UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS EN EL AFLUENTE DEL RÍO CUAUTLA UTILIZADO PARA EL RIEGO AGRÍCOLA EN EL ESTADO DE MORELOS

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

L.N. MIGUEL BERNARDO VEGA MAYA

DIRECTOR: DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ
CODIRECTOR: DR. HUMBERTO BARRIOS CAMACHO

CUERNAVACA, MORELOS **JUNIO, 2025**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) antes (CONAHCYT) por el apoyo institucional y la beca otorgada con Número 825594.

Al Dr. Humberto Barrios Camacho por invitarme a ser parte de este importante proyecto y por compartir sus conocimientos en la materia, que hoy son parte de mis herramientas de desarrollo profesional.

Al Dr. Ramón Suárez Rodríguez por aceptarme en su laboratorio y ser el titular del presente trabajo.

Al Dr. José Augusto Trujillo Ramírez por su disposición y apoyo dentro y fuera del laboratorio.

A la Dra. Josefina Durán Bedolla que con sus cuestionamientos certeros me desafiaba a ser un mejor estudiante.

Al Dr. Jesús Arellano García por sus observaciones siempre optimistas.

A todos los anteriores por ser los atentos revisores de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio, por su amistad y su ayuda; en especial a Ana, Paty, Lupita y “el Zamorano”.

TABLA DE CONTENIDO

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS IV
ÍNDICE DE FIGURAS VI
ÍNDICE DE TABLAS VIII
RESUMEN IX
INTRODUCCIÓN 1
Producción agrícola en el estado de Morelos 3
Cuenca del río Cuautla 4
Uso de aguas residuales en la agricultura 9
Coliformes como indicadores de la calidad del agua 9
Bacterias 10
Bacterias patógenas 10
Enterobacteriaceae 11
Fisiología y estructura 11
Género *Klebsiella* 11
Género *Pseudomonas* 12
Fisiología y estructura 12
Antibióticos 12
Clasificación y mecanismos de acción 12
Antibióticos betalactámicos 14
Resistencia bacteriana 16
Betalactamasas 17
Clasificación de las betalactamasas 17
Resistencia bacteriana: una amenaza global 18
Patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos 20
JUSTIFICACIÓN 23
HIPÓTESIS 24
OBJETIVOS 24
General 24
Particulares 24
MATERIALES Y MÉTODOS 25
Área de estudio 26

Fechas de muestreo. 29
Primer muestreo: época de estiaje. 29
Segundo muestreo: temporada de lluvias. 29
Toma de muestras de aguas de uso agrícola. 29
Toma de muestras y obtención de bacterias de cultivos vegetales de consumo humano. 30
Aislamiento las cepas bacterianas resistentes a antibióticos 30
Identificación de especies 31
Clasificación por tinción de Gram 31
Extracción de ADN 31
Identificación de betalactamasas mediante PCR 31
Electroforesis de los productos de PCR 32
Prueba de detección de betalactamasas por nitrocefina 32
Determinación del perfil de resistencia 33
RESULTADOS 34
Primer muestreo: Temporada de estiaje 34
Especies bacterianas identificadas 35
Tinción de Gram primer muestreo 37
Aislados de los sitios de los puentes 37
Genes de resistencia encontrados por PCR 38
Ubicación de los genes de resistencia encontrados 40
Pruebas de nitrocefina para detección de betalactamasas 43
Segundo muestreo: Temporada de lluvias 44
Especies bacterianas identificadas 45
Tinción de Gram segundo muestreo 47
Aislados de los sitios de los puentes 47
Genes de resistencia encontrados por PCR 48
Ubicación de los genes de resistencia encontrados 48
Pruebas de nitrocefina para detección de betalactamasas 51
Perfiles de resistencia a antibióticos. 52
DISCUSIÓN 54
CONCLUSIONES 63
PERSPECTIVAS 63

BIBLIOGRAFÍA 64
ANEXOS 70
Anexo I: Lista de aislados del primer muestreo 70
Anexo II: Lista de aislados del segundo muestreo 76
Anexo III: Mapa de sitios monitoreados por la RENAMECA. 81
Anexo IV: Bacterias aisladas como endófitos. 82

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Símbolo/Abreviatura	Definición
°C	Grados Celsius
µl	Microlitros
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMK	Amikacina
AMP	Ampicilina
ASURCO	Asociación de Usuarios del río Cuautla, manantiales y corrientes tributarias General Eufemio Zapata Salazar A.C.
BLEE	Betalactamasa de Espectro Extendido
CH	Clínica Hospital
CAZ	Ceftazidima
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
cm	Centímetros
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CONAGUA	Comisión Nacional del Agua
CTX	Cefotaxima
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FEP	Cefepime
GWW-México	Global Water Watch México, A.C
HG	Hospital General
UH	Unidad Habitacional
ID	Clave de identificación
IMP	Imipenem
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IMTA	Instituto Mexicano de Tecnología del Agua
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
km	Kilómetros

l/s	Litros por segundo
LPS	Lipopolisacárido
LVX	Levofloxacino
MβLs	Metalobetalactamasas
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
$MgCl_2$	Cloruro de magnesio
MgSO4 0.1 M	Sulfato de magnesio al 0.1 molar
m	Metros
ml	Mililitros
MLST	Multilocus sequence typing
mm	Milímetros
msnm	Metros sobre el nivel del mar
nm	Nanómetro
NMP	Número más probable
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PBPs	Penicillin-binding proteins
pH	Potencial de hidrógeno
PROFEPA	Procuraduría Federal de Protección al Ambiente
PTAR	Planta Tratadora de Aguas Residuales
RAM	Resistencia a los antimicrobianos
REDPA	Registro Público de Derechos de Agua
RENAMECA	Red Nacional de Medición de Calidad del Agua
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SSAPAS	Situación del Subsector Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento
TAE	Tris Acetato EDTA
Taq-Pol	Taq ADN polimerasa
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UMF	Unidad de Medicina Familiar
V	Voltios

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las cuencas del estado de Morelos y sus principales ríos (CONAGUA, 2010). 1
Figura 2. Regiones, cuencas y subcuencas hidrológicas de Morelos (INEGI, 2021). 2
Figura 3. Módulos del Distrito de Riego 016 Estado de Morelos (CEAGUA, 2014). 3
Figura 4. Mapa de la distribución espacial de los municipios que cubren la subcuenca del río Cuautla (Eguía-Lis, Izurieta, Miganjos-Carro, & González-Villela, 2014). 4
Figura 5. Presa derivadora El Mirador (Capturada en campo el 03/02/2023). 5
Figura 6. Descarga de aguas residuales sobre canal de riego (Capturada en campo el 13/09/2023). 6
Figura 7. Contaminación del río Cuautla por residuos sólidos (capturada en campo el 22/09/2023). 7
Figura 8. Estructura química de los antibióticos betalactámicos (Suárez & Gudiol, 2009). 15
Figura 9. Ejemplificación de los Mecanismos de resistencia a antibióticos y de sus sitios de acción (Pérez-Gracia, 2021) 16
Figura 10. Características moleculares y funcionales de los principales grupos de betalactamasas (Bush, 2018). Av, avibactam; CA, ácido clavulánico; Cb, carbapenémicos; Cp, cefalosporinas; EDTA, ácido etilendiaminotetraacético; E, cefalosporinas de espectro extendido; M, monobactámicos; P, penicilinas. 18
Figura 11. Esquema metodológico. 25
Figura 12. Sitios de muestreo, hospitales y PTAR en la zona del Río Cuautla. 28
Figura 13. Frecuencia y porcentaje de aislados bacterianos del primer muestreo de acuerdo con el antibiótico en el que fueron seleccionados. 34
Figura 14. Frecuencia y porcentaje de aislados del primer muestreo de acuerdo con el origen de la muestra. 34
Figura 15. Número de aislados del primer muestreo por sitio y tipo de muestra. .. 35
Figura 16. Frecuencia y porcentaje de aislados gram positivos y gram negativos del primer muestreo. 37
Figura 17. Frecuencia y porcentaje de aislados del primer muestreo en puentes de acuerdo con el antibiótico de selección. 37
Figura 18. Gel de electroforesis de productos de PCR de muestras individuales para CTX-M. 38
Figura 19. Gel de electroforesis de productos de PCR de mezclas de ADN para KPC. 38
Figura 20. Gel de electroforesis de productos de PCR de mezclas de ADN para NDM. 39
Figura 21. Gel de electroforesis de productos de PCR de muestras individuales para SHV. 39
Figura 22. Gel de electroforesis de productos de PCR de muestras individuales para VIM. 40

Figura 23. Ubicación de los aislados del primer muestreo con genes de resistencia. 42
Figura 24. Resultados de las pruebas de nitrocefina de los aislados del primer muestreo. 43
Figura 25. Frecuencia y porcentaje de aislados bacterianos del segundo muestreo de acuerdo con el antibiótico en el que fueron seleccionados. 44
Figura 26. Frecuencia y porcentaje de aislados del segundo muestreo de acuerdo con el tipo de muestra. 44
Figura 27. Número de aislados del segundo muestreo por sitio y tipo de muestra. 45
Figura 28. Frecuencia y porcentaje de aislados gram positivos y gram negativos del segundo muestreo. 47
Figura 29. Frecuencia y porcentaje de aislados del segundo muestreo en puentes de acuerdo con su resistencia. 47
Figura 30. Ubicación de los aislados del segundo muestreo con genes de resistencia. 50
Figura 31. Resultados de las pruebas de nitrocefina de aislados del segundo muestreo 51
Figura 32. Recuentos de Escherichia coli del primer y segundo muestreo de acuerdo con el antibiótico de selección. 55
Figura 33. Monitoreos de bacterias en el “Vado de Brisas” efectuados por la GWW-México. 56
Figura 34. Monitoreos de bacterias en el “Puente San Pedro Apatlaco” efectuados por la GWW-México. 57
Figura 35. A) Frecuencia y porcentaje de endófitos de acuerdo con el tejido de aislamiento. B) Frecuencia y porcentaje de endófitos de acuerdo con el antibiótico de selección. 60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plantas tratadoras de aguas residuales de los municipios de Ayala, Cuautla y Yecapixtla (CONAGUA, 2023). 8
Tabla 2: Clasificación química de los antibióticos, ejemplos, espectro y modo de acción modificada de (Errecalde, 2004). 13
Tabla 3: Lista de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos (WHO, 2024). 21
Tabla 4: Puntos de muestreo de este estudio y otros sitios de interés. 27
Tabla 5: Características de los oligonucleótidos utilizados en PCR 32
Tabla 6: Condiciones de amplificación 32
Tabla 7: Especies encontradas en el primer muestreo. 36
Tabla 8: Genes de resistencia encontrados en primer muestreo. 40
Tabla 9: Especies encontradas en el segundo muestreo. 46
Tabla 10. Genes de resistencia encontrados en el segundo muestreo. 49
Tabla 11. Perfiles de susceptibilidad 52
Tabla 12. Datos microbiológicos del río Cuautla 2022 y 2023 (CONAGUA, 2025). 58

RESUMEN

En Morelos, la cuenca del río Cuautla cuenta con la mayor superficie agrícola de riego del estado, gracias a la infraestructura hidroagrícola instalada en la zona, mediante la cual se aprovechan las aguas de este afluente y de otros manantiales para la irrigación de los campos de cultivo. Además, en la cuenca se ubica la segunda mayor población del estado, por lo que recibe una cantidad importante de aguas residuales, la mayoría de origen público urbano. Estas descargas se intensifican cuando las corrientes tributarias del río transcurren por las zonas urbanas. Sin embargo, en comunidades pequeñas principalmente rurales, este fenómeno no es de menor importancia ya que en estos lugares se tiene menor acceso al drenaje y saneamiento, por lo que disponen sus aguas residuales sin tratamiento previo alguno. Estas descargas se consideran una fuente de contaminación con antibióticos y bacterias patógenas al medio, lo que produce un fuerte impacto sobre los perfiles de resistencia a los antibióticos y su diseminación entre las poblaciones bacterianas que se encuentran en el ambiente.

En este proyecto de investigación se buscó la identificación de bacterias gram negativas en el afluente del río Cuautla utilizado para el riego agrícola en el estado de Morelos. En febrero y septiembre del 2023, se tomaron muestras de agua en 12 puntos del cauce del río Cuautla y en 2 canales que se derivan de este; las muestras fueron filtradas al vacío con filtros de 0.45 µm de diámetro de poro y dichos filtrados se preservaron en medio LB/glicerol (30 % v/v) a -70 °C. Además, se colectaron ejemplares completos de cultivos agrícolas que utilizan el agua del río para su riego, estas muestras se seccionaron en raíces, tallos y hojas o frutos; cada tejido se desinfectó y maceró por separado. Después del periodo de maceración las muestras fueron centrifugadas, los sobrenadantes se filtraron mediante el mismo método de filtración por membrana y se preservaron los filtrados en las mismas condiciones que las muestras de agua. Las bacterias preservadas en los filtrados se resuspendieron y cultivaron en agares MacConkey y LB en combinación con uno de los siguientes antibióticos betalactámicos: ampicilina, cefotaxima o imipenem. Aquellos aislamientos que presentaron resistencia a alguno de los antibióticos se aislaron para la identificación hasta especie mediante la técnica MALDI-TOF. A los aislados obtenidos se les realizo la prueba de hidrólisis de nitrocefina para identificar la producción de betalactamasas y de PCR punto final para identificar los genes de resistencia: CTX-M, KPC, NDM, SHV y VIM. Aquellos aislados que resultaron positivos para algún gen de resistencia se les realizó su perfil de susceptibilidad para los antibióticos amikacina, ceftazidima, cefotaxima, cefepime, imipenem y levofloxacino.

Entre los dos muestreos se obtuvieron 391 aislados bacterianos con resistencia a los antibióticos utilizados, de los cuales se lograron identificar hasta especie el 89 % (347/391). Dentro de este total, 9 % (36/391) presentó uno o varios de los

siguientes genes de resistencia: CTX-M, SHV y VIM. Las pruebas de nitrocefina revelaron que el 74% (187/254) de los aislados evaluados son productores de betalactamasas, y los perfiles de susceptibilidad corroboraron la resistencia a betalactámicos con una alta tasa de resistencia a cefalosporinas. Estos resultados demuestran el grave problema que se tiene en la cuenca del río Cuautla por contaminación con aguas residuales que contienen bacterias resistentes a los antibióticos. De estas bacterias las que mayor preocupación causan son aquellas que presentaron genes de resistencia, la mayoría pertenecientes a la especie *Escherichia coli* con diversas combinaciones de genes y perfiles de resistencia. Además, encontramos otras bacterias patógenas humanas de relevancia hospitalaria como *Enterobacter hormaechei, Klebsiella pneumoniae y Stenotrophomonas maltophilia.*

Por otra parte, nuestros datos también revelaron un patrón en el que el número de bacterias resistentes va disminuyendo del agua de riego a la rizósfera, de la rizósfera a las raíces, y a su vez de las raíces a los tejidos aéreos como el tallo, las hojas o frutos. Este patrón se puede deber a factores climáticos como la temperatura, la humedad y las horas luz, pero también a la competencia con bacterias propias de la rizósfera y las endófitas de cada cultivo. Aunque pareciera que este fenómeno brinda un efecto protector, puesto que la presencia de bacterias con resistencia a los antibióticos utilizados dentro de tejidos importantes como las hojas o frutos fue prácticamente nula, y además no se halló ningún gen de resistencia en estos tejidos. No se debe minimizar el riesgo que puede representar la contaminación por bacterias resistentes para la salud de los agricultores y sus comunidades, los consumidores y el ambiente mismo.

Abstract

The Cuautla River basin in the state of Morelos, Mexico, encompasses the largest irrigated agricultural area in the region, supported by hydro-agricultural infrastructure that enables the use of surface water from the river and surrounding springs for crop irrigation. However, the basin is also home to the second-largest population center in the state, resulting in substantial input of wastewater, primarily from urban public sources. This discharge intensifies where tributaries flow through urban zones. In smaller, predominantly rural communities, untreated wastewater is often discharged directly due to limited access to sanitation infrastructure. These discharges introduce antibiotics and pathogenic bacteria into the environment, promoting the development and dissemination of antibiotic resistance among environmental bacterial populations.

This study aimed to identify Gram-negative bacteria in the Cuautla River, a source of irrigation water in Morelos. In February and September 2023, water samples were collected from 12 sites along the river and 2 associated irrigation canals. Samples were vacuum-filtered using 0.45 µm pore-size membranes and preserved in LB/glycerol medium (30% v/v) at −70 °C. Additionally, agricultural crop samples irrigated with river water were collected and dissected into roots, stems, and leaves or fruits. Each tissue was disinfected, macerated individually, centrifuged, and filtered using the same membrane method; the filtrates were preserved under the same conditions as the water samples.

Filtered bacteria were resuspended and cultured on MacConkey and LB agars supplemented with one of the following β-lactam antibiotics: ampicillin, cefotaxime, or imipenem. Resistant isolates were purified and identified to the species level via MALDI-TOF mass spectrometry. Isolates were further tested using the nitrocefin hydrolysis assay to determine β-lactamase production, and endpoint PCR was performed to detect resistance genes including CTX-M, KPC, NDM, SHV, and VIM. Isolates positive for resistance genes were subjected to antimicrobial susceptibility testing using amikacin, ceftazidime, cefotaxime, cefepime, imipenem, and levofloxacin.

A total of 391 antibiotic-resistant bacterial isolates were obtained across both sampling periods, of which 89% (347/391) were successfully identified to the species level. Among these, 9 % (36/391) harbored one or more of the resistance genes CTX-M, SHV, or VIM. Nitrocefin assays indicated that 74% (187/254) of the isolates were β-lactamase producers. Susceptibility profiles confirmed extensive resistance to β-lactam antibiotics, particularly cephalosporins. The findings highlight the significant public health and environmental risks posed by untreated wastewater discharges into the Cuautla River, contributing to the persistence and spread of antibiotic-resistant bacteria.

Notably, the isolates carrying resistance genes were predominantly *Escherichia coli*, presenting a range of gene combinations and resistance phenotypes. Other clinically

significant species identified included *Enterobacter hormaechei*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Stenotrophomonas maltophilia*.

On the other hand, our data also revealed a pattern in which the number of antibiotic-resistant bacteria decreases progressively from irrigation water to the rhizosphere, from the rhizosphere to the roots, and subsequently from the roots to aerial tissues such as stems, leaves, or fruits. This trend may be influenced by climatic factors such as temperature, humidity, and light exposure, as well as by microbial competition with native rhizospheric and endophytic bacterial communities specific to each crop. Although this phenomenon may appear to exert a protective effect—given that the presence of antibiotic-resistant bacteria in critical tissues such as leaves or fruits was virtually nonexistent, and no resistance genes were detected in these tissues—it is important not to underestimate the potential risks posed by contamination with resistant bacteria. Such contamination can have serious implications for the health of farmers and their communities, consumers, and the environment.

INTRODUCCIÓN

El estado de Morelos se ubica en la zona centro de la República Mexicana y cuenta con las siguientes colindancias: al norte con Estado de México y la Ciudad de México; al este con Estado de México y Puebla; al sur con Puebla y Guerrero; al oeste con Guerrero y Estado México; su capital es el municipio de Cuernavaca (INEGI, 2021). Este estado se encuentra dentro del territorio de la gran cuenca del río Balsas, y a su vez se encuentra dividido en siete subcuencas. De las cuales seis desembocan en el río Amacuzac y la última en el río Nexapa. La mayor parte (87 %) de la superficie del estado pertenece a la cuenca del río Amacuzac, en esta cuenca se ubican cinco ríos principales: Chalma-Tembembe, Apatlaco, Yautepec, Cuautla y Amacuzac (Figura 1) (CONAGUA, 2010).

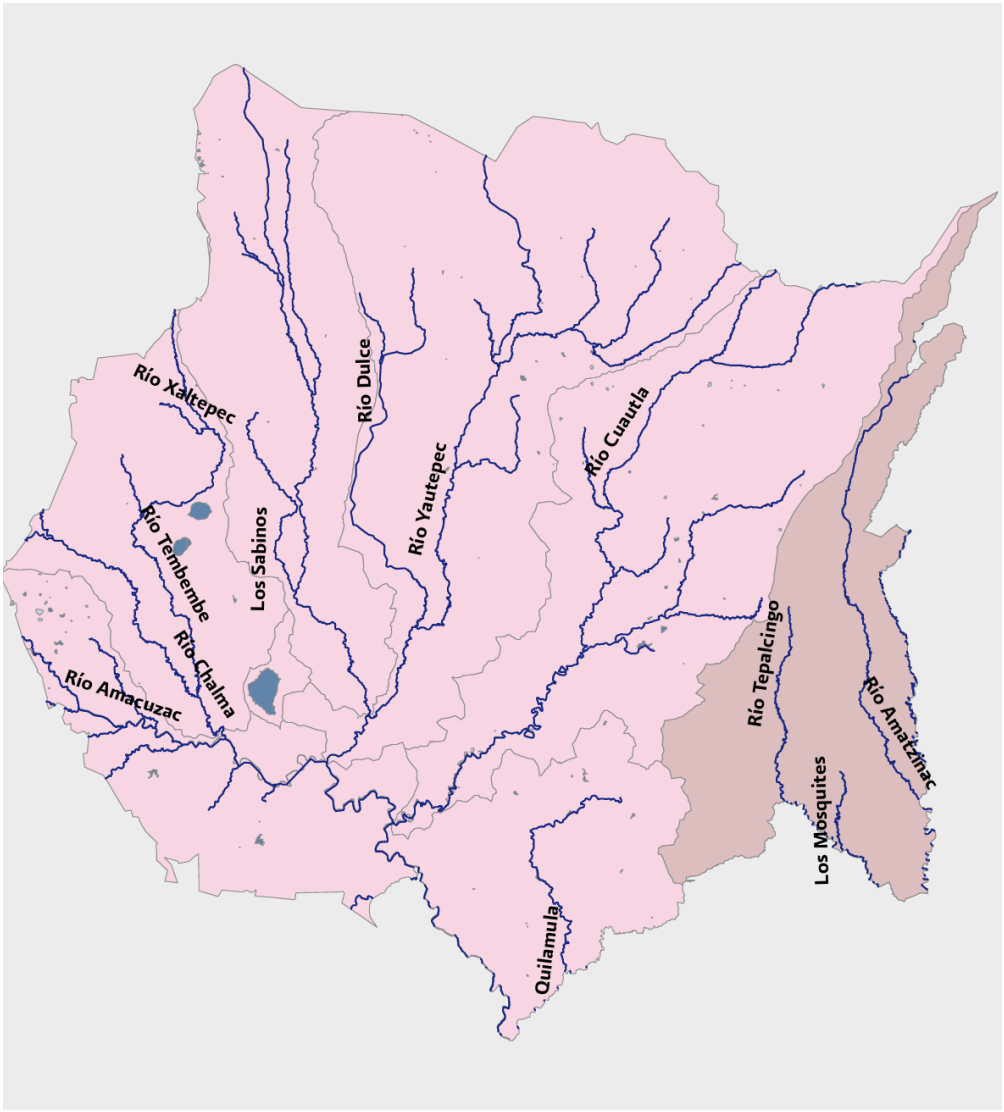


Figura 1. Las cuencas del estado de Morelos y sus principales ríos (CONAGUA, 2010).

En los márgenes de estos ríos se encuentran poblaciones importantes que por su tamaño se presentan como grandes fuentes de aguas residuales que contaminan dichos afluentes (Figura 2). De acuerdo con los datos del documento “Situación del Subsector Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento” (SSAPAS) para diciembre del 2023 en Morelos se generaba una cifra de 8595 l/s de aguas residuales, de las cuales se colectaban 6752 l/s en un total de 78 plantas tratadoras (PTAR) que se encontraban operando. De las cuales en conjunto tienen una capacidad instalada de 3154 l/s, sin embargo, el caudal tratado solo ascendió a 1942 l/s lo cual apenas representó un 28.8 % de cobertura de tratamiento (CONAGUA, 2024). Por otro lado, el Registro Público de Derechos de Agua (REPDA) en Morelos, menciona que las aguas residuales que se disponen sin tratamiento, se descargan a fosas sépticas, pozos de absorción, o directamente a arroyos, barrancas y ríos (CONAGUA, 2010).

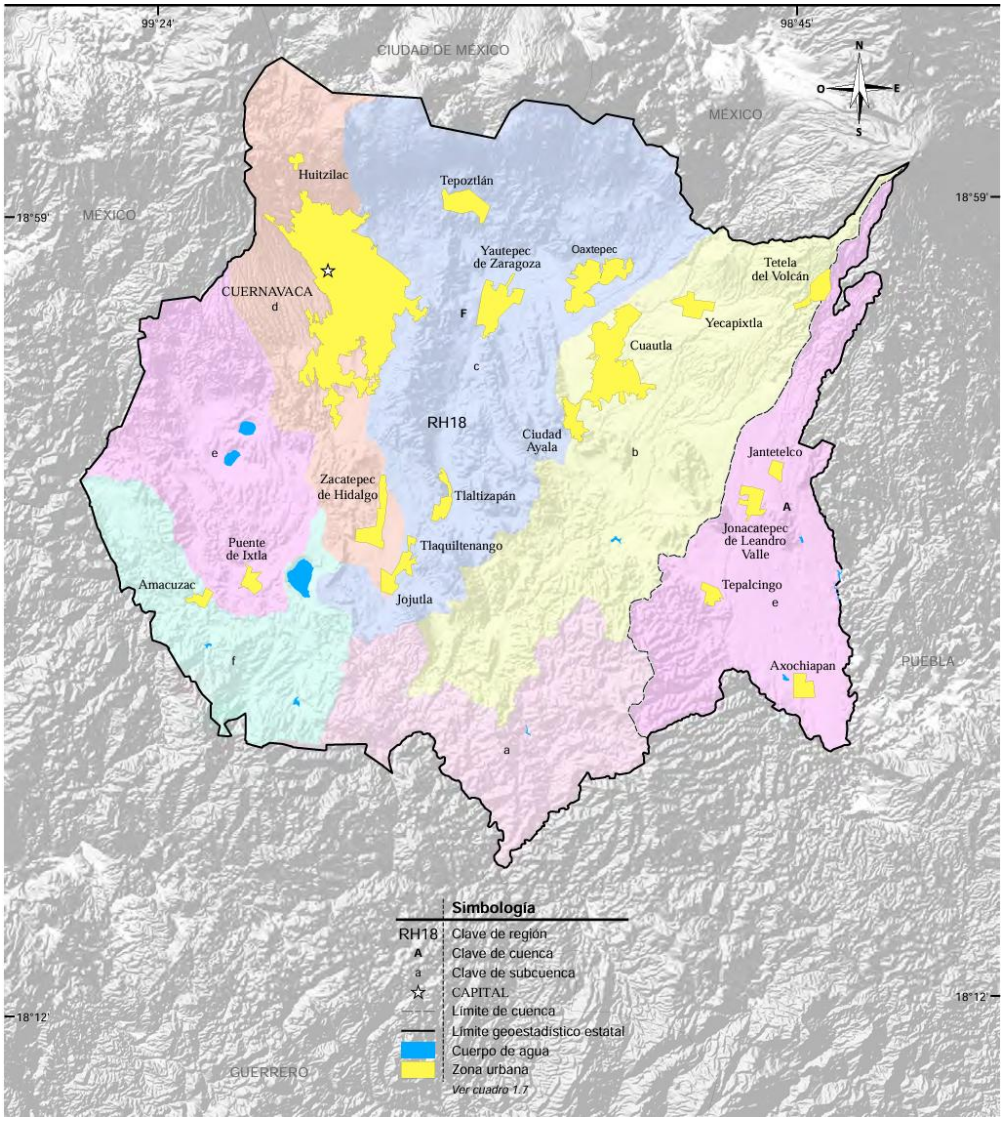


Figura 2. Regiones, cuencas y subcuencas hidrológicas de Morelos (INEGI, 2021).

Producción agrícola en el estado de Morelos

El clima y la disponibilidad de agua han hecho de Morelos un productor agrícola destacado a nivel nacional, este estado se ha posicionado como el número uno en producción de nopal, segundo en producción de rosa, tercero en producción de pera y quinto en aguacate, jitomate y pepino. Otros cultivos en los que destaca a nivel nacional son el arroz palay, la calabacita, la caña de azúcar, la cebolla, el higo, la nochebuena, el sorgo de grano, entre otros (SEDAGRO, 2024; SIAP, 2024). Morelos cuenta con 160 manantiales y 13 ríos en su territorio, los cuales en conjunto con la instalación de una vasta infraestructura hidroagrícola habilitan de riego a 57,079 ha, 51 % de esta superficie pertenece al Distrito de Riego No. 016 Estado de Morelos (Figura 3), mientras que el resto pertenece a pequeñas Unidades de Riego agrupadas en 257 Asociaciones de Usuarios (CEAGUA, 2014; SEDAGRO, 2019). Para el cierre del ciclo agrícola 2023, en Morelos se registró un total de 53,898.10 ha sembradas en régimen de riego, de las cuales los cultivos con mayor superficie sembrada fueron la caña de azúcar con 22,857.00 ha, maíz elotero con 9,415.00, maíz de grano con 3,270.20, cebolla con 2,733.50, ejote con 2,511.10, sorgo de grano con 1,103.00, pepino con 1,085.20, calabacita con 1,073.60, jitomate con 941 y jícama con 884 (SIAP, 2025).

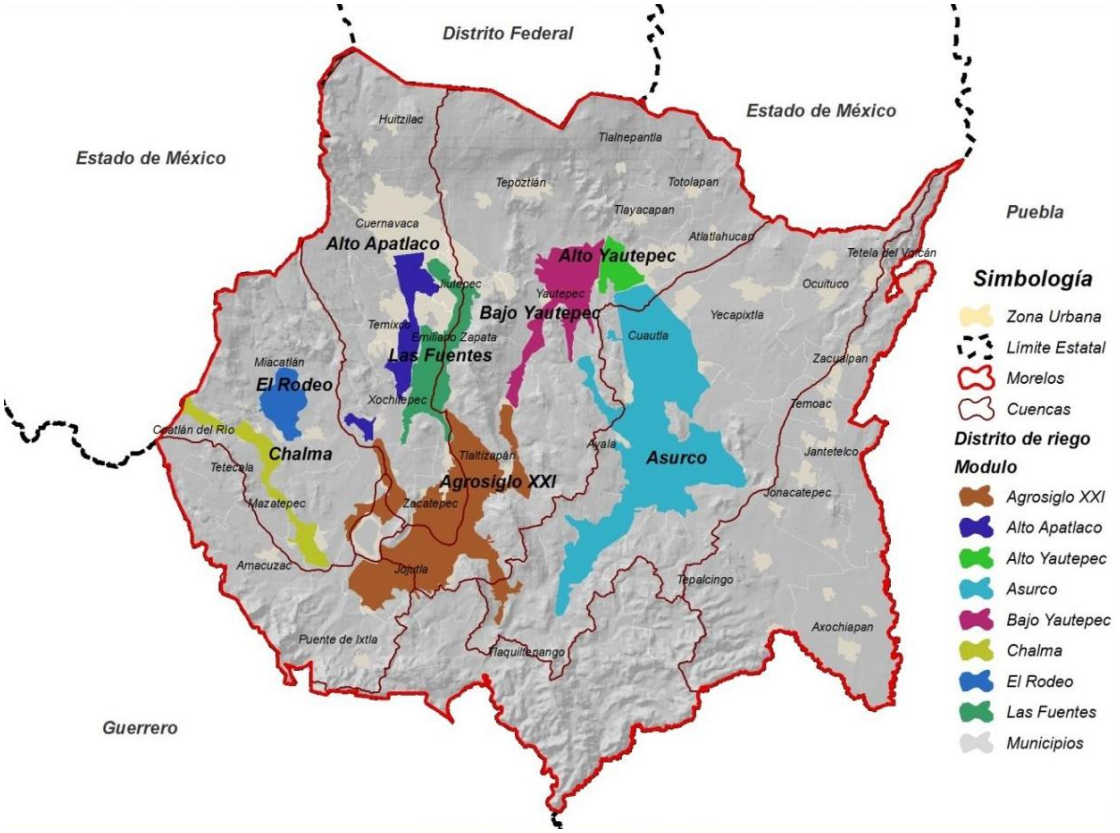


Figura 3. Módulos del Distrito de Riego 016 Estado de Morelos (CEAGUA, 2014).

Cuenca del río Cuautla

La cuenca del río Cuautla se ubica en su mayor proporción en la región centro-oriente del estado de Morelos y tiene una extensión de 1,181.85 km^2 la cual incluye superficies de 15 municipios de Morelos y 3 más del Estado de México. Los municipios con mayor aporte territorial son Ayala, Yecapixtla y Tlaquiltenango que en conjunto abarcan un 49 % de la superficie total (Figura 4). La cuenca tiene sus orígenes al noreste en el volcán Popocatépetl a una altura máxima 5,380 msnm, colinda al norte con el estado de México, al este con la cuenca del río Nexapa, al oeste con la cuenca del río Yautepec y al sur con la cuenca del río Amacuzac en el que desemboca a una altura de 761 msnm. El clima prevaleciente es el Cálido subhúmedo que se localiza en la porción centro-sur y cubre el 61.17 % del área de la cuenca; en segundo lugar, el clima Semicálido subhúmedo con un 16.68 % del área total y se ubica en la parte centro-norte de esta (Eguía-Lis et al., 2014).

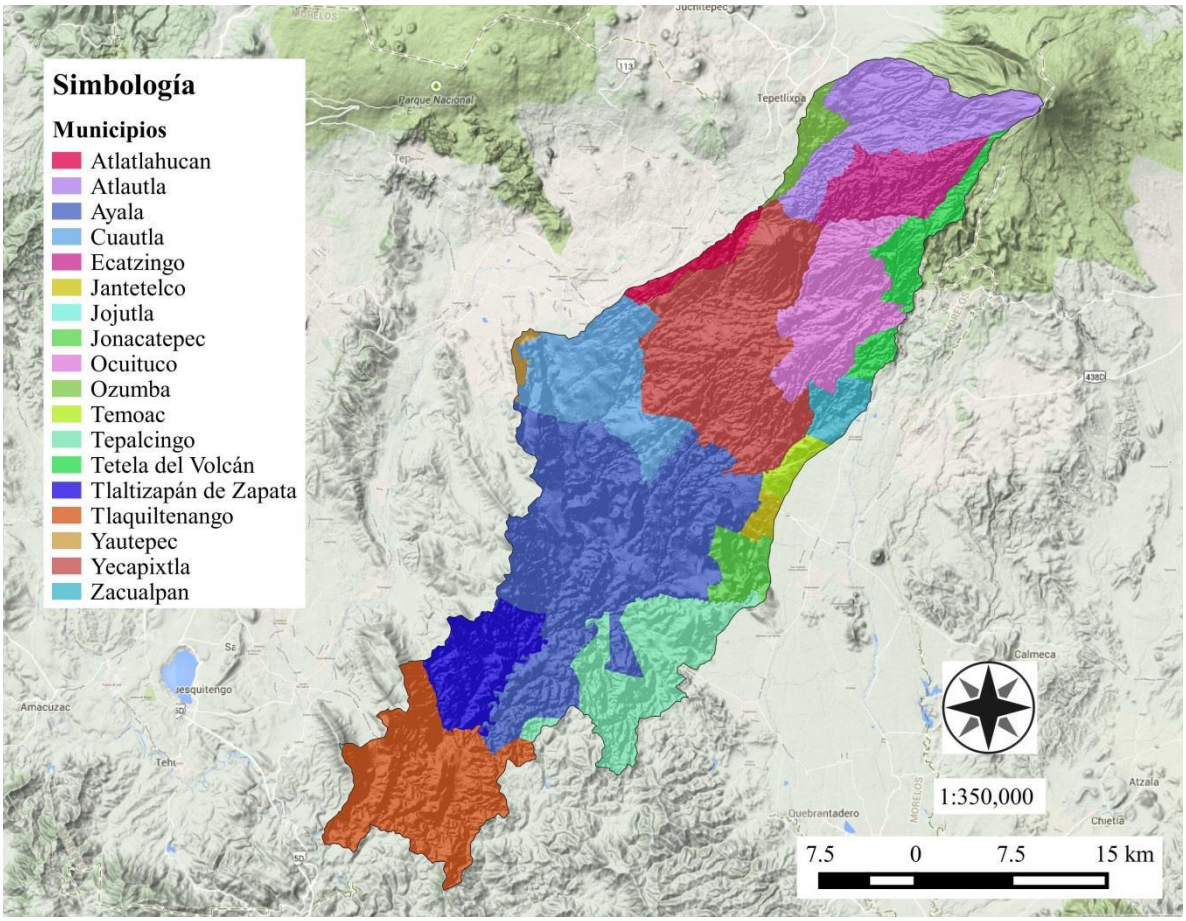


Figura 4. Mapa de la distribución espacial de los municipios que cubren la subcuenca del río Cuautla (Eguía-Lis, Izurieta, Miganjos-Carro, & González-Villela, 2014).

El río Cuautla también llamado Barranca del Volcán, tiene una orientación general de noreste a suroeste con una longitud aproximada de 110 km. En temporada de estiaje la mayor cantidad de agua la aportan los manantiales de Los Sabinos ubicados en Cuautla a la altura del poblado de Cuautlixco, a partir de ahí es donde se forma la corriente que da vida al río, excepto en el temporal, cuando los torrenciales se forman río arriba en la cuenca de Tetela del Volcán, Ocuituco y Yecapixtla (García-Cabrera, 1991; Gutiérrez-Ávalos et al., 2010). La cuenca cuenta con una infraestructura de 16 presas derivadoras y 24 canales generales a cargo de la Asociación de Usuarios del río Cuautla, manantiales y corrientes tributarias General Eufemio Zapata Salazar A.C. (ASURCO), quienes administran y explotan el recurso hídrico para beneficio de más de 4 mil usuarios en una superficie de 10,216 ha, la más grande entre las cuencas del estado. Siete de estas presas se localizan sobre el cauce del río Cuautla y derivan el agua hacia nueve canales generales (Figura 5). Al momento de este estudio solo se encontraban operando seis presas para ocho canales generales (CEAGUA, 2017; Salcedo-Baca et al., 2002).



Figura 5. Presa derivadora El Mirador (Capturada en campo el 03/02/2023).

En cuanto a población y superficie, la cuenca del río Cuautla es la segunda más importante del estado después de la del río Apatlaco. Para el año 2020, el INEGI reportó una población de 410,097 habitantes, siendo los municipios de Ayala, Yecapixtla y Cuautla los que concentran la mayor proporción de la población que

habita en esta cuenca con un estimado del 88 %. En esta cuenca se han reportado problemas de carácter hídrico como la contaminación de cuerpos de agua por descargas de aguas residuales municipales e industriales (Figura 6), infraestructura de saneamiento insuficiente e inoperante, deforestación de las zonas altas, disposición de residuos sólidos en cuerpos de agua y barrancas (Figura 7), invasión de zonas federales con asentamientos humanos irregulares e infraestructura hidroagrícola obsoleta e ineficiente. Todos estos problemas afectan negativamente la disponibilidad y la calidad del agua del río la cual como se ha mencionado anteriormente, se destina para el riego de productos agrícolas, incluidos los de consumo humano (CONAGUA, 2010; CONAGUA, 2021).



Figura 6. Descarga de aguas residuales sobre canal de riego (Capturada en campo el 13/09/2023).



Figura 7. Contaminación del río Cuautla por residuos sólidos (capturada en campo el 22/09/2023).

Para finales de 2023, se encontraban operando en la zona doce plantas tratadoras de aguas residuales (PTARs) que en conjunto sumaron un caudal tratado de 702.04 l/s, dichas plantas se describen en la siguiente tabla.

Tabla 1. Plantas tratadoras de aguas residuales de los municipios de Ayala, Cuautla y Yecapixtla (CONAGUA, 2023).

Municipio	Localidad	Nombre de la PTAR	Proceso de tratamiento del agua residual	Capacidad instalada (l/s)	Caudal tratado (l/s)	Cuerpo receptor o reúso
Ayala	Unidad Habitacional Mariano Matamoros	Unidad Habitacional Mariano Matamoros	Lodos activados	5	4	Suelo
Ayala	San Pedro Apatlaco	San Pedro Apatlaco	RAFA + Lodos activados	25	18	Riego agrícola
Ayala	Ciudad Ayala	Fraccionamiento Paseos de Ayala 2	Aerobio	10	9	Suelo
Cuautla	Cuautla	19 de Febrero	Lodos activados	7.5	4.5	Suelo
Cuautla	Cuautla	Norponiente (Casasano)	Anaerobio	42	45	Riego agrícola
Cuautla	Calderón	Calderón	Lodos activados	40	25	Río Cuautla
Cuautla	Cuautla	Santa Inés	Lodos activados	18	16	Río Cuautla
Cuautla	Ampliación Gabriel Tepepa	Galeana Sur (Gabriel Tepepa)	Lodos activados (MBR)	50	25	Suelo
Cuautla	Cuautla	Tezahuapan	Anaerobio	8	5.8	Suelo
Cuautla	Cuautla	Cuautla	Filtro percolador	630	527.94	Río Cuautla
Cuautla	Cuautla	Unidad Habitacional Piedra Blanca	Filtro percolador	6	6	Río Cuautla
Yecapixtla	Yecapixtla	Yecapixtla	Aerobio	25	15.8	Suelo

Uso de aguas residuales en la agricultura

Las aguas residuales se definen como aquellas aguas cuyas características originales han sido modificadas a causa de la actividad antropogénica. Estas aguas poseen una composición variada y provienen de las descargas de usos domésticos, industriales, municipales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios y en general de cualquier otro uso. El crecimiento acelerado de las poblaciones genera una alta demanda de agua potable tanto para actividades básicas como para el desarrollo de las diversas actividades económicas. Además, esto desencadena un aumento en la generación de aguas residuales, este fenómeno ha hecho necesario adoptar prácticas de uso racional y eficiente de los volúmenes de agua disponibles, además de buscar fuentes alternas para cubrir la demanda creciente del vital líquido. Una de las alternativas inmediatas es el reúso de las aguas residuales para el desarrollo de las diversas actividades económicas. En México, las actividades agrícolas representan la mayor parte del consumo total de agua con un 76.3 %, seguido del abasto público y urbano con 14.8 %, la industria autoabastecida con 4.8 % y la generación de electricidad con 4.1 % (no incluye la hidroelectricidad) (CONAGUA, 2024). El crecimiento poblacional y el desarrollo económico demandan aumentar la producción agrícola a nivel mundial, para cubrir esta necesidad se ha optado por la utilización de aguas residuales en la agricultura. Esta práctica presenta ventajas como la disponibilidad del líquido a bajo costo y ser buena fuente de materia orgánica y nutrientes. Sin embargo, a pesar de mejorar los rendimientos de los cultivos, su utilización implica varios riesgos para quienes están expuestos a estas aguas como son los agricultores, sus familias y comunidades; para los consumidores de productos de campos irrigados con dichas aguas y para los propios suelos de estos campos de cultivo. Estos riesgos se deben a diversos contaminantes presentes en las aguas residuales, como los productos químicos biológicamente perjudiciales, metales pesados y patógenos derivados de materia fecal de humanos y animales, entre los que se destacan las bacterias resistentes a los antibióticos. Para minimizar los riesgos por el uso de agua residual en la agricultura es necesario que sea tratada antes de su utilización, además del monitoreo constante de su calidad (Mendoza-Retana et al., 2021).

Coliformes como indicadores de la calidad del agua

Actualmente las pruebas más utilizadas para la determinación de la calidad del agua son el conteo de coliformes fecales y las pruebas fisicoquímicas, como la medición del pH, la dureza, turbidez, entre otras. Estas nos ayudan a determinar la salud de los sistemas acuáticos. Los coliformes fecales no se desarrollan naturalmente en los sistemas acuáticos o terrestres, estos provienen de los intestinos de animales de sangre caliente. Además, son incapaces de sobrevivir en el ambiente por periodos prolongados de tiempo por lo que estas características los posicionan como indicadores ideales de contaminación reciente con materia fecal. Los coliformes no son las bacterias más abundantes en los intestinos de los animales; pero si son fáciles de cultivar, y las principales fuentes de las que provienen son las

fugas en los sistemas de drenaje, descargas ilegales de aguas negras, sistemas sépticos defectuosos o ineficientes y las escorrentías de áreas urbanas y tierras agrícolas (Feng et al., 2002).

Bacterias

Todos los organismos vivos se clasifican en dos tipos celulares: eucariotas y procariotas. Dentro de los organismos eucariotas se encuentran los multicelulares como plantas y animales, y los unicelulares como algas y protistas. Las bacterias son microorganismos unicelulares que integran el reino procariota. A diferencia de los organismos eucariontes las bacterias no poseen compartimientos intracelulares delimitados por membranas, por lo tanto, carecen de un núcleo definido, de ahí el término procariota (del griego *pro* que significa antes de, y *karyo*; núcleo). El material genético de las bacterias (ADN) es mucho menor que en las eucariotas, además se encuentra dispuesto en cromosomas de doble cadena circular y cerrada por enlace covalente, mientras que las eucariotas poseen varios cromosomas de gran tamaño asociados a proteínas llamadas histonas. Otras diferencias son el tamaño celular, siendo mayor en las eucariotas, además estas son capaces de reproducirse de forma sexuada (meiosis), mientras que los procariotas se reproducen por fisión simple (forma asexuada). La mayoría de las bacterias se pueden encontrar en vida libre, muy pocas son de vida intracelular obligada, lo cual quiere decir que requieren por completo de la maquinaria intracelular de una célula huésped para poder reproducirse y subsistir; entre estas bacterias tenemos a las *Chlamydias* y *Rickettsias*. La mayoría de las bacterias son inofensivas para el ser humano y muchas forman parte de nuestra microbiota siendo beneficiosas para nuestro organismo (Pírez & Mota, 2006).

Bacterias patógenas

La patogenicidad es la capacidad de una bacteria para producir enfermedad infecciosa en un huésped, para ello necesitan de factores de virulencia, que les permitan sobrevivir, multiplicarse, diseminarse y secretar toxinas dentro del huésped. Mientras mayor sea la virulencia mayor será la patogenicidad de una bacteria, y esta se mide por el número de microorganismos necesarios para causar una enfermedad (Cárdenas-Perea et al., 2014). La enfermedad infecciosa es el resultado de un desequilibrio de los mecanismos de defensa de un determinado huésped en contra los factores de virulencia de una cepa bacteriana particular. A los patógenos los podemos clasificar en dos grupos:

A) Los patógenos primarios son aquellos microorganismos que causan infección y enfermedad cuando entra a un huésped no inmune.

B) Los patógenos oportunistas, raramente causan enfermedad en humanos sanos, pero en un organismo cuyo sistema de defensa está comprometido

pueden causar enfermedades frecuentemente fatales (Molina-López et al., 1998).

Enterobacteriaceae

La familia *Enterobacteriaceae* constituye el grupo más grande y heterogéneo de bacilos gram negativos y reciben su nombre por la localización habitual como saprófitos en el tubo digestivo. Se han descrito 50 géneros con más de 150 especies y subespecies. A pesar de la complejidad de esta familia, menos de 20 especies son las responsables de más del 95 % de las infecciones gastrointestinales. Las podemos encontrar en el suelo, agua, vegetación y como parte de la microbiota intestinal normal de muchos animales, incluido el ser humano (Pérez-Guerrero et al., 2014).

Fisiología y estructura

Los integrantes de la familia *Enterobacteriaceae* son bacilos de tamaño intermedio 1-6 µm de largo y 0.3-1 µm de diámetro. No forman esporas y crecen rápidamente de forma aerobia o anaerobia (anaerobios facultativos) en medios selectivos y no selectivos. Su metabolismo es sencillo: fermentan glucosa, reducen nitratos y son catalasa-positivos y oxidasa-negativos. El lipopolisacárido (LPS) termoestable es el principal antígeno de la pared celular y está formado por tres componentes: en la parte externa el polisacárido somático O, en la región intermedia un polisacárido común en todas las enterobacterias (antígeno común enterobacteriano) y en la parte interna el lípido A. El antígeno común también se puede encontrar como glucolípido libre en la membrana externa. La mayoría de las enterobacterias son móviles, con excepción de *Klebsiella*, *Shigella* y *Yersinia*. Las cepas móviles poseen flagelos perítricos. Las enterobacterias poseen también fimbrias (pili), estas se dividen en dos clases generales: fimbrias comunes codificadas por el cromosoma y pili sexuales codificados por plásmidos conjugativos. Las fimbrias comunes confieren la capacidad a la bacteria de adherirse a receptores específicos de la célula anfitriona, mientras que los pili sexuales o conjugativos facilitan el proceso de transferencia genética horizontal entre las bacterias (Murray et al., 2002).

Género *Klebsiella*

El género *Klebsiella* perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae,* está formado por bacilos gram negativos sin movilidad y que presentan una cápsula que le confiere un aspecto mucoide a las colonias aisladas. Son anaerobios facultativos y oxidasa negativos, productoras de la enzima lisina descarboxilasa, pero no de la enzima ornitina descarboxilasa. Son ubicuas en la naturaleza, se presentan con mayor frecuencia en el agua, suelo, plantas y en las mucosas de los mamíferos. Este género es uno de los principales patógenos oportunistas asociados a los procedimientos hospitalarios, causando infecciones principalmente a individuos

inmunocomprometidos, con una alta tasa de mortalidad (Podschun & Ullmann, 1998).

Género *Pseudomonas*

Son bacilos con una amplia distribución ambiental debido a sus bajos requerimientos de crecimiento (son capaces de utilizar un gran número de compuestos orgánicos como fuentes de carbono y de nitrógeno). Las podemos hallar en la tierra, materia orgánica en descomposición, vegetación, agua, etc. A menudo se encuentran en lugares húmedos de los hospitales, donde son capaces de provocar infecciones oportunistas a pacientes inmunodeprimidos.

Fisiología y estructura

Pseudomonas spp. son bacilos gram negativos móviles rectos o ligeramente curvados con tamaños entre 0.5-1 µm de diámetro y 1.5-5 µm de largo. Estos suelen encontrarse en parejas. Son aerobios estrictos, utilizan los hidratos de carbono a través del metabolismo respiratorio en el que el oxígeno actúa como aceptor terminal de electrones. Sin embargo, pueden crecer de forma anaerobia utilizando nitrato o arginina como aceptor terminal de electrones. Presentan citocromo oxidasa lo que las distingue de las enterobacterias. Algunas *Pseudomona* adquieren un aspecto mucoide como consecuencia de la abundancia de polisacáridos capsulares (Murray et al., 2002).

Antibióticos

Los antibióticos son compuestos químicos que sirven para combatir las infecciones causadas por bacterias; pueden ser de origen natural, producidos por diferentes especies de microorganismos (actinomicetos, hongos y/o bacterias) o sintéticos, fármacos elaborados por métodos de laboratorio que interfieren con alguna estructura o proceso esencial de la bacteria y que también presentan actividad antibacteriana. Los antibióticos ejercen dos tipos de efectos sobre las bacterias: efecto bacteriostático, el cual impide el crecimiento bacteriano y el efecto bactericida que destruye directamente a las bacterias (Cué-Brugueras & Morejón-García, 1998).

Clasificación y mecanismos de acción

Actualmente los antibióticos conforman un grupo amplio y heterogéneo de fármacos, dentro de los cuales los más comunes son los betalactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, macrólidos, entre otros. A continuación, se muestra una clasificación química de los antibióticos.

Tabla 2: Clasificación química de los antibióticos, ejemplos, espectro y modo de acción modificada de (Errecalde, 2004).

Grupo	Miembros	Espectro	Modo de acción
Betalactámicos: Penicilinas	Penicilina G	Bacterias G+	Inhiben síntesis de pared
	Penicilina V		
	Cloxacilina	Estafilococos productores de penicilinasa	
	Ampicilina	Bacterias G+ y G-	
	Carbenicilina	*P. aeruginosa*	
Betalactámicos: Cefalosporinas	Cefaloridina	Bacterias G+ y G-	Inhiben síntesis de pared
	Cefalexina	Ídem agregando actividad frente a estafilococos productores de penicilinasa	
	Cefuroxima	Ídem con menos actividad frente a G+ y más frente a G-	
	Moxalactam	Bacterias G+, enterobacterias	
	Ceftiofur		
	Cefoperazona	*P. aeruginosa*	
	Cefepima	Estafilococos y enterobacterias	
Betalactámicos: Inhibidores de la betalactamasa	Ácido clavulánico	Gérmenes productores de betalactamasa	Se une a la betalactamasa inactivándola
	Sulbactam		
	Tazobactam		
Betalactámicos: Carbapenémicos	Imipenem-cilastatina	G+ y G- aerobios y anaerobios	Inhiben síntesis de pared
Betalactámicos: Monobactámicos	Aztreonam	gram negativos aerobios	
Aminoglucósidos Aminociclitoles	Estreptomicina	Bacterias G-	Se une a la subunidad 30S ribosomal e inhibe la síntesis proteica
	Kanamicina		
	Neomicina		
	Gentamicina		
	Espectinomicina	Bacterias G- y micoplasmas	
Azúcares complejos o Lincosamidas	Lincomicina	Bacterias G+, anaerobios y micoplasmas	Se une a la subunidad 50S ribosomal e inhibe la síntesis proteica
	Clindamicina		
	Pirlimicina		
Rifamicinas	Rifampicina	Bacterias gram positivas micobacterias	Inhibe ARN polimerasa
Péptidos	Polimixina B	*P. aeruginosa*	Se unen y alteran la pared celular bacteriana
	Colistina		
Glucopéptidos	Vancomicina	Bacterias G+ y G-	Inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana
	Teicoplanina		
	Avoparcina		

Estreptograminas	Virginamicina	Bacterias G+ aerobias y anaerobias	Inhibe peptidil transferasa durante la traducción
Macrólidos	Eritromicina	Bacterias G+ y G-	Se une a la subunidad 50S ribosomal e inhibe la síntesis proteica
	Oleandomicina		
	Tilosina		
	Espiramicina		
	Tilmicosina		
Fenicoles	Cloranfenicol	Bacterias G+ y G-, *Rickettsia* y *Chlamydia*	Se une a la subunidad 50S ribosomal e inhibe la síntesis proteica
	Tianfenicol		
	Florfenicol		
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	Bacterias G+ y G-, *Rickettsia*, *Chlamydia* y algunos protozoos	Se une a la subunidad 30S ribosomal e inhibe la síntesis proteica
	Doxiciclina		
	Minociclina		
Sulfonamidas	Sulfanilamida	Bacterias G+, G- y coccidios	Interfieren síntesis de ácido fólico
	Sulfadiazina		
	Sulfatiazol		
	Ftalilsulfatiazol		
Diaminopirimidinas	Trimetoprima	Bacterias G+, G- aerobias	Interfieren síntesis de ácido tetrahidrofólico
	Baquiloprima		
Fluoroquinolonas	Enrofloxacina	Bacterias gram positivas y gram negativas	Inhiben ADN girasa en la replicación, transcripción, reparación y recombinación del ADN bacteriano
	Danofloxacina		
	Marbofloxacina		
	Sarafloxacina		
Nitrofuranos	Nitrofurazona	Bacterias gram positivas y gram negativas	Inhibe la síntesis de ácidos nucleicos
	Furazolidona		
Nitroimidazoles	Metronidazol	Anaerobios	Interfiere en la estructura del ADN
	Dimetridazol		

Antibióticos betalactámicos

Dentro de la amplia gama de los antibióticos, los betalactámicos constituyen la familia más grande y empleada en la práctica clínica. Este grupo de antibióticos tienen en común la presencia en su estructura del anillo betalactámico, lo que los define químicamente. Entre sus integrantes encontramos a las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos e inhibidores de penicilinasas. Son antibióticos de acción bactericida lenta por lo tanto su efectividad depende del tiempo, en general poseen buena distribución y baja toxicidad. Actúan en la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, un proceso llevado a cabo por enzimas conocidas genéricamente como transpeptidasas. Estas catalizan la formación de enlaces cruzados entre cadenas de peptidoglicano, eliminando el

último aminoácido (D-alanina) de un pentapéptido para facilitar la unión con otro péptido. El anillo betalactámico de estos antibióticos presenta una estructura similar al sustrato natural de estas enzimas, lo que les permite unirse de forma covalente al sitio activo de las transpeptidasas. Por esta razón, las transpeptidasas también se conocen como proteínas de unión a penicilina (PBPs, por sus siglas en inglés). Esta unión es irreversible e impide la formación de la pared celular. Como resultado, la bacteria queda expuesta a la presión osmótica del medio, lo que provoca su lisis y muerte. Con algunas modificaciones de la molécula original se han logrado obtener nuevos compuestos con un mayor espectro antimicrobiano. Sin embargo, la progresiva aparición de resistencias ha limitado su uso y eficacia en determinadas situaciones. Aun así, la penicilina continúa siendo el tratamiento de elección en un buen número de infecciones. Las cefalosporinas tienen un gran abanico de indicaciones, los carbapenémicos se usan en infecciones hospitalarias y en infecciones causadas por bacterias multirresistentes, los inhibidores de las betalactamasas permiten recuperar el espectro de actividad de las penicilinas a las que acompañan cuando la resistencia está causada por la producción de este tipo de enzimas (Suárez & Gudiol, 2009).

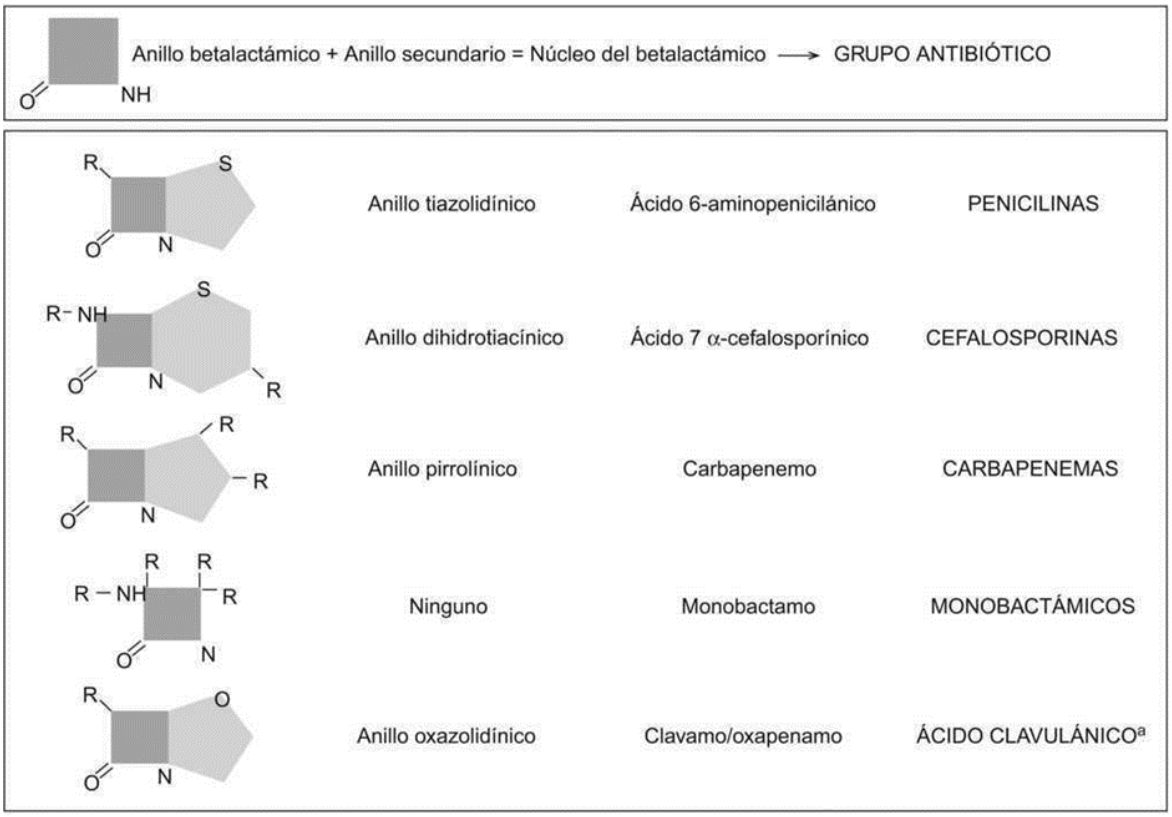


Figura 8. Estructura química de los antibióticos betalactámicos (Suárez & Gudiol, 2009).

Resistencia bacteriana

Desde el descubrimiento del uso terapéutico de los antibióticos se ha descrito la capacidad natural de las bacterias de adaptarse para sobrevivir en presencia de un antibiótico. De hecho, cada vez que se implementa un nuevo agente antimicrobiano de inmediato se detectan cepas capaces de reproducirse en presencia de dosis mayores a las terapéuticas, por lo que se considera que estas cepas han adquirido resistencia antimicrobiana (OMS, 2001). Dicha resistencia es resultado de modificaciones genéticas, ya sean mutaciones o transferencias de genes, estos genes codifican para diversos mecanismos de resistencia los cuales se ejemplifican en la siguiente figura.

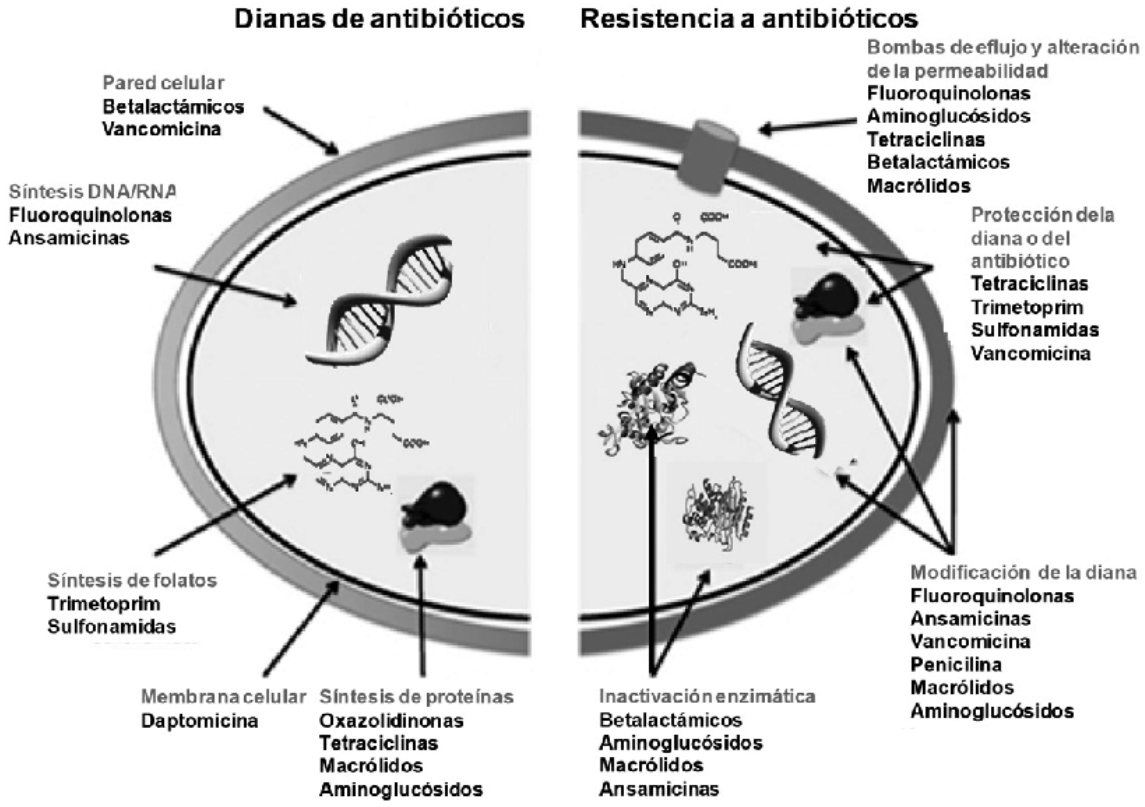


Figura 9. Ejemplificación de los Mecanismos de resistencia a antibióticos y de sus sitios de acción (Pérez-Gracia, 2021)

a) Modificación de la estructura química de antibiótico: proceso llevado a cabo por enzimas que se encargan de modificar de forma estructural a la molécula del antibiótico inhibiendo así su mecanismo de acción.

b) Alteración del sitio blanco del antibiótico: debido a mutaciones selectivas en genes que codifican proteínas específicas de la célula bacteriana donde actúa el antibiótico.
c) Alteración en las barreras de permeabilidad: son cambios debido a mutaciones en sitios de entrada a través de la pared o la membrana celular, modificando la permeabilidad de los antibióticos mediante alteraciones en el transporte activo, alteraciones estructurales de la membrana o pared celular que influyen en la permeabilidad.
d) Bombas de eflujo: se debe a un mecanismo caracterizado por la externalización de los antibióticos mediado por proteínas transmembranales y citoplasmáticas las cuales exportan al agente antimicrobiano fuera de la célula tan rápido como entra.

El mecanismo más frecuente de resistencia es la inactivación enzimática de los antibióticos, en el que enzimas presentes en las bacterias fueron modificadas de tal modo que reaccionan con los fármacos antimicrobianos eliminando o atenuando su efecto.

Betalactamasas

Son enzimas ancestrales que tiene su origen hace millones de años, debido a la homología entre sus secuencias, se cree que las betalactamasas provienen de las proteínas de unión a penicilina, PBP por sus siglas en inglés. Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma o en plásmidos y pueden producirse de manera constitutiva o inducible, estas inactivan los antibióticos del grupo betalactámico al hidrolizar el anillo del mismo nombre presente en su estructura. La mayoría de las betalactamasas inactivan ya sea penicilinas o cefalosporinas, pero algunas son capaces de inactivar ambos tipos de antibióticos (Bush, 2018; Daza-Pérez, 1998).

Clasificación de las betalactamasas

Existen principalmente dos esquemas de clasificación para las betalactamasas: la clasificación de Ambler que incluye las clases A, B, C y D, basados en la homología de la secuencia de aminoácidos y la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros basada en la afinidad de las enzimas por diferentes sustratos y su sensibilidad a la acción de diferentes inhibidores (Figura 10).

Los esquemas de clasificación funcional y molecular han sido comparados como se muestra en la siguiente figura, con una clara separación entre dos clases moleculares: 1) La Clase B: metalobetalactamasas (MβLs), son aquellas que requieren zinc para facilitar la catálisis hidrolítica de los betalactámicos. 2) Las

clases A, C y D: serin-betalactamasas, estas enzimas hidrolizan sus sustratos formando una enzima acil a través de su sitio activo de serina.

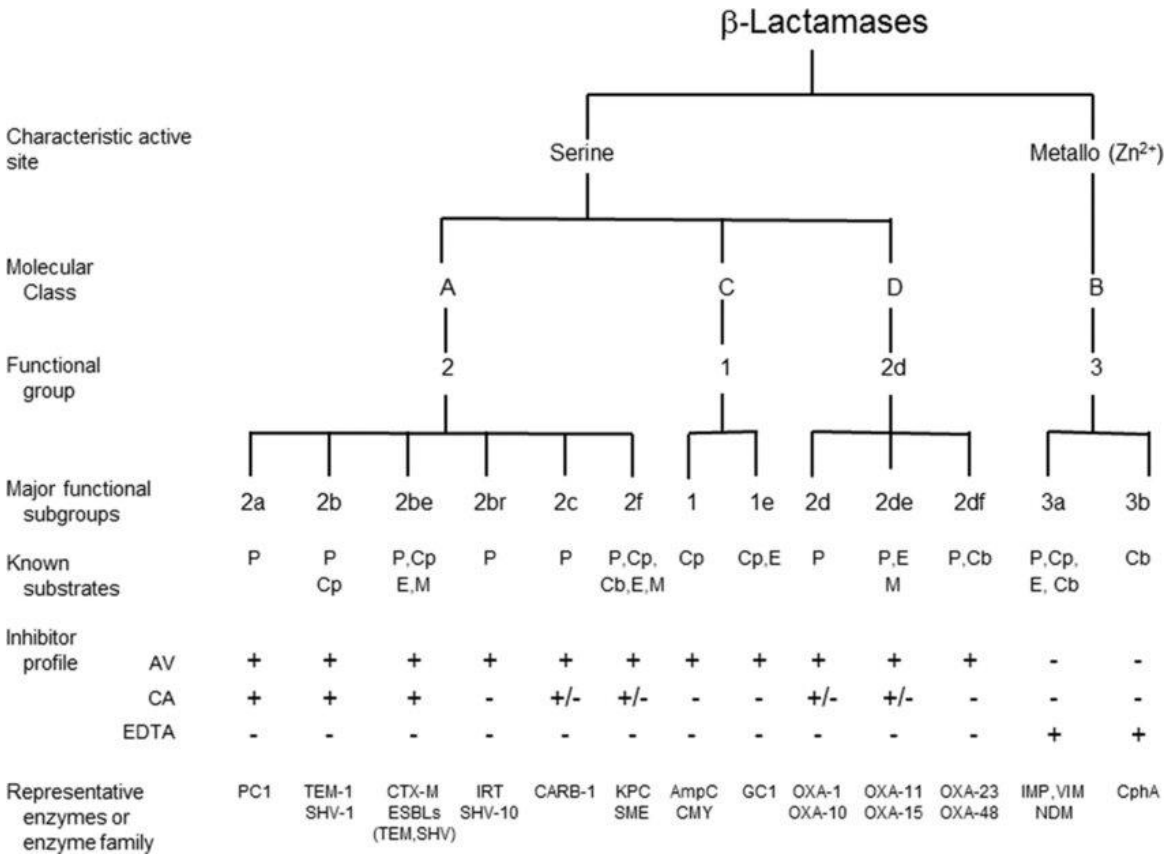


Figura 10. Características moleculares y funcionales de los principales grupos de betalactamasas (Bush, 2018). Av, avibactam; CA, ácido clavulánico; Cb, carbapenémicos; Cp, cefalosporinas; EDTA, ácido etilendiaminotetraacético; E, cefalosporinas de espectro extendido; M, monobactámicos; P, penicilinas.

Resistencia bacteriana: una amenaza global

En las últimas décadas la resistencia bacteriana se ha convertido en un problema de relevancia mundial. En el año 1996 durante la 51ª Asamblea Mundial de la Salud se presenta el informe “Enfermedades emergentes y otras enfermedades transmisibles: resistencia a los antimicrobianos” en el que se pone de manifiesto la aparición y propagación acelerada de patógenos resistentes en comparación con décadas anteriores. Esto ha hecho cada vez más difícil el tratamiento de las enfermedades infecciosas debido a la poca o nula eficacia de los agentes disponibles y por el alto costo y poco acceso a opciones terapéuticas de nueva generación. Después del análisis del informe se instó a los miembros de la asamblea a estimular el desarrollo de sistemas sostenibles para detectar patógenos

resistentes a los antimicrobianos. Además de elaborar programas de educación del personal de salud y del público en general con la finalidad de fomentar el uso apropiado y eficiente de los agentes antimicrobianos, mejorar las prácticas para prevenir la propagación infecciones y, de esa manera, la propagación de los patógenos resistentes; entre otras acciones (Asamblea Mundial de la Salud, 1998).

En el 2001, se presentó el documento “Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos”, el cual responde a la preocupación de muchos países ante los desafíos de la resistencia antimicrobiana. En este, se establece un marco de intervenciones para reducir la aparición y propagación de microorganismos resistentes por medio las siguientes medidas: a) reducción de la carga de morbilidad y propagación de las infecciones, b) mejora del acceso a los antimicrobianos, c) mejora del uso de los antimicrobianos, d) fortalecimiento de los sistemas de salud y de su capacidad de vigilancia, e) cumplimiento de los reglamentos y de la legislación y f) fomento del desarrollo de nuevos medicamentos y vacunas. La estrategia recalca la necesidad de contener la resistencia y realizar mayor investigación en la materia para mitigar la carencia de conocimientos (OMS, 2001).

Para el 2015, durante la celebración de la 68.ª Asamblea Mundial de la Salud, se reconoce que las consecuencias de la resistencia a los antimicrobianos repercuten más allá de la salud humana. Por lo que se establece la necesidad de abordarla de una manera coherente e integral, a niveles nacional, regional y mundial, desde el enfoque de “Una salud”, el cual integre a diferentes sectores como la medicina humana y veterinaria, la agricultura, las finanzas, el medio ambiente y a los consumidores. Con esto como base se adopta en la asamblea el “Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos” el cual establece los siguientes objetivos:

1) Mejorar el conocimiento de la resistencia a los antimicrobianos a través de una comunicación, educación y formación efectivas.

2) Reforzar los conocimientos y la base científica a través de la vigilancia y la investigación.

3) Reducir la incidencia de las infecciones con medidas eficaces de saneamiento, higiene y prevención.

4) Utilizar de forma óptima los medicamentos antimicrobianos en la salud humana y animal.

5) Preparar argumentos económicos a favor de una inversión sostenible que tenga en cuenta las necesidades de todos los países, y aumentar la inversión en nuevos medicamentos, medios de diagnóstico, vacunas y otras intervenciones.

A través de este plan la OMS instó a los Estados Miembros a destinar recursos humanos y financieros para poner en práctica las acciones propuestas a través de

planes y estrategias que se adapten a las prioridades y los contextos de cada nación (OMS, 2016).

Patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos

En 2017, la OMS publicó la primera lista de patógenos prioritarios, dentro de la cual se incluyen 12 familias de bacterias que en los últimos tiempos han estado adquiriendo niveles mayores de resistencia a los antibióticos y que representan un peligro para la salud humana. Para realizarla se tomaron en cuenta criterios como el grado de letalidad de las infecciones, si el tratamiento requiere o no una hospitalización larga, la frecuencia con que presentan resistencia a los antibióticos existentes, la facilidad de trasmisión entre las personas, los animales y de los animales a personas, si las infecciones pueden prevenirse o no, las opciones terapéuticas disponibles y la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos para su tratamiento. Esta lista se elaboró como parte de las actividades de la OMS para combatir el creciente problema mundial de la resistencia a los antimicrobianos y contempla la necesidad urgente de incentivar y acelerar la investigación y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos que fortalezcan el repertorio de opciones terapéuticas contra las infecciones farmacorresistentes y así reducir la alarmante cifra anual de defunciones (WHO, 2017). La lista clasifica los patógenos en tres grupos:

Prioridad 1: CRÍTICA

- *Acinetobacter baumannii*, resistente a los carbapenémicos
- *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a los carbapenémicos
- *Enterobacteriaceae*, resistentes a los carbapenémicos, productoras de ESBL

Prioridad 2: ELEVADA

- *Enterococcus faecium*, resistente a la vancomicina
- *Staphylococcus aureus*, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina
- *Helicobacter pylori*, resistente a la claritromicina
- *Campylobacter* spp., resistente a las fluoroquinolonas
- *Salmonellae*, resistentes a las fluoroquinolonas
- *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a la cefalosporina, resistente a las fluoroquinolonas

Prioridad 3: MEDIA

- *Streptococcus pneumoniae*, sin sensibilidad a la penicilina
- *Haemophilus influenzae*, resistente a la ampicilina
- *Shigella* spp., resistente a las fluoroquinolonas

Para el 2024 y con el objetivo de afrontar los desafíos cambiantes de la resistencia a los antimicrobianos, la OMS publica una actualización a su Lista de Patógenos Bacterianos Prioritarios, en esta edición se incluyeron 24 patógenos que pertenecen a 15 familias (Tabla 3). Se eliminaron cinco combinaciones de patógenos y antibióticos con respecto a la lista de 2017 y se incluyeron cuatro combinaciones nuevas. Se incluyeron en un grupo independiente en la categoría de prioridad crítica a los Enterobacterales resistentes a las cefalosporinas de tercera generación. Además, las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* disminuyeron su nivel de resistencia por lo que deja la categoría crítica y se reclasifica a la de prioridad alta. Al presentar esta última actualización la OMS destacó la necesidad de adoptar un enfoque integral de la salud pública para afrontar los desafíos que representa la RAM, tomando en cuenta cuatro ejes fundamentales: prevención de las infecciones, acceso a los servicios de salud esenciales, diagnóstico oportuno y preciso, y tratamiento adecuado y de calidad garantizada (WHO, 2024).

Tabla 3: Lista de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos (WHO, 2024).

PRIORIDAD 1: CRÍTICA	
Acinetobacter baumannii	resistente a los carbapenémicos
Enterobacterales	resistentes a las cefalosporinas de tercera generación
Enterobacterales	resistentes a los carbapenémicos
Mycobacterium tuberculosis	resistente a la rifampicina
PRIORIDAD 2: ELEVADA	
***Salmonella* Typhi**	resistente a las fluoroquinolonas
***Shigella* spp.**	resistente a las fluoroquinolonas
Enterococcus faecium	resistente a la vancomicina
Pseudomonas aeruginosa	resistente a los carbapenémicos
Salmonelas no tifoideas	resistentes a las fluoroquinolonas
***Campylobacter* spp.**	resistente a las fluoroquinolonas
Neisseria gonorrhoeae	resistente a las cefalosporinas de tercera generación y/o a las fluoroquinolonas
Staphylococcus aureus	resistente a la meticilina
PRIORIDAD 3: MEDIA	
Estreptococos del grupo A	resistentes a los macrólidos

Streptococcus pneumoniae	resistentes a los macrólidos
Haemophilus influenzae	resistente a la ampicilina
Estreptococos del grupo B	resistentes a los macrólidos

JUSTIFICACIÓN

Actualmente es poca la información sobre la correlación que existe entre la contaminación con aguas residuales de los afluentes utilizados para el riego en la agricultura del estado de Morelos y la identificación de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos en cultivos de consumo humano. El fenómeno ha sido estudiado por algunos autores, y destacan principalmente 3 mecanismos potenciales por los cuales el uso agrícola de los antibióticos podría conducir a enfermedades humanas, lo cual está estrechamente relacionado con la prevalencia de bacterias patógenas en los cultivos de consumo humano. Los mecanismos son:

1. Infección directa con bacterias resistentes de origen animal.
2. Una falla en las barreras biológicas de las especies utilizadas en la ganadería, seguidas de una transmisión sustancial de cepas resistentes a los antibióticos hacia los humanos.
3. Transferencia de genes de resistencia de la agricultura en patógenos humanos.

Sin embargo, son pocos los trabajos que hacen un análisis de bacterias patógenas que contaminan cuerpos de agua utilizados para la agricultura en México. En el caso del trabajo de Magaña-Lizárraga et al. (2022), identifican tres aislamientos de *E. coli* de la superficie de agua de un embalse conocido como “la Michoacana”, la cual es utilizada para irrigar campos de cultivo en Navolato, Sinaloa. En este trabajo se identificaron dos aislamientos como multidrogo resistentes y otro con genes de virulencia pertenecientes a las secuencias tipo ST410 y ST617.

En el estudio de Ballesteros-Nova et al. (2022), realizaron un análisis durante tres meses muestreando aguas superficiales en 6 estados de la república mexicana. Donde identifican 172 aislamientos de *Salmonella entérica*, resultando de importancia epidemiológica los pertenecientes a las secuencias tipo ST14, ST45, ST118, ST132, ST198, y ST213.

En el trabajo de Contreras et al. (2017), determinan que las personas de comunidades que utilizaban aguas residuales para irrigar sus cultivos en el Valle del Mezquital, Hidalgo; tenían un mayor riesgo de diarrea o infección entérica en comparación con otras poblaciones. Un trabajo encaminado a identificar los agentes que causaban necrosis de cultivos de plantas ornamentales fue conducido por Ramírez-Rojas et al. (2016), en él se encontraron 8 especies de bacterias fitopatógenas; además, los autores mencionan que algunas de las bacterias identificadas también pueden comportarse como patógenas humanos.

Sin embargo, en estos trabajos no se determina la correlación entre las aguas utilizadas para la irrigación y la identificación de bacterias patógenas en los cultivos. Como se describe en los trabajos antes mencionados, solo se establece la contaminación de los afluentes y no se termina de estudiar los cultivos utilizados para el consumo humano.

Es por estas razones que el objetivo de este trabajo es generar la información científica, para establecer si existe correlación entre la contaminación con aguas residuales de los afluentes utilizados para el riego en la agricultura del estado de Morelos y la identificación de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos en cultivos de consumo humano. Lo que representa un impacto directo en la salud de la población y que termina siendo un problema de salud pública en el estado de Morelos.

HIPÓTESIS

La contaminación de los afluentes utilizados para el riego agrícola en el estado de Morelos permite la dispersión de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos hacia los cultivos, y la presencia de estas bacterias en productos agrícolas de consumo humano.

OBJETIVOS

General

Identificación de bacterias patógenas gram negativas en el afluente del río Cuautla utilizado para el riego agrícola en el estado de Morelos.

Particulares

1) Identificar la presencia de bacterias gram negativas resistentes a los antibióticos en el afluente del río Cuautla.
2) Identificar bacterias gram negativas resistentes a los antibióticos en muestras de cultivos de consumo humano que utilicen el agua del río Cuautla para su irrigación.
3) Determinar los perfiles de susceptibilidad de las bacterias patógenas resistentes a los antibióticos.
4) Determinar la correlación entre las bacterias identificadas en los cultivos y las bacterias presentes en el afluente utilizado para su riego.

MATERIALES Y MÉTODOS

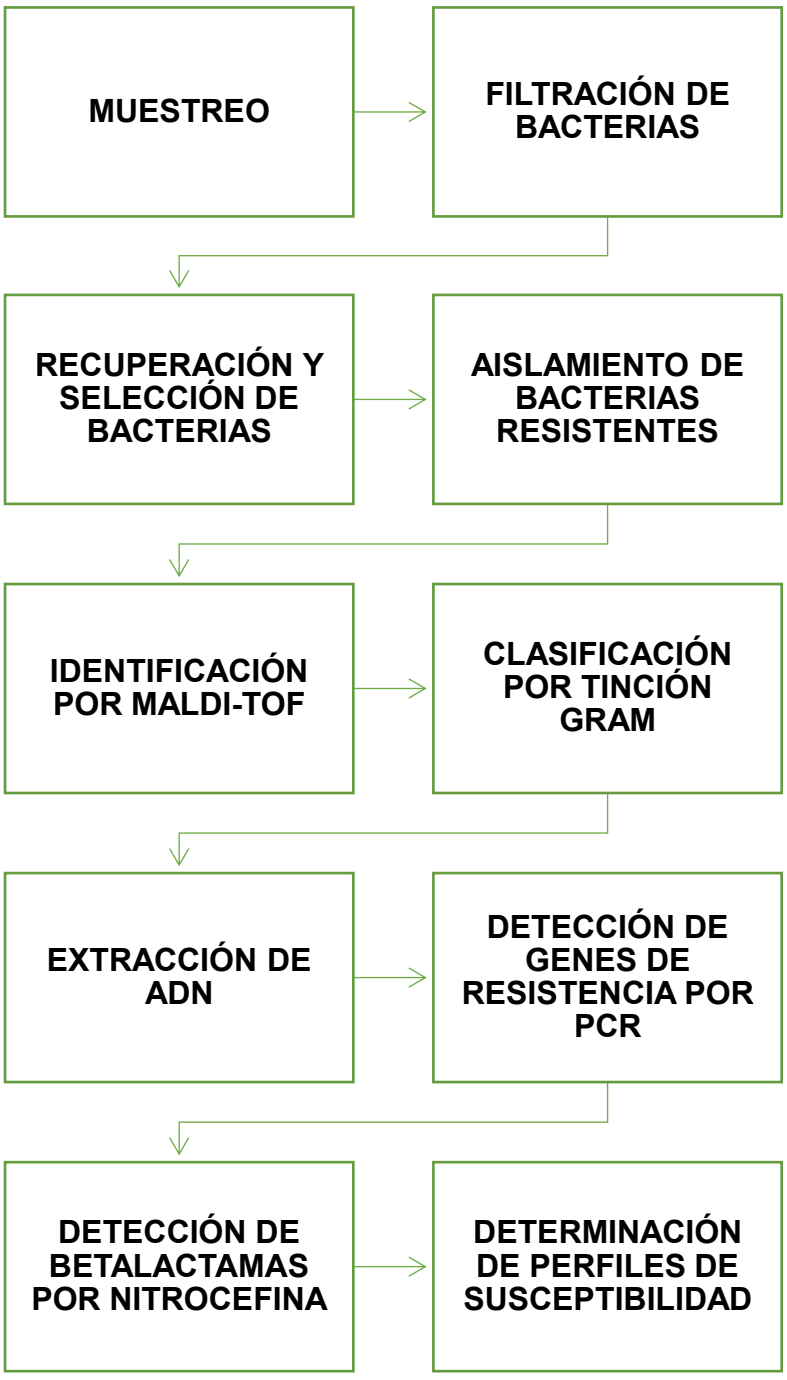


Figura 11. Esquema metodológico.

Área de estudio

El área estudiada comprende una porción del río Cuautla que va desde Yecapixtla en el norte hasta Tlaltizapán en el sur. Se tomaron muestras de agua en 12 sitios del cauce del río, 6 sitios corresponden a la ubicación de las presas derivadoras mediante las cuales la Asociación de Usuarios del río Cuautla, Manantiales y Corrientes Tributarias General Eufemio Zapata Salazar A.C. (ASURCO) proveen de agua a sus campos de cultivo y otros 6 que corresponden a las inmediaciones de importantes puentes que atraviesan el río. Además, se incluyeron muestras de agua de tres sitios extras: un manantial que desemboca en la presa el Socavón y dos canales generales próximos a los cultivos muestreados que utilizan el agua de las presas El Mirador y Las Iguanas; pero que por su lejanía resultó conveniente agregarlos al muestreo. Además, se incluyeron seis sitios de muestreo de cultivos agrícolas (1 por cada presa). Todos los sitios se distribuyen en los municipios de Ayala, Cuautla, Tlaltizapán y Yecapixtla.

La ubicación de los puntos de muestreo de aguas y de cultivos se encuentra descrita en la Tabla 4, así como en el mapa que corresponde a la Figura 12 del presente trabajo. En el mapa se incluyó la ubicación de sitios de interés como hospitales y PTAR.

Tabla 4: Puntos de muestreo de este estudio y otros sitios de interés.

Símbolo	Nombre	Ubicación
	Puente 6: Libramiento Yecapixtla	18°52'59.8"N 98°53'07.1"W
	PTAR UH Piedra Blanca	18°51'14.8"N 98°55'40.6"W
	Puente 5: Volcanes de Cuautla	18°50'53.8"N 98°55'55.7"W
	HG Dr. Mauro Belaunzarán T.	18°50'43.5"N 98°56'20.1"W
	Presa y cultivo 6: El Zapote	18°49'09.3"N 98°56'42.1"W
	CH ISSSTE Dr. Rafael Barba	18°48'49.8"N 98°56'50.8"W
	Hospital Gral. de Zona 7 IMSS	18°48'38.3"N 98°56'56.7"W
	Manantial Agua Azul	18°48'10.3"N 98°57'14.1"W
	Presa 5: El Socavón	18°48'01.9"N 98°57'28.6"W
	PTAR Cuautla Mor.	18°47'56.3"N 98°57'40.6"W
	Puente 4: Ex Hacienda de Coahuixtla	18°47'26.4"N 98°58'19.4"W
	Cultivo 5: El Socavón	18°47'20.7"N 98°58'06.4"W
	U.M.F. 8 IMSS	18°46'14.6"N 98°58'58.2"W
	Presa 4: San Esteban	18°45'44.5"N 98°57'52.3"W
	Cultivo 4: San Esteban	18°45'36.8"N 98°57'43.5"W
	Presa 3: Las Tortugas	18°44'47.9"N 98°58'34.3"W
	Cultivo 3: Las Tortugas	18°44'30.0"N 98°58'60.0"W
	Puente 3: Abelardo L. Rodríguez	18°44'15.1"N 98°58'57.8"W
	Presa 2: Las Iguanas	18°42'16.5"N 98°58'18.3"W
	Presa 1: El Mirador	18°41'03.6"N 98°59'11.0"W
	Canal y cultivo 2: Las Iguanas	18°40'45.6"N 98°58'57.7"W
	Canal y cultivo 1: El Mirador	18°39'28.9"N 99°01'35.4"W
	Puente 2: San Rafael Zaragoza	18°38'11.3"N 99°00'29.2"W
	Puente 1: San Pablo Hidalgo	18°34'45.1"N 99°02'23.4"W

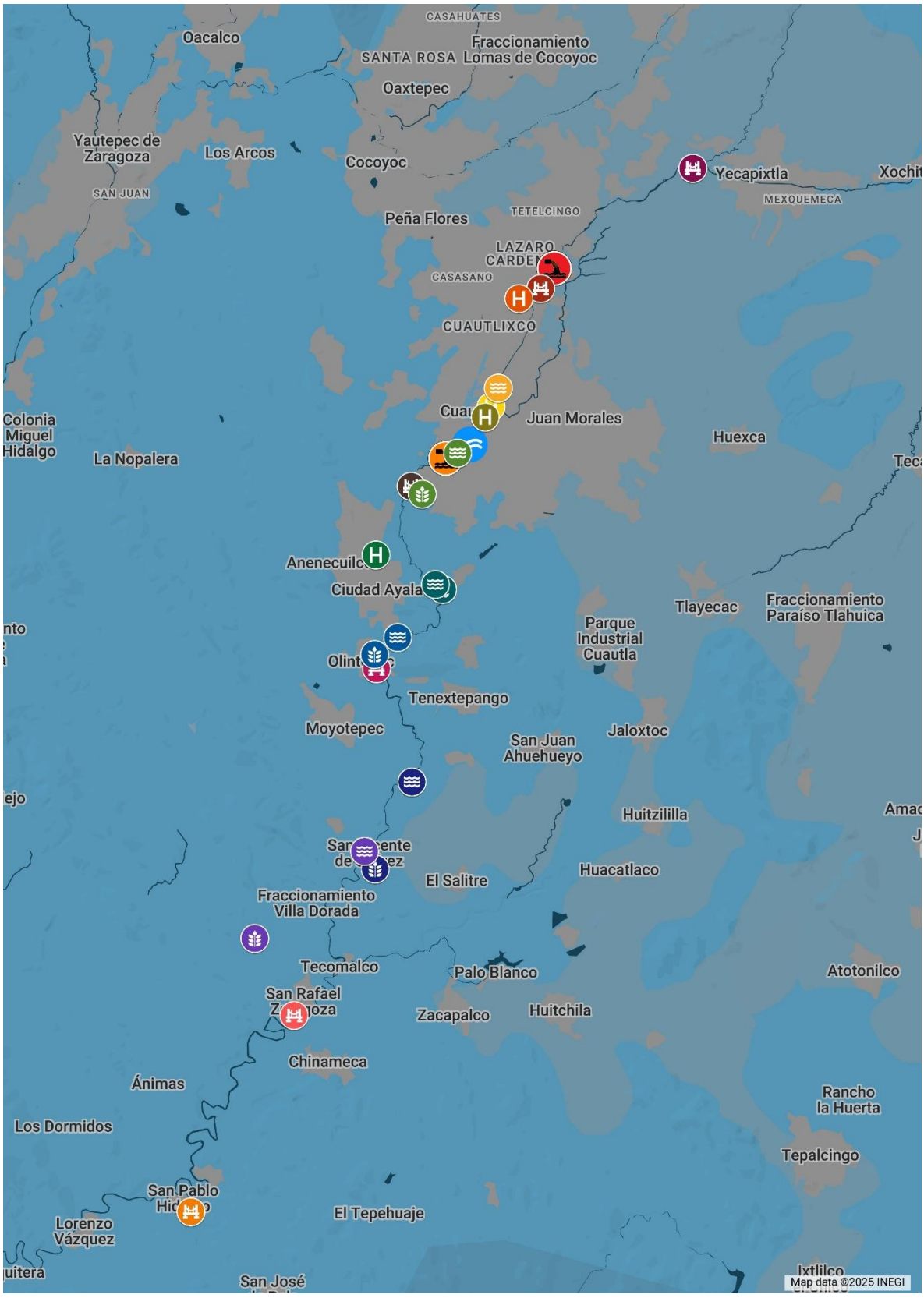


Figura 12. Sitios de muestreo, hospitales y PTAR en la zona del Río Cuautla.

Fechas de muestreo.

Primer muestreo: época de estiaje. Se realizó en las siguientes fechas: 3, 6, 10 y 16 de febrero del 2023. El primer día se tomaron muestras de agua de las presas El Mirador y Las Iguanas. Adicionalmente, debido a la lejanía de las presas mencionadas a los lugares de muestreo de los cultivos correspondientes, se decidió colectar muestras de agua de los canales de los que tomaban directamente el agua para irrigar los sitios de los que extrajimos las muestras vegetales. Estas muestras fueron, un ejemplar de jícama para la presa El Mirador y dos ejemplares de ejote para la presa Las Iguanas. El día 6 de febrero se colectaron muestras de agua de las presas Las Tortugas y San Esteban, así como ejemplares de ejote y caña respectivamente. El día 10 de febrero se colectaron aguas del manantial Agua Azul y de la presa El Socavón en la cual desemboca, el cultivo asociado fueron unas plantas de ejote: Ese mismo día se muestreó la presa El Zapote de la que se extrajeron las muestras de agua y de berros que se encontraban creciendo ahí mismo. Por último, el día 16 de febrero se realizó un recorrido por gran parte del río Cuautla y se tomaron muestras de agua directamente del cauce, los sitios donde se extrajeron las muestras se identificaron por los nombres de varios puentes que cruzan el río en cuyas inmediaciones se realizó el muestreo, estos sitios fueron: puente de San Pablo Hidalgo y puente de San Rafael Zaragoza en Tlaltizapán; puente de la colonia Abelardo L. Rodríguez y puente Ex Hacienda de Coahuixtla en Ayala; puente de la colonia Volcanes de Cuautla y puente Libramiento de Yecapixtla.

Segundo muestreo: temporada de lluvias. Este se llevó a cabo los días 13, 20 y 22 de septiembre del 2023. El primer día se tomaron muestras de agua en las inmediaciones de los puentes de San Pablo Hidalgo y de San Rafael Zaragoza, de las presas El Mirador y Las Tortugas y sus canales correspondientes. Se tomaron las siguientes muestras vegetales: planta de jícama para el cultivo correspondiente a la presa El Mirador y para el cultivo de la presa Las Iguanas una planta de caña. El segundo día se muestrearon los sitios de los puentes en la colonia Abelardo L. Rodríguez y Ex Hacienda de Coahuixtla, las presas Las tortugas y San Esteban, los cultivos asociados fueron alfalfa y caña respectivamente. El último día se realizó el muestreo en las presas El Socavón y El Zapote cuyos cultivos asociados fueron jícama y berro, además se realizó el segundo muestreo del manantial Agua Azul y los puentes de la colonia Volcanes de Cuautla y del Libramiento de Yecapixtla.

Toma de muestras de aguas de uso agrícola.

Se colectó un volumen de 500 ml de agua en recipientes estériles a una profundidad de aproximadamente 15 cm de la superficie de cada presa o canal. Las muestras se trasladaron evitando los rayos directos del sol y se procesaron el mismo día de la colecta. En el laboratorio los recipientes con agua se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos, posteriormente; en condiciones de esterilidad, se filtró el sobrenadante hasta saturar el filtro de celulosa de 0.45 µm de diámetro de poro. Cada filtro utilizado se transfirió a un tubo Cryo de 2 ml con solución Glicerol-LB (30

% v/v) y se almacenó a -70 °C para preservación de las bacterias retenidas y su posterior análisis.

Toma de muestras y obtención de bacterias de cultivos vegetales de consumo humano.

Se eligieron 1 o 2 ejemplares completos de los cultivos seleccionados, fueron extraídos procurando preservar la mayor cantidad de sus raíces con tierra, fueron almacenados en bolsas plásticas evitando los rayos directos del sol durante su traslado al laboratorio y se procesaron el mismo día. Cada planta fue examinada de objetos extraños y otras especies ajenas al interés del estudio. Se eliminó el exceso de tierra y se seccionó cada planta para conservar los siguientes tejidos: raíces, tallos y hojas o frutos. Las raíces fueron lavadas con 250 ml de agua destilada estéril y se conservó dicha agua para la obtención de bacterias de la rizósfera mediante el método de filtración de membrana. Después de enjuagar las raíces, estas y los demás tejidos se enjuagaron con agua corriente y posteriormente se dejaron secar en papel absorbente. Una vez secos, de cada tejido se tomó una muestra de 10 g o 1 g según fuera el caso; la cual se desinfectó en solución de hipoclorito de sodio al 16 % por un periodo de 15 minutos. Pasada la desinfección se enjuagó cada muestra de tejido con agua estéril por al menos 5 veces para eliminar el hipoclorito de sodio. Por cada 10 g de tejido (o 1 g) se agregaron 90 ml (o 9 ml) de solución de $MgSO_4$ 0.1 M y se maceraron en licuadora o mortero de porcelana estériles. Una vez obtenido el macerado se dejó reposar entre 30-60 minutos para permitir la salida de las bacterias del tejido hacia la suspensión. Pasado este periodo se centrifugaron los macerados a 3,500 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 5 °C para precipitar sólidos, los sobrenadantes se filtraron con filtros celulosa de 0.45 µm de tamaño de poro hasta la saturación, y los filtros se transfirieron a tubos Cryo de 2 ml con solución Glicerol-LB (30 % v/v) y se almacenaron a -70 °C para su posterior análisis.

Aislamiento las cepas bacterianas resistentes a antibióticos

Las bacterias filtradas de cada muestra obtenida (aguas de riego, rizósfera y tejidos vegetales) se resuspendieron colocando los tubos Cryo que contenían los filtros en una incubadora con agitación durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente se transfirieron alícuotas de 50 µl a cajas Petri de 20 ml con agar LB o MacConkey, adicionadas con ampicilina (10 µg/ml), cefotaxima (4 µg/ml) o imipenem (4 µg/ml), lo que nos dio un total 6 combinaciones agar-antibiótico por cada muestra. Las cajas se incubaron a 37 °C durante 18-20 horas y pasado ese período solo se preservaron las placas con crecimiento bacteriano. Por cada grupo de colonias con características similares de las que crecieron en las cajas Petri, se seleccionó una y se resembró en cajas nuevas con la misma combinación agar-antibiótico para asegurar la resistencia al antibiótico utilizado; se utilizó el método de siembra por agotamiento para obtener colonias puras. Una vez que se obtuvieron colonias puras se registraron mediante una nomenclatura única que identificara la procedencia de cada aislado, ejemplo: 1-CU5S-001: muestreo 1 - cultivo 5 suelo - aislado 001. Las

bacterias aisladas se preservaron en tubos Cryo 2 ml con solución Glicerol-LB (30 % v/v) a -70 °C y de esta manera se integró un inventario de todos los aislamientos resistentes; además se hizo un cultivo extra en tubos Cryo con agar LB para identificar su especie.

Identificación de especies

Se identificó la especie de las colonias aisladas por medio de la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF MS (Microflex LT system, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) del Laboratorio de Infectología del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Clasificación por tinción de Gram

Se definió el tipo de tinción de Gram de acuerdo con la especie identificada por MALDI-TOF. Aquellos aislados que no lograron identificarse por medio de dicha técnica, se les aplicó la tinción de Gram bajo el siguiente procedimiento: se tomó una pequeña muestra del crecimiento bacteriano y se colocó en un portaobjetos. Se fijó a la flama. Se cubrió con cristal violeta y tras 1 minuto se eliminó el excedente. Se cubrió con Lugol durante 1 minuto. Se lavó con agua destilada. Se enjuagó con alcohol-acetona (1:1 v/v). Se lavó con agua destilada. Se cubrió con safranina durante 30 segundos. Se lavó con agua destilada. Se dejó secar y se observó al microscopio, aquellas que después del procedimiento se miraban de color violáceo se registraron como gram positivas y las que se veían de tonos rojos o rosados se registraban como gram negativas.

Extracción de ADN

A cada una de las especies aisladas se le realizó extracción de ADN por medio de choque térmico. A partir de 2 o 3 colonias se realizaron 3 ciclos de 96 °C por 10 minutos y -20 °C por 10 minutos. Posteriormente un ciclo de centrifugación a 13,000 rpm por 2 minutos. Del sobrenadante se tomaron 20 µl y se mezclaron con 80 µl de agua estéril para su almacenamiento.

Identificación de betalactamasas mediante PCR

A partir del ADN extraído, se realizaron mezclas de ADN de 3 aislamientos distintos (20 µl c/u), con la finalidad de reducir la cantidad de reacciones de PCR necesarias para la identificación de genes de betalactamasas en todos los aislados, posteriormente se analizaron por separado aquellas que presentaron alguna amplificación. Los genes buscados fueron para las familias de betalactamasas: CTX-M, KPC, NDM, SHV y VIM y se utilizó ADN de cepas del laboratorio ya confirmadas para cada gen como control positivo. Cada reacción de PCR se preparó para un volumen final de 20 µl, con 2 µl de $MgCl_2$, 2 µl de Buffer (10X), 2 µl dNTPs, 2µl de los oligonucleótidos correspondientes (Tabla 5), 0.5 µl de Taq-Pol [5 U/µl], 7 µl de agua estéril y 3 µl de ADN (mezcla o individual) correspondiente. Para la reacción se utilizaron las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 2 minutos a 92 °C, seguido de 30 ciclos de amplificación y una etapa de extensión

final de tres minutos a 72 °C. Las condiciones de amplificación se detallan en la Tabla 6.

Tabla 5: Características de los oligonucleótidos utilizados en PCR

GEN	SECUENCIA	AMPLICÓN	TM
CTX-M	CTX-M-F 5´-GCTGTTGTTAGGAAGTGTG-3' CTX-M-R 5´-GGTGACGATTTTAGCCCGCC-3'	811 pb	58 °C
KPC	KPC-F 5'-CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG-3' KPC-R 5'-CTTGTCATCCTTGTTAGGCG-3'	796 pb	58 °C
NDM	NDM-F 5'-GGTGCATGCCCGGTGAAATC-3' NDM-R 5'-ATGCTGGCCTTGGGGAACG-3'	660 pb	58 °C
SHV	SHV-1 5´-ATGCGTTATATTCGCCTG-3´ SHV-2 5´-ATCGAGCACTGGCAACGCTAA-3´	291 pb	58 °C
VIM	VIM-F 5´-GTGTTTGGTCGCATATCGC-3´ VIM-R 5´-CGCAGCACCAGGATAGAAG-3´	380 pb	58 °C

Tabla 6: Condiciones de amplificación

GEN	DESNATURALIZACIÓN	ALINEAMIENTO	EXTENSIÓN	CICLOS
CTX-M	92 °C x 30 s	58 °C x 30 s	72 °C x 45 s	30
KPC	92 °C x 30 s	58 °C x 30 s	72 °C x 45 s	30
NDM	92 °C x 30 s	58 °C x 30 s	72 °C x 30 s	30
SHV	92 °C x 30 s	58 °C x 30 s	72 °C x 30 s	30
VIM	92 °C x 30 s	58 °C x 30 s	72 °C x 30 s	30

Electroforesis de los productos de PCR

Los fragmentos amplificados fueron separados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Posteriormente fueron teñidos con Bromuro de Etidio y visualizados con luz ultravioleta.

Prueba de detección de betalactamasas por nitrocefina

Se aplicó esta prueba a los aislados gram negativos para determinar la producción de betalactamasas. La nitrocefina es una cefalosporina cromogénica que torna de color amarillo a rojo, cuando por acción de una enzima se hidroliza el anillo betalactámico de la nitrocefina produciendo ácido peniciloico (Romero et al., 2011). Se preparó el sustrato a una concentración de [500 µg/ml] pesando 1 mg de

nitrocefina en un tubo Eppendorf de 2 ml, se agregaron 100 µl de DMSO y se homogenizó en vórtex. Se agregaron 1,900 µl de buffer de fosfato 0.1 M a la mezcla y se homogenizó nuevamente. Se protegió el envase envolviendo con aluminio y se almacenó a -20 °C para su utilización posterior. Se tomó una asada de cada aislado cultivado en agar y se inoculó en tubos de ensayo con caldo LB, se cultivaron por una noche a 37 °C. Transcurrido ese periodo se preparó una microplaca agregando 10 µl de nitrocefina [500 µg/ml] a cada pocillo, seguido de 10 µl del caldo de cultivo de cada aislado. Además de los aislados se añadieron controles positivo y negativo. El positivo fue un aislado con presencia de una BLEE confirmada y el negativo solo con nitrocefina [500 µg/ml]. Una vez inoculados todos los aislados se mantuvo la microplaca a temperatura ambiente por un periodo de 45-60 minutos, ya transcurrido ese tiempo se observó la placa y se registraron los resultados de cambio de coloración.

Determinación del perfil de resistencia

Se aplicó esta prueba para aquellos aislados que presentaron algún gen de resistencia durante las pruebas de PCR. Se realizó la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de cada aislado para 6 antibióticos: amikacina, ceftazidima, cefotaxima, cefepime, imipenem y levofloxacino. Las pruebas se hicieron por duplicado siguiendo el método de microdilución en caldo, conforme a lo estipulado en el manual M07-A9 Vol. 32 No. 2 (CLSI, 2012) y los resultados fueron interpretados según los puntos de corte establecidos en M100 ed. 32 (CLSI, 2022).

RESULTADOS

Primer muestreo: Temporada de estiaje

Se obtuvieron un total de 210 aislados bacterianos resistentes a los antibióticos seleccionados; tanto de las muestras de agua en puentes y presas, así como de la rizósfera y tejidos de cada cultivo, las características de estos aislados se describen en la siguiente serie de graficas:

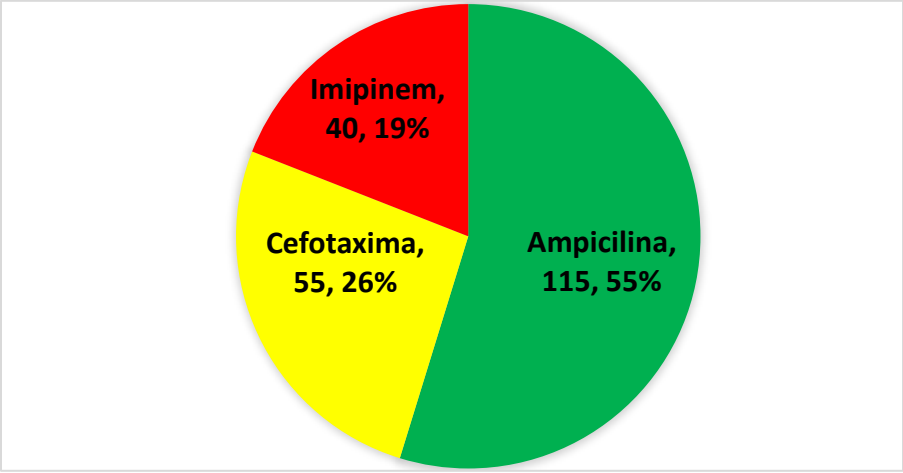


Figura 13. Frecuencia y porcentaje de aislados bacterianos del primer muestreo de acuerdo con el antibiótico en el que fueron seleccionados.

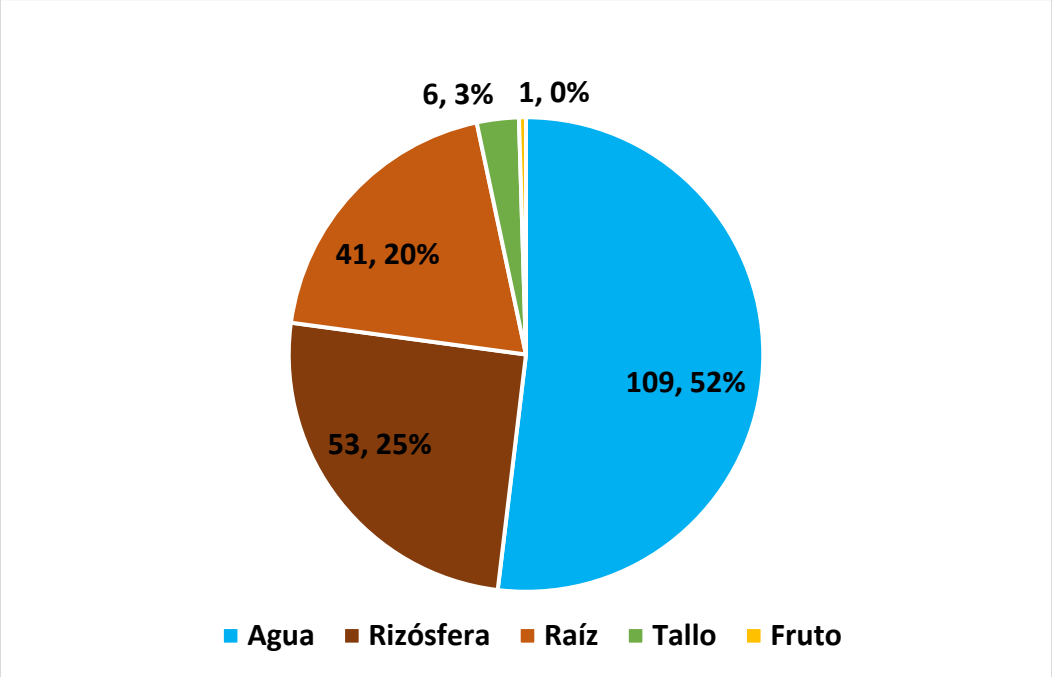


Figura 14. Frecuencia y porcentaje de aislados del primer muestreo de acuerdo con el origen de la muestra.

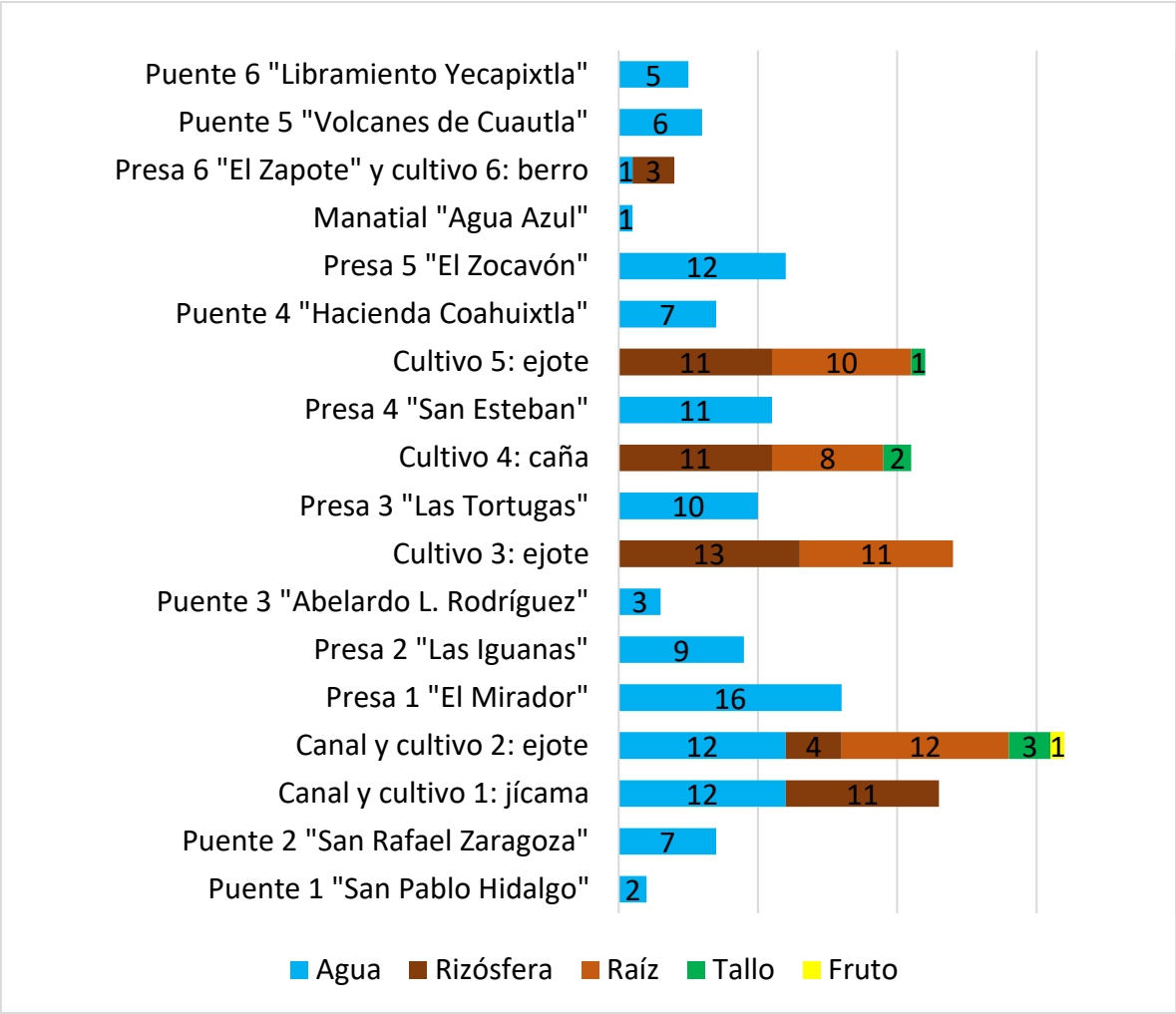


Figura 15. Número de aislados del primer muestreo por sitio y tipo de muestra.

Especies bacterianas identificadas

Del total de aislados se lograron identificar el 87 % (183/210) que pertenecen a 65 especies distintas; sin embargo, el 13% (27/210) de los aislamientos no se pudieron identificar. En la siguiente tabla se describen las especies bacterianas identificadas y frecuencia.

Tabla 7: Especies encontradas en el primer muestreo.

Especie	#	Especie	#
No identificada	27	*Agrobacterium larrymoorei*	1
Escherichia coli	23	*Alcaligenes faecalis*	1
Stenotrophomonas maltophilia	17	*Bacillus pumilus*	1
Enterococcus faecium	13	*Brachybacterium paraconglomeratum*	1
Kosakonia cowanii	13	*Chryseobacterium gleum*	1
Enterobacter cloacae	10	*Citrobacter amanolaticus*	1
Achromobacter mucicolens	9	*Citrobacter farmeri*	1
Klebsiella oxytoca	5	*Delftia tsuruhatensis*	1
Citrobacter freundii	4	*Enterobacter asburiae*	1
Enterobacter hormaechei	4	*Enterococcus casseliflavus*	1
Pseudomonas putida	4	*Enterococcus mundtii*	1
Agrobacterium radiobacter	3	*Kluyvera ascorbata*	1
Chryseobacterium aquifrigidense	3	*Lelliottia amnigena*	1
Hafnia alvei	3	*Listeria seeligeri*	1
Pseudomonas aeruginosa	3	*Microbacterium neimengense*	1
Pseudomonas chlororaphis	3	*Paenibacillus lactis*	1
Pseudomonas fluorescens	3	*Pantoea anthophila*	1
Rahnella aquatilis	3	*Pectobacterium carotovorum*	1
Achromobacter spanius	2	*Peribacillus simplex*	1
Bacillus cereus	2	*Phytobacter ursingii*	1
Bacillus sp.	2	*Priestia negaterium*	1
Carnobacterium divergens	2	*Providencia rettgeri*	1
Cronobacter sp.	2	*Pseudoescherichia vulneris*	1
Enterobacter bugandensis	2	*Pseudomonas lundensis*	1
Klebsiella pneumoniae	2	*Pseudomonas oryzihabitans*	1
Leuconostoc mesenteroides	2	*Pseudomonas straminea*	1
Pantoea ananatis	2	*Raoultella ornithinolytica*	1
Pantoea sp.	2	*Serratia fonticola*	1
Proteus mirabilis	2	*Serratia marcescens*	1
Pseudomonas monteilli	2	*Siccibacter colletis*	1
Sphingobacterium thalpophilum	2	*Staphylococcus capitis*	1
Achromobacter insolitus	1	*Staphylococcus haemolyticus*	1
Achromobacter xylosoxidans	1	Total	210

Tinción de Gram primer muestreo

La siguiente figura muestra el patrón de tinción de Gram obtenido de los aislados del primer muestreo (210):

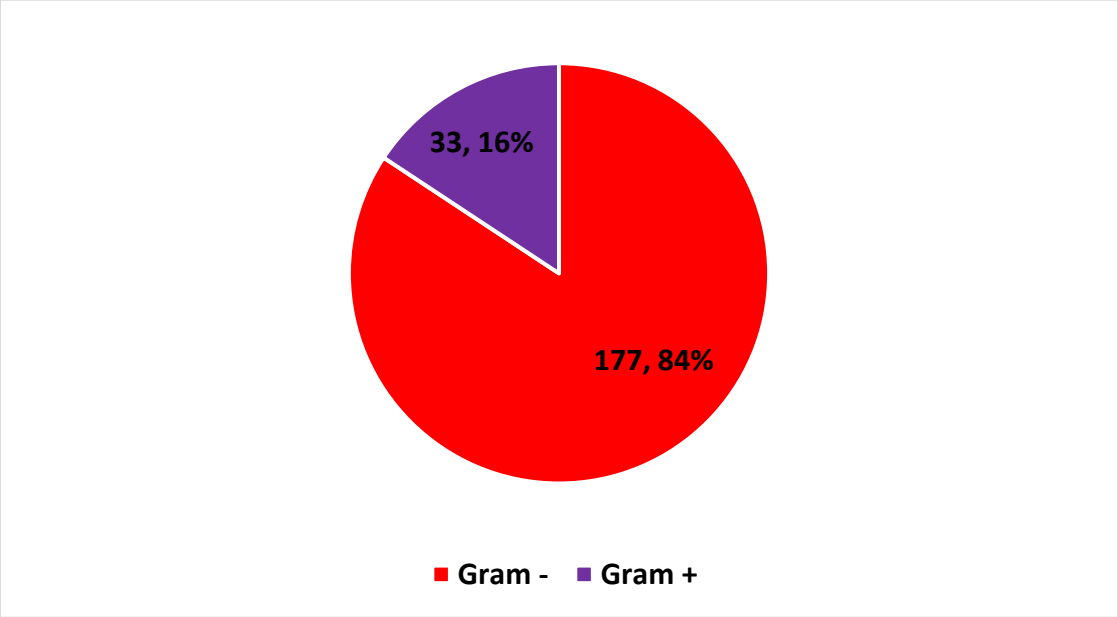


Figura 16. Frecuencia y porcentaje de aislados gram positivos y gram negativos del primer muestreo.

Aislados de los sitios de los puentes

Se obtuvieron 30 aislados en el primer muestreo de puntos del río donde se ubican diversos puentes con el siguiente patrón de resistencias:

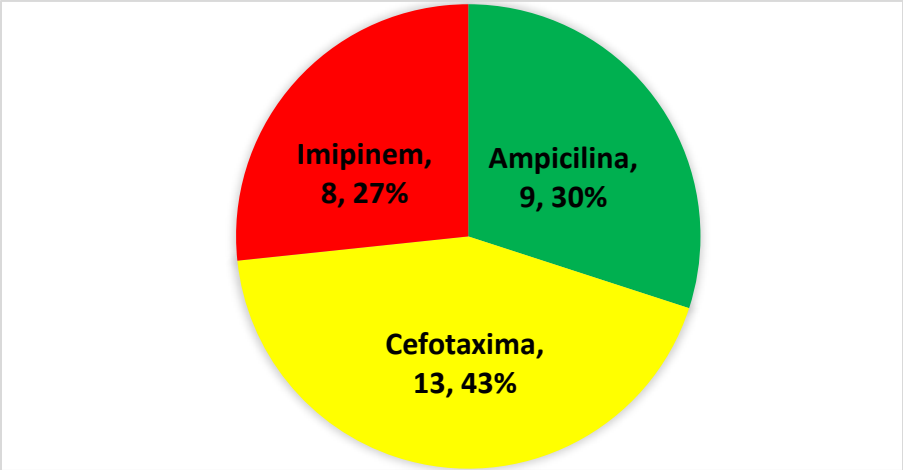


Figura 17. Frecuencia y porcentaje de aislados del primer muestreo en puentes de acuerdo con el antibiótico de selección.

Genes de resistencia encontrados por PCR

CTX-M: Se identificaron 7 % (15/210) aislados con el gen de la betalactamasa de espectro extendido CTX-M, las cuales se enlistan a continuación: 1-CU4S-202 (1), 1-CU4S-203 (2), 1-CA2-103 (3), 1-CA2-104 (4), 1-PR3-103 (5), 1-PR4-102 (6), 1-PR4-103 (7), 1-PR4-104 (8), 1-PR5-102 (9), 1-CA2-106 (10), 1-CA1-102, 1-PR2-101, 1-PR3-002, 1-PR5-004 Y 1-PR5-005. Las bandas se ubicaron entre las marcas de 700 y 1000 pb.

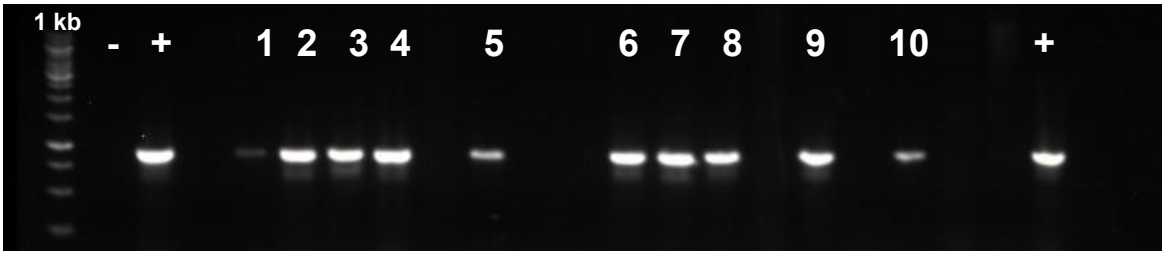


Figura 18. Gel de electroforesis de productos de PCR de muestras individuales para CTX-M.

KPC: No se identificaron aislados con este gen.

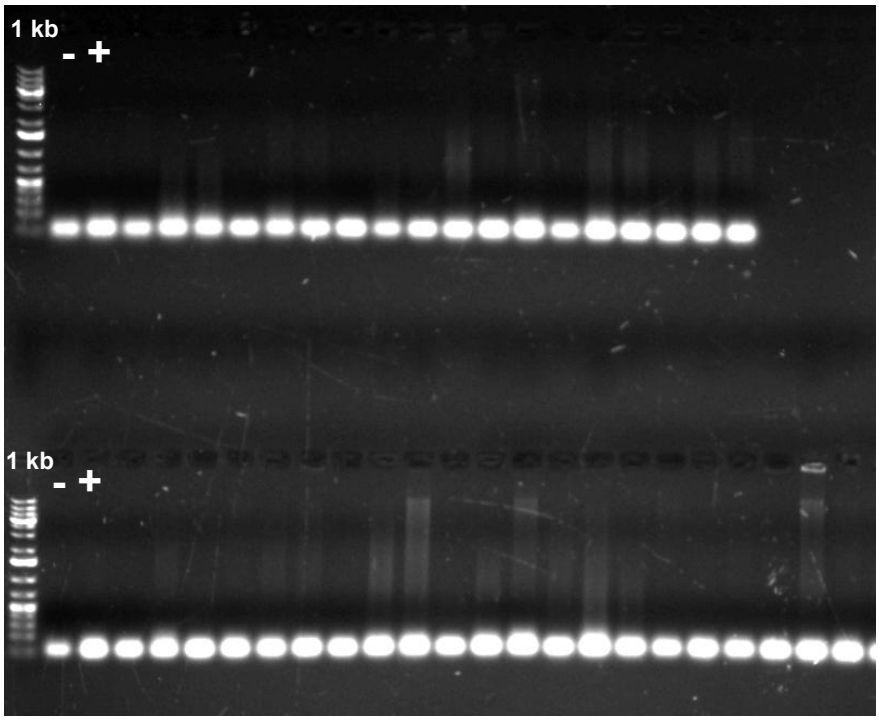


Figura 19. Gel de electroforesis de productos de PCR de mezclas de ADN para KPC.

NDM: No se identificaron aislados con este gen.

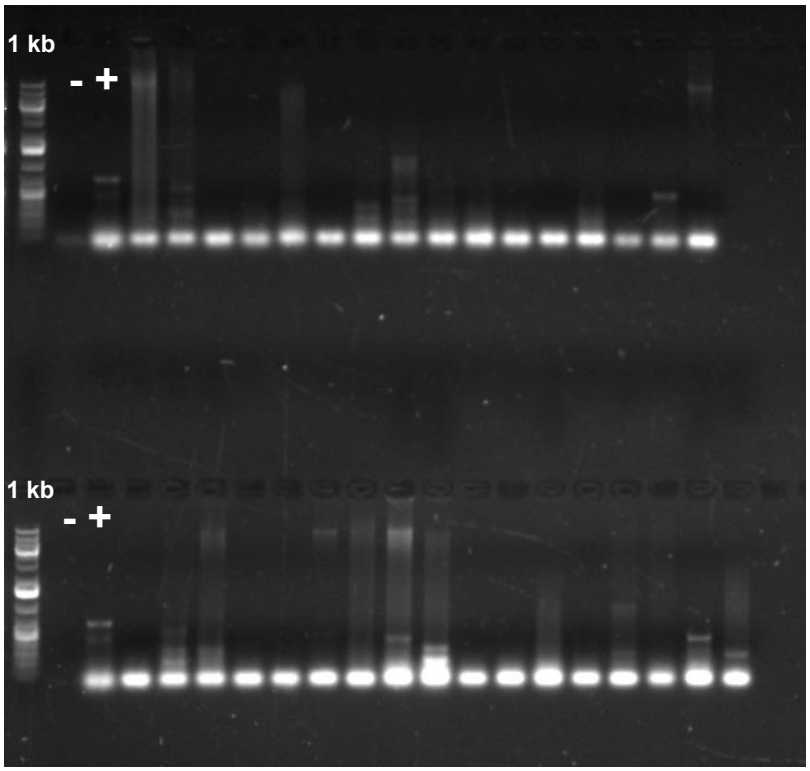


Figura 20. Gel de electroforesis de productos de PCR de mezclas de ADN para NDM.

SHV: Se identificaron 2 % (4/210) aislados con el gen de la betalactamasa SHV, los cuales se enlistan a continuación: 1-CU2S-001 (1), 1-CU2S-002 (2), 1-CU3R-002 (3) y 1-PR4-001 (4). Los bandeos se ubican por debajo de la marca de 1000 pb.

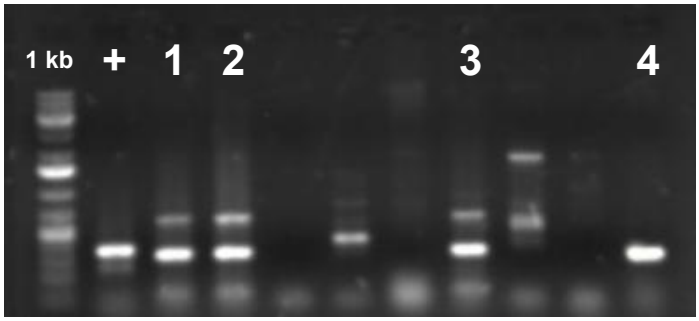


Figura 21. Gel de electroforesis de productos de PCR de muestras individuales para SHV.

VIM: Se identificaron 1 % (2/210) aislados con el gen de la metalobetalactamasa VIM las cuales se enlistan a continuación: 1-PR3-002 (1) y 1-PR5-003 (2). Las bandas se ubicaron por debajo de las 1000 pb.

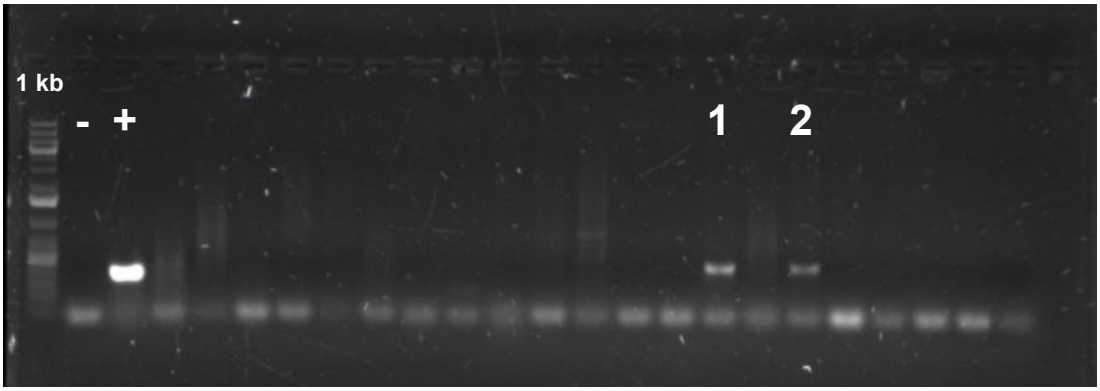


Figura 22. Gel de electroforesis de productos de PCR de muestras individuales para VIM.

Ubicación de los genes de resistencia encontrados

En la siguiente tabla se describen los aislados del primer muestreo que presentaron genes de resistencia agrupados de acuerdo con el sitio de muestreo donde se encontraron. Así mismo, en la Figura 23 se detalla la ubicación de los sitios donde se encontraron los genes mencionados.

Tabla 8: Genes de resistencia encontrados en primer muestreo.

Símbolo	Nombre	ID	Especie	Gen	Antib.	Muestra
	Presa El Socavón	1-PR5-03	*Escherichia coli*	VIM	AMP	Agua
		1-PR5-04	*Escherichia coli*	CTX-M	AMP	Agua
		1-PR5-05	*Escherichia coli*	CTX-M	AMP	Agua
		1-PR5-12	*Escherichia coli*	CTX-M	CTX	Agua
	Presa San Esteban	1-PR4-01	*Klebsiella pneumoniae*	SHV	AMP	Agua
		1-PR4-12	*Klebsiella oxytoca*	CTX-M	CTX	Agua
		1-PR4-13	*Escherichia coli*	CTX-M	CTX	Agua
		1-PR4-14	*Escherichia coli*	CTX-M	CTX	Agua

	Cultivo San Esteban	1-CU4S-10	*Stenotrophomonas maltophilia*	CTX-M	IMP	Rizósfera Caña
		1-CU4S-11	*Stenotrophomonas maltophilia*	CTX-M	IMP	Rizósfera Caña
	Presa Las Tortugas	1-PR3-02	*Escherichia coli*	CTX-M/VIM	AMP	Agua
		1-PR3-10	*Escherichia coli*	CTX-M	CTX	Agua
	Cultivo Las Tortugas	1-CU3R-02	Sin identificar	SHV	AMP	Raíz Ejote
	Presa Las Iguanas	1-PR2-04	*Escherichia coli*	CTX-M	CTX	Agua
	Canal y cultivo Las Iguanas	1-CA2-09	*Escherichia coli*	CTX-M	AMP	Agua
		1-CA2-10	*Escherichia coli*	CTX-M	AMP	Agua
		1-CA2-12	*Escherichia coli*	CTX-M	AMP	Agua
		1-CU2S-01	Sin identificar	SHV	AMP	Rizósfera Ejote
		1-CU2S-02	Sin identificar	SHV	AMP	Rizósfera Ejote
	Canal El Mirador	1-CA1-04	*Escherichia coli*	CTX-M	CTX	Agua

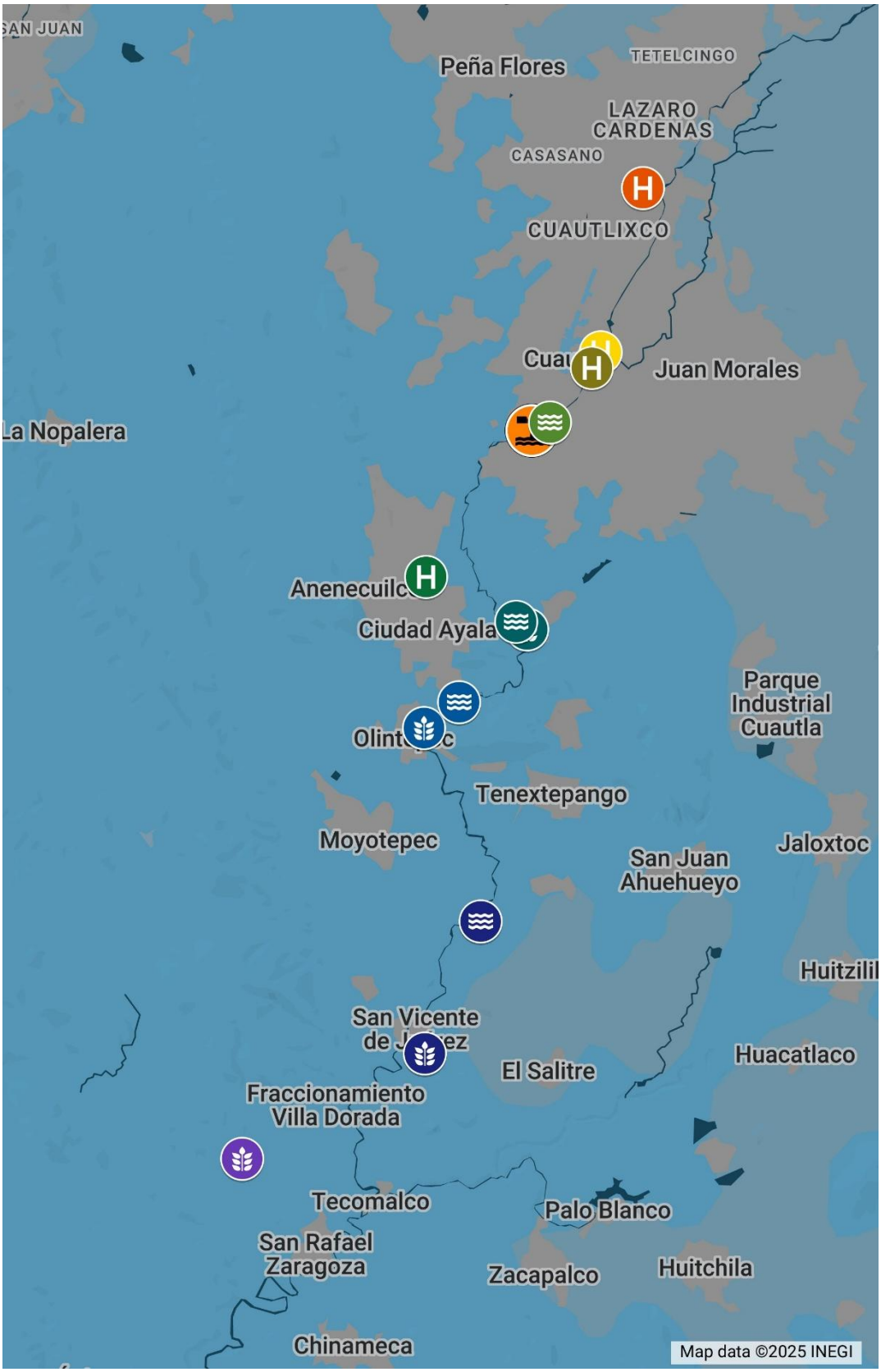


Figura 23. Ubicación de los aislados del primer muestreo con genes de resistencia.

Pruebas de nitrocefina para detección de betalactamasas

Las pruebas de nitrocefina revelaron que un 77 % (149/194) de los aislados a los que se les aplicó la prueba son productores de betalactamasas.

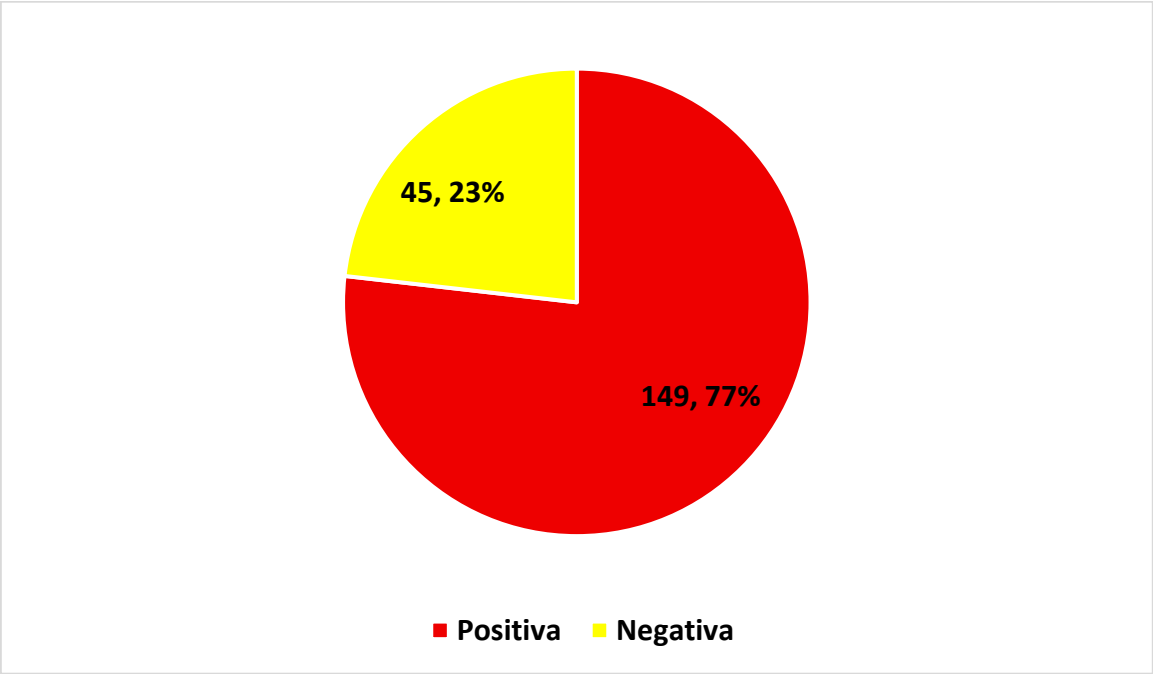


Figura 24. Resultados de las pruebas de nitrocefina de los aislados del primer muestreo.

Segundo muestreo: Temporada de lluvias

Para el segundo muestreo encontramos 181 aislados bacterianos resistentes a los antibióticos utilizados, cuyas características se describen en los siguientes tres gráficos.

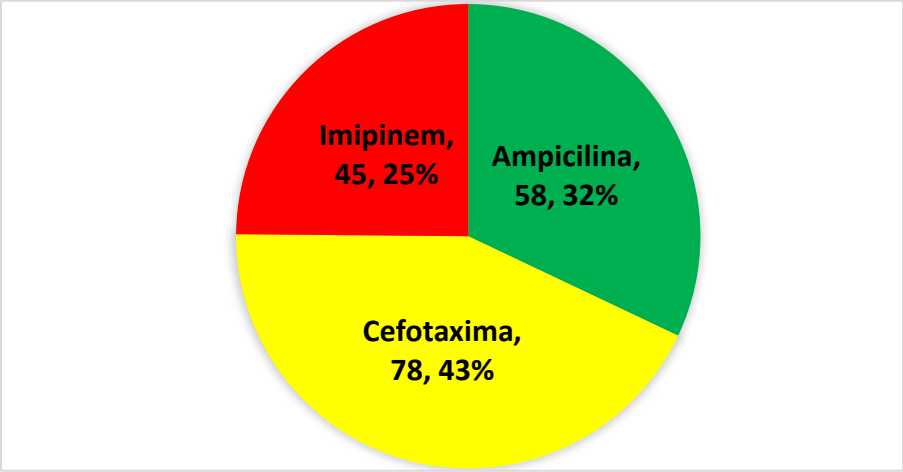


Figura 25. Frecuencia y porcentaje de aislados bacterianos del segundo muestreo de acuerdo con el antibiótico en el que fueron seleccionados.

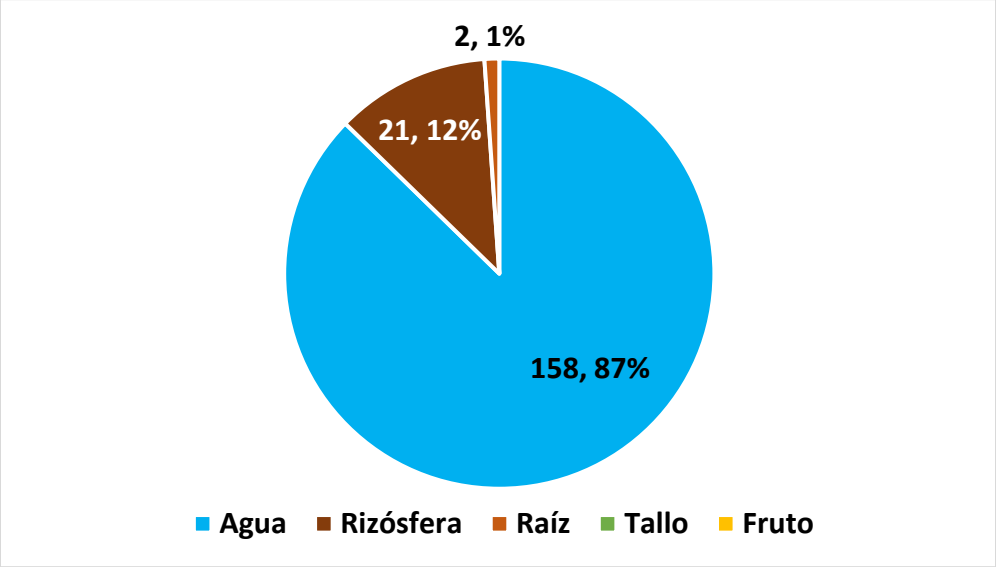


Figura 26. Frecuencia y porcentaje de aislados del segundo muestreo de acuerdo con el tipo de muestra.

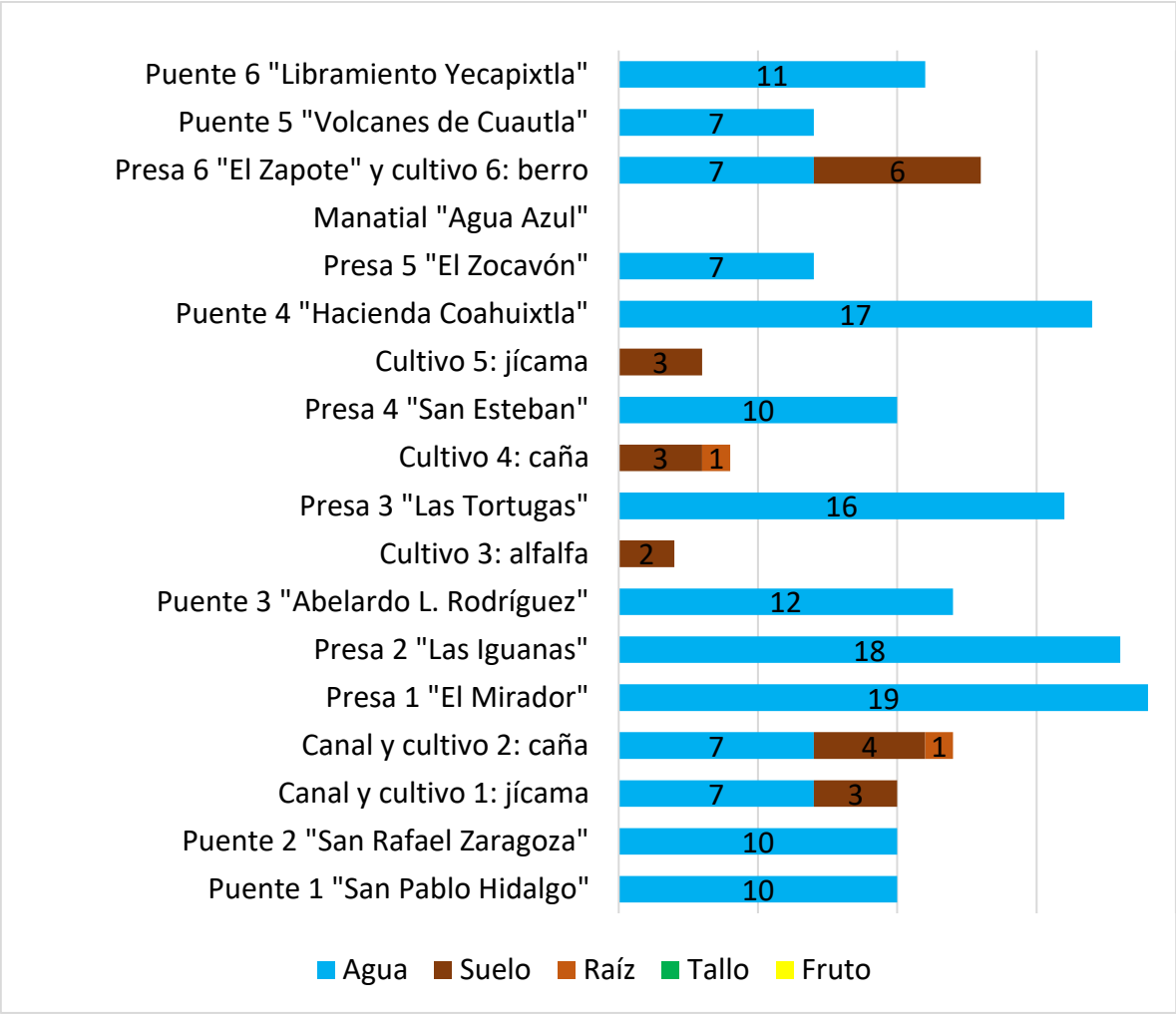


Figura 27. Número de aislados del segundo muestreo por sitio y tipo de muestra.

Especies bacterianas identificadas

En el segundo muestreo se lograron identificar el 91% de los aislados (164/181), mientras que el 9 % no fueron identificados (17/181). Los aislados identificados se distribuyeron en 52 especies distintas, las cuales se detallan en la tabla de la siguiente página.

Tabla 9: Especies encontradas en el segundo muestreo.

Especie	#	Especie	#
Bacillus cereus	33	*Bacillus pseudomycoides*	1
Escherichia coli	24	*Bacillus velezensis*	1
No identificado	17	*Brevibacillus centrosporus*	1
Peribacillus simplex	8	*Chryseobacterium arthrosphaerae*	1
Bacillus spp.	7	*Chryseobacterium indologenes*	1
Priestia megaterium	7	*Citrobacter braakii*	1
Lysinibacillus fusiformis	6	*Citrobacter freundii*	1
Bacillus pumilus	5	*Cytobacillus firmus*	1
Bacillus mycoides	4	*Cytobacillus kochii*	1
Cytobacillus oceanisediminis	4	*Empedobacter falsenii*	1
Bacillus licheniformis	3	*Enterococcus gallinarum*	1
Enterobacter hormaechei	3	*Enterococcus hirae*	1
Paenibacillus illinoisensis	3	*Enterococcus mundtii*	1
Priestia endophytica	3	*Kurthia gibsonii*	1
Serratia marcescens	3	*Metabacillus indicus*	1
Acinetobacter baumannii	2	*Ochrobactrum intermedium*	1
Bacillus cereus + Bacillus mycoides	2	*Paenibacillus amylolyticus*	1
Bacillus mycoides + Bacillus pseudomycoides	2	*Paenibacillus polymyxa*	1
Bacillus subtilis	2	*Paenibacillus silvae*	1
Bacillus thuringiensis	2	*Paenibacillus* spp.	1
Enterococcus faecium	2	*Pantoea anthophila*	1
Fictibacillus halophilus	2	*Pantoea septica*	1
Lysinibacillus xylanilyticus	2	*Peribacillus illinoisensis*	1
Paenibacillus lautus	2	*Peribacillus muralis*	1
Rossellomorea marisflavi	2	*Providencia rettgeri*	1
Bacillus altitudinis	1	*Serratia liquefaciens*	1
Bacillus cereus + Bacillus manliponensis	1	*Stenotrophomonas maltophilia*	1
Bacillus mycoides + Bacillus cytotoxicus	1	Total	181
Bacillus mycoides + Bacillus thuringiensis	1		

Tinción de Gram segundo muestreo

La siguiente gráfica representa los aislados del segundo muestreo de acuerdo con el tipo de tinción de Gram que poseen.

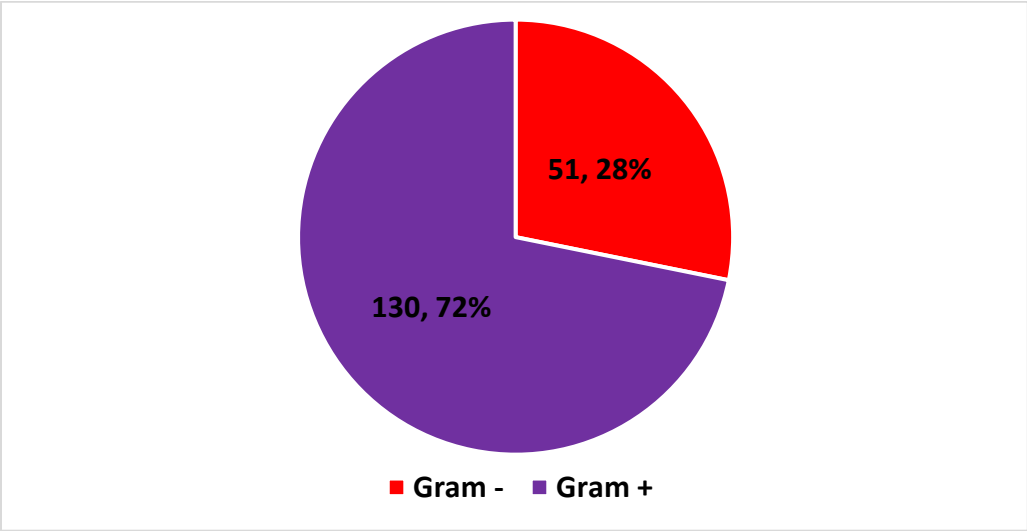


Figura 28. Frecuencia y porcentaje de aislados gram positivos y gram negativos del segundo muestreo.

Aislados de los sitios de los puentes

Para el caso del segundo muestreo en puentes se hallaron un total 67 aislados resistentes a los antibióticos con las siguientes características:

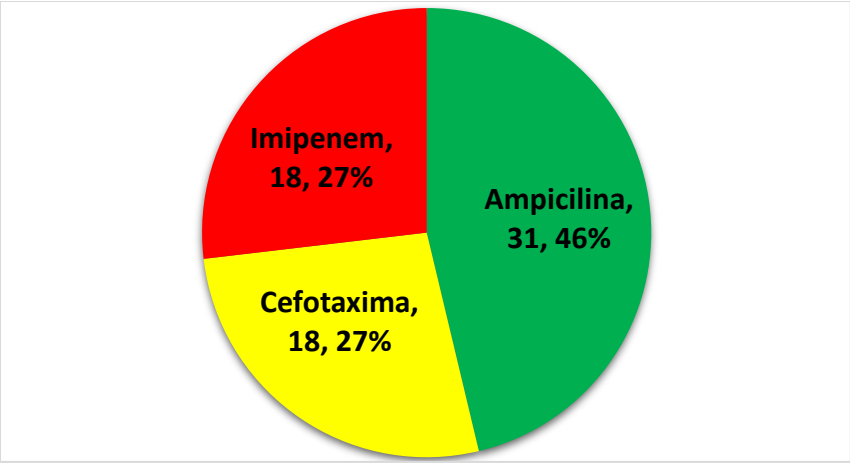


Figura 29. Frecuencia y porcentaje de aislados del segundo muestreo en puentes de acuerdo con su resistencia.

Genes de resistencia encontrados por PCR

En el segundo muestreo las pruebas de detección de genes de betalactamasas arrojaron los siguientes resultados:

CTX-M: Se identificaron 4 % (8/181) aislados con este gen de resistencia: 2-PR2-103, 2-PR3-003, 2-PR4-108, 2-PR4-201, 2-PU4-102, 2-PU4-103, 2-PU6-101 y 2-PU6-201.

KPC: No se identificaron aislados con este gen.

NDM: No se identificaron aislados con este gen.

SHV: 5 % (10/181) de los aislados presentaron este gen: 2-PR3-002, 2-PR3-004, 2-PU2-005, 2-PU3-006, 2-PU3-007, 2-PU4-001, 2-PU4-101, 2-PU4-102, 2-PU4-103 y 2-PU6-001.

VIM: El gen de esta familia de betalactamasas se encontró en 2 % (3/181) de los aislados: 2-PU4-001,2-PU4-101 y 2-PU4-102.

Ubicación de los genes de resistencia encontrados

En el segundo muestreo se hallaron en total 16 aislados con genes de resistencia bacteriana, los cuales se detallan en la siguiente tabla, así como en la Figura 30 se describe su ubicación.

Tabla 10. Genes de resistencia encontrados en el segundo muestreo.

Símbolo	Nombre	ID	Especie	Gen	Antib.	Muestra
	Puente Libramiento Yecapixtla	2-PU6-001	*Escherichia coli*	SHV	AMP	Agua
		2-PU6-101	*Escherichia coli*	CTX-M	CTX	Agua
		2-PU6-201	*Escherichia coli*	CTX-M	IMP	Agua
	Puente Ex Hacienda de Coahuixtla	2-PU4-001	*Escherichia coli*	SHV/VIM	AMP	Agua
		2-PU4-101	*Escherichia coli*	SHV/VIM	CTX	Agua
		2-PU4-102	*Escherichia coli*	CTX-M/ SHV/VIM	CTX	Agua
		2-PU4-103	*Escherichia coli*	CTX-M/SHV	CTX	Agua
	Presa San Esteban	2-PR4-108	*Escherichia coli*	CTX-M	CTX	Agua
		2-PR4-201	*Escherichia coli*	CTX-M	IMP	Agua
	Presa Las Tortugas	2-PR3-002	*Escherichia coli*	SHV	AMP	Agua
		2-PR3-003	*Citrobacter braakii*	CTX-M/SHV	AMP	Agua
		2-PR3-004	*Chryseobacterium arthrosphaerae*	SHV	AMP	Agua
	Puente Abelardo L. Rodríguez	2-PU3-006	*Escherichia coli*	SHV	AMP	Agua
		2-PU3-007	*Escherichia coli*	SHV	AMP	Agua
	Presa Las Iguanas	2-PR2-103	*Enterobacter hormaechei*	CTX-M/SHV	CTX	Agua
	Puente San Rafael Zaragoza	2-PU2-005	*Escherichia coli*	SHV	AMP	Agua

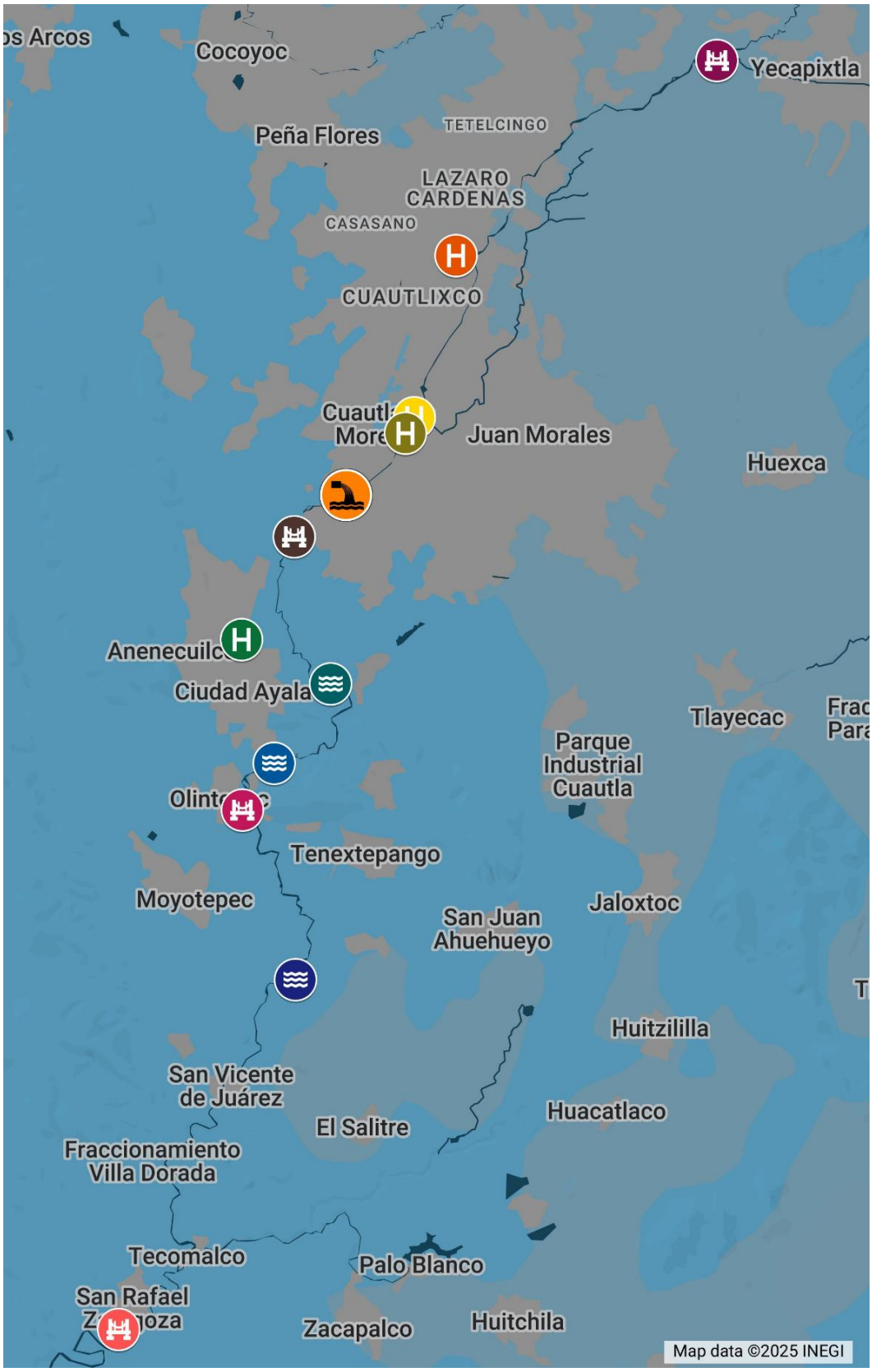


Figura 30. Ubicación de los aislados del segundo muestreo con genes de resistencia.

Pruebas de nitrocefina para detección de betalactamasas

Para el segundo muestreo la proporción de bacterias productoras de betalactamasas a las que se les aplicó la prueba bajó a 63 % (38/60) como se detalla en la siguiente figura.

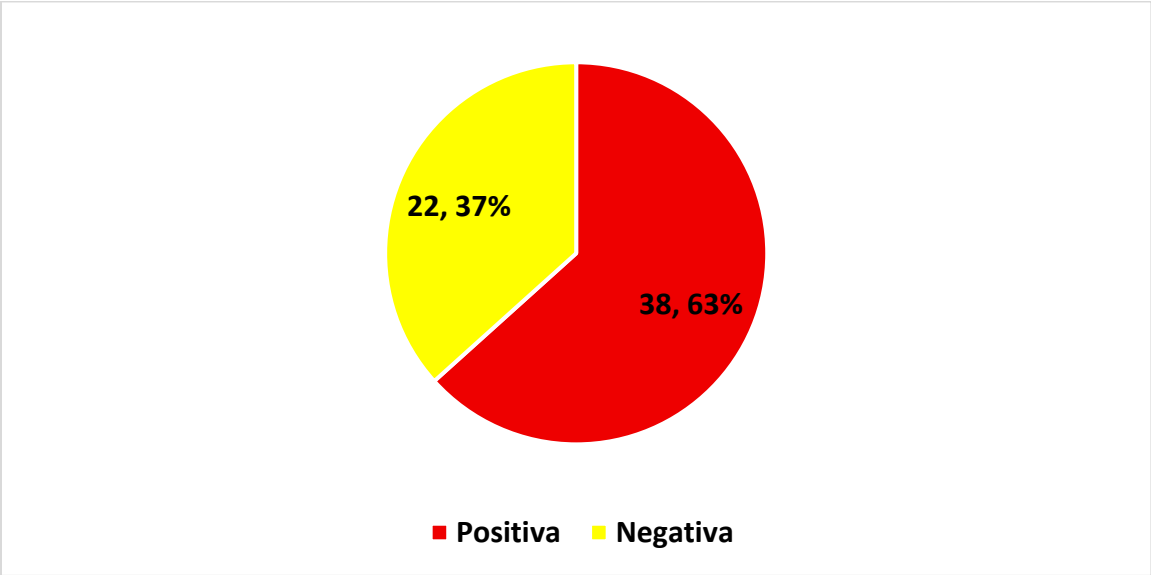


Figura 31. Resultados de las pruebas de nitrocefina de aislados del segundo muestreo

Perfiles de resistencia a antibióticos.

Del total de aislados 9 % (36/391) presentaron uno o varios genes de resistencia, 5 % (20/391) en la temporada de sequía y 4 % (16/391) en lluvias, a cada uno de estos aislados se le determinó el perfil de susceptibilidad para los siguientes antibióticos: amikacina (AMK), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), cefepime (FEP), imipenem (IMP) y levofloxacino (LVX), descritos en la siguiente tabla.

Tabla 11. Perfiles de susceptibilidad

ID	ESPECIE	GEN	MUESTRA	AMK	CAZ	CTX	FEP	IMP	LVX
1-CA1-04	*Escherichia coli*	CTX-M	Agua	8	64	>128	128	1	32
1-CA2-09	*Escherichia coli*	CTX-M	Agua	16	>128	>128	>128	0.5	64
1-CA2-10	*Escherichia coli*	CTX-M	Agua	8	128	>128	>128	1	32
1-CA2-12	*Escherichia coli*	CTX-M	Agua	8	128	>128	>128	1	32
1-CU2S-01	Sin identificar	SHV	Rizósfera Ejote	>128	>128	>128	>128	8	1
1-CU2S-02	Sin identificar	SHV	Rizósfera Ejote	>128	>128	>128	>128	8	1
1-CU3R-02	Sin identificar	SHV	Raíz Ejote	>128	>128	>128	>128	32	2
1-CU4S-10	*Stenotrophomonas maltophilia*	CTX-M	Rizósfera Caña	>128	64	>128	128	>128	1
1-CU4S-11	*Stenotrophomonas maltophilia*	CTX-M	Rizósfera Caña	>128	64	>128	128	>128	1
1-PR2-04	*Escherichia coli*	CTX-M	Agua	64	>128	>128	>128	>128	4
1-PR3-02	*Escherichia coli*	CTX-M VIM	Agua	0.125	4	1	16	8	1
1-PR3-10	*Escherichia coli*	CTX-M	Agua	8	>128	>128	>128	8	32
1-PR4-01	*Klebsiella pneumoniae*	SHV	Agua	4	0.5	0.125	0.125	8	0.125
1-PR4-12	*Klebsiella oxytoca*	CTX-M	Agua	32	>128	>128	>128	8	64
1-PR4-13	*Escherichia coli*	CTX-M	Agua	16	128	>128	>128	16	32

ID	ESPECIE	GEN	MUESTRA	AMK	CAZ	CTX	FEP	IMP	LVX
1-PR4-14	*Escherichia coli*	CTX-M	Agua	128	>128	>128	>128	8	128
1-PR5-03	*Escherichia coli*	VIM	Agua	4	0.5	0.125	0.125	8	0.125
1-PR5-04	*Escherichia coli*	CTX-M	Agua	8	>128	>128	>128	8	32
1-PR5-05	*Escherichia coli*	CTX-M	Agua	16	32	>128	>128	4	16
1-PR5-12	*Escherichia coli*	CTX-M	Agua	4	32	>128	128	8	32
2-PR2-103	*Enterobacter hormaechei*	CTX-M SHV	Agua	4	64	>128	>128	1	0.5
2-PR3-002	*Escherichia coli*	SHV	Agua	8	0.5	0.125	0.125	1	1
2-PR3-003	*Citrobacter braakii*	CTX-M SHV	Agua	4	>128	>128	>128	1	32
2-PR3-004	*Chryseobacterium arthrosphaerae*	SHV	Agua	4	1	0.125	0.5	1	1
2-PR4-108	*Escherichia coli*	CTX-M	Agua	4	>128	>128	>128	1	1
2-PR4-201	*Escherichia coli*	CTX-M	Agua	8	>128	>128	>128	1	16
2-PU2-005	*Escherichia coli*	SHV	Agua	4	0.5	0.125	0.125	1	1
2-PU3-006	*Escherichia coli*	SHV	Agua	4	0.5	0.125	0.125	2	1
2-PU3-007	*Escherichia coli*	SHV	Agua	4	0.5	0.125	0.125	2	0.125
2-PU4-001	*Escherichia coli*	SHV VIM	Agua	4	0.5	0.125	0.125	2	1
2-PU4-101	*Escherichia coli*	SHV VIM	Agua	4	>128	>128	>128	2	16
2-PU4-102	*Escherichia coli*	CTX-M SHV VIM	Agua	8	128	>128	>128	2	32
2-PU4-103	*Escherichia coli*	CTX-M SHV	Agua	8	32	>128	>128	2	32
2-PU6-001	*Escherichia coli*	SHV	Agua	32	0.5	0.125	0.125	2	0.125
2-PU6-101	*Escherichia coli*	CTX-M	Agua	8	16	>128	16	4	0.5
2-PU6-201	*Escherichia coli*	CTX-M	Agua	4	32	>128	64	4	2

x: Sensible x: Resistente

DISCUSIÓN

En el presente estudio se logró identificar la presencia bacterias y genes de resistencia a los antibióticos a lo largo del río Cuautla. Además, identificamos bacterias resistentes a los antibióticos en la rizósfera y tejidos de cultivos que son irrigados con este afluente. El estudio se llevó a cabo en dos épocas del año distintas y los resultados muestran ciertas diferencias entre ellas.

En el muestreo que corresponde a la época de lluvias, los aislamientos obtenidos de los 6 puentes muestreados aumentaron a más del doble en comparación con los obtenidos en los mismos sitios durante el primer muestreo, tomado en la época de estiaje (Figura 17 y Figura 29). Los aislamientos de las presas 1, 2 y 3, también tuvieron un aumento, que en este caso fue del 66% en comparación con la temporada de sequía. Tomando en cuenta lo anterior, se decidió dejar de utilizar ampicilina como medio de selección para usar solamente cefotaxima e imipenem en el resto de las muestras. Esto coincide con lo reportado por Amato et al. (2021), en el que el recuento de *Escherichia coli* fue mayor en muestras de sitios en los que días previos a su monitoreo recibieron lluvias intensas en comparación con las muestras de sitios en donde no las hubo, los autores lo atribuyen a que las precipitaciones arrastran microorganismos que se encuentran en los suelos, aumentando así los recuentos. Mancilla-Villa et al. (2022), reportan un caso similar con aumento de las concentraciones de coliformes en época de lluvias y Buckley et al. (1998), atribuyen este suceso a que bacterias intestinales provenientes del humano y otros animales se asocian a la materia orgánica y las fracciones finas del suelo y durante los episodios de lluvia estas se deslavan y depositan en las corrientes de agua.

Otra de las diferencias encontradas entre el primer y segundo muestreo fue la proporción de bacterias gram negativas y gram positivas en cada uno de ellos. En el primer muestreo la mayor proporción fue de bacterias gram negativas con 84 % (Figura 16) y en el segundo muestreo se identificó un 72 % de bacterias gram positivas (Figura 28). En el primer muestreo las especies con mayor frecuencia fueron *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterococcus faecium*, *Kosakonia cowanii*, *Enterobacter cloacae* y *Achromobacter mucicolens* (Tabla 7), las cuales, a excepción de *Enterococcus faecium* pertenecen al grupo de bacterias gram negativas. Por otra parte, 13 % (27/210) de los aislados de este muestreo no pudieron identificarse, por lo que se les realizó la técnica de tinción de Gram y los resultados demostraron que en este grupo también preponderaban los gram negativos con un recuento de 25/27 (Anexo I). En el segundo muestreo las especies gram positivas: *Bacillus cereus*, *Peribacillus simplex*, *Bacillus* spp, *Priestia megaterium* y *Lysinibacillus fusiformis* tuvieron los mayores recuentos, a excepción de *Escherichia coli,* que tuvo la segunda frecuencia más alta con 24/181 (Tabla 9). En este muestreo un 9 % (17/181) de los aislados no pudieron identificarse y el 53 % (9/17) de estos resultaron gram positivos después de la tinción de Gram (Anexo II). Estas diferencias también se podrían deber a los efectos de las lluvias, pues

además de provocar el arrastre de los suelos que es el hábitat natural de varias de las bacterias encontradas en este muestreo, también generan un aumento de los caudales que a su vez provocan la resuspensión de las bacterias sedimentadas en el lecho del río, otro ambiente natural para estas bacterias (Mandic-Mulec & Stefanic, 2015).

Los recuentos de *Escherichia coli* en el primer y segundo muestreo fueron bastante similares (Tabla 7 y 9), si tomamos en cuenta que en el segundo muestreo se omitió el uso ampicilina como medio de selección para la mayoría de las muestras, y que la frecuencia de esta especie aislada con este antibiótico fue menor que la registrada en el primer muestreo (Figura 32), inferimos que para esta época el número total de aislados de *E. coli* debió ser aún mayor. Lo que nos sugieren los datos obtenidos para esta especie, es que el río Cuautla está bajo una constante e intensa contaminación por materia fecal. Esto se confirma con los datos de la organización Global Water Watch México, A.C (GWW-México), que entre el 2021 y 2023 evaluó la presencia de bacterias coliformes en tres sitios de la cuenca del río Cuautla, dos de los cuales se encuentran en el cauce del río.

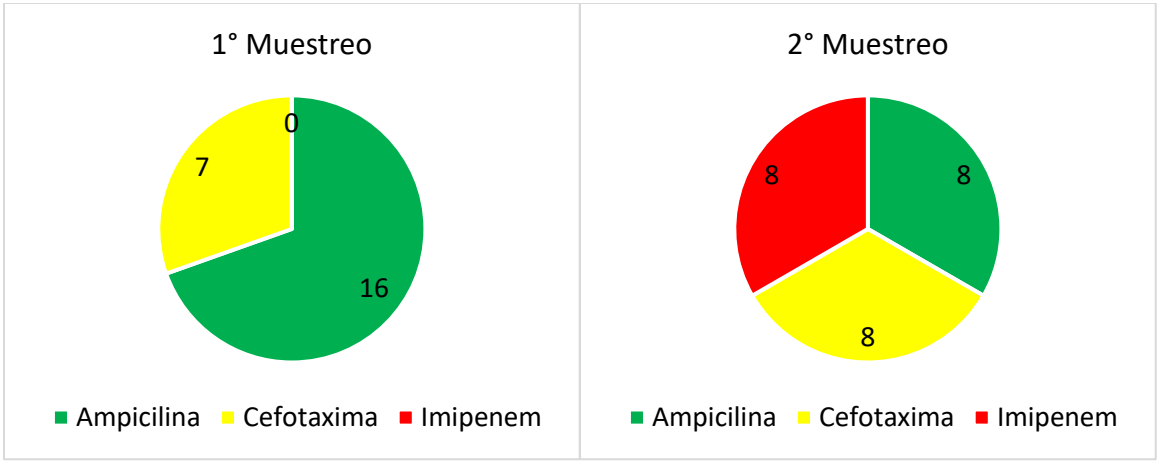


Figura 32. Recuentos de Escherichia coli del primer y segundo muestreo de acuerdo con el antibiótico de selección.

El sitio más al norte monitoreado por la GWW-México corresponde al “Vado de Brisas” y se encuentra a una distancia aproximada de 1.9 km al noreste del “Puente Volcanes de Cuautla” monitoreado en este estudio. El otro sitio sobre el cauce del río es el denominado “Puente San Pedro Apatlaco”, sus coordenadas lo ubican a escasos metros de la Presa el Socavón, por lo que coincidiría geográficamente con el sitio muestreado en nuestra investigación. En el sitio “Vado de Brisas” la GWW-México reportó cifras de *E. coli* que oscilaron en torno de las 100,000 UFC/100 ml, con una mínima en julio de 2022 con 59,200 UFC/100 ml y una máxima en octubre de 2021 con 245,600 UFC/100 ml, en el caso de los coliformes totales se reportó

una mínima de 86,000 UFC/100 en julio de 2022 y una máxima de 292,193 UFC/100 ml en octubre del mismo año (Figura 33). En el sitio “Puente San Pedro Apatlaco” se muestran datos más variables, las cifra más baja de *E. coli* se reportó en enero de 2022 con 1,200 UFC/100 ml y la máxima en diciembre del mismo año con 200,266 UFC/100 ml, en el caso de los coliformes totales la mínima fue de 4,933 UFC/100 ml en enero de 2022 y la máxima de 328,400 UFC/100 ml en octubre del mismo año (Figura 34). Lo anterior se basa en los datos del sitio web de la organización, que además muestran que en todos los registros de ambos sitios se rebasó la cifra de 600 UFC/100 ml (línea roja horizontal) que la organización maneja como límite de alto riesgo de contraer enfermedades por contacto (GWW-México, 2025).

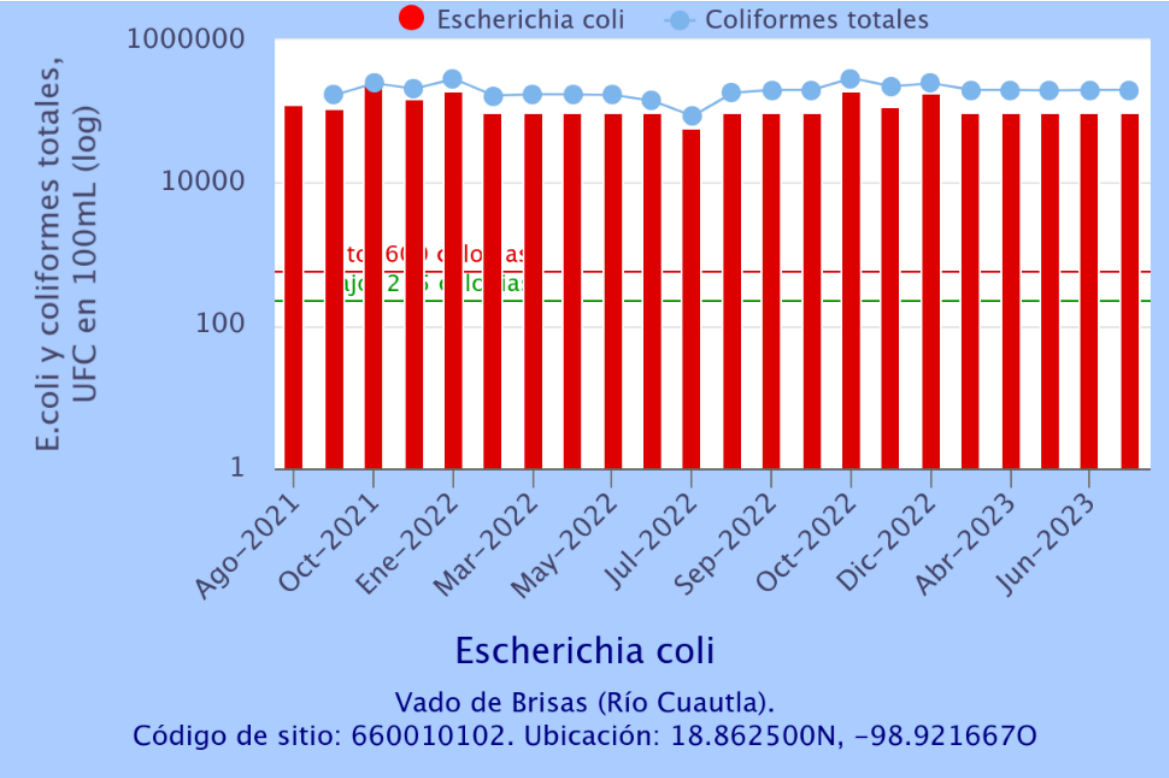


Figura 33. Monitoreos de bacterias en el “Vado de Brisas” efectuados por la GWW-México.

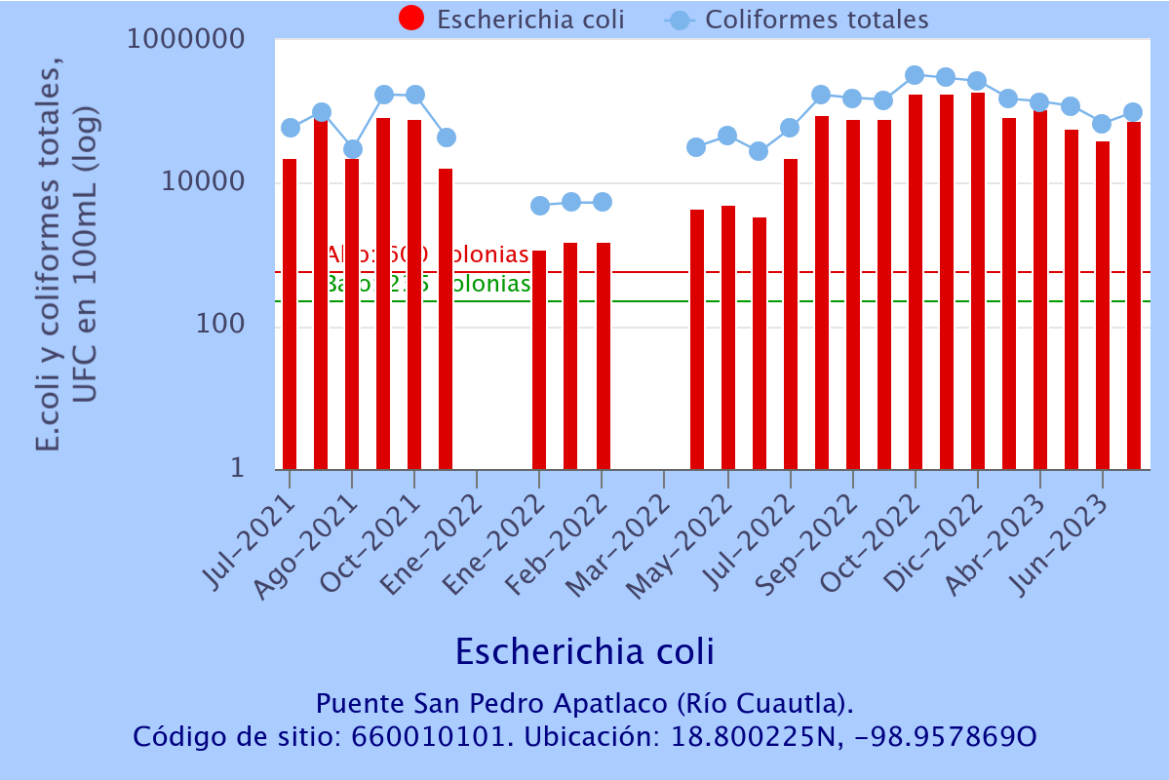


Figura 34. Monitoreos de bacterias en el "Puente San Pedro Apatlaco" efectuados por la GWW-México.

Otra institución que ha medido parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en el río Cuautla es la CONAGUA a través de la Red Nacional de Medición de Calidad del Agua (RENAMECA), que desde el 2012 lleva a cabo el monitoreo sistemático y permanente de la calidad del agua de los principales cuerpos de agua del país. En la siguiente tabla se integran los últimos dos años de datos microbiológicos del río Cuautla extraídos de los resultados de la RENAMECA, la ubicación de los sitios monitoreados se describe en el mapa del Anexo III. La tabla proporciona cifras de coliformes fecales (COLI_FEC), coliformes totales (COLI_TOT) y *Escherichia coli* (E_COLI); todas medidas en NMP/100 ml. La GWW-México y la RENAMECA coinciden en un sitio de muestreo, el cual es denominado "Vado de Brisas" en la primera y "VADO BRISAS" en la segunda, además, el sitio registrado como "RIO CUAUTLA–YECAPIXTLA" se encuentra a solo unos metros de los dos anteriores. Por otra parte, los sitios "SAN PEDRO APATLACO" y "RIO CUAUTLA ARRIBA PTAR CUAUTLA" también comparten ubicación y se encuentran a escasos 200 m del sitio "Puente San Pedro Apatlaco" de la GWW-México. Los datos que proporciona la RENAMECA son más inconsistentes que los de GWW-México, tenemos por ejemplo las cifras más bajas reportadas de *E. coli* en julio de 2022 en los sitios de VADO BRISAS y SAN PEDRO APATLACO ambos por debajo del límite de detección <1. En cambio, la GWW-México reporta 59,200 UFC/100 ml de *E. coli* para el mismo mes en el Vado de Brisas y en el Puente San Pedro Apatlaco una cifra de 22,400 UFC/100 ml (CONAGUA, 2025; GWW-México, 2025).

Tabla 12. Datos microbiológicos del río Cuautla 2022 y 2023 (CONAGUA, 2025).

NOMBRE DEL SITIO	FECHA REALIZACIÓN	COLI_FEC	COLI_TOT	E_COLI
SAN PEDRO APATLACO	17/05/2023	6400		3900
VADO BRISAS	17/05/2023	750000		200000
RIO CUAUTLA - CHINAMECA	19/04/2023	46000	110000	12000
RIO CUAUTLA - SAN VICENTE	19/04/2023	230000	750000	90000
RIO CUAUTLA-TLAQUITENANGO	19/04/2023	4600	11000	750
SAN PEDRO APATLACO	15/03/2023	2600000	7800000	
VADO BRISAS	15/03/2023	2000000	6500000	
RIO CUAUTLA - AYALA	01/03/2023	15531		4611
RIO CUAUTLA-PAPAYOS	01/03/2023	17329		4884
RIO CUAUTLA - YECAPIXTLA	28/02/2023	12000000		
RIO CUAUTLA-TLAQUITENANGO	08/11/2022	460000		150000
RIO CUAUTLA - YECAPIXTLA	25/10/2022	93000		93000
RIO CUAUTLA - CHINAMECA	24/10/2022	39000000000		39000000000
RIO CUAUTLA - AYALA	24/10/2022	24000000000		24000000000
RIO CUAUTLA - SAN VICENTE	24/10/2022	23000000000		23000000000
RIO CUAUTLA ABAJO PTAR CUAUTLA	24/10/2022	9000000000		9000000000
RIO CUAUTLA ARRIBA PTAR CUAUTLA	24/10/2022	23000000000		23000000000
RIO CUAUTLA-PAPAYOS	24/10/2022	9300		9300
SAN PEDRO APATLACO	06/07/2022		12	<1
VADO BRISAS	06/07/2022		<3	<1
RIO CUAUTLA ABAJO PTAR CUAUTLA	06/06/2022	≥2400000000000		
RIO CUAUTLA ARRIBA PTAR CUAUTLA	06/06/2022	750000		
SAN PEDRO APATLACO	09/03/2022		>241960	198630
VADO BRISAS	09/03/2022		>241960	1970
RIO CUAUTLA - YECAPIXTLA	14/02/2022		24196	6910
RIO CUAUTLA ARRIBA PTAR CUAUTLA	14/02/2022		12996	935
RIO CUAUTLA - AYALA	09/02/2022		560000	230000
RIO CUAUTLA ABAJO PTAR CUAUTLA	09/02/2022		560000	80000
RIO CUAUTLA-PAPAYOS	09/02/2022		520000	360000
RIO CUAUTLA - CHINAMECA	08/02/2022	900	24000	
RIO CUAUTLA - SAN VICENTE	08/02/2022	400	1500	
RIO CUAUTLA-TLAQUITENANGO	08/02/2022	400	2100	

Aunque los datos que proporcionan las dos instituciones anteriores no sean totalmente comparables entre sí, pues un NMP proporciona una estimación de la cantidad de microorganismos presentes y las UFC dan una cifra más precisa del número de microorganismos viables en una muestra. Ambas refuerzan la evidencia de contaminación por coliformes en el río Cuautla. Con los datos anteriores es difícil definir con certeza si el agua del río es apta para el riego, pues la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-2021 establece los límites de *Escherichia coli*, en 250 y 500 NMP/100 ml para el promedio diario y mensual respectivamente. En el primer caso será el resultado de la media geométrica de los valores que resulten del análisis de cada una de las muestras simples colectadas para conformar la muestra compuesta. El segundo será el resultado del promedio ponderado en función del caudal de los valores en Promedio Diario que resulten del análisis de al menos dos muestras compuestas colectadas en el mismo mes calendario. En un tercer caso se establece un límite de 600 NMP/100 ml como valor instantáneo y se utiliza con motivo de una verificación realizada por la CONAGUA o la PROFEPA del cumplimiento de los parámetros de calidad establecidos en esta norma (SEMARNAT, 2021). Si nos apegamos al tercer límite observamos que a excepción de las muestras de SAN PEDRO APATLACO y VADO BRISAS de julio de 2022 ninguna más fue apta como fuente riego. La antigua norma NOM-001-SEMARNAT-1996 utilizaba como indicador a los coliformes fecales, y establecía como límites para riego agrícola 1,000 y 2,000 NMP por cada 100 ml para el promedio mensual y diario, respectivamente (SEMARNAT, 1997), observamos que la mayoría de las muestras registradas excederían estos límites.

Aunque la abundancia de bacterias resistentes en el agua es clara, la transferencia de estas hacia los suelos y los tejidos de los cultivos no lo es tanto. En el primer muestreo, el 52 % de los aislamientos se hallaron en agua, 25 % en rizósfera y 20 % en raíces. Solo un 3 % se halló en tejidos aéreos como los tallos y frutos (Figura 14). Para el segundo muestreo la transferencia de bacterias fue aún menor, pues el 87 % de aislamientos se identificó en agua, 12 % en rizósfera y 1 % en raíces, no se aislaron bacterias de tejidos aéreos en este muestreo (Figura 26). Esto se puede estar influenciado por la decisión de no utilizar ampicilina como medio de selección para algunas muestras, sin embargo, también se puede deber al efecto que tienen las lluvias en esta temporada, pues reducen la necesidad de riego con el agua del río. Algunos factores que se cree disminuyen la transferencia de bacterias según Cerqueira et al. (2019), son la influencia del microbioma asociado a cada cultivo, que compite y desplaza a los grupos de bacterias ajenas, o las condiciones climáticas como la temperatura, la humedad y la radiación solar, que son factores determinantes para la supervivencia de bacterias en el ecosistema agrícola de acuerdo con Shamsizadeh et al. (2021).

Aun con la baja transferencia de bacterias del agua hacia la rizósfera y cultivos, se lograron aislar 50 bacterias con resistencia provenientes de los tejidos de algunos cultivos, por lo que se consideraron endófitos, 96% (48/50) de ellas corresponden

al primer muestreo y solo 4 % (2/50) al segundo. 86 % (43/50) de estos endófitos se hallaron dentro de raíces y 14 % (7/50) en tallos y frutos (Figura 35 A). Además, 58 % de los mismos se aislaron en ampicilina, seguido de cefotaxima e imipenem (Figura 35 B).

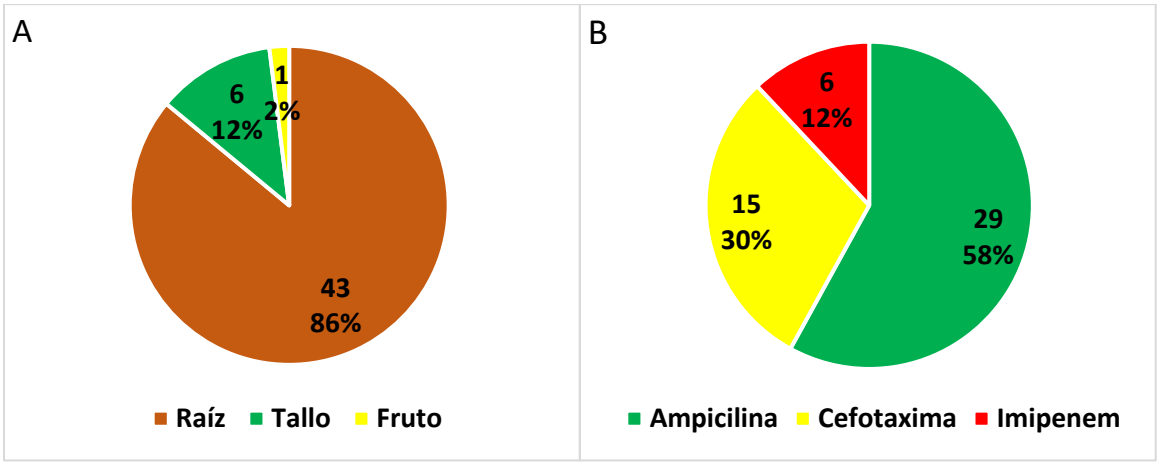


Figura 35. A) Frecuencia y porcentaje de endófitos de acuerdo con el tejido de aislamiento. B) Frecuencia y porcentaje de endófitos de acuerdo con el antibiótico de selección.

Los endófitos con resistencia a los antibióticos solo se encontraron en cultivos de ejote y caña de ambos muestreos. En el primer muestreo los cultivos fueron el 2, 3 y 5 de ejote, y el 4 de caña; y en el segundo muestreo los cultivos 2 y 4 de caña (Anexo IV). Entre los endófitos solo 3 se encontraron en tejidos comestibles: *Brachybacterium paraconglomeratum* y otro no identificado en tallos de caña, y *Agrobacterium larrymoorei* en vaina de ejote. Aunque la caña tiene como propósito primordial la producción de azúcar, también se llega a consumir directamente. Las bacterias anteriores se han descrito como endófitos de otras especies vegetales: *Agrobacterium larrymoorei* se ha descrito como causante de tumores en *Ficus benjamina* y *Brachybacterium paraconglomeratum* se ha encontrado asociada a raíces de *Chlorophytum borivilianum,* sin embargo, este último también se ha reportado como patógeno oportunista humano, lo cual se repite con varios de los endófitos de otros tejidos como *Achromobacter mucicolens, Agrobacterium radiobacter, Delftia tsuruhatensis* y *Kosakonia cowanii* (Barnawal, 2015; Berinson et al., 2020; Bouzar & Jones, 2001; Detrait et al., 2008; Isler et al., 2020; Murata et al., 2020; Ranc et al., 2018).

Además de actuar como patógenos oportunistas, otro de los riesgos que representan los endófitos y las bacterias ambientales, es que pueden actuar como reservorios de genes de resistencia y propagarlos a bacterias de otros entornos ambientales y/o a bacterias patógenas de humanos y otros animales, contribuyendo

a lo que se conoce como “ciclo de las bacterias resistentes”, considerado actualmente como uno de los principales desafíos para la salud pública a nivel mundial. Entre los endófitos encontrados en este ensayo, solo el aislado 1-CU3R-02 presentó uno de los genes de resistencia buscados (SHV), este provenía de la raíz de un cultivo de ejote del primer muestreo.

En total se encontraron 36 aislados con uno o varios genes de resistencia (Tablas 8 y 10), la ubicación geográfica donde fueron hallados se describe en las Figuras 23 y 30. En los mapas podemos notar la mayor concentración de estos genes en los cuerpos de agua cercanos a las poblaciones más grandes de la cuenca, la mayoría se hallaron en *Escherichia coli*, pero también se encontraron en otras especies reportadas frecuentemente como patógenas con altos niveles de resistencia como *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter* spp. (Despotovic et al., 2023). Otras bacterias con genes de resistencia fueron *Chryseobacterium arthrosphaerae* y *Citrobacter braakii* que muy poco se reportan como causantes de infección (Hirai et al., 2016; Im et al., 2020). Como casos particulares encontramos los aislados 1-CU2S-01, 1-CU2S-02 y 1-CU3R-02, los dos primeros hallados en la rizósfera de un cultivo de ejote y el último mencionado anteriormente como endófito de la raíz de otro cultivo de ejote, los tres presentaron el gen de la betalactamasa SHV y además fueron los únicos a los que no se les identificó la especie a la que pertenecen. Asumimos que se tratan de bacterias ambientales, debido al tipo de muestra del que proceden, además de que el equipo MALDI-TOF utilizado tiene limitaciones para identificar este tipo de bacterias, ya que se emplea principalmente para la identificación de bacterias del ámbito clínico. Otra característica observada mediante los resultados de las pruebas de PCR fue la diversidad de patrones de resistencia que presentó *Escherichia coli,* entre sus miembros podemos encontrar todas las combinaciones posibles de los genes de resistencia encontrados: CTX-M, SHV y VIM ya sea por separado, en combinación de dos genes o hasta los tres juntos en un mismo aislado. Como dato adicional ninguna otra especie presentó el gen de resistencia VIM (Tablas 8 y 10).

Las pruebas de nitrocefina para detección de betalactamasas nos revelaron que en el primer muestreo el 77 % de los aislados producían este tipo de enzimas, mientras que en el segundo la cifra bajó a 63 % (Figuras 24 y 31). Sin embargo, el número de genes encontrados es bastante inferior a lo que estiman estos porcentajes, esto nos habla de una gran brecha entre las betalactamasas detectadas y las presentes en las muestras, que a su vez nos habla de la gran diversidad de estas enzimas en la cuenca del río Cuautla. Indirectamente las pruebas de nitrocefina también nos dan evidencia de otros mecanismos de resistencia a los betalactámicos fuera de las betalactamasas, pues el promedio general nos indicó que el 30 % de los aislados no presentaron este tipo de enzimas, la cual es una cifra considerable. Otros mecanismos que confieren resistencia a los betalactámicos son las mutaciones genéticas que provocan alteraciones en las PBPs haciéndolas resistentes a la acción de estos antibióticos. Disminución de la afinidad y la cantidad de las porinas

de la membrana externa de la bacteria, lo que disminuye la permeabilidad de los betalactámicos, o la producción de bombas de eflujo que capturan y expulsan a los antibióticos (King et al., 2014).

Las pruebas de susceptibilidad practicadas mostraron altos niveles de resistencia a ceftazidima, cefotaxima y cefepime, seguido por niveles moderados de resistencia a imipenem y levofloxacino. Entre las bacterias que causan mayor preocupación son aquellas que presentaron resistencia a la ceftazidima o cefotaxima (cefalosporinas de tercera generación) o imipenem (carbapenémico) y que además pertenecen al orden de los Enterobacterales, pues de acuerdo con la última lista de patógenos prioritarios de la OMS se clasifican en la categoría “Prioridad crítica”, por su “carga de morbimortalidad y la necesidad de aplicar intervenciones específicas para hacerles frente” (WHO, 2024). Estas condiciones se cumplen en 66 % (24/36) los aislados evaluados (Tabla 11). La resistencia a cefepime no es de menor importancia, pues a pesar de ser una cefalosporina de cuarta generación tiene prácticamente el mismo nivel de resistencia que las cefalosporinas de la generación anterior. Son de sumo cuidado los aislados que presentaron los mayores niveles de resistencia (CMI) al imipenem, pues en muchos casos los carbapenémicos son considerados la última línea de defensa contra las infecciones causadas por agentes multirresistentes, entre los aislados con estas características destacan el 1-CU4S-10 y 1-CU4S-11, identificados como *Stenotrophomonas maltophilia*, un patógeno oportunista que ha ganado relevancia en la última década por sus niveles crecientes de resistencia (Álvarez-Moreno et al., 2023; Aurilio et al., 2022; Hansen, 2021; Mojica et al., 2022). Otros fármacos ajenos a los betalactamicos incluidos en las pruebas de susceptibilidad fueron la amikacina, del grupo de los aminoglucósidos y el levofloxacino, del grupo de las quinolonas. Estos presentaron niveles de resistencia bajo y moderado respectivamente lo que sugiere que la amikacina aún posee un buen nivel de efectividad. Sin embargo, entre los aislamientos que presentaron resistencia a este antibiótico encontramos tres que resultaron resistentes a todos los demas ensayados, dos pertenecen a *E. coli* y otro más sin identificar mencionado en párrafos anteriores (Tabla 11).

En las últimas décadas la investigación sobre la resistencia bacteriana ha evolucionado para pasar de un enfoque predominantemente clínico a uno en el que se integran estudios sobre este ámbito en entornos agrícolas, pecuarios y ambientales, ya que se ha demostrado que la salud de los animales, las personas y los ecosistemas están estrechamente relacionadas. En este estudio hemos observado la presencia de bacterias de origen antropogénico, endófitas y ambientales con resistencia a antibioticos betalactámicos entre las diversas muestras colectadas en la cuenca río Cuautla. Observamos tambien el impacto de la actividad humana reflejado en una alta concentracion de bacterias resistentes en cuerpos de agua cercanos a las poblaciones más grandes, las cuales presentaron diversos patrones de genes y perfiles de resistencia, que dan evidencia de la dinámica que representa la resistencia antimicrobiana. Sin embargo, quedan ciertas

incógnitas acerca de la misma, como el fenomeno por el cual las bacterias resistentes no prevalecen en los tejidos aéreos de los cultivos o la identidad de muchas bacterias aisladas, entre las cuales causan mayor interés aquellas que poseen genes de resistencia.

CONCLUSIONES

Se confirmó la presencia de bacterias con resistencia a antibióticos betalactámicos en el caudal del río Cuautla, y en la rizósfera y tejidos de cultivos que utilizan las aguas de este afluente para su irrigación.

Se encontraron bacterias portadoras de genes de resistencia de las familias de betalactamasas CTX-M, SHV y VIM en muestras de agua, rizósfera y raíces.

Se encontró una alta tasa de bacterias productoras de betalactamasas.

Se aislaron bacterias de importancia hospitalaria de prioridad crítica, de acuerdo con la última lista de patógenos prioritarios de la OMS.

PERSPECTIVAS

La alta prevalencia de bacterias resistentes en las aguas que se destinan al riego agrícola confirma el grave problema de contaminación por aguas residuales, aunque estas bacterias no persistan en tejidos comestibles, los mecanismos por los cuales se da este fenómeno merecen ser analizados más a fondo.

La presencia de bacterias multirresistentes con variadas combinaciones de genes de resistencia en el río Cuautla supone un riesgo para la salud de los habitantes y para los ambientes de la cuenca, resulta necesario definir sus puntos origen para establecer medidas que prevengan su diseminación.

Aplicar técnicas de epidemiologia molecular como la MLST a las bacterias que presentaron genes de resistencia nos permitiría conocer su evolución y hacer un seguimiento a su diseminación para definir el origen geográfico y temporal de cada una, sobre todo para aquellas que no se lograron identificar.

El alto porcentaje de bacterias productoras de betalactamasas encontrado nos muestra la enorme diversidad que existe de estas enzimas en la cuenca del río Cuautla. Aquellas que no las presentaron, revelan la presencia de otros mecanismos de resistencia a betalactámicos ajenos a este grupo de enzimas, los cuales podrían jugar un papel importante dentro de la RAM en la cuenca, lo cual merece ser estudiado más a fondo.

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez-Moreno, C. A., Guevara, F. O., Ferrer, L. E., Valderrama, S. L., Cortés, J. A., Osorio Lombana, J. P., & Saavedra Rojas, S. Y. (2023). Consenso de expertos para el tratamiento antimicrobiano de las infecciones causadas por bacilos gram negativos multirresistentesen pacientes adultos. *Infectio, 27(2)*, 102-113.

Amato, M., Dasí, D., González, A., Ferrús, M. A., & Castillo, M. Á. (2021). Occurrence of antibiotic resistant bacteria and resistance genes in agricultural irrigation waters from Valencia city (Spain). *Agricultural Water Management, 256, 107097.*

Asamblea Mundial de la Salud, 5. (1998). *Enfermedades emergentes y otras enfermedades transmisibles: resistencia a los antimicrobianos.* Organización Mundial de la Salud.

Aurilio, C., Sansone, P., Barbarisi, M., Pota, V., Giaccari, L. G., Coppolino, F., . . . Pace, M. C. (2022). Mechanisms of Action of Carbapenem Resistance. *Antibiotics, 11(3),*.

Ballesteros-Nova, N., Sánchez, S., Steffani, J., Sierra, L., Chen, Z., Ruíz-López, F., . . . Delgado-Suárez, E. (2022). Genomic Epidemiology of *Salmonella enterica* Circulating in Surface Waters Used in Agriculture and Aquaculture in Central Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*.

Barnawal, D. B. (2015). ACC-Deaminase-Producing Endophyte *Brachybacterium paraconglomeratum* Strain SMR20 Ameliorates Chlorophytum Salinity Stress via Altering Phytohormone Generation. *Journal of Plant Growth Regulation* , 553–564.

Berinson, B., Bellon, E., Christner, M., Both, A., Aepfelbacher, M., & Rohde, H. (2020). Identification of *Kosakonia cowanii* as a rare cause of acute cholecystitis: case report and review of the literature. *BMC Infectious Diseases*.

Bouzar, H., & Jones, J. (2001). *Agrobacterium larrymoorei sp*. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology, 51(Pt 3)*, 1023–1026.

Buckley, R., Clough, E., Warnken, W., & Wild, C. (1998). Coliform bacteria in streambed sediments in a subtropical rainforest conservation reserve. *Water research, 32(6)*, 1852-1856.

Bush, K. (2018). Past and Present Perspectives on β-Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(10), e01076-18.

Cárdenas-Perea, M. E., Cruz y López, O. R., Gándara-Ramírez, J. L., & Pérez-Hernández, M. A. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. *Elementos*, 35-43.

CEAGUA. (2014). *Programa Estatal Hídrico de Morelos 2014 - 2018.* Cuernavaca, Morelos: Comisión Estatal del Agua.

CEAGUA. (2017). *Estadisticas del Agua en el Estado de Morelos, 2017.* Cuernavaca, Morelos: Comisión Estatal del Agua.

Cerqueira, F., Matamorosa, V., Bayonaa, J., Elsingab, G., & Hornstrab, L. M. (2019). Distribution of antibiotic resistance genes in soils and crops. A field study in legume plants (*Vicia faba* L.) grown under different watering regimes. *Environmental Research*, 16-25.

Cisneros-Estrada, O. X., & Saucedo-Rojas, H. (2016). *Reúso de aguas residuales en la agricultura.* Jiutepec, Mor.: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.

CLSI. (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI Document M07-A9, Vol. 32, No. 2,.* Wayne: Clinical and Laboratory Standards.

CLSI. (2022). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-Ed32.* Wayne: Clinical Laboratory Standards.

CONAGUA. (2010). *Programa Hídrico Visión 2030 del Estado de Morelos.* México, D.F.: Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales.

CONAGUA. (2021). *PROGRAMA HÍDRICO REGIONAL 2021-2024 REGIÓN HIDROLÓGICO ADMINISTRATIVA IV BALSAS.* Ciudad de México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

CONAGUA. (2023). *Inventario Nacional de Plantas Municipales de Potabilización y de Tratamiento de Aguas Residuales en Operación, Diciembre 2023.* Ciudad de México: Comisión Nacional del Agua.

CONAGUA. (2024). *Estadísticas del Agua en México 2023.* Ciudad de México: Comisión Nacional del Agua.

CONAGUA. (2024). *Situación del Subsector Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento, edición 2024.* Ciudad de México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

CONAGUA. (1 de Marzo de 2025). *Resultados de la Red Nacional de Medición de Calidad del Agua (RENAMECA).* Obtenido de https://www.gob.mx/conagua/articulos/resultados-de-la-red-nacional-de-medicion-de-calidad-del-agua-renameca?idiom=es

Contreras, J., R, M., C, S., S, R.-D., YA, L.-V., G, C.-R., . . . JNS, E. (2017). Health risks from exposure to untreated wastewater used for irrigation in the Mezquital Valley, Mexico: A 25-year update. *Water Research*, 434-850.

Cué-Brugueras, M., & Morejón-García, M. (1998). Antibacterianos de acción sistémica: Parte I. Antibióticos betalactámicos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 347-361.

Daza-Pérez, R. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 57-67.

Despotovic, M., Nies, L. D., Busi, S. B., & Wilmes, P. (2023). Reservoirs of antimicrobial resistance in the context of One Health. *Current Opinion in Microbiology*.

Detrait, M., D'Hondt, L., André, M., Lonchay, C., Holemans, X., Maton, J., & Canon, J. (2008). Agrobacterium radiobacter bacteremia in oncologic and geriatric patients: presentation of two cases and review of the literature. *International Journal of Infectious Diseases*, e7-e10.

Eguía-Lis, P. A., Izurieta, J., Miganjos-Carro, M., & González-Villela, R. (2014). *Indicadores de Integridad Ecológica y Salud Ambiental para las cuencas de los ríos Yautepec y Cuautla, Morelos. 1. a Etapa. Informe Final.* IMTA.

Elsa Guzmán-Gómez, A. L.-L. (2014). Peculiaridades campesinas del Morelos rural. *Economía, sociedad y territorio*, 175-200.

Epidemiología, D. G. (2022). *PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES ASOCIADAS A LA ATENCIÓN DE LA SALUD.* MÉXICO: Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud.

Errecalde, J. O. (2004). *Uso de antimicrobianos en animales de consumo: Incidencia del desarrollo de resistencias en la salud pública.* Roma: FAO.

Feng, P., Weagant, S. D., Grant, M. A., & Burkhardt, W. (2002). Bacteriological analytical manual chapter 4: enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. *US Food and Drug Administration*.

García-Cabrera, J. (1991). Evaluacion de la calidad de agua de los rios Apatlaco, Yautepec y Cuautla, estado de Morelos, utilizando indicadores biologicos de contaminacion. México, D.F.: Facultad de Ciencias, UNAM.

Gutiérrez-Ávalos, C., Sánchez-Aguilar, G., & Viqueira-Palerm, J. (2010). *Gestión técnica y social del uso del agua en Morelos: caso del Río Cuautla.* Chapingo: Universidad Autónoma Chapingo.

GWW-México. (28 de Febrero de 2025). *Global Water Watch - México*. Obtenido de Sistema de datos en línea: http://gww-mexico.org/

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

Hirai, J., Uechi, K., Hagihara, M., Sakanashi, D., Kinjo, T., Haranaga, S., & Fujita, J. (2016). Bacteremia due to *Citrobacter braakii*: A case report and literature review. *Journal of Infection and Chemotherapy,*, 819-821.

Im, J. H., Kim, D., Kim, J. J., Kim, E. Y., Park, Y. K., Kwon, H. Y., . . . Lee, J.-S. M. (2020). *Chryseobacterium arthrosphaerae* ventriculitis: A case report. *Medicine (Baltimore)*.

INEGI. (2021). *Aspectos Geográficos Morelos.* Aguascalientes, Aguascalientes: Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

INEGI. (2021). *Marco Geoestadístico. Población y Vivienda 2020.* Ciudad de México: INEGI.

Isler, B., Kidd, T. J., Stewart, A. G., Harris, P., & Paterson, D. L. (2020). *Achromobacter* infections and treatment options. *Antimicrobial agents and chemotherapy, 64(11), 10-1128.*

King, D. T., Sobhanifar, S., & Strynadka, N. C. (2014). The Mechanisms of Resistance to β-Lactam Antibiotics. *Handbook of Antimicrobial Resistance*.

Magaña-Lizárraga, J., Gómez-Gil, B., Rendón-Maldonado, J., Delgado-Vargas, F., Vega-López, I., & Báez-Flores, M. (2022). Genomic Profiling of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Surface Water of Agricultural Drainage in North-Western Mexico: Detection of the International High-Risk Lineages ST410 and ST617. *Microorganisms*.

Mancilla-Villa, O. R., Gómez-Villaseñor, L., Olguín-Lopez, J. L., Guevara-Gutiérrez, R. D., Hernández-Vargas, O., Ortega-Escobar, H. M., . . . Cruz-Crespo, E. (2022). Contaminación orgánica por coliformes, Nitrógeno y Fósforo en los ecosistemas acuáticos de la cuenca Ayuquila-Armería, Jalisco, México. *Biotecnia, 24(1)*, 5-14.

Mandic-Mulec, I., & Stefanic, P. &. (2015). Ecology of *Bacillaceae*. *Microbiology spectrum. 3. 10.1128*.

Mendoza-Retana, S. S., Cervantes-Vázquez, M. G., Valenzuela-Garcia, A. A., Guzmán-Silos, T. L., Orona-Castillo, I., & Cervantes-Vázquez, T. J. (2021). Uso potencial de las aguas residuales en la agricultura. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 115-126.

Mojica, M. F., Humphries, R., Lipuma, J. J., Mathers, A. J., Rao, G. G., Shelburne, S. A., . . . Bonomo, R. A. (2022). Clinical challenges treating

Stenotrophomonas maltophilia infections: an update. *JAC-Antimicrobial Resistance, Volume 4, Issue 3,*.

Molina-López, J., Manjarrez-Hernández, H. A., & Cravioto-Quintana, A. (1998). Patogenicidad bacteriana. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 89-128.

Murata, K., Ozawa, K., Kawakami, H., Mochizuki, K., & Ohkusu, K. (2020). *Brachybacterium paraconglomeratum* endophthalmitis postcataract operation. *Case reports in ophthalmological medicine*, 1513069.

Murray, P. R., Rosenthal, K., Kobayashi, G., & Pfaller, M. (2002). *Microbiología Médica 4ta. Edición.* Madrid, España.: Editorial Mosby.

OMS. (2001). *Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos.* Ginebra, Suiza: Organización Mundial de la Salud.

OMS. (2016). *Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos.* Ginebra: Organización Mundial de la Salud.

Pérez-Gracia, M. T. (2021). La pandemia silenciosa: resistencia bacteriana a los antibióticos. [Inauguración Curso Académico 2021-2022]. Retrieved from: http://hdl.handle.net/10637/13083.

Pérez-Guerrero, P., Galán-Sánchez, F., Gutiérrez-Saborido, D., & Guerrero-Lozano, I. (2014). Infecciones por enterobacterias. *Medicine: Programa de Formación Médica Continuada Acreditado, 11(55)*, 3276-3282.

Pírez, M., & Mota, M. (2006). Morfología y estructura bacteriana. En *Temas de bacteriología y virología médica* (págs. 23-42).

Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*.

Ramírez-Rojas, S., Osuna-Canizalez, F. d., García-Pérez, F., Canul-Ku, J., & Palacios-Talavera, A. (2016). Identificación molecular de bacterias asociadas a plantas ornamentales producidas in vitro. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 173-183.

Ranc, A., Dubourg, G., Fournier, P. E., Raoult, D., & Fenollar, F. (2018). *Delftia tsuruhatensis*, an emergent opportunistic healthcare-associated pathogen. *Emerging infectious diseases, 24(3)*, 594.

Romero, S. P., Gómez, M. Z., Rodríguez, M. M., & Pedral, M. R. (2011). Presencia de β-lactamasas de espectro extendido en enterobacterias aisladas de casos de infección nosocomial. *CIENCIA ergo-sum*, 164-170.

Salcedo-Baca, I., Palerm-Viqueira, J., Martínez-Saldaña, T., & Escobedo-Castillo, J. F. (2002). La organización social de los regantes del río Cuautla, canal general de las Iguanas, en el estado de Morelos. *Comunicaciones En Socioeconomía, Estadística E Informática*, 93-121.

SEDAGRO. (2019). *Programa Sectorial Agropecuario y Acuícola 2019-2024.* Cuernavaca, Morelos.: Secretaría de Desarrollo Agropecuario.

SEDAGRO. (2024). *Boletín 00279.* Cuernavaca, Morelos.: Secretatía de Desarrollo Agropecuario,.

SEMARNAT. (1997). NOM-001-SEMARNAT-1996. *Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales*. México.

SEMARNAT. (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.* México.

Shamsizadeh, Z., Ehrampoush, M. H., Nikaeen, M., Mohammadi, F., Mokhtari, M., Gwenzi, W., & & Khanahmad, H. (2021). Antibiotic resistance and class 1 integron genes distribution in irrigation water-soil-crop continuum as a function of irrigation water sourc. *Environmental Pollution, 289, 117930.*

SIAP. (2024). *Panorama Agroalimentario 2024.* Ciudad de México: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.

SIAP. (7 de 02 de 2025). *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola*. Obtenido de https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/

Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 116-129.

WHO. (2017). *GLOBAL PRIORITY LIST OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA TO GUIDE RESEARCH, DISCOVERY, AND DEVELOPMENT OF NEW ANTIBIOTICS.* Ginebra: World Health Organization.

WHO. (2024). *Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide.* Geneve: World Health Organization.

ANEXOS

Anexo I: Lista de aislados del primer muestreo

ID	Especie	Gram	Nitrocefina o Gen	Antibiótico	Muestra
1-AA-01	*Chryseobacterium aquifrigidense*	-	+	AMP	Agua
1-CA1-01	*Kosakonia cowanii*	-	+	AMP	Agua
1-CA1-02	*Escherichia coli*	-	+	AMP	Agua
1-CA1-03	*Stenotrophomonas maltophilia*	-	+	CTX	Agua
1-CA1-04	*Escherichia coli*	-	CTX-M	CTX	Agua
1-CA1-06	*Citrobacter freundii*	-	+	AMP	Agua
1-CA1-07	*No fue posible identificar*	-	-	AMP	Agua
1-CA2-01	*Proteus mirabilis*	-	+	AMP	Agua
1-CA2-02	*Kosakonia cowanii*	-	+	CTX	Agua
1-CA2-03	*No fue posible identificar*	-	+	AMP	Agua
1-CA2-04	*Enterococcus faecium*	+	+	IMP	Agua
1-CA2-05	*Pseudomonas aeruginosa*	-	+	IMP	Agua
1-CA2-06	*Enterobacter cloacae*	-	+	AMP	Agua
1-CA2-07	*Cronobacter sp.*	-	+	AMP	Agua
1-CA2-08	*Escherichia coli*	-	+	AMP	Agua
1-CA2-09	*Escherichia coli*	-	CTX-M	AMP	Agua
1-CA2-10	*Escherichia coli*	-	CTX-M	AMP	Agua
1-CA2-11	*Escherichia coli*	-	+	AMP	Agua
1-CA2-12	*Escherichia coli*	-	CTX-M	AMP	Agua
1-CU1S-01	*Bacillus sp.*	+	+	AMP	Suelo
1-CU1S-02	*Enterobacter hormaechei*	-	+	AMP	Suelo
1-CU1S-03	*Stenotrophomonas maltophilia*	-	-	AMP	Suelo
1-CU1S-04	*Chryseobacterium aquifrigidense*	-	+	AMP	Suelo
1-CU1S-05	*Peribacillus simplex*	+	+	CTX	Suelo
1-CU1S-06	*Achromobacter mucicolens*	-	+	CTX	Suelo
1-CU1S-08	*Sphingobacterium thalpophilum*	-	-	IMP	Suelo
1-CU1S-10	*Chryseobacterium aquifrigidense*	-	+	IMP	Suelo
1-CU1S-11	*Alcaligenes faecalis*	-	+	AMP	Suelo
1-CU1S-12	*Enterobacter hormaechei*	-	+	AMP	Suelo
1-CU1S-13	*Achromobacter insolitus*	-	-	CTX	Suelo
1-CU2F-01	*Agrobacterium larrymoorei*	-	-	AMP	Fruto
1-CU2R-01	*Achromobacter mucicolens*	-	+	AMP	Raíz
1-CU2R-02	*Pseudomonas monteilli*	-	+	AMP	Raíz
1-CU2R-03	*Kosakonia cowanii*	-	-	AMP	Raíz
1-CU2R-04	*Stenotrophomonas maltophilia*	-	+	CTX	Raíz
1-CU2R-05	*Pseudomonas chlororaphis*	-	+	CTX	Raíz

1-CU2R-06	*Sphingobacterium thalpophilum*	-	-	IMP	Raíz
1-CU2R-07	*Pseudomonas fluorescens*	-	+	AMP	Raíz
1-CU2R-08	*Kosakonia cowanii*	-	-	AMP	Raíz
1-CU2R-09	*Kosakonia cowanii*	-	-	AMP	Raíz
1-CU2R-10	*Kosakonia cowanii*	-	-	AMP	Raíz
1-CU2R-11	*Pseudomonas monteilli*	-	+	CTX	Raíz
1-CU2R-12	*Pseudomonas fluorescens*	-	+	IMP	Raíz
1-CU2S-01	*No fue posible identificar*	-	SHV	AMP	Suelo
1-CU2S-02	*No fue posible identificar*	-	SHV	AMP	Suelo
1-CU2S-04	*Stenotrophomonas maltophilia*	-	+	IMP	Suelo
1-CU2S-05	*Achromobacter spanius*	-	+	IMP	Suelo
1-CU2T-01	*Stenotrophomonas maltophilia*	-	+	AMP	Tallo
1-CU2T-02	*Staphylococcus haemolyticus*	+	-	AMP	Tallo
1-CU2T-03	*Staphylococcus capitis*	+	-	AMP	Tallo
1-CU3R-01	*Pseudomonas putida*	-	+	AMP	Raíz
1-CU3R-02	*No fue posible identificar*	-	SHV	AMP	Raíz
1-CU3R-03	*Agrobacterium radiobacter*	-	+	AMP	Raíz
1-CU3R-04	*Delftia tsuruhatensis*	-	+	AMP	Raíz
1-CU3R-05	*No fue posible identificar*	-	-	CTX	Raíz
1-CU3R-06	*No fue posible identificar*	-	+	CTX	Raíz
1-CU3R-07	*Achromobacter mucicolens*	-	+	CTX	Raíz
1-CU3R-09	*Achromobacter mucicolens*	-	+	IMP	Raíz
1-CU3R-10	*Kosakonia cowanii*	-	+	AMP	Raíz
1-CU3R-11	*No fue posible identificar*	-	+	AMP	Raíz
1-CU3R-12	*Pseudomonas putida*	-	+	AMP	Raíz
1-CU3S-01	*Bacillus cereus*	+	+	CTX	Suelo
1-CU3S-02	*No fue posible identificar*	-	+	CTX	Suelo
1-CU3S-03	*Stenotrophomonas maltophilia*	-	+	CTX	Suelo
1-CU3S-04	*No fue posible identificar*	-	+	CTX	Suelo
1-CU3S-05	*No fue posible identificar*	-	+	IMP	Suelo
1-CU3S-06	*Stenotrophomonas maltophilia*	-	+	IMP	Suelo
1-CU3S-07	*No fue posible identificar*	-	+	AMP	Suelo
1-CU3S-08	*Enterobacter cloacae*	-	+	AMP	Suelo
1-CU3S-09	*Klebsiella oxytoca*	-	+	AMP	Suelo
1-CU3S-10	*Achromobacter spanius*	-	-	CTX	Suelo
1-CU3S-11	*Achromobacter mucicolens*	-	+	IMP	Suelo
1-CU3S-12	*Stenotrophomonas maltophilia*	-	+	IMP	Suelo
1-CU3S-13	*Stenotrophomonas maltophilia*	-	+	IMP	Suelo
1-CU4R-01	*Enterobacter cloacae*	-	+	AMP	Raíz

1-CU4R-03	*No fue posible identificar*	-	-	CTX	Raíz
1-CU4R-04	*No fue posible identificar*	-	+	CTX	Raíz
1-CU4R-05	*Enterobacter bugandensis*	-	-	AMP	Raíz
1-CU4R-06	*Pantoea ananatis*	-	+	AMP	Raíz
1-CU4R-07	*Enterobacter bugandensis*	-	+	AMP	Raíz
1-CU4R-08	*Enterobacter cloacae*	-	+	AMP	Raíz
1-CU4R-09	*Achromobacter mucicolens*	-	-	CTX	Raíz
1-CU4S-01	*Serratia marcescens*	-	+	AMP	Suelo
1-CU4S-02	*Citrobacter farmeri*	-	+	AMP	Suelo
1-CU4S-03	*No fue posible identificar*	-	-	CTX	Suelo
1-CU4S-04	*Enterobacter cloacae*	-	+	IMP	Suelo
1-CU4S-05	*Citrobacter amanolaticus*	-	+	AMP	Suelo
1-CU4S-06	*Klebsiella pneumoniae*	-	+	AMP	Suelo
1-CU4S-07	*Escherichia coli*	-	+	AMP	Suelo
1-CU4S-08	*Achromobacter mucicolens*	-	-	AMP	Suelo
1-CU4S-09	*Achromobacter xylosoxidans*	-	-	CTX	Suelo
1-CU4S-10	*Stenotrophomonas maltophilia*	-	CTX-M	IMP	Suelo
1-CU4S-11	*Stenotrophomonas maltophilia*	-	CTX-M	IMP	Suelo
1-CU4T-01	*Brachybacterium paraconglomeratum*	+	+	AMP	Tallo
1-CU4T-02	*No fue posible identificar*	-	+	CTX	Tallo
1-CU5R-01	*Pseudomonas chlororaphis*	-	+	AMP	Raíz
1-CU5R-02	*Agrobacterium radiobacter*	-	+	AMP	Raíz
1-CU5R-03	*Pseudomonas straminea*	-	+	AMP	Raíz
1-CU5R-04	*Stenotrophomonas maltophilia*	-	+	CTX	Raíz
1-CU5R-05	*No fue posible identificar*	-	+	CTX	Raíz
1-CU5R-06	*No fue posible identificar*	-	+	IMP	Raíz
1-CU5R-07	*Stenotrophomonas maltophilia*	-	+	IMP	Raíz
1-CU5R-08	*Enterobacter cloacae*	-	+	AMP	Raíz
1-CU5R-09	*Kosakonia cowanii*	-	-	AMP	Raíz
1-CU5R-10	*Achromobacter mucicolens*	-	+	CTX	Raíz
1-CU5S-01	*Priestia negaterium*	+	+	AMP	Suelo
1-CU5S-02	*Enterobacter hormaechei*	-	+	AMP	Suelo
1-CU5S-03	*Agrobacterium radiobacter*	-	+	AMP	Suelo
1-CU5S-04	*No fue posible identificar*	-	+	CTX	Suelo
1-CU5S-05	*No fue posible identificar*	-	+	CTX	Suelo
1-CU5S-06	*No fue posible identificar*	-	+	IMP	Suelo
1-CU5S-07	*Stenotrophomonas maltophilia*	-	+	IMP	Suelo
1-CU5S-08	*No fue posible identificar*	-	+	IMP	Suelo
1-CU5S-09	*Enterobacter cloacae*	-	+	AMP	Suelo

1-CU5S-10	*Kosakonia cowanii*	-	+	AMP	Suelo
1-CU5S-11	*Enterobacter cloacae*	-	+	AMP	Suelo
1-CU5T-01	*Enterobacter hormaechei*	-	-	IMP	Tallo
1-CU6S-01	*Lelliottia amnigena*	-	+	AMP	Suelo
1-CU6S-02	*Citrobacter freundii*	-	+	AMP	Suelo
1-CU6S-03	*Citrobacter freundii*	-	+	AMP	Suelo
1-PR1-01	*Pantoea anthophila*	-	+	AMP	Agua
1-PR1-02	*Klebsiella oxytoca*	-	+	AMP	Agua
1-PR1-03	*Microbacterium neimengense*	+	+	AMP	Agua
1-PR1-04	*Bacillus sp.*	+	+	CTX	Agua
1-PR1-05	*Pseudomonas putida*	-	+	CTX	Agua
1-PR1-06	*Pseudomonas putida*	-	-	CTX	Agua
1-PR1-07	*Pantoea sp.*	-	+	IMP	Agua
1-PR1-08	*Pseudomonas chlororaphis*	-	+	IMP	Agua
1-PR1-09	*Kosakonia cowanii*	-	-	AMP	Agua
1-PR1-10	*Pseudoescherichia vulneris*	-	-	AMP	Agua
1-PR1-11	*Kluyvera ascorbata*	-	+	AMP	Agua
1-PR1-12	*Enterobacter cloacae*	-	+	AMP	Agua
1-PR1-13	*Phytobacter ursingii*	-	-	AMP	Agua
1-PR1-14	*Achromobacter mucicolens*	-	-	CTX	Agua
1-PR1-15	*Stenotrophomonas maltophilia*	-	+	IMP	Agua
1-PR1-16	*Stenotrophomonas maltophilia*	-	+	IMP	Agua
1-PR2-01	*Siccibacter colletis*	-	+	AMP	Agua
1-PR2-02	*Klebsiella oxytoca*	-	+	AMP	Agua
1-PR2-03	*Proteus mirabilis*	-	+	AMP	Agua
1-PR2-04	*Escherichia coli*	-	CTX-M	CTX	Agua
1-PR2-05	*Pseudomonas aeruginosa*	-	+	CTX	Agua
1-PR2-06	*Enterococcus faecium*	+	-	IMP	Agua
1-PR2-07	*Pseudomonas aeruginosa*	-	+	IMP	Agua
1-PR2-08	*Enterobacter cloacae*	-	+	AMP	Agua
1-PR2-09	*Cronobacter* sp.	-	+	AMP	Agua
1-PR3-01	*Klebsiella oxytoca*	-	+	AMP	Agua
1-PR3-02	*Escherichia coli*	-	CTX-M/ VIM	AMP	Agua
1-PR3-03	*Stenotrophomonas maltophilia*	-	+	AMP	Agua
1-PR3-04	*No fue posible identificar*	-	-	AMP	Agua
1-PR3-05	*No fue posible identificar*	-	+	CTX	Agua
1-PR3-06	*Enterococcus casseliflavus*	+	-	CTX	Agua
1-PR3-07	*Pseudomonas oryzihabitans*	-	+	AMP	Agua
1-PR3-08	*Citrobacter freundii*	-	+	AMP	Agua

1-PR3-09	*Kosakonia cowanii*	-	-	AMP	Agua
1-PR3-10	*Escherichia coli*	-	CTX-M	CTX	Agua
1-PR4-01	*Klebsiella pneumoniae*	-	SHV	AMP	Agua
1-PR4-02	*Providencia rettgeri*	-	+	AMP	Agua
1-PR4-05	*Kosakonia cowanii*	-	+	AMP	Agua
1-PR4-06	*Chryseobacterium gleum*	-	+	IMP	Agua
1-PR4-08	*Escherichia coli*	-	+	AMP	Agua
1-PR4-09	*Kosakonia cowanii*	-	-	AMP	Agua
1-PR4-10	*Escherichia coli*	-	+	AMP	Agua
1-PR4-11	*Raoultella ornithinolytica*	-	+	AMP	Agua
1-PR4-12	*Klebsiella oxytoca*	-	CTX-M	CTX	Agua
1-PR4-13	*Escherichia coli*	-	CTX-M	CTX	Agua
1-PR4-14	*Escherichia coli*	-	CTX-M	CTX	Agua
1-PR5-01	*Enterococcus faecium*	+	-	AMP	Agua
1-PR5-02	*Escherichia coli*	-	+	AMP	Agua
1-PR5-03	*Escherichia coli*	-	VIM	AMP	Agua
1-PR5-04	*Escherichia coli*	-	CTX-M	AMP	Agua
1-PR5-05	*Escherichia coli*	-	CTX-M	AMP	Agua
1-PR5-06	*Enterococcus faecium*	+	-	AMP	Agua
1-PR5-07	*Enterococcus mundtii*	+	-	IMP	Agua
1-PR5-08	*Enterobacter asburiae*	-	+	IMP	Agua
1-PR5-09	*Escherichia coli*	-	+	AMP	Agua
1-PR5-10	*Escherichia coli*	-	+	AMP	Agua
1-PR5-11	*Escherichia coli*	-	+	CTX	Agua
1-PR5-12	*Escherichia coli*	-	CTX-M	CTX	Agua
1-PR6-01	*Pectobacterium carotovorum*	-	-	AMP	Agua
1-PR6-02	*Pantoea ananatis*	-	+	AMP	Agua
1-PU1-001	*Serratia fonticola*	-	+	AMP	Agua
1-PU1-102	*Enterococcus faecium*	+	NA	CTX	Agua
1-PU2-002	*Pantoea sp.*	-	+	AMP	Agua
1-PU2-004	*Rahnella aquatilis*	-	-	AMP	Agua
1-PU2-101	*No fue posible identificar*	+	+	CTX	Agua
1-PU2-102	*Leuconostoc mesenteroides*	+	NA	CTX	Agua
1-PU2-103	*Pseudomonas fluorescens*	-	-	CTX	Agua
1-PU2-201	*Leuconostoc mesenteroides*	+	NA	IMP	Agua
1-PU2-202	*No fue posible identificar*	-	-	IMP	Agua
1-PU3-101	*Enterococcus faecium*	+	NA	CTX	Agua
1-PU3-201	*Enterococcus faecium*	+	NA	IMP	Agua
1-PU3-202	*Paenibacillus lactis*	-	-	IMP	Agua

1-PU4-001	*Rahnella aquatilis*	-	-	AMP	Agua
1-PU4-002	*Enterococcus faecium*	+	NA	AMP	Agua
1-PU4-101	*Bacillus pumilus*	+	NA	CTX	Agua
1-PU4-103	*No fue posible identificar*	+	-	CTX	Agua
1-PU4-104	*Bacillus cereus*	+	NA	CTX	Agua
1-PU4-105	*Enterococcus faecium*	+	NA	CTX	Agua
1-PU4-201	*Enterococcus faecium*	+	NA	IMP	Agua
1-PU5-001	*Carnobacterium divergens*	+	NA	AMP	Agua
1-PU5-002	*Hafnia alvei*	-	-	AMP	Agua
1-PU5-003	*Hafnia alvei*	-	-	AMP	Agua
1-PU5-101	*Rahnella aquatilis*	-	-	CTX	Agua
1-PU5-102	*Carnobacterium divergens*	+	NA	CTX	Agua
1-PU5-202	*Enterococcus faecium*	+	NA	IMP	Agua
1-PU6-003	*Hafnia alvei*	-	+	AMP	Agua
1-PU6-101	*Enterococcus faecium*	+	NA	CTX	Agua
1-PU6-102	*Listeria seeligeri*	+	NA	CTX	Agua
1-PU6-201	*Pseudomonas lundensis*	-	+	IMP	Agua
1-PU6-202	*Enterococcus faecium*	+	NA	IMP	Agua

Anexo II: Lista de aislados del segundo muestreo

ID	Especie	Gram	Nitrocefina o Gen	Antibiótico	Muestra
2-CA1-102	*Bacillus cereus*	+	NA	CTX	Agua
2-CA1-103	*Cytobacillus oceanisediminis*	+	NA	CTX	Agua
2-CA1-104	*Fictibacillus halophilus*	+	NA	CTX	Agua
2-CA1-105	*Bacillus cereus*	+	NA	CTX	Agua
2-CA1-107	*Peribacillus simplex*	+	NA	CTX	Agua
2-CA1-201	*Bacillus cereus*	+	NA	IMP	Agua
2-CA1-202	*Bacillus thuringiensis*	+	NA	IMP	Agua
2-CA2-101	*Bacillus mycoides*	+	NA	CTX	Agua
2-CA2-102	*Peribacillus simplex*	+	NA	CTX	Agua
2-CA2-103	*Bacillus cereus*	+	NA	CTX	Agua
2-CA2-104	*Bacillus cereus*	+	NA	CTX	Agua
2-CA2-105	*Bacillus mycoides*	+	NA	CTX	Agua
2-CA2-201	*Enterococcus faecium*	+	NA	IMP	Agua
2-CA2-202	*Bacillus cereus*	+	NA	IMP	Agua
2-CU1S-102	*No fue posible identificar*	+	-	CTX	Suelo
2-CU1S-103	*Stenotrophomonas maltophilia*	-	+	CTX	Suelo
2-CU1S-104	*Bacillus pseudomycoides*	+	NA	CTX	Suelo
2-CU2R-101	*No fue posible identificar*	+	+	CTX	Raíz
2-CU2S-101	*Bacillus mycoides + Bacillus cytotoxicus*	+	NA	CTX	Suelo
2-CU2S-102	*Paenibacillus illinoisensis*	+	NA	CTX	Suelo
2-CU2S-103	*Bacillus cereus*	+	NA	CTX	Suelo
2-CU2S-104	*No fue posible identificar*	+	-	CTX	Suelo
2-CU3S-103	*Bacillus cereus*	+	NA	CTX	Suelo
2-CU3S-104	*Peribacillus simplex*	+	NA	CTX	Suelo
2-CU4R-101	*No fue posible identificar*	-	-	CTX	Raíz
2-CU4S-101	*Bacillus* spp.	+	NA	CTX	Suelo
2-CU4S-102	*Peribacillus muralis*	+	NA	CTX	Suelo
2-CU4S-104	*Bacillus cereus*	+	NA	CTX	Suelo
2-CU5S-101	*Cytobacillus oceanisediminis*	+	NA	CTX	Suelo
2-CU5S-102	*Bacillus pumilus*	+	NA	CTX	Suelo
2-CU5S-202	*Paenibacillus lautus*	+	NA	IMP	Suelo
2-CU6S-102	*Bacillus cereus*	+	NA	CTX	Suelo
2-CU6S-103	*Bacillus cereus*	+	NA	CTX	Suelo
2-CU6S-104	*Priestia megaterium*	+	NA	CTX	Suelo
2-CU6S-105	*Bacillus cereus + Bacillus manliponensis*	+	NA	CTX	Suelo

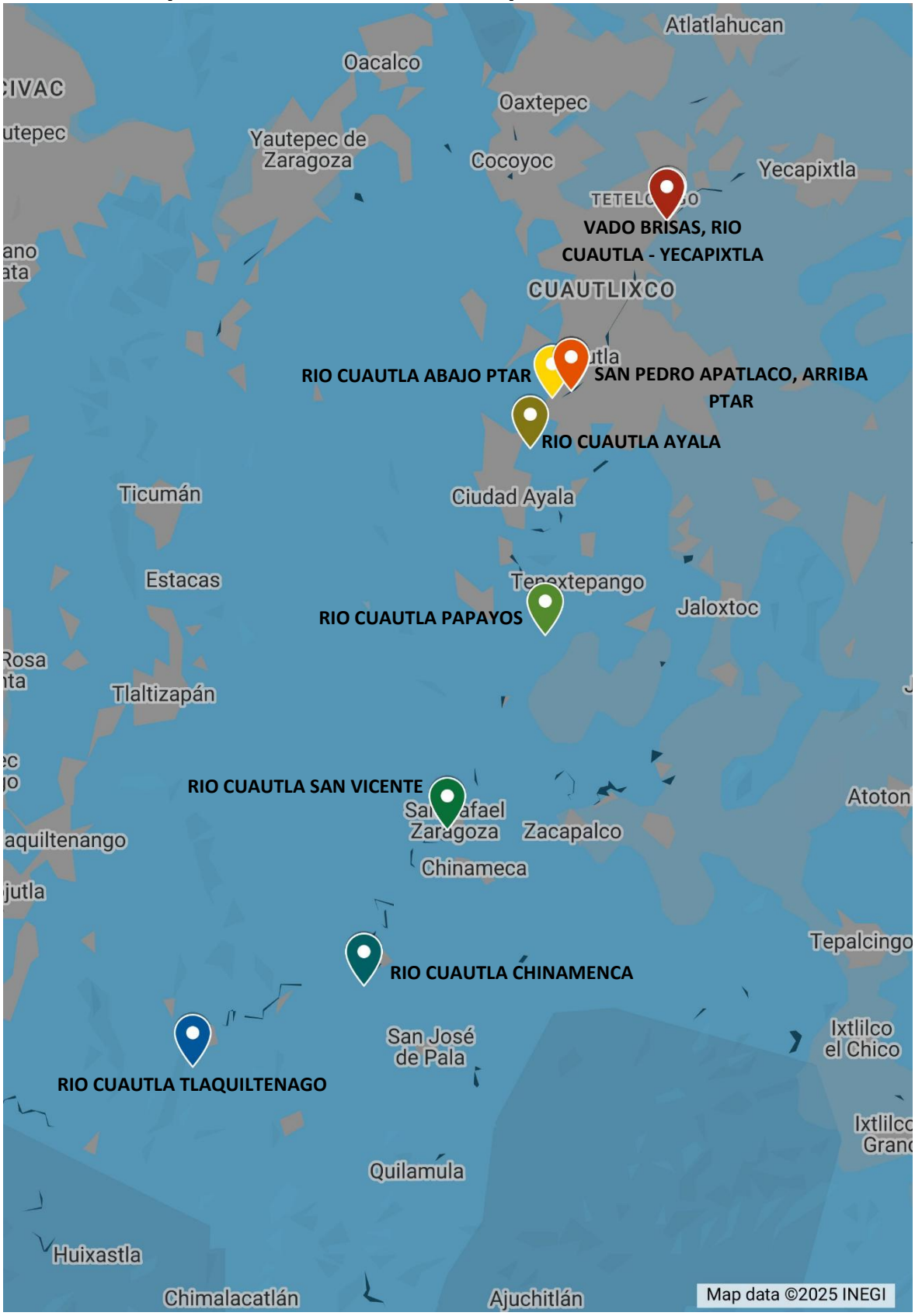
2-CU6S-202	*Bacillus mycoides*	+	NA	IMP	Suelo
2-CU6S-203	*Bacillus pumilus*	+	NA	IMP	Suelo
2-PR1-001	*Bacillus pumilus*	+	NA	AMP	Agua
2-PR1-002	*Priestia endophytica*	+	NA	AMP	Agua
2-PR1-003	*Bacillus cereus*	+	NA	AMP	Agua
2-PR1-004	*Bacillus licheniformis*	+	NA	AMP	Agua
2-PR1-006	*Peribacillus simplex*	+	NA	AMP	Agua
2-PR1-007	*Bacillus subtilis*	+	NA	AMP	Agua
2-PR1-008	*No fue posible identificar*	-	-	AMP	Agua
2-PR1-009	*Bacillus cereus*	+	NA	AMP	Agua
2-PR1-010	*Lysinibacillus fusiformis*	+	NA	AMP	Agua
2-PR1-011	*No fue posible identificar*	-	+	AMP	Agua
2-PR1-012	*Enterobacter hormaechei*	-	+	AMP	Agua
2-PR1-102	*Priestia megaterium*	+	NA	CTX	Agua
2-PR1-103	*Bacillus cereus*	+	NA	CTX	Agua
2-PR1-104	*Escherichia coli*	-	+	CTX	Agua
2-PR1-201	*Serratia marcescens*	-	+	IMP	Agua
2-PR1-202	*Escherichia coli*	-	-	IMP	Agua
2-PR1-203	*Paenibacillus polymyxa*	+	NA	IMP	Agua
2-PR1-204	*Paenibacillus illinoisensis*	+	NA	IMP	Agua
2-PR1-205	*Escherichia coli*	-	+	IMP	Agua
2-PR2-001	*Priestia endophytica*	+	NA	AMP	Agua
2-PR2-002	*Bacillus mycoides + Bacillus pseudomycoides*	+	NA	AMP	Agua
2-PR2-003	*Lysinibacillus xylanilyticus*	+	NA	AMP	Agua
2-PR2-004	*Bacillus cereus +Bacillus mycoides*	+	NA	AMP	Agua
2-PR2-005	*Escherichia coli*	-	+	AMP	Agua
2-PR2-006	*Metabacillus indicus*	+	NA	AMP	Agua
2-PR2-007	*No fue posible identificar*	+	+	AMP	Agua
2-PR2-008	*Cytobacillus firmus*	+	NA	AMP	Agua
2-PR2-009	*Bacillus cereus +Bacillus mycoides*	+	NA	AMP	Agua
2-PR2-010	*Peribacillus illinoisensis*	+	NA	AMP	Agua
2-PR2-101	*Priestia megaterium*	+	NA	CTX	Agua
2-PR2-102	*Paenibacillus lautus*	+	NA	CTX	Agua
2-PR2-103	*Enterobacter hormaechei*	-	CTX-M/SHV	CTX	Agua
2-PR2-104	*Lysinibacillus fusiformis*	+	NA	CTX	Agua
2-PR2-106	*Bacillus cereus*	+	NA	CTX	Agua
2-PR2-201	*Bacillus licheniformis*	+	NA	IMP	Agua

2-PR2-202	*Bacillus mycoides+Bacillus thuringiensis*	+	NA	IMP	Agua
2-PR2-203	*Paenibacillus amylolyticus*	+	NA	IMP	Agua
2-PR3-001	*Priestia megaterium*	+	NA	AMP	Agua
2-PR3-002	*Escherichia coli*	-	SHV	AMP	Agua
2-PR3-003	*Citrobacter braakii*	-	CTX-M/SHV	AMP	Agua
2-PR3-004	*Chryseobacterium arthrosphaerae*	-	SHV	AMP	Agua
2-PR3-005	*Priestia megaterium*	+	NA	AMP	Agua
2-PR3-006	*Paenibacillus silvae*	+	NA	AMP	Agua
2-PR3-102	*Bacillus cereus*	+	NA	CTX	Agua
2-PR3-103	*Peribacillus simplex*	+	NA	CTX	Agua
2-PR3-104	*Bacillus cereus*	+	NA	CTX	Agua
2-PR3-105	*Acinetobacter baumannii*	-	+	CTX	Agua
2-PR3-106	*Bacillus mycoides + Bacillus pseudomycoides*	+	NA	CTX	Agua
2-PR3-107	*Priestia megaterium*	+	NA	CTX	Agua
2-PR3-201	*Lysinibacillus fusiformis*	+	NA	IMP	Agua
2-PR3-202	*Escherichia coli*	-	-	IMP	Agua
2-PR3-203	*Bacillus mycoides*	+	NA	IMP	Agua
2-PR3-204	*Bacillus cereus*	+	NA	IMP	Agua
2-PR4-101	*Escherichia coli*	-	+	CTX	Agua
2-PR4-102	*Bacillus cereus*	+	NA	CTX	Agua
2-PR4-103	*Acinetobacter baumannii*	-	-	CTX	Agua
2-PR4-104	*Bacillus cereus*	+	NA	CTX	Agua
2-PR4-105	*No fue posible identificar*	-	+	CTX	Agua
2-PR4-106	*Fictibacillus halophilus*	+	NA	CTX	Agua
2-PR4-107	*Bacillus cereus*	+	NA	CTX	Agua
2-PR4-108	*Escherichia coli*	-	CTX-M	CTX	Agua
2-PR4-201	*Escherichia coli*	-	CTX-M	IMP	Agua
2-PR4-202	*Bacillus thuringiensis*	+	NA	IMP	Agua
2-PR5-101	*Bacillus cereus*	+	NA	CTX	Agua
2-PR5-102	*Peribacillus simplex*	+	NA	CTX	Agua
2-PR5-103	*Bacillus cereus*	+	NA	CTX	Agua
2-PR5-104	*Peribacillus simplex*	+	NA	CTX	Agua
2-PR5-106	*Escherichia coli*	-	+	CTX	Agua
2-PR5-201	*Escherichia coli*	-	-	IMP	Agua
2-PR5-202	*Escherichia coli*	-	-	IMP	Agua
2-PR6-101	*Peribacillus simplex*	+	NA	CTX	Agua
2-PR6-104	*Bacillus cereus*	+	NA	CTX	Agua

2-PR6-105	*Bacillus altitudinis*	+	NA	CTX	Agua
2-PR6-202	*Bacillus cereus*	+	NA	IMP	Agua
2-PR6-203	*Brevibacillus centrosporus*	+	NA	IMP	Agua
2-PR6-204	*Bacillus cereus*	+	NA	IMP	Agua
2-PR6-205	*No fue posible identificar*	-	-	IMP	Agua
2-PU1-001	*Priestia megaterium*	+	NA	AMP	Agua
2-PU1-002	*Priestia endophytica*	+	NA	AMP	Agua
2-PU1-003	*Bacillus* spp.	+	NA	AMP	Agua
2-PU1-004	*No fue posible identificar*	+	-	AMP	Agua
2-PU1-005	*Cytobacillus oceanisediminis*	+	NA	AMP	Agua
2-PU1-101	*Bacillus* spp.	+	NA	CTX	Agua
2-PU1-102	*Cytobacillus oceanisediminis*	+	NA	CTX	Agua
2-PU1-201	*Bacillus* spp.	+	NA	IMP	Agua
2-PU1-202	*Enterococcus mundtii*	+	NA	IMP	Agua
2-PU1-203	*Lysinibacillus fusiformis*	+	NA	IMP	Agua
2-PU2-001	*Bacillus* spp.	+	NA	AMP	Agua
2-PU2-002	*Rossellomorea marisflavi*	+	NA	AMP	Agua
2-PU2-003	*Bacillus subtilis*	+	NA	AMP	Agua
2-PU2-004	*Cytobacillus kochii*	+	NA	AMP	Agua
2-PU2-005	*Escherichia coli*	-	SHV	AMP	Agua
2-PU2-101	*Bacillus cereus*	+	NA	CTX	Agua
2-PU2-103	*No fue posible identificar*	+	+	CTX	Agua
2-PU2-104	*No fue posible identificar*	-	-	CTX	Agua
2-PU2-201	*Paenibacillus illinoisensis*	+	NA	IMP	Agua
2-PU2-202	*Ochrobactrum intermedium*	-	+	IMP	Agua
2-PU3-001	*No fue posible identificar*	+	-	AMP	Agua
2-PU3-002	*Bacillus cereus*	+	NA	AMP	Agua
2-PU3-003	*Rossellomorea marisflavi*	+	NA	AMP	Agua
2-PU3-004	*Lysinibacillus fusiformis*	+	NA	AMP	Agua
2-PU3-005	*No fue posible identificar*	+	-	AMP	Agua
2-PU3-006	*Escherichia coli*	-	SHV	AMP	Agua
2-PU3-007	*Escherichia coli*	-	SHV	AMP	Agua
2-PU3-008	*Pantoea septica*	-	-	AMP	Agua
2-PU3-101	*No fue posible identificar*	-	+	CTX	Agua
2-PU3-201	*Enterococcus faecium*	+	NA	IMP	Agua
2-PU3-202	*Enterococcus gallinarum*	+	NA	IMP	Agua
2-PU3-203	*Lysinibacillus fusiformis*	+	NA	IMP	Agua
2-PU4-001	*Escherichia coli*	-	SHV/VIM	AMP	Agua
2-PU4-002	*Enterobacter hormaechei*	-	+	AMP	Agua

2-PU4-003	*Pantoea anthophila*	-	-	AMP	Agua
2-PU4-004	*Bacillus cereus*	+	NA	AMP	Agua
2-PU4-005	*Bacillus cereus*	+	NA	AMP	Agua
2-PU4-007	*Bacillus* spp.	+	NA	AMP	Agua
2-PU4-101	*Escherichia coli*	-	SHV/VIM	CTX	Agua
2-PU4-102	*Escherichia coli*	-	CTX-M/SHV/VIM	CTX	Agua
2-PU4-103	*Escherichia coli*	-	CTX-M/SHV	CTX	Agua
2-PU4-104	*Chryseobacterium indologenes*	-	+	CTX	Agua
2-PU4-105	*Empedobacter falsenii*	-	+	CTX	Agua
2-PU4-202	*Citrobacter freundii*	-	+	IMP	Agua
2-PU4-203	*Providencia rettgeri*	-	-	IMP	Agua
2-PU4-204	*Serratia liquefaciens*	-	+	IMP	Agua
2-PU4-205	*Serratia marcescens*	-	-	IMP	Agua
2-PU4-206	*Serratia marcescens*	-	-	IMP	Agua
2-PU4-207	*Kurthia gibsonii*	+	NA	IMP	Agua
2-PU5-001	*Bacillus cereus*	+	NA	AMP	Agua
2-PU5-002	*Lysinibacillus xylanilyticus*	+	NA	AMP	Agua
2-PU5-005	*No fue posible identificar*	+	-	AMP	Agua
2-PU5-007	*Bacillus* spp.	+	NA	AMP	Agua
2-PU5-008	*Bacillus licheniformis*	+	NA	AMP	Agua
2-PU5-102	*Paenibacillus* spp.	+	NA	CTX	Agua
2-PU5-201	*Enterococcus hirae*	+	NA	IMP	Agua
2-PU6-001	*Escherichia coli*	-	SHV	AMP	Agua
2-PU6-002	*Escherichia coli*	-	+	AMP	Agua
2-PU6-101	*Escherichia coli*	-	CTX-M	CTX	Agua
2-PU6-102	*Bacillus cereus*	+	NA	CTX	Agua
2-PU6-103	*Bacillus cereus*	+	NA	CTX	Agua
2-PU6-104	*No fue posible identificar*	-	-	CTX	Agua
2-PU6-105	*Bacillus pumilus*	+	NA	CTX	Agua
2-PU6-106	*Bacillus velezensis*	+	NA	CTX	Agua
2-PU6-201	*Escherichia coli*	-	CTX-M	IMP	Agua
2-PU6-202	*Escherichia coli*	-	-	IMP	Agua
2-PU6-203	*Bacillus pumilus*	+	NA	IMP	Agua

Anexo III: Mapa de sitios monitoreados por la RENAMECA.



Anexo IV: Bacterias aisladas como endófitos.

ID	Especie	Gram	Nitrocefina	Antibiótico	Muestra	Cultivo
1-CU2F-01	*Agrobacterium larrymoorei*	-	-	AMP	Fruto	Ejote
1-CU2R-01	*Achromobacter mucicolens*	-	+	AMP	Raíz	Ejote
1-CU2R-02	*Pseudomonas monteilli*	-	+	AMP	Raíz	Ejote
1-CU2R-03	*Kosakonia cowanii*	-	-	AMP	Raíz	Ejote
1-CU2R-04	*Stenotrophomonas maltophilia*	-	+	CTX	Raíz	Ejote
1-CU2R-05	*Pseudomonas chlororaphis*	-	+	CTX	Raíz	Ejote
1-CU2R-06	*Sphingobacterium thalpophilum*	-	-	IMP	Raíz	Ejote
1-CU2R-07	*Pseudomonas fluorescens*	-	+	AMP	Raíz	Ejote
1-CU2R-08	*Kosakonia cowanii*	-	-	AMP	Raíz	Ejote
1-CU2R-09	*Kosakonia cowanii*	-	-	AMP	Raíz	Ejote
1-CU2R-10	*Kosakonia cowanii*	-	-	AMP	Raíz	Ejote
1-CU2R-11	*Pseudomonas monteilli*	-	+	CTX	Raíz	Ejote
1-CU2R-12	*Pseudomonas fluorescens*	-	+	IMP	Raíz	Ejote
1-CU2T-01	*Stenotrophomonas maltophilia*	-	+	AMP	Tallo	Ejote
1-CU2T-02	*Staphylococcus haemolyticus*	+	-	AMP	Tallo	Ejote
1-CU2T-03	*Staphylococcus capitis*	+	-	AMP	Tallo	Ejote
1-CU3R-01	*Pseudomonas putida*	-	+	AMP	Raíz	Ejote
1-CU3R-02	*No fue posible identificar*	-	SHV	AMP	Raíz	Ejote
1-CU3R-03	*Agrobacterium radiobacter*	-	+	AMP	Raíz	Ejote
1-CU3R-04	*Delftia tsuruhatensis*	-	+	AMP	Raíz	Ejote
1-CU3R-05	*No fue posible identificar*	-	-	CTX	Raíz	Ejote
1-CU3R-06	*No fue posible identificar*	-	+	CTX	Raíz	Ejote
1-CU3R-07	*Achromobacter mucicolens*	-	+	CTX	Raíz	Ejote
1-CU3R-09	*Achromobacter mucicolens*	-	+	IMP	Raíz	Ejote
1-CU3R-10	*Kosakonia cowanii*	-	+	AMP	Raíz	Ejote
1-CU3R-11	*No fue posible identificar*	-	+	AMP	Raíz	Ejote
1-CU3R-12	*Pseudomonas putida*	-	+	AMP	Raíz	Ejote
1-CU4R-01	*Enterobacter cloacae*	-	+	AMP	Raíz	Caña
1-CU4R-03	*No fue posible identificar*	-	-	CTX	Raíz	Caña
1-CU4R-04	*No fue posible identificar*	-	+	CTX	Raíz	Caña
1-CU4R-05	*Enterobacter bugandensis*	-	-	AMP	Raíz	Caña
1-CU4R-06	*Pantoea ananatis*	-	+	AMP	Raíz	Caña
1-CU4R-07	*Enterobacter bugandensis*	-	+	AMP	Raíz	Caña
1-CU4R-08	*Enterobacter cloacae*	-	+	AMP	Raíz	Caña
1-CU4R-09	*Achromobacter mucicolens*	-	-	CTX	Raíz	Caña
1-CU4T-01	*Brachybacterium paraconglomeratum*	+	+	AMP	Tallo	Caña

1-CU4T-02	*No fue posible identificar*	-	+	CTX	Tallo	Caña
1-CU5R-01	*Pseudomonas chlororaphis*	-	+	AMP	Raíz	Ejote
1-CU5R-02	*Agrobacterium radiobacter*	-	+	AMP	Raíz	Ejote
1-CU5R-03	*Pseudomonas straminea*	-	+	AMP	Raíz	Ejote
1-CU5R-04	*Stenotrophomonas maltophilia*	-	+	CTX	Raíz	Ejote
1-CU5R-05	*No fue posible identificar*	-	+	CTX	Raíz	Ejote
1-CU5R-06	*No fue posible identificar*	-	+	IMP	Raíz	Ejote
1-CU5R-07	*Stenotrophomonas maltophilia*	-	+	IMP	Raíz	Ejote
1-CU5R-08	*Enterobacter cloacae*	-	+	AMP	Raíz	Ejote
1-CU5R-09	*Kosakonia cowanii*	-	-	AMP	Raíz	Ejote
1-CU5R-10	*Achromobacter mucicolens*	-	+	CTX	Raíz	Ejote
1-CU5T-01	*Enterobacter hormaechei*	-	-	IMP	Tallo	Ejote
2-CU2R-101	*No fue posible identificar*	+	+	CTX	Raíz	Caña
2-CU4R-101	*No fue posible identificar*	-	-	CTX	Raíz	Caña

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos, a 09 de mayo del 2025.

VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: **IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS EN EL AFLUENTE DEL RÍO CUAUTLA UTILIZADO PARA EL RIEGO AGRÍCOLA EN EL ESTADO DE MORELOS,** que presenta el **C. Miguel Bernardo Vega Maya**, del Programa de Posgrado Maestría en Biotecnología, bajo la dirección del DR. RAMON SUAREZ RODRIGUEZ y codirección del DR. HUMBERTO BARRIOS CAMACHO, han determinado que el documento reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado, por lo que emiten su **VOTO APROBATORIO.**

Comisión Revisora de tesis (firma electrónica)

DR. RAMON SUAREZ RODRIGUEZ (director de tesis, CEIB UAEM)

DR. HUMBERTO BARRIOS CAMACHO (codirector de tesis, CISEI INSP)

DR. JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO (CEIB UAEM)

DRA. JOSEFINA DURÁN BEDOLLA (CISEI INSP)

DR. JOSE DE JESUS ARELLANO GARCIA (CEIB UAEM)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

JOSE DE JESUS ARELLANO GARCIA | Fecha:2025-05-09 13:17:58 | FIRMANTE

i05CLZnfIXcq2bDQFDTl9kMjwbVb+yAHst5xzjtavZ6xb+w/Vpr/MxMCEDeXd3NFs3psoNTwiGAGmQ4XbPzuUvUPbyOzuTWuPJZM+6SYGqlVyBK1/jxkTX1QB6J1o1IhV8RIFLaamr80f1KgTyobX9EcRXeXAIVdEKf2DYzOdCYoXNN2lzMwSjbs8AlU2yN5D/TJpnIQHCKgL4yh5TKr2yRglaAeco4sCTwOZ57MF9/Q2TVZwCwaPvsysLnFiYxjck072eYeCwt2VHI1LPL8rvI8TkZpxLzveSCOBtclR7gX4T12RPQmV7OrB5RHdm8QpYOakv8ZwaWAElP0xzDV0g==

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2025-05-09 15:29:13 | FIRMANTE

CPouWGGaSp2sFMjFyHBbvYmahm2mTtCQ3GD+bFJyq8FUfl5mwcgoQZKwDqQ0BzpIi61cZMkDd8io6BgbfmzD5pSQfOj9pjV9Oj/Mw39OGUdxYQpz4IEKLrGGaRt23K5y6Yf6K92Wa3rIeqSsa7P6ecJ90a1T8djtHtDUCiE+1Sd5zl0XUtGJ28Rpj/gVoAf2UvUpiYuUF1wjL5mxRYwr44fEF9dwftP/dTBLTuA6Z0g95Pa4fU0/BCB8vmM1g1tCW7uUXL76Jxb+aJSHvsJtMh6Ks/xVSPsGG7mvVKpbsz/9SKJf7IhwiJOw3XDlHokVjRZjMeMHJCkF7F0J3XTBTg==

JOSEFINA DURÁN BEDOLLA | Fecha:2025-05-09 16:55:21 | FIRMANTE

gj02aqgxy6vCI0xvxe3IkD9PnAh8quZGbj97dlNiKGiJLJ9txz/VtlpClQd54QFz45MZ8wTfPUEGPRz0D1JYPo2db7OqpUXtiPvAFyvvTfmJeVJSpzluyYiGqWlRPRSvCyBZsZ9s9dpUi/7gW3I2yyeUa933EZEM9V9m7p5G5QzRT+qhaNO52T2ELkKYuZULY1gwPW42AOyp2GSGt3jP34nbewPqd2R/v9++qh2+WKIgb0H2lZG1gX+04QVVc/6wy5sYhYDONTKZEy/jkmzg7NBZFx/E1zbsIDV2n/w4xZIf8SNsLI4ovPda5Kq/KxJBi9WsxOByMgKljqhMSGOeVA==

RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2025-05-11 19:49:31 | FIRMANTE

pH/M/t1+ExtSrxbKBQD/PTz8bBAMFez98JlpAUIeVPBPjFeI4PQuGfUekTGHbRFBRPXKA2SGXfoe5Vfa6jOvzgaw6IXXiiQIrkwJ+kKpRSpSPqQ65esRA9FTL5+apBLhcqlRtzp3tUSRRo6BH4iD2G1/Md/IllCKEurOMFR3NX/AmrKIpDOjdmjNkaQq0LUugrFDky6PclrpqeWECmYqOhbrF0Gd8EstFuz/WYLlKGmB0OdJMtKrwRGDwXZSc1roBNFJrh1MTPpEtPc4F753nlMaAkJ/4ur67T+0OpqvjvReBPp9KDKJdDLmzctWNTodQLxhYbhVjYkbeWMMkCK1ug==

HUMBERTO BARRIOS CAMACHO | Fecha:2025-05-12 07:55:25 | FIRMANTE

wlzbjhYrcUXdG+7tjc6pa+tfpJeCiz44juYPAfcJ7OLKwe0snZVqJ4qpBR9IO06NNGsroh/Ogk02/kaGP1zRxsnPtf22axiGQFhzKzWexT41vHNiLCuoFjwveDrXdtOYhh+HQ909bFcOSpGHBRqb4Zo7sfB2iYWziiTKJCl4aRgUAa21mqRZNW2cvSnxdce2HY5EbECF6+mN4pSVlwb45fxOmCHaPJ8jCoUlGQJOmEHsSc0CW/xhqI6vdwWtP7Uw07ivms11EeVJ5TnqR41oCRVHbvwo0UktXbaRbTk+B/dwWYQmkWlOTFR7z08PON+lzaQ37A2fxA9ZUVeAZXRVZg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

VXpQBL1IP

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/iuxSHtdVHFkDAfFFveGzSwUaniQv7Oc1