



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Escherichia coli ENTEROPATÓGENA EN UN EFLUENTE
TRATADO DE LA CIUDAD DE PUEBLA, RESISTENTE A
ANTIBIÓTICOS Y A METALES PESADOS

Tesis presentada para obtener el título de
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:
CLAUDIA CECILIA CORDERO ARELLANO

DIRECTORA:
DRA. EDITH CHÁVEZ BRAVO
CICM-ICUAP



MARZO 2018

ÍNDICE

ÍNDICE.....	2
ÍNDICE DE TABLAS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	6
ABREVIATURAS.....	7
1 RESUMEN.....	9
2 INTRODUCCIÓN.....	10
3 MARCO TEÓRICO.....	12
3.1 Impacto del agua residual a nivel mundial y nacional.....	12
3.2 El agua residual de la ciudad de Puebla.....	14
3.3 Aguas tratadas.....	15
3.4 Microorganismos patógenos del agua residual.....	17
3.5 <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).....	19
3.5.1 Resistencia a antibióticos.....	20
3.5.2 Resistencia a metales pesados.....	21
4 ANTECEDENTES.....	23
4.1 Contaminación del río Atoyac.....	23
4.2 Tratamiento del agua residual en el río.....	24
4.3 Reportes de la existencia de patogrupos de <i>Escherichia coli</i> en el río.....	26
4.4 Impacto en la salud por la existencia de EPEC con resistencia a antibióticos y a metales pesados.....	27
5 JUSTIFICACIÓN.....	29

6	OBJETIVOS.....	30
7	HIPÓTESIS.....	31
8	MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
	8.1 Procedimiento de recuperación de cepas.....	32
	8.2 Detección molecular de cepas EPEC.....	32
	8.3 Determinación de la resistencia a antibióticos.....	34
	8.4 Determinación de la resistencia a metales pesados.....	35
	8.5 Comparación de los factores de virulencia de susceptibilidad a antibióticos y de resistencia a metales pesados de las cepas EPEC....	35
9	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
	9.2 Detección molecular de cepas EPEC.....	36
	9.3 Determinación de la resistencia a antibióticos.....	38
	9.3.1 Multiresistencia de cepas <i>E. coli</i>	42
	9.4 Determinación de la resistencia a metales pesados.....	45
	9.5 Comparación de los factores de virulencia de susceptibilidad a antibióticos y de resistencia a metales pesados de las cepas EPEC....	47
10	CONCLUSIONES.....	51
11	BIBLIOGRAFÍA.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales del río Atoyac del estado de Puebla.....	25
Tabla 2. Ciclos de temperaturas utilizados para la replicación de los amplicones de los genes de virulencia <i>eae</i> y <i>bfpA</i> pertenecientes a EPEC.....	33
Tabla 3. Patrones de resistencia a antibióticos de cepas <i>E. coli</i> aisladas del río Atoyac.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Cepas de <i>E. coli</i> en medio MacConkey.....	32
Fig. 2 Gel de agarosa con los amplicones <i>eae</i> y <i>bfpA</i> . Carril M: marcador de peso molecular (1 Kb), 1: gen <i>eae</i> , 2: gen <i>bfpA</i>	36
Fig. 3 Gel de agarosa con los amplicones <i>eae</i> y <i>bfpA</i> de 2 cepas <i>E. coli</i> (Claves: 1bc y 2a). Carril M: marcador de peso molecular (1 Kb), 3-4: gen <i>eae</i> y <i>bfpA</i> , 7-8: gen <i>eae</i> y <i>bfpA</i>	37
Fig. 4 Gel de agarosa con el amplicones <i>bfpA</i> de 3 cepas <i>E. coli</i> (Claves: 1ac, 2aB y 2cb). Carril M: marcador de peso molecular (1 Kb), 4: gen <i>bfpA</i> , 8: gen <i>bfpA</i> , 12: gen <i>bfpA</i>	37
Fig. 5 Crecimiento de las cepas <i>E. coli</i> en agar Müller-Hinton adicionado con los metales: molibdeno (NaMoO_4) y hierro (FeCl_3) A: metal molibdeno (NaMoO_4), B: metal hierro (FeCl_3).....	45

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Porcentaje total de cepas <i>E. coli</i> resistentes a antibióticos.....	39
Gráfica 2 Comparación de la resistencia a antibióticos de todas las cepas <i>E. coli</i> aisladas.....	40
Gráfica 3 Comparación de los porcentajes de cepas de <i>E. coli</i> resistentes a metales pesados.....	46
Gráfica 4 Porcentaje de cepas EPEC con susceptibilidad y resistencia a antibióticos y resistencia a 2 metales pesados.....	48
Gráfica 5 Porcentaje de cepas EPEC con susceptibilidad y resistencia a antibióticos y resistencia a 3 metales pesados.....	48

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
AK	Amikacina	<i>eae</i>	Gen de virulencia que codifica para EPEC
Al	Aluminio	EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
AM	Ampicilina	EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
As	Arsénico	EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
Bfp	Bundle-forming pilus	EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena
<i>BfpA</i>	Gen de virulencia que codifica para EPEC	ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
Caldo LB	Medio Luria Bertani	FAO	Organización de las Naciones Unidas para La Alimentación y la Agricultura
CB	Carbenicilina	Fe	Hierro
Cd	Cadmio	FeCl ₃	Cloruro Férrico
CF	Cefalotina	GE	Gentamicina
CF	Coliformes fecales	Hg	Mercurio
CFX	Cefotaxima	I	Intermedio
CIP	Ciprofloxacino	IA	Irrigación Agrícola
CL	Clorafenicol	IMP	Imipenem
Co	Cobalto	Kb	Kilobase
CONAGUA	Comisión Nacional del Agua	KZ	Cefazolina
CoSO ₄	Sulfato de cobalto	LMP	Límite máximo permisible
Cr	Cromo	LV	Levofloxacina
CRO	Ceftriaxona	m ³ . s ⁻¹	Metro cúbico por segundo
CT	Coliformes totales	mM	Milimolar
Cu	Cobre		
CuCl	Cloruro de cobre I		
DAEC	<i>E. coli</i> de adherencia difusa		
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>		

Abreviatura	Significado
Mo	Molibdeno
MR	Medianamente resistente
NaMoO ₄	Molibdato de Sodio
NEO	Neomicina
NET	Netilmicina
NF	Nitrofurantoína
Ni	Níquel
NOM	Norma Oficial Mexicana
ONU	Organización de las Naciones Unidas
Pb	Plomo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PROTAR	Programa de tratamiento de aguas residuales
PVA	Protección de vida acuática
R	Resistente
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
S	Sensible
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SM	Estreptomicina
SOAPAP	Agua de Puebla
SXT	Sulfametoxazol/Trimetoprim
TCY	Tetraciclina
TMP	Trimetoprim
V	Vanadio
Zn	Zinc

1. RESUMEN

El río Atoyac de la Ciudad de Puebla se ha convertido en receptor de descargas industriales y domésticas, siendo la carga microbiana uno de los contaminantes más persistentes incluso después de un tratamiento. La carga microbiana es un factor importante para la salud pública ya que las bacterias patógenas son causantes de enfermedades infecciosas con diferente nivel de gravedad. Los contaminantes químicos como: metales pesados y antibióticos son causa de las actividades antropogénicas y de su uso indiscriminado. Debido a que este río es receptor de dichos contaminantes, el objetivo de este estudio fue identificar la presencia de la bacteria patógena *E. coli* enteropatógena (EPEC) y determinar su resistencia a antibióticos y a metales pesados. Se caracterizaron 113 cepas de *E. coli* aisladas del agua residual del río Atoyac, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), asimismo se les determinó su resistencia a 12 antibióticos, así como su resistencia a Co, Mo, Fe, Cu y Pb. Los resultados mostraron que el 85% de las cepas pertenecen al patotipo EPEC, el 77% (87/113) presentó resistencia al menos a 1 tipo de antibiótico, solo el 24% presentó multirresistencia y todas las cepas presentaron resistencia a Mo y Fe, para Co y Cu sólo presentaron mediana resistencia, ante Pb sólo el 5.3% (6/113) del total de las cepas presentó resistencia y el 69% (78/113) presentó sólo mediana resistencia. Los resultados obtenidos revelan la presencia de EPEC, agente etiológico causal de brotes diarreicos capaz de sobrevivir y tener resistencia a antibióticos y metales, resultado que apoya la preocupación en poner atención en la sanidad del agua residual del río Atoyac para evitar futuras infecciones en comunidades aledañas.

2. INTRODUCCIÓN

El actual escenario mundial de intenso crecimiento demográfico y las actividades urbanas han provocado la contaminación de los cuerpos de agua, siendo los más afectados los países en vías de desarrollo (Martínez *et al.*, 2017; Olguín *et al.*, 2010). Entre los principales contaminantes encontramos las descargas de aguas residuales industriales y domésticas que son vertidas en los ríos sin recibir un tratamiento adecuado (Arcos *et al.*, 2005). La liberación de compuestos tóxicos como metales pesados, así como la liberación de bacterias patógenas resistentes a antibióticos presentes en aguas residuales constituyen un gran problema para el medio ambiente y para la salud pública (Martínez *et al.*, 2010). El mal uso que se les ha dado a los antibióticos en las prácticas médicas, veterinarias y agrícolas ha provocado el desarrollo de resistencia y multiresistencia microbiana a estos compuestos, reduciendo la efectividad de los tratamientos establecidos e incrementando los índices de mortalidad (Tzoc *et al.*, 2004; Dreser *et al.*, 2008). Asimismo, la exposición a los efectos tóxicos de los metales pesados ha permitido la aparición y selección de bacterias con mecanismos capaces de tolerar sus efectos nocivos (Martínez *et al.*, 2017; Cervantes *et al.*, 2006).

En México la contaminación del agua se deriva de la deficiencia en los sistemas de tratamiento de aguas residuales y medios de saneamiento, ocasionando problemas en la salud pública como son el aumento de las enfermedades gastrointestinales, sobre todo entre niños menores de cinco años, siendo uno de los factores que ocasionan muertes en el país. Entre los patógenos bacterianos causantes de estas enfermedades encontramos los patotipos de *E. coli* diarrogénicas como uno de los agentes etiológico más importantes que está asociado a la contaminación de aguas residuales y como uno de los principales contribuyentes de estas enfermedades (Ruvalcaba *et al.*, 2014; Somda *et al.*, 2017).

El río Atoyac del estado de Puebla se considera como uno de los ríos más contaminados del país, el cual está extremadamente impactado por las aguas residuales de descargas de fuentes urbanas, agrícolas e industriales (Martínez *et al.*, 2017). Por lo tanto, las consecuencias que pueda generar la contaminación de

este río que lo convierte en reservorio de microorganismos capaces de generar resistencia a los antibióticos y a metales pesados, es un tema preocupante (Ruvalcaba *et al.*, 2014).

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Impacto del agua residual a nivel mundial y nacional.

El agua es uno de los recursos más apreciados e imprescindibles del planeta y por lo mismo es ampliamente utilizada en actividades tales como la agricultura (70% al 80%), la industria (20%), el uso doméstico (6%), entre otras. Siendo así de vital importancia mantener una buena calidad del agua, así como conservar las fuentes naturales, asegurando de esta manera que las futuras generaciones puedan tener acceso a este recurso (Arcos *et al.*, 2005).

La contaminación del agua se ha convertido en un grave problema a nivel mundial, según la ONU (2014) y la FAO (2010) se estima que cada día 2 millones de toneladas de aguas residuales, desechos industriales y agrícolas se vierten en las aguas de todo el mundo y cerca del 40% de la población mundial no tiene acceso a servicios de saneamiento adecuados, sufriendo mayor impacto en países en vías de desarrollo, que descargan cerca del 90% de sus aguas residuales sin ningún tratamiento a los ríos y lagos (Olguín *et al.*, 2010). Asimismo, más de 300 millones de habitantes de ciudades Latinoamericanas producen 225,000 toneladas de residuos sólidos cada día, sin embargo, menos del 5% de las aguas de alcantarillado de las ciudades reciben tratamiento. Sin un tratamiento, las aguas residuales son vertidas en las aguas superficiales, provocando tanto riesgos en la salud humana, así como riesgos ecológicos (Reynolds, 2002).

Esta contaminación del agua se origina principalmente por el vertido de aguas residuales de origen doméstico e industrial, siendo los residuos domésticos los que aportan altos porcentajes de materia orgánica y microorganismos de origen fecal (Arcos *et al.*, 2005). Dentro de estos últimos encontramos patógenos capaces de causar enfermedades como son virus, protozoos y bacterias. La falta de saneamiento de estas aguas tiene impacto en un gran número de muertes por enfermedades como la diarrea y la gastroenteritis, ubicándose dentro de las tres

principales causas de muerte a nivel mundial y en Latinoamérica (Peña *et al.*, 2014; Reynolds, 2002).

En México el crecimiento poblacional ha provocado que exista una demanda de servicios urbanos, como son los servicios de agua potable, drenaje y saneamiento, lo que se ha convertido en un problema, ya que estos servicios no tienen un adecuada gestión y manejo, dando como resultado una calidad deficiente en estos servicios y generando grandes volúmenes de aguas residuales que contribuyen a la contaminación ambiental y problemas de salud (López *et al.*, 2015). Mora *et al.* (2016) nos dice que entre 1998 y 2007, la generación de aguas residuales de los centros urbanos (municipales) aumentaron de 239 a 243 m³ s⁻¹, mientras que las descargas industriales (no municipales) aumentaron de 170 a 188.7 m³ s⁻¹ en el mismo período y del total de aguas residuales generadas en esos años, sólo el 25.3% fue tratado. Por consiguiente, el crecimiento urbano ha provocado que los daños ambientales y de salud humana se potencien en diversas regiones de todo el país, producto de la falta de tecnologías ambientales adecuadas para el saneamiento de estas aguas, así como la falta de cultura ambiental de los ciudadanos (Olguín *et al.*, 2010).

Sin embargo, para la mayor parte de México sólo se tienen reportes aislados de la carga de contaminantes que se vierten a los cauces y cuerpos naturales de agua, así como de las propias fuentes de contaminación, por lo que no se tienen datos exactos del riesgo provocado en los habitantes por la exposición a los contaminantes de las aguas residuales, ya sean de tipo químico, físico o biológico y que puede influir en las tasas de morbilidad poblacional (Rivera *et al.*, 2007).

En el caso específico de la ciudad de Puebla, México, sólo 35 de las 278 plantas de tratamiento de aguas residuales que se encuentran en el estado de Puebla funcionan y están dentro de la norma, debido a los altos costos que implica ponerlas en operación a los municipios que las tienen a su cargo. Por lo tanto, el incremento poblacional tanto a nivel nacional como a nivel mundial ha provocado que se generen grandes cantidades de aguas residuales que constituyen fuentes de contaminación que afectan a la salud humana y al medio ambiente (Bonilla y

Fernández *et al.*, 2013), siendo así de vital importancia tener un control de la calidad del agua de consumo y de desecho, con la finalidad de identificar la presencia de microorganismo patógenos, que son causantes de enfermedades como la gastroenteritis, diarrea, disentería y hepatitis o fiebre tifoidea (Arcos *et al.*, 2005).

3.2 El agua residual de la ciudad de Puebla.

En la ciudad de Puebla encontramos ríos de gran importancia como son el San Francisco, el Atoyac y el Alseseca, que actualmente presentan problemas de contaminación, ya que se han convertido en depósitos de desechos (Rivera *et al.*, 2006 b). Esta situación es preocupante ya que no se sabe el impacto que están produciendo en la salud humana y en el ambiente los contaminantes que se encuentran en estos ríos, puesto que no se han realizado estudios detallados de estos posibles efectos (Valencia *et al.*, 2011).

Dentro de los desechos producidos que son liberados en los ríos, destacan los desechos industriales, de acuerdo a Valencia *et al.* (2011) más del 50% de las descargas anuales provienen de las industrias químicas, fundidoras, procesadoras de metales y refinerías de petróleo. Otra fuente de contaminación importante son los desechos agropecuarios, así como los desechos de origen doméstico. Por lo que el desarrollo industrial junto con los desechos agropecuarios y domésticos han provocado la contaminación de los ríos, generando riesgos para la salud y el medio ambiente y afectando la calidad de agua para su consumo humano, así como la vida acuática (Valencia *et al.*, 2011).

Las industrias y comunidades descargan sus aguas residuales en forma directa o con escaso o nulo tratamiento hacia los cuerpos receptores de los ríos Alseseca, Zahuapan y Atoyac, generando un riesgo en la salud humana por la exposición de los habitantes a estos contaminantes (Bonilla y Fernández *et al.*, 2013). En el caso del río Atoyac, se considera un río muy contaminado, ya que recibe agua residual municipal e industrial, provocando que su uso solo sea aceptable para riego agrícola (Valencia *et al.*, 2011). La contaminación de este río se debe principalmente a las

actividades socioeconómicas de tipo alimenticia, textil, química, petroquímica, automotriz, papelera, bebidas, hierro y acero, farmacéutica, tenería, metalmecánica, siderúrgica y producción agrícola que se da en la ciudad de Puebla y Tlaxcala, ocasionando una producción aproximada de 55 descargas de aguas residuales directas e indirectas, 45 industriales y 10 municipales (Sandoval *et al.*, 2009).

Sin embargo, la problemática de la gran contaminación de los ríos, se ve aún más afectada debido a que las plantas tratadoras de aguas residuales no funcionan de manera correcta, de acuerdo a Bonilla y Fernández (2013) hasta el 2012 las cinco plantas tratadoras de aguas residuales del Sistema Operador de Agua Potable y Alcantarillado de Puebla (SOAPAP) solamente funcionaban al 60% de su capacidad. Por lo tanto, las consecuencias que pueda generar la contaminación de estos ríos es un tema preocupante, ya que no sabemos los daños en la salud que puede provocar a los habitantes que viven cerca de estas zonas, así como para el ambiente (Bonilla y Fernández *et al.*, 2013).

3.3 Aguas Tratadas.

De acuerdo a SEMARNAT (2003) las aguas residuales son definidas como aguas de descargas municipales, industriales, agrícolas, ganaderas, domésticas, o de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas. Asimismo, Mora *et al.* (2016) nos dicen que dentro de la clasificación de las aguas residuales basadas en su origen encontramos a las aguas residuales urbanas y aguas residuales industriales. En las aguas residuales urbanas encontramos aguas negras o fecales, aguas de lavado doméstico y aguas de drenaje de calles, en cambio las aguas residuales industriales provienen de procesos de producción, procesamiento o manipulación en el que se utilice agua, por lo que están más contaminadas que las aguas residuales urbanas y sus contaminantes son más difíciles de eliminar.

El incremento de la población urbana y el modo de vida actual ha provocado un aumento de la descarga de aguas residuales en las últimas décadas, siendo el agua un elemento de gran importancia para la vida humana, surge una gran preocupación

y la necesidad de limpiar los cuerpos de agua contaminados, para así poder satisfacer las necesidades de la población urbana (Peña *et al.*, 2013).

Reynolds (2002) nos dice que las aguas residuales consisten de dos componentes, un efluente líquido y un constituyente sólido, conocido como lodo. Es así que existen dos formas generales de tratar las aguas residuales. La primera de ellas consiste en dejar que las aguas residuales se asienten en el fondo de los estanques, permitiendo que el material sólido se deposite en el fondo y después tratando la corriente superior de residuos con sustancias químicas para reducir el número de contaminantes dañinos presentes. La segunda forma consiste en utilizar la población bacteriana para degradar la materia orgánica. Este método, conocido como tratamiento de lodos activados, requiere el abastecimiento de oxígeno a los microbios de las aguas residuales para realzar su metabolismo (Reynolds, 2002).

De acuerdo a lo anterior Reynolds (2002) refiere que los pasos básicos para el tratamiento de aguas residuales son:

1. Pre tratamiento: remoción física de objetos grandes.
2. Deposición primaria: sedimentación por gravedad de las partículas sólidas y contaminantes adheridos.
3. Tratamiento secundario: digestión biológica usando lodos activados o filtros de goteo que fomentan el crecimiento de microorganismos.
4. Tratamiento terciario: tratamiento químico (por ejemplo, precipitación, desinfección). También puede utilizarse para realzar los pasos del tratamiento primario.

El tratamiento de las aguas residuales urbanas e industriales resulta ser la mejor solución para la depuración de los efluentes, no obstante, la acción toxica de ciertas sustancias pueden retardar el proceso de purificación y anular la acción de los microorganismos involucrados en la purificación del agua. Asimismo, compuestos como los metales pesados, pueden permanecer en las aguas tratadas, debido a que los procesos de purificación no eliminan completamente estos compuestos, por

lo que no se recomienda devolver el agua tratada a los canales de agua limpia (Mora *et al.*, 2016).

En México se han implementado programas de tratamiento de aguas residuales desde 2008, como PROTAR (programa de tratamiento de aguas residuales) entre otros, que buscan aumentar el volumen de agua tratada y mejorar los procesos utilizados para el tratamiento de aguas residuales, teniendo como resultado 2,287 plantas de tratamiento en todo el país hasta diciembre de 2013 (Mora *et al.*, 2016).

La finalidad del tratamiento de aguas residuales ha sido tratar con la problemática de la contaminación del agua, tratando de reducir el nivel de microorganismos dañinos presentes y de esta forma disminuir el riesgo de exposición en la reutilización de estas aguas, como lo es su uso en el riego agrícola. Por consecuencia el tratamiento de aguas residuales es de vital importancia para la prevención de la contaminación ambiental y del agua al igual que de la salud pública (Reynolds, 2002).

3.4 Microorganismos Patógenos del agua residual.

La exposición a la actual contaminación ha provocado que exista un mayor riesgo para la salud humana, afectando más a países en vías de desarrollo, en los que la falta de tecnología adecuada, así como la falta de atención de los organismos encargados, han generado que los niveles de contaminación aumenten en gran medida (Rivera *et al.*, 2006 a). La falta de atención en el tratamiento de aguas residuales, que se sabe albergan microorganismos (patógenos) pueden causar enfermedades. De acuerdo con Reynolds (2002) los organismos patogénicos pueden originarse en individuos infectados o en animales domésticos o salvajes, de los cuales pueden o no presentar señales de enfermedad. La contaminación a través del desecho inadecuado de aguas negras es responsable de una gran mayoría de muertes (Reynolds, 2002).

Castillo *et al.* (2010) nos dicen que el 30% de muertes en América Latina son causadas por enfermedades transmitidas por agua contaminada, seis veces más que el porcentaje reportado en países desarrollados. Los microorganismos implicados en este tipo de enfermedades pueden causar enfermedades con diferentes niveles de gravedad, desde una gastroenteritis simple hasta graves diarreas, y pueden ser transmitidos a través del agua, pero también a través de alimentos, de animales a humanos, y entre personas por los malos hábitos higiénicos. Los agentes patógenos que se encuentran implicados en la transmisión de este tipo de enfermedades son bacterias, virus, protozoos, helmintos y cianobacterias (Arcos *et al.*, 2005).

Las enfermedades gastrointestinales son de las enfermedades más comunes en humanos. Vidal (2003) nos dice que se estima que alrededor de 2 millones de niños mueren al año de enfermedades diarreicas en países en vías de desarrollo. A nivel mundial las enfermedades gastrointestinales son una de las causas de mortalidad en lactantes y niños, de acuerdo a Hernández *et al.* (2011) se ha estimado que en Asia, África y Latinoamérica la probabilidad de que un niño muera antes de los 5 años es del 50%, aunque estas cifras dependen de los factores socioeconómicos y nutricionales. En México, hasta el 2001 las enfermedades gastrointestinales ocasionadas por patógenos ocupaban el decimocuarto lugar de muertes a nivel nacional, y los estados con mayor incidencia eran: Chiapas, Oaxaca, Guanajuato, Veracruz, Puebla y el Distrito Federal (Hernández *et al.*, 2011).

Los organismos patógenos causantes de enfermedades gastrointestinales infecciosas son principalmente representados por bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella*. Destacando a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) como uno de los principales patógenos causantes de cuadros diarreicos en niños. EPEC es reconocida como una causa importante de muertes por enfermedades infecciosas en infantes, generando una alta tasa de morbilidad y mortalidad en países en vías de desarrollo (Hernández *et al.*, 2011; Vidal, 2003).

La presencia de microorganismos patógenos y compuestos contaminantes en el agua pueden causar daños en la salud humana, es por esto que es necesario la

implementación de tecnologías y plantas de tratamiento eficientes que reduzcan estos riesgos (Castillo *et al.*, 2010).

3.5 *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* que se encuentra en la flora normal microbiana del colon humano, ya que coloniza el tracto gastrointestinal de los recién nacidos y permanece ahí durante toda la vida en simbiosis con el huésped humano. Se ha visto que dentro de la misma especie existen serotipos especiales que pueden causar enfermedades en los humanos como la septicemia, neumonía, infecciones en vías urinarias, diarrea, entre otras (Vidal, 2003).

Actualmente se conocen 6 categorías de *E. coli* asociadas con enfermedades infecciosas diarreicas, que han sido clasificadas de acuerdo a sus características clínicas y epidemiológicas. Los patotipos son: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC), enteropatógena (EPEC) y de adherencia difusa (DAEC). Las *E. coli* diarrogénicas son la principal causa de gastroenteritis en niños en países en vías de desarrollo, siendo responsables del 30% al 40% de todos los casos de diarrea en niños (Lluque *et al.*, 2010).

Las cifras de muertes en países en vías de desarrollo son grandes del 20% al 50%, lo que convierte a EPEC en una anomalía clínica de inmediata respuesta. En México una de las causas más comunes de diarrea infantil es la infección por EPEC, dentro de los síntomas provocados por EPEC encontramos diarreas acuosas que tienen diferentes grados de severidad, vómitos y fiebre. La incubación de la infección se da entre las primeras 3 a 24 horas después de la ingesta de un inóculo de bacterias (Vidal, 2003).

3.5.1 Resistencia a antibióticos.

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema de salud mundial que va en aumento en nuestra sociedad actual (Kawane, 2012). Durante los últimos años el uso indiscriminado de los antibióticos en el sector salud, así como en la agricultura y la ganadería ha provocado que las bacterias desarrollen mecanismos que les permitan evadir con efectividad la acción de estos compuestos. (Cabrera *et al.*, 2007; Kawane, 2012). El desarrollo de esta resistencia bacteriana reduce la efectividad de tratamientos establecidos e incrementa la mortalidad por enfermedades infecciosas (Dreser *et al.*, 2008).

La resistencia adquirida por las bacterias se da por un cambio en la composición génica de la bacteria, que puede ocurrir por una mutación genética o por la transferencia entre bacterias de genes de resistencia a los antibióticos (Kawane, 2012). El incremento acelerado de esta resistencia bacteriana y su expansión a nivel mundial, es una manifestación de la evolución bacteriana, en respuesta a la presión selectiva ejercida en diferentes ambientes, por el mal uso de los antimicrobianos (Yamile *et al.*, 2012). Asimismo, el aumento de la resistencia a los antibióticos actualmente está superando el desarrollo de nuevos antibióticos (Adefisoye *et al.*, 2016), representando grandes retos para el tratamiento de infecciones. De acuerdo a Tafur *et al.* (2008) se calcula que entre el 50% y el 60% de más de dos millones de infecciones hospitalarias en Estados Unidos son causadas por bacterias resistentes y son responsables de cerca de 77,000 muertes por año.

Para los países en vías de desarrollo esto es aún más preocupante, ya que las infecciones bacterianas son uno de los principales precursores de las enfermedades, siendo de vital importancia los agentes antimicrobianos para el tratamiento de estas (Cui *et al.*, 2017). Se sabe que *E. coli* es una de las principales causantes de enfermedades infecciosas y se ha asociado junto con otras comunidades de bacterias ambientales con genes resistentes a antibióticos (Adefisoye *et al.*, 2016). El tratamiento antimicrobiano utilizado en infecciones ocasionadas por los patotipos de *E. coli*, ha tenido que cambiar a través de los años

debido a la resistencia que estas presentan, siendo así que antibióticos que antes se usaban para su tratamiento como la Tetraciclina, Estreptomina, Amoxicilina, Cefalotina, Ticarcilina y Sulfametoxazol/Trimetoprim resultan ya no ser de gran utilidad (Paniagua *et al.*, 2007).

De esta manera los mecanismos de resistencia que presentan las bacterias son cada vez más difíciles de controlar, aunado al hecho de que una bacteria puede presentar resistencia a más de un antibiótico, lo que se conoce como multiresistencia. Las infecciones provocadas por estas bacterias multiresistentes son las causantes de un creciente número de pacientes, así como del aumento en la morbilidad y mortalidad. (Pérez *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2013).

3.5.2 Resistencia a metales pesados.

La contaminación ambiental con metales pesados constituye una problemática de gran importancia a nivel mundial, puesto que se considera en aumento y provoca efectos tóxicos sobre los organismos vivos (Suárez *et al.*, 2002; Marrero *et al.*, 2010). La contaminación antropogénica del medio ambiente con metales pesados debido a las diversas aplicaciones que tienen en las prácticas agrícolas, la acuicultura, así como su utilización en las industrias y en productos domésticos contribuyen a esta carga ambiental (Seiler *et al.*, 2012; Kawane, 2012). Es así que estas prácticas han determinado la presencia de metales en cantidades importantes en el ambiente, causando numerosos efectos sobre la salud y el equilibrio de los ecosistemas (Marrero *et al.*, 2012).

Por lo tanto, los metales pesados son elementos químicos que representan una amenaza biológica, pues no son biodegradables (Marrero *et al.*, 2012). Los efectos tóxicos y mutagénicos de estos elementos inorgánicos son los causantes de seleccionar y mantener variantes microbianas capaces de bioconcentrarlos y de tolerar sus efectos nocivos. Se han identificado diversos mecanismos de resistencia en especies de bacterias, protistas y hongos (Martínez *et al.*, 2010; Cervantes *et al.*, 2006). De acuerdo a Marrero *et al.* (2010) solo los microorganismos que portan

sistemas genéticos que contrarrestan los efectos tóxicos de los metales son capaces de sobrevivir en ambientes con elevadas concentraciones de esos elementos.

Las altas concentraciones de metales pesados presentes en el ambiente han creado una presión selectiva que conduce a las mutaciones en los microorganismos permitiéndoles sobrevivir y multiplicarse (Kawane, 2012). En particular las bacterias han sido objeto de estudio por su capacidad para transformar compuestos no esenciales y por los mecanismos de resistencia que han desarrollado para tolerar los efectos nocivos de los metales tóxicos. Dentro de estos mecanismos principalmente destacan los que involucran: componentes celulares que capturan a los iones neutralizando su toxicidad, enzimas capaces de convertir a los metales o metaloides en formas menos tóxicas, y transportadores de la membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular (Suárez *et al.*, 2002; Cervantes *et al.*, 2006). De esta manera la exposición de microorganismos autóctonos a ecosistemas contaminados con metales ha permitido la aparición y la selección de bacterias resistentes a metales pesados (Martínez *et al.*, 2010).

Moraga *et al.* (2003) nos dice que esta relación contaminante-microorganismo es una serie de procesos adaptativos que finalmente se expresan como mecanismos de resistencia hacia el contaminante.

4. ANTECEDENTES

4.1 Contaminación del río Atoyac.

La contaminación que presenta el río Atoyac es alarmante y lo coloca como uno de los cuerpos de agua más contaminados de México. Las descargas de aguas residuales domésticas e industriales sin tratamiento vertidas en este río, revelan el elevado nivel de contaminación y constituyen un grave problema en los estados de Tlaxcala y Puebla, provocando impactos negativos en la salud de los pobladores, las actividades económicas y los ecosistemas aledaños (Rodríguez *et al.*, 2012).

Debido a que la contaminación de este río representa un grave problema para la población y el medio ambiente, diversos trabajos se han enfocado en su estudio. Sandoval *et al.* (2009) nos mencionan que desde el año 1995 se ha registrado un alto grado de deterioro en el río Atoyac, debido a los asentamientos humanos e industriales. Asimismo, realizaron una evaluación fisicoquímica, microbiológica y toxicológica del río Atoyac, donde se destacó que para coliformes fecales (CF) se rebasaron los límites máximos permisibles (LMP) de acuerdo con la norma *NOM-001-ECOL-1996* y se registró una contaminación alta de acuerdo con los parámetros toxicológicos y mutagénicos. De la misma manera García *et al.* (2011) realizaron un estudio para determinar las concentraciones de Arsénico (As) y Plomo (Pb) en agua superficial de la cuenca del alto Atoyac, sus resultados revelaron que las concentraciones de Pb y As en agua fueron superiores a la norma *NOM-001-ECOL-1996* que establece el límite en las descargas de aguas residuales para la protección de la vida acuática, asimismo encontraron que se superó el límite para el uso del agua con fines agrícolas establecido por la misma norma.

Por otra parte, Bonilla *et al.* (2013) analizaron la calidad fisicoquímica y microbiológica del agua residual vertida por 2 parques industriales (5 de mayo y Puebla 2000) que desembocan en el río Atoyac y reportaron que la concentración de CF en todas las muestras tomadas sobrepasaba los LMP establecidos por la *NOM-001-SEMARNAT-1996* para el uso agrícola. Posteriormente Bonilla *et al.*

(2015) analizaron la calidad fisicoquímica del agua del distrito de riego 030 “Valsequillo”, en donde sus resultados mostraron que las descargas de agua residual vertidas hacia el río Atoyac y Alseseca presentan altos niveles de contaminantes que rebasaron los LMP de la *NOM-001-SEMARNAT-1996*.

El problema de la contaminación del río Atoyac se ha vuelto un problema muy serio, a medida que aumenta la amenaza a la salud pública, Rodríguez *et al.* (2017) nos dicen que hay una relación directa entre la incidencia de enfermedades gastrointestinales y el nivel de contaminación del agua del río Atoyac por coliformes totales (CT), de igual manera nos dicen que las causas de contaminación están directamente relacionadas con el desarrollo económico y el crecimiento de la población, con efectos adversos en la salud humana.

Sin embargo, el nivel de contaminación del río sigue siendo un grave problema, Pérez *et al.* (2018) evaluaron la calidad del agua del río Atoyac en base a parámetros físico-químicos y bacteriológicos, compararon sus resultados con los datos de 2011 de la Declaratoria de clasificación del Atoyac y Xochiac o Hueyapan, y sus afluentes, encontrando un aumento notable en las concentraciones de los 8 metales pesados que analizaron (Al, Fe, Cu, Pb, Cd, Zn, Co, Ni, y Cr), destacando los niveles de Hierro (Fe) y aluminio (Al) que registraron valores superiores a los LMP para la protección de vida acuática (PVA) de acuerdo con los Criterios Ecológicos de Calidad del Agua (CE-CCA-001/89), y para Irrigación Agrícola (IA), asimismo encontraron que para CF se excedieron los LMP para riego agrícola según CE-CCA-001/89 y la NOM 001-SEMARNAT-1996.

4.2 Tratamiento del agua residual en el río.

El río Atoyac recibe tratamiento de 3 plantas tratadoras de aguas residuales: Atoyac Sur, Barranca del Conde y San Francisco. El tratamiento aplicado consta de un pretratamiento, tratamiento primario avanzado (DENSADG®), digestión anaerobia de los lodos y deshidratación por filtros banda (SUPERPRESS), solo la planta

Atoyac Sur cuenta con tratamiento de lodos, las plantas Barranca del Conde y San Francisco envían sus lodos hacia la planta Atoyac Sur. (Degrémont, 2015 a).

CONAGUA (2015) nos dice que las 3 plantas aplican tratamiento primario avanzado, pero difieren en la capacidad instalada de tratamiento, caudal tratado y en el proceso avanzado de depuración (ver tabla 1).

Tabla 1. Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales del río Atoyac del estado de Puebla.

Nombre de la Planta	Proceso	Capacidad Instalada (l/s)	Caudal Tratado (l/s)	Proceso avanzado de depuración
Atoyac Sur	Primario Avanzado	400.0	436.0	Digestión anaerobia de los lodos.
Puebla Barranca del Conde	Primario Avanzado	340.0	209.0	Decantación compacta (DENSADEG®)
Puebla San Francisco	Primario Avanzado	1 100.0	1292.0	Deshidratación por filtros banda (SUPERPRESS)

El tratamiento primario avanzado DENSADEG®, es un proceso de decantación con contacto de lodos que permite acelerar el tratamiento fisicoquímico del agua. Se basa especialmente en un doble sistema de inyección de productos químicos que garantiza su óptima utilización (Degrémont, 2015 b). De acuerdo a Degrémont (2015 b) el DENSADEG® es el proceso más robusto, más compacto y más polivalente para el tratamiento de agua en los sectores municipales o industriales, además de que este proceso tiene como ventaja la reducción de manera importante del impacto ambiental al integrar dentro de una misma instalación las funciones indispensables para una clarificación completa del agua.

4.3 Reportes de la existencia de patogrupos *E. coli* en el río.

La contaminación de aguas superficiales con agentes patógenos de *E. coli* ha sido implicada en un número creciente de brotes de enfermedades y muertes, y la aparición de estas cepas que albergan genes de virulencia, se relacionan con la contaminación por heces de animales domésticos, salvajes, así como de los humanos. Se han hecho estudios de brotes de enfermedades relacionadas con la exposición de aguas contaminadas, sin embargo, muy pocos estudios se han enfocado en investigar la presencia de cepas *E. coli* portadoras de genes de virulencia en aguas superficiales como es el caso de los ríos (Titilawo *et al.*, 2015).

En el estado de Puebla, México se han realizado algunos estudios enfocados a evaluar la calidad de las aguas residuales; Rivera *et al.* (2006 b) realizó un diagnóstico de las enterobacterias presentes en el río Alseseca en donde del total de las muestras identificadas como enterobacterias la más frecuente fue *E. coli* con 44% (48/110). Asimismo, Aburto *et al.* (2017) identificaron la comunidad bacteriana en sedimentos del río Atoyac por medio de una biblioteca genómica de clones 16s rRNA, en donde encontraron que la familia *Enterobacteriaceae* domina la comunidad bacteriana, destacando *E. coli* y especies de *Shigella*. De la misma manera, Biviano (2017) evaluó la calidad del agua del río Atoyac antes y después de ser tratada por decantación e identifico la presencia del patogrupo ETEC en las muestras de agua. Por otro lado, Pérez *et al.* (2018) identificaron la presencia de *E. coli* junto con otras 10 especies bacterianas patógenas gram-negativas pertenecientes a las familias *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Xanthomonadaceae* en muestras de agua del río Atoyac.

Sin embargo, se cuenta con pocos estudios sobre el río Atoyac enfocados al diagnóstico de la calidad de aguas residuales y a sus factores causantes de contaminación, pero hasta la fecha ninguno de los estudios se ha enfocado en identificar la presencia del patogrupo EPEC.

4.4 Impacto en la salud por la existencia de EPEC con resistencia a antibióticos y a metales pesados.

Los patógenos de mayor relevancia en salud pública son aquellos asociados con mayor carga de enfermedad, severidad, complicaciones y mortalidad. Siendo uno de los patógenos más prevalentes las *E. coli* diarrogénicas a nivel comunitario en niños (Riveros *et al.*, 2015).

Riveros *et al.* (2015) nos dice que un estudio diseñado para determinar la etiología y carga de diarrea en países en vías de desarrollo (The Global Enteric Multicenter Study, GEMS), evaluó más de 9000 casos de diarrea moderada/severa en niños menores de 5 años y en más de 13 000 niños sin diarrea (control), en cuatro países de África y tres de Asia, en donde *E. coli* enteropatógena (EPEC), fue uno de los patógenos asociados con mayor mortalidad.

En México, Paniagua *et al.* (2007) analizaron muestras diarreicas de 174 niños que acudieron para atención médica a la Clínica Universitaria de la Salud Integral Iztacala (CUSI-I), Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en donde encontraron que el 25.2% (n = 44) de las muestras de los niños con diarrea fue positivo para algún tipo de *E. coli*, dentro de los cuales la prevalencia de EPEC fue del 2.9% (n=5). Asimismo, el 58% de las cepas de EPEC (n = 5) fue resistente a Ampicilina (AM), 49% a Cefalotina (CF), 48% a Carbenicilina (CB), 33% a Trimetoprim/Sulfametoxazol (SXT), 30% a Cefotaxima (CFX), 25% a Clorafenicol (CL), 21% a Gentamicina (GE), 19% a Netilmicina (NET), 12% a Nitrofurantoína (NF), 10% a Amikacina (AK) y 8% a Ceftriaxona (CRO).

Novoa *et al.* (2017) analizaron 614 cepas de bacterias aisladas de pacientes de todas las edades con diarrea aguda de 4 ciudades del sureste de México, sus resultados mostraron que más de la mitad de los aislamientos fueron identificados como un serotipo de *E. coli* diarrogénica y tres cuartas partes de *E. coli* (77%) correspondieron al serotipo de *E. coli* enteropatógena (EPEC) que presento

resistencia a los antibióticos Ampicilina (AM), Trimetoprim/Sulfametoxazol (SXT), Neomicina (NEO) y Ciprofloxacino (CIP).

Por lo consiguiente el surgimiento de nuevas cepas de *E. coli* diarrogénicas resistentes a los antimicrobianos ha ocasionado con el tiempo que el tratamiento médico adecuado con antibióticos sea cada vez más complicado, sobre todo en los infantes, en quienes las tasas de morbilidad y mortalidad son muy elevadas. (Paniagua *et al.*, 2007)

Por otra parte, se ha observado que la contaminación de ambientes naturales con metales pesados tiene una función importante en la evolución, co-selección y distribución de genes de resistencia. La descarga de metales pesados junto con antibióticos en los cuerpos de agua de los sistemas municipales, de actividades agrícolas o de acuacultura, promueve la co-selección de bacterias resistentes a esos compuestos (Gutiérrez *et al.* 2017).

Chávez *et al.* (2007) analizaron un total de 48 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes adultos con cuadros diarreicos de la ciudad de Puebla, en donde encontraron que el 30% de las cepas pertenecían a la categoría de EPEC, asimismo encontraron que todas las cepas fueron resistentes a los metales Fe, Mo, V, Cu, Ni y Pb a dos concentraciones (1,000 y 2,000 ppm) y el 35.4% fue resistente al metal Co.

Por lo anterior es importante realizar estudios sobre el impacto en la salud pública que puede producir la exposición a patógenos resistentes a metales pesados, ya que la presencia de estos contaminantes en altas concentraciones en el ambiente puede probar efectos nocivos sobre la salud (Marrero *et al.*, 2012).

5. JUSTIFICACIÓN

La contaminación del río Atoyac se ha convertido en una grave problemática ambiental. A pesar de que el río cuenta con 3 plantas tratadoras para aguas residuales, las descargas domésticas e industriales que recibe lo han convertido en reservorio de diversos contaminantes: físicos, químicos y biológicos. Debido a que el agua del efluente se utiliza para riego es necesario descartar la existencia de microorganismos patógenos capaces de causar infecciones gastrointestinales. La resistencia a antibióticos de estos microorganismos se ha convertido en una agravante para el tratamiento de enfermedades, asimismo, las altas concentraciones de metales pesados en el ambiente contribuyen al problema de la contaminación, por lo que analizar la resistencia que presentan las bacterias a estos compuestos puede presentar potencialidades para el diseño de tecnologías aplicables como la biorremediación de ambientes contaminados. Debido a que, se han realizado pocos estudios de calidad microbiológica del río Atoyac, es necesario realizar estudios específicos que identifiquen y caractericen patogrupos diarrogénicos de *E. coli*.

6. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- ❖ Determinar la existencia de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) en un efluente tratado de la ciudad de Puebla resistente a antibióticos y metales pesados.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Detección de cepas EPEC mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- ❖ Determinar la resistencia a antibióticos de las cepas EPEC mediante la técnica de Kirby-Bauer.
- ❖ Determinar la resistencia a metales pesados (Co, Cu, Fe, Mo y Pb) de las cepas EPEC.

7. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS NULA:

El agua residual del río Atoyac después de su tratamiento primario, no presenta el patotipo EPEC resistente a antibióticos y metales pesados.

HIPÓTESIS ALTERNATIVA:

El agua residual del río Atoyac después de su tratamiento primario, presenta el patotipo EPEC resistente a antibióticos y metales pesados.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Procedimiento de recuperación de cepas.

Se utilizaron 113 cepas de *Escherichia coli* correspondientes a un previo monitoreo anual realizado en el 2016 en el efluente del río Atoyac del estado de Puebla, dichas cepas fueron resguardadas en el laboratorio de Patogenicidad Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del ICUAP, Edif. 103J, perteneciente a la BUAP. Las muestras se resguardaron en crioviales con caldo LB a una temperatura de -70°C .

Para su utilización, las cepas de *E. coli* fueron descongeladas, se sembraron por gota en placas con medio agar MacConkey y se incubaron a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas (Fig. 1). Después de las 24 horas de incubación se revisaron las placas y se examinó que las cepas no estuvieran contaminadas.



Fig.1 Cepas de *E. coli* en medio MacConkey.

8.2 Detección molecular de cepas EPEC.

La detección de los genes de virulencia *eae* (384 pb) y *bfpA* (324 pb) de las cepas EPEC se realizó a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para este procedimiento las cepas aisladas de *E. coli* se sembraron en medio agar

MacConkey por 24 horas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, posteriormente se revisó que las cepas no estuvieran contaminadas, se sembraron por estría cruzada en medio agar Luria Bertani (LB) y se incubaron por 24 horas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Posteriormente, se extrajo el ADN de las cepas por medio de la técnica de shock térmico, y se procedió a realizar la PCR con cebadores específicos para los genes de virulencia de EPEC que codifican para Intimina (gen *eae*) con un peso molecular de 384 pb y Bfp (gen *bfpA*) con un peso molecular de 324 pb, utilizando como control la cepa E2348/69 (EPEC). Posteriormente se colocaron las muestras en un termociclador marca TECHNE modelo: TC-412 y se programó para la realización de los ciclos de temperaturas específicos para la PCR (ver tabla 2).

Tabla 2. Ciclos de temperaturas utilizados para la replicación de los amplicones de los genes de virulencia <i>eae</i> y <i>bfpA</i> pertenecientes a EPEC.
Temperatura 105°C Pre calentamiento

Inicio de calentamiento Desnaturalización 94.0°C 5m00 _____ etapa 1 _____
Número de ciclos 30 Paso 94.0°C 0m 30 max Paso 55.0°C 0m 30 max Paso 72.0°C 0m 30 max

Temperatura de extensión 72.0°C 5m00 Temperatura final 10.0°C

Una vez obtenidas las muestras de PCR se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1.5% para observar la amplificación de los genes de las cepas.

Posteriormente el gel se tiñó con bromuro de etidio y se enjuagó en agua destilada, para después ponerlo en un transiluminador UV para la visualización de las bandas amplificadas de los genes de virulencia de EPEC.

8.3 Determinación de la resistencia a antibióticos.

Todas las cepas fueron sometidas mediante la técnica de Kirby- Bauer para determinar su sensibilidad a 12 antimicrobianos: Ampicilina (AM), Carbenicilina (CB), Cefalotina (CF), Cefotaxima (CFX), Ciprofloxacina (CPF), Cloranfenicol (CL), Nitrofurantoína (NF), Amikacina (AK), Gentamicina (GE), Netilmicina (NET), Norfloxacina (NOF), Sulfametoxazol Trimetoprim (SXT).

Para ello las cepas se sembraron en medio agar MacConkey durante 24 horas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, posteriormente se sembraron por estría cruzada en medio agar LB y se incubaron durante 24 horas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, se prepararon y estandarizaron inóculos en solución salina al 0.85% con una turbidez igual al tubo 5 de McFarland, posteriormente se inoculó de forma uniforme a las cepas por medio de hisopos estériles en medio agar Müller-Hinton, se colocaron los discos de papel filtro impregnados con los antibióticos y se incubaron a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. A las 24 horas de incubación se leyeron los halos de inhibición para su posterior clasificación.

La lectura de los halos de inhibición se hizo de acuerdo a la tabla de comparación de halos de sensibilidad en mm (NCCLS) perteneciente a la marca: Investigación Diagnóstica (ID) referencia PT-35 Multibac I.D. REG. No. 1159R2002 SSA. De acuerdo a las medidas en milímetros de los halos de sensibilidad presentadas en los discos de los antibióticos, las cepas se clasificaron en resistente (R), intermedio (I) y sensible (S).

8.4 Determinación de la resistencia a metales pesados.

Para la determinación de resistencia a metales pesados las cepas fueron sembradas por medio de estría cruzada en medio agar Müller-Hinton adicionado con los siguientes metales: Cobalto (CoSO_4), Molibdeno (NaMoO_4), Cobre (CuCl), Plomo (Pb) y Hierro (FeCl_3) a una concentración de 100 ppm, se incubaron durante 24 horas a $37\pm 1^\circ\text{C}$ y posteriormente se determinó la resistencia a cada metal a través de la observación del crecimiento microbiano y su sensibilidad en la inhibición de crecimiento.

En la determinación de la resistencia a los diferentes metales se tomaron en cuenta 3 parámetros: resistente (R) para cepas que presentaron un crecimiento total, medianamente resistente (MR) a cepas con un mínimo de crecimiento y sensible (S) a cepas sin crecimiento en el medio.

8.5 Comparación de los factores de virulencia de susceptibilidad a antibióticos y de resistencia a metales pesados de las cepas EPEC.

Se realizó un análisis comparativo para determinar el número de cepas EPEC resistentes a antibióticos y a metales pesados.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Detección molecular de cepas EPEC.

Con la detección molecular se determinó que el 85% (96/113) de cepas fueron positivas para el patogrupa EPEC mediante la expresión de los genes de virulencia: *eae* (384 pb) y/o *bfpA* (324 pb), genes específicos que corresponden al patogrupa EPEC. En este estudio se utilizó la cepa control E2348/69 para su comparación con las cepas problema (Fig.2).

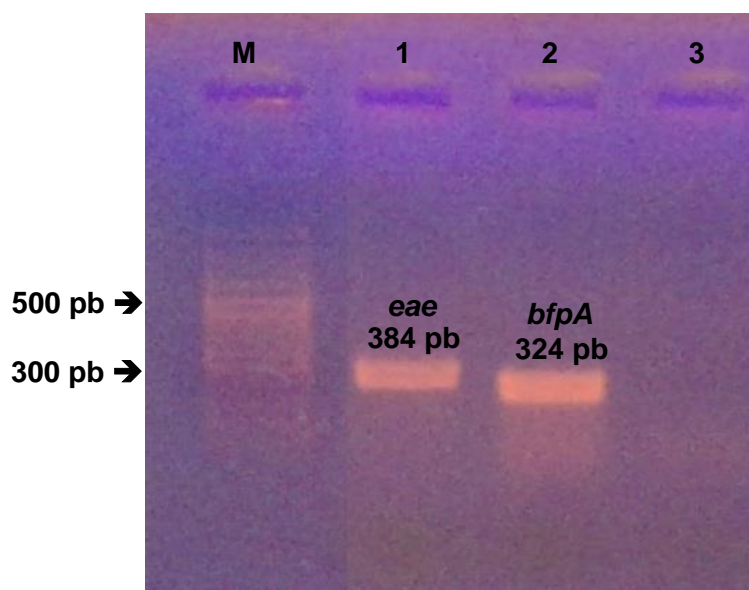
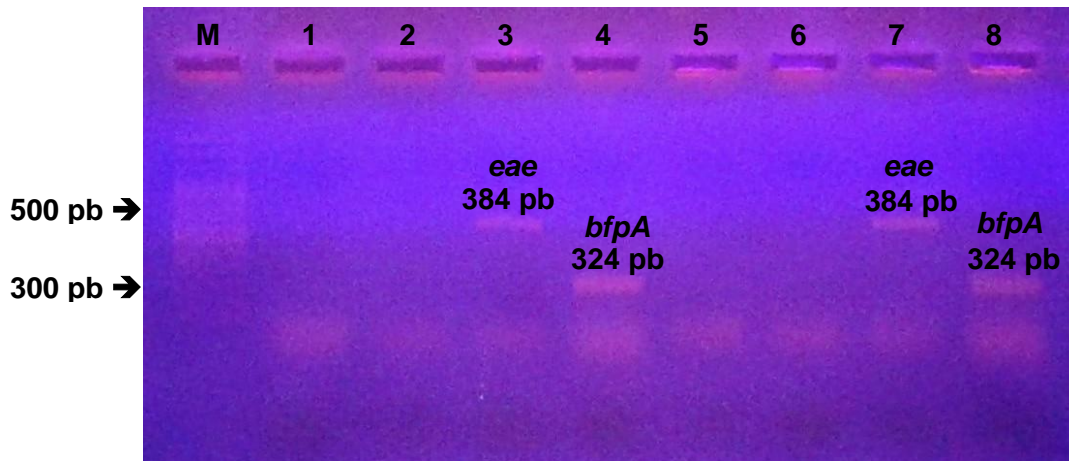


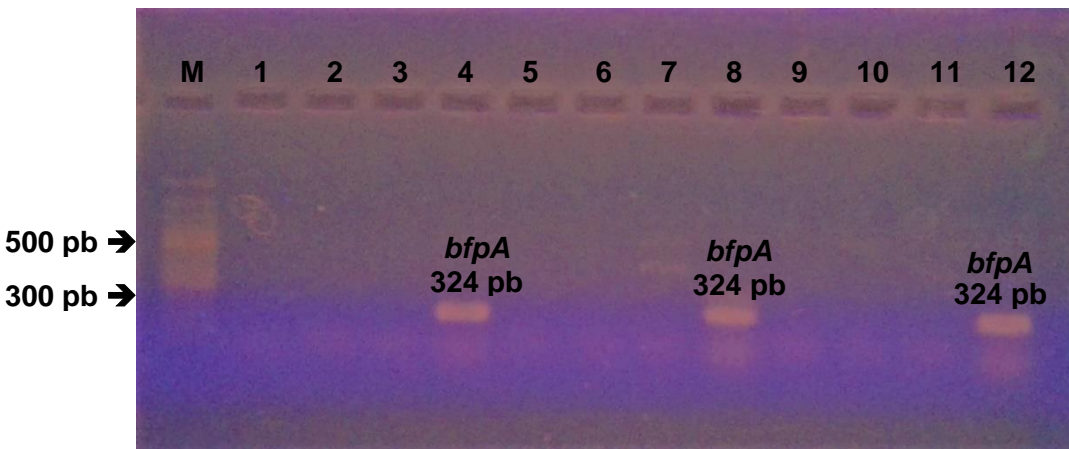
Fig. 2 Gel de agarosa con los amplicones *eae* y *bfpA*. Carril M: marcador de peso molecular (1 Kb), 1: gen *eae*, 2: gen *bfpA*.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Huang *et al.* (2016) quienes también identificaron la presencia de EPEC en aguas residuales de ríos, obteniendo que el 17% (8/47) del total de sus cepas aisladas tomadas de 12 principales ríos en Taiwán fueron identificadas como EPEC, así mismo muestrearon 34 puntos del río Puzih donde obtuvieron 196 cepas de las cuales 28.1 % (55/196) fueron identificadas como EPEC, siendo este patotipo de *E.coli* el que se encontró con mayor frecuencia en este estudio. De la misma manera Ramírez *et al.* (2013) analizaron muestras

tomadas del río San Pedro en Aguascalientes en donde encontraron la presencia de 150 (100%) cepas de *E. coli* de las cuales el 6% (9/150) fue positivo para EPEC. Asimismo, se obtuvo que del 85% (96/113) de cepas positivas para EPEC el 28.3% (32/113) expreso ambos genes de virulencia *eae* (384 pb) y *bfpA* (324 pb) (Fig.3).



Mientras que el 56.6% (64/113) de las cepas positivas para EPEC solo expreso el gen de virulencia *bfpA* (Fig. 4).



Estos resultados concuerdan con Obi *et al.* (2004) quienes encontraron que de 87.7% (200/228) de cepas identificadas como *E. coli* aisladas de 6 ríos en la región de Venda en Sudáfrica, 67.5% (135/200) tenían uno o más de los genes responsables de la patogenicidad de *E. coli*, siendo EPEC una de las cepas mayormente encontradas con 34.1 % (46/135), de las cuales el gen *bfpA* fue detectado con mayor frecuencia con 26% (35/135).

La presencia de EPEC en ríos, se debe principalmente a las descargas de aguas residuales que estos reciben, como son las aguas residuales de origen doméstico que aportan altos porcentajes de materia orgánica y microorganismos de origen fecal (Ahmed *et al.*, 2005; Arcos *et al.*, 2005). La contaminación fecal en aguas superficiales y la presencia de patógenos derivados de las heces en el agua está relacionado con enfermedades infecciosas (Mendes *et al.*, 2015).

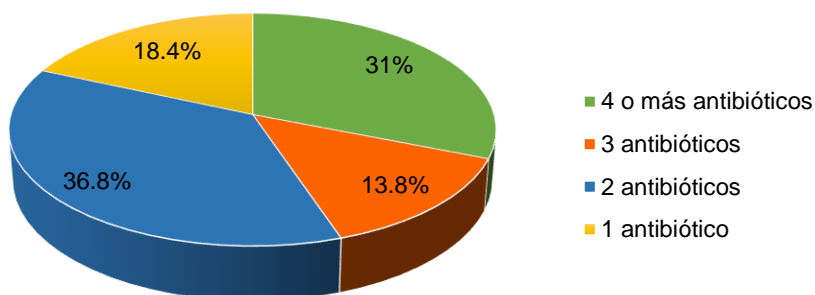
Méndez *et al.* (2010) nos dicen que las concentraciones de coliformes en aguas superficiales implican la presencia de géneros bacterianos de la familia *Enterobacteriaceae* como son *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Yersinia*. Siendo el género *Escherichia* el más representativo de la contaminación fecal y que se encuentra asociado a enfermedades gastrointestinales infecciosas (Méndez *et al.*, 2010; Vila *et al.*, 2009).

Es así que la detección de cepas EPEC en ríos derivada de la contaminación de aguas superficiales nos indican un gran riesgo para la salud pública, debido a su capacidad para causar enfermedades humanas, como lo es la diarrea infantil (Megchún *et al.*, 2015).

9.2 Determinación de la resistencia a antibióticos.

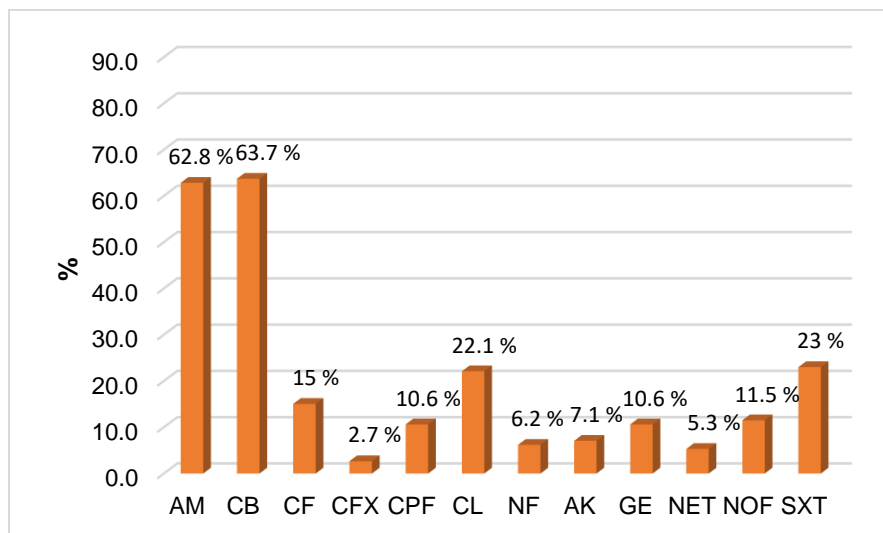
De las 113 cepas de *E. coli* en este estudio el 77% (87/113) presento resistencia al menos a 1 tipo de antibiótico, siendo 31 % (27/87) resistente a 4 o más tipos de antibióticos, 13.8% (12/87) resistente a 3 antibióticos, 36.8% (32/87) resistente a 2 antibióticos y 18.4% (16/87) resistente a 1 solo antibiótico (Gráfica 1). Mientras que

el resto de las cepas presento susceptibilidad a todos los antibióticos con 23% (26/113).



Gráfica 1 Porcentaje total de cepas *E.coli* resistentes a antibióticos.

Las cepas de *E. coli* presentaron mayor resistencia a los antimicrobianos Carbenicilina (CB) con 63.7% (72/113) y Ampicilina (AM) con 62.8% (71/113), asimismo presentaron resistencia a los antimicrobianos Sulfametoxazol Trimetroprim (SXT) con 23% (26/113), Cloranfenicol (CL) con 22.1% (25/113), Cefalotina (CF) con 15% (17/113), Norfloxacin (NOF) con 11.5% (13/113), Gentamicina (GE) con 10.6% (12/113), Ciprofloxacina (CPF) con 10.6% (12/113), Amikacina (AK) 7.1% (8/113), Nitrofurantoína (NF) con 6.2% (7/113), Netilmicina (NET) con 5.3% (6/113) y Cefotaxima (CFX) con 2.7% (3/113) (Gráfica 2).



Gráfica 2 Comparación de la resistencia a antibióticos de todas las cepas *E. coli* aisladas.

Estos resultados concuerdan con Ramírez *et al.* (2013) quienes realizaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de 150 cepas *E. coli* aisladas del río San Pedro en Aguascalientes, México a 13 antibióticos y reportaron que 52% (79/150) fueron resistentes al menos a 1 agente antimicrobiano, 37.3% (56/150) al menos a dos y 30.6% (46/150) fueron multiresistentes. Asimismo, encontraron que 39.3% (59/150) de las cepas fueron resistentes a Ampicilina (AM) siendo la resistencia más prevalente, seguida de Trimetoprim/Sulfametoxazol (SXT) con 28.6 % (43/150), Cloranfenicol (CL) con 22% (33/150) y Cefalotina (CF) con 17.3% (26/150) y sólo 1.33% (2/150) de las cepas presentaron resistencia a los antibióticos Netilmicina (NET), Amikacina (AK) y Cefotaxima (CFX).

Rivera *et al.* (2006 b) también realizó pruebas de sensibilidad a 12 antibióticos de 100 enterobacterias aisladas del río Alseseca, siendo *E. coli* la más frecuente con 44% (48/110), en donde sus resultados revelaron que las cepas mostraron un alto porcentaje de resistencia a Carbenicilina (CB) con 87.9 %, siendo la resistencia que más se presentó en todas las cepas, asimismo también se observó resistencia a los antibióticos ampicilina (AM), Sulfametoxazol Trimetoprim (SXT), Cefotaxima (CFX), Cefalotina (CF), Cloranfenicol (CL), Amikacina (AK) y Nitrofurantoína (NF), mientras que para los antibióticos Gentamicina (GE) y Netilmicina (NET) no se

presentó resistencia. Por otro lado, Nonotonga *et al.* (2016) aislaron 278 cepas de *E. coli* del río Kat en Sudáfrica y reportaron el perfil de susceptibilidad a 10 antibióticos, sus resultados mostraron que el 98% (272/ 278) presento resistencia a Ampicilina (AM) y 38% (105/278) a Sulfametoxazol Trimetoprim (SXT), mientras que para los demás antibióticos analizados las cepas no presentaron resistencia significativa.

De la misma manera Chávez *et al.* (2012) analizaron la susceptibilidad a 12 antibióticos de 103 cepas de *E. coli* aisladas de muestras de heces de niños y adultos con cuadros diarreicos, en donde sus resultados mostraron que el 87% (90/103) de las cepas presentaron resistencia a por lo menos un antibiótico, en donde los porcentajes de resistencia a Carbenicilina (CB) y a Ampicilina (AM) fueron los más elevados, siendo las resistencias más frecuentes presentada por las cepas. Asimismo, nos dicen que los marcadores de resistencia con elevada frecuencia en la población deberían confirmarse en estudios más extensivos, para considerar la eliminación de su uso en los tratamientos de enfermedades infecciosas, puesto que además de inefectivos, contribuirían a limitar aún más las opciones de la terapia antimicrobiana.

Los altos porcentajes de resistencia de las cepas *E. coli* a los antibióticos Carbenicilina (CB) y Ampicilina (AM), seguidos de Sulfametoxazol Trimetoprim (SXT) y Cloranfenicol (CL) obtenidos en este estudio y en estudios previos coinciden con la alta frecuencia de resistencia bacteriana a los antibióticos que se utilizan con mayor frecuencia en México para el tratamiento de infecciones (Novoa *et al.* 2016). Por otro lado, los antibióticos Cefalotina (CF), Norfloxacin (NOF), Gentamicina (GE), Ciprofloxacina (CPF), Amikacina (AK), Cefotaxima (CFX), Nitrofurantoína (NF), Netilmicina (NET) y Cefotaxima (CFX) mostraron porcentajes de resistencia bajos, lo cual puede ser indicativo del poco uso de estos fármacos en el tratamiento indiscriminado de infecciones (Tzoc *et al.*, 2004).

Por consiguiente, la aplicación generalizada de antibióticos en la medicina humana y veterinaria ha llevado a la emergencia, selección y diseminación de bacterias resistentes a antibióticos y genes que codifican para la resistencia antibiótica en

diferentes sectores ambientales tales como las aguas superficiales. De esta manera los ambientes acuáticos tales como ríos y arroyos se consideran reservorios ideales para la diseminación de resistencia a antibióticos, ya que antimicrobianos y bacterias resistentes a los antimicrobianos son a menudo lanzado directamente en el medio ambiente (Stange *et al.*, 2016; Ramírez *et al.*, 2013).

9.2.1 Multiresistencia de cepas *E. coli*.

Del total de cepas *E. coli* el 23.9% (27/113) presentó multiresistencia (resistencia a 4 o más antibióticos diferentes), siendo el 7.1% (8/113) las cepas más predominantes con resistencia a 4 antibióticos, seguidos del 5.3% (6/113) a 6 antibióticos, 4.4% (5/113) a 5 antibióticos, 3.5% (4/113) a 7 antibióticos, 1.8% (2/113) a 8 antibióticos y 10 antibióticos respectivamente. Dentro de este 23.9% (27/113) de cepas multiresistentes se encontraron 23 patrones de resistencia antimicrobiana, de los cuales los más frecuentes fueron: AM-CB-CL-SXT presente en 3.5% (4/113) de las cepas y AM-CB-CF-CL-NF presente en 1.8% (2/113) de las cepas, el resto de los patrones estuvieron representados por 0.9% de las cepas (1/113) (ver tabla 3).

Tabla 3. Patrones de resistencia a antibióticos de cepas *E. coli* aisladas del río Atoyac.

No. de antibióticos	Patrón	No. de cepas
	AM-CB-CF-SXT	1
	AM-CB-CF-CL	1
4	AM-CB-CL-SXT	4
	AM-CB-GE-NOF	1
	AM-CB-AK-SXT	1
	AM-CB-CF-CFX-SXT	1
5	AM-CB-CPF-NOF-SXT	1
	AM-CB-CF-GE-SXT	1
	AM-CB-CF-CL-NF	2
	AM-CB-CPF-CL-NOF-SXT	1
6	AM-CB-CF-CPF-NOF-SXT	1
	AM-CB-CL-GE-NOF-SXT	1
	AM-CB-CF-CL-NET-NOF	1
	AM-CB-CPF-CL-GE-NOF	1
	AM-CB-NF-NET-NOF-SXT	1
7	AM-CB-CPF-GE-NET-NOF-SXT	1
	AM-CB-CF-CL-NF-GE-SXT	1
	AM-CB-CPF-NF-AK-GE-NOF	1
	AM-CB-CF-CFX-CPF-CL-AK	1
8	AM-CB-CF-CPF-CL-GE-NOF-SXT	1
	AM-CB-CF-CPF-CL-NF-NOF-SXT	1
10	AM-CB-CF-CPF-CL-NF-AK-GE-NET-SXT	1
	AM-CB-CF-CFX-CPF-CL-GE-NET-NOF-SXT	1

Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Ramírez *et al.* (2013) en donde encontraron que de 150 cepas *E. coli* aisladas del río San Pedro en Aguascalientes sometidas a pruebas de sensibilidad a 13 antibióticos con perfil multiresistente, el 13% (20/150) presentó resistencia a 3 antibióticos, 7.3% (1/150) a 4 antibióticos, 5.3% (8/150) a 5 antibióticos, 3.3% (5/150) a 6 antibióticos y 1.3% (2/150) a 7 antibióticos. Asimismo, Romeu *et al.* (2012) analizaron la susceptibilidad antimicrobiana a 15 antibióticos de 113 cepas de *E. coli* aisladas de 3 ríos (Almendares, Quibú y Luyanó) de la Habana, Cuba en donde encontraron que 11.5% (13/113) de las cepas mostraron resistencia frente a 3 antibióticos o más (multirresistentes) y obtuvieron 9 patrones de multiresistencia de 3 a 7 antibióticos, donde los patrones más frecuentes fueron AMP/CPF/LV con 4 cepas (3.5%), seguido del patrón AMP/CPF/LV/NF con 2 cepas (1.8%), el resto estuvo integrado por una sola cepa.

Por otra parte, Chindembele *et al.* (2015) analizaron 114 cepas de *E. coli* aisladas de urocultivos pertenecientes a pacientes diagnosticados con infección del tracto urinario del Hospital General de Huambo, Angola y determinaron su resistencia a 12 antibióticos, en donde sus resultados mostraron que las cepas presentaron resistencia frente a más de tres antibióticos de familias diferentes, por lo que se consideraron multirresistentes y encontraron 46 patrones de multiresistencia frente a 5 hasta 10 de los 12 antibióticos evaluados. Los patrones de resistencia más frecuentes entre estas cepas fueron: AMP-KZ-SXT-CL-NF con ocho cepas, KZ-AK-SXT-CRO-CL-NF-IMP y KZ-CRO-CPF-GE-NF-AMP con seis cepas cada uno, AMP-KZ-SXT-CRO-NF con cinco cepas, mientras que el resto de los patrones estuvo integrado por 1 a 4 cepas.

Por consiguiente, los resultados de este trabajo se pueden comparar con los estudios previos revisados, en donde existe una multiresistencia presente en cepas de *E. coli*, así como patrones de resistencia que van desde los 3 antibióticos hasta los 10 antibióticos, los cuales están mayormente representados por los antibióticos Ampicilina (Am) y Sulfametoxazol Trimetoprim (SXT). Delgado *et al.* (2016) nos

dicen que los patrones de resistencia a varios antibióticos comúnmente usados en tratamientos terapéuticos se consideran una amenaza para la salud pública.

9.3 Determinación de la resistencia a metales pesados.

La resistencia presente en las cepas *E. coli* fue mayormente representada por los metales pesados Molibdato (NaMoO_4) y Hierro (FeCl_3) (Fig.5).

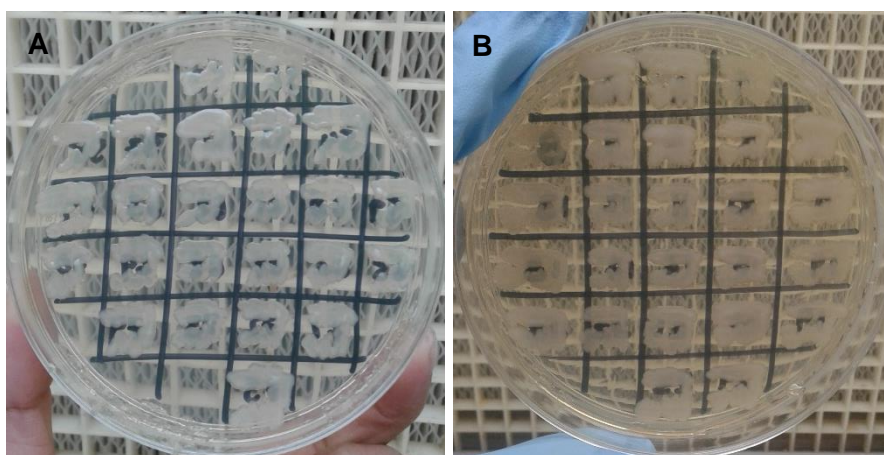
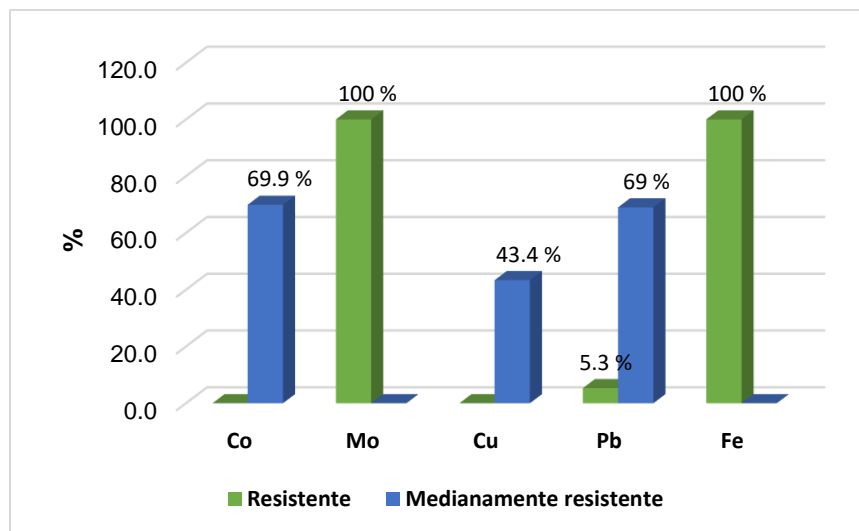


Fig. 5 Crecimiento de las cepas *E. coli* en agar Müller-Hinton adicionado con los metales: molibdeno (NaMoO_4) y Hierro (FeCl_3)
A: metal molibdato (NaMoO_4), B: metal Hierro (FeCl_3).

Las 113 cepas presentaron 100% (113/113) de resistencia a los metales Molibdeno (NaMoO_4) y Hierro (FeCl_3), ante el metal Plomo (Pb) solo el 5.3% (6/113) de las cepas fueron resistentes. También las cepas presentaron medianamente resistencia con un 69.9% (79/113) a Cobalto (CoSO_4), un 69% (78/113) a Plomo (Pb) y un 43.4% (49/113) a Cobre (CuCl) (Gráfica 3).



Gráfica 3 Comparación de los porcentajes de cepas de *E. coli* resistentes a metales pesados.

Estos resultados concuerdan con Abskharon *et al.* (2008) quienes aislaron 12 cepas de *E. coli* del canal El-Malah en Assiut (Egipto) y determinaron su tolerancia a los metales pesados: Cd, Cr, Pb, Co, Cu, Ni y Zn en concentraciones de 0.09 a 12 mM, en donde sus resultados mostraron que la mayoría de las cepas crecieron bien a bajas concentraciones de metales pesados y su número decreció gradualmente a medida que aumentaba la concentración. Asimismo, Martínez *et al.* (2010), evaluaron cepas bacterianas aisladas del río Almendares (Cuba) y encontraron que presentaban resistencia a los metales pesados Plomo (Pb) y Cromo (Cr) en concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5 mM.

Por otro lado, Chávez *et al.* (2007) determinaron la resistencia a 8 metales pesados (Fe, Co, Mo, Pb, Ni, Cu, Hg y V) a dos concentraciones (1,000 y 2,000 ppm) de 48 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes adultos con cuadro diarreicos de la ciudad de Puebla, en donde sus resultados mostraron que todas las cepas fueron resistentes a los metales pesados Fe, Mo, V, Cu, Ni y Pb y sólo el 35.4% fue resistente a Co.

Por consiguiente, con los resultados obtenidos en este estudio y lo revisado en estudios previos se muestra la resistencia de *E. coli* a metales pesados, lo que concuerda con lo expuesto por Cervantes *et al.* (2006) donde propone que la

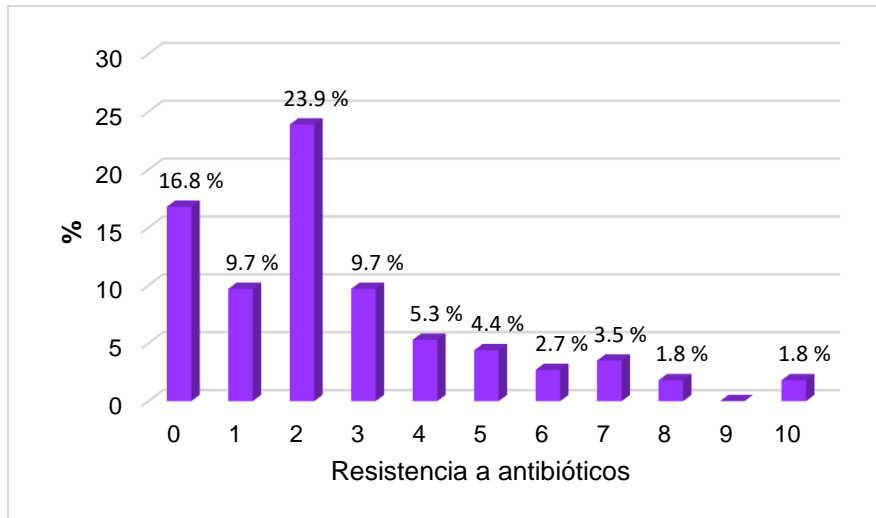
exposición a los metales, selecciona y mantiene variantes microbianas capaces de tolerar y resistir sus efectos nocivos.

La presencia de elevadas concentraciones de metales pesados en sitios antropogénicos o ecosistemas naturales, representa una presión selectiva permanente, recalcitrante y ampliamente distribuida, con importancia medioambiental, que ha contribuido al surgimiento y dispersión de nuevos genotipos microbianos que determinan la resistencia a metales (Marrero *et al.*, 2010).

Asimismo, la presencia de los metales pesados Fe, Mo, Pb, Cu y Co en el río Atoyac se puede relacionar con el vertimiento de descargas industriales que recibe el efluente. (Sandoval *et al.*, 2009)

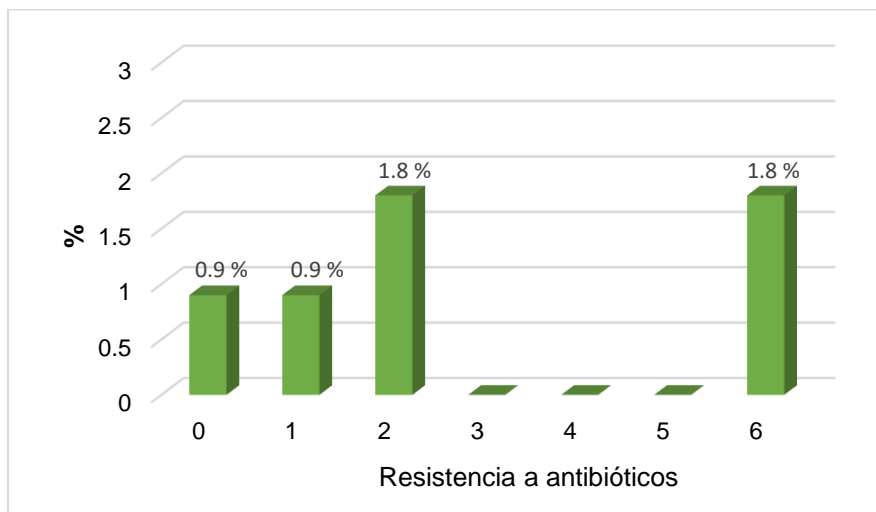
9.4 Comparación de los factores de virulencia de susceptibilidad a antibióticos y su resistencia a metales pesados de las cepas EPEC.

El 85% de las cepas EPEC (96/113) presento resistencia entre 1 a 10 antibióticos y a 2 metales pesados. El 23.9% (27/113) de las cepas presento resistencia a 2 antibióticos y 2 metales pesados, 9.7% (11/113) a 3 antibióticos y 2 metales pesados, otro 9.7% (11/113) a 1 antibiótico y 2 metales pesados, 5.3% (6/113) a 4 antibióticos y 2 metales pesados, 3.5% (4/113) a 7 antibióticos y 2 metales pesados, 2.7% (3/113) a 6 antibióticos y 2 metales pesados, 4.4% (5/113) a 5 antibióticos y 2 metales pesados, 1.8% (2/113) a 10 antibióticos y 2 metales pesados, 1.8% (2/113) a 8 antibióticos y 2 metales pesados, mientras que el 16.8% (19/113) fue susceptible a todos los antibióticos y presento resistencia a 2 metales pesados (Gráfica 4).



Gráfica 4 Porcentaje de cepas EPEC con susceptibilidad y resistencia a antibióticos y resistencia a 2 metales pesados.

El resto de las cepas EPEC presento resistencia entre 1 a 6 antibióticos y a 3 metales pesados, siendo 1.8% (2/113) resistente a 6 antibioticos y 3 metales pesados, 1.8% (2/113) a 2 antibioticos y 3 metales pesados, 0.9%(1/113) a 1 antibiotico y 2 metales pesados y 0.9% (1/113) susceptible a antibioticos y resistente a 3 metales pesados (Gráfica 5).



Gráfica 5 Porcentaje de cepas EPEC con susceptibilidad y resistencia a antibióticos y resistencia a 3 metales pesados.

Los resultados obtenidos pueden compararse con los de Lamprecht *et al.* (2014) quienes analizaron muestras de agua del río Plankenburg (Stellenbosch, Provincia del Cabo Occidental) e identificaron 81 cepas de *E. coli* de las cuales 4 cepas pertenecían al grupo EPEC y presentaron resistencia a 5 antibióticos (AM, CL, TCY, TMP y SM). De la misma manera Adefosoye *et al.* (2016) analizaron muestras de agua de efluentes finales vertidos de dos instalaciones de tratamiento de aguas residuales en la Provincia del Cabo Oriental de Sudáfrica, en donde identificaron 223 aislados presuntivos de *E. coli* de los cuales 17 (7.6%) cepas pertenecían al patogruppo EPEC que a su vez presentaron resistencia a 11 antibióticos, destacando los antibióticos: AM, CFX, CL, CIP, NOF, S y TET.

Asimismo, Novoa *et al.* (2017) analizaron de 614 cepas de bacterias aisladas de pacientes de todas las edades con diarrea aguda de 4 ciudades del sureste de México, en donde sus resultados mostraron que el 77% de las cepas analizadas correspondieron al serotipo de *E. coli* enteropatógena (EPEC), obteniendo que este patogruppo presento resistencia a 8 antimicrobianos, de los cuales destacan: AM, CL, CIP y SXT. Por otra parte, Chávez *et al.* (2007) analizaron un total de 48 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes adultos con cuadros diarreicos de la ciudad de Puebla en donde encontraron que el 30% (14/48) de las cepas pertenecían a la categoría de EPEC, las cuales presentaron una elevada resistencia a 6 metales pesados (Fe, Mo, V, Cu, Ni y Pb).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el patogruppo EPEC aislado del río Atoyac presento resistencia a antibióticos y metales pesados, lo que concuerda con estudios anteriores. Veranes (2013) nos dice que el comportamiento de los microorganismos frente a los antibióticos ha tenido un efecto colateral en la expresión de la resistencia a metales pesados como consecuencia de la presencia de genes en un mismo plásmido, que pueden conferir resistencia a estos compuestos. De manera simultánea, la presencia de metales pesados en un ecosistema puede dar lugar al desarrollo de microorganismos resistentes a estos contaminantes, así como los antibióticos.

Los microorganismos resistentes a antibióticos y metales parecen ser el resultado de la exposición a ambientes contaminados con metales que causan una selección coincidente de factores de resistencia para ambos (Abskharon *et al.*, 2008).

10. CONCLUSIONES

- ❖ Se identificó la presencia del patogrupo *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) en el efluente del río Atoyac.
- ❖ Las cepas de *Escherichia coli* aisladas del río Atoyac presentaron resistencia ante 12 antibióticos, predominando la resistencia a los antibióticos Carbenicilina (CB), Ampicilina (AM) y Sulfametoxazol/Trimetroprim (SXT).
- ❖ Las cepas de *Escherichia coli* aisladas del río Atoyac presentaron multiresistencia entre 4 a 10 antibióticos con 23 patrones de resistencia antimicrobiana
- ❖ Todas las cepas de *Escherichia coli* aisladas del río Atoyac presentaron resistencia a los metales pesados: Molibdato (NaMoO_4) y Hierro (FeCl_3) y a Plomo (Pb) sólo 5.3%.
- ❖ Los resultados revelaron la existencia de EPEC capaz de resistir a más de 1 tipo de antibiótico y a metales pesados.

11. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Abskharon, R. N. N., Hassan, S. H. A., Gad El-Rab, S. M. F. y Shoreit, A. A. M. (2008). Heavy metal resistant of *E. coli* isolated from wastewater sites in Assiut City, Egypt. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* Vol. 81, pp. 309-315.
- ❖ Aburto, A., Ortiz, I. y Hernández, E. (2017). Prevalence of *Enterobacteriaceae* and contaminants survey in sediments of the Atoyac River. *Tecnología y Ciencias del Agua.* Vol.8 (3), pp.27-37.
- ❖ Adefisoye, M. A. y Okoh, A. I. (2016). Identification and antimicrobial resistance prevalence of pathogenic *Escherichia coli* strains from treated wastewater effluents in Eastern Cape, South Africa. *Microbiology Open.* Vol. 5 (1), pp. 143-151.
- ❖ Ahmed, W., Neller, R. y Katouli, M. (2005). Host species-specific metabolic fingerprint database for enterococci and *Escherichia coli* and its application to identify sources of fecal contamination in surface waters. *APPL.ENVIRON.MICROBIOL.* Vol. 71 (8), pp. 4461-4468.
- ❖ Arcos, M., Ávila, S., Estupiñán, S. M. y Gómez, A. C. (2005). Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *NOVA-PUBLICACIÓN CIENTÍFICA.* Vol. 3 (4), pp. 69-79.
- ❖ Bonilla y Fernández, M. N., Ayala, A. I., González, S., Santamaría, J. D. y Silva, S. E. (2015). *Revista Iberoamericana de Producción Académica y Gestión Educativa.* Vol. 2 (4), pp. 1-29.
- ❖ Bonilla y Fernández, M. N., Silva, S. E., Cabrera, C. y Sánchez, R. C. (2013). Calidad del agua residual no entubada vertida por dos parques industriales

en la ciudad de Puebla, México. *Revista Iberoamericana para la Investigación y el Desarrollo Educativo*. Vol. 4 (7), pp. 1-36.

- ❖ Cabrera, C. E., Gómez, R. F. y Zúñiga, A. E. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colomb Med*. Vol. 38 (2), pp. 149-158.
- ❖ Castillo, J. H., López, A. y Bandala, E. R. (2010). Desinfección de agua mediante el uso de tecnologías emergentes basadas en procesos avanzados de oxidación. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. Vol. 4 (1), pp. 74-83.
- ❖ Cervantes, C., Espino, A. E., Acevedo, F., León, I. L., Rivera, M. E., Avila, M., Wróbel, K., Wróbel, K., Gutiérrez, J. F., Rodríguez, J. S. y Moreno, R. (2006) Interacciones microbianas con metales pesados. *Rev Latinoam Microbio*. Vol. 48 (2), pp. 203-210.
- ❖ Chávez, E., García, M., Avelino, F., Gil, C. y Castañeda, E. I. (2007). Identificación de tres factores de virulencia en cepas de *Escherichia Coli* aisladas de humanos. *ENF INF MICROBIOL*. Vol. 27 (4), pp. 114-117.
- ❖ Chávez, E., Rivera, J. A., Castañeda, E. I., Gil, J. C., Ochoa, M. A. y Cedillo, M. L. (2012). Multiresistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* enteropatógena y enterotoxigénica, detectadas en muestras clínicas mediante reacción en cadena de la polimerasa. *REVISTA CIENCIAS BIOMÉDICAS*. Vol. 3 (1), pp. 40-48.
- ❖ Chindembele, J. M., Romeu, B., Chivela, M., Resto, G. A. y Rojas, N. M. (2015). Evaluación de la resistencia antimicrobiana de cepas de *Escherichia*

- coli* causantes de infecciones urinarias en la provincia de Huambo, Angola. *REVISTA CUBANA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS*. VOL. 4 (2), pp. 71-77.
- ❖ CONAGUA (2015). Inventario nacional de plantas municipales de potabilización y de tratamiento de aguas residuales en operación. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/197610/Inventario_2015.pdf
 - ❖ Cui, Dan., Xinliang, L., Hawkey, P., Li, H., Wang, Q., Mao, Z. y Sun, J. (2017). Use of and microbial resistance to antibiotics in China: a path to reducing antimicrobial resistance. *Journal of International Medical Research*. Vol. 45 (6), pp. 1768-1778.
 - ❖ De la Peña, M. E., Ducci, J. y Zamora, V. (2013). Tratamiento de aguas residuales en México. Banco Interamericano de Desarrollo. Inter-American Development Bank.
 - ❖ Degrémont (2015 a). PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES PUEBLA. Disponible en: <http://www.degremont.com.br/ES/Referencias/Pages/Mexico-Planta-de-Tratamiento-de-Aguas-Residuales-Puebla.aspx>
 - ❖ Degrémont (2015 b). DENSADeg®: DECANTACION COMPACTA. Disponible en: <http://www.degremont.com.br/ES/Tecnologia/Pages/tecnodensadeg.aspx>
 - ❖ Delgado, M. E., Tamez, P., Gómez, R., Zavala, F. J., Eroza, G., Nevárez, G. V., Pérez, M. C., Sánchez, B., González, M. y Infante, R. (2016). Multidrug-Resistant bacteria isolated from surface water in Bassaseachic Falls National Park, Mexico. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. Vol. 13 (597), pp. 3-15.

- ❖ Dreser, A., Wirtz, V. J., Corbett, K. K. y Echániz, G. (2008). Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud pública de México. Vol. 50 (4)*, pp. 480-487.

- ❖ FAO. (2010). Día Mundial del Agua 2010: agua limpia para un mundo sano. Disponible en: <http://www.fao.org/americas/noticias/ver/es/c/229276/>

- ❖ García, E., Carrizalez, L., Juárez, L., García, E., Hernández, E., Briones, E. y Vázquez, O. G. (2011). Plomo y Arsénico en la Subcuenca del Alto Atoyac en Tlaxcala, México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. Vol. 17 (1)*, pp. 7-17.

- ❖ Gutiérrez, O. G., Navarro, L. F., Loeza, P. D., Del Río, O. G. y Jiménez, R. (2017). Perfiles de resistencia a antibióticos y metales pesados en *Pseudomonas aeruginosa* potencialmente patógenas aisladas de agua de uso agrícola. *Nova Scientia. Vol. 9 (2)*, pp. 97-112.

- ❖ Hernández, C., Aguilera, M. G. y Castro, G. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *ENF INF MICROBIOL. Vol. 31 (4)*, pp. 137-151.

- ❖ Huang, W. C., Hsu, B. M., Kao, P. M., Tao, C. W., Ho, Y. N., Kuo, C. W. y Huang, Y. L. (2016). Seasonal distribution and prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in different aquatic environments in Taiwan. *Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 124*, pp. 37-41.

- ❖ Kawane, R. S. (2012). Studies on antibiotics and heavy metal resistance profiling of *Escherichia coli* from drinking water and clinical specimens. *Bioscience Discovery. Vol. 3 (3)*, pp. 292-295.

- ❖ Lamprecht, C., Romain, M., Huisamen, N., Carinus, A., Schoeman, N., Sigge, G. O. y Britz, T. J. (2014). *Escherichia coli* with virulence factors and

multidrug resistance in the Plankenburg River. *South African Journal of Science*. Vol. 110 (9/10), pp. 1-6.

- ❖ Lluque, A., Mercado, E., Riveros, M., Alvarado, L., Carlos, E., Colichón, A., Salazar, E. y Ochoa, T. (2010). Comparación entre el Diagnóstico Serológico y el Diagnóstico por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC). *Rev. Gastroenterol. Perú*. Vol. 30 (2), pp.121-125.
- ❖ López, R. y Montalvo, R. (2015). Expansión urbana, agua potable y saneamiento en la zona metropolitana Puebla Tlaxcala (ZMPT). *Revista OI DLES*. Vol. 9 (18), pp. 1-16.
- ❖ Marrero, J., Amores, I. y Coto, O. (2012). Fitorremediación, una tecnología que involucra a plantas y microorganismos en el saneamiento ambiental. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*. Vol. 46 (3), pp. 52-61.
- ❖ Marrero, J., Díaz, A. y Coto, O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. Vol. 41 (1), pp. 67-78.
- ❖ Martínez, A., Cruz, M., Veranes, O., Carballo, M. E., Salgado, I., Olivares, S., Lima, L. y Rodríguez, D. (2010). Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. Vol. 41, pp. 1-10.
- ❖ Megchún, J. V., Landeros, C., Soto, A., Castañeda, M. d. R., Martínez, J. P., Nikolskii, I., Galaviz, I. y Lango, F. (2015). Total coliforms and *Escherichia coli* in surface and subsurface water from a sugarcane agroecosystem in Veracruz, México. *Journal of Agricultural Science*. Vol. 7 (6), pp. 110-119.

- ❖ Mendes, D. y Domingues, L. (2015). On the track for an efficient detection of *Escherichia coli* in water: A review on PCR-based methods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 113, pp. 400-411.

- ❖ Méndez, R. I., San Pedro, L., Castillo, E. R. y Vázquez, E. (2010). Modelación del tiempo de conservación de muestras biológicas de agua. *Rev. Int. Contam. Ambient*. Vol. 26 (4), pp. 327-335.

- ❖ Mora, S. G., Alarcón, A. Rocandio, M. y Vanoye, V. (2016). Bioremediation of wastewater for reutilization in agricultural systems: a review. *APPLIED ECOLOGY AND ENVIRONMENTAL RESEARCH*. Vol. 15 (1), pp. 33-50.

- ❖ Moraga, R., Merino, C. y Mondaca, M. A. (2003). Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Invest. Mar*. Vol. 31 (1), pp. 91-95.

- ❖ Nontongana, N., Sibanda, T., Ngwenya, E. y Okoh, A. I. (2014). Prevalence and antibiogram profiling of *Escherichia coli* pathotypes Isolated from the Kat river and the Fort Beaufort abstraction water. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. Vol. 11, pp. 8213-8227

- ❖ Novoa, O., Frati, A. C., Peredo, M. A., Flores, S., Novoa, O., Galicia, J. y Romero, C. E. (2017). Susceptibility to rifaximin and other antimicrobials of bacteria isolated in patients with acute gastrointestinal infections in Southeast Mexico. *Revista de Gastroenterología de México*. Vol. 82 (3), pp. 226-233.

- ❖ Obi, C. L., Green, E., Bessong, P. O., De Villiers, B., Hoosen, A. A., Igumbor, E. O. y Potgieter, N. (2004). Gene encoding virulence markers among *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic stool samples and river sources in rural Venda communities of South Africa. *Water S.A*. Vol. 30 (1), pp. 37-42.

- ❖ Olguín, E. J., González, R. E., Sánchez, G., Zamora, J. E. y Owen, T. (2010). Contaminación de ríos urbanos: El caso de la subcuenca del río Sordo en Xalapa, Veracruz, México. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal. Vol.1 (2)*, pp.178-190.

- ❖ ONU. (2014). Decenio Internacional para la Acción "El agua fuente de vida" 2005-2015: Calidad del agua. Disponible en: <http://www.un.org/spanish/waterforlifedecade/quality.shtml>

- ❖ Paniagua, G. L., Monroy, E. y Vaca, S. (2007). Fenotipos de resistencia a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* diarreogénicas detectadas en infantes mediante reacción en cadena de la polimerasa multiplex. *Rev Med Hosp Gen Mex. Vol. 70 (4)*, pp. 158- 167.

- ❖ Peña, M., Dávila, C., Tresierra, A. y Castro, J. (2014). Identificación molecular de *Escherichia coli* enterotoxigénica en niños con infecciones diarreicas agudas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. *Ciencia amazónica (Iquitos). Vol. 4 (2)*, pp. 117-122.

- ❖ Pérez, G., Tamariz, V., López, L., Hernández, F., Castelán, R., Morán, J. L., García, W. A., Díaz, A. y Handal, A. (2018). Atoyac River Pollution in the Metropolitan Area of Puebla, México. *Water. Vol. 10 (3)*, pp. 267-283.

- ❖ Pérez, H. J. y Robles, A. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica MD. Vol. 4 (3)*, pp.186-191.

- ❖ Pérez, N., Pavas, N., Molina, N. y Rodríguez E. I. (2008). Resistencia a los antimicrobianos de las enterobacterias en un Hospital de la Orinoquía Colombiana. *Acta Colombiana de Cuidado Intensivo. Vol. 8 (2)*, pp. 67-74.

- ❖ Ramírez, F. Y., Avelar, F. J., Garneau, P., Márquez, F., Guerrero, A. L. y Harel, J. (2013). Presence of multi-drug resistant pathogenic *Escherichia coli* in the San Pedro River located in the State of Aguascalientes, México. *Front. Microbiol. Vol. 4 (147)*, pp. 1-16.

- ❖ Reynolds, K. (2002). Tratamiento de Aguas Residuales en Latinoamérica: Identificación del Problema. *Agua Latinoamérica*. Disponible en: http://cidta.usal.es/cursos/EDAR/modulos/Edar/unidades/LIBROS/documentos_nuevos/DeLaLaveSepOct02.pdf

- ❖ Rivera, R., Palacios O. L., Chávez, J., Belmont, M. A., Nikolski, I., De la Isla de Bauer, M., Guzmán, A., Terrazas, L. y Carrillo, R. (2007). Contaminación por coliformes y helmintos en los ríos Texcoco, Chapingo y San Bernardino tributarios de la parte Oriental de la Cuenca del Valle de México. *Rev. Int. Contam. Ambient. Vol. 23 (2)*, pp. 69-77.

- ❖ Rivera, A., Chávez, E., Rendón, G. y Giono, S. (2006 a). Viabilidad de *Escherichia coli* en presencia de diferentes contaminantes. *Rev Peru Med Exp Salud Publica. Vol. 23 (2)*, pp. 110-113.

- ❖ Rivera, J. A., Cedillo, L., Guzmán, M. y Giono, S. (2006 b). Diagnóstico de enterobacterias en el río Alseseca. *Rev Fac Med UNAM. Vol. 49 (1)*, pp. 20-22.

- ❖ Riveros, M. y Ochoa, T. J. (2015). Enteropatógenos de importancia en salud pública. *Rev Peru Med Exp Salud Publica. Vol. 32 (1)*, pp.157-64.

- ❖ Rodríguez, L. y Morales, J. A. (2017). Bacterial Pollution in River Waters and Gastrointestinal Diseases. *Int. J. Environ. Res. Public Health. Vol 14*, pp. 479-489.

- ❖ Rodríguez, L., Morales, J. A. y Zavala, P. (2012). Evaluación socioeconómica de daños ambientales por contaminación del río Atoyac en México. *Tecnología y Ciencias del Agua*. Vol. 3, pp. 143-151.
- ❖ Romeu, B., Salazar, P., Lugo, D., Rojas, N. M. y Eslava, C. A. (2012). Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Escherichia coli* procedentes de ecosistemas dulceacuícolas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. Vol. 64 (2), pp.132-141.
- ❖ Ruvalcaba, J. C., Rosas, I., Pertuz, S. B., Interían, L. y Raygoza, A. M. (2014). Bacteriological Indicators on the Environment and in Human Healt. *Curr. World Environ*. Vol. 9(1), pp. 96-104.
- ❖ Sandoval, A. M., Pulido, G., Monks, S., Gordillo, A. J. y Villegas, E. C. (2009). Evaluación fisicoquímica, microbiológica y toxicológica de la degradación ambiental del río Atoyac, México. *Interciencia*. Vol. 34 (12), pp. 880-887.
- ❖ Seiler, C. y Berendonk, T. U. (2012). *Front* Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Microbiol*. Vol. 3 (399), pp. 1-10.
- ❖ SEMARNAT (2003). Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002, Protección ambiental. - Lodos y biosólidos. - Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final. *Diario Oficial de la Federación (DOF)*. Disponible en: <http://www.semarnat.gob.mx/gobmx/biblioteca/nom.html>
- ❖ Stange, C., Sidhu, J. P. S., Tiehm, A. y Toze, S. (2016). Antibiotic resistance and virulence genes in coliform water isolates. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. Vol. 219, pp.823-831.

- ❖ Somda, N. S., Bonkougou, O. J. I., Zongo, C., Kpoda, D. S., Tapsoba, F., Bassolé, I. H. N., Traoré, Y., y Savadogo, A. Prevalence of *Escherichia coli* virulence genes in patients with diarrhoea in ouagadougou, burkina faso. *AFRICAN JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL MICROBIOLOGY*. Vol. 18 (4), pp. 179-185.

- ❖ Suárez, P. y Reyes, R. (2002). La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Interciencia*. Vol. 27 (4), pp.160-164.

- ❖ Tafur, J. D., Torres, J. A. y Villegas, M. V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infect*. Vol.12 (3), pp. 223-233.

- ❖ Titilawo, Y., Obi, L. y Okoh, A. (2015). Occurrence of virulence gene signatures associated with diarrhoeagenic and non-diarrhoeagenic pathovars of *Escherichia coli* isolates from some selected rivers in South-Western Nigeria. *BMC Microbiology*. Vol. 15 (204), pp. 1-14.

- ❖ Tzoc, E., Arias, M. L. y Valiente, C. (2004). Efecto de las aguas residuales hospitalarias sobre los patrones de resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Aeromonas sp.* Vol. 15 (3), pp. 165-172.

- ❖ Valencia, R., Waliszewski, S. M., Gómez, J. L., Suárez, J. y Sánchez, J. (2011). Evaluación de riesgos por exposición a contaminantes ambientales presentes en las aguas del Sistema Hidrológico Atoyac-Zahuapan. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/235997477>

- ❖ Veranes, O. (2013). Evaluación de la resistencia a antibióticos y a metales pesados en aislados bacterianos del río Almendares. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. Vol. 44 (3), pp. 35-37.

- ❖ Vidal, J. E. (2003). *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC): Una causa frecuente de diarrea infantil. *Salud en Tabasco*. Vol. 9 (1), pp. 188-193.
- ❖ Vila, J., Álvarez, M., Buesa, J. y Castillo, J. (2009). Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. Vol. 27 (7), pp. 406-411.
- ❖ Yamile, A. y Celis, B. (2012). *Escherichia coli* uropatógena resistente a múltiples antibióticos: un problema de salud pública. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*. Vol. 30 (1), pp.74-77.