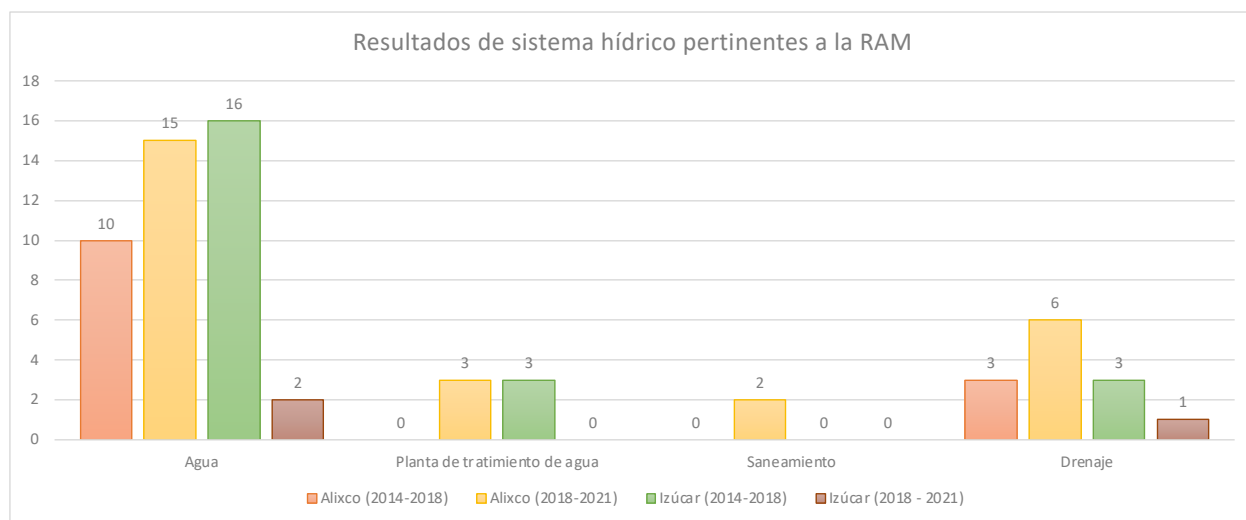


Figura 29. Resultados de la búsqueda de los códigos en la categoría agua para los municipios Atlixco e Izúcar.

8.2.1.2. Salud

Esta categoría es probablemente una de las más importantes debido a que es un tema prioritario en la agenda pública. Las administraciones son responsables en invertir en infraestructura, personal, capacitaciones e insumos médicos, ya que esto tiene una relación con un incremento en la mejora de la salud y contención de enfermedades infecciosas, esto impacta en la RAM, ya que si se cuenta con el interés de los gobiernos en soportar un buen sistema de salud hay un decremento importante, a nivel económico y en cuestión de casos de resistencia, de la problemática asociada a la RAM (Collignon et al., 2018). Los hospitales y centros de salud son la clave para el desarrollo de la RAM, no solo porque ahí se administran medicamentos para tratar infecciones microbianas, sino porque se generan una gran cantidad de residuos que pueden llevar microorganismos resistentes o del material genético de estos microorganismos.

Los programas sociales que fomenten la higiene personal y el correcto uso de antibióticos y productos que contienen antimicrobianos de venta libre en la población son indispensables de acuerdo con la Estrategia Nacional por lo que encontrar dentro de los informes estos programas impulsados por los gobiernos municipales es de gran importancia para conocer el impulso y la intención de las administraciones para el tema. De manera directa estos programas concientizan

a la población y disminuyen el riesgo a problemas de salud pública; esto también propicia, de manera colateral, la disminución del riesgo ecotoxicológico (SEGOB, 2018).

En la categoría *salud*, la palabra salud apareció con mayor incidencia en el texto y la que mayor pertinencia mostró (**Figura 30**). Para el caso de Atlixco se observan más códigos pertinentes que en Izúcar, para ambos periodos de gobierno, excepto en medicinas/medicamentos. Residuos es el segundo código con más apariciones pertinentes, lo que muestra, en términos generales, el interés, aunque de manera indirecta, en la RAM. Es importante destacar que ninguno de los códigos pertinentes para la categoría de *salud* tuvo algún resultado, excepto en la administración de Atlixco 2018-2021, que se observaron dos resultados para el código bacteria; esto demuestra el desconocimiento y la falta de interés directo hacia la RAM en este periodo de gestión en ambos municipios.

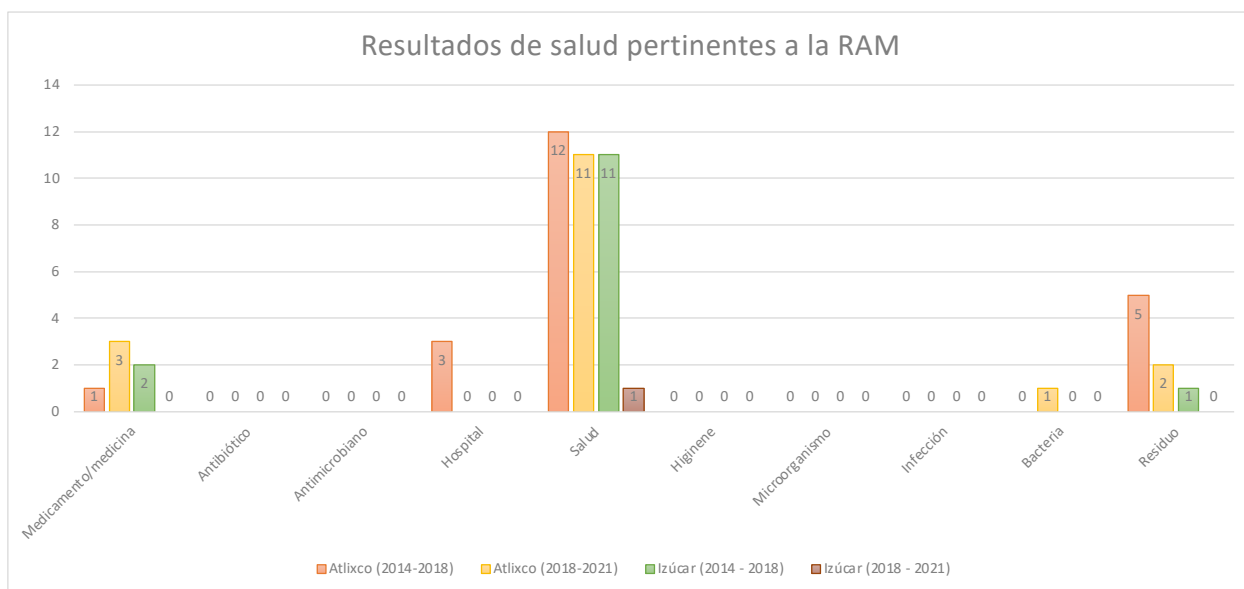


Figura 30. Resultados de la búsqueda de los códigos en la categoría salud para los municipios Atlixco e Izúcar.

8.2.1.3. Agricultura y ganadería

El tema del monitoreo y vigilancia en el sector agroganadero es prioritario debido al desconocimiento en las repercusiones que esta industria genera directamente en el ambiente y en la salud humana debido al uso indiscriminado y mal manejo de antibióticos, así como las condiciones de salubridad con las que se manejan las granjas (Hendriksen et al., 2019). Las granjas agroganaderas utilizan una gran cantidad de antibióticos; estos y sus productos de biodegradación son depositados en los diferentes compartimentos ambientales generando que microorganismos que solo se encuentran en ambientes naturales como suelo y aguas superficiales y subterráneas generen resistencia ya sea por mutación o por microorganismos resistentes que terminan siendo el destino final proveniente de estas granjas (Swift et al., 2019). Las enfermedades infecciosas de los animales de granja son un tema crítico para los productores ganaderos, cuando existe esta situación de salud, ellos recurren a veterinarios que deben administrar los antimicrobianos, principalmente antibióticos, por lo que se debe tener un control y conocimiento

por parte de los profesionales de la salud animal, de esta manera se debe conocer si el gobierno realiza programas de concientización y vigilancia de estas sustancias en granjas y veterinarios.

El uso de plaguicidas en la agricultura, actualmente ha generado gran atención a la comunidad científica debido a la relación que puede tener la presencia de los plaguicidas con microorganismos y al desarrollo de la RAM en estos microorganismos, así como generar tolerancia y resistencia a los plaguicidas (Curutiu et al., 2017). Los microorganismos ayudan a degradar plaguicidas, pero al haber esta interacción se puede generar persistencia de las sustancias químicas, propiciando otros problemas de gran riesgo en la salud humana y en el ambiente (Ramakrishnan et al., 2019). Por este motivo es necesario conocer si hay programas que monitoreen la aplicación de plaguicidas y su presencia en el ambiente, principalmente el agua.

Para la categoría de *agricultura y ganadería*, se observó que, en Izúcar de Matamoros, se tuvo un gran interés en el sector ganadero en el periodo 2018-2021 debido a que, en la búsqueda en el texto, el código ganadería fue el único que apareció como pertinente (**Figura 31**). Esta categoría es de gran importancia debido a la gran cantidad de antimicrobianos que se utiliza en este sector y al uso desmesurado de los mismos, al no observarse un interés en la importancia de esta situación, complica e incrementa la problemática asociada a la RAM. En este contexto es necesario presentar, en ambos municipios, programas enfocados específicamente en la capacitación a los trabajadores agroganaderos sobre el uso de antimicrobianos y plaguicidas. Los monitoreos y la vigilancia sobre el uso y destino de los antimicrobianos debe ser un tema prioritario en este sector económico si se desea combatir la RAM (O'Neill, 2016).

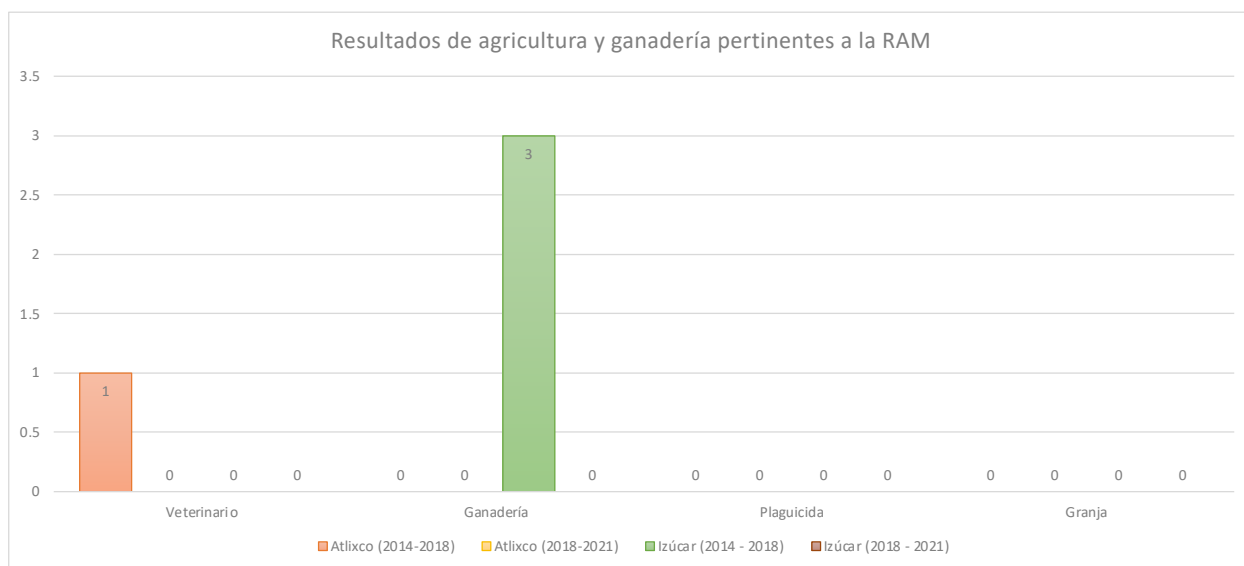


Figura 31. Resultados de la búsqueda de los códigos en la categoría agricultura y ganadería para los municipios Atlixco e Izúcar.

8.2.1.4. Educación ambiental

La aparición en el ambiente de microorganismos multirresistentes a los antimicrobianos es debida en gran medida a los temas antes mencionados y esto genera no solo problemas a la salud, sino que las repercusiones económicas son notables (Hendriksen et al., 2019). Esto debe

generar un fuerte interés en concientizar a la población mediante educación ambiental, no solo en las escuelas, sino que el gobierno debe establecer programas relacionados con este tema en instituciones públicas y privadas para resolver el problema de manera sostenible.

En la categoría *educación ambiental*, el código de conciencia ambiental, para el periodo 2014-2018, en ambos municipios se encontraron tres resultados pertinentes y para Atlixco 2018-2021 se observaron cinco resultados, por lo que en el discurso hay una cierta visión de concientizar a la población, de manera indirecta, del impacto y los riesgos de la RAM, solo en el municipio de Atlixco, porque en el municipio de Izúcar un descenso drástico en este periodo para este código en incluso toda la categoría (**Figura 32**). A pesar de que en el discurso de ambos municipios en las administraciones 2014-2018 mencionan que es básica la sustentabilidad en sus administraciones, no se encontraron resultados pertinentes para este código, por lo que es recomendable incluir no solo en el discurso sino aplicar la inversión en infraestructura y formación social sostenible; a diferencia de las administraciones anteriores, en el periodo 2014-2018 en Atlixco se encontraron cuatro resultados pertinentes para el código inversión sostenible/sustentable.

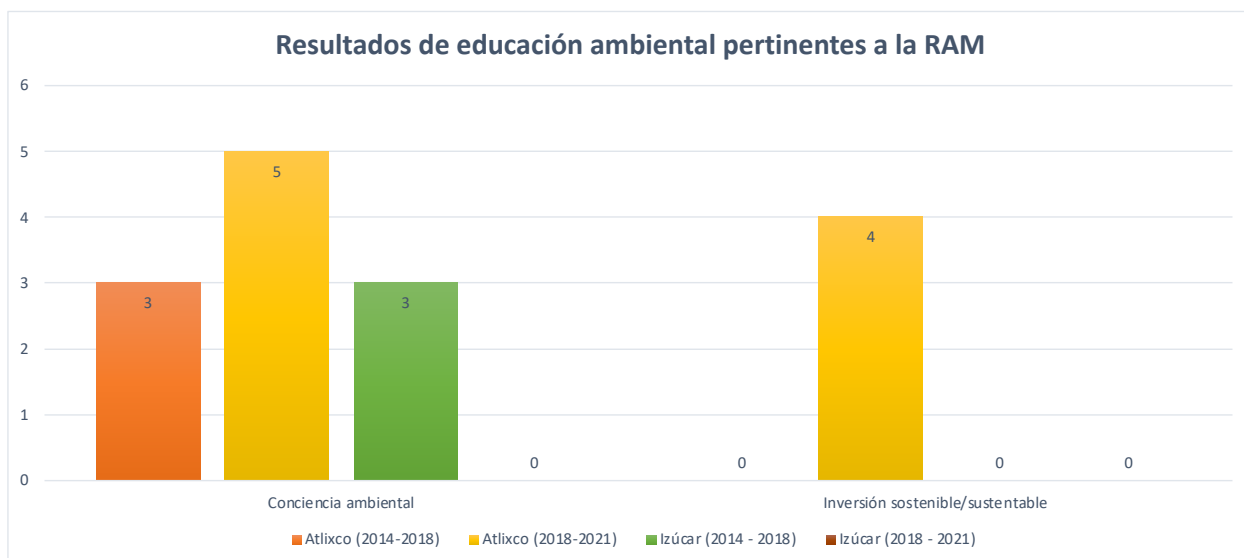


Figura 32. Resultados de la búsqueda de los códigos en la categoría educación ambiental para los municipios Atlixco e Izúcar.

8.3. Caracterización de agua

Se realizaron 3 muestreos en diferentes periodos de tiempo, muestreo 1 (M1) enero 2022, muestreo 2 (M2) mayo 2022 y muestreo 3 (M3) agosto 2022, para observar y comparar en distintas estaciones del año como es la calidad del agua. Es importante mencionar que el sitio de muestreo 5 (S5) solo se obtuvieron muestras de agua en el M2 y M3 debido a que en el M1 fue imposible tomar la muestra debido a las condiciones del lugar y accesibilidad. En el **ANEXO 4** se muestran los resultados de todos los parámetros medidos, tanto para los medidos directamente en sitio como para la calidad de agua analizada en laboratorio. A continuación, se muestran los resultados

individualmente por parámetro medido y el sitio de muestreo en las diferentes estaciones del año.

8.3.1. Parámetros en la toma de muestra

Durante los muestreos realizados en el río Nexapa se obtuvieron los valores *in situ* de conductividad, temperatura, oxígeno disuelto, pH del agua y sólidos disueltos totales (SDT).

La conductividad eléctrica es un parámetro común en el monitoreo del agua, es directamente medido en los sitios de muestreo y con ello ayuda a tener una idea de la cantidad de iones y sales que tiene el agua, si puede haber presencia de contaminantes e incluso la dureza (López Báez, 2014; Yaroshenko et al., 2020). En la **Figura 33** se muestran los resultados de la conductividad, si bien en la Norma Oficial Mexicana vigente desde 2021, NOM-001-SEMARNAT-2021, Que establece los límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores propiedad de la nación, no se estipula un nivel máximo, pero en la norma anterior (NOM-069-ECOL-1994) se establecía como 2500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ que va acorde con lo que establece la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés) (USEPA, 2009); si bien ninguna de las muestras superó este límite recomendado (LR) es destacable que los valores de S6, que son los de la PTAR, están más de cuatro veces por encima del primer sitio de muestreo.

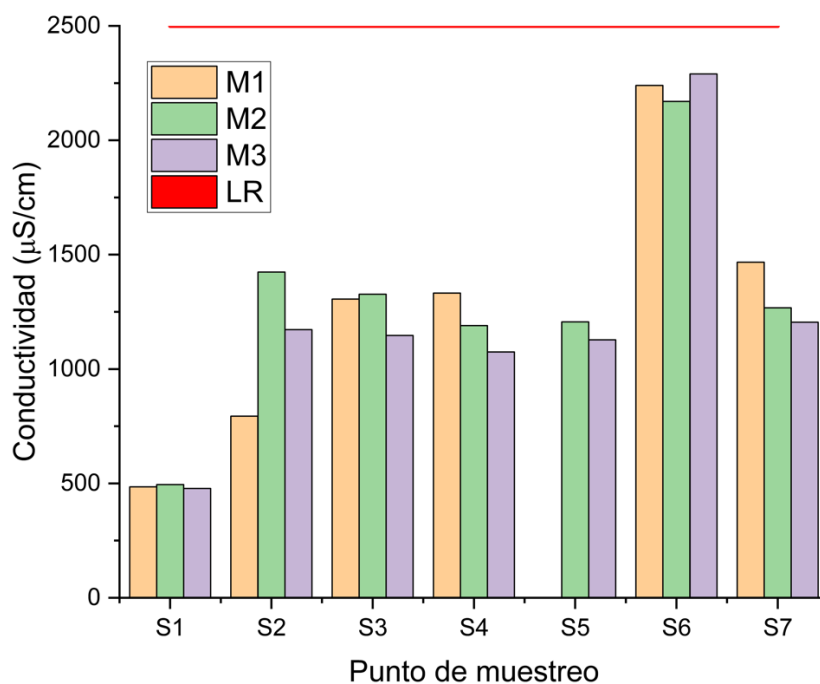


Figura 33. Resultados de conductividad (elaboración propia, 2023)

Si bien, los SDT no tienen un valor máximo y al igual que la conductividad, valores elevados no tienen un efecto significativo en la salud humana, pero de acuerdo a la OMS se recomienda que el agua no sobrepase los 1000 mg/L (WHO, 1996). Existe una relación de la conductividad y SDT en cuanto a la presencia de sales en agua, ya que altas concentraciones de

estas se evita la evaporación y la entrada de energía solar favoreciendo el crecimiento de microorganismos y la transferencia de material genético resistente (Rusydi, 2018). En los muestreos se observa que en el S6 en todos los muestreos supera el LR (**Figura 34**) por lo que es evidente que esta agua puede favorecer en gran medida el desarrollo de resistencia, aunque exceptuando el S1, todos los demás puntos de muestreo están cercanos al LR en este trabajo, por lo que es importante tomar en cuenta estos valores con respecto a la presencia de los genes de resistencia que se presenta más adelante.

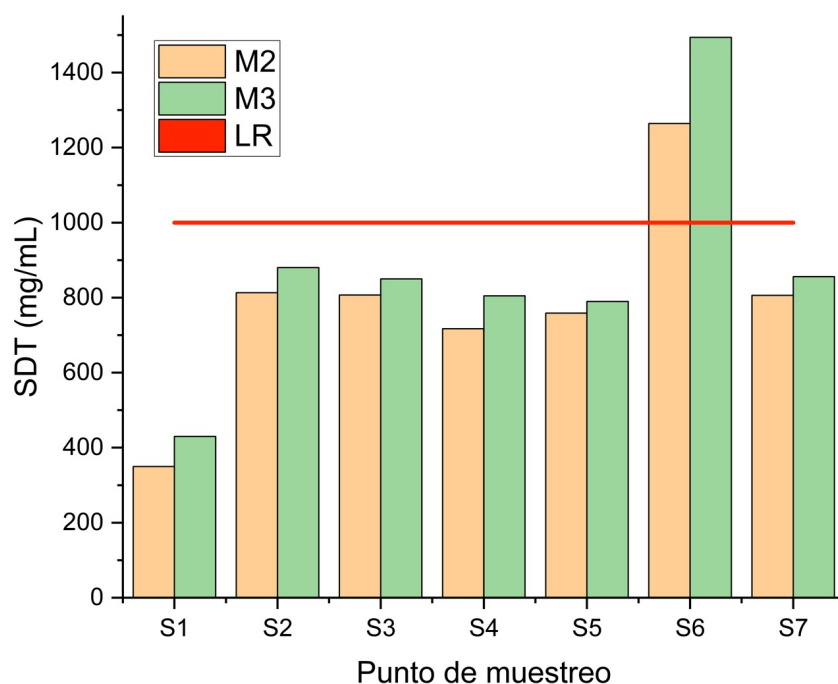


Figura 34. Resultados del análisis de sólidos disueltos totales (elaboración propia, 2023).

El pH y la temperatura son parámetros en agua que favorecen en gran medida el crecimiento microbiano y la transferencia de genes de resistencia favoreciendo su actividad metabólica (Patil et al., 2015). En México, la NOM-001-SEMARNAT-2021 establece que para el pH, límite inferior (LI) permitido es 6 y el límite superior (LS) es 9; para la temperatura el límite máximo (LM) es de 35°C. Ninguna de las muestras medidas superó los límites oficiales establecidos, pero en los sitios 5 y 6 en el muestreo 3 se observó que el pH estuvo cerca de sobrepasar ambos límites, respectivamente (**Figura 35a**) y para los S5, S6 y S7 la temperatura fue más elevada (**Figura 35b**), pero sin sobrepasar el LM, debido a que la altura es menor en estos sitios.

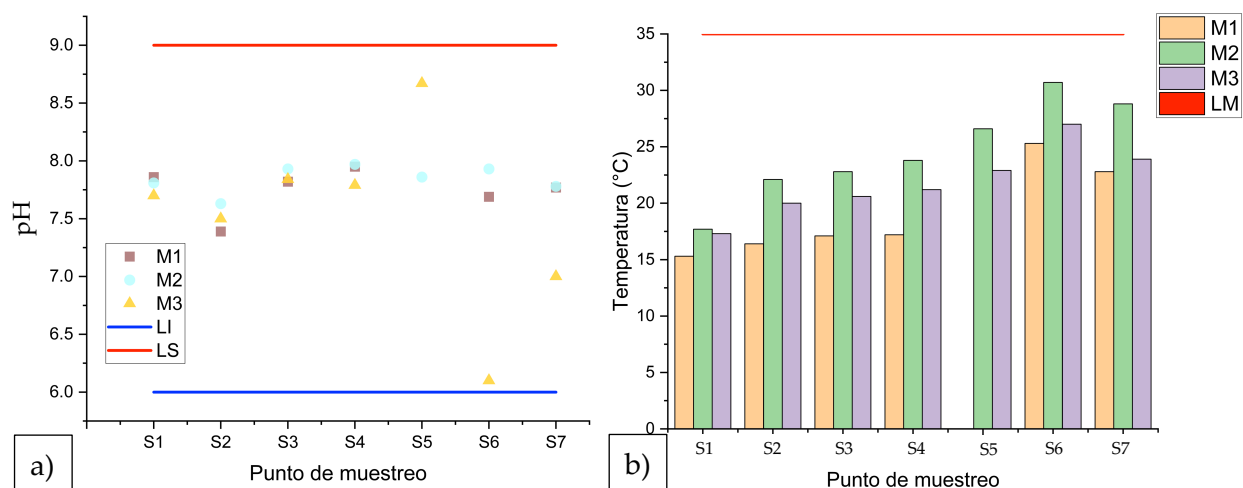


Figura 35. Resultados de a) pH y b) temperatura (elaboración propia, 2023).

El oxígeno disuelto no es un parámetro que se monitoree de acuerdo con la NOM-001-SEMARNAT-2021 pero puede tener relación directa con algunos de los demás parámetros incluidos en la norma, por ejemplo, a mayor temperatura habrá menos oxígeno disuelto que si la temperatura del agua es más fría; también es una medida que relaciona la cantidad de contaminantes en el agua y la posibilidad de que los microorganismos utilicen el oxígeno para realizar sus bioprocesos (Omer, 2019). En la **Figura 36** se observa que, en los S2, S6 y S7 son los sitios con menor cantidad de oxígeno disuelto medido directamente en el punto de recolección, esto indica que puede haber una mayor carga de contaminantes, que estos se degradan lentamente y que no hay una rápida purificación del agua (Wei et al., 2019).

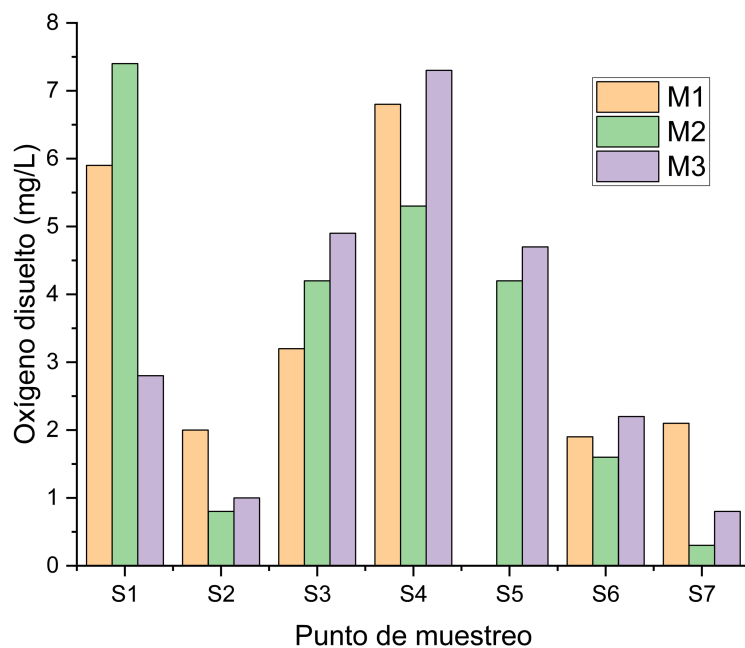


Figura 36. Resultados de oxígeno disuelto (elaboración propia, 2023).

8.3.2 Evaluación de la calidad de agua.

El análisis de la calidad del agua es de gran relevancia para tener una perspectiva amplia y dinámica de los impactos ecosistémicos, económicos, sociales y en la salud humana pues todo lo anterior está interrelacionado sistémicamente (Bhateria & Jain, 2016; Yan et al., 2022); variaciones y alteraciones pueden generar presión en la RAM, ya que muchas de las sustancias que son monitoreadas en el agua como indicadores en la calidad del agua contribuyen en que microorganismos que son resistentes a uno o más antimicrobianos puedan transferir, mediante transferencia horizontal, la información a otros microorganismos que anteriormente eran susceptibles y así poder diseminarse por todos los compartimentos ambientales (Magnano San Lio et al., 2023). Otro factor relevante es que muchas de las sustancias (que en elevadas concentraciones son contaminantes) favorecen el crecimiento microbiano y estos microorganismos pueden perdurar más tiempo en el agua y por consiguiente tener las condiciones propicias en interactuar con antimicrobianos en el ambiente y generar resistencia de manera “natural” (Ashwini et al., 2022).

DQO y DBO son dos de los parámetros que se realizan rutinariamente en agua y son un indicador de la cantidad de contaminantes presentes en el agua de acuerdo con la cantidad de oxígeno disuelto consumido por dichos contaminantes (DQO) y consumido por los microorganismos (DBO) presentes en el agua (Bhateria & Jain, 2016; Deswati et al., 2022). La norma NOM-001-SEMARNAT-2021 establece como límite máximo permitido (LMP) 210 mg/L medido y que si el valor supera este límite el agua está fuertemente contaminada, en la **Figura 37a** se observa que el punto de muestreo 6 en los tres muestreos realizados los valores están tres veces más alto que el LMP y en el primer muestreo (periodo de invierno) todas las muestras estuvieron por encima del LMP, esto debido a que hay menor cantidad de lluvias y la corriente en el río es menor que en los periodos posteriores. En la norma vigente no se establece LMP para la medición de DBO, pero en la normatividad previa de los que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales (NOM-001-SEMARNAT-1996) establecía un valor como agua fuertemente contaminada como 150 mg/L; para este caso, el sitio de muestreo 6 nuevamente mostró que en los 3 muestreos estuvieron por encima del LMP de la norma anterior, también se observa que las muestras de los sitios 2 y 7 muestran valores altos (**Figura 37b**) y por los cuales se debe poner atención y continuar con el monitoreo de la calidad del agua para disminuir el riesgo ecosistémico a la salud humana.

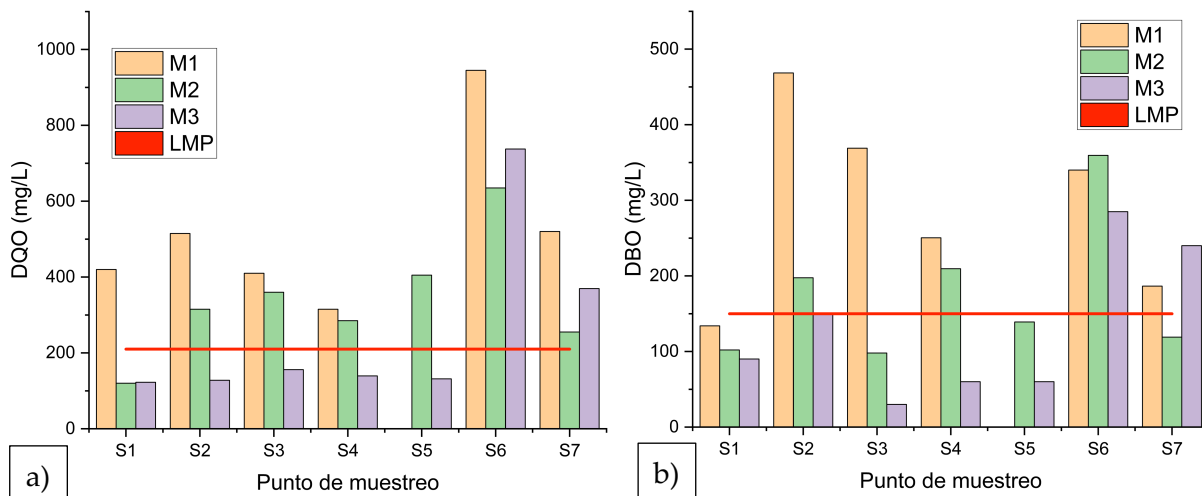


Figura 37. Resultados de **a)** DQO y **b)** DBO (elaboración propia, 2023).

La presencia de iones catiónicos en el agua como el calcio y magnesio es un tema importante a considerar, si bien no hay indicios que afecte a la salud humana, altas concentraciones de estas sustancias representan alta mineralización del agua, así como un factor importante para el crecimiento microbiano (Bhateria & Jain, 2016). El magnesio y el calcio no tienen un valor máximo permitido en normas oficiales, es recomendable, en el agua para beber que no estén por encima de los 150 mg/L. Para el magnesio ninguna muestra superó el límite máximo recomendado (LMR) (Figura 38a). En la medición del calcio no fue posible, por cuestiones de insumos de laboratorio, realizar el análisis de la concentración de los iones presentes en el agua para los muestreos 1 y 2; para el muestreo 3 se observó que el sitio 6 tuvo valores por encima de lo recomendado (200 mg/L) (Figura 38b), por lo que esta agua tiene un impacto directo en generar condiciones propicias para el crecimiento bacteriano.

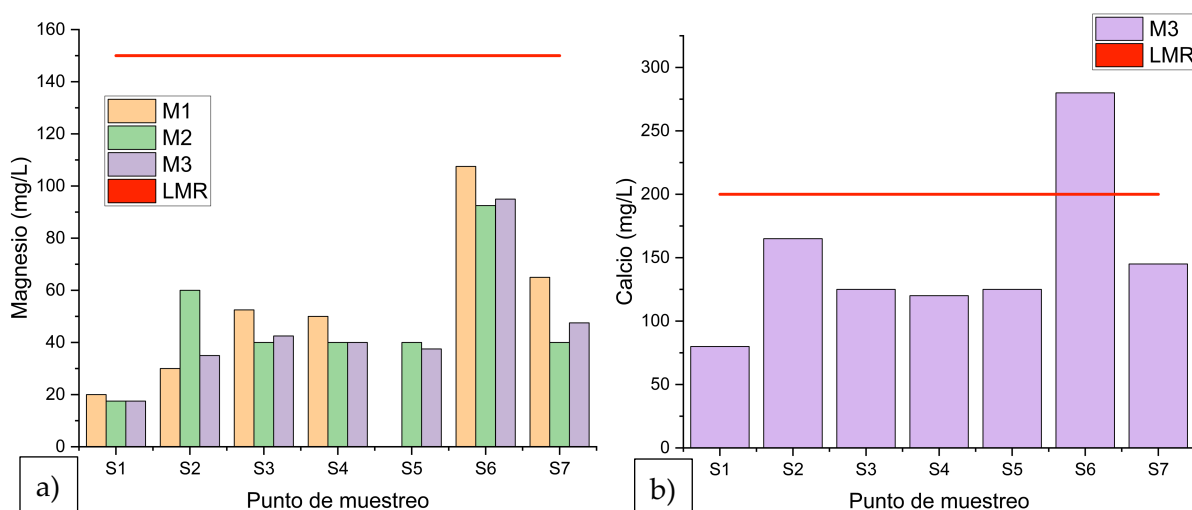


Figura 38. Resultados analíticos para la medición de **a)** magnesio y **b)** calcio (elaboración propia, 2023).

Los iones y sales inorgánicas como los nitratos, fosfatos y sulfatos son otros de los parámetros fisicoquímicos que tienen mayor impacto en contribuir en el crecimiento de microorganismos resistentes y por consiguiente fomentar su transmisión a los demás compartimentos ambientales (Chartimagar et al., 2020; Gros et al., 2023). Estas sustancias son principalmente nutrientes en granjas agroganaderas, pero al ser aplicadas en grandes cantidades su incorporación a los sistemas hídricos es crítico. Los nitratos principalmente es un producto que se encuentra en los fertilizantes, en México el límite máximo permitido (LMP-M) es 10 mg/L, cinco veces menos al recomendado por la OMS (LMP-O), si tomamos en consideración el LMP mexicano todas las muestras del primer y segundo muestreo estarían fuera de este valor (**Figura 39**), siendo el sitio de muestreo 2 el de mayor cantidad tenía, esto debido a que el agua de este punto es cercano a una desembocadura del río Atoyac el cual pasa por varias zonas agrícolas; el sitio de muestreo 6 también tuvo presente valores significativamente más altos que el LM-M. Los sulfatos, a diferencia de los nitratos, pueden ser encontrados naturalmente en cuerpos de agua superficial y subterránea debido a depósitos de sulfato de magnesio o sodio, este compuesto si puede tener impacto ecotoxicológico por lo que es de suma importancia monitorear su presencia y establecer posibles correlaciones con la presencia de genes de resistencia a los antimicrobianos. De acuerdo con el PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-127-SSA1-2017, Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de la calidad del agua, la especificación sanitaria química es de 400 mg/L, pero de acuerdo con esta misma norma vigente (NOM-127-SSA1-1994) el LMR es de 250 mg/L, por lo que aquí se considera este valor; en las muestras analizadas, S6 y S7 son las que tuvieron mayor cantidad de este compuesto químico (**Figura 40**), principalmente por las descargas de la ciudad y las actividades económicas de la misma, además del incorrecto funcionamiento de la PTAR. El fósforo proveniente del uso en la agricultura es uno de los principales problemas, a nivel nacional y mundial, de la calidad del agua, debido a que puede funcionar como nutriente de microorganismos patógenos y otras especies invasivas en los ambientes acuáticos; de acuerdo con la NOM-001-SEMARNAT-2021 la concentración máxima de fósforo en aguas, arroyos, canales y drenajes es de 21 mg/L. En el punto de muestreo S4 se tuvieron concentraciones cinco veces por arriba del LMP (**Figura 41**), esto es debido a que en ese sitio se tienen grandes extensiones de cultivo agrícola y crianza de ganado, por lo que el uso desmedido de plaguicidas y nutrientes termina desembocando en las corrientes, esto puede generar severas afectaciones a la salud y propiciar el crecimiento microbiano y la transferencia de material genético resistente entre microorganismos.

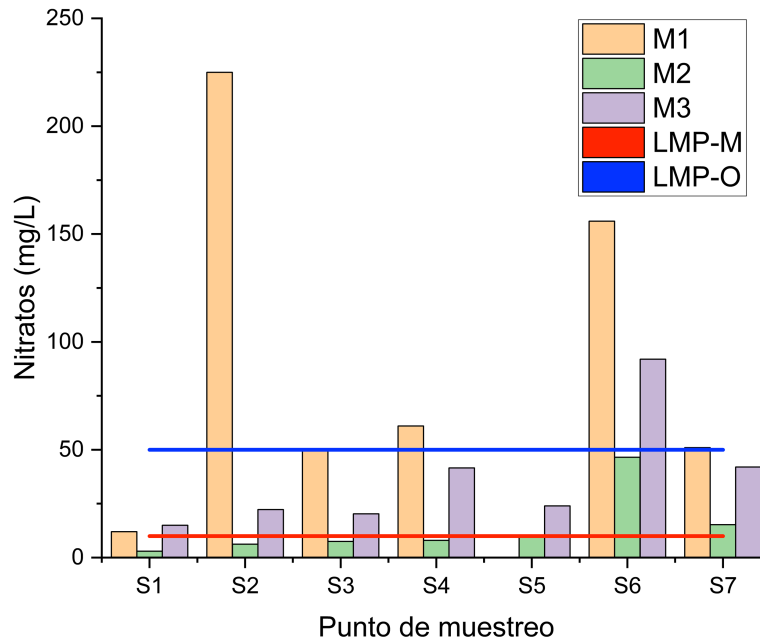


Figura 39. Resultados de nitratos (elaboración propia, 2023).

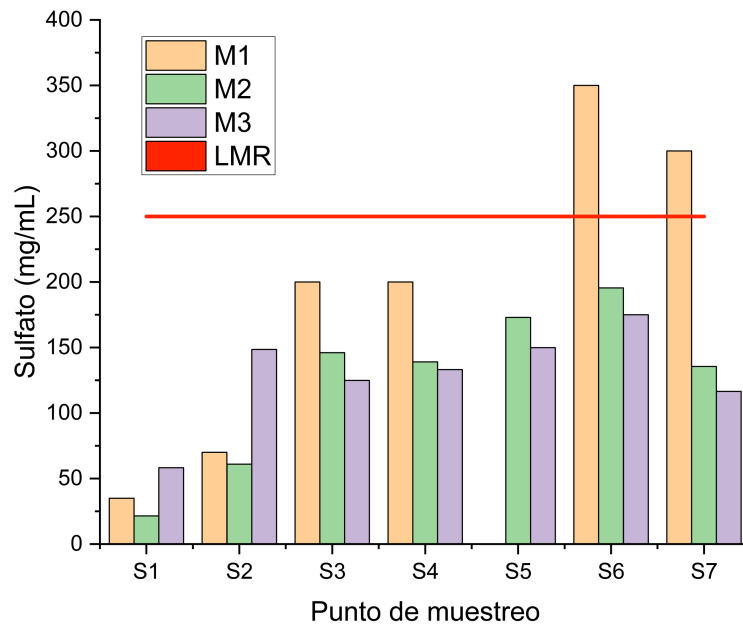


Figura 40. Resultados de sulfato (elaboración propia, 2023).

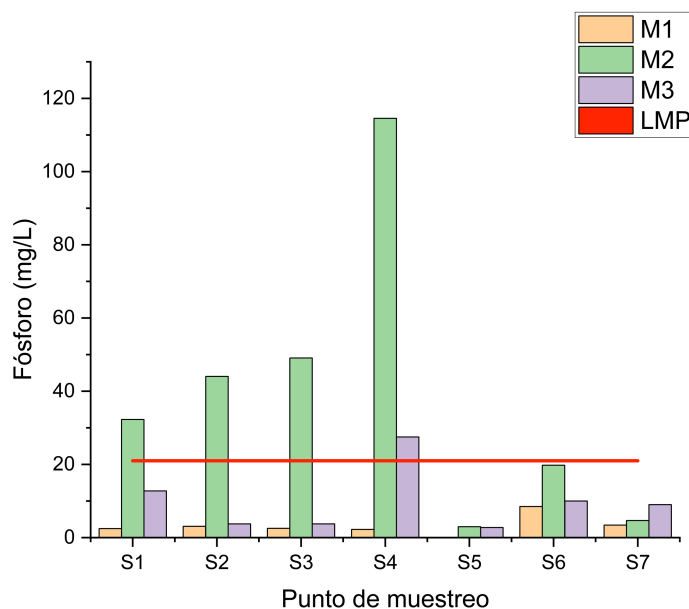


Figura 41. Resultados de la presencia de fósforo en agua del Río Nexapa (elaboración propia, 2023).

El cloro libre es frecuentemente encontrado en aguas naturales, aunque no es un compuesto que se encuentra de manera natural los diversos productos de limpieza contribuyen en gran medida en encontrar concentraciones elevadas, además de que es utilizado para desinfectar el agua de consumo humano. El proyecto de norma PROY-NOM-127-SSA1-2017 estipula como LMP 1.5 mg/L en agua para productos residuales de la desinfección. En ninguna de las muestras recolectadas en el Río Nexapa se encontraron valores superiores al valor máximo permitido (**Figura 42**).

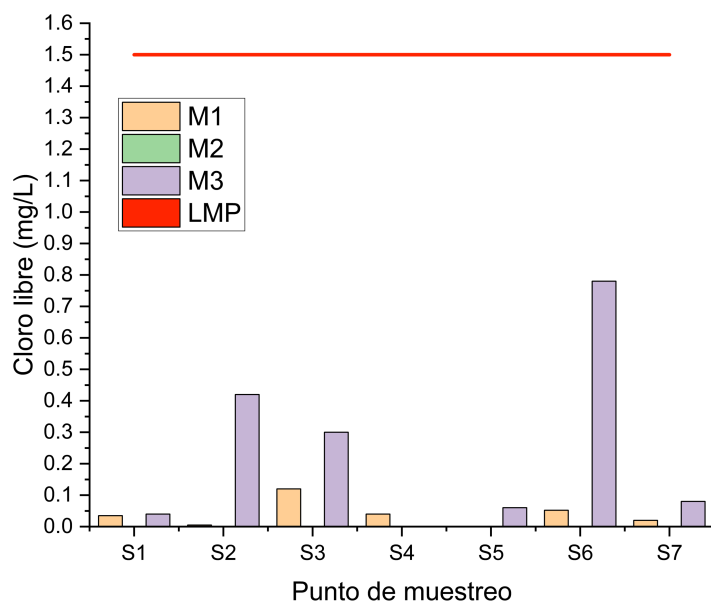


Figura 42. Resultados de concentración de cloro residual libre en agua (elaboración propia, 2023).

Los iones metálicos como el hierro y níquel son de gran importancia en el análisis de la calidad del agua ya que, pueden tener serias repercusiones ecosistémicas y además de tener asociación directa en la resistencia a los antimicrobianos, ya que las fuentes de estos compuestos son en las granjas ganaderas, como aditivos, mostrando una relación con la RAM y su incorporación en elementos genéticos móviles que contienen genes de resistencia a estos metales catiónicos y genes de resistencia a antibióticos (C. Liu, Liu, et al., 2021; Yu et al., 2017). De acuerdo con el proyecto de norma PROY-NOM-127-SSA1-2017 el LMP para metales y metaloides, en el caso del hierro es de 300 µg/L y para el níquel es de 4 mg/L, para el S2 se obtuvieron valores de casi el doble del LMP (**Figura 43a**), esto debido a que las aguas provenientes de la vertiente del río Atoyac están fuertemente contaminadas por la actividad industrial de la ciudad de Puebla. Por el contrario, el níquel no mostró ninguna muestra por arriba del LMP (**Figura 43b**), pero nuevamente el S6 tuvo los valores más elevados debido a la contribución de la ciudad de Izúcar de Matamoros y que la PTAR no funcionaba de manera adecuada.

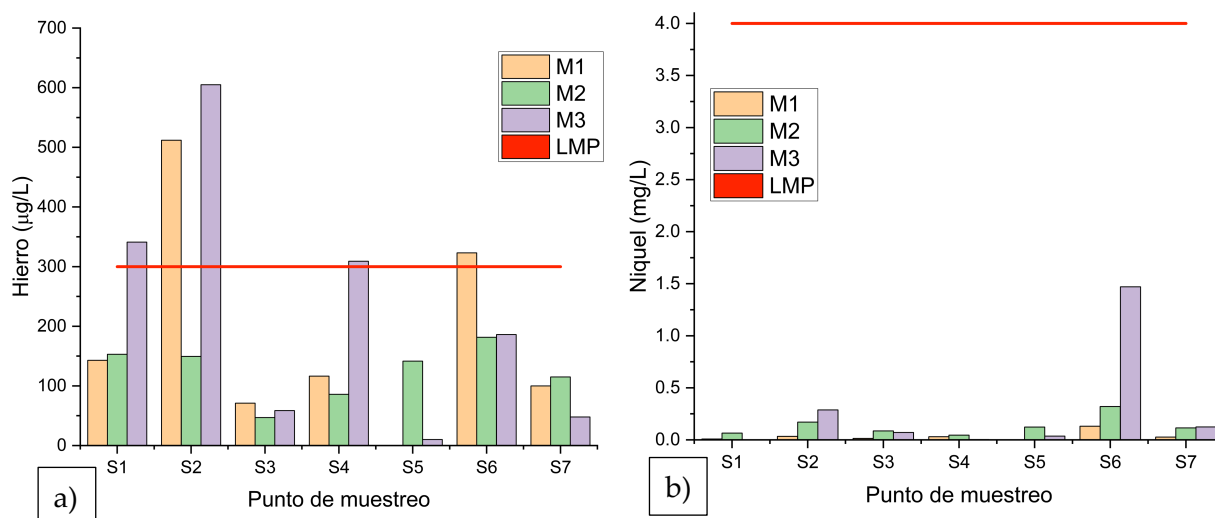


Figura 43. Resultados del análisis de la presencia de a) hierro y b) níquel en aguas del Río Nexapa (elaboración propia, 2023).

8.4. Análisis molecular de los genes de resistencia a sulfonamidas

En este apartado se describen los resultados de la extracción y el análisis de PCR para cada una de las muestras de agua de los muestreos realizados y la determinación cuantitativa de los genes de resistencia a sulfonamidas *sul1*, *sul2*, *sul3* y *ysul4*.

8.4.1. Extracción de ADN total

Todas las muestras de agua recolectadas se procesaron de acuerdo al protocolo de extracción de ADN total y su posterior comprobación de la presencia del material genético mediante electroforesis. En el **ANEXO 5** se presenta el revelado de los geles después de correr las muestras extraídas, en ella se observa que todas las muestras tienen cantidad suficiente de ADN total libre proveniente de los microorganismos presentes en el agua. Con estos resultados se tiene certeza que la cantidad de ADN total es suficiente para realizar la amplificación mediante PCR

de los cuatro genes de resistencia a sulfonamidas en cada una de las muestras provenientes de los tres muestreos.

8.4.2. Análisis por PCR de los genes de resistencia a sulfonamidas

De acuerdo con la cepa de referencia de *E. coli* que contenía los genes de resistencia a sulfonamidas *sul1* y *sul3* se utilizaron como control positivo (C+), para control negativo (C-) se utilizó una cepa de *E. coli* previamente analizada con los cuatro genes de resistencia a sulfonamidas. Los resultados de estos controles se muestran en el **ANEXO 6**.

8.4.2.1. Detección del gen *sul1*

El gen de resistencia a sulfonamidas *sul1* es el más abundante de los cuatro genes de resistencia en cuanto a su presencia en ambientes clínicos, acuáticos y granjas agroganaderas (Haenelt et al., 2023; Lye et al., 2022). Además de estar presente en el principal integrón (*Int1*) de genes de resistencia en su región conservada de los microorganismos entéricos (Razavi et al., 2017). Con lo anterior se esperaba que estuviera presente en los microorganismos de las muestras de agua recolectadas. Para los tres muestreos se observó que todas las muestras tenían este gen de resistencia (**Figura 44, 45 y 46**). En todos los casos el amplicón del gen *sul1* se amplificó correctamente observándose ligeramente por debajo de la banda de 300 pares de bases y por encima de la banda de 200 pares de bases presente en la regla de los marcadores de peso molecular, infiriendo que se amplificó correctamente en el orden de 288 pares de bases, siendo coherente con lo esperado en el diseño de los cebadores mostrado en el **ANEXO 2**. Es importante destacar que debido a que en las aguas del Río Nexapa, hay una cantidad grande de descargas de aguas residuales sin ningún tratamiento, la carga de antibióticos y nutrientes favorece a que microorganismos entéricos y de ambientes naturales sin relación aparente, produzcan, reciban y diseminen estos genes de resistencia y en gran medida este gen, que ha podido transferirse por una gran cantidad de regiones y microorganismos, globalmente y por más de 50 años (Akiba et al., 1960).

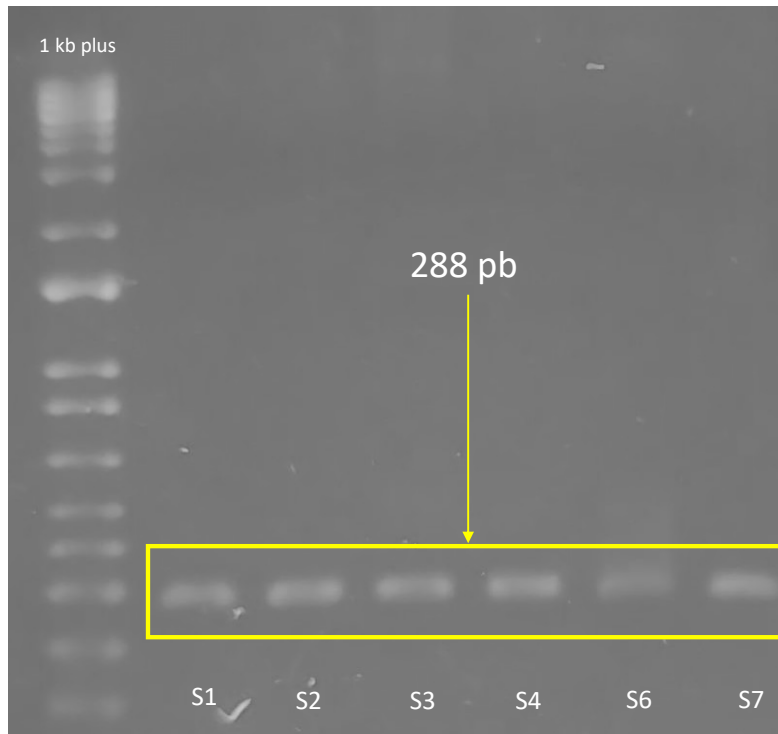


Figura 44. Resultados del gen *sul1* para el primer muestreo (fotografía propia, 2023).

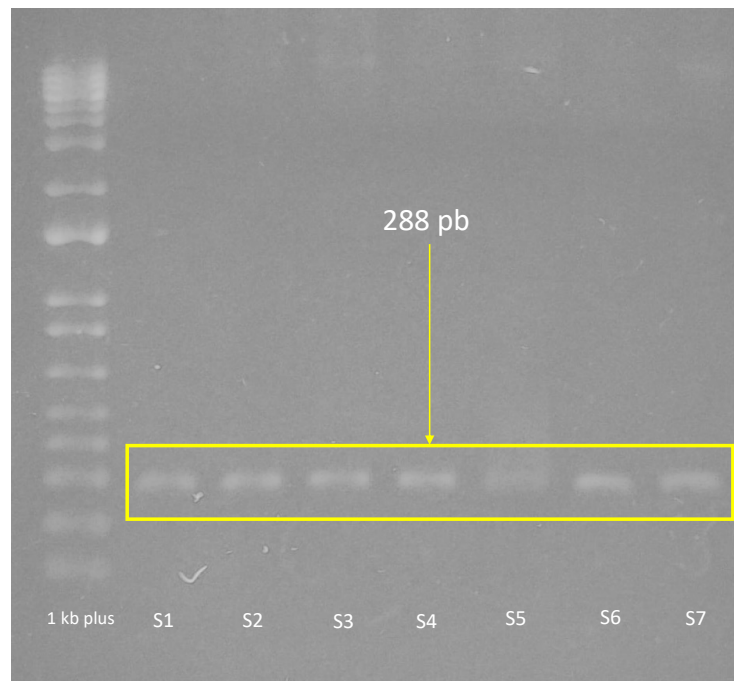


Figura 45. Resultados del segundo muestreo para el gen *sul1* (fotografía propia, 2023).

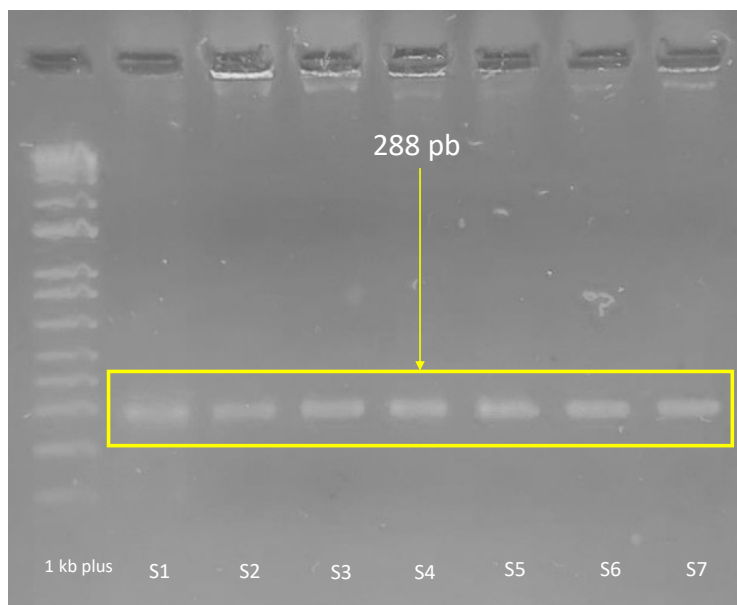


Figura 46. Gen de resistencia a sulfonamidas *sul1* en el tercer muestreo (fotografía propia, 2023).

8.4.2.2. Detección del gen *sul1*

Este gen es encontrado principalmente en ambientes hospitalarios, pero recientemente se ha encontrado en microorganismos entéricos en ambientes naturales (suelo y sistemas hídricos) cerca de cuerpos de agua con fuertes actividades antrópicas (Bala et al., 2023; Haenelt et al., 2023). En la **Figura 47** se observa que en el primer muestreo hubo presencia del gen amplificado de 835 pares de bases solo en el sitio de muestreo 6. En la **Figura 48** se muestran los resultados del segundo muestreo; para este periodo no hubo presencia del gen en los sitios de muestreo 1, 3, 4 y 5, no así en los sitios 2, 6 y 7 que son los lugares con la mayor carga de contaminantes. En el tercer muestreo no hubo presencia del amplicón en la S1, esto porque en este sitio, debido a su cercanía al nacimiento del río en la vertiente del volcán Popocatepetl, el agua ha estado en contacto en menor proporción, comparado con los otros sitios muestreados, con actividades antrópicas, en los sitios restantes se observó correcta amplificación del gen, excepto en el S3 que la banda en el gel de agarosa fue mucho menos intensa, pero es notoria su presencia (**Figura 49**).

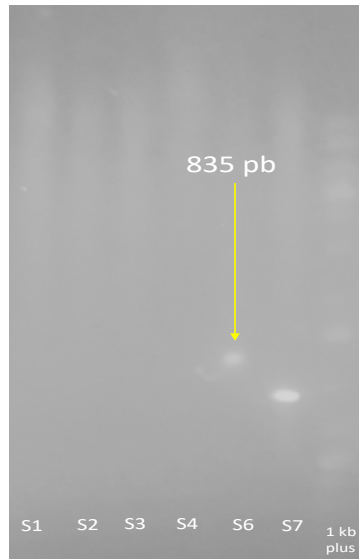


Figura 47. Resultados del gen *sul1* para el primer muestreo (fotografía propia, 2023).

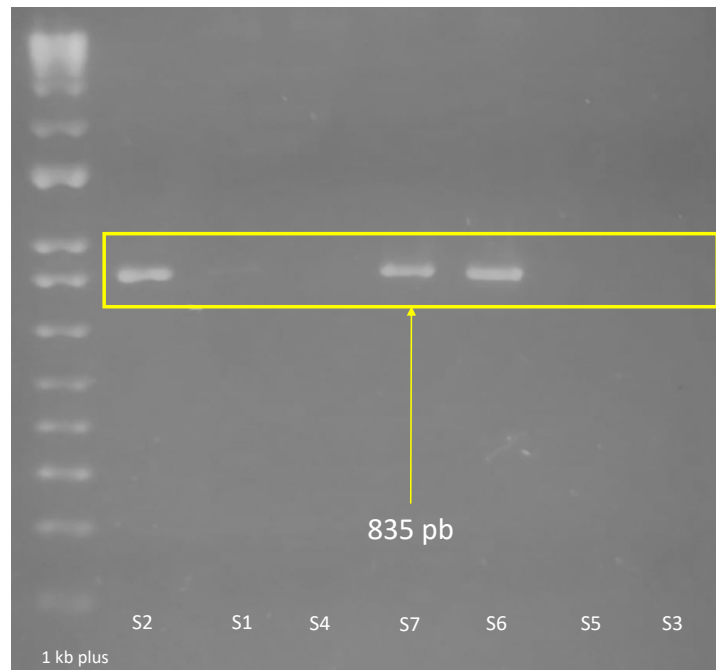


Figura 48. Resultados del gen *sul2* para el segundo muestreo (fotografía propia, 2023).

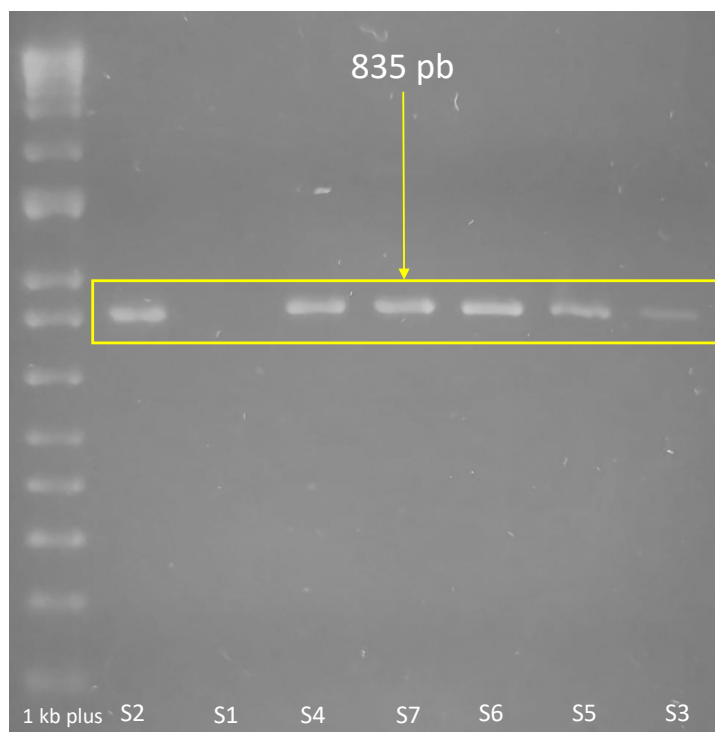


Figura 49. Resultado de la detección del gen *sul2* para el tercer muestreo (fotografía propia, 2023).

8.4.2.3. Detección del gen *sul3*

Este gen es probablemente el de mayor interés en lo relativo a las muestras de granjas agroganaderas, ya que es donde fue descubierto y donde mayor incidencia ha tenido su presencia en microorganismos patógenos relacionados a enfermedades gastrointestinales (Rådström et al., 1991) aunque su presencia no se limita a este tipo de ambientes pues ha sido determinado en muestras de agua cerca de aguas residuales de hospitales y municipales (Sánchez-Osuna et al., 2019). Para este gen que, de acuerdo al diseño mostrado en el **ANEXO 2**, es amplificado en 557 pares de bases se encontró en los sitios de muestreo con mayor concentración aparente de contaminantes (puntos de muestreo S2, S6 y S7) en todos los periodos en los que se recolectaron muestras de agua (**Figura 50, 51 y 52**). En el tercer periodo de muestreo en todos los sitios se determinó la presencia del gen *sul3*, incluso en el sitio de muestreo 1 (**Figura 52**), esto puede ser debido a que cerca de este lugar, aunque no hay una gran cantidad de asentamientos contiguos al sitio donde se recolectó la muestra, ni antes del mismo, si hay presencia de pequeñas granjas con actividad agrícola y ganadera, lo que pudiera favorecer el desarrollo y propagación de este gen; los otros sitios muestreados en este periodo presentan este gen debido a que en estas zonas hay una mayor cantidad de actividades antrópicas. En los otros periodos muestreados, no se encontró la presencia del gen (exceptuando los sitios S2, S6 y S7) (**Figura 50 y 51**), esto puede ser debido al periodo en que fueron recolectadas las muestras de agua y las condiciones ambientales que favorecieron que los microorganismos no desarrollaran resistencia en ese lapso de tiempo.

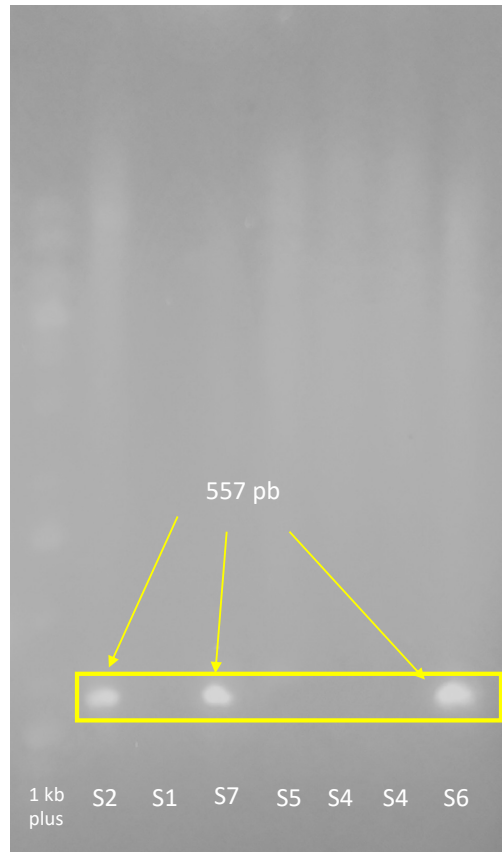


Figura 50. Resultados de detección del gen *sul3* en el primer muestreo (fotografía propia, 2023).

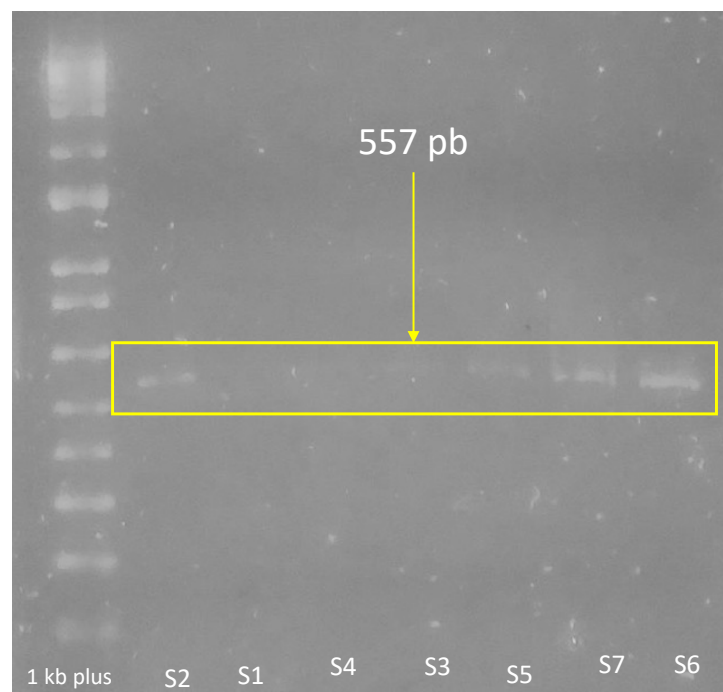


Figura 51. Resultados del segundo muestreo para el gen *sul3* (fotografía propia, 2023).

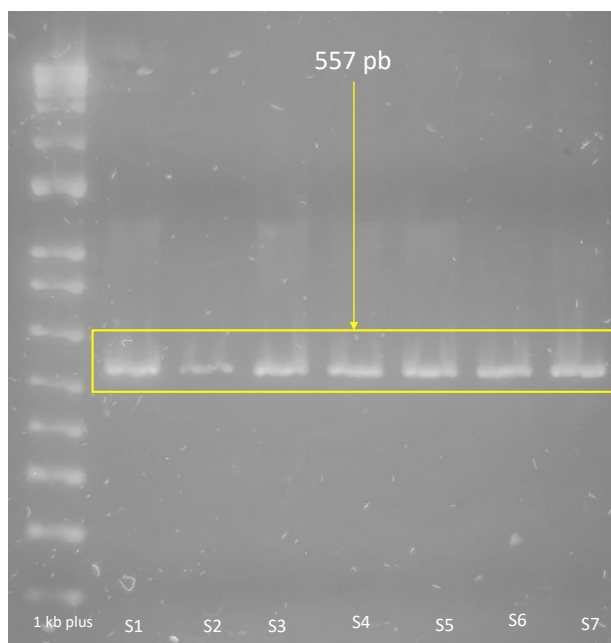


Figura 52. Resultados de detección del gen *sul3* para el tercer muestreo (fotografía propia, 2023).

8.4.2.4. Detección del gen *sul4*

El gen *sul4* ha sido descubierto recientemente y no ha sido determinada su presencia en el continente americano; en la actualidad solo se ha reportado este gen en algunos países de Asia y Europa (Hutinel et al., 2022; Sharif et al., 2020; F. Xu et al., 2020). Los resultados para la detección del gen *sul4* en todos los muestreos procedieron negativos (**Figura 53**), que es lo esperado, ya que no ha sido el suficiente tiempo para generar la dispersión globalmente, así como el tipo de microorganismos en el que surgió esta mutación ya que no fueron microorganismos entéricos (Razavi et al., 2017).

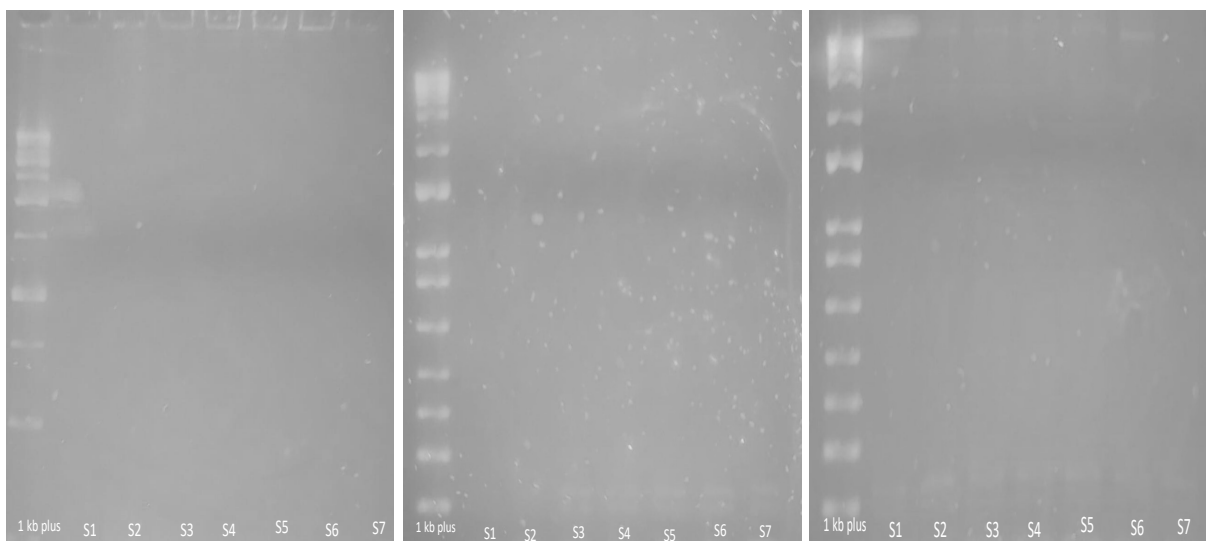


Figura 53. Resultados de la detección del gen *sul4* para los muestreos a) M1, b) M2 y c) M3 (fotografía propia, 2023).

En la **Tabla 12, 13 y 14** se muestran los resultados de todas las muestras recolectadas durante el periodo comprendido en los tres muestreos.

Tabla 12. Incidencia de los genes de resistencia a sulfonamidas para las muestras del primer muestreo.

Sitio de muestreo	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>sul3</i>	<i>sul4</i>
1	+	-	-	-
2	+	-	+	-
3	+	-	-	-
4	+	-	-	-
5*				
6	+	+	+	-
7	+	-	+	-

* Sitio sin muestreo

Tabla 13. Incidencia de los genes de resistencia a sulfonamidas para las muestras del segundo muestreo.

Sitio de muestreo	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>sul3</i>	<i>sul4</i>
1	+	-	-	-
2	+	+	+	-
3	+	-	+	-
4	+	-	-	-
5	+	-	+	-
6	+	+	+	-
7	+	+	+	-

Tabla 14. Incidencia de los genes de resistencia a sulfonamidas para las muestras del tercer muestreo.

Muestra	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>sul3</i>	<i>sul4</i>
1	+	-	+	-
2	+	+	+	-
3	+	+	+	-
4	+	+	+	-
5	+	+	+	-
6	+	+	+	-
7	+	+	+	-

8.5. Evaluación del biosensor.

Como una alternativa analítica a la reacción en cadena de la polimerasa y la técnica de detección cualitativa de los genes amplificados, la electroforesis; en este trabajo se propone una tecnología rápida, eficiente, robusta y de bajo costo basada en la tecnología de genosensores

electroquímicos que pueda ser aplicada en material genético que este libre (extracelular) y en microorganismos.

8.5.1. Análisis de repetibilidad

Para evaluar que las secuencias nucleotídicas correspondientes a los genes de resistencia *sul1* y *sul4*, establecidos en el **ANEXO 3**, fueron correctamente determinadas mediante el protocolo de detección (**sección 7.4.1**), se realizaron diferentes mediciones con las mismas condiciones en distintos días (24 análisis para el gen *sul1* y 20 análisis para el gen *sul4*) y en un intervalo de concentración de ADN de 0.01 nM a 50 nM. Con estos resultados se estableció el límite de detección (LDD), obtenido con tres veces la relación señal ruido (RSR) y el límite de cuantificación (LC), obtenido con diez veces la RSR; el intervalo lineal fue evaluado con la ecuación de una línea recta de acuerdo con los niveles de concentración que cumplieran la linealidad. Todos estos parámetros fueron obtenidos y evaluados graficando la altura del pico de la corriente anódica en μA generada por la oxidación del naftol sobre la superficie del electrodo de trabajo contra la concentración en nM del gen diana utilizado. A continuación, se muestran y describen estos resultados para cada gen

8.5.1.1. *sul1*

En la **Figura 54a** se muestra la gráfica de los resultados analizados de los 24 análisis para las secuencias nucleotídicas específicas para el gen *sul1*, aquí se aprecia que a 30 nM no hay aumento de la respuesta debido a que no es posible diferenciar concentraciones más elevadas. Se determinó un LDD de 250 pM, el cual representa una buena sensibilidad comparada con técnicas tradicionales como la electroforesis o incluso la PCR en tiempo real (Razavi et al., 2017; F. Xu et al., 2020), el límite de cuantificación se determinó en 500 pM, manteniendo el método una linealidad hasta los 30 nM (**Figura 54**).

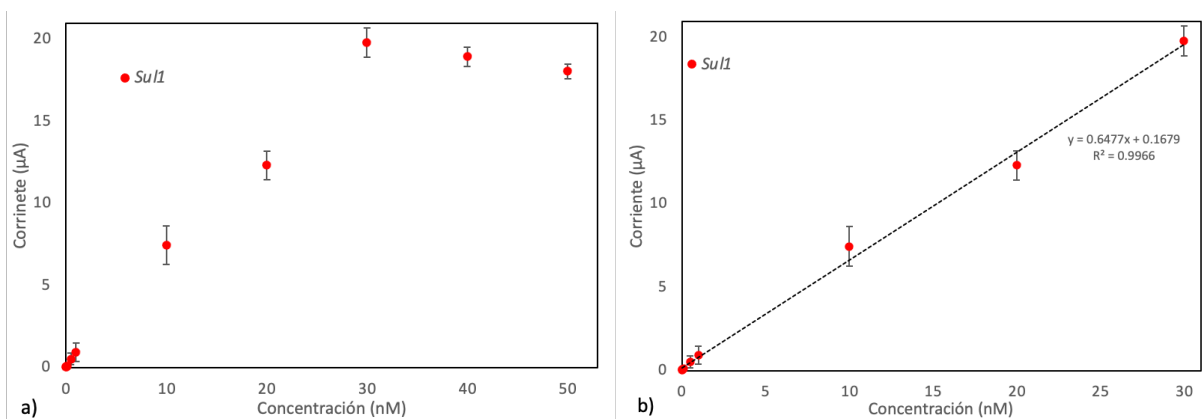


Figura 54. Resultados de a) repetibilidad y b) linealidad del biosensor para el gen *sul1*.

8.5.1.2. *sul4*

Para este gen, el biosensor diseñado mostró tener menos sensibilidad que para el gen *sul1* (**Figura 55a**), esto puede ser debido la composición de guanina (G) y citosina (C), ya que estas bases nitrogenadas presentan mayor estabilidad que la adenina y timina, esta relación puede

verse reflejada en una mayor respuesta en la medición electroquímica (Sarkar et al., 2021); el gen *sul4* presenta una relación GC de 59 % que es menor al 59.5 % que presenta el gen *sul1*. El biosensor diseñado tiene un LDD de 490 pM y un LC de 1 nM para el gen *sul4*. Al igual que para el gen *sul1* este dispositivo es lineal hasta los 30 nM para el gen de resistencia más recientemente descubierto (**Figura 55b**).

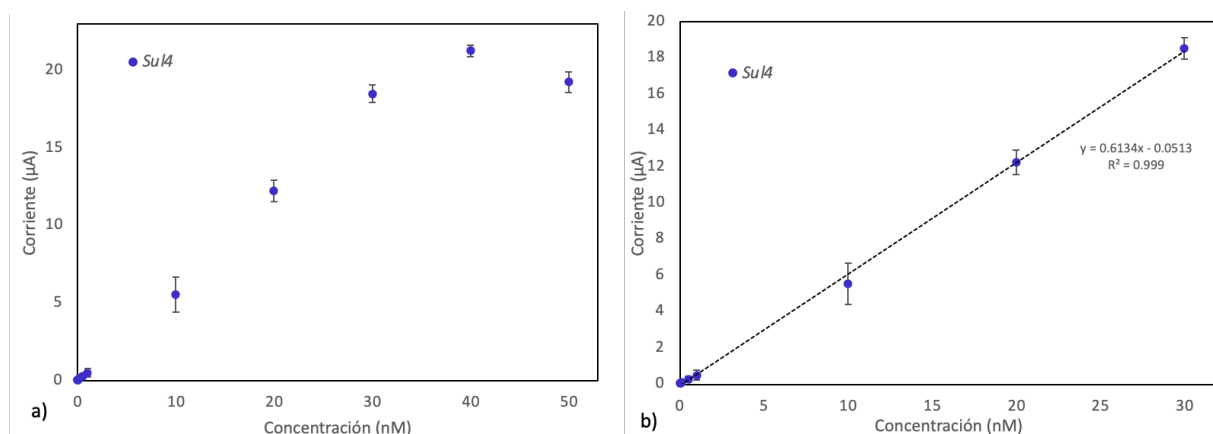


Figura 55. Resultados de a) repetibilidad y b) linealidad del biosensor para el gen *sul4*.

8.5.2. Análisis de selectividad para el gen *sul1*

En esta propuesta tecnológica se analizaron, mediante el protocolo antes mencionado, diferentes secuencias de ADN no específicas para las sondas diseñadas del gen diana *sul1* y con ellas evaluar la selectividad del biosensor. Para comprobar esto, se utilizó una muestra negativa que solo contenía la solución amortiguadora PBS, una solución 10 nM del gen *sul4* y dos genes con función diferente a la de resistencia a los antibióticos, las secuencias de los genes *ERCC1* y *ERCC5*, ambas a 10 nM; se utilizó una solución del gen *sul1* a 1 nM para comparar los resultados y observar si el genosensor es capaz de determinar el gen objetivo. Después de procesar y analizar cada una de las muestras por triplicado, no se obtuvo respuesta para ninguno de los genes no específicos de las sondas diseñadas para el gen *sul1* (**Figura 56**); el gen objetivo fue el único que mostró una respuesta favorable.

8.5.3. Evaluación del biosensor en células modelo de *E. coli*

Para determinar la presencia del gen de resistencia a sulfonamidas *sul1* se adquirió una cepa de referencia de *E. coli* (NCTC 13846) que contenía dicho gen. La cepa liofilizada original fue procesada de acuerdo a lo descrito en el apartado 7.3.3 y 7.3.5 donde se extrajo el ADN total después de crecerla con las condiciones de incubación y se amplificó el gen diana. De los amplicones obtenidos se realizaron alícuotas 1:10, 1:25, 1:50 y 1:100 para conocer si las diluciones tienen una respuesta acorde con el factor de dilución. Después de realizar las diluciones de los genes amplificados, estas muestras se procesaron mediante el protocolo del biosensor electroquímico junto con una curva de calibración (0.05-10 nM) para estimar la concentración. En los resultados de la **Figura 57** se observa que la muestra más diluida (1:100), aunque presenta una notoria diferencia con respecto a la muestra negativa, está por debajo del límite de detección, las muestras 1:100, 1:50 y 1:25 muestran un incremento proporcional de acuerdo con la dilución

realizada, pero la muestra 1:10 presenta una tendencia ligeramente menor. Las concentraciones determinadas, a partir de la curva de calibración, se muestran en la **Tabla 15**; como se mencionó, la muestra diluida 1:10 no es proporcional a las muestras más diluidas pues tiene una concentración calculada inicial (antes de la dilución) de 7.4 nM, esto es debido a que la cantidad de amplicones de 288 pares de bases es muy elevado y pueden envolver las partículas magnéticas evitando así que las sondas señal puedan hibridar con las secuencias diana unidas a las sondas de captura, pero al tener concentraciones más bajas este fenómeno disminuye notoriamente.

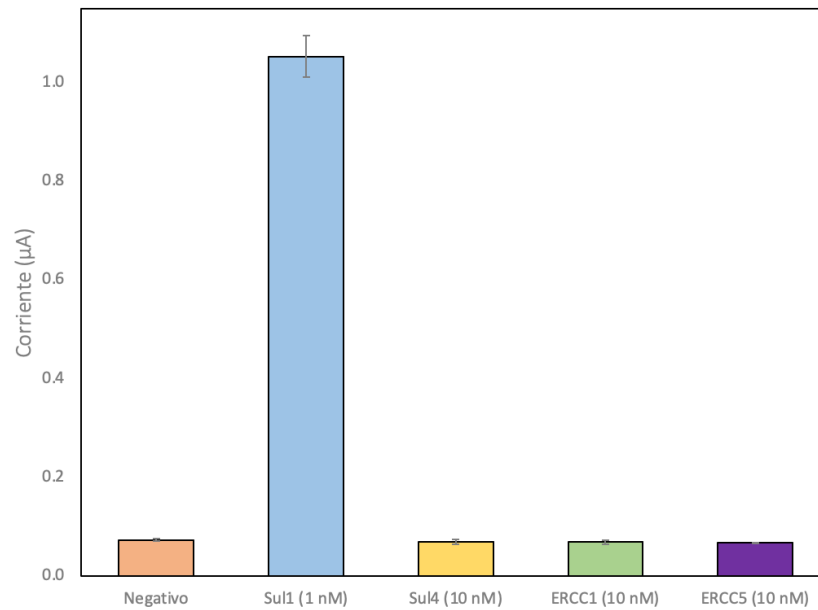


Figura 56. Ensayo de selectividad del biosensor para el gen *sul1*.

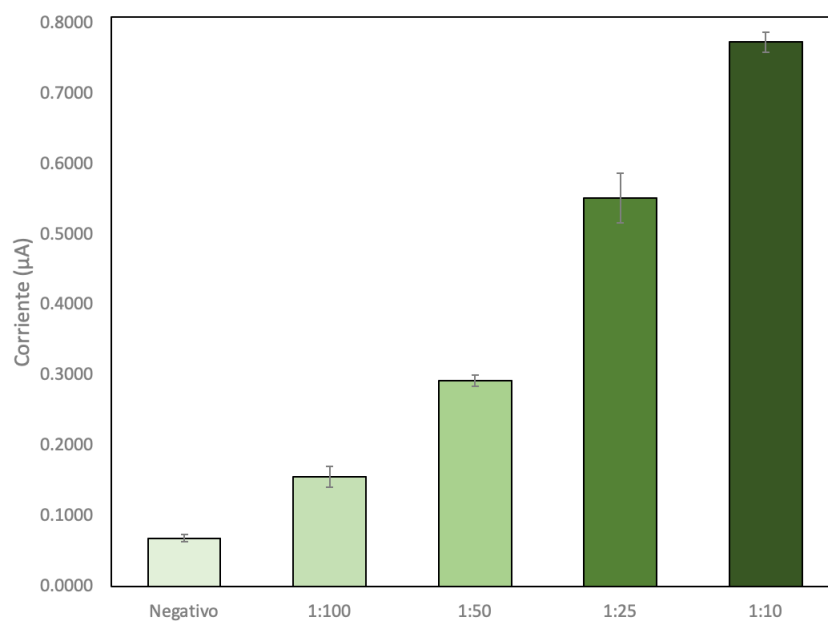


Figura 57. Detección del gen *sul1* en muestras modelo de *E. coli*.

Tabla 15. Resultados de concentración en la detección del gen *sul1* en células de *E. coli*.

Dilución	Concentración de la muestra en el electrodo (nM)	Concentración calculada en la muestra inicial (nM)
1:100	0.12	12.5
1:50	0.26	13.0
1:25	0.52	13.0
1:10	0.74	7.4

8.5.4. Detección del gen *sul1* en muestras de agua del Río Nexapa

Para este ensayo se tomó la muestra amplificada del gen *sul1* del sitio de muestreo 2 en el periodo de muestreo 3. Se realizaron tres diluciones para observar y comparar que los resultados electroquímicos fueran coherentes con la tendencia de la dilución. En la **Figura 58** se observa que la tendencia es proporcional con el factor de dilución. En la **Tabla 16** se muestran las concentraciones calculadas en la detección del amplicón del gen *sul1* para el ADN de los microorganismos aislados en agua del Río Nexapa, aquí se observa que la concentración calculada en la muestra inicial, para las tres diluciones, no difiere con respecto a la dilución realizada. Estos resultados sugieren que la alternativa biotecnológica para la detección de elementos genéticos capaces de codificar información genética de resistencia de manera rápida, sensible, cuantitativa, selectiva y eficiente en microorganismos presentes en muestras de agua, así como con un tratamiento de muestra apropiado, en muestras de ambientes hospitalarios o de matrices complejas como suelo.

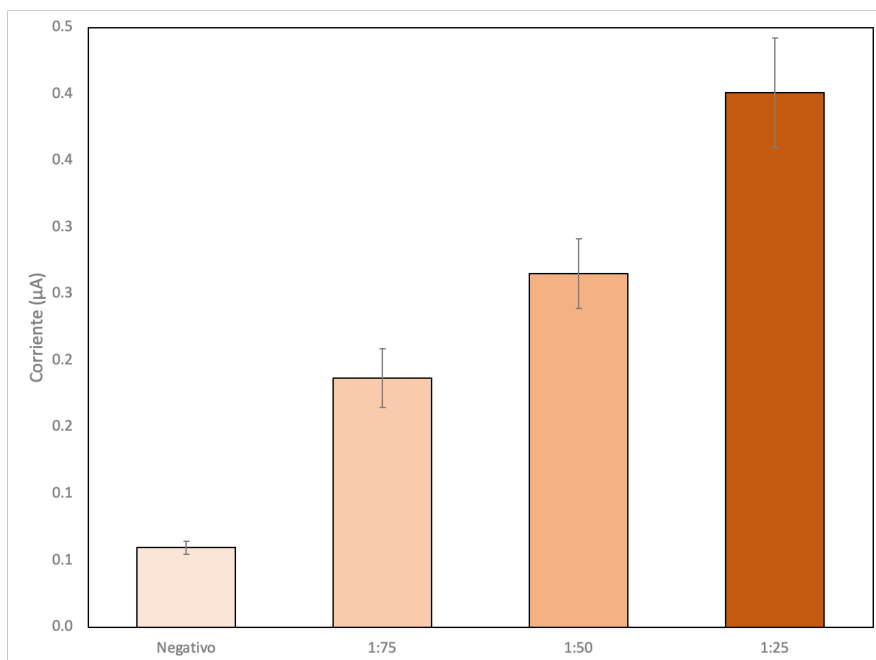


Figura 58. Detección del gen *sul1* en muestras de agua del Río Nexapa.

Tabla 16. Resultados de concentración en la detección del gen *sul1* en muestras de agua del Río Nexapa.

Dilución	Concentración calculada en la muestra diluida (nM)	Concentración calculada en la muestra inicial (nM)
1:75	0.129	9.695
1:50	0.213	10.648
1:25	0.386	9.662

8.6. Análisis estadístico

8.6.1. ANOVA y LSD de Fisher

Los parámetros cuantitativos mostrados en la sección 8.3. **Caracterización del agua** fueron analizados mediante análisis de varianza para conocer si existe diferencia en las condiciones y cantidad de sustancias, contaminantes o no, presentes en el agua del Río Nexapa de acuerdo a los tres periodos de tiempo en los que se recolectaron dichas muestras. Adicional al ANOVA, se realizó el método de Diferencia Menos Significativa de Fisher (Fisher's LSD, por sus siglas en inglés) para encontrar si existe diferencia entre las medias de los grupos individuales para los diferentes muestreos, es decir si algunos de los tres muestreos difiere de uno o los otros dos periodos de toma de muestra, ya que el ANOVA solo establece que hay diferencia significativa en al menos uno de los muestreos, pero no indica cuál de los muestreos es significativamente diferente o si todos los grupos son diferentes (Hayter, 1986; Williams & Abdi, 2010). En la **Tabla 17** se muestran los resultados del análisis realizado para el ANOVA en donde se observa que la DBO, cloro libre, nitratos y fósforo tienen diferencia significativa en cuanto a los periodos de muestreo. En el caso de Nitratos se observa que la diferencia fue significativa en los muestreos, con el análisis de LSD de Fisher se observó que, para nitratos, la media del muestreo 1 es diferente a la media de los muestreos 2 y 3; esta diferencia se observa en todos los parámetros donde se encontró diferencia significativa excepto para fósforo donde el muestreo 2 fue diferente a los muestreos 1 y 3. Esta diferencia en los muestreos es debida a la temporada del año, ya que el muestreo 1 fue realizado en el periodo de invierno, que es cuando menor temperatura se registró en la región, pudiendo perdurar mayor tiempo los iones y contaminantes encontrados. Esta diferencia entre los periodos de muestreo puede observarse en las medias de la temperatura del agua al momento de tomar la muestra, si bien en el ANOVA no se observó diferencia significativa en el LSD de Fisher si se observa diferencia, aquí el muestreo 1 mostro tener una temperatura más baja que en los otros dos muestreos. Otro parámetro que no mostró diferencia en el ANOVA pero si en LSD de Fisher fue la DQO que es un indicador de gran importancia en cuanto a la presencia de contaminantes en el agua; este parámetro mostró la misma tendencia que en la temperatura del agua, este periodo del año pudo haber influido en que en invierno se tuviera una media de DQO más elevado que los otros dos periodos, la temperatura puede ayudar a estabilizar los contaminantes en el agua e impedir que se dispersen con el flujo de la corriente del río, además de que la mayor cantidad de precipitaciones se presentan en las estaciones primavera y verano,

por lo que en estos periodos es notorio que hay menor concentración de DBO en las aguas muestreadas.

Tabla 17. ANOVA y LSD de Fisher para los parámetros de caracterización de agua en los tres periodos de muestreo realizados.

Parámetro	Muestreo 1		Muestreo 2		Muestreo 3		ANOVA	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	F	p
pH	7.7467 A	0.1952	7.8443 A	0.1169	7.514 A	0.798	0.83	0.452
Temperatura	19.02 B	4.04	24.64 A	4.41	21.84 AB	3.11	3.4	0.057
Conductividad	1271 A	605	1297 A	490	1214 A	537	0.04	0.958
SDT	-	-	788	266	872	315	0.29	0.599
Oxígeno disuelto	3.65 A	2.162	3.4 A	2.598	3.386 A	2.362	0.02	0.976
DQO	520.8 A	221.3	339.3 AB	158.6	254.9 B	230.2	2.8	0.089
DBO	291.4 A	124.3	174.9 AB	92.6	130.7 B	98.3	3.99	0.038*
Cloro libre	0.0453 AB	0.0401	0 B	0	0.24 A	0.284	3.89	0.041*
Nitratos	439 A	383	63.4 B	70.3	8.5 B	4.73	7.7	0.004**
Fósforo	3.71 B	2.377	38.2 A	38.1	9.93 B	8.62	4.19	0.033*
Sulfatos	192.5 A	123.5	124.5 A	61.7	129.5 A	36.8	1.44	0.265
Magnesio	54.2 A	30.8	47.14 A	23.47	45 A	23.98	0.22	0.808
Hierro	210.9 A	172.4	124.8 A	45.7	222.5 A	212.8	0.77	0.478
Níquel	0.0407 A	0.0451	0.1321 A	0.0927	0.284 A	0.532	0.96	0.402
Calcio	-	-	-	-	148.6	63.5	-	-

Las letras mayúsculas indican diferencia significativa $p < 0.05$, LSD de Fisher; las celdas en color resaltan la diferencia significativa.

8.6.2. Análisis de correlación de Spearman

De acuerdo con los resultados de la presencia de los genes de resistencia en las electroforesis mostradas en la sección 8.4.2. **Análisis por PCR de los genes de resistencia** se estableció un nivel de 1 a 4, de acuerdo con la intensidad de la banda, para poder correlacionar estos resultados ordinales con las variables continuas de los resultados de la caracterización del agua; estos resultados con los cuales se construye el análisis de Spearman se muestran en el **ANEXO 4**. Dado que no existe una relación lineal ni una dispersión normal en los resultados de la detección de los genes de resistencia a sulfonamidas *sul1*, *sul2* y *sul3* se utiliza este ensayo no paramétrico que consiste en establecer una correlación de intervalo entre dos variables de acuerdo con su dependencia estadística y nivel de asociación (J & S, 2018; Zar, 2014). En la **Tabla 18** se muestra el coeficiente de correlación de Spearman para los genes de resistencia a sulfonamidas que estuvieron presentes en los tres muestreos. Se excluyó del análisis el gen *sul4* debido a que no estuvo presente en ninguno de los muestreos. En los resultados de correlación se observa que para el gen *sul1* existe una correlación positiva con el fósforo, que es uno de los principales ingredientes en los productos agroganaderos utilizados en la región de Izúcar de Matamoros y Atlixco. El gen *sul2* tuvo el mayor número de coeficientes de correlación con

respecto a los compuestos analizados, ya que presentó una correlación positiva con la temperatura, magnesio, níquel y calcio; la temperatura puede influir a expresar el gen hacia la enzima mutante y resistente a la presencia y acción de las sulfonamidas, el magnesio y el calcio son indicadores de la dureza del agua y pueden favorecer el crecimiento microbiano (Pinna et al., 2018); el níquel, como ya se ha mencionado también puede influir en la asociación e incremento de microorganismos resistentes (Yu et al., 2017); por otro lado, para este gen, el oxígeno disuelto tiene una relación negativa, esto debido a que la carga de contaminantes en el agua puede ser elevada y estos pueden ser utilizados como sustrato para el crecimiento microbiano, además que se ha reportado que altos niveles de aeración puede favorecer la transferencia de genes de resistencia a los antimicrobianos (C. Liu, Li, et al., 2021). Para el gen *sul3*, se encontró una relación negativa con el pH, un factor que puede determinar la transferencia de genes entre microorganismos y el propio crecimiento de los mismos (Hitchner et al., 2019).

Tabla 18. Coeficiente de correlación de Spearman para los genes de resistencia *sul1*, *sul2* y *sul3* con respecto a los parámetros fisicoquímicos de la caracterización del agua.

Parámetro	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>sul3</i>
pH	0.207	0.207	-0.519*
Temperatura	0.426	0.558*	0.246
Conductividad	0.3	0.392	0.029
Oxígeno disuelto	-0.149	-0.55*	-0.357
DQO	-0.056	0.079	0.112
DBO	-0.021	0.078	-0.107
Cloro libre	-0.285	0.14	0.377
Nitratos	-0.059	-0.278	-0.271
Sulfatos	-0.005	0.068	0.067
Fósforo	0.494*	0.304	0.046
Magnesio	0.217	0.446*	0.189
Hierro	-0.37	0.196	0.21
Níquel	0.223	0.67*	0.101
Calcio	0.101	0.767*	-0.412

*celdas en color amarillo indican una correlación significativa ($p < 0.05$).

8.7. Diagnóstico de la problemática

La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno global y con un impacto crítico en los ecosistemas. Su estudio demanda gran complejidad debido a su dinamismo y por el cual todos los elementos y variables que intervienen en su desarrollo y disseminación no pueden ser separados. El enfoque DPSIR sirve para estudiar, entender y proponer respuestas para intentar mitigar problemas de esta naturaleza, conectando los diferentes estratos sociales, económicos y ambientales que, de manera individual y en conjunto, contribuyen a la proliferación de microorganismos resistentes y sus elementos genéticos (Shi et al., 2021; F. Zhang et al., 2016). El análisis con el marco de referencia DPSIR sirve como herramienta eficiente en la toma de decisiones para combatir las necesidades y alteraciones provocadas por la RAM y como elemento

para determinar los factores en la vigilancia continua, entendiendo las causas, consecuencias y dimensionando la magnitud del problema (Lhermie et al., 2019).

En la **Figura 59** se establecen los factores determinados en esta investigación que facilitan el diagnóstico de la problemática asociada a la RAM en el Río Nexapa. A partir de revisión bibliográfica y de los elementos resultantes del análisis ambiental y socioeconómico de la zona de estudio se establecieron las fuerzas motrices, presiones, estado, impacto y las respuestas específicas.

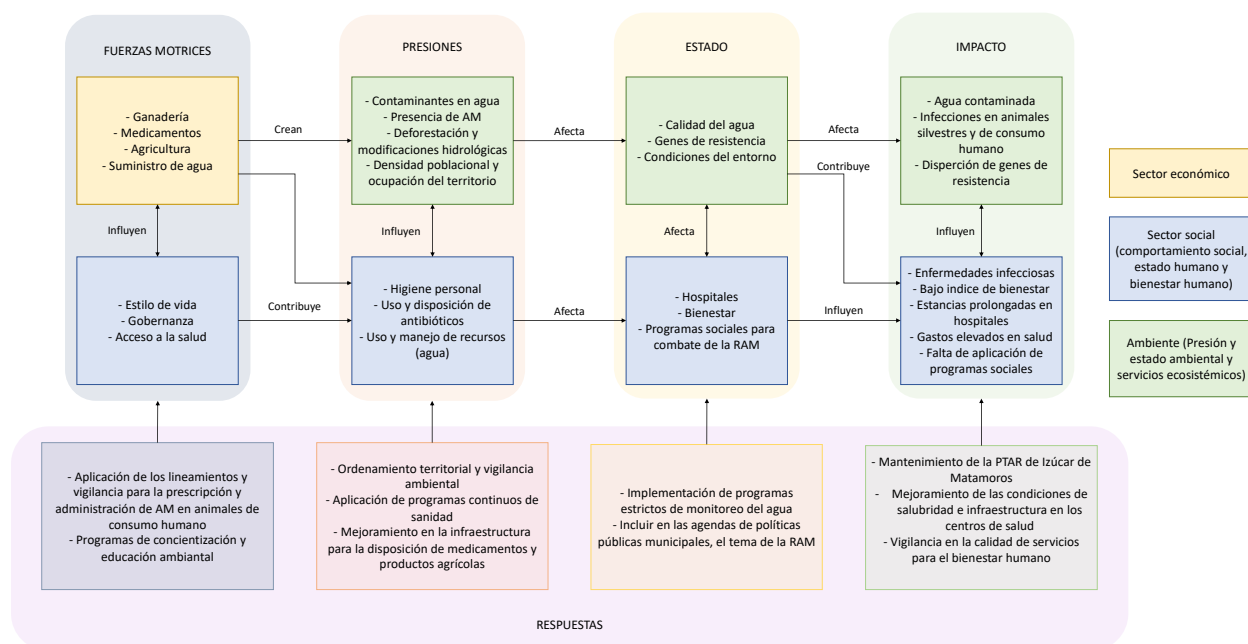


Figura 59. Factores, indicadores y actividades que inciden en el modelo DPSIR para la evaluación de la problemática ambiental asociada a la presencia de genes de resistencia en el acuífero del Río Nexapa Atlixco-Izúcar de Matamoros (elaboración propia, 2023).

8.7.1. Fuerzas motrices.

Las actividades sociales y los elementos económicos para el desarrollo de la población que cubran sus necesidades son la base para identificar las fuerzas motrices (Agyemang et al., 2007; F. Zhang et al., 2016). El río Nexapa es la base del desarrollo económico y social en la región Izúcar de Matamoros-Atlixco, de aquí convergen la agricultura y la ganadería como las principales actividades económicas y de donde se produce la mayor cantidad de contaminantes hacia el ecosistema. El acceso a la salud con la infraestructura necesaria es un elemento indispensable en el desarrollo y bienestar humano, ello involucra que el acceso a los medicamentos administrados de forma apropiada por profesionales de la salud no aumente la problemática relacionada con la dispersión de la RAM e infecciones que cada vez son más complicadas de combatir. El estilo de vida de la población en el acuífero Atlixco-Izúcar de Matamoros determina la dinámica y rumbo de las relaciones sociales y con su entorno, pues si no se aplican actividades básicas en cuanto al manejo apropiado de los recursos naturales, control de infecciones de animales destinados al consumo humano, al manejo sostenible del agua y disposición de basura no se podrá hacer frente

a los principales factores que alteran el ecosistema. Tener la infraestructura para el suministro y tratamiento del agua implica que la población y el ecosistema serán menos vulnerables en generar y propagar microorganismos resistentes. Las zonas urbanas de Izúcar de Matamoros y Atlixco son entidades con actividades agrícolas y ganaderas donde gran cantidad de contaminantes, provenientes de estas actividades económicas y sociales, terminan en el sistema hídrico. Antes de ser descargadas las aguas municipales deben ser correctamente tratadas, pero se ha encontrado que existe una insuficiencia estructural y operativa en la PTAR de Izúcar de Matamoros, además de descargas directas de las poblaciones cercanas al río Nexapa (Ortega-Vázquez, 2021).

La forma de gobernar y la aplicación de políticas públicas genera las condiciones necesarias para mantener en equilibrio y función de las fuerzas motrices antes mencionadas, por lo que un desinterés en conocer todos los factores que interrelacionan y aplicar ese conocimiento en función de las necesidades básicas de la población y los ecosistemas aumentará significativamente la problemática en la región. De acuerdo con el índice anual sobre la situación de pobreza, publicado por la Secretaría del Bienestar (anteriormente publicada por CONEVAL) en 2022, en Izúcar de Matamoros el 66% de la población se encuentra en situación de pobreza, de la cual el 13% se encuentra en pobreza extrema y el 5 % no cuenta con servicio de drenaje, por lo que sus residuos terminan en el agua del río; el rezago educativo, que como ya se ha mencionado, está relacionado con el combate a la RAM, es del 21%; es importante destacar que en el municipio hay cinco unidades médicas adscritas al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), que por sí mismas son insuficientes para atender a casi 85 000 personas que habitan en la entidad, se ha estimado que solo el 27% de la población tiene acceso a la salud (Secretaría de Bienestar, 2022b). Para el caso de Atlixco, hay 60% de población en situación de pobreza con 11% en situación de pobreza extrema, en la población 7.2% no cuenta con drenaje y se tiene un rezago educativo del 22%; en el municipio de Atlixco solo existen cuatro unidades médicas del IMSS para una población de casi 150 000 personas, pero a diferencia de Izúcar de Matamoros el porcentaje que cuenta con acceso a la salud aumenta al 38% (Secretaría de Bienestar, 2022a). Hay un notorio rezago a nivel social, dejando este importante factor para cubrir las necesidades básicas de salud, se ha demostrado que esta situación es una fuerza motriz que genera y aumenta la problemática de la RAM (Collignon et al., 2015, 2018). Aunado a lo anterior, el rezago educativo coadyuva a que el conocimiento y combate a la resistencia microbiana se vea reducido notoriamente.

8.7.2. Presiones

Derivado de las fuerzas motrices, las presiones son las actividades sociales y económicas que llegan a producir cambios y alteraciones en el sistema asociado a los genes de resistencia a los antimicrobianos (Hansen & Baun, 2015). A nivel ambiental, los diferentes contaminantes en el agua, producto de las diversas actividades económicas y sociales, así como los microorganismos resistentes pueden someter presión en el sistema. La modificación de los ambientes como la deforestación y alteración en los cauces del río también significan una afectación de gran impacto al ecosistema de la cuenca; ocupar el territorio de forma ilegal o irregular, como en el sitio de muestreo 4, contribuye a lo ya mencionado, esto es propiciado en gran medida por la creciente necesidad de espacio donde habitar, ya que el costo de terrenos es elevado así como las rentas de habitaciones a sobre precios y sin servicios, no solo en el sitio de muestreo 4, donde es más evidente, sino en la ciudad de Izúcar de Matamoros y en Atlixco. Es importante mencionar que

en el sitio de muestreo 1, donde inicialmente se consideró el sitio más limpio, en el último muestreo, la zona aledaña a la toma de muestra se volvió un basurero, contribuyendo significativamente a inducir presión en el estado del sitio (**Figura 60**) (F. Zhang et al., 2016).



Figura 60. Basurero encontrado aledaño al sitio de muestreo 1 en el muestreo 3 (fotografía cortesía de José Luis García Zamora, 2023).

La población de la región ejerce una fuerte presión al sistema hídrico y contribuye en gran medida en modificar el estado, no solo por los contaminantes, como ya se ha mencionado, sino por el uso y manejo de los recursos naturales, ya que se observó que se ha deforestado y modificado el territorio para uso de nuevos cultivos; en el sitio de muestreo 4 es donde mayormente ha resaltado esto e incluso el agua ya llega contaminada de las descargas municipales e industriales de poblaciones que anteceden río arriba.

8.7.3. Estado

Las presiones ejercidas en el sistema han provocado alteraciones en el sistema ecológico y social, disminuyendo la capacidad de resiliencia. Esto puede observarse en la presencia de genes de resistencia, ya que en el último muestreo se observó que en casi todas las muestras los tres genes monitoreados fueron detectados desembocando en un impacto ecosistémico que puede conducir a un incremento en las enfermedades en la población y animales de granja, así como los costos desencadenados (Lambraki et al., 2021). Previamente, desde hace más de una década se han realizado diversos estudios de la calidad del agua en el acuífero del río Nexapa (Cano, 2020a, 2020b; Contreras-Lino, 2022; García-Zamora, 2019; Navarro et al., 2013, 2014), encontrando resultados muy similares acerca de los contaminantes, puntualmente la DBO y la DQO que sobrepasan hasta en 10 veces los límites permitidos (García-Zamora, 2019); estos indicadores denotan

el grado de contaminación en la región desde inicios de la década del 2010 cuando Navarro *et al.* realizaron muestreos periódicos en el río Nexapa (Navarro *et al.*, 2013, 2014) además del hecho que, a nivel de infraestructura y funcionamiento la PTAR de Izúcar de Matamoros, ha mostrado deficiencias operativas (por debajo del 70%) desde el año 2009, fecha de inicio de sus operaciones (Cano, 2020a), aunque en el año 2020 hubo una inversión e interés en el funcionamiento de la misma, en la actualidad el Sistema Operador de los Servicios de Agua Potable y Alcantarillado del Municipio de Izúcar de Matamoros (SOSAPAMIM) debe pagar multas trimestrales de 300 mil pesos por descargar aguas sin ningún tipo de tratamiento al caudal del río Nexapa (Cano, 2020b).

Se encontró que el entorno de la cuenca ha sido alterado y sometido a una gran presión, esto se observa en la alteración hidrológica, pues el cauce de río, en las últimas tres décadas, ha disminuido notoriamente. La orografía y el clima de la región favorece a la presencia de microorganismos, la transferencia horizontal de genes y la diseminación por la región del Río Nexapa, además de la presencia abundante de varios contaminantes que están por encima de los límites permitidos por las normas oficiales.

A nivel político se encontró que la situación en la región tiene una clara tendencia en el desinterés por combatir la resistencia a los antimicrobianos, ya que, los principales gobiernos de las ciudades más densamente pobladas (Atlixco e Izúcar de Matamoros) y donde es más visible el estado de la problemática, no hacen mención de la situación actual de la RAM e incluso, a partir de los códigos directos e indirectos analizados en sus informes de gobierno, el interés por la problemática disminuyó considerablemente.

8.7.4. Impacto

Como se observó en la mayoría de los parámetros de la calidad del agua muestreados, se exceden los niveles máximos permisibles, impactando en gran medida los ecosistemas, exponiendo a los animales silvestres y los animales destinados al consumo humano, como sucede en la granja agroganadera cercana al sitio de muestreo 4, donde hay una gran cantidad de cabezas de ganado (Thornber *et al.*, 2022); ahí, mayormente se aplican antibióticos relacionados con las sulfonamidas, contribuyendo a desarrollar resistencia, transferir elementos genéticos móviles (como los genes de resistencia a sulfonamidas) y diseminar estos contaminantes emergentes hacia nuevos lugares donde no es común generar este tipo de sustancias biológicas (K. Zhang *et al.*, 2022). Encontrar los tres principales genes de resistencia a sulfonamidas es un claro indicador del grado de contaminación del agua y del impacto que genera en los ecosistemas y no solo en la salud humana, sino también en el ámbito económico, ya que trasciende estadías prolongadas en hospitales, mayor consumo de medicamentos, aumento considerable de residuos y en el ámbito veterinario, pues los animales de consumo humano no solo se enferman con mayor frecuencia, sino que también es más difícil tratar las infecciones microbianas y por consiguiente la cantidad de producto comercializado se reduce en gran medida (Lambraki *et al.*, 2021; Wernli *et al.*, 2017).

El poco interés y la falta de aplicación de las políticas públicas aplicadas a la Estrategia Nacional Contra la Resistencia a los antimicrobianos es un destacado ejemplo del impacto que tiene esta problemática global y remarcada a nivel regional y local, ya que con el desconocimiento por parte de los tomadores de decisiones y la falta de apoyo en políticas y de infraestructura relacionadas a la salud hay un aumento significativo de condiciones favorecedoras relacionadas

con el aumento en la RAM (contaminantes en el ambiente y condiciones hidrográficas y orográficas). El impacto en el bienestar humano, desembocado por la disminución en el interés de los gobiernos municipales, conlleva a un detrimento significativo, así como un opaco crecimiento de la conciencia relacionada con los ecosistemas y la visualización de la resolución de problemas relacionados a la RAM a corto mediano y largo plazo. Recientemente, Contreras *et al.* reportaron un caso de infección gastrointestinal provocada por una cepa multirresistente de *E. coli* (Contreras-Lino, 2022), aunque no se han encontrados más casos documentados sobre microorganismos resistentes en la región no representa que sea un hecho aislado, lo anterior denota la falta de mecanismos de monitoreo y vigilancia tanto a nivel ambiental, clínico y social.

8.7.5. Respuestas

En el modelo DPSIR, la respuesta es de importancia prioritaria, pues debe ser utilizada como elemento base en la evaluación y resolución de los problemas relacionados con la RAM, así como para la mejora continua por los tomadores de decisiones y personajes centrales en la aplicación de políticas públicas, en todos los sectores, tanto social, económico y ambiental (Hansen & Baun, 2015). En este trabajo, se determinaron las respuestas de acuerdo al análisis de los resultados y discusiones presentados en esta investigación y aplicados a las fuerzas motrices, presiones, estado e impacto que muestra la presencia de genes de resistencia a sulfonamidas en la cuenca del Río Nexapa.

En las fuerzas motrices, una correcta aplicación de los documentos oficiales (NOM-064-ZOO-2000, Lineamientos para la clasificación y prescripción de productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos) para la vigilancia en la prescripción y aplicación de antimicrobianos en los animales de granja destinados al consumo humano, ya que la importancia en las necesidades económicas y sociales para la crianza de estos animales es un motor en la región, pero de acuerdo a lo discutido en este trabajo no hay un estricto control ni monitoreo en la implementación de las normas mexicanas, por lo que el interés en este tema por parte de las autoridades y los trabajadores debe ser un tema prioritario a vigilar. Relacionado a lo anterior, se deben implementar programas de concientización ambiental en todos los niveles sociales de la región, ya que, al intentar cubrir las necesidades básicas para vivir, la población está alterando y contribuyendo significativamente en la generación de microorganismos resistentes y la diseminación a lo largo de la región.

Los contaminantes generados a partir de las actividades agroganaderas y de los residuos de medicamentos generados por la población son una fuente de presión de gran magnitud, por lo que generar respuestas para esto disminuirá las presiones generadas; una de dichas respuestas sería mejorando la infraestructura para la disposición y tratamiento de estos contaminantes, en especial lo relacionado con los antimicrobianos, pues tanto en el sector ganadero como con la población no se cuenta con las condiciones para evitar que su destino sea el sistema hídrico. Otra de las respuestas y que está relacionada con lo anterior, es aplicar programas de sanidad en los lugares donde con mayor facilidad se puede transferir la resistencia a los antimicrobianos, como en las granjas y los hospitales, evitando así la propagación y la transferencia horizontal de genes de resistencia a los antimicrobianos. Si no se evita que la población y las empresas alteren los ecosistemas, se propiciará un desequilibrio ecosistémico mayor, por lo que la aplicación de

políticas públicas relacionadas al ordenamiento territorial, como respuesta a las presiones sociales, conducirá a un funcionamiento mejor del sistema donde los beneficios de los servicios ambientales ayudarán a disminuir la dispersión de microorganismos resistentes y sus biomoléculas.

Conociendo el estado de la resistencia a los antimicrobianos, en el agua del acuífero de Atlixco, Izúcar de Matamoros, se puede determinar el grado de contaminación con respecto a esta problemática y plantear los escenarios adversos que a ello, dependiendo del nivel de contaminación, conlleva; en este sentido, el estado de la calidad del agua, en el Río Nexapa, es malo, ya que los niveles de contaminación de la mayoría de los parámetros analizados, sobrepasan los niveles máximos permitidos, así como la presencia de los tres principales genes de resistencia en los microorganismos concurrentes en el agua. Pero no existen los suficientes reportes para conocer el estado total del problema, pues se requiere de análisis continuos y rutinarios por lo que una de las principales respuestas para conocer el estado de la calidad del agua es implementar estrictos programas de monitoreo para determinar de forma asertiva el estado de la región y las medidas puntuales que se deben llevar a cabo. Un punto trascendental es incluir, como respuesta a lo explicado en esta investigación, en la agenda pública y gubernamental (municipal y estatal) el tema de la RAM, pues es evidente que el estado actual, con respecto al interés de los gobiernos de la región, es prácticamente nulo, remarcando el hecho que a partir de la implementación de la Estrategia Nacional Contra la Resistencia a los antimicrobianos, los dirigentes no tienen la perspectiva de hacer frente a esta problemática que es considerada de preocupación crítica a nivel salud y económica.

El funcionamiento de la PTAR de Izúcar de Matamoros impacta directamente en los sitios de muestreo 6 y 7, mostrando ineficiencias graves durante los tres periodos de muestreo; esto fue notorio en el olor que se percibía en el ambiente y principalmente en los contaminantes, donde la mayoría de ellos superaba los límites máximos permitidos; es importante remarcar que en estos dos sitios de muestreo y para los 3 periodos de recolección de muestra, los tres principales genes de resistencia a sulfonamidas (*sul1*, *sul2* y *sul3*) estuvieron presentes, esto como indicativo del impacto en la calidad del agua. Se propone, como respuesta, dar mantenimiento continuo y aplicar los procesos implicados, en la normativa oficial, para el monitoreo de contaminantes. Una de las acciones que se debe realizar debido al impacto que genera la calidad del agua y las condiciones hidrológicas de la región, en cuestión de salud pública, es aplicar mayor presupuesto en infraestructura en los centros de salud, incluyendo el mantenimiento de las instalaciones y generar programas de concientización de los efectos en salud pública y ambiental de la presencia de microorganismos resistentes. Es importante tomar medidas preventivas y correctivas con respecto a la administración de antimicrobianos en los animales de granja, ya que, la mayor parte de esta problemática es debida a la presencia de estos agentes farmacéuticos provenientes de las granjas agroganaderas; las acciones deben estar relacionadas con la correcta aplicación de políticas públicas y el monitoreo continuo en todas las etapas de producción. Finalmente, es importante que se desarrollen programas continuos de vigilancia para conocer el grado de bienestar humano por parte de la población, pues esto es trascendental para el correcto funcionamiento del complejo sistema relacionado con la RAM, por lo que generar entrevistas periódicas a la población para conocer las necesidades y carencias guiará a una interrelación de

factores puntuales que son base para el desarrollo humano y que directamente lo entrelaza con un mejoramiento económico y ambiental.

8.7.6. Complejidad y diagnóstico de la RAM

Dada la complejidad del problema de la RAM y las múltiples interrelaciones que se desarrollan, en la **Figura 61** se muestra una perspectiva de lo determinado en este trabajo, si bien se exhibe como una instantánea de los procesos, es importante resaltar el hecho del dinamismo y complejidad que representan dichas interrelaciones. El aumento demográfico altera el ambiente (modificación del ambiente y contaminación del agua) y las relaciones sociales (estado del bienestar). En el caso de la cuenca del Río Nexapa, se observó un problema de presencia de basura en sitios donde anteriormente no se encontraba, asentamientos irregulares en mayor proporción y se modificaron espacios de zonas naturales por campos agrícolas. Lo anterior impacta tanto en la salud ambiental como en la humana, pues son factores para enfermedades infecciosas y medios propicios para la transferencia de información genética referente a la resistencia (Urra et al., 2018). Se ha demostrado que aumentar el gasto en salud y por consiguiente el interés de los tomadores de decisiones y gobernantes hacia combatir la RAM, reduce los problemas directamente en cuanto a lo destinado a hacer frente a la problemática (Collignon et al., 2018). De acuerdo a lo planteado en las fuerzas motrices, presiones, estado y respuestas mostradas en la **Figura 59**, es necesario hacer intervenciones que posibiliten generar respuestas que escalen de manera local a nivel regional y estatal. Este trabajo se presenta como elemento de análisis para el entendimiento de la RAM que sucede en una de las cuencas del país, determinando factores de gran impacto como la presencia y administración de antimicrobianos en animales y granjas agroganaderas, condiciones ambientales y orográficas de la región, deficiencia en la infraestructura para el tratamiento y remoción de microorganismos resistentes, ausencia de planes de monitoreo no solo en la presencia de genes, proteínas y biomoléculas que promuevan la RAM, sino de contaminantes que favorecen a los microorganismos, también, como ya se mencionó pero es uno de los principales factores, la mala gobernanza, falta de conocimiento del personal delegado en materia de salud y ausencia de interés en generar y aplicar políticas que repercutan directa e indirectamente en mitigar la RAM (Thornber et al., 2022). Todo lo anterior coadyuva en la proliferación y esparcimiento de microorganismos resistentes, así como sus elementos genéticos promotores a la RAM. El sistema hídrico, es uno de los sistemas más vulnerables en cuanto a este tipo de problemáticas, ya que participa en prácticamente todos los demás sistemas y de forma interconectada, contribuye a que los ecosistemas y los sistemas socioeconómicos estén continuamente mermados, por lo que la evaluación, aplicabilidad y desarrollo de trabajos e investigaciones relacionadas sean prioritarios.

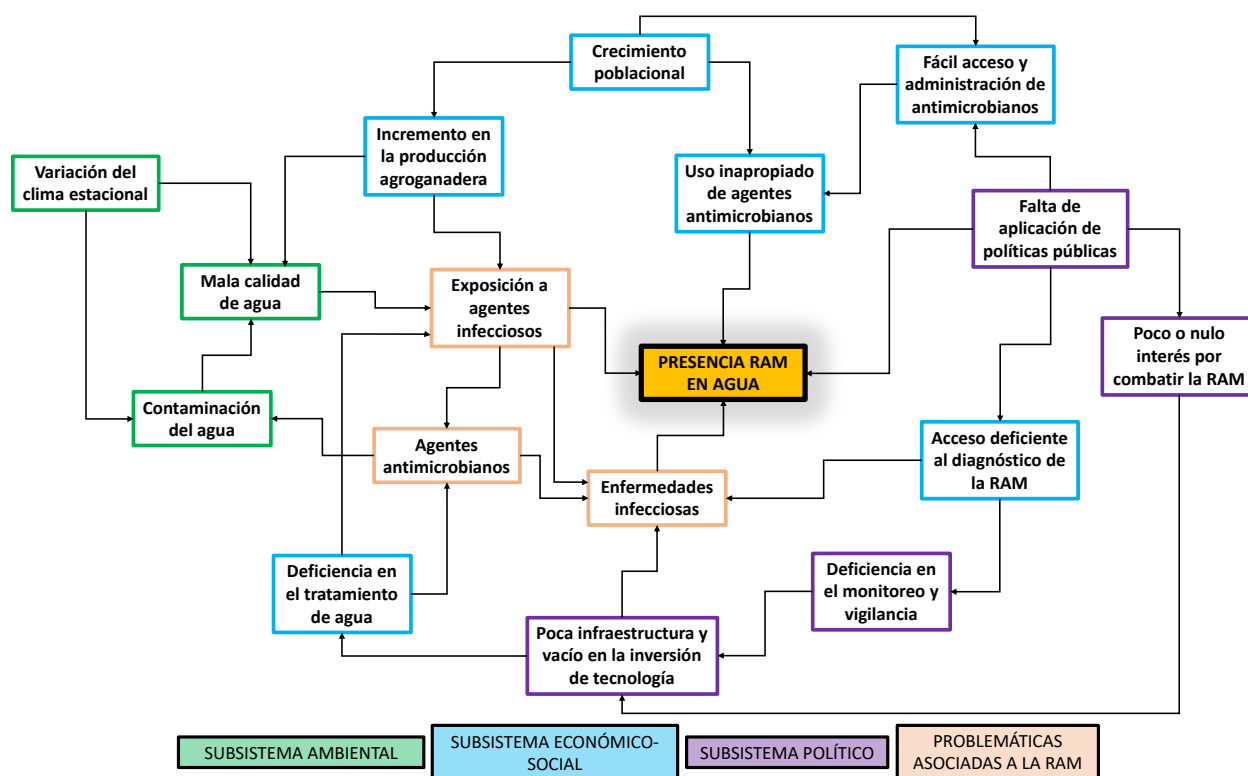


Figura 61. Esquema de complejidad con respecto al diagnóstico de la presencia de resistencia a los antimicrobianos en el río Nexapa (elaboración propia, 2023).

IX. CONCLUSIONES

En este trabajo se generó un diagnóstico integral de la problemática de la resistencia a sulfonamidas en el río Nexapa, considerando la interrelación de factores sociales y ambientales respecto a la presencia de genes de resistencia a sulfonamidas *sul1*, *sul2* y *sul3*.

A través de la aplicación de técnicas analíticas selectivas y eficientes basadas en PCR y electroforesis se detectó la presencia de los genes de resistencia *sul1*, *sul2* y *sul3* en varios puntos de muestreo a lo largo de la cuenca del río, principalmente en los sitios 6 y 7 que son los aledaños a la PTAR de Izúcar de Matamoros. Sin embargo, esta técnica basada en la amplificación de ácidos nucleicos, presenta la limitación de ser cualitativa, por lo que estimar la concentración de los genes presentes en agua no fue posible. Por lo anterior, se desarrolló, evaluó y aplicó una metodología analítica alternativa utilizando un biosensor electroquímico para la detección cuantitativa, rápida y específica de los genes de resistencia *sul1* y *sul4*, lo que representa un avance significativo en la detección de estos contaminantes emergentes.

El análisis ambiental y social reveló que la cuenca del río Nexapa presenta una alta alteración hidrológica y pérdida de cobertura vegetal, lo que contribuye a la presencia de contaminantes y microorganismos resistentes en el agua. Las condiciones ambientales como el relieve, el clima y la ramificación de la red de drenaje incrementan la diseminación de microorganismos y genes de resistencia. En términos de impacto, se encontró que el agua en el

río Nexapa está fuertemente contaminada, de acuerdo con los parámetros de la normativa oficial mexicana de la calidad del agua, ya que los niveles de sustancias contaminantes superan los límites máximos permitidos. Esto representa un riesgo tanto para la salud pública como para el equilibrio ecosistémico de la región. La falta de aplicación de políticas públicas y el desinterés por parte de algunos gobiernos municipales en la región representan factores que promueven la resistencia a los antimicrobianos. La incorrecta aplicación de documentos oficiales relacionados con la prescripción e ingesta de antimicrobianos en el sector agropecuario y clínico humano, así como la falta de programas de concientización ambiental en todos los niveles sociales, la carencia de infraestructura para la disposición y tratamiento de contaminantes fomentan la RAM; al igual que, el desinterés de los gobiernos municipales en implementar programas de prevención sanitaria relacionada con la RAM en lugares donde la resistencia a los antimicrobianos puede propagarse fácilmente.

Las variables de la calidad del agua relacionadas con la presencia de los genes de resistencia a sulfonamidas *sul1*, *sul2* y *sul3* en las aguas del río Nexapa, de acuerdo con su significancia estadística, fueron pH, temperatura, oxígeno disuelto, fósforo, magnesio y níquel, por lo que la presencia de contaminantes que influyen en la calidad del agua, condicionan y favorecen la presencia y esparcimiento de microorganismos y sus elementos genéticos resistentes.

Para contrastar la hipótesis nula, se puede decir que los genes de resistencia *sul1*, *sul2* y *sul3* que, de acuerdo a la bibliografía, era de esperar que se encontraran en el sistema hídrico del río Nexapa, pero, ya que no hay reportes de la presencia del gen *sul4* en América se puede decir que este elemento genético que le confiere resistencia a los microorganismos no ha sido diseminado en esta región. En cuanto a la explicación del por qué la presencia de estos genes de resistencia en el agua, se acepta la hipótesis de que la falta de aplicación de políticas públicas, ya establecidas, en materia del combate a la resistencia a los antimicrobianos es deficiente, además del poco interés de los principales presidentes municipales de la región. Referente al desconocimiento de la población, se propone continuar con investigación más profunda estableciendo programas de monitoreo y vigilancia social para poder aceptar la hipótesis propuesta. El consumo de antibióticos para tratar enfermedades gastrointestinales del tipo sulfonamidas está bien documentado en la región, así como su presencia en agua del río Nexapa, por lo que uno de los principales factores que promueve la resistencia es el mal manejo de estos medicamentos en este sector económico, por esta razón, a partir de lo encontrado en este trabajo, se reafirma la hipótesis de que es uno de los principales impulsores de la RAM. Finalmente, y respondiendo a una de las preguntas de investigación, los factores ambientales como el orden del río, la orografía de la región y la temperatura y precipitaciones favorecen la proliferación de microorganismos resistentes a sulfonamidas en las aguas del río Nexapa.

Este estudio destaca la importancia de abordar la resistencia a sulfonamidas de manera integral y multidisciplinaria, involucrando a tomadores de decisiones, gobernantes y actores clave en la implementación de políticas públicas que aborden esta problemática crítica para la salud y el medio ambiente. Las respuestas identificadas a través del modelo DPSIR deben ser consideradas como base para el desarrollo de estrategias efectivas de vigilancia y control de la resistencia antimicrobiana en la región del río Nexapa. Este trabajo sirve como herramienta para guiar acciones futuras y promover una mayor conciencia sobre la importancia de abordar la

resistencia a los antimicrobianos de manera integral y coordinada. Solo a través de la colaboración y el compromiso de todos los actores involucrados será posible enfrentar eficazmente este desafío emergente que afecta la salud pública, el medio ambiente y la economía de la región.

X. REFERENCIAS

- Aarestrup, F. M., Wegener, H. C., & Collignon, P. (2008). Resistance in bacteria of the food chain: Epidemiology and control strategies. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 6(5), 733–750. <https://doi.org/10.1586/14787210.6.5.733>
- Agyemang, I., McDonald, A., & Carver, S. (2007). Application of the DPSIR framework to environmental degradation assessment in northern Ghana. *Natural Resources Forum*, 31(3), 212–225. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1477-8947.2007.00152.x>
- Akiba, T., Koyama, K., Ishiki, Y., Kimura, S., & Fukushima, T. (1960). On the mechanism of the development of multiple drug-resistant clones of *Shigella*. *Japanese Journal of Microbiology*, 4(2), 219–227.
- Aminov, R. (2017). History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochemical Pharmacology*, 133, 4–19. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.10.001>
- Anjum, M. F., Zankari, E., & Hasman, H. (2018). Molecular Methods for Detection of Antimicrobial Resistance. In S. Schwarz, L. M. Cavaco, & J. Shen (Eds.), *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals* (pp. 35–50). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555819804.ch3>
- Arnold, K. E., Williams, N. J., & Bennett, M. (2016). Disperse abroad in the land: The Role of Wildlife in the Dissemination of Antimicrobial Resistance. *Biology Letters*, 12(8), 1–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0137>
- Ashwini, A., Jamwal, P., & Vanak, A. T. (2022). Environmental surveillance of antimicrobial resistance in a rapidly developing catchment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 195(1), 7. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10630-7>
- Asif, M. (2017). Antimicrobial Agents. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, 4(3), 00104. <https://doi.org/10.15406/japlr.2017.04.00104>
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Salamat, M. K. F., & Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, Volume 11, 1645–1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>
- Baker-Austin, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R., & McArthur, J. V. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*, 14(4), 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.006>
- Bala, A., Uhlin, B. E., & Karah, N. (2023). Insights into the genetic contexts of sulfonamide resistance among early clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Infection, Genetics and Evolution*, 112, 105444. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meegid.2023.105444>

- Batterman, S., Eisenberg, J., Hardin, R., Kruk, M. E., Lemos, M. C., Michalak, A. M., Mukherjee, B., Stein, E. R., Watkins, C., & Wilson, M. L. (2009). Sustainable Control of Water-Related Infectious Diseases A Review and Proposal for Interdisciplinary Health-Based Systems Research. *Environmental Health Perspectives*, 117(7), 1023–1032. <https://doi.org/doi:10.1289/ehp.0800423>
- Bettazzi, F., Marrazza, G., Minunni, M., Palchetti, I., & Scarano, S. (2017). Biosensors and Related Bioanalytical Tools. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 77, 1–33. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2017.05.003>
- Bhateria, R., & Jain, D. (2016). Water quality assessment of lake water: a review. *Sustainable Water Resources Management*, 2(2), 161–173. <https://doi.org/10.1007/s40899-015-0014-7>
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Burnham, C. A. D., Leeds, J., Nordmann, P., O'Grady, J., & Patel, J. (2017). Diagnosing antimicrobial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 15(11), 697–703. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.103>
- Campos-Aranda, D. F. (1998). Geomorfología de la cuenca. In *Procesos del ciclo hidrológico* (3a reimpre, pp. 2.1-2.29). UASLP.
- Cano, L. (2020a, January 28). *Planta de tratamiento de aguas en Izúcar opera al 70 %*. Municipios Puebla. <https://municipiospuebla.mx/nota/2020-01-28/izucar-de-matamoros/planta-de-tratamiento-de-aguas-en-iz%C3%BAcar-opera-al-70>
- Cano, L. (2020b, August 15). *Planta de tratamiento de agua en Izúcar lleva 4 años sin funcionar*. Municipios Puebla. <https://municipiospuebla.mx/nota/2020-08-15/izucar-de-matamoros/planta-de-tratamiento-de-agua-en-iz%C3%BAcar-lleva-4-a%C3%B1os-sin>
- Cauas, D. (2015). Definición de las variables, enfoque y tipo de investigación. *Universidad Nacional Abierta y a Distancia* (UNAD), 1–11. http://www.mecanicahn.com/personal/marcosmartinez/seminario1/los_pdf/1-Variables.pdf
- Chinu, J., Jobin, T., Prasannakumar, V., & Reghunath, R. (2019). BaDAM Toolbox: A GIS-Based Approach for Automated Drainage Basin Morphometry. *Journal of the Indian Society of Remote Sensing*, 47(3), 467–478. <https://doi.org/10.1007/s12524-018-0913-9>
- Collignon, P., Athukorala, P., Senanayake, S., & Khan, F. (2015). Antimicrobial Resistance : The Major Contribution of Poor Governance and Corruption to This Growing Problem. *PLoS ONE*, 10(3), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116746>
- Collignon, P., Beggs, J. J., Walsh, T. R., Gandra, S., & Laxminarayan, R. (2018). Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. *The Lancet Planetary Health*, 2(9), e398–e405. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(18\)30186-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2542-5196(18)30186-4)

- CONAGUA. (2011). ACUERDO por el que se dan a conocer los estudios técnicos de aguas nacionales superficiales de la Región Hidrológica número 18 Balsas. *Diario Oficial de La Federación*, 26/01/2011.
- CONAGUA. (2016). *Catálogo de estaciones hidrométricas del Banco Nacional de Datos de Aguas Superficiales (BANDAS)*.
- CONAGUA. (2018). Actualización de la disponibilidad media anual de agua en el acuífero Atlixco-Izucar de Matamoros (2103), Estado de Puebla. *Diario Oficial de La Federación*, 1–21.
- Contreras-Lino, M. (2022). *Análisis del funcionamiento de la PTAR de Izúcar de Matamoros y propuesta preliminar del proceso Fenton como tratamiento terciario para disminuir la contaminación ambiental de sulfametoxazol*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Cruz Romero, B., Gaspari, F. J., Rodríguez Vagaría, A. M., Carrillo González, F. M., & Téllez López, J. (2015). Análisis morfométrico de la cuenca hidrográfica del río Cuale, Jalisco, México. *Investigación y Ciencia*, 23(64), 26–34. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67441039004>
- Curiao, T., Marchi, E., Grandgirard, D., León-Sampedro, R., Viti, C., Leib, S. L., Baquero, F., Oggioni, M. R., Martinez, J. L., & Coque, T. M. (2016). Multiple adaptive routes of Salmonella enterica Typhimurium to biocide and antibiotic exposure. *BMC Genomics*, 17(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2778-z>
- Curutiu, C., Lazar, V., & Chifiriuc, M. C. (2017). 10 - Pesticides and antimicrobial resistance: from environmental compartments to animal and human infections (A. M. B. T.-N. P. and S. S. Grumezescu, Ed.; pp. 373–392). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804299-1.00011-4>
- Davenport, D. (2012). The war against bacteria: How were sulphonamide drugs used by Britain during World War II? *Medical Humanities*, 38(1), 55–58. <https://doi.org/10.1136/medhum-2011-010024>
- Davenport, M., Mach, K. E., Shortliffe, L. M. D., Banaei, N., Wang, T. H., & Liao, J. C. (2017). New and developing diagnostic technologies for urinary tract infections. *Nature Reviews Urology*, 14(5), 298–310. <https://doi.org/10.1038/nrrol.2017.20>
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Origins and Evolution of Antibiotic Resistance*, 74(3), 417–433. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00016-10>
- Department of Health/DEFRA. (2013). UK Five Year Antimicrobial Resistance Strategy 2013 to 2018. *Department of Health Department for Environment Food and Rural Affairs*, 43. https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/244058/20130902_UK_5_year_AMR_strategy.pdf
- Deswati, D., Safni, S., Khairiyah, K., Yani, E., Yusuf, Y., & Pardi, H. (2022). Biofloc technology: water quality (pH, temperature, DO, COD, BOD) in a flood & drain aquaponic system. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 102(18), 6835–6844. <https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1817428>

- Domagk, G. (1935). Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. *Dtsch Med Wochenschr*, 61(7), 250–253. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1129486>
- Doyle, M. P., Loneragan, G. H., Scott, H. M., & Singer, R. S. (2013). Antimicrobial Resistance: Challenges and Perspectives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(2), 234–248. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12008>
- El-Halfawy, O. M., & Valvano, M. A. (2015). Antimicrobial heteroresistance: An emerging field in need of clarity. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 191–207. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-14>
- Enne, V. I., Livermore, D. M., Stephens, P., & Hall, L. M. C. (2001). Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet*, 357(9265), 1325–1328. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04519-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04519-0)
- Escudero, J. A., Céline, L., Aleksandra, N., & Didier, M. (2015). The Integron: Adaptation On Demand. *Microbiology Spectrum*, 3(2), 3.2.10. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0019-2014>
- European Commission. (n.d.). *EU Action on Antimicrobial Resistance*. https://doi.org/https://ec.europa.eu/health/amr/antimicrobial-resistance_en
- European Commission. (2011). Communication from the Commission to the European Parliament and the Council - Action plan against the rising threats from Antimicrobial Resistance. *Com (2011) 748*, 1–17. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- European Commission. (2017). *A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance*. https://ec.europa.eu/health/amr/sites/amr/files/amr_action_plan_2017_en.pdf
- Fahrenfeld, N., Ma, Y., O'Brien, M., & Pruden, A. (2013). Reclaimed water as a reservoir of antibiotic resistance genes: Distribution system and irrigation implications. *Frontiers in Microbiology*, 4(MAY), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00130>
- Florence, D., Isabelle, P., Roland, L., Ekkehard, C., & Patrice, C. (2007). Modes and Modulations of Antibiotic Resistance Gene Expression. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(1), 79–114. <https://doi.org/10.1128/CMR.00015-06>
- Gajdács, M., Spengler, G., & Urbán, E. (2017). Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria: Rubik's Cube of Clinical Microbiology? *Antibiotics*, 6(4). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/antibiotics6040025>
- Gandra, S., Barter, D. M., & Laxminarayan, R. (2017). Economic burden of antibiotic resistance : How much do we really know? *Clinical Microbiology and Infection*, 20(10), 1–9. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12798>
- García, R. (2006). *Conceptos, métodos y fundamentación epistemológica de la investigación interdisciplinaria*. Gedisa.
- García Romero, L. (2020). *Propuesta y análisis de metodologías para la evaluación de recursos hídricos mediante modelos precipitación-escurrentia* [Universitat Politècnica de València]. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/153150>

- García-Caro, M. P., Cruz-Quintana, F., Río-Valle, J. S., Muñoz-Vinuesa, A., Montoya-Juárez, R., Prados-Peña, D., Pappous, A., & Botella-López, M. C. (2010). Influencia de las emociones en el juicio clínico de los profesionales de la salud a propósito del diagnóstico de enfermedad terminal. *International Journal of Clinical and Health Psychology*, 10(1), 57–73. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33712017004>
- García-Zamora, J. L. (2019). *Nanofibras biocatalíticas de quitosano para la degradación de retardantes de flama como contaminantes de flama como contaminantes orgánicos persistentes*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Gastañaga, M. del C. (2018). Agua, saneamiento y salud. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 35(2), 181. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.352.3732>
- Geressu, R., Siderius, C., Harou, J. J., Kashaigili, J., Pettinotti, L., & Conway, D. (2020). Assessing River Basin Development Given Water-Energy-Food-Environment Interdependencies. *Earth's Future*, 8(8), e2019EF001464. <https://doi.org/https://doi.org/10.1029/2019EF001464>
- Ghartimagar, S., Khatri, P., Neupane, S., Joshi, D. R., & Joshi, T. P. (2020). Evaluation of Ground Water Quality of Kathmandu Valley and Antibiotic Susceptibility test against *Klebsiella pneumoniae*. *Tribhuvan University Journal of Microbiology*, 7(0), 83–90. <https://doi.org/10.3126/tujm.v7i0.33850>
- Gros, M., Mas-Pla, J., Sánchez-Melsió, A., Čelić, M., Castaño, M., Rodríguez-Mozaz, S., Borrego, C. M., Balcázar, J. L., & Petrović, M. (2023). Antibiotics, antibiotic resistance and associated risk in natural springs from an agroecosystem environment. *Science of The Total Environment*, 857, 159202. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159202>
- Guerra, F., & González, J. (2002). Caracterización morfométrica de la cuenca de la quebrada La Bermeja, San Cristóbal, Estado Táchira, Venezuela . *Geoenseñanza*, 7(1–2), 88–108. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=36070208>
- Guo, J., Li, J., Chen, H., Bond, P. L., & Yuan, Z. (2017). Metagenomic analysis reveals wastewater treatment plants as hotspots of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements. *Water Research*, 123, 468–478. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.002>
- Gupta, S., Arango-Argoty, G., Zhang, L., Pruden, A., & Vikesland, P. (2019). Identification of discriminatory antibiotic resistance genes among environmental resistomes using extremely randomized tree algorithm. *Microbiome*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0735-1>
- Haenelt, S., Wang, G., Kasmanas, J. C., Musat, F., Richnow, H. H., da Rocha, U. N., Müller, J. A., & Musat, N. (2023). The fate of sulfonamide resistance genes and anthropogenic pollution marker *intI1* after discharge of wastewater into a pristine river stream. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1058350>
- Hammerum, A. M., Heuer, O. E., Emborg, H., Bagger-Skjøt, L., Jensen, V. F., Rogues, A., Skov, R. L., Agersø, Y., Brandt, C. T., Seyfarth, A. M., Muller, A., Hovgaard, K., Ajufo, J., Bager, F., Aarestrup, F. M., Frimodt-Møller, N., Wegener, H. C., & Monnet, D. L. (2007). Danish

- Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Program. *Emerging Infectious Diseases*, 13(11), 1633–1639. <https://doi.org/10.3201/eid1311.070421>
- Hannah, S., Addington, E., Alcorn, D., Shu, W., Hoskisson, P. A., & Corrigan, D. K. (2019). Rapid antibiotic susceptibility testing using low-cost, commercially available screen-printed electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 145(July), 111696. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111696>
- Hansen, S. F., & Baun, A. (2015). DPSIR and Stakeholder Analysis of the Use of Nanosilver. *NanoEthics*, 9(3), 297–319. <https://doi.org/10.1007/s11569-015-0245-y>
- Hayter, A. J. (1986). The Maximum Familywise Error Rate of Fisher's Least Significant Difference Test. *Journal of the American Statistical Association*, 81(396), 1000–1004. <https://doi.org/10.1080/01621459.1986.10478364>
- Hellen, G., Molly, M.-P., Suraj, P., Sumanth, G., Jordan, L., Devra, B., Andrea, W., & Ramanan, L. (2015). The State of the World's Antibiotics. In *Economics & Policy*. <https://doi.org/10.3928/23258160-20160324-13>
- Hendriksen, R. S., Munk, P., Njage, P., van Bunnik, B., McNally, L., Lukjancenko, O., Röder, T., Nieuwenhuijse, D., Pedersen, S. K., Kjeldgaard, J., Kaas, R. S., Clausen, P. T. L. C., Vogt, J. K., Leekitcharoenphon, P., van de Schans, M. G. M., Zuidema, T., de Roda Husman, A. M., Rasmussen, S., Petersen, B., ... Aarestrup, F. M. (2019). Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08853-3>
- Hernández-Sampieri, R., & Mendoza, C. (2018). *Metodología de la investigación. Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta* (7th ed.). McGraw-Hill Interamericana.
- Heuer, H., & Smalla, K. (2007). Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environmental Microbiology*, 9(3), 657–666. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01185.x>
- Hitchner, M. A., Santiago-Ortiz, L. E., Necelis, M. R., Shirley, D. J., Palmer, T. J., Tarnawsky, K. E., Vaden, T. D., & Caputo, G. A. (2019). Activity and characterization of a pH-sensitive antimicrobial peptide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1861(10), 182984. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.05.006>
- Horton, R. E. (1932). Drainage-basin characteristics. *Eos, Transactions American Geophysical Union*, 13(1), 350–361. <https://doi.org/https://doi.org/10.1029/TR013i001p00350>
- Horton, R. E. (1945). Erosional development of streams and their drainage basins; hydrophysical approach to quantitative morphology. *GSA Bulletin*, 56(3), 275–370. [https://doi.org/10.1130/0016-7606\(1945\)56\[275:EDOSAT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1130/0016-7606(1945)56[275:EDOSAT]2.0.CO;2)
- Hughes, D., & Andersson, D. I. (2017). Environmental and genetic modulation of the phenotypic expression of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 374–391. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux004>

- Humphries, R. M., & Hindler, J. A. (2016). Emerging Resistance, new antimicrobial agents . . . but no tests! the challenge of antimicrobial susceptibility testing in the current us regulatory landscape. *Clinical Infectious Diseases*, 63(1), 83–88. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw201>
- Hutinel, M., Larsson, D. G. J., & Flach, C.-F. (2022). Antibiotic resistance genes of emerging concern in municipal and hospital wastewater from a major Swedish city. *Science of The Total Environment*, 812, 151433. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151433>
- INAFED. (2010a). *Atlixco*. Enciclopedia de Los Municipios y Delegaciones de México, Estado de Puebla.
- INAFED. (2010b). *Izúcar de Matamoros*. Enciclopedia de Los Municipios y Delegaciones de México, Estado de Puebla.
- INEGI. (2015). *Conjunto de datos vectoriales de información topográfica 1:50 000 serie III*. Topografía.
- INEGI. (2019). *Red hidrológica subcuenca del Río Nexapa (RH18Ae)*. Simulador de Flujos de Agua de Cuencas Hidrográficas. http://antares.inegi.mx/analisis/red_hidro/siatl/#
- J, A. K., & S, A. (2018). Aspect-based opinion ranking framework for product reviews using a Spearman's rank correlation coefficient method. *Information Sciences*, 460–461, 23–41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ins.2018.05.003>
- JETACAR. (1999). *The use of antibiotics in food-producing animals: antibiotic-resistant bacteria in animals and humans*. [http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/health-pubs-jetacar-cnt.htm/\\$FILE/jetacar.pdf](http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/health-pubs-jetacar-cnt.htm/$FILE/jetacar.pdf)
- Johnson, T. A., Stedtfeld, R. D., Wang, Q., Cole, J. R., Hashsham, S. A., Looft, T., Zhu, Y. G., & Tiedje, J. M. (2016). Clusters of antibiotic resistance genes enriched together stay together in swine agriculture. *MBio*, 7(2), 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.02214-15>
- Jorgensen, J. H., & Turnidge, J. D. (2015). Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In *Manual of Clinical Microbiology* (Eleventh E, pp. 1253–1273). American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch71>
- Köhler, T., Kok, M., Michea-Hamzehpour, M., Plesiat, P., Gotoh, N., Nishino, T., Curty, L. K., & Pechere, J. C. (1996). Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(10), 2288–2290. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.10.2288>
- Kools, S. A. E., Moltmann, J. F., & Knacker, T. (2008). Estimating the use of veterinary medicines in the European union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 50(1), 59–65. <https://doi.org/10.1016/J.YRTPH.2007.06.003>
- Lambraki, I. A., Majowicz, S. E., Parmley, E. J., Wernli, D., Léger, A., Graells, T., Cousins, M., Harbarth, S., Carson, C., Henriksson, P., Troell, M., & Jørgensen, P. S. (2021). Building Social-Ecological System Resilience to Tackle Antimicrobial Resistance Across the One Health Spectrum: Protocol for a Mixed Methods Study. *JMIR Res Protoc*, 10(6), e24378. <https://doi.org/10.2196/24378>

- Lebreton, F., Manson, A. L., Saavedra, J. T., Straub, T. J., Earl, A. M., & Gilmore, M. S. (2017). Tracing the Enterococci from Paleozoic Origins to the Hospital Article Tracing the Enterococci from Paleozoic Origins to the Hospital. *Cell*, 169, 849–861. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.027>
- Leonard, H., Colodner, R., Halachmi, S., & Segal, E. (2018). Recent Advances in the Race to Design a Rapid Diagnostic Test for Antimicrobial Resistance. *ACS Sensors*, 3(11), 2202–2217. <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b00900>
- Lhermie, G., Wernli, D., Jørgensen, P. S., Kenkel, D., Lin Lawell, C. Y. C., Tauer, L. W., & Gröhn, Y. T. (2019). Tradeoffs between resistance to antimicrobials in public health and their use in agriculture: Moving towards sustainability assessment. *Ecological Economics*, 166(June), 106427. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2019.106427>
- Lin, L., Yuan, K., Liang, X., Chen, X., Zhao, Z., Yang, Y., Zou, S., Luan, T., & Chen, B. (2015). Occurrences and distribution of sulfonamide and tetracycline resistance genes in the Yangtze River Estuary and nearby coastal area. *Marine Pollution Bulletin*, 100(1), 304–310. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.08.036>
- Liu, C., Li, X., Zheng, S., Kai, Z., Jin, T., Shi, R., Huang, H., & Zheng, X. (2021). Effects of wastewater treatment and manure application on the dissemination of antimicrobial resistance around swine feedlots. *Journal of Cleaner Production*, 280, 123794. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123794>
- Liu, C., Liu, Y., Feng, C., Wang, P., Yu, L., Liu, D., Sun, S., & Wang, F. (2021). Distribution characteristics and potential risks of heavy metals and antimicrobial resistant *Escherichia coli* in dairy farm wastewater in Tai'an, China. *Chemosphere*, 262, 127768. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127768>
- Liu, Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., & Park, H. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China : a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- López Báez, W. (2014). Watershed management analysis as a tool for sustainable use of natural resources. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 13(2), 39–45. <https://doi.org/doi:10.5154/r.rchsza.2012.06.017>
- Lye, Y.-L., Chai, L.-C., Lee, C.-W., Suzuki, S., & Bong, C.-W. (2022). Microbial Community Structure and Bacterial Lineages Associated with Sulfonamides Resistance in Anthropogenic Impacted Larut River. *Water*, 14(7), 1018. <https://doi.org/10.3390/w14071018>
- Magnano San Lio, R., Favara, G., Maugeri, A., Barchitta, M., & Agodi, A. (2023). How Antimicrobial Resistance Is Linked to Climate Change: An Overview of Two Intertwined Global Challenges. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(3), 1681. <https://doi.org/10.3390/ijerph20031681>

- Marinho, C. M., Santos, T., Gonçalves, A., Poeta, P., & Igrejas, G. (2016). A Decade-Long Commitment to Antimicrobial Resistance Surveillance in Portugal. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1650. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01650>
- Martínez-Austria, P. F., & Vargas-Hidalgo, A. (2017). Sistema de asignaciones, concesiones y política hídrica en México. Efectos en el derecho humano al agua . In *Tecnología y ciencias del agua* (Vol. 8, pp. 117–125). scielomx .
- Mcgann, P., Snedrud, E., Maybank, R., Corey, B., Ong, A. C., Clifford, R., Hinkle, M., & Whitman, T. (2016). Escherichia coli Harboring mcr-1 and bla CTX-M on a Novel IncF Plasmid : First Report of mcr-1 in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(7), 4420–4422. <https://doi.org/10.1128/AAC.01103-16>.Address
- McLain, J. E., Cytryn, E., Durso, L. M., & Young, S. (2016). Culture-based Methods for Detection of Antibiotic Resistance in Agroecosystems: Advantages, Challenges, and Gaps in Knowledge. *Journal of Environmental Quality*, 45(2), 432–440. <https://doi.org/10.2134/jeq2015.06.0317>
- Meza, A., Cruz, E., Rodríguez, P., Ramírez, J., Solórzano, F., Miranda, M., Volkow, P., Vilar, D., Soto, G., Soto, J., Arias, E., Macías, M., Tinoco-Favila, J., Morfin-Otero, M., Rodríguez-Noriega, E., Pérez-Gómez, H., Morales, J., Macías, A., Molina, J., & Basurto, D. (2018). Estado Actual de la Resistencia Antimicrobiana en México. *Programa Universitario de Investigación En Salud*, 28.
- Meza-Rodríguez, D. (2006). *Caracterización hidrográfica de la cuenca Ayuquila-Armeria mediante la aplicación de un sistema de informacion geográfica* [Tesis Doctoral. Tesis Ingenieria en Recursos Naturales y Agropecuarios. Autlan de Navarro]. Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de la Costa Sur.
- Mora, A., García-Gamboa, M., Sánchez-Luna, M. S., Gloria-García, L., Cervantes-Avilés, P., & Mahlknecht, 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146788>
- Moreno Jiménez, J. M., Aguarón Joven, J., & Escobar Urmeneta, M. T. (2001). Metodología científica en la valoración y selección ambiental. *Pesquisa Operacional*, 21(1), 1–16. <https://doi.org/10.1590/S0101-74382001000100001>
- Mullet, D. R. (2018). A General Critical Discourse Analysis Framework for Educational Research. *Journal of Advanced Academics*, 29(2), 116–142. <https://doi.org/10.1177/1932202X18758260>
- Navarro, A., Herrera, J., Caso, L., & Marrugo, J. (2013). Calidad del agua del río Nexapa: Tendencias espacio-temporales y sus implicaciones. In M. Ramos. & V. Aguilera. (Eds.), *Ciencias Naturales y Exactas, Handbook* (pp. 83–97). ECORFAN.
- Navarro, A., Herrera, J., Marrugo, J., Bayona, J., & Morales, L. (2014). Microcontaminantes orgánicos en los ríos de México: El caso del río Nexapa. In M. Ramos & V. Aguilera (Eds.), *Ciencias de la Ingeniería y Tecnología, Handbook T-IV* (pp. 43–63). ECORFAN.

- Nisa, S., Bercker, C., Midwinter, A. C., Bruce, I., Graham, C. F., Venter, P., Bell, A., French, N. P., Benschop, J., Bailey, K. M., & Wilkinson, D. A. (2019). Combining MALDI-TOF and genomics in the study of methicillin resistant and multidrug resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in New Zealand. *Scientific Reports*, 9(1271), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37503-9>
- OECD. (2001). Ready Biodegradability. *OECD Guideline for Testing of Chemicals*, December, 1–26.
- Omer, N. H. (2019). Water Quality Parameters. In K. Summers (Ed.), *Water Quality* (p. Ch. 1). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89657>
- O'Neill, J. (2016). *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations*. The Review on Antimicrobial Resistance. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Ortega-Vázquez, M. (2021). *Análisis socioecológico de la planta de tratamiento de aguas residuales de Izúcar de Matamoros empleando el marco de referencia DPSIR*.
- Osińska, A., Korzeniewska, E., Harnisz, M., Felis, E., Bajkacz, S., Jachimowicz, P., Niestepski, S., & Konopka, I. (2020). Small-scale wastewater treatment plants as a source of the dissemination of antibiotic resistance genes in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 381(121221). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121221>
- Padrón, J. (2007). Tendencias Epistemológicas de la Investigación Científica en el Siglo XXI Epistemological Trends in 21st Century Scientific Research. *Cinta de Moebio*, 28, 1–28.
- Patil, K., Patil, S., Patil, S., & Patil, V. (2015). Monitoring of Turbidity, PH & Temperature of Water Based on GSM. *International Journal for Research in Emerging Science and Technology*, 2(3), 16–21.
- Pazda, M., Kumirska, J., Stepnowski, P., & Mulkiwicz, E. (2019). Science of the Total Environment Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems – A review. *Science of the Total Environment*, 697, 134023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134023>
- Perreten, V., & Boerlin, P. (2003). A New Sulfonamide Resistance Gene (sul3) in *Escherichia coli* Is Widespread. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), 1169–1172. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.3.1169>
- Pinna, C., Vecchiato, C. G., Bolduan, C., Grandi, M., Stefanelli, C., Windisch, W., Zaghini, G., & Biagi, G. (2018). Influence of dietary protein and fructooligosaccharides on fecal fermentative end-products, fecal bacterial populations and apparent total tract digestibility in dogs. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 106. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1436-x>
- Pruden, A., Alcalde, R. E., Alvarez, P. J. J., Ashbolt, N., Bischel, H., Capiro, N. L., Crossette, E., Frigon, D., Grimes, K., Haas, C. N., Ikuma, K., Kappell, A., LaPara, T., Kimbell, L., Li, M., Li, X., McNamara, P., Seo, Y., Sobsey, M. D., ... Zhou, Z. (2018). An Environmental Science and Engineering Framework for Combating Antimicrobial Resistance. *Environmental Engineering Science*, 35(10), 1–7. <https://doi.org/10.1089/ees.2017.0520>

- Queenan, K., Häsler, B., & Rushton, J. (2016). A One Health approach to antimicrobial resistance surveillance : is there a business case for it ? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(4), 422–427. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.06.014>
- Rådström, P., & Swedberg, G. (1988). RSF1010 and a conjugative plasmid contain sulII, one of two known genes for plasmid-borne sulfonamide resistance dihydropteroate synthase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(11), 1684–1692.
- Rådström, P., Swedberg, G., & Sköld, O. (1991). Genetic analyses of sulfonamide resistance and its dissemination in gram-negative bacteria illustrate new aspects of R plasmid evolution. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(9), 1840–1848.
- Rai, P. K., Mohan, K., Mishra, S., Ahmad, A., & Mishra, V. N. (2017). A GIS-based approach in drainage morphometric analysis of Kanhar River Basin, India. *Applied Water Science*, 7(1), 217–232. <https://doi.org/10.1007/s13201-014-0238-y>
- Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., & Megharaj, M. (2019). Local applications but global implications: Can pesticides drive microorganisms to develop antimicrobial resistance? *Science of The Total Environment*, 654, 177–189. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.041>
- Razavi, M., Marathe, N. P., Gillings, M. R., Flach, C. F., Kristiansson, E., & Joakim Larsson, D. G. (2017). Discovery of the fourth mobile sulfonamide resistance gene. *Microbiome*, 5(1), 160. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0379-y>
- Resmi, M., Babeesh, C., & Hema, A. (2019). Quantitative analysis of the drainage and morphometric characteristics of the Palar River basin, Southern Peninsular India; using bAd calculator (bearing azimuth and drainage) and GIS. *Geology, Ecology, and Landscapes*, 3(4), 295–307. <https://doi.org/10.1080/24749508.2018.1563750>
- Reynoso, E. C., Laschi, S., Palchetti, I., & Torres, E. (2021). Advances in Antimicrobial Resistance Monitoring Using Sensors and Biosensors: A Review. *Chemosensors*, 9(8), 232. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9080232>
- Rodríguez-Noriega, E., León-Garnica, G., Petersen-Morfin, S., Pérez-Gómez, H. R., González-Díaz, E., & Morfín-Otero, R. (2014). La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. *Biomedica*, 34(SUPPL.1), 181–190. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.2142>
- Rooke, L. S. J., Smith, R. D., Pouwels, K. B., Buchanan, J., Abel, L., Eibich, P., Butler, C. C., Tan, P. S., Sarah Walker, A., Robotham, J. V., & Wordsworth, S. (2019). The challenge of antimicrobial resistance: What economics can contribute. *Science*, 364(6435). <https://doi.org/10.1126/science.aau4679>
- Rusydi, A. F. (2018). Correlation between conductivity and total dissolved solid in various type of water: A review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 118, 012019. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/118/1/012019>
- Sabaté, M., & Prats, G. (2002). Estructura y función de los integrones. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 20(7), 341–345. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(02\)72813-9](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(02)72813-9)

- Sade, R., Rimmer, A., Samuels, R., Salingar, Y., Denisyuk, M., & Alpert, P. (2016). *Water Management in a Complex Hydrological Basin—Application of Water Evaluation and Planning Tool (WEAP) to the Lake Kinneret Watershed, Israel* BT - *Integrated Water Resources Management: Concept, Research and Implementation* (D. Borchardt, J. J. Bogardi, & R. B. Ibisch, Eds.; pp. 35–57). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25071-7_2
- Salazar Corrales, K. D. (2022). *Evaluación fisicoquímica y microbiológica como insumo para el mejoramiento de la gestión socioambiental del recurso hídrico en la parte media y baja de la Cuenca del Río Tempisque, Guanacaste, Costa Rica* [Universidad Nacional, Costa Rica]. <https://repositorio.una.ac.cr/handle/11056/23210>
- Sánchez-Osuna, M., Cortés, P., Barbé, J., & Erill, I. (2019). Origin of the mobile di-hydro-pterolate synthase gene determining sulfonamide resistance in clinical isolates. *Frontiers in Microbiology*, 10(JAN), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03332>
- Sarkar, S., Roy, S., & Singh, P. C. (2021). Groove Switching of Hydroxychloroquine Modulates the Efficacy of Binding and Induced Stability to DNA. *The Journal of Physical Chemistry B*, 125(25), 6889–6896. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c03869>
- Schillinger, J., Özerol, G., Güven-Griemert, Ş., & Heldeweg, M. (2020). Water in war: Understanding the impacts of armed conflict on water resources and their management. *WIREs Water*, 7(6), e1480. <https://doi.org/10.1002/wat2.1480>
- Schumm, S. (1956). Evolution of drainage systems and slopes in badlands at Perth Amboy, New Jersey. *GSA Bulletin*, 67(5), 597–646. [https://doi.org/10.1130/0016-7606\(1956\)67\[597:EODSAS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1130/0016-7606(1956)67[597:EODSAS]2.0.CO;2)
- SECOFI. (2012). NMX-AA-159-SCFI-2012. Que establece el procedimiento para la determinación del caudal ecológico en cuencas hidrológicas. *Diario Oficial de La Federación*.
- Secretaría de Bienestar. (2022a). *Informe anual sobre la situación de pobreza y rezago social 2022. Atlixco*.
- Secretaría de Bienestar. (2022b). *Informe anual sobre la situación de pobreza y rezago social 2022. Izúcar de Matamoros*.
- SEDESOL. (2013a). *Unidad de Microrregiones. Cédula de Información Municipal (SCIM). Atlixco. Sistema de Apoyo Para La Planeación Del Programa Para El Desarrollo de Zonas Prioritarias*.
- SEDESOL. (2013b). *Unidad de Microrregiones. Cédula de Información Municipal (SCIM). Izúcar de Matamoros. Sistema de Apoyo Para La Planeación Del Programa Para El Desarrollo de Zonas Prioritarias*.
- SEGOB. (2018). ACUERDO por el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos. *Diario Oficial de La Federación*, 28.
- Sharif, N., Nobel, N. U., Sakib, N., Liza, S. M., Khan, S. T., Billah, B., Parvez, A. K., Haque, A., Talukder, A. A., & Dey, S. K. (2020). Molecular and Epidemiologic Analysis of Diarrheal Pathogens in Children With Acute Gastroenteritis in Bangladesh During 2014–2019. *The*

- Pediatric Infectious Disease Journal*, 39(7).
https://journals.lww.com/pidj/Fulltext/2020/07000/Molecular_and_Epidemiologic_Analysis_of_Diarrheal.9.aspx
- Shen, X., Anagnostou, E. N., Mei, Y., & Hong, Y. (2017). A global distributed basin morphometric dataset. *Scientific Data*, 4(1), 160124. <https://doi.org/10.1038/sdata.2016.124>
- Shi, S., Tao, X., Chen, X., Chen, H., Fitri, A., & Yang, X. (2021). Evaluation of urban water security based on DPSIR model. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 880(1), 012023. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/880/1/012023>
- Sims, N., & Kasprzyk-Hordern, B. (2020). Future perspectives of wastewater-based epidemiology: Monitoring infectious disease spread and resistance to the community level. *Environment International*, 139, 105689. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105689>
- Singer, A. C., Shaw, H., Rhodes, V., & Hart, A. (2016). Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. *Frontiers in Microbiology*, 7(NOV), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01728>
- Singer, A. C., Xu, Q., & Keller, V. D. J. (2019). Translating antibiotic prescribing into antibiotic resistance in the environment: A hazard characterisation case study. *Plos One*, 14(9), e0221568. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221568>
- Sköld, O. (2000). Sulfonamide resistance: Mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates*, 3(3), 155–160. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0146>
- Soler Castillo, S. (2011). Análisis crítico del discurso de documentos de política pública en educación. *Forma y Función*, 24(1), 75–105. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=21922416005>
- Strahler, A. N. (1952). Dynamic basis of geomorphology. *GSA Bulletin*, 63(9), 923–938. [https://doi.org/10.1130/0016-7606\(1952\)63\[923:DBOG\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1130/0016-7606(1952)63[923:DBOG]2.0.CO;2)
- Svobodová, K., Semerád, J., Petrácková, D., & Novotny, C. (2018). Antibiotic Resistance in Czech Urban Wastewater Treatment Plants: *Microbial Drug Resistance*, 24(6), 830–838. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0406>
- Swift, B. M. C., Bennett, M., Waller, K., Dodd, C., Murray, A., Gomes, R. L., Humphreys, B., Hobman, J. L., Jones, M. A., Whitlock, S. E., Mitchell, L. J., Lennon, R. J., & Arnold, K. E. (2019). Anthropogenic environmental drivers of antimicrobial resistance in wildlife. *Science of the Total Environment*, 649, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.180>
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Analytical Letters*, 34(5), 635–659. <https://doi.org/10.1081/AL-100103209>
- Thorner, K., Bashar, A., Ahmed, Md. S., Bell, A., Trew, J., Hasan, M., Hasan, N. A., Alam, Md. M., Chaput, D. L., Haque, M. M., & Tyler, C. R. (2022). Antimicrobial Resistance in Aquaculture Environments: Unravelling the Complexity and Connectivity of the

- Underlying Societal Drivers. *Environmental Science & Technology*, 56(21), 14891–14903. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c00799>
- Török, M. E., Cooke, F. J., & Moran, E. (2016). Basics of Antimicrobials. In M. E. Torok, E. Moran, & F. Cooke (Eds.), *Oxford Handbook of Infectious Diseases and Microbiology* (Second, pp. 3–30). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/med/9780199671328.003.0001>
- Urrea, E., Muñoz, A., & Peña, J. (2018). El análisis del discurso como perspectiva metodológica para investigadores de salud. *Enfermería Universitaria*, 10(2). [https://doi.org/10.1016/S1665-7063\(13\)72629-0](https://doi.org/10.1016/S1665-7063(13)72629-0)
- USEPA. (2009). EPA 816-F-09-004. National Primary Drinking Water Regulations. *Usepa*, 1, 7. <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations>
- van Belkum, A., Burnham, C. A. D., Rossen, J. W. A., Mallard, F., Rochas, O., & Dunne, W. M. (2020). Innovative and rapid antimicrobial susceptibility testing systems. *Nature Reviews Microbiology*, 18(5), 299–311. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0327-x>
- Van Dijk, T. A. (2015). Critical Discourse Analysis. In *The Handbook of Discourse Analysis* (pp. 466–485). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118584194.ch22>
- Vikesland, P. J., Pruden, A., Alvarez, P. J. J., Aga, D., Bu, H., Li, X., Manaia, C. M., Nambi, I., Wigginton, K., & Zhang, T. (2017). Toward a Comprehensive Strategy to Mitigate Dissemination of Environmental Sources of Antibiotic Resistance. *Environmental Science & Technology*, 51, 13061–13069. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03623>
- Vrioni, G., Tsiamis, C., Oikonomidis, G., Theodoridou, K., Kapsimali, V., & Tsakris, A. (2018). MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. *Annals of Translational Medicine*, 6(12), 240–240. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.06.28>
- Wang, K., Zhang, C., Chen, H., Yue, Y., Zhang, W., Zhang, M., Qi, X., & Fu, Z. (2019). Karst landscapes of China: patterns, ecosystem processes and services. *Landscape Ecology*, 34(12), 2743–2763. <https://doi.org/10.1007/s10980-019-00912-w>
- Wang, N., Yang, X., Jiao, S., Zhang, J., Ye, B., & Gao, S. (2014). Sulfonamide-Resistant Bacteria and Their Resistance Genes in Soils Fertilized with Manures from Jiangsu Province, Southeastern China. *PLoS ONE*, 9(11), e112626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112626>
- Wei, Y., Jiao, Y., An, D., Li, D., Li, W., & Wei, Q. (2019). Review of Dissolved Oxygen Detection Technology: From Laboratory Analysis to Online Intelligent Detection. *Sensors*, 19(18), 3995. <https://doi.org/10.3390/s19183995>
- Wernli, D., Jørgensen, P. S., Harbarth, S., Carroll, S. P., Laxminarayan, R., Levrat, N., Røttingen, J.-A., & Pittet, D. (2017). Antimicrobial resistance: The complex challenge of measurement to inform policy and the public. *PLOS Medicine*, 14(8), e1002378. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002378>
- WHO. (1996). *Guidelines for drinking-water quality*.

- WHO. (2001). *Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance* (p. 105). World Health Organization.
- WHO. (2015). Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. In *World Health Organisation*. www.wpro.who.int/entity/drug_resistance/resources/global_action_plan_eng.pdf
- Williams, L. J., & Abdi, H. (2010). Fisher's Least Significant Difference Test. In N. Salkind (Ed.), *Encyclopedia of Research Design*. SAGE Publications, Inc. <https://doi.org/10.4135/9781412961288>
- World Health Organization. (2019). *Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision*.
- Wu, J., Huang, Y., Rao, D., Zhang, Y., & Yang, K. (2018). Evidence for environmental dissemination of antibiotic resistance mediated by wild birds. *Frontiers in Microbiology*, 9(APR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00745>
- Wu, S., Dalsgaard, A., Hammerum, A. M., Porsbo, L. J., & Jensen, L. B. (2010). Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-47>
- Xu, F., Min, F., Wang, J., Luo, Y., Huang, S., Chen, M., Wu, R., & Zhang, Y. (2020). Development and evaluation of a Luminex xTAG assay for sulfonamide resistance genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates. *Molecular and Cellular Probes*, 49, 101476. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mcp.2019.101476>
- Xu, J., Murphy, S. L., Kochanek, K. D., Bastian, B., & Arias, E. (2018). Death: Final Report for 2016. *National Vital Statistics Report*, 67(2), 1–76.
- Yan, T., Shen, S.-L., & Zhou, A. (2022). Indices and models of surface water quality assessment: Review and perspectives. *Environmental Pollution*, 308, 119611. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119611>
- Yaroshenko, I., Kirsanov, D., Marjanovic, M., Lieberzeit, P. A., Korostynska, O., Mason, A., Frau, I., & Legin, A. (2020). Real-Time Water Quality Monitoring with Chemical Sensors. *Sensors*, 20(12), 3432. <https://doi.org/10.3390/s20123432>
- Yoo, S. M., & Lee, S. Y. (2016). Optical Biosensors for the Detection of Pathogenic Microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 34(1), 7–25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.09.012>
- Yu, Z., Gunn, L., Wall, P., & Fanning, S. (2017). Antimicrobial resistance and its association with tolerance to heavy metals in agriculture production. *Food Microbiology*, 64, 23–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.12.009>
- Zar, J. H. (2014). Spearman Rank Correlation: Overview. In *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat05964>
- Zare, F., Elsayah, S., Bagheri, A., Nabavi, E., & Jakeman, A. J. (2019). Improved integrated water resource modelling by combining DPSIR and system dynamics conceptual modelling

- techniques. *Journal of Environmental Management*, 246(April), 27–41. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.033>
- Zhang, F., Zhang, J., Wu, R., Ma, Q., & Yang, J. (2016). Ecosystem health assessment based on DPSIRM framework and health distance model in Nansi Lake, China. *Stochastic Environmental Research and Risk Assessment*, 30(4), 1235–1247. <https://doi.org/10.1007/s00477-015-1109-2>
- Zhang, K., Wang, T., Chen, J., Guo, J., Luo, H., Chen, W., Mo, Y., Wei, Z., & Huang, X. (2022). The reduction and fate of antibiotic resistance genes (ARGs) and mobile genetic elements (MGEs) in microbial fuel cell (MFC) during treatment of livestock wastewater. *Journal of Contaminant Hydrology*, 247, 103981. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2022.103981>
- Zhang, W.-J., Xu, X.-R., Schwarz, S., Wang, X.-M., Dai, L., Zheng, H.-J., & Liu, S. (2014). Characterization of the IncA/C plasmid pSCEC2 from *Escherichia coli* of swine origin that harbours the multiresistance gene cfr. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(2), 385–389. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt355>

ANEXO 1. ESTACIONES CLIMATOLÓGICAS ALEDAÑAS AL RÍO NEXAPA

I.D. de la estación	Nombre da la estación	Elevación (msnm)	Coordenadas (UTM WGS84)	
			X	Y
12023	Copalillo, Atenango del r	900	494707.56	1993874.08
12030	Chaucingo, Huitzuco	830	487669.03	2021536.78
12130	Atenango del rio	626	489419.89	2001252.12
12193	Papalutla, copalillo	658	510585.13	1992032.31
12212	Tuzantlan, Atengo del r.	744	482376.49	2012321.08
15007	Amecameca de Juarez,	2479	524538.38	2115596.96
15015	Amecameca de Juarez(smn)	2470	524540.85	2113752.82
15103	S. Pedro Nexapa,Amecameca	2650	528053.12	2110069.56
15106	San Rafael, Tlalmanalco	2530	526280.97	2122976.19
17008	Huautla, Tlalquilténango	971	496480.04	2038129.16
17015	Tepalcingo, Tepalcingo	1200	515825.02	2056575.93
17020	Tlacotepec, Zacualpan	1302	526351.61	2073184.56
17021	Tlacualera, Tlacualera	1560	505274.77	2058414.08
17028	jonacatepec, jonacatepec	1165	521089.21	2065801.27
17036	Lagunillas de Rayon, dge	1100	529911.70	2043684.48
17045	Huecauasco e-7, Ocuituco	2197	533345.74	2091636.65
17046	Hueyapan e-4, Tetela d v.	2230	533352.35	2087948.44
17048	Puente de Ocuituco e-5,	1960	526330.85	2087937.20
17057	El Limon, Tepalcingo	1650	507036.58	2047350.34
17060	Alpanocan, Tetela del v.	2200	512300.03	2069481.79
17063	Tecajec, Yecapixtla	955	519320.81	2076863.94
17064	Tecomalco, Villa de Ayala	955	501758.36	2060257.46
21012	Atlixco, Atlixco	1840	557917.26	2091696.89
21024	Chietla, Chietla	1222	545738.84	2047404.18
21034	Echeverria, Puebla	2170	575438.25	2099136.83
21045	Huehuetlan el grande,smn	1300	587849.80	2071527.01
21046	Huejotzingo, Huejotzingo	2291	563093.92	2117533.08
21048	Ixcamilpa, Ixcamilpa gro.	806	531753.28	1993899.10
21049	Izucar de Matamoros(dge)	1285	556261.19	2058496.94
21050	Jolalpan, Jolalpan (smn)	820	519373.37	2025230.72
21071	San Baltasar Tetela, dge	2062	587763.28	2089969.43
21116	Chiautla de Tapia, (smn)	1025	542277.37	2021579.14
21123	Huaquechula, Huaquechula	1640	549185.19	2075074.37
21132	Izucar de Matamoros(smn)	2175	556261.19	2058496.94
21164	S. Juan Tetla, c. agr.exp	3300	587754.59	2091813.67
21167	Calpan, San Sndres Calpan	2220	557848.04	2113827.38
21177	Tepexco, Tepexco (dge)	2243	529897.21	2052905.03
21189	Teotlalco, Teotlalco	2243	528155.33	2041837.79

21192	Huilango e-2, Tochimilco	1860	543893.34	2084282.02
21193	San Pedro b. Juarez e-1,	2200	547386.08	2091666.89
21195	Sta.c.Cuahutomatitla e-3	1930	547390.77	2089822.97
21197	Tochimilco, d-2, (dge)	1930	547404.83	2084290.39
21205	Santa Cruz Tejalpa	2278	568675.06	2029031.57
21214	San Juan Tetla 7 norte	3100	587754.59	2091813.67

ANEXO 2. SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE LOS GENES DE RESISTENCIA A SULFONAMIDAS Y LAS REGIONES UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS POR PCR

Gen *sul1*

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_048081.1?report=fasta

>NG_048081.1 Escherichia coli R46 *sul1* gene for sulfonamide-resistant dihydropteroate synthase *sul1*, complete CDS

```
AAAAGCTTGATGCGTGCGGGCTTTGTAGGTATGGGGCTCATAATTGCTGCCTTTTGTCTGCCCCGATCCCCATCGTGGAAGTC
GCTGCGGAGGCCGACGCCATGGTGACGGTGTTCCGCATTCTGAATCTCACCAGGACTCCTTCTTCGATGAGAGCCGGCGG
CTAGACCCCGCCGGCGCTGTCACCGCGGCATCGAAATGCTGCGAGTCGGATCAGACGTCGTGGATGTCGGACCGGCCG
CAGCCATCCGGACGCGAGGCCTGTATCGCCGGCCGATGAGATCAGACGTATTGCGCCGCTCTAGACGCCCTGTCCGATCA
GATGCACCGTGTTCAATCGACAGCTTCCAACCGGAAACCCAGCGCTATGCGCTCAAGCGCGCGTGGGCTACCTGAACG
ATATCCAAGGATTTCCTGACCCCTGCGCTCTATCCCGATATTGCTGAGGCGGACTGCAGGCTGGTGGTTATGCACTCAGCGCA
GCGGGATGGCATCGCCACCCGACCCGGTCACCTTCGACCCGAAGACGCGCTCGACGAGATTGTGCGGTTCTTCGAGGCGC
GGGTTTCCGCTTGCGACGGAGCGGGGTCGCTGCCGACCGGCTCATCTCGATCCGGGGATGGGATTTTTCTTGAGCCCCGC
ACCGGAAACATCGCTGCACGTGCTGTGAACCTTCAAAGCTGAAGTCGGCGTTGGGGCTCCGCTATTGGTCTCGGTGTC
GCGGAAATCCTTCTTGCGGCCACCGTTGGCCTTCTGTAAAGGATCTGGGTCCAGCGAGCCTTGCGGCGGAACCTCACGC
GATCGGCAATGGCGTGACTACGTCCGCACCCACGCGCTGGAGATCTGCGAAGCGCAATCACCATCTCGGAAACCTCG
CGAAATTCGAGTCGCGACGCCAGAGACCGAGGGTAGATCATGCCTAGCATTCACCTCCGGCCGCCCGCTAGCGGACC
CTGGTCAGGTTCCGCGAAGGTGGGCGCAGACATGCTGGGCTCGTCAGGATCAAATGCACTATGAGGCG
```

Cebador sentido: **GCCGATGAGATCAGACGTATTG**

Cebador antisentido: CTCGAAGAACCGCACAAATCT (**AGATTGTGCGGTTCTTCGAG**)

Amplicon: 288 pb con cebadores

Gen *sul2*

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_048106.1?report=fasta

>NG_048106.1 Pasteurella multocida Pm1096 pIG1 *sul2* gene for sulfonamide-resistant dihydropteroate synthase *sul2*, complete CDS

```
TAATGGATCACCGCAAAACAGGTTACTCGCCTGGGGATTCCCTTTGACCCGAGCATCCGTATGAGACTCATGCTCGATTATT
ATTATTATAGAAGCCCCCATGAATAAATCGCTCATCATTTCGGCATCGTCAACATAACCTCGGACAGTTTCTCCGATGGAG
GCCGGTATCTGGCGCCAGACGCAGCCATTGCGCAGGCGCGTAAGCTGATGGCCGAGGGGCGAGATGTGATCGACCTCGGT
CCGGCATCCAGCAATCCCGACGCCGCGCCTGTTTCGTCCGACACAGAAATCGCGCGTATCGCGCCGGTGCTGGACGCGCTC
AAGGCAGATGGCATTCCCGTCTCGCTCGACAGTTATCAACCCGCGACGCAAGCCTATGCCTTGTCGCGTGGTGTGGCCTAT
CTCAATGATATTTCGCGGTTTCCAGACACTGCGTTCTATCCGCAATTGGCGAAATCATCTGCCAAACTCGTCGTTATGCATTC
GGTGCAAGACGGGAGGCAGATCGGCGCGAGGCACCCGCTGGCGACATCATGGATCACATTGCGGCGTTCTTTGACGCGC
GCATCGCGCGCTGACGGGTGCCGATCAAAACGCAACCGCCTTGTCCTTGATCCCGGCATGGGGTTTTTCTGGGGGCTGC
TCCGAAACCTCGCTCTCGGTGCTGGCGCGGTTGATGAATTGCGGTGCGCTTCGATTGCGCGTGCTTCTGTCTGTTTCGC
GCAAATCCTTTCTGCGCGCGCTCACAGGCCGTGGTCCGGGGGATGTGCGGGCCGCGACACTCGCTGCAGAGCTTGCCGCCG
CCGCAGGTGGAGCTGACTTCATCCGCACACAGAGCCGCGCCCTTGCGCGACGGGCTGGCGGTATTGGCGGCGCTGAAA
GAAACCGCAAGAATTCGTTAACTGCACATTCGGGATATTCTCTATATTCGCGGTTTCAGCAGGCATGGGTAGTCAGATTGTT
TTAACGCACAGCAACAAGGATGTGCAGGCGCTTAATGAG
```

Cebador sentido: **TCGGCATCGTCAACATAACC**

Cebador antisentido: CTGCTGAACCGCGAATATAGAG (**CTCTATATTCGCGGTTTCAGCAG**)

Amplicon: 835 pb con cebadores

Gen *sul3*

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_048120.1?report=fasta

>NG_048120.1 Escherichia coli pVP440 *sul3* gene for sulfonamide-resistant dihydropteroate synthase *sul3*, complete CDS

```
AAAAAATTAGGCTGCAAAGATAGGGAAAATGTGTCAATTTGCGTAAGTGATAATTAGTCAATTAAGATAAAATGCTACTTTT
GTAATCAAAGCAAAATGATATGAGCAAGATTTTTGGAATCGTAAATATAACCACCGATAGTTTTCCGATGGAGGACTTTA
TTTAGATACAGATAAGGCAATTGAGCATGCTCTGCATTTGGTTGAAGATGGAGCAGATGTGATTGATTGGGAGCCGCTTCC
AGTAATCCTGATACAACTGAAGTGGGCGTTGTGGAAGAAATCAAAAGACTCAAACCTGTCATTAAGGCTTTAAAGAAAA
AGGCATTTCTATTTCTGTGATACATTTAAACCTGAGGTTTCAGAGTTTTGTCATAGAACAAGGTTGATTTATTAATGATA
TTCAAGGTTTTCCTTATCCTGAGATTTATTCAGGCTTGGCAAAGTCAGATTGCAAACTTGTGTTGATGCACTCCGTTTCAGCGA
ATTGGTGCAGCTACTAAAGTTGAAACGAATCCGGAAGAGGTTTTACTTCCATGATGGAATTTTTAAAGAAAGAATTGCT
GCTTTAGTTGAGGCTGGTGTAAAGCGTGAACGAATTATTCTTGATCCGGGTATGGGCTTCTTTTAGGCTCTAATCCAGAAA
CATCTATTCTTGTGTTGAAGCGTTTCCCTGAAATCAAGAAGCTTTAATTGCAAGTAATGATTGCAGTGTACGGAAATCA
TTCTTAGGTAAATAAATGGAACCGATGTGAAATCTCGTTTAGCACCAACTCTTGCAGCAGAAATGTATGCATACAAAAAA
GGTGCAGATTATCTCCGCACCCATGATGTTAAGTCTTTATCAGATGCCTTGAAAATATCCAAAGCCTAGGTTAGTTTTATT
TTTAGCTTTCTAAATGAATATGCTATACTTGTCTGAAGTTGTGTTGGCGTACTTGACTTAGGTCTGGATCTTCGAACCTGT
ACTAAGAG
```

Cebador sentido: **CGCTTCCAGTAATCCTGATACA**

Cebador antisentido: CTGCAAGAGTTGGTGCTAAAC (**GTTTAGCACCAACTCTTGCAG**)

Amplicon: 557 pb con cebadores

Gen *sul4*

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_056174.1?report=fasta

>NG_056174.1 uncultured bacterium *sul4* gene for sulfonamide-resistant dihydropteroate synthase *sul4*, complete CDS

```
CACCCCTAACCCCTCCCCCTAAAAATGGGGAGGGAACATCTCCCTCTCCCGTGGGAGAGGGCTGGGGAGAGGGTGA
AAAAAATTTTCAAGGAAGTCTATTGATGTCAACCACACTAACCAGCTTCAAATGGGGTGAACGCACCTACATCATGGGC
ATCCTCAACGTCACTCCAGACAGCTTTTCTGGAGATGGCGTTATGGTTGAAGAAGATGTCATCGCCAAAGCGGTAGCCAG
GCCAAACAATTTGTAGCCGACGGCGCAGACATCATCGACATTGGCGGCGAGAGTACCCGCCCTGGCAGCTCACCTATAAG
CGCAGAGGAAGAAGTGGCGCGGGTGCTGCCGGTGGTGAGGCCGTACGCCAGGCTGTGGACGTCGTTATTTCCATCGACA
GCTACCGCGCTTCCGTGGCCGAAGCGGCCCTGGCGGCAGGCGCCAGCTGGCTCAACGACGCTGCGGGGCTGCGCATGGAC
CCGGACATGGCCGGCTGGCAGCACAAGCCGGCTGCCCATCGTCTTATGCACAACCGCAGCAAACCAAAGAACATAGC
GCAAGAAAAAAGCTGGGCGGGCGCTTCATCGGGTAAAAATACGACGACCTCATCACCGACGTTAAACGTGAATTACAA
GAAAGCATCGACATCGCTTAAAGCCGGCGTAAAGAGTCCCAAATTATCCTGGATCCCGGCATCGGCTTCGGTAAAC
CGTCGAGCAAAGTTGCAACTGCTCGACCAGATTAATCAGTTCAAAACAATGGGATTTCCTATCTTAATAGGTCGCTCGCG
CAAATCATTTATTGGCTATACGCTCGATTGCGCGCAGACCAGCGCATAGAAGGAACGGCGGCCACCGTCGCCATTGGCAT
TGACCGAGGAGCCGACGTTGTGCGCGTCCATGACGTCAAAGCAATCGTTCGGGTGCGCCGTATGACAGATGCAATCGTGA
GACGTTAAAGGATTCAGTGCTATCAGTCACTAGTGAAATGCGTAAACGTAATGCGTAAGGTTTATTACGCATTACGCATT
ACGAATCAAACCACAAACACACTGAA
```

Cebador sentido: **CCACACTAACCAGCTTCAAATG**

Cebador antisentido: AGTTCTTCCTCTGCGCTTATAG (**CTATAAGCGCAGAGGAAGAAGT**)

Amplicon: 223 pb con cebadores

ANEXO 3. Materiales, soluciones e instrumentos utilizados para la fabricación del biosensor.

A continuación, se detallan los reactivos, materiales, equipos e instrumentos utilizados para la detección de los genes de resistencia a sulfonamidas (*sul1* y *sul4*).

Reactivos y soluciones utilizados

Solución Tris-EDTA. Se pesaron 158 mg de Tris-HCl y 29.2 mg de EDTA y se disolvieron en 100 mL de agua *milli-Q* ultra pura y ajustar el pH a 7.4; posteriormente se filtró con una membrana de nylon de tamaño de poro de 0.44 μm . Esta solución debe conservarse a temperatura ambiente y protegida de la luz.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2. Se disuelven 4 g de NaCl, 0.1 g de KCl, 1.425 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ y 0.1 g de 0.1 g KH_2PO_4 en 500 mL de agua *milli Q* y se ajusta el pH a 7.2 utilizando solución diluida de NaOH o HCl según corresponda.

Solución PBS + Tween al 0.01%. Se disuelven 2 μL de Tween en 20 μL de la solución previamente preparada de PBS.

Solución de dietanolamina (DEA) pH 9.6. Se adicionan 5.257 g de DEA, 3.727 g de KCl y 0.5 mL de MgCl_2 1 M en 500 mL de agua *milli-Q* y se ajusta el pH a 9.6 utilizando solución diluida de NaOH o HCl según corresponda.

Solución DEA + Tween 0.01%. Se disuelven 2 μL de Tween en 20 μL de la solución previamente preparada de DEA.

Solución de unión-lavado concentrada (B&W-2X). A 50 mL de agua *milli-Q* se adicionan 78.8 mg de Tris-HCl, 14.6 mg de EDTA y 5.844 g de NaCl; se disuelven todos los reactivos y se ajusta a pH 7.5.

Solución B&W-1X. Se disuelve en un 50% la solución B&W-2X en agua *milli-Q*.

Solución B&W-1X + Tween 0.01%. Se disuelven 2 μL de Tween en 20 μL de la solución previamente preparada de B&W-1.

Solución de Biotina. Se disuelve los 2.4 mg de Biotina en 9.82 mL de la solución B&W-1X.

Solución de enzima streptavidina fosfatasa alcalina (E). El lote relativo a la enzima utilizada (Streptavidin-Alkaline Phosphatase from *Streptomyces avidinii*) señala que contiene 0.287 mg del liofilizado enzimático y que la actividad enzimática (DEA, Denitrification Enzyme Assay) corresponde a 1407 U/mg, por lo que el producto contine 403.8 U en total. El liofilizado fue resuspendido en 1 mL de DEA pH 9.6 previamente preparado por lo que la solución madre de enzima contiene 404 U/mL. La concentración final de la E debe ser de 1.5 U/mL por lo que se hacen alícuotas de 3.7 μL para posteriormente adicionar, durante el protocolo de detección, 992 μL de DEA previamente preparada.

Solución sustrato enzimático (S) 1-naftil fosfato. Pesar 3 mg de 1-Naphthyl phosphate disodium salt y adicionar 1 mL de la solución DEA previamente preparada. Posteriormente, tomar 200 μL de esta solución y adicionar 800 μL de la solución de DEA, esta será la solución de trabajo S cuya concentración final es $0.5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$.

Partículas magnéticas (Beads). De acuerdo con el fabricante, cada mg de Beads (Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1) tiene la capacidad de unir 500 pmoles de DNA de cadena sencilla marcados con biotina. La concentración de la solución de Beads es $10 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$.

Materiales moleculares

Para cada uno de los genes a detectar de sulfonamidas se utilizaron 3 secuencias de ADN de cadena sencilla diferente, los cuales consisten en una sonda de captura (**CP**), sonda señal (**SP**) y la secuencia diana (**T**). A continuación, se detalla la preparación de las soluciones madre y las soluciones de trabajo para cada uno de los genes de resistencia a sulfonamidas.

Preparación de CP, SP y T para el gen sul1.

Secuencia nucleotídica del gen de resistencia *sul1*.

```
AAAAGCTTGATGCGTGGGGCTTTGTAGGTATGGGGCTCATAATTGCTGCCTTTTGTCTCGCCCGATCCCCATCGTGGAAGTCGCTGCGGAGGGC  
GACGCCATGGTGACGGTGTTCCGGCATTTCTGAATCTCACCGAGGACTCCTTCTTCGATGAGAGCCGGCGGCTAGACCCCGCCGGCGCTGTCACC  
GCGGCGATCGAAATGCTGCGAGTCGGATCAGACGTCGTGGATGTCGGACCGGCCCGCAGCCATCCGGACGCGAGGCCGTGTATCGCCCGCCG  
ATGAGATCAGACGTAATTCGCGCTCTTAGACGCGCTGTCCGATCAGATGCACCGTGTTCATCGACAGCTTCCAACCGGAAACCCAGCGCT  
ATGCGCTCAAGCGCGGCGTGGGCTACCTGAACGATATCCAAGATTTCCTGACCTGCGCTCTATCCCGATATTGCTGAGGCGGACTGCAGGC  
TGGTGGTTATGCACTCAGCGCAGCGGGATGGCATCGCCACCCGACCGGTACCTTCGACCCGAAGACGCGCTCGACGAGATTGTGCGGTTTC  
TTCGAGGCGCGGTTTCGCTTTCGCGAGCGGAGCGGGTTCGTCGCCACCGGCTCATCTCGATCCGGGATGGGATTTTCTTGAGCCCCGCA  
CCGAAACATCGCTGCACGTGCTGTGCAACCTTCAAAAGCTGAAGTCGCGCTTGGGGCTTCGCTATTGGTCTCGGTGTCGCGGAAATCCTTC  
TTGGGCGCCACCGTTGGCTTCCTGTAAGGATCTGGGTCCAGCGAGCCTTGGCGCGGAACTTACGCGATCGGCAATGGCGCTGACTACGTC  
CGACCCACGCGCTGAGATCTGCGAAGCGCAATCACCATCTCGGAAACCTCGGAAATTTCGCAGTCGCGACGCCAGAGACCGAGGGTT  
AGATCATGCCTAGCATTCACCTTCGCGCCGCCGCTAGCGGACCTGGTCAGGTTCCGCGAAGGTGGGCGCAGACATGCTGGGCTCGTCAGG  
ATCAAACCTGCACTATGAGGCG
```

La secuencia marcada en azul representa la secuencia nucleotídica utilizada como **CP**, que es la sección que captura inicialmente a la secuencia diana presente en las muestras reales; la secuencia marcada en amarillo corresponde a **SP** que es la sección que se unirá a la secuencia diana para medir la presencia del gen en muestras reales. El **T** corresponde a la secuencia complementaria de **CP** y **SP**.

A la secuencia liofilizada de **CP** se adicionaron 239 μL de **Tris-EDTA** para tener una concentración final de 100 μM , esta es la solución madre. De la solución madre se preparó una subalícuota 50 μM (10 μL de **CP** solución madre + 10 μL de **PBS**), de esta subalícuota se tomaron 4 μL y se colocaron en un vial eppendorf de 1.5 mL para utilizarlo como solución de trabajo en el protocolo normal, la concentración final de **CP** en la solución de trabajo es de 1 μM .

Para el **SP**, a la secuencia liofilizada se adicionaron 247 μL de **Tris-EDTA** para tener una concentración final de 100 μM , esta es la solución madre. De la solución madre se preparó una subalícuota 50 μM (45 μL de **SP** solución madre + 45 μL de **PBS**), de esta subalícuota se tomaron 4 μL y se colocaron en un vial eppendorf de 1.5 mL para utilizarlo como solución de trabajo en el protocolo normal, la concentración final de **SP** en la solución de trabajo es de 383 nM.

Finalmente, a la secuencia liofilizada del **T** se adicionaron 303 μL de **Tris-EDTA** para tener una concentración final de 100 μM , esta es la solución madre. De la solución madre se preparó una subalícuota 1 μM (5 μL de **T** solución madre + 495 μL de **PBS**), de esta subalícuota se tomaron 20 μL y se colocaron en un vial eppendorf de 1.5 mL para utilizarlo como solución de trabajo en el protocolo normal, la concentración final de **T** en la solución de trabajo es de 40 nM.

Preparación de CP, SP y T para el gen sul4.

Secuencia nucleotídica del gen de resistencia *sul4*

```
CACCTAACCTCCCTTAAATGGGGAGGGAACATCTCCCTCTCCGGTGGGAGAGGGTGGGAGAGGGTGAAAAAATTTTCAAGGAA  
CTGCTATTGATGTCAAACACACTAACCGCTTCAAAATGGGTGAACGCACCTACATCATGGGCATCTCAACGTCACTCCAGACAGCTTTTCT  
GGAGATGGCGTTATGGTTGAAGAAGATGTCATCGCCAAAGCGGTAGCCAGGCCAAACAATTTGTAGCCGACGGCGCAGACATCATCGACA  
TTGGCGGCGAGAGTACCCGCCCTGGCAGCTACCTATAAGCGCAGAGGAAGAAGTGGCGCGGGTGTGCGCGTGGTGCAGGCCGTACGCCA  
GGCTGTGGACGTCGTTATTTCCATCGACAGCTACCGCGCTTCCTGGCCGAAGCGGCCCTGGCGGCAGGCGCCAGCTGGCTCAACGACGCTCTG  
GGGCTGCGCATGGACCGGACATGGCCGGCTGGCAGCACAAGCGGCTGCCCATCGTCTTATGCACAACCGCAGCAAAACCAAGAAC  
ATAGCGCAAGAAAAAAGCTGGGCGGGCGCTTCATCGGGTAAAATACGACGACCTCATCACCGACGTTAAACGTGAATTACAAGAAAGCA  
TCGACATCGCTTAAAGCCGGCGTAAAGAGTCCCAAATTATCCTGGATCCCGCATCGCTTCGGTAAAACCGTCGAGCAAAAGTTTGCAA  
CTGCTCGACCAGATTAATCAGTTCAAAACAATGGGATTTCCCATCTTAATAGGTCCGTGCGCAAAATCATTTATTGGCTATACGCTCGATTGCG
```

CGCCAGACCAGCGCATAGAAGGAACGGCGGCCACCGTCGCCATTGGCATTGACCGAGGAGCCGACGTTGTGCGCGTCCATGACGTCAAAGC
AATCGTTCGGGTCGCCCCGTATGACAGATGCAATCGTGAGACGTTAAAGGATTTCAGTGCTATCAGTCACTAGTGAAATGCGTAAAACGTAATG
CGTAAGGTTTATTACGCATTACGCATTACGAATCAAACCACAAACACACTGAA

La secuencia marcada en azul representa la secuencia nucleotídica utilizada como **CP**, que es la sección que captura inicialmente a la secuencia diana presente en las muestras reales; la secuencia marcada en amarillo corresponde a **SP** que es la sección que se unirá a la secuencia diana para medir la presencia del gen en muestras reales. El **T** corresponde a la secuencia complementaria de **CP** y **SP**.

A la secuencia liofilizada de **CP** se adicionaron 116 μL de **Tris-EDTA** para tener una concentración final de 100 μM , esta es la solución madre. De la solución madre se preparó una subalícuota 50 μM (10 μL de **CP** solución madre + 10 μL de **PBS**), de esta subalícuota se tomaron 4 μL y se colocaron en un vial eppendorf de 1.5 mL para utilizarlo como solución de trabajo en el protocolo normal, la concentración final de **CP** en la solución de trabajo es de 1 μM .

Para el **SP**, a la secuencia liofilizada se adicionaron 214 μL de **Tris-EDTA** para tener una concentración final de 100 μM , esta es la solución madre. De la solución madre se preparó una subalícuota 50 μM (45 μL de **SP** solución madre + 45 μL de **PBS**), de esta subalícuota se tomaron 4 μL y se colocaron en un vial eppendorf de 1.5 mL para utilizarlo como solución de trabajo en el protocolo normal, la concentración final de **SP** en la solución de trabajo es de 383 nM.

Finalmente, a la secuencia liofilizada del **T** se adicionaron 308 μL de **Tris-EDTA** para tener una concentración final de 100 μM , esta es la solución madre. De la solución madre se preparó una subalícuota 1 μM (5 μL de **T** solución madre + 495 μL de **PBS**), de esta subalícuota se tomaron 20 μL y se colocaron en un vial eppendorf de 1.5 mL para utilizarlo como solución de trabajo en el protocolo normal, la concentración final de **T** en la solución de trabajo es de 40 nM.

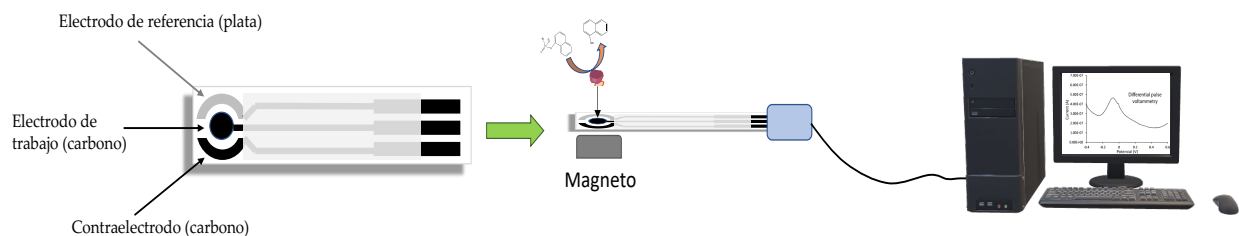


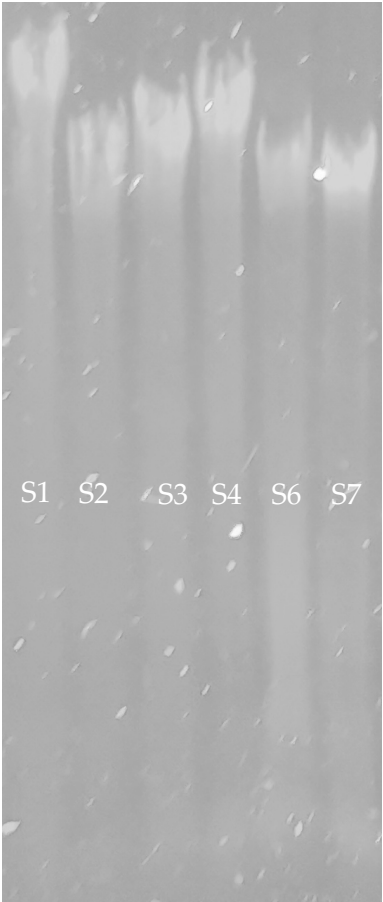
Figura ANEXO3-1. Electrodo utilizado para la detección electroquímica de la presencia de los genes de resistencia a sulfonamidas (elaboración propia, 2023)

ANEXO 4. Resultado de la medición de la caracterización del agua.

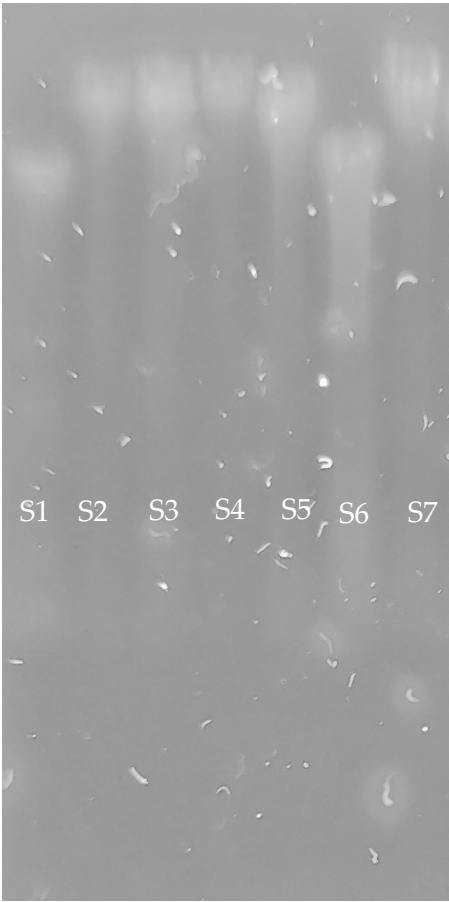
Fecha de muestreo:			22-ene-22																
Muestra	pH	Temperatura (°C)	Conductividad (uS/cm)	SDT (mg/L)	Oxígeno Disuelto (mg/L)	DQO (mg/L)	DBO (mg/L)	Cloro libre (mg/L)	Nitratos (mg/L)	Fósforo (mg/L)	Sulfatos (mg/L)	Magnesio (mg/L)	Hierro (ug/L)	Níquel (mg/L)	Calcio (mg/L)	Gen Sul1	Gen Sul2	Gen Sul3	Gen Sul4
S1	7.86	15.3	485	-	5.9	420	134	0.035	58	2.45	35	20	143	0.0085	-	2	0	0	0
S2	7.39	16.4	794	-	2	515	468.5	0.005	1068	3.10	70	30	512	0.034	-	3	0	4	0
S3	7.82	17.1	1306	-	3.2	410	369	0.12	236	2.55	200	52.5	71	0.014	-	3	0	0	0
S4	7.95	17.2	1332	-	6.8	315	250.5	0.04	288	2.26	200	50	116.5	0.03	-	3	0	0	0
S5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S6	7.69	25.3	2240	-	1.9	945	340	0.052	741	8.48	350	107.5	323	0.1305	-	2	2	4	0
S7	7.77	22.8	1467	-	2.1	520	186.5	0.02	242	3.42	300	65	100	0.027	-	3	0	4	0
Fecha de muestreo:			05-may-22																
Muestra	pH	Temperatura (°C)	Conductividad (uS/cm)	SDT (mg/L)	Oxígeno Disuelto (mg/L)	DQO (mg/L)	DBO (mg/L)	Cloro libre (mg/L)	Nitratos (mg/L)	Fósforo (mg/L)	Sulfatos (mg/L)	Magnesio (mg/L)	Hierro (ug/L)	Níquel (mg/L)	Calcio (mg/L)	Gen Sul1	Gen Sul2	Gen Sul3	Gen Sul4
S1	7.81	17.7	495	350	7.4	120	102	0	14.25	32.28	21.5	17.5	153	0.0645	-	3	0	0	0
S2	7.63	22.1	1424	813	0.8	315	197.5	0	29	44.03	61	60	149.5	0.1705	-	4	4	2	0
S3	7.93	22.8	1327	807	4.2	360	98	0	33	49.07	146	40	47	0.086	-	4	0	1	0
S4	7.97	23.8	1190	717	5.3	285	209.5	0	34.75	114.55	139	40	86	0.0455	-	4	0	0	0
S5	7.86	26.6	1206	759	4.2	405	139	0	46.75	2.99	173	40	141.5	0.1225	-	2	0	1	0
S6	7.93	30.7	2170	1264	1.6	635	359.5	0	218.25	19.78	195.5	92.5	181.5	0.3205	-	4	4	3	0
S7	7.78	28.8	1268	806	0.3	255	119	0	67.5	4.66	135.5	40	115	0.115	-	4	3	2	0
Fecha de muestreo:			10-ago-22																
Muestra	pH	Temperatura (°C)	Conductividad (uS/cm)	SDT (mg/L)	Oxígeno Disuelto (mg/L)	DQO (mg/L)	DBO (mg/L)	Cloro libre (mg/L)	Nitratos (mg/L)	Fósforo (mg/L)	Sulfatos (mg/L)	Magnesio (mg/L)	Hierro ug/L	Níquel (mg/L)	Calcio (mg/L)	Gen Sul1	Gen Sul2	Gen Sul3	Gen Sul4
S1	7.7	17.3	478	430	2.8	122.5	90	0.04	3.4	12.75	58.275	17.5	341	0	80	3	0	4	0
S2	7.5	20	1172	880	1	128	150	0.42	5	3.75	148.5	35	605	0.2875	165	2	3	3	0
S3	7.84	20.6	1147	850	4.9	156	30	0.3	4.6	3.75	124.875	42.5	58.5	0.0705	125	3	1	4	0
S4	7.79	21.2	1075	805	7.3	139.5	60	0	9.3	27.5	133.2	40	309	0.003	120	3	3	4	0
S5	8.67	22.9	1128	790	4.7	131.5	60	0.06	10.8	2.75	149.85	37.5	10	0.0365	125	4	2	4	0
S6	6.1	27	2290	1494	2.2	737.5	285	0.78	17.1	10	175	95	186	1.47	280	4	4	4	0
S7	7	23.9	1205	856	0.8	369.5	240	0.08	9.3	9	116.5	47.5	48	0.1235	145	3	3	4	0

ANEXO 5. Resultados de electroforesis para la extracción de ADN total

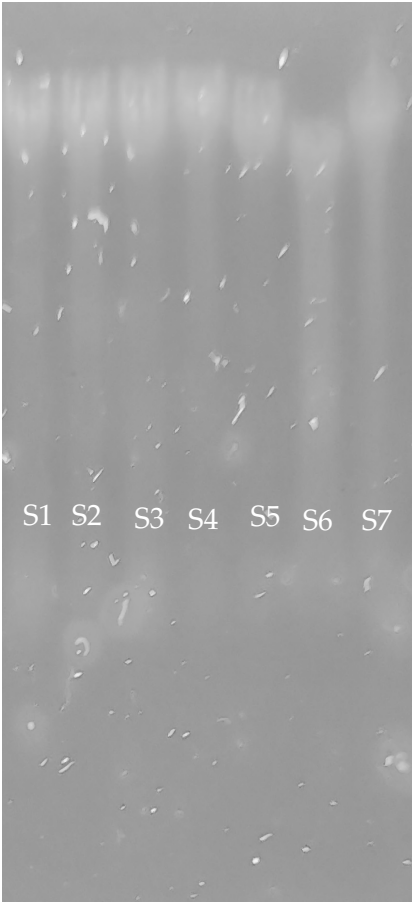
Primer muestreo



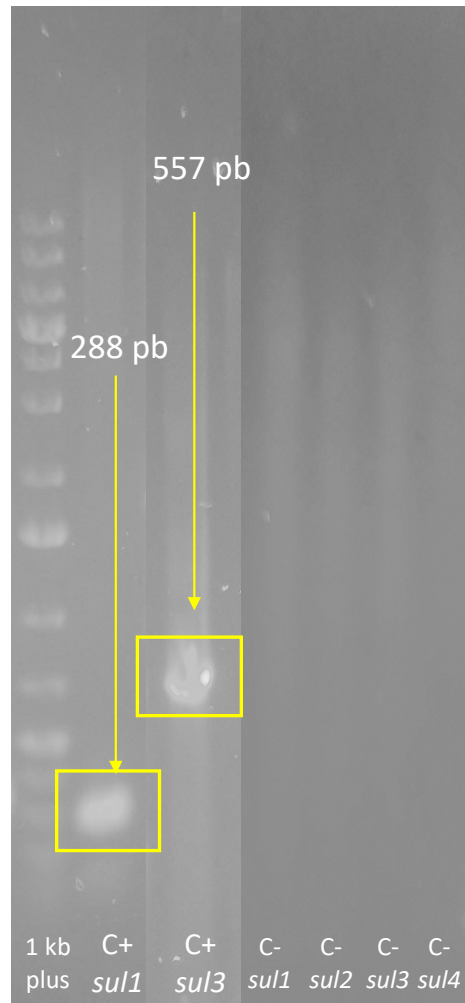
Segundo muestreo



Tercer muestreo



ANEXO 6. Controles para PCR para los genes de resistencia a sulfonamidas



ANEXO 7. Producción científica y actividades académicas de difusión

6.1. Artículo en revista JCR

Reynoso, E. C., Laschi, S., Palchetti, I., & Torres, E. (2021). Advances in antimicrobial resistance monitoring using sensors and biosensors: A review. *Chemosensors*, 9(8), 232.

Review

Advances in Antimicrobial Resistance Monitoring Using Sensors and Biosensors: A Review

Eduardo C. Reynoso ¹, Serena Laschi ², Ilaria Palchetti ^{3,*} and Eduardo Torres ^{1,4}

¹ Ciencias Ambientales, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, Mexico; eduardoc.reynoso@gmail.com (E.C.R.); eduardo.torres@correo.buap.mx (E.T.)

² Nanobiosens Join Lab, Università degli Studi di Firenze, Viale Pieraccini 6, 50139 Firenze, Italy; serena.laschi@gmail.com

³ Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Firenze, Via della Lastruccia 3, 50019 Sesto Fiorentino, Italy

⁴ Centro de Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, Mexico

* Correspondence: ilaria.palchetti@unifi.it

Citation: Reynoso, E.C.; Laschi, S.; Palchetti, I.; Torres, E. Advances in Antimicrobial Resistance Monitoring Using Sensors and Biosensors: A Review. *Chemosensors* **2021**, *9*, 232. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9080232>

Academic Editor: Philip Gardiner

Received: 5 July 2021

Accepted: 16 August 2021

Published: 19 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The indiscriminate use and mismanagement of antibiotics over the last eight decades have led to one of the main challenges humanity will have to face in the next twenty years in terms of public health and economy, i.e., antimicrobial resistance. One of the key approaches to tackling antimicrobial resistance is clinical, livestock, and environmental surveillance applying methods capable of effectively identifying antimicrobial non-susceptibility as well as genes that promote resistance. Current clinical laboratory practices involve conventional culture-based antibiotic susceptibility testing (AST) methods, taking over 24 h to find out which medication should be prescribed to treat the infection. Although there are techniques that provide rapid resistance detection, it is necessary to have new tools that are easy to operate, are robust, sensitive, specific, and inexpensive. Chemical sensors and biosensors are devices that could have the necessary characteristics for the rapid diagnosis of resistant microorganisms and could provide crucial information on the choice of antibiotic (or other antimicrobial medicines) to be administered. This review provides an overview on novel biosensing strategies for the phenotypic and genotypic determination of antimicrobial resistance and a perspective on the use of these tools in modern health-care and environmental surveillance.

Keywords: antimicrobial resistance; sensor; biosensor; antibiotic susceptibility test; phenotypic technique; genotypic technique

1. Antimicrobial Resistance

In recent years, antimicrobial resistance (AMR) has received a great deal of attention because of the impact resistant microorganisms have on public health. Consequently, it has been declared as a global public health concern [1–7]. According to the World Health Organization (WHO), antimicrobial resistance occurs when bacteria adapt and grow in the presence of an antimicrobial (AM) agent [8]. It can also be described as a phenomenon when microorganisms (bacteria, viruses, fungi, and parasites) are no longer affected by an AM to which it was previously sensitive, as a result of mutation of the microorganism to evade the effect of the antimicrobial or of the acquisition of the resistance gene [9,10]. It is estimated that by 2050, human deaths related to AMR will amount to 10 million, resulting in an economic cost of about 100 billion dollars [11]. Although, there is compelling economic justification for the development of new generations of antibiotics by 2030 [12], the acquisition rate of biological resistance to new drugs is now a major consideration in preventing their introduction [7,13,14].

The WHO has established a list of antimicrobials (limited to antibiotics) that are important in human medicine and in veterinary practice. The top priority antimicrobials are cephalosporins (3rd, 4th, and 5th generation), glycopeptides, macrolides and ketolides, polymyxins and quinolones [4,15]. In 2017, the WHO published a list of priority pathogens resistant to antibiotics; on this list, 12 families of bacteria are selected for the research and development of new antibiotics due to the growing need for innovative treatments against multi-resistant bacteria in hospital environments (Figure 1) [16,17].

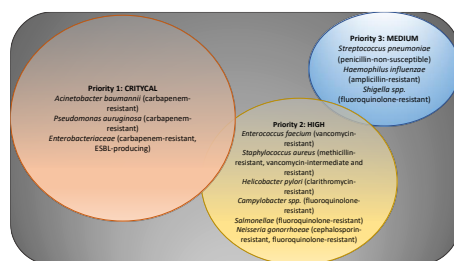


Figure 1. List of priority pathogens for research and development of new antibiotics.

One of the leading causes contributing to the global increase in AMR is the empirical use of broad-spectrum AMs in clinical and veterinary practices [18]. For the early detection of microorganisms, for the prevention of diseases and spread of AMR, it is essential to have well-equipped laboratories specialized in the diagnosis of infections [19]. It is difficult to meet this requirement in developing countries because of the lack of funds, shortage of trained personnel, and lack of the required infrastructures. According to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines, reliable antimicrobial resistance tests require phenotypic evaluation, i.e., experimental procedures to monitor the microbial growth in presence of AM. The routine procedure to determine if a pathogen is resistant is through isolation, including enrichment culture (i.e., urine culture) and plate cultivation, identification and finally antimicrobial susceptibility testing (AST) using different AM loads. The results can be expressed as the lowest concentration of the antibiotic that prevents visible growth, i.e., the minimal inhibitory concentration (MIC) [20]. ASTs based on culturing methods require from 24 to 72 h. This time lapse can be crucial for the patient [21,22]. Another disadvantage of culturing-based techniques is that trained personnel is required [23]. The disk diffusion test, introduced in the 1960s by Bauer and Kirby to determine the susceptibility to antibiotics in *Staphylococcus* strains, is still one of the most frequently used phenotypic method for AST [24,25]. Broth microdilution assays is another commonly used technique [26,27], based on visually identifiable growth. Automated commercially available AST instruments have helped in reducing the analysis times to less than a day [28]. Examples of automated instruments include the Vitek systems (BioMérieux), the BD Phoenix instruments, the Alfred 60AST system (Alifax), and the MicroScan WalkAway system (Beckman Coulter) [18,25,29–31].

Other candidates for AST are flow cytometry (FC) and isothermal microcalorimetry (IMC). FC is an optical technique used for cell counting and the detection of biomarkers

[32]. Since the mechanism of action of antibiotics induces modifications in some morpho-functional and physiological characteristics of the cell, it is possible to determine the degree of susceptibility with FC [33,34]. The evaluation of AMR by IMC [35] consists of measuring the change in the rate of heat production in the cultural environment in the presence of an AM [36]. One of the advantages of this technique is its non-destructive nature. However, the results can take several hours or even days [37]. Another limitation of IMC is that non-replicating cells in the biofilm or the total biomass are not directly quantified [38].

Recently, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), has been proposed for the identification of pathogens due to its precision. Pathogen identification (ID) is a recommended step of AST. However, one of the disadvantages is that not all hospitals or microbiological laboratories can have this type of instrument. In addition to the fact that cultured clinical samples are always required, which are usually available after 24 h [39,40].

The acquisition of resistance gene can be identified by means of nucleic acid-based methods (genotypic methods) such as the polymerase chain reaction (PCR)-based procedures [41] and other nucleic acid amplification technologies. However, genotypic methods can only find resistances that are searched for, since only selected genes are evaluated. Moreover, DNA extraction is critical so that complex matrices can lead to severe interpretation problems; this means that the potentially found resistance genes are not necessarily from the actual pathogenic organism. PCR-based method can become unspecific if the primers are not well designed or aligned with other regions of the DNA, causing false positives [20,42–44]. Whole genome sequencing (WGS) of the pathogen by using next-generation sequencing (NGS), can provide a complete picture of the pathogen's resistome, such as predicting known resistance phenotypes, but like PCR, this methodology does not express the putative functionality of these genes present in the microorganism. This can be solved with functional metagenomics, but it involves a prolonged time since the genes of interest are inserted into a plasmid and these turn into a host, such as a bacterial strain, continuing with the culturing process and AST, so that the time can be prolonged [9,45]. Another widely used technique for gene resistance evaluation are microarrays technology [46] and fluorescence in situ hybridization (FISH), using synthetic capture probes of different types including peptide nucleic acid (PNA) probes [47–50]. However, for the development of PNA-FISH, biological samples are commonly previously cultured by automated instruments, thus increasing the analysis time.

The use of chemosensor and biosensor technology is an alternative approach which possesses technical simplicity, low cost, short analysis time, easy operation, and hold exceptional promise for providing critical information for real-time data collection and simultaneous measurements of multiple analytes (multiplexing) within a single device. In general terms, chemosensors are devices that measure the signal produced by a chemical reaction whereas biosensors can be defined as “compact analytical devices incorporating a biological or biologically derived sensing element either integrated within or intimately associated with a physicochemical transducer” [18,19,51–58].

Different examples of sensors and biosensors for antimicrobial susceptibility tests and resistance gene detection have been reported in literature [59–64]. Complex real matrices have been analyzed including biological matrices such as saliva, blood, and urine [65,66], environmental matrices such as soil, water (drinking water, rivers, lakes, groundwater, wastewater), plants [67–70], livestock [71], and food [55,67,68].

The aim of this review is to describe sensor- and biosensor-based methods for detecting AMR, limiting the discussion to the system proposed for phenotypic and genotypic AMR detection. Thus, (bio)sensor-based methods for general pathogen identification are not reviewed here.

2. Sensors and Biosensors for AMR Detection

Methods for AMR detection based on sensor and biosensors are here classified as phenotypic and genotypic tools. The phenotypic techniques consist of detecting the expression of the microorganism's resistance mechanisms, i.e., the microorganism survival in presence of an antimicrobial. Genotypic techniques allow the detection of genes that express some mechanism of the microorganism resistance to the action of the antimicrobial. Many resistance target genes are known and are listed in specialized databases such as The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD, <https://card.mcmaster.ca/>, accessed on 17 August 2021), ResFinder (https://bitbucket.org/genomicepidemiology/resfinder_db/src/master/, accessed on 17 August 2021) and Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, accessed on 17 August 2021) [9]. Some examples of these genes are reported in Table 1.

Table 1. Main antimicrobial groups, AMR genes, and type of resistance mechanisms [9,72,73].

Antimicrobial Group	Antimicrobial Agent(s)	Some of Resistance Gene(s)	Resistance Mechanism
Aminocoumarins	Novobiocin, Coumermycin, Chlorobiotin	gyrB, parE, parY	Target modification
Aminoglycosides	Amikacin, Dibekacin, framycetin, gentamicin, kanamycin, neomycin, netilmicin, plazomicin, sisomicin, spectinomycin, streptomycin, tobramycin	aacA-aphII, aadD, aadE, aadY, ant(4)-Ia, aphA3, armA, rmtA, rmtB, rmtC, str	Reduced permeability, antibiotic efflux, antibiotic modification, target modification
Amphenicol	Acidamfenicol, chloramphenicol, flufenicol, thiamphenicol	agmK, catA1, cmlA1, floR, tfgABC	Reduced permeability, antibiotic efflux, antibiotic modification, target modification
Ansamycins	Rifampicin, rifamixin	dnaA, rbpA, rpoB	Target modification, antibiotic modification, reduced permeability
Carbapenems	Doripenem, ertapenem, Imipenem	blaOXA-23, blaOXA-58, blaOXA-497, blaVIM-1	Reduced permeability, antibiotic efflux, antibiotic modification, target modification
Cephalosporins	Cefaclor, cefalexin, cefalotin, cefazolin, cefazolin, cefixime, cefotaxime, ceftriaxone, cefuroxime	ampC, bla-genes	Reduced permeability, antibiotic efflux, antibiotic modification, target modification
Ethambutol	Ethambutol	embB, embC	Expression changes, target modification
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin, clinafloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, ofloxacin, pefloxacin, sarafloxacin	gyrA, gyrB, parC, parE	Reduced permeability, antibiotic efflux, antibiotic modification, target modification
Fosfomycin	Fosfomycin	fomA, fomB, fosC, fosA, fosX	Antibiotic modification, target modification
Fusidates	Fusidic acid	fusB, fusC	Reduced permeability, target protection
Glycopeptides	Carbonyl, ramoplanin, telavancin, teicoplanin, vancomycin	vanA, vanB, vanD, vanK, vanS	Reduced permeability, target modification
Isoniazid	Isoniazid (INH)	ahpC, inhA, katG	Expression changes, target modification
Lincosamides	clindamycin, lincomycin, pivlincin	ermA, ermB, erm(3), ein, lnu(A), lnu(B), lnu(B), sal(A)	Antibiotic efflux, antibiotic modification, target modification
Lipopeptides	Bacitracin, capreomycin, daptomycin, mivocyclin	cdsA, rpoB	Antibiotic modification, target modification

frequency. In presence of an antibiotic, the MIC of the antibiotic can be estimated [88]. Kinnunen et al. measured the bacterial growth of uropathogenic *E. coli* isolate and its response to the presence of streptomycin and gentamicin by coating magnetic beads with specific antibodies for the bacteria. Bacterial growth alters the drag of the rotating magnetic bead cluster due to the change in viscosity (Figure 2A) [89]. With this device, the MICs of streptomycin (8 µg/mL) and gentamicin (2 µg/mL) were obtained in 2 h.

Other devices that also use beads are those based on the measurement of the Brownian motion. Wang et al. developed a self-powered sensor based on vancomycin-modified microbeads and the use of their Brownian motion for rapid AST and in situ monitoring of microorganisms [90]. The proposed approach is based on the fact that vancomycin is a β -lactam antibiotic that possesses a similar structure to the enzyme dd-transpeptidase that catalyzes the synthesis of bacterial cell walls. Cell walls of almost all bacteria contain d-Ala-d-Ala residues. Gram-negative bacteria are covered with an extra layer of outer membrane, however d-Ala-d-Ala ligases are exposed to the outside environment through some defects [91]. Thus, the vancomycin-modified microbeads can selectively capture bacteria instead of normal cells or proteins and inhibit their wall synthesis. When the functionalized microbeads capture the bacteria, giving rise to a change in diffusivity, the Brownian motion is weaker; the images of the analysis were then obtained by means a fluorescent microscope. In this study, *E. coli* and *S. aureus* strains were used, and gentamicin was added for AST. It was determined that concentrations below 2 µg/mL were insufficient to inhibit the bacteria; the determined MIC was 4 µg/mL with a detection limit of 10^6 CFU/mL in an analysis time of 2 h and a volume of 5 µL.

Quartz crystal microbalance (QCM) allows piezoelectric/acoustic dynamic measurements. This technique measures the resonant frequency change from mass changes on the transducer surface. The surface of the transducer is a piezoelectric material; quartz is commonly used for its low cost and stability against thermal, chemical, and mechanical stresses [92]. The quartz crystal is coated with a gold electrode; antibodies, DNA or RNA capture probes, enzymes or nanostructures that are specific and highly sensitive to the substance to be detected can be immobilized on the gold surface [93,94]. Reyes et al. reported a rapid and highly sensitive biosensor for monitoring the effects of antibiotics on resistant or susceptible strains of *E. coli* and *S. cerevisiae* [95]. A magnesium zinc oxide (MZO) nanostructure-modified quartz crystal microbalance (MZO-nano-QCM) was used (Figure 2B). The biosensor was applied to measure the sensitivity of the strains to ampicillin and tetracycline for *E. coli*, and amphotericin-B and miconazole for *S. cerevisiae* through the device's time-dependent frequency shift and motional resistance [95]. An innovative alternative for the determination of AST was proposed by Guliy et al. [96]. The principle of operation of the sensor is based on the fact that the attenuation of an acoustic wave propagating in a piezoelectric plate and its velocity depend on the electrical boundary conditions on the surface of the plate [97]. In the proposed approach the lower part of a lithium niobate plate was excited with interdigital transducers (IDT), the signal generated was determined in the form of an acoustic wave with horizontal polarization; the suspension of *E. coli* cells, placed on top of the lithium niobate plate, led to the appearance of pronounced resonance peaks. Subsequently, the bacterial suspension was exposed to ampicillin and measurements of the depth and frequency of the resonant peaks were made; at 2 µg/mL of antibiotic, a change in the depth and frequency of the resonance peaks can be observed because ampicillin modifies the properties of the cytoplasmic membrane, favoring the release of species to the suspension by modifying its conductivity; this increase in conductivity decreases the depth and frequency of the resonant peaks of the sensor. This device has the advantage of short analysis times (10–15 min). However, it is affected by temperature changes, causing fluctuations in the resonance frequency.

Mechanical sensors have been proposed for AST [76,98]. The forces produced by the interaction of the target species with the receptors immobilized on the cantilever determine a change in the cantilever resonance frequency that behaves as a harmonic

oscillator. For the determination of bacteria and their susceptibility or resistance, the cells adhere to the cantilever, and according to the added mass and position, the change in resonance frequency is monitored [74,99,100]. Currently, the atomic force microscope (AFM) is one of the main nanomechanical techniques used in AST due to its ability to detect displacements in the range of 0.1 Å and a resolution of microseconds [98,101]. Using an AFM system, Stupar et al. developed a methodology capable of detecting nanomotion of *E. coli* bacteria and observing their behavior when exposed to ciprofloxacin, ampicillin, and ceftriaxone [102]. The bacteria themselves induce a fluctuation in the sensor; when exposing the bacteria to antibiotics, a change in the fluctuations is rapidly recorded (Figure 2C).

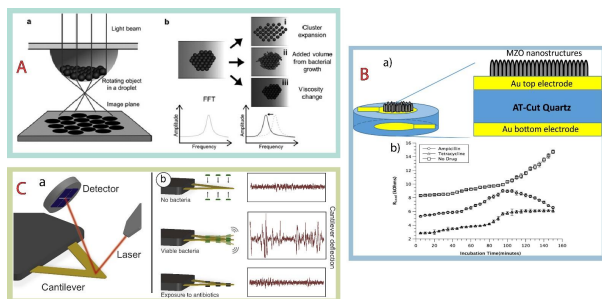


Figure 2. Examples of different magnetic, mass and mechanical (bio)sensors: (A) Schematic of an AMBR biosensor. (a) The droplet lensing effect was used to amplify the rotation signal; the rotation signal can be observed using a photodetector and visualizing a periodic signal that corresponds to the rotational period of the cluster. (b) The rotational period of the cluster is different when (i) the cluster expands, (ii) the bacteria attach to the cluster, or (iii) the viscosity of the surrounding fluid changes. Reprinted from reference [89] with permission from John Wiley and Sons. (B) (a) Scheme of the MZQ-Chann-QCM biosensor; (b) the motional resistance (Rload) is calculated from the sensors admittance spectrum amplitude modulation for three cases, i.e., ampicillin, tetracycline, and no drug treatment. Reprinted from reference [95] with permission from Elsevier. (C) Representation of nanomechanical sensor based on cantilever. (a) Schematic of nanomotion detector setup; laser beam is focused on the sensor surface, and the movements of the cantilever are monitored by evaluating the reflection. (b) Representation of a nanomotion susceptibility test. The fluctuations are driven only by thermal motion and are low, when bacteria are not attached to the sensor. After attachment of bacteria, fluctuations are linked to their metabolic activity and are high. Finally, after exposure to the antibiotic, bacteria are nonviable, and fluctuations return to low levels. Reprinted from reference [102] with permission from Elsevier.

Table 2 summarizes some of the most recent works for the determination of susceptibility through magnetic, mass, and mechanical sensors. Mainly, these sensors were tested in bacterial culture. Thus, in Table 2, detection times after the isolation and identification of the strains are detailed, as well as the MICs of the antibiotics used for susceptibility or resistance measurement and the detection limits.

Technic/Signal/Type	Target	Antibiotic	MIC (μg/L)	Limit of Detection	Time	Reference
Asynchronous magnetic bead rotation	<i>E. coli</i>	Gentamicin	1	Single bacterium binding events	15 min	[87]
Atomic force microscope cantilevers	<i>E. coli</i>	Ampicillin	12.5–50	NM, 1×10^5 CFU/mL**	45 min	[100]
Asynchronous magnetic bead rotation	<i>E. coli</i>	Ampicillin	8	Single bacterium binding events	1.5 h	[103]
Asynchronous magnetic bead rotation	<i>E. coli</i>	Gentamicin	1	50 cells per drop	100 min	[104]
Asynchronous magnetic bead rotation	<i>E. coli</i>	Gentamicin	2	Single bacterium binding events	91 min	[105]
Brownian motion	<i>P. aeruginosa</i>	Gentamicin	2	One bacterium	2 h	[106]
Multi-channel series piezoelectric quartz crystal	<i>E. coli</i>	Ampicillin	32	5×10^5 CFU/mL**	5–8 h	[107]
Spectral amplitude modulation MZO-QCM	<i>S. epidermidis</i>	Ciprofloxacin	0.5	1×10^6 CFU/mL	1.5 h	[108]
Orthogonal quartz crystal microbalance	<i>E. coli</i>	Ciprofloxacin	12.5	5×10^6 CFU/mL**	1 h	[109]
Indirect series piezoelectric	<i>M. tuberculosis</i>	Isoniazid	0.1	1×10^3 CFU/mL**	>1 day	[110]
		Rifampin	1.0			
		Ethambutol	2.5			
		Streptomycin	2.0			
		Capreomycin	10			
		p-Aminosalicylic acid	2.0			
		Ethionamide	5.0			
QCM under an external magnetic field	<i>D. desulfotomaculum</i>	Vancomycin	NR	1.8×10^4 CFU/mL**	30 min	[111]
Cantilever NMS under an external magnetic field	<i>M. bovis</i> , <i>M. abscessus</i>	Amikacin	1.7	100 bacterial cells	30 min	[112]
		Rifampin	0.15			
		Isoniazid	0.17			
Atomic force microscope cantilevers	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Ampicillin	2.0	4.6 ± 0.5 bacteria/100 μm ²	30–40 min	[113]
		Kanamycin	70.0			

biomaterial microcantilever with an embedded microfluidic channel	<i>E. coli</i>	Ampicillin Kanamycin	NM	1×10^5 CFU/mL**	30 min	[114]
Atomic force microscope cantilevers	<i>B. pertussis</i>	Erythromycin Clarithromycin	0.06 0.12	NM	20–40 min	[115]

** Initial concentration; CFU, colony-forming unit; MZO, magnesium zinc oxide; NM, not measured; NMS, nanomotion sensor; NR, not reported; QCM, quartz crystal microbalance.

2.1.2. AST Optical (Bio)Sensors

Optical (bio)sensors include a wide variety of transducing methods such as fluorescence, chemi- and bioluminescence, colorimetry, surface plasmon resonance (SPR), evanescent optical-planar waveguide, reflectometric interference spectroscopy, etc., [19,116,117].

Colorimetric sensors offer a number of advantages including: simple procedure, low cost, and the possibility of observing color changes with the naked eye or with simple instrumentation in the case of quantitative analysis [70,118]. The use of chemical species that changes color with respect to bacterial growth, such as Resazurin [19,119], or the use of enzymes, such as Horseradish Peroxidase (HRP), that modifies substrates according to the number of microbial cells, can help to measure susceptibility in real-time [70].

In the approach of Sun et al. [120], *p*-benzoquinone was used to monitor the bacterial concentration and specifically distinguish *E. coli* from four other common bacteria, namely, *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), and *Salmonella pullorum* (*S. pullorum*). A visible color change, evaluated without any complex instruments but with a simple smartphone, is used for the determination of the concentration of the bacteria.

Many (bio)sensors are based on fluorescent labels including nanomaterials [70,121,122]. Nazemi et al. developed a rapid approach to evaluate antibiotic susceptibility of *E. coli* based on photoluminescence emission of GaAs/AlGaAs quantum well (QW) biochips [123]. Bacterial cells were captured on the surface of the QW, delaying the photoluminescence maximum. The biochips were functionalized with polyclonal antibodies for *E. coli*. After 4 h of incubation (LB broth, penicillin, or ciprofloxacin), the position of photoluminescence maximum was measured. The photoluminescence maximum depends on the photocorrosion process due to the immobilized bacteria on the surface of the GaAs/AlGaAs biochips (Figure 3A). When bacterial cells are affected by antibiotic exposure, peak photoluminescence occurs faster than in presence of bacteria in LB.

Tang et al. [124] studied the change in pH due to the rapid accumulation of metabolic products during cell growth. A microfluidic pH sensor manufactured by integrating pH-sensitive chitosan hydrogel with poly(dimethylsiloxane) (PDMS) microfluidic channels was used in their study. To observe the change in pH, Fourier transform reflectometric interference spectroscopy (FT-RIFS) was used. The suspension of the bacterial cells (*E. coli*, 1×10^6 CFU/mL) with different antibiotics (azithromycin, amikacin, ciprofloxacin, and tetracycline) was injected into the device measuring the EOT changes. The increase in EOT was monitored in real-time by determining the possible inhibition of bacterial growth by different antibiotics (Figure 3B). The technique was adequate to monitor microbial growth and MIC of antibiotics in real-time (azithromycin 1 μg/mL, amikacin 16 μg/mL, ciprofloxacin 0.25 μg/mL, and tetracycline 0.5 μg/mL) in 60 min.

Rapid analysis of antibiotics susceptibility (cefazidime, cefotaxime, ampicillin, amoxicillin, levofloxacin, and doxycycline) was demonstrated in *P. aeruginosa* and *E. coli* bacteria by Nag et al. [125] by using localized SPR phenomenon and gold nanoparticles. The analysis consisted of capturing the bacteria (10^5 CFU/mL) on a gold nanoparticle-

coated optical fiber sensor directly from urine (Figure 3C). Subsequently, the bacteria were exposed and induced to cell lysis with different antibiotics for 2 h, observing the change in absorbance with time and degree of susceptibility or resistance of the bacteria to the different antibiotics (Figure 3C). The sensor was also tested in tap water samples [125].

Raman spectroscopy (RS), is commonly used to measure molecular vibrational, rotational, and other low-frequency modes providing characteristic information about the effects of AMs on microbial cells [126]. Intensity and wavenumber of anelastic-scattered light of RS can be used to analyze living cells without labeling or fixation procedures. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) can be used to amplify the response [28,74,127,128]. Bi et al. developed an AST procedure based on SERS-active Au@Ag core-shell nanorods (Au@AgNR) [129]. The manufacture of the SERS nanotag system consisted of the functionalization of the Au@AgNR with streptavidin (SA) and their interaction with biotinylated antibodies specific for *E. coli* to form the complete SERS nanotags (Au@AgNR-SA@Ab) (Figure 3D). Bacterial cells were trapped by the nanotags (Figure 3D) and measured at different CFU concentrations to check the biosensor sensitivity. Finally, the bacterial cells were exposed to ampicillin to observe the susceptibility of the bacteria. The technique showed a detection limit of 10^3 CFU/mL, an estimated analysis time lower than 4 h and the possibility to analyze complex biological matrices such as blood. Some of the most recent publications related to optical (bio)sensors are summarized in Table 3.

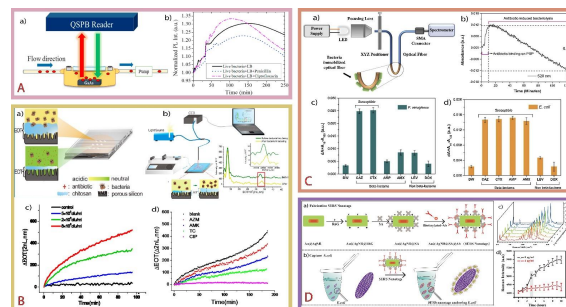


Figure 3. Examples of different optical (bio)sensors for AST. (A) (a) Schematic illustration of the experimental setup. (b) normalized photoluminescence intensity measured for biochips in *E. coli* exposed to penicillin and ciprofloxacin. Reprinted from reference [119] with permission from Elsevier. (B) (a) Mechanism for monitoring bacterial metabolism and growth; (b) schematic instrumental setup for the sample detection; (c) time traces of EOT changes during bacterial incubation in the microfluidic channel; (d) EOT changes measured by the sensor loaded with bacteria spiked with different concentrations of antibiotics. Adapted with permission from (Tang et al., 2013). Copyright (2013) American Chemical Society. (C) (a) Optical detection assembly; (b) time-varying response of *P. aeruginosa* immobilized optical fibers to 10 μg/mL cefazidime; (c) response of *P. aeruginosa*; and (d) *E. coli* immobilized optical fiber to 10 μg/mL of antibiotics cefazidime (CAZ), cefotaxime (CTX), ampicillin (AMP), amoxicillin (AMX), levofloxacin (LEV), and doxycycline (DOX). DW is the change in absorbance in distilled water only. Reprinted from reference [121] with permission from Elsevier. (D) (a) Scheme of the functionalization process of Au@AgNR as SERS nanotag; (b) attachment of SERS nanotag to *E. coli*; (c) SERS spectra of *E. coli* complex at a different concentration ranging from 107 to 102 CFU/mL; (d) growth curve of *E. coli* from SERS plot for ampicillin (4 μg/mL) exposure and unexposed. Reprinted from reference [125] with permission from Elsevier.

Table 3. Optical (bio)sensors for determination of susceptibility to antimicrobials.

Technique	Recognition Probe	Target	Antibiotic	MIC (µg/L)	Limit of Detection	Time	Reference
Colorimetric	Tetrazolium salts-8	<i>E. coli</i>	Ampicillin	128	10 CFU/mL	2 h	[122]
Fluorescence	TDN-aptamer/SYTO 9 Green	<i>E. coli</i>	Kanamycin	4.0	10 CFU/mL	5 h	[130]
			Streptomycin	8.0			
			Ofloxacin	0.5			
			Chloramphenicol	2.0			
SPR	2PAC—Au nanosphere/block copolymer templates (PS- <i>b</i> -PMMA)	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Carbenicillin	100	NR	30 min	[131]
			Gentamicin	1			
laser-patterned paper-based	Chromogenic agar CHROMagar/pho topolymer Disc-diffusion	<i>E. coli</i>	Amoxicillin	30	2.5 × 10 ⁶ CFU/mL	18 h	[132]
			Amoxicillin	30			
SPR	Poly-L-lysine/glass slide coated with gold sensor chip	MRSA MSSA	Cefoxitin	32 to >128	5 × 10 ³ CFU/mL *	3 h	[133]
			Cefoxitin	32 to >128			
Colorimetric	Endogenous H2S / AgNPs	<i>E. coli</i>	Ampicillin	100 (MBC)	10 ² cell/mL *	4–6 h	[134]
Fluorescence	Resazurin	<i>E. coli</i>	Gentamicin	4	Single cell	1 h	[135]
Fluorescence imaging	anti- <i>E. coli</i> antibody / streptavidin-coated polystyrene microsphere	<i>E. coli</i>	Ceftazidime	4	Single cell	30 min	[136]
			Levofloxacin	32			
SERS	Gold nanoparticles	<i>L. lactis</i>	Ampicillin	NR	NR	1.5 h	[137]
Fluorescence	PDMS/TLFM	<i>E. coli</i>	Ampicillin	8	Single cell	2–4 h	[138]
			Ciprofloxacin	12			
			Chloramphenicol	8			
			Tetracycline	2			
SPR	Poly-L-lysine/Au thin film	<i>E. coli</i>	Ampicillin	3	NR	2 h	[139]
SERS	Bacteria-aptamer/AgNPs	<i>S. aureus</i>	Tigecycline	0.02	5 × 10 ³ CFU/mL *	2 h	[140]
			Vancomycin	0.2			
Raman tweezers	fused-silica microfluidic chip	<i>S. aureus</i>	Oxacillin	2000	10 ² cells/L	4 h	[141]

* Initial concentration; 2PAC, two-dimensional physically-chemical assembly method; AgNPs, silver nanoparticles; AgNPs, silver nanoparticles; MBC, minimal bactericidal concentration; MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*; MSSA, methicillin-susceptible *S. aureus*; NR, Not reported; PDMS, polydimethylsiloxane; PS-*b*-PMMA, poly(styrene-*b*-methyl methacrylate); SERS, surface-enhanced Raman spectroscopy; SPR, surface plasmon resonance; TDN, tetrahedral DNA nanostructure; TLFM, time-lapse fluorescence microscopy.

2.1.3. AST Electrochemical (Bio)Sensors

Electrochemical sensors have also been proposed in AST tests [43,75,142].

Bacteria can be electroactive and carry out a great variety of redox reactions. Thus, electrochemical sensors can determine the electrical response of microbial cells with great sensitivity, in some cases, eliminating the prolonged isolation and culturing times and allowing the measurement directly in biological and environmental matrices [75,143]. Depending on the interaction of the microbial cell with the recognition element, the response can be measured indirectly or directly [144]. In direct detection, the binding of the cell itself with an antibody or a bacteriophage immobilized on the electrode, produces

voltammetry (CV) was used to measure the peak reduction of HRP. The *E. coli* bacteria were incubated in the presence of ampicillin to measure whether the strains were susceptible or resistant to the antibiotic. The system allows the determination of bacterial cells in the order of 8 CFU/mL in 1–2 h.

Aptamers have also been proposed for bacterial cell determination [156–159]. To measure, in real-time, the growth and susceptibility of *E. coli* and *S. aureus* to the antibiotics gentamicin, ampicillin, and tetracycline, Jo et al. reported an aptamer-functionalized capacitance sensor array [160]. The specific DNA aptamers for each of the different strains were immobilized on the surface of the Au-working electrode. Bacteria can act as capacitors connected between electrodes in parallel, providing valuable information on bacterial activity. When bacteria are treated with antibiotics at inhibitory concentrations, the capacitance decreases. When the bacteria is resistant to the antibiotic, the capacitance increases in the same way as if the strains were not exposed to the antibiotic (Figure 4C); the analysis can be performed in 1 h with a sensitivity of 10 CFU/mL [160].

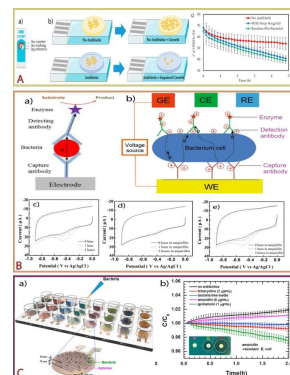


Figure 4. Examples of AST electrochemical sensors. (A) (a) Schematic of Au SPE; (b) overview of bacterial growth on the biosensor containing no antibiotic (above) and antibiotic (below) over time; (c) bacterial growth curves of *Escherichia coli* on gels seeded with and without streptomycin and baseline curve (no bacteria). This article [149] is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), accessed on 17 August 2021. (B) (a) The sandwich-immune complex formed on an electrode; (b) a schematic description of the FEED-based detection platform; (c) CV of wild-type *E. coli* without ampicillin; (d) CV of wild-type *E. coli* growth in ampicillin; (e) CV of ampicillin-resistant *E. coli* growth in ampicillin. This article [155] is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), accessed on 17 August 2021. (C) (a) Schematic of aptamer-functionalized capacitance sensor array; (b) real-time capacitance measured for ampicillin-resistant *E. coli* treated with tetracycline, gentamicin, ampicillin, or medium. Reprinted from reference [160] with permission from Elsevier.

a reduction or increase in the transfer of electrons due to the presence of membrane enzymes [145]. In the indirect detection, the cell is stimulated to secrete some electroactive species that can be measured [144]. Screen-printed electrodes (SPE) have a significant advantage over traditional electrochemical cell methods since the three electrodes (working, counter, and reference electrode) are integrated into a single chip, facilitating the analysis and reducing manufacturing costs and time [146–148]. Hannah et al. implemented an SPE to monitor bacterial growth and select the correct antibiotic to administer to treat infections caused by *E. coli* at a low-cost diagnosis (Figure 4A) [149]. A gold electrode was modified with an antibiotic-seeded hydrogel to measure the resistance to current flow presented by *E. coli* strains by electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The bacteria were exposed to streptomycin (MIC of 4 µg/mL) for 2.5 h showing a sensitivity of ≥10³ CFU/mL.

Furthermore, electroanalytical techniques can be used for pathogen identification significantly reducing the susceptibility determination times [66,150,151]. Altobelli et al. [150] developed an assay for phenotypic antimicrobial susceptibility testing and rapid uropathogen identification. The quantitative determination of bacterial 16S rRNA is based on the use of an electrochemical array functionalized with a panel of complementary DNA capture probes. Pathogen ID was determined using pathogen-specific probes, whereas phenotypic AST with ciprofloxacin MIC was determined using an Enterobacteriaceae probe to measure 16S rRNA levels as a function of bacterial growth. Results are obtained in very short time (66 h) in comparison to 2–3 days required for the standard diagnosis.

Mach et al. developed an electrochemical, point of care device for determining the antibiotic susceptibility of pathogens of urinary tract directly in urine samples [152]. In this case, each of the working-electrodes of a sensor array was modified with a capture probe specific for the bacterial 16S rRNAs of clinically relevant bacterial urinary pathogens. Detection of the target-probe hybrids was achieved through binding of HRP-conjugated anti-fluorescein antibody to the detector probe. Uropathogenic *E. coli* was cultured, and samples taken at time intervals of 20 min for the analysis by standard quantitative plating as well as the biosensor assay. Proportional increases in signal strength were observed over a 4-log unit range. A similar correlation between increased cell number and biosensor signal was observed with other common uropathogens including *E. faecalis* and *P. aeruginosa*. The specific probes for *E. coli* were immobilized on the microfabricated sensor with a thin, optical-grade layer of gold electrodes deposited on plastic. Subsequently, the strains were cultured for 2.5 h in different antibiotics (ampicillin, ciprofloxacin, trimethoprim/sulfamethoxazole, gentamicin, ceftazidime, and cefepime). After this time, cell lysis was performed, and amperometric current versus time was measured using a multichannel potentiostat to observe the susceptibility or resistance of the microbiological species [152]. In the analysis of samples directly from urine, it was determined that the identified *E. coli* bacteria were resistant to ampicillin, ciprofloxacin, trimethoprim/sulfamethoxazole, and gentamicin and susceptible to ceftazidime and cefepime. A similar approach was reported in [153]. Genefluidics Inc. (Duarte, CA, USA) commercializes a system based on this approach, as also described in the Section 3.

Complementary to oligonucleotide-based capture probes, antibodies are an excellent tool for detecting whole cells due to their high specificity and potential for ID [154]. Recently, Shi et al. implemented a biosensor based on the capture antibody-bacteria-detection antibody sandwich immune complex to demonstrate a culture-free approach and to achieve a rapid diagnosis of bloodstream infections (Figure 4B) [155]. Here, redox electroactive enzymes attached to antibodies are used as sensing elements; the device consists of a three-electrode cell modified with insulated gating electrodes (GE) for applying a gating voltage (VG) between the gating electrode and the working electrode. VG modifies the interfacial charge distribution by inducing an electric field at the solution-enzyme-electrode interface to reduce the tunnel barrier for electrons. A first antibody (specific for *E. coli*) is immobilized on the surface of the working electrode; the sample is incubated with the biosensor; finally, another antibody marked with HRP is added. Cyclic

Table 4. Electrochemical (bio)sensor for determination of susceptibility to antimicrobials.

Electrode—Recognizing Element	Respond	Target	Antibiotic	MIC (µg/L)	Limit of Detection	Time	Reference
Au SPE—antibody alkaline phosphatase	DPV	<i>S. aureus</i>	MRSA strain	Nm	845 CFU/mL	4.5 h	[143]
SPE—Thiolated oligonucleotide capture probes	Amperometric	<i>E. coli</i>	Ciprofloxacin	2	10 ³ CFU/mL	5 h	[150]
G-FET—peptide probes	Dirac voltage	<i>S. aureus</i> , <i>A. baumannii</i>	colistin resistant strain	NM	10 ⁶ cells/mL	5 min	[165]
SPCE/MWCNTs/AuNPs—reduction of resazurin	DPV	<i>S. gallinarum</i>	Ofloxacin	32	10 ³ CFU/mL	1 h	[166]
Au—aptamers	Capacitance	<i>E. coli</i> *	Amikacin	≤2	10 ³ CFU/mL **	6 h	[167]
		<i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i>	Ampicillin	≥32			
			Aztreonam	≤1			
			Cefepime	≤1			
			Ceftazidime	≤1			
Au SPE—agarose-based hydrogel deposit	EIS	<i>S. aureus</i>	Amoxicillin	8 in both	10 ³ CFU/mL (50,000 CFUs) **	45 min	[168]
			Oxacillin				
Pt deposited over a glass substrate—reduction of resazurin	DPV	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>	Ampicillin	NM	10 ³ cells/mL	4 h	[169]
Two working electrodes (Au and Pt)—POA detection	CV	<i>M. tuberculosis</i>	Pyrazinamide	NM	40 µM of POA	NR	[170]
Array of interdigital electrodes—FD of the impedance of living and dead microorganisms	Impedance	<i>E. coli</i>	Ceftazidime	NR	NR	2 h	[171]
Silicon nanowire FETs by varying pH values	Current caused by varying pH	<i>E. coli</i>	Ceftriaxone	1–4	Single cells	6 h	[172]
			Ofloxacin	0.1–6			
3-APBA modified	Capacitance	<i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i>	Ceftriaxone	0.03	10 ³	2.5 h	[173]

electrode bind with cis-diol groups on the cell wall		<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i>	Q. infectoria Ampicillin Vancomycin Rhydomyrtone	20 0.5 1.25 0.5	CFU/mL	
SPE plastic-based microchips—antibodies	Impedance	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Erythromycin	0.1	10 ³ CFU/mL **	1.5 h [174]
Interdigital electrodes—antibodies	Impedance	<i>S. aureus</i>	Flucloroxacin	100	10 ³ cells/mL **	2 h [175]

* Antibiotic and MIC correspond to *E. coli*; ** Initial concentration; 3-APBA, 3-aminophenylboronic acid; AuNPs—gold nanoparticles; CV, cyclic voltammetry; DPV, differential pulse voltammetry; EIS, electrochemical impedance spectroscopy; FD, frequency dependence; G-FET, graphene field effect transistors; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MWCNTs, multiwalled carbon nanotubes; Not measured; Not reported; POA, pyrazinoic acid; SPCE, screen-printed carbon electrodes; SPE, screen-printed electrodes.

2.2. Sensors and Biosensors for Genotypic Antimicrobial Resistance Detection

Microorganisms have developed different biological mechanisms to adapt and survive AM attack; these mechanisms are conserved and transmitted to other microorganisms through resistance genes. These genes information can be transferred vertically to the offspring or horizontally through mobile genetic elements (plasmids, prophages, integrons) [176,177].

The continuous mutations in the genome of microorganisms make it challenging to detect resistance genes. Short sequences of oligonucleotides (single-stranded DNA, PNA, LNA) immobilized on transducer surfaces are the most common techniques in detecting ARGs by using electrochemical platforms, [47,86,178,179], SPR chip [180,181], or thin film transistor [182].

A direct gene-circuit/electrode interface for the electrochemical detection of colistin antibiotic resistance genes has been proposed by Mousavi et al. [183]. The colistin resistance genes (i.e., *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* and *mcr-4*) have recently been identified in livestock globally. The interesting strategy described in ref. [183] is based on the production of restriction-enzyme-based reporters to catalyze the release of a reporter DNA (single-stranded DNA, ssDNA, labeled with methylene blue), which hybridizes with a DNA capture probe immobilized on the electrode surface. The approach begins with the synthesis of toehold switches complementary to the 24 top-ranked binding sites within each *mcr* gene and the ligation of a unique reporter enzyme gene to each set of switches. Restriction enzymes cleave annealed reporter DNA, which is free floating solution, releasing reporter DNA labeled with methylene blue. The capture probes then recruit the redox-active reporter DNA to the surface of nanostructured microelectrodes, generating an electrochemical signal. The approach was validated against the *mcr-4* gene. Thus, the *mcr-4* gene was expressed in *E. coli* and then total RNA was collected from the resulting culture. Selected RNA fragments were then amplified by isothermal amplification reaction (1 h) at a concentration of 30 ng/μL, using *mcr-4* specific primers. The amplified *mcr-4* mix was added without purification to solution containing the specific switch, followed by incubation off- and on-electrochemical chip for 45 min at 37 °C, prior to taking the first electrochemical measurement. The measurement was specific to *mcr-4* RNA in the presence of high background off-target RNA sequences and provided a strong, distinct signal against negative controls.

Korri-Yousoufi group [178,179] demonstrated the detection of *rpoB* gene resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in real samples in a PCR-free approach. The sensitivity of the proposed assay was based on the association of magnetic nanoparticles and polypyrrole on a gold electrode surface. The catalytic properties of iron oxide nanoparticles combined with conducting properties of polypyrrole platform, allowed the detection of 1 fM of DNA target in a 50 μL drop corresponding to 3 × 10⁴ copies of DNA. The naphthoquinone redox signal decreased after the hybridization between a selected probe and the complementary DNA target without cross-hybridization with single

nucleotide mismatch DNA target. The biosensors were applied to detect and discriminate wild type DNA from mutated DNA strands of *M. tuberculosis*, in both PCR amplified samples and samples without PCR amplification.

An electrochemical biosensor based on isothermal strand-displacement polymerization reaction for detection of *mecA* gene in methicillin resistance-*Staphylococcus aureus* (MRSA) was proposed in [184]. Methylene blue (MB)-labeled hairpin capture probes were immobilized by self-assembling on a gold electrode, in order to have the MB molecules confined close to the electrode surface for efficient electron transfer. After hybridization with the complementary target DNA, the hairpin probes undergo conformational changes, which led to a decreased electrochemical response. Furthermore, the primers annealed with the opened stems of the hairpin probes were extended by DNA polymerase, which in turn released the target DNA to trigger the next polymerase cycle. Therefore, a significant amplified current suppression for *mecA* gene detection is generated by the mass of MB molecules moved away from the electrode surface since many rounds can be performed.

Huang et al. developed an electrochemical biosensor based on a specific PNA probe to detect *bla*_{NDM}, the gene encoding the New Delhi metallo-β-lactamase, using label-free EIS [185]. The capture probe for the single-stranded DNA of the resistance gene was immobilized on the surface of a gold screen-printed electrode. After extraction and digestion of the plasmatic DNA, hybridization with the biosensor was performed. The detection limit of 100 pM for PCR amplification products of the *bla*_{NDM} gene was obtained, with excellent results observed for amplification-free from a *bla*_{NDM}-harboring plasmid.

Rolling-circle amplification (RCA) was coupled to a simple electrochemical impedimetric sensor for the detection of resistance genes of antibiotic belonging to the diverse group of β-lactamases [186]. Using a bimodal waveguide interferometer (BIMW) technique, Maldonado et al. [187] demonstrated a direct detection, without amplification, of *bla*_{CTX-M-15} gene and *bla*_{NDM-5} gene, two clinically relevant and frequent antimicrobial resistance encoding sequences. Selected DNA capture probes were immobilized on the surface of the BIMW sensor chip. After DNA extraction, fragmentation, and denaturation process, the samples were carried out for alignment with the sensor (Figure 5). The BIMW biosensor showed high sensitivity (20–30 aM) and short analysis times (<40 min, including sample pretreatment) for resistance gene analysis.

Hu et al. developed a system based on multiple cross displacement amplification (MCDA) assay and label-based lateral flow biosensor (LFB) for the amplification and detection of nucleic acids labeled with different chain displacement biomarkers in the presence of *Bst* polymerase under isothermal conditions [188]. In this work, the presence of the *bla*_{OXA-23-AB} (carbapenem resistance) gene was determined in *A. baumannii*. The reading of the results using the MCDA-LFB technique consists of capturing the amplification products on the test lines based on the combination of antibodies embedded in the LFB test lines and labeled antigens in the amplification products. The method shows a detection limit of 100 fg per reaction with pure culture and high selectivity for the carbapenem resistance gene. Different types of genotypic sensors to determine resistance genes are shown in Table 5.

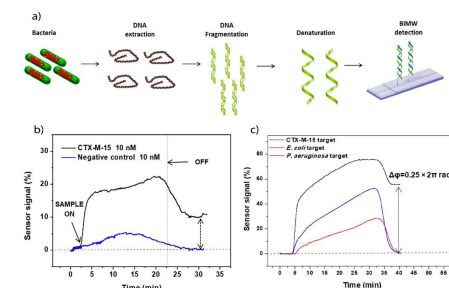


Figure 5. (a) Scheme of the biosensor strategy used for the detection of the genes; (b) signals obtained for the binding of the target (black line) and negative control (blue line) to the *bla*_{CTX-M-15}; (c) detection of *bla*_{CTX-M-15} gene (black line), non-specific *Pseudomonas aeruginosa* (blue line), and *Escherichia coli* without *bla*_{CTX-M-15} gene (red line). This article [187] is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), accessed on 17 August 2021).

Table 5. Different genosensor for determination of antimicrobial resistance genes.

Technic	Recognition Element	Target	Type of Resistance	Limit of Detection	Previous Amplification	Reference
Electrochemical—EIS and CV	DNA probe	<i>rpoB</i>	Rifampicin resistance	0.08 fM/L	Yes	[179]
Optic—fluorescence	DNA probe	CTX-MNDM-1	Cephalosporins resistance Carbapenems resistance	<10 copies of the gene	Yes	[182]
Optic—SERS	Hairpin-structured	<i>tetA</i>	Tetracycline Resistance	25 copies/μL	No	[189]
Optic—fluorescence	Fluorescent nucleic acid probe	VIM NDM IMP KPC	carbapenem antibiotic resistance genes	(1.8 ± 0.7) × 10 ⁶ beads/mL per target	No	[190]
Electrochemical—EIS and CV	DNA probe	<i>rpoB</i>	Rifampicin resistance	0.2 fM	Yes	[191]
Optic—fluorescence	Binary deoxyribozyme	<i>rpoB</i> katG inhA	Rifampin resistance Isoniazid resistance Fluoroquinolone resistance	5 fg–15.6 pg	Yes	[192]
Electrochemical—EIS and CV	DNA probe	<i>rpoB</i>	Rifampicin resistance	0.1 fM–1 pM	No	[193]
Electrochemical—capacitance	DNA probe	<i>ampR</i>	Ampicillin resistance	1–4 pM	No	[194]
Electrochemical—DPV	DNA probe	MDR1	Multidrug resistance	2.95 × 10 ^{−12} M	No	[195]
Optic—fluorescence	DNA probe	<i>rpoB</i>	Rifampicin resistance	1 nM ssDNA in 1 mL sample	Yes	[196]

				volume		
Optic—fluorescence	DNA probe	<i>rpoB</i>	Rifampicin resistance	100 nM	Yes	[197]
Optic—SFR	DNA probe	<i>rpoB</i>	Rifampicin resistance	NR	No	[198]
Electrochemical—DPV	PNA probe	<i>rpoB</i>	Rifampicin resistance	1 CFU/mL	No	[199]
Optic—fluorescence	Fluorescence DNA hairpin	<i>mecR</i>	Methicillin resistance	1 nM	Yes	[200]
Optic—fluorescence	Ab-DNA probe	<i>lamB</i>	Increases resistance to chlorotetracycline, ciprofloxacin, balofloxacin and nalidixic acid	4–250 pM amplicon concentrations	Yes	[201]
Electrochemical—DPV	DNA probe	<i>rpoB</i>	Rifampicin resistance	20 fM	Yes	[202]
Mechanic—piezoelectric	DNA probe	<i>mecR</i>	Methicillin resistance	0.125 μM	Yes	[203]

Ab, antibody; CV, cyclic voltammetry; DPV, differential pulse voltammetry; EIS, electrochemical impedance spectroscopy; IMP, Imipenemase; KPC, Klebsiella pneumoniae carbapenemase; NDM, New Delhi metallo-β-lactamase; NR, not reported; SERS, surface-enhanced Raman spectroscopy; VIM, Verona integron metallo-β-lactamase.

3. Conclusions and Perspectives

The main challenges in AMR detection is to obtain reliable results in minutes or hours (instead of days as with standard techniques) and with easy-to-use and cost-effective tools. Automated systems have helped in the pursuit to decrease analysis time in the deployment of AST and various methods based on optical imaging and microscopy-based techniques have been developed to measure bacterial growth [204–206].

Chemosensors and biosensors are one of the alternative techniques with the most significant projection in the coming years. The use of chemosensors and biosensors will result in the development of fast point-of-care devices in multiplexing formats. Progress in the different transducing techniques will allow AMR monitoring in low resource settings without the need for trained personnel.

However, despite the pressing market demands, commercially available tools are still at the development stage or do not meet validation requirements. There are a number of challenges that have to be surmounted in the validation of the developed methods. Key of which is the detection of low concentrations of analytes in the presence of high concentrations potential interferents. Enrichment and amplification are still necessary for the analysis of real samples due to the need to detect target species at low concentrations (i.e., initial concentration of bacteria in blood is around 1 to 100 CFU/mL) and eventually in the presence of a large excess of other bacterial species.

Integration of many different technologies is needed to solve problems related to low initial pathogen number and the presence of contaminating sample matrices. The problem of contamination can be avoided by the use of magnetic beads or nanoparticles coated with ligands-targeting bacteria. Furthermore, the development of novel isothermal amplification procedures will benefit (bio)sensor field. Among these techniques we can mention the nucleic acid sequence-based amplification (NASBA), the loop-mediated isothermal amplification (LAMP), the recombinase polymerase amplification (RPA), and others. These amplification methods have simplified nucleic acid amplification, often allowing a minimum sample treatment, cut down the costs of instrumentation and are suitable for miniaturization. Moreover, some of these techniques are less sensitive to inhibitors than standard PCR, allowing a minimal treatment of biological fluids. By contrast, multiplexing approaches are less developed for these isothermal amplification techniques than for PCR. Recently, clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated methods have been studied for the detection of nucleic acids. This and other novel biochemical approaches represent innovative and powerful tools for rapid sensitive and selective monitoring of resistance genes.

Miniaturization of the transducers and the coupling with microfluidic platforms will enable the deployment of multiplexed, compact, and easy-to-use systems that will result

in greater acceptance of chemosensors and biosensors by end-users and industrial stakeholders. Indeed, the progress in microfluidics, nucleic acid isothermal amplification, and (bio)sensor technology has recently provided several interesting devices that may eventually be used in AST, especially for low-resource field settings. An example is the Alveo platform (Alveo Technologies Inc, Alameda, CA, USA), an innovative device designed to multiplex 100 or more simultaneous tests from a single sample. The device consists of a fluidic cartridge coupled with electrochemical detection to measure the change in electrical conductivity that occurs during nucleic acid amplification: actually, during biochemical synthesis of DNA from nucleotides, the number and the mobility of electrically charged molecules are altered. Thus, the detection strategy is based on processing the sample by performing RPA and, optionally, a second isothermal amplification reaction. The second isothermal amplification reaction, which includes LAMP, can be carried out with amplification products of the RPA itself. The presence of the amplified target nucleic acid is then evaluated by measuring the impedimetric signal of the amplification reaction solution compared to a control. The analysis time can be of few minutes as well as many hours, depending on the desired degree of amplification that is necessary to achieve.

However, miniaturization requires a high level of standardization of the conditions, as the samples should represent similar growth states and culture densities. Automation can help with accurate reagent dispensing. The UniMax Lab Automation System of GeneFluidics Inc. (Duarte, CA, USA) is an automated diagnostic platform for the identification of uropathogens directly from urine samples, consisting of a robotic liquid handling system with associated reagent kits and disposable sensor array chips. As already mentioned the chip allows the electrochemical-measurement of species-specific ribosomal 16S rRNA. Each sample is lysed chemically. A built-in multi-channel potentiostat reads the electrical current from the steady-state enzymatic cycling amplification: signal is proportional to the bound 16S rRNA content from lysate and reported in ranges of CFU per milliliter through an established calibration curve.

Research in the field of chemo- and biomimetic receptors, including peptides, imprinted polymers and aptamers, will help in improving selectivity and thus bacterial identification that is another important issue for improving the reliability of the (bio)sensing approach to AMR monitoring. For instance, recently, antimicrobial peptides are considered as interesting biorecognition elements for bacteria ID and detection. These peptides can interact with bacteria, causing their lysis and inhibition of their growth. Some antimicrobial peptides have been described as specific to certain bacterial species, while other peptides can recognize any bacteria. This diversity can be employed both to design highly specific ligands and wide-spectrum probes able to interact with many different bacteria species. In the second case, profiling fingerprints and statistical analysis of data are necessary for the species-specific identification of bacteria.

Thus, in a context of growing global bacterial resistance, the development of better and more rapid detection of pathogenic threats based on biosensors is for sure one of the main interesting targets. This of course implies the development of more efficient sensing devices and also adequate biorecognition elements in the future to allow the specific identification of the various pathogens, particularly in medical settings where the nature of the threat is often not clearly identifiable.

Author Contributions: Conceptualization, E.C.R. and E.T.; writing—original draft preparation, E.C.R., E.T., S.L.; writing—review and editing, I.P. and S.L.; funding acquisition, E.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research project was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (Grant Number 754592), by The European Community and the Tuscany Region for their funding within the framework of the SAFE WATER project (European Union's Horizon 2020 Research and Innovation program and the ERA-NET "PhotonicSensing" cofund-G.A. n. 688735), and by Fondazione CR Firenze ID 20201662.

Chemosensors 2021, 9, 232

21 of 27

Chemosensors 2021, 9, 232

22 of 27

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Adam, B.; Wang, W.; Arshad, M.I.; Khurshid, M.; Muzammil, S.; Rasool, M.H.; Nisar, M.A.; Alvi, R.F.; Aslam, M.A.; Qamar, M.U.; et al. Antibiotic resistance: A roundabout of a global crisis. *Infect. Drug Resist.* **2018**, *11*, 1645–1658.
- Michael, C.A.; Dominey-Howes, D.; Labbate, M. The Antimicrobial Resistance Crisis: Causes, Consequences, and Management. *Front. Public Health* **2014**, *2*, 145.
- OECD. Stemming the Superbug Tide: Just a Few Dollars More. In *OECD Health Policy Studies*; OECD Health Policy Studies, OECD Publishing: Paris, France, 2018; ISBN 9789264307582.
- Sims, N.; Kasprzyk-Hordern, B. Future perspectives of wastewater-based epidemiology: Monitoring infectious disease spread and resistance to the community level. *Environ. Int.* **2020**, *139*, 105689.
- Gelband, H.; Laxminarayan, R. Tackling antimicrobial resistance at global and local scales. *Trends Microbiol.* **2015**, *23*, 524–526.
- Roope, L.S.J.; Smith, R.D.; Pouwels, K.B.; Buchanan, J.; Abel, L.; Eibich, P.; Butler, C.C.; Tan, P.S.; Sarah Walker, A.; Robotham, J.V.; et al. The challenge of antimicrobial resistance: What economics can contribute. *Science* **2019**, *364*, eaau4679.
- Smith, R.; Coast, J. The true cost of antimicrobial resistance. *BMJ Br. Med. J.* **2013**, *346*, h1493.
- WHO. *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*; WHO: Geneva, Switzerland, 2015.
- Boochbandi, M.; D'Souza, A.W.; Dantas, G. Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance. *Nat. Rev. Genet.* **2019**, *20*, 356–370.
- Christaki, E.; Marcou, M.; Tofarides, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *J. Mol. Evol.* **2020**, *88*, 26–40.
- O'Neill, J. *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations*; The Review on Antimicrobial Resistance: London, UK, 2016; ISBN 9789241564748.
- AMR Action Fund. The AMR Innovation Challenge. Available online: (accessed on 17 August 2021).
- Chokshi, A.; Sifri, Z.; Connimo, D.; Horg, H. Global Contributors to Antibiotic Resistance. *J. Glob. Infect. Dis.* **2019**, *11*, 36–42.
- Vikesland, P.; Garner, E.; Gupta, S.; Kang, S.; Maile-Moskowitz, A.; Zhu, N. Differential Drivers of Antimicrobial Resistance across the World. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 916–924.
- WHO. *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine*; WHO: Geneva, Switzerland, 2019.
- Taconelli, E.; Carrara, E.; Savoldi, A.; Harbarth, S.; Mendelson, M.; Monnet, D.L.; Pulcin, C.; Kahlmeter, G.; Kluytmans, J.; Carmali, Y.; et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 318–327.
- WHO. WHO Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics Are Urgently Needed. Available online: (accessed on 17 August 2021).
- Vasala, A.; Hytönen, V.P.; Laitinen, O.H. Modern Tools for Rapid Diagnostics of Antimicrobial Resistance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 308.
- Salmiyang Raz, K.; Aryan, E.; Moshlat, Z.; Ranjbar, G.; Sarkian, M.; Ghavini, K.; Farsiani, H.; Pourfarman, H.R.; Rozaei, M. The overview and perspectives of biosensors and Mycobacterium tuberculosis: A systematic review. *J. Clin. Physiol.* **2021**, *236*, 1730–1750.
- Kahlmeter, G.; Giske, C.G.; Kirn, T.J.; Sharp, S.E. Point-Counterpoint: Differences between the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and Clinical and Laboratory Standards Institute Recommendations for Reporting Antimicrobial Susceptibility Results. *J. Clin. Microbiol.* **2019**, *57*, e01129-19.
- Davenport, M.; Mach, K.E.; Shortliffe, L.M.D.; Banat, N.; Wang, T.H.; Liao, J.C. New and developing diagnostic technologies for urinary tract infections. *Nat. Rev. Urol.* **2017**, *14*, 298–310.
- McLain, J.E.; Cytryn, E.; Durso, L.M.; Young, S. Culture-based Methods for Detection of Antibiotic Resistance in Agroecosystems: Advantages, Challenges, and Gaps in Knowledge. *J. Environ. Qual.* **2016**, *45*, 432–440.
- Lagier, J.-C.; Edouard, S.; Pagnier, I.; Mediannikov, O.; Drancourt, M.; Raoult, D. Current and Past Strategies for Bacterial Culture in Clinical Microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28*, 208–236.
- Bauer, A.W.; Perry, D.M.; Kirby, W.M.M. Single-Disk Antibiotic-Sensitivity Testing of Staphylococci: An Analysis of Technique and Results. *AMA Arch. Intern. Med.* **1959**, *104*, 208–216.
- Pitrucello, G.; Condeci, D.; Kraus, T.F. Nanophotonics for bacterial detection and antimicrobial susceptibility testing. *Nanophotonics* **2020**, *9*, 4447–4472.
- Benkova, M.; Soukup, O.; Marek, J. Antimicrobial susceptibility testing: Currently used methods and devices and the near future in clinical practice. *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *129*, 806–822.
- Rottle, C.A.; Fass, R.J.; Prior, R.B.; Perkins, R.L. Microdilution Technique for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1975**, *7*, 311–315.
- Dierckx, J.; Vana, L.; Uria, N.; Marco, M.-P.; Muñoz-Berbel, X. Current and near-future technologies for antibiotic susceptibility testing and resistant bacteria detection. *TRAC Trends Anal. Chem.* **2020**, *127*, 115891.
- Li, Y.; Yang, X.; Zhao, W. Emerging Microtechnologies and Automated Systems for Rapid Bacterial Identification and Antibiotic Susceptibility Testing. *SLAS Technol.* **2017**, *22*, 585–608.
- Snyder, J.W.; Munier, C.K.; Johnson, C.L. Direct comparison of the BD phoenix system with the MicroScan WalkAway system for identification and antimicrobial susceptibility testing of Enterobacteriaceae and nonfermentative gram-negative organisms. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 2227–2233.
- Whistler, T.; Sangwichan, O.; Jorakate, P.; Sawabwong, P.; Surin, U.; Piralam, B.; Thanthitwitat, S.; Promkong, C.; Pensak, I. Identification of Gram-negative nonfermentative bacteria: How hard can it be? *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007729.
- McKinnon, K.M. Flow Cytometry: An Overview. *Curr. Protoc. Immunol.* **2018**, *120*, 5.1.1–5.1.11.
- Adan, A.; Alizada, G.; Kiraz, Y.; Baran, Y.; Nalbant, A. Flow cytometry: Basic principles and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2017**, *37*, 163–176.
- Schmitt, T.; Klomp, M.; Khan, M.N. An Overview of Flow Cytometry: Its Principles and Applications in Allergic Disease Research. *Anim. Models Allergy Dis.* **2021**, *2223*, 169–182.
- Entenza, J.M.; Bétrisey, B.; Manuel, O.; Giddey, M.; Sakwinko, O.; Laurent, F.; Bizzini, A. Rapid Detection of *Staphylococcus aureus* Strains with Reduced Susceptibility to Vancomycin by Isothermal Microcalorimetry. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 180–186.
- Howell, M.; Wirz, D.; Daniels, A.U.; Bräisant, O. Application of a Microcalorimetric Method for Determining Drug Susceptibility in Mycobacterial Species. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 16–20.
- Braisant, O.; Wirz, D.; Glopfer, B.; Daniels, A.U. Biomedical Use of Isothermal Microcalorimeters. *Sensors* **2010**, *10*, 9369–9383.
- Butini, M.E.; Gonzalez Moreno, M.; Czuban, M.; Koloszek, A.; Thilakshilvi, T.; Trampuz, A.; Di Luca, M. Real-Time Antimicrobial Susceptibility Assay of Planktonic and Biofilm Bacteria by Isothermal Microcalorimetry. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2019**, *1214*, 61–77.
- Burnham, C.A.D.; Leeds, J.; Nordmann, P.; O'Grady, J.; Patel, J. Diagnosing antimicrobial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **2017**, *15*, 697–703.
- Oviano, M.; Bou, G. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for the Rapid Detection of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Beyond. *Clin. Microbiol. Rev.* **2019**, *32*, e00037-18.
- Rentschler, S.; Kaiser, I.; Deigner, H.-P. Emerging Options for the Diagnosis of Bacterial Infections and the Characterization of Antimicrobial Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 456.
- Anjum, M.F.; Zankari, E.; Hasman, H. Molecular Methods for Detection of Antimicrobial Resistance. In *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals*; Schwarz, S., Cavaco, L.M., Shen, J., Eds.; ASM Press: Washington, DC, USA, 2018; pp. 35–50.
- Leva-Bueno, J.; Peyman, S.A.; Millner, P.A. A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection. *Med. Microbiol. Immunol.* **2020**, *209*, 343–362.
- Luby, E.; Mark Bekwe, A.; Zilles, J.; Pruden, A. Molecular methods for assessment of antibiotic resistance in agricultural ecosystems: Prospects and challenges. *J. Environ. Qual.* **2016**, *45*, 445–453.
- Yee, R.; Simmer, P.J. Next-Generation Sequencing Approaches to Predicting Antimicrobial Susceptibility Testing Results. *Adv. Mol. Pathol.* **2019**, *2*, 99–110.
- Gillespie, S. Chapter 3—Current status of molecular microbiological techniques for the analysis of drinking water. In *Molecular Microbial Diagnostic Methods*; Cook, N., D'Agostino, M., Thompson, K.C., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2016; pp. 39–58. ISBN 978012416999-9.
- Laschi, S.; Palchetti, I.; Marrasca, G.; Mascini, M. Enzyme-amplified electrochemical hybridization assay based on PNA, LNA and DNA probe-modified micro-magnetic beads. *Bioelectrochemistry* **2009**, *76*, 214–220.
- Nielsen, P.E.; Egholm, M.; Berg, R.H.; Buchardt, O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* **1991**, *254*, 1497–1500.
- Gupta, A.; Mishra, A.; Puri, N. Peptide nucleic acids: Advanced tools for biomedical applications. *J. Biotechnol.* **2017**, *259*, 148–159.
- Zhao, X.; Wu, C. Recent Advances in Peptide Nucleic Acids for Rapid Detection of Foodborne Pathogens. *Food Anal. Methods* **2020**, *13*, 1956–1972.
- Thévenot, D.R.; Toth, K.; Durst, R.A.; Wilson, G.S. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Anal. Lett.* **2001**, *34*, 635–659.
- Reynoso, E.C.; Torres, E.; Bettazzi, F.; Palchetti, I. Trends and perspectives in immunosensors for determination of currently-used pesticides: The case of glyphosate, organophosphates, and neonicotinoids. *Biosensors* **2019**, *9*, 20. doi:10.3390/bios901020.
- Palchetti, I.; Mascini, M. Nucleic acid biosensors for environmental pollution monitoring. *Analyst* **2008**, *133*, 846–851.
- Palchetti, I.; Mascini, M. Biosensor technology: A brief history. In *Sensors and Microsystems*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2010; Volume 54 LNEE, ISBN 9789048136056.
- Leonard, H.; Colodner, R.; Halachmi, S.; Segal, E. Recent Advances in the Race to Design a Rapid Diagnostic Test for Antimicrobial Resistance. *ACS Sens.* **2018**, *3*, 2202–2217.
- Van Belkum, A.; Burnham, C.A.D.; Rossen, J.W.A.; Mallard, F.; Rochas, O.; Dunne, W.M. Innovative and rapid antimicrobial susceptibility testing systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 299–311.
- Bettazzi, F.; Palchetti, I. Nanotoxicity assessment: A challenging application for cutting edge electroanalytical tools. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1072*, 61–74.
- Ensaifi, A.A. Chapter 1—An introduction to sensors and biosensors. In *Electrochemical Biosensors*; Ensaifi, A.A., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 1–10. ISBN 9780281649414.
- Bonini, A.; Poma, N.; Vivaldi, F.; Kirchhain, A.; Salvo, P.; Bottai, D.; Tavanti, A.; Di Francesco, F. Advances in biosensing: The CRISPR/Cas system as a new powerful tool for the detection of nucleic acids. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2021**, *192*, 113645.
- Ceylan Koydemir, H.; Kula, H.; Özgen, C.; Alp, A.; Hascelik, G. MEMS biosensors for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *29*, 1–12.
- Xu, L.; Liang, W.; Wen, Y.; Wang, L.; Yang, X.; Ren, S.; Jia, N.; Zuo, X.; Liu, G. An ultrasensitive electrochemical biosensor for the detection of mecA gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *99*, 424–430.
- Bhardwaj, N.; Bhardwaj, S.K.; Mehta, J.; Mohanta, G.C.; Deep, A. Bacteriophage immobilized graphene electrodes for impedimetric sensing of bacteria (*Staphylococcus aureus*). *Anal. Biochem.* **2016**, *505*, 18–25.
- Gupta, N.; Renukopalakrishnan, V.; Liepmann, D.; Paulmurugan, B.; Malhotra, B.D. Cell-based biosensors: Recent trends, challenges and future perspectives. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *141*, e111435.
- Hu, J.; Ghosh, M.; Miller, M.J.; Bohn, P.W. Whole-cell biosensing by siderophore-based molecular recognition and localized surface plasmon resonance. *Anal. Methods* **2019**, *11*, 296–302.
- Hoyne-Nogués, M.; Gil, F.J.; Mas-Moruno, C. Antimicrobial Peptides: Powerful Biorecognition Elements to Detect Bacteria in Biosensing Technologies. *Molecules* **2018**, *23*, 1683.
- Mach, K.E.; Wong, P.K.; Liao, J.C. Biosensor diagnosis of urinary tract infections: A path to better treatment? *Trends Pharmacol. Sci.* **2011**, *32*, 330–336.
- Röder-Christ, K.; Bendas, G. Biosensor Applications in the Field of Antibiotic Research—A Review of Recent Developments. *Sensors* **2019**, *19*, 9450–9464.
- Yoo, S.M.; Lee, S.Y. Optical Biosensors for the Detection of Pathogenic Microorganisms—Trends in Biosensing. *Biotechnol.* **2016**, *34*, 7–25.
- Jung, J.K.; Alam, K.K.; Verosloff, M.S.; Capdevila, D.A.; Desmau, M.; Clauser, P.P.; Lee, J.W.; Nguyen, P.Q.; Pastén, P.A.; Matlack, S.J.; et al. Cell-free biosensors for rapid detection of water contaminants. *Nat. Biotechnol.* **2020**, *38*, 1451–1459.
- Zhou, C.; Pan, Y.; Ge, S.; Coulon, F.; Yang, Z. Rapid methods for antimicrobial resistance diagnosis in contaminated soils for effective remediation strategy. *TRAC Trends Anal. Chem.* **2021**, *137*, 116203.
- Li, Z.; Liu, C.; Sarpong, V.; Gu, Z. Multisegment nanowire/nanoparticle hybrid arrays as electrochemical biosensors for simultaneous detection of antibiotics. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *126*, 632–639.
- McArthur, A.G.; Waghech, N.; Nizam, F.; Yan, A.; Azad, M.A.; Baylaj, A.J.; Bhullar, K.; Canova, M.J.; De Pascale, G.; Ejim, L.; et al. The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 3348–3357.
- Argudin, M.A.; Deplano, A.; Mogharaoui, A.; Dodemont, M.; Heinrichs, A.; Denis, O.; Nonhoff, C.; Roisin, S. Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance Genes. *Antibiotics* **2017**, *6*, 12.
- Behara, B.; Anil Vishnu, C.K.; Chatterjee, S.; Sitarangappa, V.S.N.; Sreokumar, N.; Nagabhusan, A.; Rajendran, N.; Prathik, B.H.; Pandya, H.J. Emerging technologies for antibiotic susceptibility testing. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *142*, 111552.
- Ferapontova, E.E. Electrochemical assays for microbial analysis: How far they are from solving microbiota and microbiome challenges. *Curr. Opin. Electrochem.* **2020**, *19*, 153–161.
- Pujol-Vila, F.; Villa, R.; Alvarez, M. Nanomechanical Sensors as a Tool for Bacteria Detection and Antibiotic Susceptibility Testing. *Front. Mech. Eng.* **2020**, *6*, 44.
- Syal, K.; Mo, M.; Yu, H.; Iriya, R.; Jing, W.; Guodong, S.; Wang, S.; Crys, T.E.; Haydel, S.E.; Tao, N. Current and emerging technologies for antibiotic susceptibility tests. *Theranostics* **2017**, *7*, 1795–1805.
- Liu, J.; Xing, Y.; Zhou, X.; Chen, G.Y.; Shi, H. Light-sheet skew rays enhanced U-shaped fiber-optic fluorescent immunosensor for Microcystin-LR. *Biosens. Bioelectron.* **2021**, *176*, 112902.
- Cardenas-Rubio, M.C.; Robison, H.M.; Bailey, R.C. Recent advances in environmental and clinical analysis using microarray resonator-based sensors. *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.* **2019**, *10*, 38–46.
- Gupta, B.D.; Shrivastava, A.M.; Usha, S.P. *Optical Sensors for Biomedical Diagnostics and Environmental Monitoring*, 1st ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2017; ISBN 9781315156033.
- Berneschi, S.; Bettazzi, F.; Giannetti, A.; Baldini, F.; Nunzi Conti, G.; Polli, S.; Palchetti, I. Optical whispering gallery mode resonators for label-free detection of water contaminants. *TRAC Trends Anal. Chem.* **2020**, *126*, 115856.
- Miyazaki, C.M.; Shimizu, F.M.; Ferreira, M. 6–Surface Plasmon Resonance (SPR) for Sensors and Biosensors. In *Nanoscale Characterization Techniques*; Da Roz, A.L., Ferreira, M., de Lima Leite, F., Oliveira, O.N.J., Eds.; William Andrew Publishing: Norwich, NY, USA, 2017; pp. 183–200. ISBN 978032349787.
- Lahoda, J.; Oliveira Brett, A.M.; Evtyugyn, G.; Foja, M.; Mascini, M.; Ossow, M.; Palchetti, I.; Palock, E.; Wang, J. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2020**, *92*, 1161–1187.
- Ronkainen, J.H.; Halsall, H.B.; Heineman, W.R. Electrochemical biosensors. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1747–1763.
- Bettazzi, F.; Palchetti, I. Photoelectrochemical biosensors for the determination of nucleic acid cancer biomarkers. *Curr. Opin. Electrochem.* **2018**, *12*, 51–53.
- Vocia, D.; Sosnowska, M.; Bettazzi, F.; Roscigno, G.; Frattini, E.; De Francis, V.; Condorelli, G.; Chitta, R.; D'Souza, F.; Kutner, W.; et al. Direct determination of small RNAs using a biotinylated polythiophene impedimetric biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *87*, 1012–1019.
- Sim, I.; Kinnunen, P.; Albertson, T.; McNaughton, B.H.; Newton, D.W.; Burns, M.A.; Kopelman, R. Asynchronous magnetic bead rotation (AMBR) biosensor in microfluidic droplets for rapid bacterial growth and susceptibility measurements. *Lab. Chip* **2011**, *11*, 2604–2611.

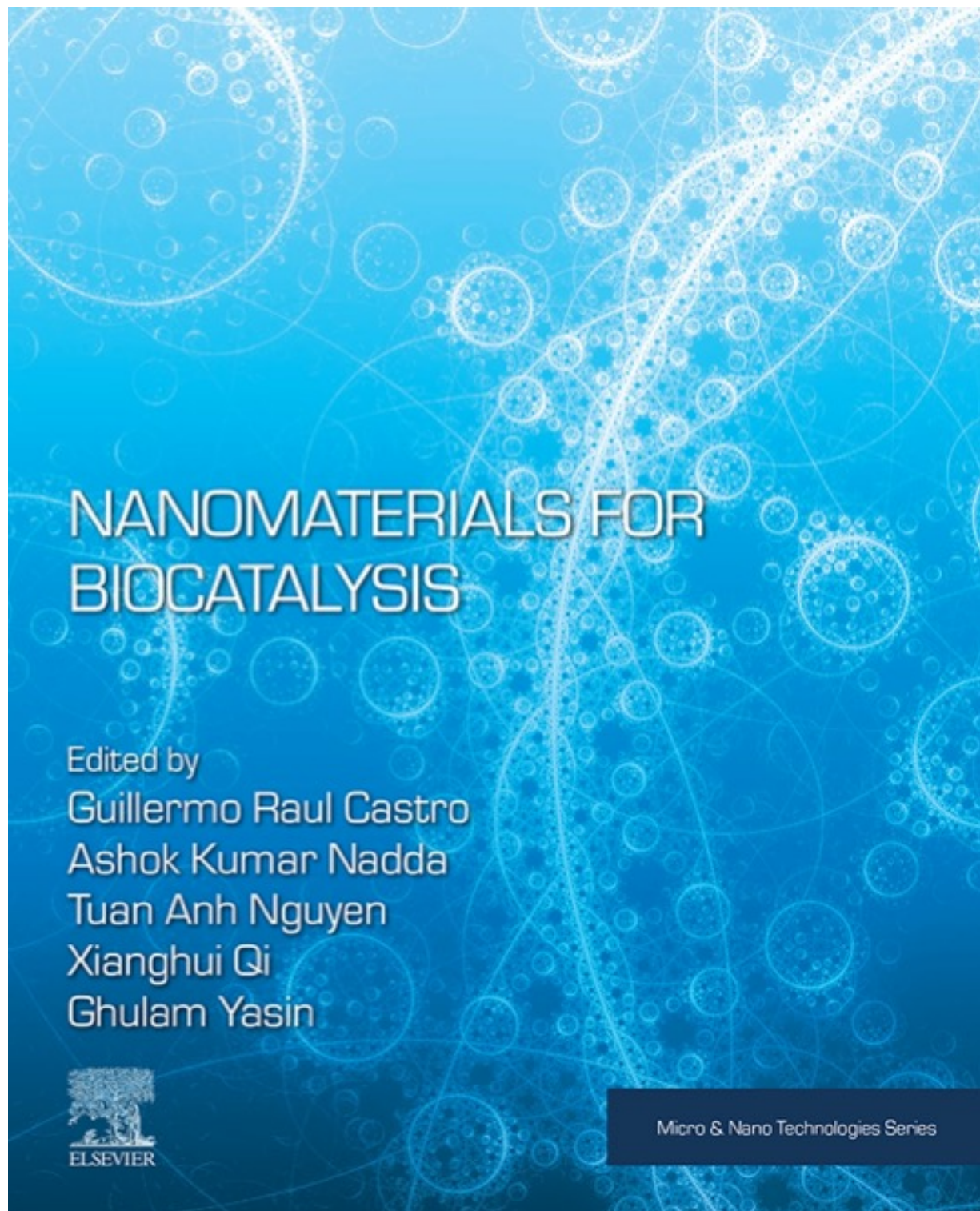
88. Kinnunen, P.; Sinn, I.; McNaughton, B.H.; Kopelman, R. High frequency asynchronous magnetic bead rotation for improved biosensors. *Appl. Phys. Lett.* **2010**, *97*, 223701.
89. Kinnunen, P.; McNaughton, B.H.; Albertson, T.; Sinn, I.; Mofakham, S.; Elbez, R.; Newton, D.W.; Hunt, A.; Kopelman, R. Self-Assembled Magnetic Bead Biosensor for Measuring Bacterial Growth and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Small* **2012**, *8*, 2477–2482.
90. Wang, J.-C.; Chi, S.-W.; Yang, T.-H.; Chuang, H.-S. Label-Free Monitoring of Microorganisms and Their Responses to Antibiotics Based on Self-Powered Microbead Sensors. *ACS Sens.* **2018**, *3*, 2182–2190.
91. Gu, H.; Xu, K.; Xu, C.; Xu, B. Biofunctional magnetic nanoparticles for protein separation and pathogen detection. *Chem. Commun.* **2006**, 941–949.
92. Jha, S.N. Chapter 6—Biosensor. In *Rapid Detection of Food Adulterants and Contaminants*; Jha, S.N., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2016; pp. 125–145. ISBN 9780124200845.
93. Ragavan, K.V.; Neethirajan, S. Chapter 7—Nanoparticles as Biosensors for Food Quality and Safety Assessment. In *Nanomaterials for Food Applications*; López Rubio, A.; Fabra Rovira, M.J.; Martínez Sanz, M.; Gómez-Mascareña, L.G., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 147–202. ISBN 9780128141304.
94. Plácido, A.; Amaral, J.S.; Costa, J.; Fernandes, T.J.R.; Oliveira, M.B.P.P.; Delerue-Matos, C.; Mafra, I. Chapter 12—Novel Strategies for Genetically Modified Organism Detection. In *Genetically Modified Organisms in Food*; Watson, R.R.; Freedy, V.R., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 119–131. ISBN 9780128022597.
95. Reyes, P.J.; Yang, K.; Zheng, A.; Li, R.; Li, G.; Lu, Y.; Tsang, C.K.; Zheng, S.X.F. Dynamic monitoring of antimicrobial resistance using magnesium zinc oxide nanostructure-modified quartz crystal microbalance. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *93*, 189–197.
96. Guliy, O.I.; Zaitsev, B.D.; Borodina, I.A. New approach for determination of antimicrobial susceptibility to antibiotics by an acoustic sensor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 1283–1290.
97. Jin, Y.; Joshi, S.G. Propagation of a quasi-shear horizontal acoustic wave in Z-X lithium niobate plates [and conductivity sensor application]. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **1996**, *43*, 491–494.
98. Kasas, S.; Malovichko, A.; Villalba, M.I.; Vela, M.E.; Yantorno, O.; Willaert, R.G. Nanomotion Detection-Based Rapid Antibiotic Susceptibility Testing. *Small* **2012**, *10*, 287.
99. Dragoman, M.; Dragoman, D. Microelectromechanical Systems. In *Encyclopedia of Condensed Matter Physics*; Bassani, F.; Liedl, G.L.; Wyder, P., Eds.; Elsevier: Oxford, UK, 2005; pp. 415–423. ISBN 9780123694010.
100. Bennett, I.; Pyne, A.L.B.; McKendry, R.A. Cantilever Sensors for Rapid Optical Antimicrobial Sensitivity Testing. *ACS Sens.* **2020**, *5*, 3133–3139.
101. Sinha Ray, S. 4—Techniques for characterizing the structure and properties of polymer nanocomposites. In *Woodhead Publishing Series in Composites Science and Engineering*; Sinha Ray, S., Ed.; Woodhead Publishing: Sawston, UK, 2013; pp. 74–88. ISBN 9780857097774.
102. Stupar, P.; Opota, O.; Longo, G.; Prodrom, G.; Dietler, G.; Greub, G.; Kasas, S. Nanomotion sensor applied to blood culture pellets: A fast approach to determine the antibiotic susceptibility against agents of bloodstream infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **2017**, *23*, 400–405.
103. Kinnunen, P.; Sinn, I.; McNaughton, B.H.; Newton, D.W.; Burns, M.A.; Kopelman, R. Monitoring the growth and drug susceptibility of individual bacteria using asynchronous magnetic bead rotation sensors. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 2751–2755.
104. Sinn, I.; Albertson, T.; Kinnunen, P.; Breslau, D.R.; McNaughton, B.H.; Burns, M.A.; Kopelman, R. Asynchronous Magnetic Bead Rotation Microcosmometer for Rapid, Sensitive, and Label-Free Studies of Bacterial Growth and Drug Sensitivity. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5250–5256.
105. Kinnunen, P.; Carey, M.E.; Craig, E.; Brahmansandra, S.N.; McNaughton, B.H. Rapid bacterial growth and antimicrobial response using self-assembled magnetic bead rotation sensors. *Sens. Actuators B* **2019**, *280*, 265–269.
106. Chung, C.-Y.; Wang, J.-C.; Chuang, H.-S. Rapid Bead-Based Antimicrobial Susceptibility Testing by Optical Diffusometry. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0148664.
107. He, F.; Zhou, J. A new antimicrobial susceptibility testing method of *Escherichia coli* against ampicillin by MSPQC. *J. Microbiol. Methods* **2008**, *68*, 563–567.
108. Wu, Y.; Li, G.; Heng, Y.; Zhao, X.; Reyes, P.L.; Lu, Y. Rapid and dynamic detection of antimicrobial treatment response using spectral amplitude modulation in MZO nanostructure-modified quartz crystal microbalance. *J. Microbiol. Methods* **2020**, *178*, 106071.
109. Ma, F.; Rehman, A.; Sims, M.; Zeng, X. Antimicrobial Susceptibility Assays Based on the Quantification of Bacterial Lipopolysaccharides via a Label Free Lectin Biosensor. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 4385–4393.
110. Ren, J.; Ma, L.; Li, Z.; Lin, Q.; Huang, H.; Li, Y. Simultaneous and early detection of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to antituberculous drugs using an indirect series piezoelectric system. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *43*, 115–119.
111. Wan, Y.; Zhang, D.; Hou, B. Determination of sulphate-reducing bacteria based on vancomycin-functionalised magnetic nanoparticles using a modification-free quartz crystal microbalance. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1847–1850.
112. Mustazzoli, A.; Venturilli, D.; Dinarelli, S.; Brown, K.; Floto, R.A.; Dietler, G.; Fattorini, L.; Kasas, S.; Girasole, M.; Longo, G. A Rapid Unravelling of the Activity and Antibiotic Susceptibility of *Mycobacteria*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e02194-18.
113. Longo, G.; Alonso-Sarduy, L.; Rio, L.M.; Bizzini, A.; Trampuz, A.; Notz, J.; Dietler, G.; Kasas, S. Rapid detection of bacterial resistance to antibiotics using AFM cantilevers as nanomechanical sensors. *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 522–526.
114. Elayash, H.; Khan, M.F.; Kaur, K.; Thundat, T. Microfluidic cantilever detects bacteria and measures their susceptibility to antibiotics in small confined volumes. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12947.

142. Simoska, O.; Stevenson, K.J. Electrochemical sensors for rapid diagnosis of pathogens in real time. *Analyst* **2019**, *144*, 6461–6478.
143. Németh, C.R.; Smith, S.J.; Liu, W.; Meehan, A.H.; Mohamed, R.M.; Labib, M.; Kelly, S.O. Nanoparticle-Mediated Capture and Electrochemical Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 2847–2853.
144. Karbelkar, A.A.; Furst, A.L. Electrochemical Biosensors for Bacterial Infectious Diseases. *ACS Infect. Dis.* **2020**, *6*, 1567–1571.
145. Liang, B.; Li, L.; Tang, X.; Lang, Q.; Wang, H.; Li, F.; Shi, J.; Shen, W.; Palchetti, I.; Mascini, M.; et al. Microbial surface display of glucose dehydrogenase for amperometric glucose biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *45*, 19–24. doi:10.1016/j.bios.2013.01.050.
146. Farabullini, F.; Lucarelli, F.; Palchetti, I.; Marrazza, G.; Mascini, M. Disposable electrochemical sensor for the simultaneous analysis of different bacterial food contaminants. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1544–1549.
147. Voccia, D.; Bellazzi, F.; Frattini, E.; Berli, D.; Palchetti, I. Improving impedimetric nucleic acid detection by using enzyme-decorated liposomes and nanostructured screen-printed electrodes. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 7271–7281.
148. Beitollahi, H.; Mohammadi, S.Z.; Safaei, M.; Tajik, S. Applications of electrochemical sensors and biosensors based on modified screen-printed electrodes: A review. *Anal. Methods* **2020**, *12*, 1547–1560.
149. Hannah, S.; Dobrea, A.; Lasserre, P.; Blair, E.O.; Alcorn, D.; Hoskinson, P.A.; Corrigan, D.K. Development of a Rapid, Antimicrobial Susceptibility Test for *E. coli* Based on Low-Cost, Screen-Printed Electrodes. *Biosensors* **2020**, *10*, 133.
150. Altschell, E.; Mohan, R.; Madh, K.E.; Sin, M.L.Y.; Anilak, V.; Buscari, M.; Wong, P.K.; Gao, Y.; Ranee, N.; Liao, J.-C. Integrated Biosensor Assay for Rapid Uropathogen Identification and Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing. *Eur. Urol. Focus* **2017**, *3*, 293–299.
151. Zhu, Y.; Jović, M.; Lescé, A.; Tissières Lovey, L.; Prudent, M.; Pick, H.; Girault, H.H. Immuno-affinity Amperometric Detection of Bacterial Infections. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2018**, *57*, 14942–14946.
152. Mach, K.E.; Ruchika, M.; Jo, B.E.; Mei-Chung, S.; Vincent, G.; Kim, W.; C., L.J. A Biosensor Platform for Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing Directly From Clinical Samples. *J. Urol.* **2011**, *185*, 148–153.
153. Liao, J.-C.; Mastali, M.; Gao, Y.; Suchard, M.A.; Moller, A.K.; Bruckner, D.A.; Babbitt, J.T.; Li, Y.; Cornebin, J.; Landaw, E.M.; et al. Use of Electrochemical DNA Biosensors for Rapid Molecular Identification of Uropathogens in Clinical Urine Specimens. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 561–570.
154. Vu, Q.K.; Tran, Q.H.; Vu, N.P.; Anh, T.-L.; Dang, T.T. Le; Matteo, T.; Nguyen, T.H.H. A label-free electrochemical biosensor based on screen-printed electrodes modified with gold nanoparticles for quick detection of bacterial pathogens. *Mater. Today Commun.* **2021**, *26*, 101726.
155. Shi, X.; Kadiyala, U.; VanPipps, J.S.; Yau, S.-T. Culture-free bacterial detection and identification from blood with rapid, phenotypic, antibiotic susceptibility testing. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 3416.
156. Mascini, M.; Palchetti, I.; Tombelli, S. Nucleic acid and peptide aptamers: Fundamentals and bioanalytical aspects. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2012**, *51*, 1316–1332.
157. Palchetti, I.; Mascini, M. Electrochemical nanomaterial-based nucleic acid aptasensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 3103–3114.
158. Hasan, M.R.; Pulingam, T.; Appaturi, J.N.; Zifrudin, A.N.; Teh, S.J.; Lim, T.W.; Ibrahim, F.; Leo, B.F.; Thong, K.L. Carbon nanotube-based aptasensor for sensitive electrochemical detection of whole-cell *Salmonella*. *Anal. Biochem.* **2018**, *554*, 34–43.
159. Muntian, S.; Dinesh, J.J.; Teh, S.J.; Lai, C.W.; Ibrahim, F.; Thong, K.L.; Leo, B.F. Graphene-based label-free electrochemical aptasensor for rapid and sensitive detection of foodborne pathogen. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 6893–6905.
160. Jo, N.; Kim, B.; Lee, S.-M.; Oh, J.; Park, I.H.; Jin, Lim, K.; Shin, J.-S.; Yoo, K.-H. Aptamer-functionalized capacitance sensors for real-time monitoring of bacterial growth and antibiotic susceptibility. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *102*, 164–170.
161. Fu, W.; Jiang, L.; van Geest, E.P.; Lima, L.M.C.; Schneider, G.F. Sensing at the Surface of Graphene Field-Effect Transistors. *Adv. Mater.* **2017**, *29*, 1603610.
162. Ping, J.; Vishnubhatta, R.; Vrudhula, A.T.C. Scalable Production of High-Sensitivity, Label-Free DNA Biosensors Based on Back-Gated Graphene Field Effect Transistors. *ACS Nano* **2016**, *10*, 8700–8704.
163. Thakur, B.; Zhou, G.; Chang, C.; Wang, H.; Jin, B.; Sui, X.; Yuan, X.; Yang, C.-H.; Magdur, M.; Chen, J. Rapid detection of single *E. coli* bacteria using a graphene-based field-effect transistor device. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *110*, 16–22.
164. Wu, G.; Dai, Z.; Tang, X.; Lin, Z.; Lo, P.K.; Meryampam, M.; Lai, K.W.C. Graphene Field-Effect Transistors for the Sensitive and Selective Detection of Ochratoxin A Using Pyrene-Tagged DNA Aptamer. *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, *6*, 1700736.
165. Kumar, N.; Wang, W.; Ortiz-Marquez, J.C.; Catalano, M.; Gray, M.; Biglari, N.; Hikari, K.; Ling, X.; Gao, J.; van Opipien, T.; et al. Dielctrophoresis assisted rapid, selective and single cell detection of antibiotic resistant bacteria with G-FETs. *Biosens. Bioelectron.* **2020**, *156*, 112123.
166. Ren, Y.; Ji, J.; Sun, J.; Pi, F.; Zhang, Y.; Sun, X. Rapid detection of antibiotic resistance in *Salmonella* with screen printed carbon electrodes. *J. Solid State Electrochem.* **2020**, *24*, 1539–1549.
167. Lee, K.-S.; Lee, S.-M.; Oh, J.; Park, H.J.; Song, H.J.; Han, M.; Yong, D.; Lim, K.J.; Shin, J.-S.; Yoo, K.-H. Electrical antimicrobial susceptibility testing based on aptamer-functionalized capacitance sensor array for clinical isolates. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 13709.
168. Hannah, S.; Addington, E.; Alcorn, D.; Shu, W.; Hoskinson, P.A.; Corrigan, D.K. Rapid antibiotic susceptibility testing using low-cost, commercialized screen-printed electrodes. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *145*, 111696.
169. Mishra, P.; Singh, D.; Mishra, K.P.; Kaur, G.; Dhull, N.; Tomar, M.; Gupta, V.; Kumar, B.; Ganju, L. Rapid antibiotic susceptibility testing by resazurin using thin film platform as a bio-electrode. *J. Microbiol. Methods* **2019**, *162*, 69–76.

115. Villalba, M.I.; Stupar, P.; Chomicki, W.; Bertacchi, M.; Dietler, G.; Arnal, I.; Vela, M.E.; Yantorno, O.; Kasas, S. Nanomotion Detection Method for Testing Antibiotic Resistance and Susceptibility of Slow-Growing Bacteria. *Small* **2018**, *14*, 1702671.
116. Qureshi, A.; Niaz, J.H. Biosensors for detecting viral and bacterial infections using host biomarkers: A review. *Analytical* **2020**, *145*, 7825–7848.
117. Moran, K.; Fitzgerald, J.; McPartlin, D.A.; Loftus, J.H.; O’Kennedy, R. Chapter 4—Biosensor-Based Technologies for the Detection of Pathogens and Toxins. In *Biosensors for Sustainable Food—New Opportunities and Technical Challenges*; Scognamiglio, V.; Rea, G.; Arduini, F.; Palleschi, G., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; Volume 74, pp. 93–120. ISBN 0166526X.
118. Ye, Y.; Wu, T.; Jiang, X.; Cao, J.; Ling, X.; Mei, Q.; Chen, H.; Han, D.; Xu, J.-J.; Shen, Y. Portable Smartphone-Based QDs for the Visual Onsite Monitoring of Fluoroquinolone Antibiotics in Actual Food and Environmental Samples. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 14552–14562.
119. Chen, F.-E.; Kaushik, H.; Hsieh, K.; Chang, E.; Chen, L.; Zhang, P.; Wang, T.-H. Toward Decentralizing Antibiotic Susceptibility Testing via Ready-to-Use Microwell Array and Resazurin-Aided Colorimetric Readout. *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 1260–1265.
120. Sun, J.; Warden, A.R.; Huang, J.; Wang, W.; Ding, X. Colorimetric and Electrochemical Detection of *Escherichia coli* and Antibiotic Resistance Based on a p-Benzoylquinone-Mediated Bioassay. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 7524–7530.
121. Moan, T.; Mateo, C.T.; Pop, T.; Mosteanu, O.; Buzoiu, A.D.; Paia, C.; Iancu, C.; Moan, L. Development of nanoparticle-based optical sensors for pathogenic bacteria detection. *J. Nanobiotechnology* **2017**, *15*, 25.
122. Kadlec, M.W.; You, D.; Liao, J.C.; Wong, P.K. A Cell Phone-Based Microphotometric System for Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing. *J. Lab. Autom.* **2014**, *19*, 258–266.
123. Nazemi, E.; Hasen, W.M.; Frost, E.H.; Dubowski, J.J. Monitoring growth and antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* with photoluminescence of GaAs/AlGaAs quantum well microstructures. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *93*, 234–240.
124. Tang, Y.; Zhen, L.; Liu, J.; Wu, J. Rapid antibiotic susceptibility testing in a microfluidic pH sensor. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 2787–2794.
125. Nag, P.; Sadani, K.; Mukherji, S.; Mukherji, S. Beta-lactam antibiotics induced bacteriolysis on LSPR sensors for assessment of antimicrobial resistance and quantification of antibiotics. *Sens. Actuators B Chem.* **2020**, *311*, 127945.
126. Adya, A.K.; Cantello, E. Chapter 16—Nanotechnology and its applications to animal biotechnology, 2nd ed.; In *Animal Biotechnology*; Verma, A.S.; Singh, A., Eds.; Academic Press: Boston, MA, USA, 2020; pp. 309–326. ISBN 9780128117101.
127. Uzunoglu, D.; Altunbek, M.; Kuku, G.; Culha, M. Chapter 8—Single-Cell Omics in Noninvasive Diagnosis and Testing—Surface-Enhanced Raman Spectroscopy-Based Approach. In *Single-Cell Omics*; Barh, D.; Azevedo, V.B., Eds.; Academic Press: Boston, MA, USA, 2019; pp. 153–177. ISBN 9780128149195.
128. Mood, B.R.; Kochan, K.; Marzec, K.M. Chapter 13—Resonance Raman spectroscopy of hemoglobin in red blood cells. In *Vibrational Spectroscopy in Protein Research*; Ozaki, Y.; Baranska, M.; Lednev, I.K.; Wood, B.R., Eds.; Academic Press: Boston, MA, USA, 2020; pp. 375–414. ISBN 9780128186107.
129. Bi, L.; Wang, X.; Cao, X.; Liu, L.; Bai, C.; Zheng, Q.; Choo, J.; Chen, L. SERS-active Au@Ag core-shell nanorod (Au@AgNR) tags for ultrasensitive bacteria detection and antibiotic-susceptibility testing. *Talanta* **2020**, *220*, 121397.
130. Zhu, P.; Bian, X.; Zhang, H.; Wen, Y.; Chen, Q.; Yan, Y.; Li, L.; Liu, G.; Yan, J. Controllable design of a nano-bio aptasensing interface based on tetrahedral framework nucleic acids in an integrated microfluidic platform. *Biosens. Bioelectron.* **2021**, *175*, 112943.
131. Thrift, W.J.; Ronaghi, S.; Samad, M.; Wei, H.; Nguyen, D.G.; Cebuslay, A.S.; Groom, C.E.; Santiago, P.J.; Baldi, P.; Hochbaum, A.J.; et al. Deep Learning Analysis of Vibrational Spectra of Bacterial Lysate for Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing. *ACS Nano* **2020**, *14*, 15336–15348.
132. He, P.J.W.; Katis, I.N.; Kumar, A.J.U.; Bryant, C.A.; Keovil, C.W.; Somani, B.K.; Mahobia, N.; Eason, R.W.; Sones, C.L. Laser-patterned paper-based sensors for rapid point-of-care detection and antibiotic-resistance testing of bacterial infections. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *112*, 110208.
133. Ucak Oskaya, G.; Durak, M.Z.; Akyar, I.; Karatuna, O. Antimicrobial Susceptibility Test for the Determination of Resistant and Susceptible *S. aureus* and *Enterococcus* spp. Using a Multi-Channel Surface Plasmon Resonance Device. *Diagnostics* **2019**, *9*, 191.
134. Gahlaut, S.K.; Kalyani, N.; Sharan, C.; Mishra, P.; Singh, P.P. Smartphone based dual mode in situ detection of viability of bacteria using Ag nanorods array. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *126*, 478–484.
135. Kaushik, A.M.; Hsieh, K.; Chen, L.; Shin, D.J.; Liao, J.C.; Wang, T.-H. Accelerating bacterial growth detection and antimicrobial susceptibility assessment in integrated planar droplet platform. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *97*, 260–266.
136. Subhachandani, P.; Sarkar, S.; Zucchi, P.C.; Whitfield, B.A.; Kirby, J.E.; Hirsch, E.B.; Korry, T. Integrated microfluidic platform for rapid antimicrobial susceptibility testing and bacterial growth using bead-based biosensor via fluorescence imaging. *Microchim. Acta* **2017**, *184*, 4619–4628.
137. Wang, P.; Pang, S.; Zhang, H.; Fan, M.; He, L. Characterization of *Lactococcus lactis* response to ampicillin and ciprofloxacin using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 933–941.
138. Mohan, R.; Mukherjee, A.; Sevgen, S.E.; Sarpitkar, C.; Lee, J.; Schroeder, C.M.; Kenis, P.J.A. A multiplexed microfluidic platform for rapid antibiotic susceptibility testing. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *48*, 118–125.
139. Chiang, Y.-L.; Lin, C.-H.; Yen, M.-Y.; Su, Y.-D.; Chen, S.-J.; Chen, H. Innovative antimicrobial susceptibility testing method using surface plasmon resonance. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1905–1910.
140. Fu, S.; Wang, X.; Wang, T.; Li, Z.; Han, D.; Yu, C.; Yang, C.; Qu, H.; Chi, H.; Wang, Y.; et al. A sensitive and rapid bacterial antibiotic susceptibility test method by surface enhanced Raman spectroscopy. *Brazillian J. Microbiol.* **2020**, *51*, 875–881.
141. Beronova, S.; Rebořková, K.; Plát, Z.; Šerý, M.; Gievký, A.; Samek, O.; Jeleš, J.; Šiler, M.; Křivský, M.; Klementová, T.; et al. Rapid detection of antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* by Raman tensors. *Eur. Phys. J. Plus* **2021**, *36*, 1233.
142. Rueda, D.; Furukawa, R.; Fuentes, P.; Comina, G.; Rey De Castro, N.G.; Requena, D.; Gilman, R.H.; Sheen, P.; Zimic, M. A novel electrochemical sensor for pyrazinamide acid as a potential tool for the identification of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Mycobacteriology* **2018**, *7*, 275–281.
143. Sitkov, N.O.; Zimina, T.M.; Soloviev, A.V. Development of impedimetric sensor for E.coli M-17 antibiotic susceptibility testing. In Proceedings of the 2018 IEEE Conference of Russian Young Researchers in Electrical and Electronic Engineering (EIConRus), Moscow and St. Petersburg, Russia, 29 January–1 February 2018; pp. 1227–1230.
144. Ibarburea, B.; Rim, T.; Baek, C.K.; Cho, J.; Asagawa, M.; Baraban, L.; Cuniberti, G. Nanowire sensors monitor bacterial growth kinetics and response to antibiotics. *Lab. Chip* **2017**, *17*, 4282–4293.
145. Nyiruchosa, S.; Limbut, W.; Numnum, A.; Asawatratanakul, P.; Kanatharan, P.; Thavarungkul, P. Capacitive antibacterial susceptibility screening test with a simple renewable sensing surface. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *96*, 84–88.
146. Safavi, M.; Pandya, H.J.; Venkataraman, M.; Thirumalaraju, P.; Kanakasabapathy, M.K.; Singh, A.; Prabhakar, D.; Chug, M.K.; Shafiee, H. Rapid Real-Time Antimicrobial Susceptibility Testing with Electrical Sensing on Plastic Microchips with Printed Electrodes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 12832–12840.
147. Abehayneh, G.; Hryhryk, D.H.; McIntire, T.W.; Nguyen, T.C.; Nasr, B.; Zantomo, D.; Chana, G.; Abbott, I.; Cheong, P.; Catton, M.; et al. Lab on a chip sensor for rapid detection and antibiotic resistance determination of *Staphylococcus aureus*. *Analyst* **2016**, *141*, 1928–1939.
148. Török, M.E.; Cooke, F.J.; Moran, E. Basics of Antimicrobials. In *Oxford Handbook of Infectious Diseases and Microbiology*; Torok, M.E.; Moran, E.; Cooke, F., Eds.; Oxford University Press: Oxford, UK, 2016; pp. 3–30. ISBN 9780199671328.
149. Vikesland, P.J.; Pruden, A.; Alvarez, P.J.J.; Aga, D.; Bu, H.; Li, X.; Mania, C.M.; Nambi, I.; Wigginton, K.; Zhang, T. Toward a Comprehensive Strategy to Mitigate Dissemination of Environmental Sources of Antibiotic Resistance. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51*, 1260–1269.
150. Haddad, M.; Sola, C.; Raouafi, N.; Korri-Yousoufi, H. E-DNA detection of rpoB gene resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in real samples using Fe3O4/polypropylene nanocomposite. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *128*, 76–82.
151. Bizid, S.; Bilal, S.; Milka, R.; Haj Said, A.; Korri-Yousoufi, H. Direct E-DNA sensor of *Mycobacterium tuberculosis* mutant strain based on new nanocomposite transducer (Fc-α-OMP/AMWCNTs). *Talanta* **2018**, *184*, 475–483.
152. Rachkov, A.; Patskovsky, S.; Soldatkin, A.; Meunier, M. Surface plasmon resonance detection of oligonucleotide sequences of the rpoB gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Talanta* **2011**, *55*, 2094–2099.
153. Matishin, M.; Rachkov, A.; Lopatynskiy, A.; Chegal, V.; Soldatkin, A.; El’skaya, A. Selective Amplification of rpoB Biosensor Signal for Recognition of rpoB Gene Fragments by Use of Gold Nanoparticles Modified by Thiolated DNA. *Nanoscale Res. Lett.* **2017**, *12*, 252.
154. Hu, C.; Kals, S.; Zeimpekis, I.; Sun, K.; Ashburn, P.; Turner, C.; Sutton, J.M.; Morgan, H. Ultra-fast electronic detection of antimicrobial resistance genes using isothermal amplification and Thin Film Transistor sensors. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *96*, 281–287.
155. Sadat Mousavi, P.; Smith, S.J.; Chen, J.B.; Karlikow, M.; Tinaraf, A.; Robinson, C.; Liu, W.; Ma, D.; Green, A.A.; Kelley, S.O.; et al. A multiplexed, electrochemical interface for gene-circuit-based sensors. *Nat. Chem.* **2020**, *12*, 48–55.
156. Wang, T.; Zhang, Z.; Li, Y.; Xie, G. Amplified electrochemical detection of mecA gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* based on target recycling amplification and isothermal strand-displacement polymerization reaction. *Sens. Actuators B Chem.* **2015**, *221*, 148–154.
157. Huang, J.M.-Y.; Henihan, G.; Macdonald, D.; Michalowski, A.; Templeton, K.; Gibb, A.P.; Schulze, H.; Bachmann, T.T. Rapid Electrochemical Detection of New Delhi Metallo-beta-lactamase Genes To Enable Point-of-Care Testing of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 7738–7745.
158. Maier, T.; Kainz, K.; Barisic, I.; Hainberger, R. An Impedimetric Sensor for Real-Time Detection of Antibiotic Resistance Genes Employing Rolling Circle Amplification. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2015**, *10*, 2026–2034.
159. Maldonado, J.; González-Guerrero, A.B.; Fernández-Gavella, A.; González-López, J.J.; Lechuga, L.M. Ultrasensitive Label-Free Detection of Unamplified Multidrug-Resistance Bacteria Genes with a Bimodal Waveguide Interferometer Biosensor. *Diagnostics* **2020**, *10*, 85.
160. Hu, S.; Niu, L.; Zhao, F.; Yan, L.; Nong, J.; Wang, C.; Gao, N.; Zhu, X.; Wu, L.; Bo, T.; et al. Identification of *Acinetobacter baumannii* and its carbapenem-resistant gene blaOXA-23-like by multiple cross displacement amplification combined with lateral flow biosensor. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 17888.
161. Lu, S.; Du, J.; Sun, Z.; Jing, C. Hairpin-Structured Magnetic SERS Sensor for Tetracycline Resistance Gene tetA Detection. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 16229–16235.
162. Meier, G.C.; Wall, T.; Stett, M.A.; Brown, O.; Robison, R.; Hawkins, A.R.; Schmidt, H. 7⁺ multiplexed, optofluidic detection of nucleic acids for antibiotic-resistance bacterial screening. *Opt. Express* **2020**, *28*, 33019–33027.
163. Bizid, S.; Bilal, S.; Milka, R.; Haj Said, A.; Korri-Yousoufi, H. Direct Electrochemical DNA Sensor based on a new redox oligomer modified with ferrocene and carboxylic acid: Application to the detection of *Mycobacterium tuberculosis* mutant strain. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *994*, 10–18.
164. Bengtson, H.N.; Homolka, S.; Niemann, S.; Reis, A.J.; da Silva, P.E.; Gerasimova, Y.V.; Kolpaschikov, D.M.; Rohde, K.H. Multiplex detection of extensively drug resistant tuberculosis using binary deoxyribozyme sensors. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *94*, 176–183.

6.2. Capítulo de libro en editorial Elsevier

Reynoso, E. C., Romero-Guido, C., Rebollar-Pérez, G., & Torres, E. (2022). Enzymatic biosensors for the detection of water pollutants. In *Nanomaterials for biocatalysis* (pp. 463-511). Elsevier.



Elsevier

Radarweg 29, PO Box 211, 1000 AE Amsterdam, Netherlands

The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, United Kingdom

50 Hampshire Street, 5th Floor, Cambridge, MA 02139, United States

Copyright © 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

No part of this publication may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher. Details on how to seek permission, further information about the Publisher's permissions policies and our arrangements with organizations such as the Copyright Clearance Center and the Copyright Licensing Agency, can be found at our website: www.elsevier.com/permissions.

This book and the individual contributions contained in it are protected under copyright by the Publisher (other than as may be noted herein).

Notices

Knowledge and best practice in this field are constantly changing. As new research and experience broaden our understanding, changes in research methods, professional practices, or medical treatment may become necessary.

Practitioners and researchers must always rely on their own experience and knowledge in evaluating and using any information, methods, compounds, or experiments described herein. In using such information or methods they should be mindful of their own safety and the safety of others, including parties for whom they have a professional responsibility.

To the fullest extent of the law, neither the Publisher nor the authors, contributors, or editors, assume any liability for any injury and/or damage to persons or property as a matter of products liability, negligence or otherwise, or from any use or operation of any methods, products, instructions, or ideas contained in the material herein.

British Library Cataloguing-in-Publication Data

A catalogue record for this book is available from the British Library

Library of Congress Cataloging-in-Publication Data

A catalog record for this book is available from the Library of Congress

ISBN: 978-0-12-824436-4

For Information on all Elsevier publications
visit our website at <https://www.elsevier.com/books-and-journals>

Publisher: Matthew Deans

Acquisitions Editor: Simon Holt

Editorial Project Manager: Gabriela D. Capille

Production Project Manager: Prasanna Kalyanaraman

Cover Designer: Greg Harris

Typeset by MPS Limited, Chennai, India



CHAPTER 16

Enzymatic biosensors for the detection of water pollutants

Eduardo C. Reynoso¹, Cynthia Romero-Guido¹, Georgette Rebollar-Pérez² and Eduardo Torres¹

¹Institute of Sciences, Meritorious Autonomous University of Puebla, Puebla, Mexico

²Faculty of Chemical Engineering, Meritorious Autonomous University of Puebla, Puebla, Mexico

16.1 Introduction

Biosensors are environmental monitoring tools that can be used to assess chemical or biological contamination of water. These devices can detect some compounds such as pesticides, drugs, metals, benzene and its derivatives, and pathogenic microorganisms (Bhalla, Jolly, Formisano, & Estrela, 2016; Rebollar-Pérez, Campos-Terán, Ornelas-Soto, Méndez-Albores, & Torres, 2016; Rodríguez-Mozaz, López-de-Alda, Marco, & Barceló, 2005; Rodríguez-Mozaz, Lopez de Alda, & Barceló, 2006). The union of nanomaterials and enzymes, which adds the physicochemical properties of nanomaterials to the kinetic and specificity characteristics of enzymes, has produced a number of methods and devices with interesting potential in the environmental field. The demand and interest in enzymatic biosensors in the environmental area has increased due to three main reasons: the increasing amount of chemical substances found in water bodies due to the continuous disposal of effluents that are not properly treated; the increasingly strict and comprehensive regulations for their monitoring; and the high cost and long processing or analysis times of some conventional detection methods (Lazcka, Campo, & Muñoz, 2007; Nigam & Shukla, 2015; Tian, Greplová, Frébort, Dale, & Napier, 2014). According to the IUPAC definition, an enzyme biosensor is a device that uses specific enzyme-mediated biochemical reactions to detect chemical compounds through electrical, thermal, or optical signals derived from enzyme catalysis. In this definition, the enzyme must be in intimate contact or integrated with a transducer. For this purpose, an additional element placed between the enzyme and the transducer is used to improve the functionality of the biosensor, either by providing greater stability or by amplifying the signal. The interfaces increasingly used are organic, inorganic, or hybrid nanomaterials (Holzinger, Le Goff, & Cosnier, 2014; Kucherenko, Soldatkin, Kucherenko, Soldatkina, & Dzyadevych, 2019). Fig. 16.1 outlines the elements that make up an enzymatic biosensor, and includes the important definitions in the performance of a biosensor. Biosensors are portable, cost-effective, fast, and easy-to-operate devices that have demonstrated performance characteristics that are competitive to

6.3. Artículo de divulgación científica

Reynoso Camargo E. C., Chavarin-Pineda Y., Torres Ramírez E. (2023). Estudio sobre los contaminantes emergentes en México. *MIX TEC*, 3(5): 120-129.



ESTUDIO SOBRE LOS CONTAMINANTES EMERGENTES EN MÉXICO

STUDY ON EMERGING POLLUTANTS IN MEXICO

Reynoso Camargo E. C.¹, Chavarin-Pineda Y.², Torres Ramírez E.^{1,3*}

¹Posgrado en Ciencias Ambientales, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Prolongación de la 14 Sur 6301, Bugambillas 3ra Sección, 72580 Puebla, Pue., 22295500 ext. 7056

²Centro de Investigación en Ciencias Agrícolas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Av. San Claudio 1814, Jardines de San Manuel, 72570 Puebla, Pue., 22295500 ext. 5240

³Centro de Química, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Boulevard Carlos Camacho SN, Cd Universitaria, 72570 Puebla, Pue., 22295500 ext. 7273

* Autor de correspondencia: eduardo.torres@correo.buap.mx

Recibido: 10/abril/2023

Aceptado: 27/junio/2023

RESUMEN

Con el acelerado crecimiento de la población, el incremento de productos para todo tipo de necesidades ha desarrollado una problemática crítica en los ecosistemas, la presencia de contaminantes emergentes. Estas sustancias son fuente de gran preocupación social y en la comunidad científica debido al potencial ecotoxicológico y en la salud humana. En este trabajo analizamos las fuentes, distribución y destino de los contaminantes emergentes, así como una revisión bibliográfica de los avances en materia de evaluación de la toxicidad, monitoreo en la presencia y diferentes procesos de eliminación que se realizan en los principales centros de investigación y académicos en

México. El estudio de contaminantes emergentes en México inicia en el año 2007 pero con una cantidad reducida de investigaciones, 10 años después crece el interés de la comunidad científica para estos compuestos. La situación actual se torna preocupante debido el descubrimiento de alteraciones producidas que antes no se conocían y a la abundante presencia resultado de los monitores realizados. Es necesario desarrollar nuevas tecnologías y conciencia social para hacer frente a esta problemática que se acrecienta globalmente.

Palabras clave: revisión bibliográfica; contaminantes emergentes; monitoreo ambiental

6.4. Estancia de investigación académica internacional

Estancia de investigación en la Universidad de Florencia, Italia para el desarrollo y validación de biosensores electroquímicos para la detección de genes de resistencia a sulfonamidas.



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DIPARTIMENTO
DI CHIMICA
"UGO SCHIFF"

Firenze, 21 December 2022

To Whom it May Concern

This letter is to inform that Mr. Eduardo Canek Reynoso Camargo, PhD Student in Environmental Sciences from the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, have resided in the Chemistry Department "Ugo Schiff" of the University of Florence, from September 1st 2022 to December 14, 2022. During his scientific visit in the lab, he worked on the development of a genosensor for the detection of antimicrobial resistance genes. Specific work he has accomplished are summarized below:

- Development of an electrochemical genoassy
- Characterization of a microfluidic platform.
- Enhanced experimental expertise in electrochemical assay.

Sincerely yours
Best regards

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Ilaria Palchetti".

Prof. Ilaria Palchetti



Prof. Palchetti Ilaria,
Via della Lastruccia, 3/13 – 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy
Ph (direct): +39 055 4573323; e-mail: ilaria.palchetti@unifi.it

6.5. Participación en congreso internacional

Ponencia en la VIII Convención Iberoamericana sobre Medio Ambiente y Sustentabilidad.



UNIVERSIDAD NACIONAL
RED IBEROAMERICANA DE
MEDIO AMBIENTE

PAN AMERICAN FOUNDATION FOR
INTERNATIONAL COOPERATION
FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT

UNIVERSIDAD CENTRO PANAMERICANO
DE ESTUDIOS SUPERIORES

Confieren el presente
CERTIFICADO
A:

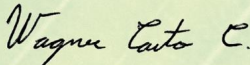
EDUARDO CANEK REYNOSO CAMARGO

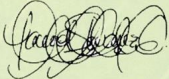
Por la presentación de la ponencia titulada:

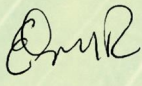
**“Análisis del discurso de dos gobiernos municipales del estado de Puebla (México)
referente al interés público sobre la resistencia a los antimicrobianos”**

En la **VIII CONVENCIÓN IBEROAMERICANA SOBRE AMBIENTE Y SUSTENTABILIDAD**,
evento organizado por la Universidad Nacional de Costa Rica
del 6 al 10 de junio de 2022, con una duración de 40 horas académicas

Tomo: **VI-SCICUDS** Folio **2020** No. **096-048**


MEd. Wagner Castro Castillo
Presidente Comité Organizador
Universidad Nacional


MSc. Yamel Álvarez Gutiérrez
Secretaria General
REIMA, A.C., Ecuador


Msc. Eugenio Landeiro Reyes
Presidente
PAFICSD, Canadá


MSc. Jazmín Flores Chávez
Directora Académica
UNICEPES, México





BUAP

6.6. Seminarios de avance de tesis

Participación en seminarios del cuerpo académico para la divulgación de los avances de tesis.

La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
A través del Instituto de Ciencias
otorga la presente

CONSTANCIA

A: Eduardo Canek Reynoso Camargo

Por haber asistido al Seminario en Línea
Avance de Tesis Otoño 2020
Realizado del 6 al 27 de noviembre de 2020
Con una duración de 10 horas

"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., a 05 de marzo de 2021

Dr. Carlos Contreras Cruz
Director General de Educación Continua

6.7. Retribución social

Participación como docente en la Licenciatura de Biotecnología perteneciente a la Facultad de Biología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla en las asignaturas de Química Analítica y Técnicas de Biología Molecular para la Detección de microorganismos patógenos.



Oficio No. BIOSAC/C-034/2022
Asunto: Se indica

A QUIEN CORRESPONDA PRESENTE

Por este conducto le envío un cordial saludo y a la vez se hace constar que el profesor **EDUARDO CANEK REYNOSO CAMARGO** participó como colaborador en la Licenciatura en Biotecnología, con carga académica frente a grupo en el periodo de Otoño 2021, correspondiente al Plan de Estudios:

MATERIA	CLAVE	NRC	SECC	DIA	HORA
Química Analítica	LBTS007	21747	OOS	AJ	1500-1659
				M	1000-1259

Sin más por el momento y agradeciendo la atención prestada, quedo de Usted.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., a 12 de enero de 2022

Dr. Salvador Galicia Isasmendi
Director
Oficio No. BIOSAC/C-034/2022
Asunto: Se indica



Facultad de
Ciencias Biológicas

Edif. 1 BIO 1, Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00
Ext. 7097, 7085, 7084 y 7086



BUAP



Facultad de Ciencias Biológicas
BUAP



La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

A través de la Facultad de Ciencias Biológicas

otorga la presente

CONSTANCIA

A: **M.C. Eduardo Canek Reynoso Camargo**

Por su participación como INSTRUCTOR del Curso Práctico Verano 2022:
" **Técnicas de Biología Molecular para la detección de Microorganismos Patógenos**"
realizado en la Facultad de Ciencias Biológicas-BUAP
del 06 al 10 de junio de 2022
con valor curricular de 20 horas prácticas.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., a 10 de agosto de 2022

Dr. Salvador Galicia Isasmendi

Director de la Facultad de Ciencias Biológicas
Cursos Prácticos Verano 2022. No de registro 02FCBDIR

