



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

ESCUELA DE ESTUDIOS SUPERIORES DEL JICARERO

**BACTERIAS PATÓGENAS PRESENTES EN DOS ZONAS
DEL RIO APATLACO, EN EL ESTADO DE MORELOS**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

P R E S E N T A:

GLORIA HUICOHEA MONTES

DIRECTOR

DR. LUIS JAVIER MENDOZA ESTRADA

CODIRECTOR

DR. VÍCTOR MANUEL NAVARRO GARCÍA

JOJUTLA, MORELOS

JUNIO, 2021



AGRADECIMIENTOS:

Primeramente, a Dios por permitirme la vida hasta estos momentos y darme la oportunidad de terminar mi tesis después de tantos obstáculos en mi camino.

Al Dr. Julio Yamil Jimenez director del hospital Ernesto Meana San Roman y al jefe del laboratorio de análisis clínicos el Dr. Mario Ocampo Ocampo, por permitirme que utilizara las instalaciones el área del laboratorio para realizar todo mi trabajo de investigación.

Al Dr. Luis Javier Mendoza Estrada, director de mi tesis, por que le dio el enfoque sustancioso y correcto a mi investigación y el gran apoyo recibido de su persona.

A mis sinodales, que me alentaron dándome ideas para que mi trabajo quedara de la forma más ordenada.

A mi sobrino Abner Samuel Monroy Huicochea, por su apoyo y aportación de ideas.

A mi amigo, el IBQ. Israel Jesús Guzmán García, por su apoyo incondicional a este trabajo de investigación.

A todos mis compañeros de trabajo por darme los animos y decirme que si se puede.

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mi persona, a mi esfuerzo, a mi dedicación y empeño.

A mis hijos, por comprender mi ausencia de casa en ocasiones y permitirme el tiempo requerido a realizar mi trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE CUADROS	II
ÍNDICE DE FIGURAS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Marco teórico	2
1.2. Antecedentes	6
1.3. Justificación	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo general	13
2.2. Objetivos específicos	13
3. METODOLOGÍA	14
3.1. Área de estudio	14
3.2. Toma de muestras de agua	15
3.3. Identificación de bacterias	16
3.3.1. Pruebas bioquímicas en placa de microtitulación	18
3.3.1.1. Sensititre MEXNC2F para Gram negativas	20
3.3.1.2. Sensititre MEXNC2F para Gram positivas	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1. Comparación entre los sitios de muestreo	26
4.1.1. Punto de muestreo 1 Puente de preparatoria Jojutla	26
4.1.2. Punto de muestreo 2 Puente a Galeana	29
4.2. Presencia de bacterias patógenas por época del año	30
4.3. Caracterización de la patogenicidad.....	32
5. CONCLUSIONES	43
6. LITERATURA CITADA	44

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Composición taxonómica de las bacterias identificadas en el río Apatlaco	22
Cuadro 2. Especies identificadas en los sitios de muestreo 1 y 2 en el río Apatlaco	27
Cuadro 3. Especies identificadas por época del año en los puntos de muestreo del río Apatlaco	31

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Área de estudio en el río Apatlaco (Google Earth, 2019).....	14
Figura 2. Punto de muestreo “puente de Jojutla” para la toma de muestras de agua, la flecha en color rojo se señala la zona donde se colectaron las muestras.....	15
Figura 3. Punto de muestreo “puente de Galeana” para la toma de muestras de agua, la flecha en rojo marca el lugar donde se tomaron las muestras.....	15
Figura 4. Colecta de agua en puente de Galeana.....	15
Figura 5. Colecta de agua en puente de Jojutla.....	16
Figura 6. Incubación de cajas a 37°C.....	16
Figura 7. Estriado en cajas con medio diferencial y selectivos.....	17
Figura 8. Análisis macroscópico de colonias desarrolladas en medio diferencial y selectivo.....	18
Figura 9. observación de láminas teñidas en microscopio.....	18
Figura 10. Inoculador de placa de microtitulación <i>Thermo Scientific Sensititre AIM</i> llenando placa de microtitulación para bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	19
Figura 11. Lector de placas de microtitulación Sensititre OptiRead.....	19
Figura 12. Interpretación de resultados con el software para Windows (SWIN) de Sensititre®.....	19

RESUMEN

El río Apatlaco es una de las microcuencas más importantes de la parte sur del estado del estado de Morelos, ya que de este depende gran parte de la agricultura de la región, por lo que es de vital interés para la salud pública la determinación de la diversidad de bacterias patógenas presentes en el cuerpo de agua. Se hicieron seis muestreos de enero a octubre del año 2015 en dos puntos del río; uno ubicado en el área urbana (Jojutla) y el otro en una zona agrícola (Zacatepec). Se identificaron 26 taxones de bacterias patógenas, donde el filo Proteobacteria fue el más representativo con 19 taxones (76%) seguida del filo Firmicutes con seis taxones (24%). Seis especies y una subespecie se consideran como coliformes fecales recurrentes, y 13 especies exhibieron multirresistencia a antimicrobianos; la especie *Klebsiella* del grupo 47 fue la más frecuente (87.5% de las muestras) y junto con *Citrobacter freundii* exhibieron la mayor multirresistencia (15 y 18 antibióticos respectivamente). De acuerdo a los resultados en el presente estudio se consideran de suma importancia en materia de salud pública por lo que es importante dar seguimiento al monitoreo de la calidad del agua del río Apatlaco, para generar planes de contingencia.

Palabras clave: bacterias, *Citrobacter freundii*, Jojutla, *Klebsiella* grupo 47, Morelos, multirresistencia, patógenas, río Apatlaco, salud pública, Zacatepec.

ABSTRACT

The Apatlaco River is one of the most important micro-basins in the southern part of the state of Morelos, since a large part of the agriculture of the region depends on it, so it is of vital interest for public health to determine the diversity of pathogenic bacteria present in the body of water. Six samplings were made from January to October 2015 in two points of the river; one located in the urban area (Jojutla) and the other in an agricultural area (Zacatepec). 26 taxa of pathogenic bacteria were identified, where the phylum Proteobacteria was the most representative with 19 taxa (76%) followed by the phylum Firmicutes with six taxa (24%). Six species and one subspecies are considered to be recurrent fecal coliforms, and 13 species exhibited multi-resistance to antimicrobials; the *Klebsiella* species from group 47 was the most frequent (87.5% of the samples) and together with *Citrobacter freundii* they exhibited the highest multi-resistance (15 and 18 antibiotics respectively). According to the results in this study, they are considered of most importance in public health matters, so it is important to follow up on the monitoring of the water quality of the Apatlaco River, to generate contingency plans.

Key words: bacteria, *Citrobacter freundii*, Jojutla, *Klebsiella* group 47, Morelos, multi-resistance, pathogens, Apatlaco river, public health, Zacatepec.

1. INTRODUCCIÓN

En la sociedad actual el agua se ha convertido en un bien muypreciado, por su vital importancia en el sostén de todo organismo vivo (Anderson y Davison, 2010). En México se reconoce al agua como un asunto estratégico y de seguridad nacional, al día de hoy, se ha convertido en elemento central de la política ambiental, y más aún, en un factor clave de la política de desarrollo social y de la política económica; su disponibilidad condiciona la posibilidad de desarrollo de algunas regiones del país y su calidad es factor determinante para la salud y bienestar de la población (Valencia *et al.*, 2006). Sin embargo, el descuido y uso irracional ha provocado una grave contaminación por diversos agentes químicos y biológicos.

Las poblaciones rurales obtienen agua de forma individual o doméstica de las fuentes de agua superficiales y subterráneas más cercanas, donde a menudo se desconoce la calidad microbiana (Peter-Varbanets *et al.*, 2012). A nivel mundial, hay estimaciones sobre las enfermedades transmitidas por el agua pueden causar más de dos millones de muertes y cuatro mil millones de casos de diarrea al año, siendo la diarrea infecciosa, responsable de la mayor carga de morbilidad y mortalidad de este tipo de afecciones, y los niños menores de cinco años son las poblaciones más gravemente afectadas (WHO, 2000).

Según los estudios de los índices de calidad del agua de los ríos de la región del estado de Morelos, el 60.95% están contaminados, entre ellos destaca el río Apatlaco. Las aguas del río Apatlaco en los municipios de Zacatepec y Jojutla, se utiliza para regar áreas agrícolas, sin técnicas adecuadas de saneamiento del recurso (CONAGUA, 2008), por lo que este tipo de prácticas exponen a las personas a patógenos transmitidos por el agua mencionados anteriormente.

El uso de microorganismos bioindicadores de calidad del agua disminuye los costos y facilita la implementación de medidas eficientes de tratamiento, control del agua y de enfermedades asociadas a su transmisión (Ríos-Tobón *et al.*, 2017). Por lo que las

investigaciones sobre diversidad microbiana en ríos, nos permiten detectar agentes patógenos de importancia en salud humana, diseñar estrategias y planes de manejo, que nos facilitan tomar precauciones para su uso.

1.1. Marco teórico

El cauce de un río es de mucha importancia, porque en ocasiones aporta abastecimiento de agua en varias poblaciones que depende del río como una fuente de agua única o alterna, al igual que para la industria, ya que el agua puede ser utilizada para distintos oficios como la agricultura; desde el riego para la siembra hasta la producción agropecuaria. En los ríos de México escurren 396 km³ de agua anualmente, aproximadamente el 87% de este escurrimiento se presenta en 39 ríos, cuyas cuencas ocupan el 58% de la extensión territorial continental del país (Valecia *et al.*, 2006).

El crecimiento poblacional que usualmente se establecen asentamientos alrededor de las cuencas de los ríos además de sus diversas actividades, contribuyen a la disminución del margen de río y la competencia por el agua, que como resultado, se produce la emisión de gases tóxicos, contaminación por desechos tóxicos y pesticidas, descarga de desechos químicos y materiales radiactivos, o por accidentes industriales, como los derrames de petróleo (García, 2015) esto causa un incremento elevado de contaminación del líquido en mención.

Aunque el agua constituye el 71% de la superficie terrestre, solo el 0,3% está disponible como agua dulce para uso humano, además, su calidad en los sistemas subterráneos y superficiales es motivo de gran preocupación (Khatri y Tyagi, 2015), por lo que la contaminación de los recursos hídricos es causa de gran inquietud dada su importancia para la conservación y como fuentes de agua y alimentos para la población local (Aburto-Medina *et al.*, 2015).

Según los estudios de los índices de calidad del agua de los ríos de la región del estado de Morelos, el 60.95% están contaminados, entre ellos destaca el río Apatlaco. La cuenca

del Río Apatlaco tiene una extensión de 760 km² en un perímetro de 162Km. La subcuenca del Río Apatlaco puede considerarse como la más densamente poblada del estado, ya que en ella se localizan dos municipios de mayor población hasta el año 1995; la ciudad de Cuernavaca, con una población de 316,760 habitantes y le sigue Jiutepec, con 150,608 habitantes, generando valores de densidad que varían de 71 a 3,059 habitantes por km² (Aguilar, 1998).

Como se ha mencionado, las actividades como la agricultura; uso de fertilizantes, abonos y pesticidas, prácticas de riego ineficientes y actividades de cría de animales, acuicultura además de la deforestación de bosques, contaminación por efluentes industriales y aguas residuales domésticas, minería y actividades recreativas afectan la calidad del agua (Khatri y Tyagi, 2015), además de que es un problema importante, cuando la mayor parte del agua utilizada por la industria es devuelta a su cauce sin tratamiento, promueven alteraciones ambientales, debido la entrada de partículas de materiales considerados como extraños tales como: productos químicos, residuos industriales, así como microorganismos de aguas residuales, que resultan dañinas para flora y fauna asociada a las aguas de los ríos (Anderson y Davison, 2010).

En algunos países en vías de desarrollo, la contaminación del agua por residuos industriales es muy importante ya que utilizan este elemento para el riego de tierras destinadas a la agricultura para siembra de vegetales y para dar de beber a sus animales. Dentro de los vertidos urbanos se incluyen a los solventes orgánicos, aguas residuales y cloradas, con desechos de sustancias jabonosas producto de la actividad doméstica (CONAGUA, 2012). Los contaminantes producto de la agricultura y ganadería incluye vertidos de pesticidas, fertilizantes y restos orgánicos de animales y plantas que contaminan de una forma difusa pero muy notable en las aguas de los ríos. Estas influencias antropogénicas provocan concentraciones elevadas de metales pesados, mercurio, coliformes y cargas de nutrientes en los ríos (Khatri y Tyagi, 2015).

Esto sin contar con algunos de los principales contaminantes de los ríos, tales como: aguas residuales (demandan oxígeno disuelto en el agua), productos químicos,

nutrientes vegetales y agentes infecciosos (causan trastornos gastrointestinales); estos no solo ingresan al organismo a través de una ingesta directa de agua en mal estado, sino que también pueden incorporarse a través del consumo de peces que habitan aguas contaminadas (Quayaperu.org, 2018). La contaminación de los ríos puede provocar pérdida de la biodiversidad en el ecosistema, afectando a la calidad de vida de los individuos allí residentes e inclusive precipitando la muerte masiva de los mismos en casos de intoxicaciones severas.

La contaminación que existe en el afluente del río Apatlaco, es generada principalmente por los desechos industriales y municipales. En la subcuenca del río Apatlaco se concentran los ríos que presentan los mayores índices de contaminación de todo el estado, destacando el arroyo Puente Blanco, la barranca Amanalco y el cauce principal del río Apatlaco. En la subcuenca se reciben las descargas de dos de las zonas industriales más importantes del estado, la Ciudad Industrial del Valle de Cuernavaca (CIVAC) y la Ciudad de la Confección, en el municipio de Emiliano Zapata, así como las descargar provenientes del Ingenio Azucarero Emiliano Zapata, en Zacatepec (García, 2015).

El agua es un alimento esencial para los animales incluido el hombre, y frecuentemente actúa como vehículo de transmisión de microorganismos entéricos; la materia fecal puede accidentalmente alcanzar una fuente de abastecimiento, siendo la forma más común el ingreso a través de los sistemas de pozo ciego a napas profundas (Apella y Araujo, 2005), por lo que la influencia de los recursos hídricos en el desarrollo de la dispersión de enfermedades parasitarias es bastante considerable, y entre los organismos patógenos transmitidos por el agua se incluyen bacterias, protozoos y virus. Siendo las enfermedades bacterianas transmitidas por el agua más comunes, la fiebre tifoidea, disentería bacilar, salmonelosis, infecciones por *Escherichia coli*, campilobacteriosis, botulismo, cólera, legionelosis, leptospirosis, entre otras (Pandey *et al.*, 2014).

Así mismo, de las enfermedades causadas por protozoos, las más comunes son la amebiasis, giardiasis, ciclosporiasis y criptosporidiosis y están relacionadas con una mala calidad del agua. También se han notificado otras infecciones parasitarias, como esquistosomiasis, fasciolosis, himenolepiasis, enfermedad hidatídica, ascariasis, enterobiasis e infecciones por larva migrans visceral de *Ancylostoma* sp. (El-Kowrany *et al.*, 2016), por lo que constituye una necesidad primordial para la salud, el monitoreo de la calidad y el saneamiento de los recursos hídricos por considerarse uno de los derechos humanos básicos.

Las aguas del río Apatlaco son de tipo residual, y proviene de la ciudad de Cuernavaca y de poblaciones dentro de la cuenca del Río Apatlaco, como Temixco, Xochitepec, Puente de Ixtla, Zacatepec y Jojutla, donde es utilizada para la agricultura, ya que riegan las áreas de cultivo por gravedad y sin técnicas adecuadas de saneamiento del recurso (CONAGUA, 2008), este tipo de prácticas exponen a las personas a patógenos transmitidos por el agua mencionados anteriormente. Las normas internacionales de salud recomiendan que el agua residual para riego en hortalizas deba contener menos de 1000 coliformes fecales por 100 mil de agua y menos de un huevecillo de helminto por litro de agua. Los coliformes fecales procedentes del tubo intestinal humano y animal son indicadores de material fecal en las aguas residuales (Cuenca-Adame *et al.*, 2001).

A principios de 1991 llegó a México la pandemia del cólera, y la respuesta gubernamental, fue lanzar un plan de emergencia que con el tiempo se consolidó, como una estrategia frente a los problemas de contaminación del agua, que se operó a través del programa “agua limpia”. Este programa se propuso acciones consistentes entre otras, en desinfectar el agua en todos los sistemas de distribución, evitar el riego de vegetales que se consumen crudas con aguas residuales no tratadas, ya que no se cuenta con una planta de tratamiento de aguas residuales que funcione correctamente (Vargas y Hernandez, 2015).

En Morelos el 27 de octubre de 1991 se publica un decreto, por parte de la Conagua y la Secretaría de Salud, en el que se prohíbe la producción de hortalizas por el alto índice

de contaminación que está afectando, uno de ellos es el Río Apatlaco. La respuesta de los agricultores afectados por la contaminación ha pasado por distintas fases de organización y desorganización, ha ido de la resistencia a la negociación e inclusión de algunos de sus representantes en cargos políticos estatales. Algunas soluciones convencionales fueron, entre otras acciones la construcción de plantas de tratamiento de aguas residuales (Ley de Aguas Nacionales, 1992).

1.2. Antecedentes

La contaminación por patógenos transmitidos por el agua en los recursos hídricos y las enfermedades relacionadas son una preocupación importante en la calidad del agua en todo el mundo. El creciente interés en el control de patógenos transmitidos por el agua en los recursos hídricos, evidenciado por una gran cantidad de publicaciones recientes, atestigua claramente la necesidad de estudios que sintetizen el conocimiento de múltiples campos que cubran aspectos comparativos de la contaminación por patógenos, y los unifique en un solo lugar para presentar y abordar el problema en su conjunto (Pardey *et al.*, 2014).

Las bacterias presentes en los ríos han sido ampliamente estudiadas a nivel internacional, por ejemplo, Buckley y col. (1998), desarrollaron un análisis microbiológico en un río de una reserva de conservación mínimamente perturbada en Queensland, Australia, encontrando concentraciones significativamente más altas de bacterias en los sedimentos del lecho del río durante la estación seca en comparación con la estación húmeda. Se aislaron a las especies *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Morganella*, *Plesiomonas* y *Aeromonas* de muestras de estos sedimentos.

Polo *et al.*, (1998) investigaron la presencia de *Salmonella* y su relación con indicadores de contaminación fecal en hábitats acuáticos del noreste de España. Analizaron muestras de agua obtenidas de 213 playas, ocho ríos y 14 embalses de agua dulce, y la mayor frecuencia de aislamiento de *Salmonella* fue en ríos (58,7% de las muestras), seguidos

de embalses de agua dulce (14,8%) y agua de mar (5,9%). Registraron la ausencia de *Salmonella* sólo en playas con densidades muy bajas (UFC (100 ml) ⁻¹) de organismos indicadores (25 coliformes totales, 13 coliformes fecales y 17 estreptococos fecales).

Gran parte de la diversidad de microbios y parásitos patógenos en ríos es producto del desarrollo de ciudades, Houmsou *et al.* (2010), analizaron la relación entre la urbanización y las infecciones parasitarias, y proporcionaron breve descripción general de cómo la urbanización influye en las infecciones parasitarias, especialmente en los países en desarrollo, y recomendaron algunas medidas de control, entre las que destacan implementación de saneamiento y drenaje, vigilancia y seguimiento de los datos derivados de los servicios de salud hospitalarios y ambulatorios para determinar el patrón y la distribución de las enfermedades parasitarias y sustentar las medidas de control de vectores.

Wolf-Rainer (2011), realizó una investigación sobre las megaciudades como fuentes de bacterias patógenas en los ríos y su destino río abajo. Concluyendo que los ríos contaminados albergan comunidades microbianas muy diversas y dinámicas, que también suelen incluir bacterias patógenas para los seres humanos y el ganado, y que su presencia aumenta mucho más cerca de las megaciudades donde el tratamiento de aguas residuales es incompleto.

Pardey y colaboradores (2014), hicieron una revisión sobre la contaminación de los recursos hídricos por bacterias patógenas. Registrando a los coliformes fecales, y especies como: *Salmonella*, *Streptococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella newport*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia enterocolitica*, *Serratia marcescens* y *Clostridium perfringens* como los principales agentes contaminantes de los ríos.

En Colombia se caracterizó la microbiota bacteriana presente en biosólidos generados en una de las plantas de tratamiento de aguas residuales por Arévalo-Arbeláez *et al.* (2017). Aplicando técnicas moleculares y estrategias filogenéticas identificaron a los

Phyla Chloroflexi, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria y Firmicutes como los más abundantes. Los géneros *Pseudomonas*, *Dysgonomonas* y *Proteiniphilum* fueron los más relevantes. Concluyendo que en los biosólidos predominan bacterias ambientales que participan en los procesos de estabilización de la materia orgánica durante los tratamientos, una de las especies dominantes en este lodo es una nueva especie del grupo Anaerolineaceae.

Rivera y Ochoa (2018), identificaron y cuantificaron microorganismos indicadores de contaminación fecal y ambiental en los cuatro ríos de la Ciudad de Cuenca, en Ecuador. Se evidenció como resultado la presencia de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *Enterococcus faecalis*, mohos y levaduras.

El lago Taihu es uno de los lagos de agua dulce más grandes de China y es una fuente importante de agua potable, pero sufre eutrofización, proliferación de cianobacterias y contaminación fecal, y la afluencia del río Tiaoxi es uno de los principales contribuyentes, por lo que Vadde *et al.* (2019), caracterizaron la estructura de la comunidad bacteriana del agua del río Tiaoxi mediante la secuenciación de próxima generación (NGS). Encontrando que los phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes y Cyanobacteria fueron predominantes en la mayoría de las muestras de agua analizadas, lo que indica la presencia de contaminación fecal de aves, cerdos y humanos en el río Tiaoxi. Detectaron cinco géneros bacterianos de origen fecal y secuencias de siete patógenos potenciales en muchos lugares y su presencia se correlacionó bien con el patrón de uso de la tierra.

Shrestha *et al.* (2019), determinaron la diversidad de bacterias patógenas en el río Bagmati, Nepal, durante un período de un año, analizaron muestras de agua en busca de genes bacterianos de ARNr 16S mediante secuenciación de próxima generación dirigida a Arcobacter. Identificaron 28 filos, 61 clases y 709 géneros bacterianos; Arcobacter, Acinetobacter y Prevotella fueron los géneros dominantes, donde sus resultados demuestran la mala calidad bacteriana del agua del río Bagmati, sugiriendo la necesidad de implementar más medidas para reducir la contaminación fecal en el agua del río.

Garrido *et al.* (2020), analizaron la composición de la comunidad bacteriana del río Pinheiros en São Paulo, Brasil, utilizando técnicas moleculares. La composición taxonómica reveló una abundancia de phyla de Proteobacteria, seguida de Firmicutes y Bacteroidetes, con un total de 233 familias bacterianas clasificadas y 558 géneros bacterianos conocidos. Reportando 35 bacterias potencialmente patógenas identificadas, con el género *Arcobacter* como el más predominante.

A nivel nacional, se tiene el trabajo realizado por Isaac-Márquez *et al.* (1998), que fue enfocado en una sola especie, buscaron la presencia de *V. cholerae* No-01 en suministros de agua para consumo humano en la ciudad de Campeche y localidad rural de Becal. Detectaron la presencia de la bacteria en el 5,9% de las muestras obtenidas en pozas profundas, 31.5% en Becal y 8.7% en el barrio de Morelos, en el centro de la ciudad de Campeche.

En el área metropolitana de la Ciudad de México, Mazari-Hiriart *et al.* (2005) realizaron un estudio longitudinal en el acuífero regional de la Cuenca de México para proporcionar una descripción general de la calidad del agua subterránea, determinando parámetros microbiológicos (coliformes totales, coliformes fecales, estreptococos y *Vibrio* spp.), presencia de *Helicobacter pylori* y parámetros fisicoquímicos, incluida la cantidad de trihalometanos (THM). Identificaron ochenta y cuatro especies bacterianas de nueve géneros normalmente asociados con la contaminación fecal, *H. pylori* se detectó en al menos el 10% de las muestras. Demostrando que el sistema de distribución de agua subterránea es susceptible a la contaminación y que se necesita una estrategia de desinfección estricta durante todo el año para garantizar una calidad adecuada del agua potable.

Mazari-Hiriart *et al.*, (2014) evaluaron la cantidad y calidad del agua en el sistema fluvial Magdalena-Eslava, que es un río urbano en las cercanías de la Ciudad de México y propusieron alternativas para el uso sostenible del agua. Analizaron los datos históricos de caudal (1973-2010), junto con los atributos fisicoquímicos y bacteriológicos a lo largo

de cinco años (2008-2010) tanto en la época seca como en la lluviosa. Obteniendo como resultado que los indicadores de contaminación fecal y varios patógenos estuvieron presentes en densidades elevadas, lo que demuestra una amenaza para la población que vive cerca del río.

Aburto-Medina *et al.* (2015), llevaron a cabo investigaciones microbianas y químicas en las muestras de humedales de Lerma (Chimaliapan) y Almoloya del Río (Chiconahuapan; ambos sitios Ramsar) en México con fines de evaluación de riesgos. Sus resultados mostraron la prevalencia de Enterobacteriaceae, del género *Shigella* y especies de *Escherichia coli* en ambos humedales, y otros microorganismos detectados incluyeron organismos similares a los obtenidos de ambientes contaminados con hidrocarburos. Demostrando el aumento de los riesgos para la salud y el potencial de biomagnificación de metales por especies comestibles podrían estar asociados con el uso de los recursos hídricos de los humedales.

A nivel local, se han realizado varios planes de saneamiento, recuperación ambiental y el efecto del cambio climático de la cuenca del río Apatlaco como los desarrollados por el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA) y la fundación Gonzalo Rio Arronte (2007), la Comisión Nacional del Agua (2008 y 2012), el Gobierno del Estado de Morelos (2008), Villafaña-Martínez (2010), García (2015), Reyes (2015) y Soares y Peña (2018).

Pero investigaciones de interés en la microbiología del río Apatlaco, son pocas; un ejemplo es el estudio de Cuenca-Adame *et al.* (2001), que realizaron un estudio sobre el efecto de cinco niveles de humedad aprovechable con aguas residuales del río Apatlaco en el rendimiento de bulbo de cebolla (*Allium cepa* L.); cuantificando la fluctuación poblacional de coliformes fecales (en suelo y bulbos) y de huevecillos de helmintos (en bulbo). Teniendo como resultados que el número de coliformes fecales en bulbo varió de 312 (0% HA) a 2440 (80% HA) por 100 g de bulbo cosechado y el promedio de huevecillos por bulbo fue inferior a uno y con mayor frecuencia de *Ascaris lumbricoides*.

Los estudios más recientes son los de Breton-Deval *et al.*, (2019 y 2020). En el 2019 analizaron los parámetros de calidad del agua y la dinámica de las comunidades bacterianas para comprender la relación entre ellos, ya que el río que presenta una clara perturbación ambiental. Reportando al filo Proteobacteria como el más representativo en todos los sitios de muestreo, sin embargo, el punto de referencia del agua limpia se enriqueció con microorganismos del género *Limnohabitans*, una bacteria planctónica muy extendida en los ecosistemas de agua dulce y en los sitios muestreados contaminados, encontramos una gran abundancia de géneros potenciales de patógenos oportunistas como *Acinetobacter*, *Arcobacter* y *Myroides*, concluyendo que además de la contaminación del agua, hay un riesgo inminente para la salud humana debido a bacterias patógenas que pueden afectar potencialmente a una población de ~ 1,6 millones de personas que viven cerca del río Apatlaco.

Y en el año 2020, estudiaron el potencial funcional y metabólico de las comunidades microbianas a lo largo del río, destacando las actividades relacionadas con la biorremediación y su relación con los contaminantes presentes en el agua. Registraron que la contaminación fue una presión selectiva, encontrando bacterias con genes relacionados con la biodegradación xenobiótica.

1.3. Justificación

Más de dos millones de muertes al año se producen alrededor del mundo a causa de la contaminación microbiológica del agua que bebemos (WHO, 2000), y la cuenca del Rio Apatlaco históricamente ha sido una fuente de agua para el riego de plantíos como hortalizas, cebolla, maíz, arroz y caña, cultivos que por décadas han dado sustento a personas que habitan sobre la cuenca del río que, en la actualidad, sus aguas están altamente contaminadas y es un foco de infección para la gente que trabaja en el campo y que riega sus sembradíos (hortalizas) esta agua no tratada (Cuenca-Adamé *et al.*, 2001), de ahí la importancia de establecer modelos de evaluación y gestión integral que garanticen su calidad.

Actualmente hay múltiples metodologías para detectar la contaminación microbiana del agua. Sin embargo, los elevados costos que representan, los tiempos de análisis y aislamiento en cultivo de microorganismos han sido obstáculo para establecer la calidad microbiana del agua para consumo humano principalmente.

El uso de microorganismos bioindicadores de calidad del agua disminuye los costos y facilita la implementación de medidas eficientes de tratamiento, control del agua y de enfermedades asociadas a su transmisión (Ríos-Tobón *et al.*, 2017). La importancia de conocer las especies presentes en los sistemas acuáticos naturales y el comportamiento en su ambiente, radica en la posibilidad de desarrollar nuevas tecnologías que logren su eliminación y de esta manera controlar enfermedades de origen hídrico (Apella y Araujo, 2005).

El presente estudio es indispensable, ya que puede dar un panorama parcial sobre la diversidad de bacterias patógenas presentes en el río Apatlaco, y sentar las bases para establecer medidas preventivas contra las posibles enfermedades transmitidas por el río y la aplicación de normas establecidas en la legislación ambiental para el uso de sus aguas. De manera tal que podemos decir que, el desarrollo de estudios sobre diversidad microbiológica en ríos, nos da a conocer la presencia de microorganismos patógenos de importancia en salud pública y que son indicadores de contaminación.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Establecer el registro de especies de bacterias patógenas presentes en el río Apatlaco, en los municipios de Jojutla y Zacatepec, en el estado de Morelos.

2.2. Objetivos específicos

- a) Identificar hasta el nivel taxonómico posible a las bacterias patógenas aisladas en los puntos de muestreo del río Apatlaco.

- b) Caracterizar la patogenicidad de las bacterias aisladas en los puntos de muestreo del río Apatlaco.

3. METODOLOGÍA

3.1. Área de estudio

El afluente del Río Apatlaco se ubica al noroeste del Estado de Morelos; cubre un área de 746 km², de los cuales 656.5 se encuentran en el territorio morelense, y el resto en el Estado de México y el distrito federal (figura 1). Su nacimiento como cauce ya definido se señala en el manantial de Chapultepec, de la ciudad de Cuernavaca, y su desembocadura en el Río Yautepec, junto al poblado de Tlatenchi en Jojutla, que posteriormente más adelante se integran al Rio principal que es el Rio Balsas (CONAGUA, 2008).

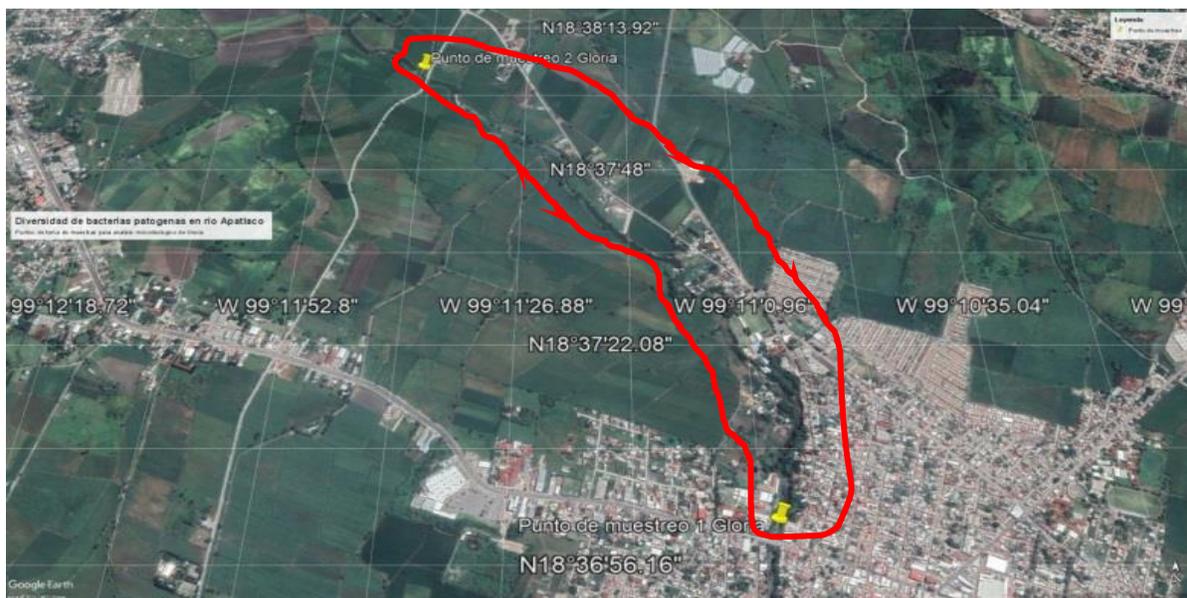


Figura 1. Área de estudio en el río Apatlaco (Google Earth, 2019).

Se definieron dos sitios en el río Apatlaco para la toma de muestras de agua; ambos sitios con características diferentes, el primero cercano a un centro urbano nombrado como “puente de Jojutla” (figura 2), ubicado a un costado de la preparatoria N° 4 de la UAEM (LN 18°36'59.52" y LO 99°11'0.12"). El segundo sitio para la toma de muestras se ubicó en un medio rural, y se denominó como “puente a Galeana” (figura 3), localizado cerca del libramiento a Galeana, en el municipio de Zacatepec (LN 18° 38' 3.57" y LO 99°11' 39.87").



Figura 2. Punto de muestreo “puente de Jojutla” para la toma de muestras de agua, la flecha en color rojo se señala la zona donde se colectaron las muestras.



Figura 3. Punto de muestreo “puente de Galeana” para la toma de muestras de agua, la flecha en rojo marca el lugar donde se tomaron las muestras.

3.2. Toma de muestras de agua

Se realizaron cuatro muestreos durante el periodo enero a octubre del año 2015 (un muestreo cada tres meses; el primero en enero, el segundo en abril, el tercero en julio y el cuarto en octubre de 2015); en diferentes épocas del año (2 en época de lluvias y 2 en época de secas). Las muestras de agua se tomaron basados en la norma oficial mexicana NOM-014-SSA1-1993, tomando un volumen aproximado de 250 ml (por frasco) de agua a 30 cm de profundidad con frascos de plástico estériles (figura 4 y 5).



Figura 4. Colecta de agua en puente de Galeana.



Figura 5. Colecta de agua en puente Jojutla.

El procesamiento de las muestras de agua se llevó a cabo en el área de bacteriología, del hospital Ernesto Meana San Román, ubicado en Av. Universidad s/n colonia Centro, en el municipio de Jojutla, en el estado de Morelos.

3.3. Identificación de bacterias

Para separar las bacterias patógenas de las que no lo son, el procesamiento de las muestras fue de acuerdo con lo propuesto por Henry (2005a y b) y Koneman *et al.*, (2008), que consistió en tomar 3 ml de la muestra de agua y colocarlas en tubos con medio líquido enriquecido BHI (infusión de cerebro corazón), para posteriormente incubarlas en estufa bacteriológica durante 2 horas para emulsionar las posibles bacterias presentes (figura 6).



Figura 6. Incubación de cajas a 37°C

Transcurrido este periodo de tiempo, de los tubos en los que se observó crecimiento bacteriano, en un campo de esterilidad (con un mechero de bunsen encendido) a temperatura ambiente y con ayuda de un isopo estéril, se inocularon placas con medios de cultivos diferenciales y enriquecidos, como agar McConkey (crecimiento de enterobacterias), agar infusión de cerebro corazón y agar SS (desarrollo de bacterias *Salmonella* y *Shigella*) y por último agar sal y manitol (aislamiento selectivo de cepas patógenas de *Staphylococcus*) para obtener colonias únicas (figura 7).



Figura 7. Estriado en cajas con medio diferencial y selectivos

Posteriormente se rotularon las cajas con datos como número de muestra, sitio de colecta, fecha y hora, a continuación, todas las cajas inoculadas se incubaron a 37° en estufa bacteriológica durante 24 horas. De las cepas únicas obtenidas, se volvieron a resembrar en su medio selectivo de cultivo, y se incubaron 24 horas a 37°C. Este proceso se realizó por triplicado para cada muestra de agua por punto de muestreo.

De las placas que registraron desarrollo de cultivos, se tomó una muestra con ayuda de un asa calibrada para inocular tubos con pruebas bioquímicas enzimáticas oxidasa y catalasa, y se identificó macroscópicamente las colonias de tipo patógena; por ejemplo, con hemolisis beta, ácido sulfhídrico u olor a masa (figura 8), y se corroboraron microscópicamente características morfológicas y fenotípicas con la tinción de Gram (figura 9).



Figura 8. Análisis macroscópico de colonias desarrolladas en medio diferencial y selectivo.



Figura 9. observación de láminas teñidas en microscopio

3.3.1. Pruebas bioquímicas en placa de microtitulación

Para esta fase, se tomaron cinco colonias de las cepas puras aisladas que tenían características de ser patógenas, para depositarlas en un tubo con 5 ml de agua desmineralizada (*tubo 1*), se mezclaron con la solución y después se verificó si la muestra alcanzó una turbidez 0.5. Posteriormente, del *tubo 1*, se transfirieron 20 microlitros a un tubo con 11 ml de caldo nutritivo Müller Hinton (*tubo 2*), se agitó hasta homogenizar la muestra para la elaboración de pruebas de susceptibilidad a antibióticos y el aislamiento de especies de los géneros *Neisseria* y *Moraxella*.

Subsecuentemente se colocó el *tubo 1* en el sistema de administración de inoculación automatizado *Sistema de dosificación de inóculo automatizado Thermo Scientific Sensititre AIM* (figura 10), que hace el llenado de 40 pozos con pruebas bioquímicas en las placas de microtitulación. Al finalizar el vaciado del tubo 1, se retiró y se colocó el tubo 2 para llenar los 56 pozos restantes con antibióticos para analizar la resistencia o sensibilidad de las cepas aisladas.

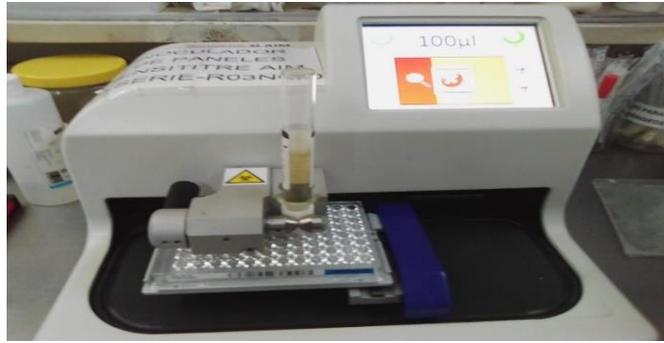


Figura 10. Inoculador de placa de microtitulación *Thermo Scientific Sensititre AIM* llenando placa de microtitulación para bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Terminado este proceso, se incubaron las placas durante 24 horas a 37°C en estufa bacteriológica, al siguiente día se sacaron de la estufa y se leyeron en un *Sistema fluorimétrico de lectura de placas automatizado Thermo Scientific Sensititre OptiRead* (figura 11), y los resultados se analizaron con ayuda del sistema de software para Windows (SWIN) de Sensititre® (figura 12) que determina el género y especie de la cepa aislada.



Figura 11. Lector de placas de microtitulación *Sensititre OptiRead*

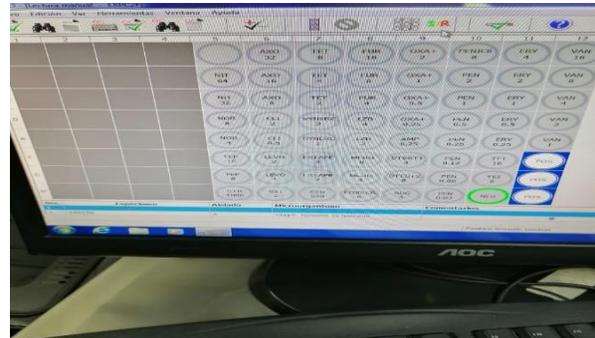


Figura 12. Interpretación de resultados con el software para Windows (SWIN) de Sensititre®

Para la identificación taxonómica de las cepas aisladas de las muestras de agua se utilizaron placas de microtitulación de 96 pozos *Sensititre MEXNC2F* marca *TREK Diagnostic System* para bacterias Gram positivas y Gram negativas. La identidad de presuntos Gram negativos se puede obtener en cinco horas; la identificación hasta el nivel de especie tanto para Gram positivos y negativos se puede obtener incubando durante toda la noche (TREK Diagnostic System Magellan Bioscience, 2008; Thermo Scientific, 2012).

3.3.1.1. Sensititre MEXNC2F para Gram negativas

Para la identificación de bacterias Gram negativas, la placa de microtitulación contiene 32 pruebas bioquímicas (50 μ l) que consisten: Amida metil cumarina de lisina (FR1), fosfato metil umbeliferona (FR3), α -D- glucopiranosido metil umbeliferona (FR4), amida metil cumarina de prolina (FR5), α -D-galactosido metil umbeliferona (FR6), γ -glutamina metil umbeliferona (FR7), Bis fosfato metil umbeliferona (FR8), β -D-glucoronido metil umbeliferona (FR9), β -D-glucopiranosido metil umbeliferona (FR10), 2-acetamido-2-desoxiglucopiranosido más metil umbeliferona de α -L-arabinopiranosido (FR12), urea, ornitina (ORN), sorbitol (SORB), xilosa (XYL), arginina (ARG), sucrosa (SUC), trealosa (TREH), manitol (MANN), celobiosa (CELL), malonato (MALN), maltosa (MALT), inositol (INOS), fructosa (FRUC), piruvato (PYR), citrato (CIT), esculina (ESCU), arabitol (ATOL), arabinosa (ANOS), lisina (LYS), Triptófano desaminasa (TDS), rafinosa (RAFF) y agmantina (AGMA).

La placa también contiene pruebas de sensibilidad a 24 antimicrobianos con diferentes rangos de dilución [μ g/ml] que fueron: ampicilina (AMP) [16-4], amikacina (AMI) [32-16], aztreonam (AZT) [16-8], cefepima (FEP) [16-8], ceftazidima (TAZ) [16-8], imipenem (IMI) [8-4], norfloxacino (NOR) [8-4], piperacilina/tazobactam (P/T4) [64/4- 16/4], trimetoprima/sulfametazol (SXT) [2/38], carbenicilina (CAR) [32-16], cefalotina (CEP) [16-4], cefotaxima (FOT) [32-8], meropenem (MERO) [8-4], ciprofloxacino (CIP) [2-0.5], gentamicina (GEN) [8-2], cloranfenicol (CHL) [16-4], tetraciclina (TET) [8-4], nitrofurantoina (NIT) [64-32], ofloxacino (OFL) [4-1], ticarcilina/ácido clavulánico (TIM2) [64/2-16/2], tobramicina (TOB) [8-4], levofloxacino (LEVO) [4-1], piperacilina (PIP) [64-16] y cefuroxima (FUR) [16-4].

3.3.1.2. Sensititre MEXNC2F para Gram positivas

En el caso de las Gram positivas, los test bioquímicos (50 μ l) radicaron en: β -D-galactopiranosido metil umbeliferona (FR13), β -D-glucopiranosido metil umbeliferona (FR14), amida metil cumarina de alanina (FR15), β -D-ribofuranosido metil umbeliferona

(FR16), amida metil cumarina D-alanina (FR17), β -D-piranosido metil umbeliferona (FR18), amida metil cumarina de ornitina (FR19), amida metil cumarina de arginina (FR20), β -D-glucuronido metil umbeliferona (FR21), α -D-glucopiranosido metil umbeliferona (FR22), amida metil cumarina de cisteina (FR23), amida metil cumarina de treonina (FR24), amida metil cumarina de metionina (FR25), amida metil cumarina de prolina (FR26), amida metil cumarina de serina (FR27), amida metil cumarina de citrulina (FR28), amida metil cumarina de piroglutamato (FR29), amida metil cumarina de tirosina (FR30), amida metil cumarina de leucina (FR31), amida metil cumarina de valina (FR32), B-metilglucosido (B-MG), urea, esculina (ESCU), arginina (ARG), raminosa (RHAM), manitol (MANN), trehalosa (TREH), maltosa (MALT), glicerol (GLYC), glucosa (GLUC), sucrosa (SUC) y sorbitol (SORB).

Las pruebas de sensibilidad de la placa incluyen 25 antimicrobianos, que al igual que la placa para la identificación de Gram negativas, cuenta con diferentes niveles de dilución [μ g/ml]. Los antimicrobianos que contiene son: nitrofurantoina (NIT) [32-64], norfloxacin (NOR) [4-8], cefepima (FEP) [8-16], estreptomina (STR) [1000], ceftriaxona (AXO) [8-32], clindamicina (CLI) [0.5-2], levofloxacin (LEVO) [1-2], trimetoprima/sulfametoxazol [2/38], tetraciclina (TET) [2-8], quinupristina/dalfopristina (SYN) [1/2], ertapenem (ETP) [2-4], gentamicina (GEN) [500], cefuroxima (FUR) [4-16], linezolid (LZD) [2-4], meropenem (MERO) [4-8], cribado de cefoxitina (FOX) [6], oxacilina + 2% NaCl (OXA+) [0.25-2], ampicilina (AMP) [0.25], test 1 de difusión de doble disco clindamicina/eritromicina (DT1), test 2 de difusión de doble disco clindamicina/eritromicina (DT2), amoxicilina/ácido clavulánico (AUG) [4/2], penicilina (PEN) [0.03-8], eritromicina (ERY) [0.25-4], telitromicina (TEI) [8-16] y vancomicina (VAN) [1-16].

La prueba de sensibilidad no aplica para el género *Streptococcus* del grupo D, ya que, presentan un antígeno que no es un carbohidrato sino un ácido glicérido teicoico (antígeno D), que parece estar asociado con el citoplasma de la membrana plasmática que le da la capacidad de crecer en altas temperaturas y concentraciones de sal, lo que lo hace ser muy resistente a casi a todos los antibióticos. Son bacterias Gram positivas no hemolíticas, constituyen la biota normal del tracto intestinal, solo pueden ser eliminadas con gentamicina en concentraciones muy altas (Koneman *et al.*, 2008).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente investigación se aislaron 26 cepas, las cuales se relacionaron taxonómicamente con dos filos, dos clases, cuatro órdenes, siete familias, 14 géneros, 17 especies y una subespecie (cuadro 1).

Cuadro 1. Composición taxonómica de las bacterias identificadas en el río Apatlaco

Filo	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie					
Firmicutes	Bacilli	Bacilliales	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	sp.					
					<i>albus</i>					
					<i>aureus</i>					
					<i>epidermidis</i>					
		Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Lactobacilliales	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	sp.			
							<i>faecalis</i>			
				Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	sp.		
								Citrobacter	<i>freundii</i>	
									<i>Enterobacter</i>	sp.
										<i>aerogenes</i>
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia</i>	<i>cloacae</i>					
					<i>Klebsiella</i>	<i>coli</i>				
						<i>oxytoca</i>				
					<i>Morganella</i>	<i>ozaenae</i>				
						<i>pneumoniae</i>				
						grupo 47				
					Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Morganellaceae	<i>Morganella</i>	sp.
<i>Raoultella</i>	<i>planticola</i>									
	<i>Salmonella</i>	sp.								
		<i>Shigella</i>	sp.							
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Yersiniaceae	<i>Proteus</i>	sp.					
					<i>Serratia</i>	<i>marcesens</i>				
						<i>proteomacula</i>				
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	<i>Vibrio</i>	<i>rubidaea</i>					
					<i>fluvialis</i>					
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	<i>Vibrio</i>	<i>vulnificus</i>					

El filo Proteobacteria fue el más representativo con 19 taxones (76%) seguida del filo Firmicutes con seis taxones (24%), siendo las bacterias entéricas Gram negativas fueron las más predominantes, con 20 taxones, que se relacionaron a 13 especies y una subespecie; seguidas; forman un grupo muy grande y heterogéneo cuyo hábitat natural es el tracto gastrointestinal de humanos y otros animales; y las Gram positivas con seis cepas que correspondieron a cuatro especies. La especie *Klebsiella* grupo 47 fue la más frecuente, ya que se encontró en el 85.7% de las muestras, seguida por *K. oxytoca* que se aisló en el 57.1% y las especies: *Klebsiella* sp., *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp., *S. epidermidis*, *S. faecalis*, *S. rubidaea*, *E. coli* y *V. fluvialis* se aislaron en el 28.5 % de las muestras; el resto de las especies solo se identificaron en el 14.2% de las muestras de agua colectadas en el río Apatlaco.

La mayoría de las especies identificadas son bacterias entéricas, provenientes del tracto gastrointestinal de animales y humanos, denominadas bacterias fecales, cuya capacidad de sobrevivir y reproducirse en el agua es restringida dado el estrés fisiológico que presenta el medio acuoso y establecerlas como bioindicadoras tiene alto grado de complejidad, pero su hallazgo está asociado con infecciones recientes o con presencia de materia orgánica y condiciones de pH, humedad y temperatura que faciliten su reproducción y sobrevivencia (Ríos-Tobón *et al.*, 2017).

Nuestros resultados concuerdan con los de otros estudios similares en el país (Mondragón *et al.*, 2011; Ramírez-Castillo *et al.*, 2013; Mazari-Hiriart *et al.*, 2005; 2014; Pérez *et al.*, 2018; Breton-Deval *et al.*, 2019), donde la comunidad bacteriana estuvo dominada por coliformes fecales y patógenas oportunistas en los sitios con indicios de contaminación antropogénica. El crecimiento de la población humana en las últimas décadas y su concentración en las ciudades, han contribuido al deterioro de la calidad del agua, y este fenómeno se hace más evidente en países en desarrollo; ya que a menudo se trata de poblados donde el saneamiento del agua residual es inadecuado, además de que los vectores y animales portadores de bacterias infecciosas no tienen barreras que impidan su dispersión (Wolf-Rainer, 2011).

Los organismos indicadores (p. Ej., coliformes conformes y termotolerantes) se utilizan ampliamente como sustitutos para la detección de patógenos (Chin, 2010; Ibekwe *et al.*, 2013), por lo que la composición de la comunidad microbiana en los ríos, se sugiere como un indicador de contaminación (Wolf-Rainer, 2011).

En el río Apatlaco se registró un gran número de bacterias en comparación con otros estudios sobre microbiota patógena de ríos (Buckley *et al.*, 1998; Mazari-Hiriart *et al.*, 2005; Wilkes *et al.*, 2011; Stanish *et al.*, 2016), considerando que los microbios en los ríos son diversos y dinámicos en su composición, debido en gran parte al estrés ambiental provocado por la mayoría de las ciudades ubicadas cerca de los ríos, ya que con frecuencia los utilizan como vertederos de aguas residuales y alcantarillados, que contienen enterobacterias principalmente (Wolf-Rainer, 2011), aunque las cuencas pueden tener muchas fuentes de patógenos como: tierras agrícolas, áreas ribereñas, operaciones de alimentación agrícola, ganado, vida silvestre y humanos.

Estas bacterias y enterobacterias encontradas en el río Apatlaco puede que no se encuentren de forma natural en el agua de este afluente, debido a que, con el paso de los años, los asentamientos humanos fueron en crecimiento, aumentando la contaminación al verter sus desechos, así como aguas residuales y aguas negras a lo largo de su trayecto lineal, hasta su conexión con el Río Yautepec en el poblado de Tlatenchi (CONAGUA, 2008), mostrando una clara perturbación ambiental, efecto confirmado con un estudio más reciente, que analizó parámetros de calidad del agua y la dinámica de las comunidades bacterianas (Breton-Deval *et al.*, 2019), y sigue registrando abundancia de géneros de potenciales patógenos oportunistas como *Acinetobacter*, *Arcobacter* y *Myroides*, entre otros.

Existe una interacción compleja de factores ambientales y de comportamiento tanto de animales como de humanos, que facilitan la propagación de infecciones por varios patógenos, las malas condiciones de saneamiento e higiene, así como la falta o poca conciencia ambiental entre las personas, se consideran la principal causa de contaminación de las fuentes de agua (Igbinosa y Okoh, 2010). Actualmente, uno de los

problemas ambientales más graves de México son los altos niveles de contaminación de muchos de sus ríos, convirtiéndose en un peligro potencial para la salud de las personas que viven en las comunidades ribereñas cercanas y la relación entre los niveles de bacterias coliformes totales y el aumento de enfermedades del tracto digestivo humano (Rodríguez-Tapia y Morales-Novelo, 2017). De acuerdo con Baker y Herson (1999), los brotes de enfermedades transmitidas por el agua se deben principalmente a su contaminación con materia fecal, provocando un estimado de más de dos millones de muertes y cuatro mil millones de casos de diarrea al año (WHO, 2000; El Kowrany *et al.*, 2016).

Dentro de las bacterias establecidas como contaminantes del agua se han aislado Gram negativas, especialmente pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Gallionella*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Moraxella* y *Acinetobacter*, sin embargo, el grupo bacteriano que cumple con las características de potencial bioindicador de calidad del agua es el de las bacterias coliformes, enterobacterias o Enterobacteriaceae, que corresponden a 10% de los microorganismos intestinales humanos y animales, por lo que su presencia en el agua está asociada con contaminación fecal e indica tratamientos inadecuados o contaminación posterior (Ríos-Tobón *et al.*, 2017).

Las Enterobacteriaceae son una gran familia de bacterias Gram-negativas que incluye patógenos familiares como *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Klebsiella* y *Shigella* junto con muchos simbiontes inofensivos (Mampallil *et al.*, 2017), por lo que algunas especies identificadas en el estudio pueden ser bacterias asociadas a las plantas, como rizosféricas, endofíticas y filoplanas, y algunas se han utilizado en el biocontrol de otros agentes patógenos. Pero también incluye a varias especies patógenas que causan síndromes diarreicos, además de causar infecciones que se adquieren en hospitales y asociados con altos rangos de morbilidad y mortalidad (Ramos-Vivas *et al.*, 2020), y su diseminación en el agua, se asocia con la presencia de mecanismos reguladores que controlan la permeabilidad de la membrana y la expresión de enzimas desintoxicantes (β -lactamasas de espectro extendido) involucradas en la

degradación/inactivación de antibióticos, además de que tienen la capacidad de adquirir e intercambiar numerosos elementos móviles genéticos, que contribuyen fuertemente a la resistencia a los antibióticos y les ayuda a colonizar varios entornos, huéspedes y a adaptar rápida y eficazmente su metabolismo y fisiología a las condiciones externas y las tensiones ambientales (Polo *et al.*, 1999; Tzelepi *et al.*, 2000; Davin-Regli y Pagès, 2015).

Estas bacterias coliformes, enterobacterias o Enterobacteriaceae todavía son consideradas como potencial bioindicador de calidad del agua, y este grupo incluye géneros *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, y *Citrobacter*; identificados en la investigación, pero estos cuatro últimos se encuentran en grandes cantidades en fuentes de agua, vegetación y suelos, por lo que no están asociados necesariamente con contaminación fecal y no plantean ni representan necesariamente un riesgo evidente para la salud, aunque hay varios reportes que difieren de este punto de vista. Sin embargo, las especies de géneros *Enterobacter* y *Klebsiella* colonizan superficies interiores de las tuberías de agua y tanques de almacenamiento, que forman biopelículas en presencia de nutrientes, temperaturas cálidas, bajas concentraciones de desinfectantes y tiempos largos de almacenamiento (Ríos-Tobón *et al.*, 2017).

4.1. Comparación entre los sitios de muestreo

La calidad del agua en entornos rurales y urbanos se ve afectada tanto por procesos naturales como por influencias antropogénicas (Khatri y Tyagi, 2015), por lo que, las precipitaciones y descargas generales se asocian con la densidad y presencia de bacterias indicadoras y la detección de patógenos en distintas partes de un río (Wilkes *et al.*, 2009).

4.1.1. Punto de muestreo 1 Puente de preparatoria de Jojutla

De acuerdo a nuestros resultados, existen diferencias entre los sitios de muestreo; el punto del puente de Jojutla fue el que más especies presento (19 taxas), en comparación con el punto del puente a Galeana solo fueron (13 taxones) (cuadro 2).

Cuadro 2. Especies identificadas en los sitios de muestreo 1 y 2 en el río Apatlaco.

Sitio 1 Puente de Jojutla	Sitio 2 Puente a Galeana
Especies	Especies
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella</i> sp.
<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Klebsiella</i> grupo 47
<i>Klebsiella</i> grupo 47	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella ozaenae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus</i> sp.
<i>Morganella</i> sp.	<i>Salmonella</i> sp.
<i>Raoultella planticola</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Salmonella</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.
<i>Serratia proteamacula</i>	<i>Vibrio fluvialis</i>
<i>Serratia rubidaea</i>	
<i>Shigella</i> sp.	
<i>Staphylococcus albus</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
<i>Streptococcus</i> sp.	
<i>Vibrio vulnificus</i>	

Las cepas se relacionaron taxonómicamente con dos clases, cuatro órdenes, cinco familias, 12 géneros, 12 especies y una subespecie. Las enterobacterias del complejo de especies de *Klebsiella* fueron las más representativas, ya que las especies *Klebsiella* grupo 47 y *K. oxytoca*, se consideraron las más frecuentes ya que fueron aisladas en el 75% de las muestras; seguidas por *K. pneumoniae*, *E. coli* y el género *Serratia*. Identificadas en el 50% y el resto de los taxos se identificaron en el 25% de las muestras, por lo que podrían considerarse como especies poco frecuentes en ese punto del río. Diez taxones exhibieron multirresistencia a antimicrobianos, donde los más relevantes fueron *klebsiella oxitoca* *klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella* del grupo 47 (resistencia a

15 antibióticos) y *Citrobacter freundii* (multirresistente a 18 antimicrobianos), pero su hallazgo fue poco frecuente.

Como se ha mencionado, este punto de muestreo corresponde a una zona urbana, y el río en este punto ya manifiesta características de los ríos vinculados a los centros poblados en los países denominados “en desarrollo” como un deterioro de la calidad físico-química (presencia de olor), disminución y pérdida de la biodiversidad, deterioro del aspecto visual y destrucción del paisaje y la aparición de patógenos (Kuczynski, 2016) como lo confirman nuestros resultados, además de recibir aguas residuales y residuos de habitantes, hospitales (Dr. Ernesto Meana San Román) y de tipo industrial (Guzman-Otazol *et al.*, 2019).

Una investigación de Ribas *et al.*, (2017) sobre patógenos transportados por el agua en la República Democrática Popular de Lao, indicó la presencia de varios patógenos entéricos como *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp., cepas de *E. coli* productoras de verocitotoxina, *Shigella* spp., y adenovirus entérico, en el que el nivel de contaminación por patógenos microbianos se asoció con la actividad humana, observando mayores niveles de contaminación en el sitio río abajo en comparación con el sitio en la aldea y río arriba, respectivamente, lo que también se reflejó en los resultados obtenidos, con un mayor número de taxas identificados en la zona urbana, en comparación con la zona agrícola.

Las especies identificadas en este punto de muestreo son similares a los de otros estudios similares, donde la mayor cantidad de patógenos se han identificado en agua de escorrentía urbana (Ibekwe *et al.*, 2013; Guzman-Otazol *et al.*, 2019) y donde los filos principales son Proteobacteria y Firmicutes, donde los miembros más comunes suelen ser *Escherichia coli* (DEC), *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella* spp. y enterobacterias.

4.1.2. Punto de muestreo 2 Puente a Galeana

Los taxones identificados correspondieron a dos clases, cuatro órdenes, seis familias, nueve géneros, ocho especies y una subespecie. En este punto, de los 12 taxones identificados, los más frecuentes fueron *Klebsiella* del grupo 47, identificado en el 100% de las muestras de esta zona, seguida por *E. cloacae*, *K. oxytoca*, *Staphylococcus* sp. y *V. fluvialis* se aislaron en el 66.6% de las muestras. El resto de las especies solo se identificaron en el 33.3% de las muestras. En esta zona se encontraron pocas cepas multirresistentes, resaltando las especies *S. rubidaea* y *Klebsiella* grupo 47, multirresistentes a 15 antimicrobianos); y *E. cloacae*, multirresistente a 16 antibióticos.

Este punto de muestreo, presenta características de una zona agrícola, y este tipo de ambientes son ejemplos típicos de la interacción de factores ambientales y de comportamiento tanto de animales como de humanos, que facilitan la propagación de infecciones por varios patógenos; ya que varias prácticas agrícolas involucran el uso de aguas residuales o estiércol de ganado en las granjas, además de su pastoreo cerca de áreas de captación de agua (Igbinosa y Okoh, 2010), y por consiguiente, hay reportes de la supervivencia de una gran variedad de bacterias enteropatógenas (Terzieva y Mcfeters, 1991; Wilkes *et al.*, 2009) en este tipo de ambientes.

En entornos agrícolas, las densidades de *E. coli* eran los clasificadores más útiles de la presencia y ausencia de parásitos/patógenos, seguidos de cerca por los coliformes fecales y, en menor medida, los enterococos y los coliformes totales (Wilkes *et al.*, 2009). Por lo que podemos considerar como fuente importante de microorganismos patógenos en el río Apatlaco para este punto, las bacterias que proceden de parcelas agrícolas abonadas con estiércol de ganado; fresco o seco, y purines porcinos, que liberan una gran carga microbiana durante la precipitación intensa, y el agua superficial en este tipo de ambientes puede servir como un vehículo persistente para la transmisión de estas bacterias enteropatógenas entre animales y humanos (Terzieva y Mcfeters, 1991).

Wolf-Rainer (2011), menciona que existen reportes donde se estudiaron bacterias patógenas y sus resistencias a antibióticos en puntos cercanos a la ciudad y alejados de la misma, donde se demostró que las bacterias patógenas se perdían kilómetros río abajo, ya que durante los periodos de lluvias, las aguas residuales incluidas las fecales se transportan a los ríos y río abajo, lo que explicaría haya grupos taxonómicos que se comparten en ambos sitios; al menos cinco para ser exactos, que corresponden a las especies *E. faecalis*, algunos miembros del complejo de especies de *Klebsiella* sp. (*K. oxytoca* y *K. pneumoniae* grupo 47) y *Salmonella* sp.

La calidad microbiológica del agua que se utiliza en el riego de cultivos y hortalizas, adquiere importancia en términos de salud pública, ya que esta podría ser el vehículo para la transmisión de bacterias patógenas a la población, algunas de las cuales podrían presentar determinantes génicos de resistencia a antimicrobianos (Valenzuela *et al.*, 2016).

4.2. Presencia de bacterias patógenas por época del año

La participación del cambio climático es un punto importante a considerar en la aparición de bacterias patógenas en los ríos, ya que las fluctuaciones entre las épocas de secas y lluvias, genera algunas temporadas de inundaciones, que afectan a las plantas de alcantarillado, y un gran número de patógenos son arrastrados hacia las áreas inundadas y los ríos, donde quedan lodos que son reservorios de microorganismos enriquecidos con patógenos facultativos, que son más abundantes y frecuentes durante esta época (Jiménez *et al.*, 2014).

El análisis comparativo entre la época de lluvias y secas del periodo 2015, arrojó una diferencia evidente, ya que en la época de secas se identificaron 20 taxas, en comparación con 13 que se aislaron durante las lluvias (cuadro 3).

Cuadro 3. Especies identificadas por época del año en los puntos de muestreo del río Apatlaco

Época de secas Enero-Abril 2015	Época de lluvias Julio-Octubre 2015
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Enterobacter</i> sp.
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella</i> grupo 47
<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Klebsiella</i> grupo 47	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Morganella</i> sp.
<i>Klebsiella ozaenae</i>	<i>Raoultella planticola</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella</i> sp.
<i>Proteus</i> sp.	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Salmonella</i> sp.	<i>Serratia proteomacula</i>
<i>Serratia rubidaea</i>	<i>Serratia rubidaea</i>
<i>Shigella</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.
<i>Staphylococcus</i> sp.	
<i>Staphylococcus albus</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
<i>Streptococcus</i> sp.	
<i>Vibrio fluvialis</i>	
<i>Vibrio vulnificus</i>	

Numerosos patógenos son vehiculizados por el agua y pueden permanecer en el agua además de que se adaptan fácilmente a condiciones cambiantes, conservando su poder patogénico y adicionalmente pueden desarrollar mayor resistencia (Kuczynski, 2016), esto explicaría por qué se identificaron más especies durante la época de secas que en las lluvias, en donde las bacterias patógenas pueden ser transportadas por el flujo del agua río abajo, donde se ha demostrado que las bacterias patógenas se pierden kilómetros río abajo (Wolf-Rainer, 2011).

Expertos sobre Cambio Climático han manifestado reiteradamente, que además de impactos económicos y ambientales, el cambio climático traerá impactos negativos

directos sobre la salud humana, con el aumento de enfermedades en las plantas, animales y en los humanos; ya se observa la frecuencia de *Staphylococcus* y enterobacterias en órganos de peces, que es ya una característica de peces de ríos tropicales, además de estar altamente vinculadas a infecciones en humanos (Kuczynski, 2016). Los animales acuáticos, están en contacto más íntimo con los microbios externos que los animales terrestres, por tanto, se considera que la microbiota de su tracto gastrointestinal y branquias es un reflejo de la composición de la microbiota del agua de su medio ambiente (Al-Hisnawi *et al.*, 2016).

Por lo que nuestros resultados indican un alto riesgo de transmisión de enfermedades por el uso y consumo de peces o verduras regadas con agua de esos puntos de muestreo del río Apatlaco.

4.3. Caracterización de la patogenicidad

De acuerdo con los resultados registrados de las pruebas bioquímicas con las placas de microtitulación, de los 26 taxas identificados, 13 (52%) exhibieron resistencia a los antimicrobianos evaluados; y de este grupo se pueden identificar nueve perfiles de multirresistencia. La resistencia y multirresistencia bacteriana a antimicrobianos y su prevalencia en microorganismos que causan bacteriemia es un problema de magnitud creciente y provoca gran preocupación en todo el mundo, ya que representa una seria complicación su tratamiento (Philippe *et al.*, 2015; Anderson *et al.*, 2018; Ramos-Vivas *et al.*, 2020).

Enterobacter sp. y *Klebsiella pneumoniae* mostraron resistencia a tres antibióticos (ampicilina, tetraciclina y ticarcilina/ácido clavulánico y ampicilina, imipenem y meropenem respectivamente). Las especies de *Enterobacter* pueden aislarse del medio ambiente (suelo y agua), de plantas (como endófitas o fitopatógenas) y como patógenas oportunistas (animales y seres humanos), además de estar involucrada en infecciones nosocomiales, principalmente en la unidad de cuidados intensivos, donde afecta a pacientes inmunocomprometidos tales como recién nacidos, infantes prematuros, pacientes con

diabetes mellitus, pacientes quemados o con múltiples traumatismos y pacientes con leucemia o bajo alguna terapia inmunosupresora. Pero su resurgimiento como un patógeno resistente es un problema de salud importante, especialmente cuando se considera la escasez de nuevos antibióticos activos contra bacterias Gramnegativas. Otro punto importante es que el complejo de especies del género *Enterobacter* pertenecen al grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aureoginosa* y especies de *Enterobacter*), que se caracteriza por contener a las bacterias patógenas con mayor resistencia a antimicrobianos (Davin-Regli *et al.*, 2019).

La especie *K. pneumoniae*, es una bacteria ampliamente esparcida en el ambiente; se encuentra de forma natural en el suelo, el agua, verduras (coles, lechuga, vegetales de hojas verdes) y presente de manera especial en las superficies mucosas de mamíferos; en los seres humanos coloniza la nasofaringe y el tracto gastrointestinal, al respecto, es importante señalar que la tasa de colonización se incrementa hasta tres veces en el ambiente hospitalario (Echeverri y Correa, 2010). Algunas de sus cepas se asocian con infecciones del sistema nervioso central y endoftalmitis (Russo y Marr, 2019), afecciones hepáticas, polimicrobianas y asociadas con una alta mortalidad y altas tasas de recaída (Wang *et al.*, 1998), infectando personas especialmente susceptibles, como hospitalizados en unidades de cuidados intensivos, neonatos, inmunocomprometidos y los que tienen enfermedades debilitantes de base; como diabetes mellitus o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Echeverri y Cataño, 2010).

La diseminación de Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas se considera actualmente un problema clínico grave, debido al fracaso en el tratamiento de las infecciones producidas por ellas, y se ha identificado en las principales especies de enterobacterias relacionadas con infecciones asociadas a la salud, pero en *K. pneumoniae* se le considera la especie predominante en la producción de estas enzimas (Vera-Leiva *et al.*, 2017). Su alto porcentaje de aislamientos en muestras clínicas, así como el hallazgo de resistencia a múltiples familias de antimicrobianos, constituye en la

actualidad, un problema de salud en varios países; por lo que su identificación en el río Apatlaco, es un dato de interés en nuestro estado y país.

Se identificó una cepa de *Klebsiella* sp., que exhibió resistencia a seis antimicrobianos (ampicilina, ciprofloxacino, imipenem, meropenem, tobramicina y trimetropima/sulfametoxazol). Este género es responsable de neumonía, infecciones del tracto urinario (ITU), infecciones del torrente sanguíneo y sepsis, y una característica definitoria de estas infecciones es su morbilidad y mortalidad, y las cepas de *Klebsiella* asociadas con ellas se consideran hipervirulentas. El creciente aislamiento de sus cepas resistentes a múltiples fármacos ha reducido significativamente, o eliminado por completo las opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones por *Klebsiella*, por lo que varias organizaciones han señalado a este patógeno como una amenaza urgente para la salud humana (Bengoechea y Sa Pessoa, 2019).

Enterobacter aerogenes muestra resistencia a 8 antibióticos (amikacina, ampicilina, cefuroxime (sodio), cloranfenicol, gentamicina, tetraciclina, ticarcilina/ácido clavulánico y trimetropima/sulfametoxazol). Se ha reportado una considerable prevalencia de *E. aerogenes* (Thiolas *et al.*, 2005; Philippe *et al.*, 2015) en infecciones hospitalarias, así como la facilidad que tienen para la transmisión horizontal de elementos móviles que contienen genes de resistencia a antibióticos, además de la eficacia del intercambio de genes de resistencia *Klebsiella pneumoniae* para *Enterobacter* sp. (Davin-Regli *et al.*, 2019), ambas identificadas en los puntos de muestreo. Cepas de *E. aerogenes* resistentes a múltiples fármacos se aíslan cada vez más en Europa y especialmente en Francia, provocando una tasa de mortalidad del 100% (Bornet *et al.*, 2000), además de que se reportado asociada con otras especies bacterianas, provocando enfermedades espontáneas con una tasa de mortalidad cercana al 100% (Rondina *et al.*, 2006).

Otro dato relevante sobre *E. aerogenes* es su aplicación en la elaboración de biocombustibles, ya que usa pequeñas cantidades de oxígeno en condiciones semi-anaeróbicas para su crecimiento antes de usar oxígeno de sales descomponibles,

principalmente NH_4NO_3 , en condiciones anaeróbicas para producir hidrógeno y etanol (Jitrwung y Yargeau, 2015).

Vibrio fluvialis presenta resistencia a nueve antibióticos (ampicilina, aztreonam, carbenicilina, cefuroxime (sódico), ciprofloxacino, ofloxacino, tetraciclina, ticarcilina/ácido clavulánico y trimetoprima/sulfametoxazol). Las especies del género *Vibrio*, incluyendo *V. fluvialis*, se encuentran ampliamente distribuidas en el medio acuático, principalmente en estuarios y aguas salobres, se ha aislado de agua, heces de animales y de humanos, aguas residuales y productos del mar, principalmente en moluscos bivalvos por filtración (Guzmán-Hernández et al., 2016), por lo que se le considera un patógeno en los entornos costeros, y por este motivo es rara su presencia en el río Apatlaco, pero teniendo en cuenta el reciente aumento en el número de brotes de diarrea y casos extraintestinales esporádicos, se le ha considerado un patógeno emergente. En regiones más cálidas como Florida, se ha detectado predominantemente en sedimentos durante los meses de invierno, y en comparación con otros vibriones, su aislamiento es frecuente en los efluentes de las comunidades suburbanas de otros países (Ahmed et al., 2005; Ramamurthy et al., 2014). La fracción de aguas residuales tratadas que se descargan en las cuencas hidrográficas ha aumentado a lo largo del tiempo, lo que ha provocado el reporte de la incidencia de *V. fluvialis* emergente (Igbinosa y Okoh, 2010).

Aunque se ha identificado a *V. fluvialis* como patógeno desde hace bastante tiempo, ahora se reconoce su importancia clínica, ya que su prevalencia en casos de diarrea está aumentando (Ramamurthy et al., 2014), además de su participación en casos de gastroenteritis entre los bebés, diarrea similar al cólera, infecciones de piel asociadas a la exposición a ambientes acuáticos y causando una variedad de infecciones en pacientes inmunocompetentes/VIH (Ahmed et al., 2005; Igbinosa y Okoh, 2010; Ramamurthy et al., 2014; Guzmán-Hernández et al., 2016). En comparación con otros vibrios clínicos, la resistencia a los antimicrobianos se ha reportado en gran medida en *V. fluvialis*, ya que se ha demostrado que contiene varios elementos genéticos móviles portadores de multiresistencia, pudiendo transferir esos elementos por conjugación a

otras especies de bacterias, como *Escherichia coli* (Ahmed *et al.*, 2005) y *V. cholerae* (Rajpara *et al.*, 2009).

La especie *Klebsiella oxytoca* mostro resistencia a 12 antimicrobianos (ampicilina, aztreonam, cefotaxime, ceftazidime, cefuroxime (sodio), cloranfenicol, ciprofloxacino, gentamicina, levofloxacino, tetraciclina, ticarcilina/ácido clavulánico y trimetoprima/sulfametoxazol). A esta bacteria se le considera como un patógeno oportunista, implicado en diversas enfermedades clínicas en animales y seres humanos (Darby *et al.*, 2014). Se le considera el agente causante de la colitis hemorrágica asociada a antibióticos (Zollner-Schwetz *et al.*, 2008), que actúa como patobionte intestinal por caquexia por cáncer (Pötgens *et al.*, 2018); y recientemente se demostró que participa en del desarrollo de la enterocolitis necrotizante (enfermedad inflamatoria intestinal) asociada con la disbiosis bacteriana intestinal (Paveglio *et al.*, 2020).

Las especies *Serratia proteomacula* y *Escherichia coli*, presentaron resistencia a 14 antibióticos. Las especies del género *Serratia* no forman parte de la microbiota intestinal humana, su hábitat generalmente se encuentra en la naturaleza (Sekhsokh *et al.*, 2007), pero existen reportes de cepas del género causando el 2% de las infecciones nosocomiales, que se limitan generalmente a las especies *Serratia liquefaciens* y *Serratia marcescens* (Gentile *et al.*, 2014; Karkey *et al.*, 2018), esta última identificada durante el desarrollo de la investigación. En el caso de *Serratia proteomacula*, al igual que *S. marscecens*, se le considera un patógeno oportunista y su principal utilidad es el área de la biotecnológica, ya que es útil en la producción de compuestos antitumorales activos, antimicrobianas, larvicidas y antinematoides de inmunomodulación para aplicaciones farmacéuticas (Miao *et al.*, 2013; Mampallil *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2020).

La EPA (2005), estableció a *E. coli* y otras bacterias como indicadores de contaminación fecal del agua, de manera que la mayoría de los estudios sobre calidad del agua se basan en su detección para señalar los niveles de patógenos, pero por sí sola puede generar información engañosa. Además de que esta especie debe su importancia a que tiene un doble papel; como indicador de contaminación fecal y como patógeno; se han

aislado serotipos de esta bacteria como la 0.157 bastante patógeno que provoca la llamada *diarrea del viajero* que con pocas células puede montar una grave infección (Phillips *et al.*, 1988), con predominio en el tracto urinario (cistitis) hasta sepsis potencialmente mortal (bacteriemia) y meningitis, y su infección ocurre en humanos de todas las edades (Rogers *et al.*, 2011; Ríos-Tobón *et al.*, 2017).

El gen *tet* (M), codifica una proteína que actúa como un transportador activo, permitiendo la resistencia a tetraciclina originalmente se ha detectado en bacterias Gram-positivas, y su combinación con otros elementos se detectaron por primera vez en *E. coli* aislada de una cuenca fluvial natural, lo que sugiere que este gen podría haberse transferido de otras especies bacterianas a través de la transferencia horizontal de genes (Hu *et al.*, 2008), y en los ríos se han aislado cepas resistentes de *E. coli* no solo de origen clínico, sino también ambiental (Romeu *et al.* 2012; Ramírez-Castillo *et al.*, 2013; Guzman-Otazol *et al.*, 2019) lo cual agrava la situación.

Ya se ha demostrado una amplia distribución de *E. coli* resistente a los antimicrobianos en Europa (particularmente el Reino Unido), América del Norte, Canadá, Japón y Corea, y se sugieren tasas altas a en Asia, Oriente Medio y África, además de en animales de compañía, animales que no son de compañía y alimentos (Rogers *et al.*, 2011), por lo que no es extraño encontrarlos en cuerpos de agua alterados por actividad antropogénica (Guzman-Otazol *et al.*, 2019) y la presencia de una cepa multirresistente en el río Apatlaco indica claramente el riesgo biológico a la salud animal y humana en el área de estudio.

Las especies *Klebsiella* grupo 47 y *Serratia rubidaea* exhibieron resistencia a 15 antibióticos, la especie *Klebsiella* del grupo 47 se considera una subespecie de *K. pneumoniae*, especie más estudiada y de mayor relevancia clínica. Esta cepa tiene como hábitat habitual drenajes de aguas negras, donde fue aislada en 1989, por lo que se considera como un indicador fecal muy consistente. Sus colonias son grandes y con moco; debido a las propiedades bioquímica que tiene este bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo y tiene como defensa un lipopolisacárido capsular, sustancia

mucoide que no permite su fácil fagocitación por el sistema y además de su significativa resistencia β -lactamica. Datos del año 2009 recolectados en el Departamento de Antioquia (Colombia) por el grupo para el control de resistencia bacteriana de Bogotá, señalan a este agente como el segundo microorganismo más aislado en pacientes hospitalizados, por lo que se le considera microorganismos multirresistentes (Suarez *et al.*, 2015). *Klebsiella* del grupo 47 fue la más relevante, ya que se encontró en todos los cultivos que se analizaron, en ambos sitios de muestreo y durante la duración de la presente investigación.

La especie *S. rubidaea*, es una enterobacteria cuyo hábitat no es bien conocido, sin embargo, se ha aislado en la naturaleza (frutas, vegetales y cocos, pero no en el agua, insectos, pequeños mamíferos u otros animales) (Rojo *et al.*, 1996; Gentile *et al.*, 2014), por lo que su registro en el agua del río Apatlaco es un dato importante para futuros aislamientos en el ambiente. Se ha descrito como agente causal de infecciones del tracto respiratorio, urinario, de úlceras o heridas, por lo que se le considera como patógeno oportunista, generalmente nosocomial, que afecta a pacientes debilitados o inmunocomprometidos, sometidos a tratamiento antimicrobiano de amplio espectro, cirugías extensas, instrumentalización de la vía urinaria u otros procedimientos invasores. Se han recuperado cepas del esputo, y de fuentes extra-intestinales; como fuentes respiratorias, sangre, heridas y fuentes similares (Johnson y Ellner, 1974), y rara vez se aíslan de muestras clínicas (Karkey *et al.*, 2018) y no hay datos que sugieran que el organismo sea de importancia clínica, pero la importancia clínica no puede descartarse por completo debido a su aparición en muestras clínicas (Gentile *et al.*, 2014). Especulamos que los déficits en el comportamiento higiénico, combinados con la falta de un control estándar de infecciones en situaciones de emergencia posterior a desastres naturales han contribuido con brotes de estas especies inusuales de *Serratia* spp. como *S. rubidaea* (Karkey *et al.*, 2018).

Enterobacter cloacae mostro resistencia a 16 antibióticos, solo exhibió susceptibilidad a la amikacina, y el resto de fármacos evaluados no aplican en su tratamiento. Esta especie también tiene alta prevalencia en infecciones hospitalarias (García *et al.*, 2005; Hayakawa

et al., 2014; Gomez-Simmonds *et al.*, 2018; Annavajhala *et al.*, 2019), así como la misma capacidad para la transmisión horizontal de elementos genéticos móviles de resistencia a antibióticos. Además de que hay registros de cepas de *E. cloacae* (cepa B29) relacionadas con la obesidad y el daño hepático (Keskitalo *et al.*, 2018).

Hay trabajos que reportan una relación estrecha entre *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella pneumoniae* (Kanamori *et al.*, 2017), generando brotes epidemiológicos, intercambiando elementos móviles productores de resistencia a antimicrobianos. La especie *K. pneumoniae*, puede producir β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), que inactivan a los antimicrobianos β -lactámicos, los más prescritos en todo el mundo y son el tratamiento de primera línea para las infecciones causadas por esta bacteria.

La colonización intestinal por cepas de *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia* (KES) es un paso crucial en el desarrollo de infecciones nosocomiales. Trabajos sobre resistencia de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* y *Serratia* mencionan que la mitad de sus cepas exhiben resistencia a varios agentes antimicrobianos, incluidos los aminoglucósidos y los antibióticos β -lactámicos, y estaban involucrados en infecciones graves (Livrelli *et al.*, 1996).

La especie *Citrobacter freundii*, fue la que mayor índice de multirresistencia exhibió, contra 18 antibióticos. Al igual que otras enterobacterias, es considerado un microorganismo ubicuo, se puede encontrar en el tracto intestinal de humanos, animales y fuentes ambientales (Anderson *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018b), de manera tal que puede infectar animales acuáticos (Al-Hisnawi *et al.*, 2016), reptiles, aves y mamíferos, manifestando una alta mortalidad debido a es capaz de causar septicemia severa (derrame pleural), hepatitis, encefalitis (congestión de vasos meníngeos) (Liu *et al.*, 2018a; Ciulli *et al.*, 2020).

A nivel mundial existen estudios que clasifican al 33% de bacterias Gram negativas recuperadas de infecciones de torrente sanguíneo como resistentes a múltiples fármacos, entre las principales prevalentes se tiene a *Escherichia coli* y *Klebsiella*

pneumoniae, además de un pequeño grupo de patógenos oportunistas Gram negativos entre los que se considera a *C. freundii* entre estas especies. En el caso de humanos, *C. freundii* provoca infecciones en el tracto urinario, diarrea, neumonía, infecciones del torrente sanguíneo y raramente encefalitis y abscesos intracraneales (Anderson *et al.*, 2018). Cepas de esta especie con alta patogenicidad en los últimos años han registrado un incremento en su resistencia a múltiples fármacos a nivel mundial, ya que algunas cepas albergan β -lactamasas de espectro extendido y resistencia a quinolonas mediadas por plásmidos (Liu *et al.*, 2018b) y otros antimicrobianos como el florfenicol (Zhou *et al.* 2019), y carbapenemasas (Ramsamy *et al.*, 2020). Estos plásmidos de resistencia son de vital importancia ya que son estructuras genéticas móviles, y que pueden encontrarse en cepas aisladas de animales, seres humanos y del medio ambiente (Zhou *et al.*, 2019).

Las perturbaciones antropogénicas generan una presión de selección para la aparición de microbios patógenos, lo que puede reflejar cambios en los procesos ecológicos que estructuran las comunidades bajo diferentes niveles de estrés (Stanish *et al.*, 2016). Las plantas de tratamiento de aguas residuales son fuentes puntuales tanto para la liberación de genes de resistencia a los antibióticos como para la descarga de antibióticos al medio ambiente, lo que conduce a un aumento de genes de resistencia en los ríos receptores, y dichos genes, así como las bacterias patógenas facultativas es muy probable que permanezcan en el lecho del río receptor debido a la sedimentación (Brown *et al.*, 2019). Las aguas residuales tratadas y no tratadas se han vertido en ríos y arroyos, investigaciones han mostrado que altos niveles de contaminación fecal, así como materia orgánica e inorgánica lo suficientemente abundante como para soportar el crecimiento heterotrófico de microorganismos es un importante mecanismo de diseminación de genes de resistencia a los antibióticos (Ramírez-Castillo *et al.*, 2013).

Los plásmidos portadores de genes con resistencia a antibióticos frecuentemente adquieren también resistencia a metales pesados y a detergentes (Kuczynski, 2016). La presión selectiva de los metales pesados contribuye al aumento de patógenos oportunistas resistentes a antimicrobianos (Wang *et al.*, 2020), ya que se ha demostrado que la

resistencia a los metales pesados y a los antibióticos tiene una fuerte correlación en la naturaleza, y su interrelación es un importante para el estudio de las aguas superficiales de los ríos de México, donde bacterias aisladas del género *Enterococcus*, específicamente *Enterococcus faecalis* han demostrado una correlación entre el patrón de flujo del río y la resistencia a metales pesados o metales pesados y antibióticos (Mondragón *et al.*, 2011), esto último les permite además sobrevivir en condiciones de alta contaminación que no podrían soportar las cepas originales. Se evidencia como otra importante causa del incremento de la resistencia a antibióticos el empleo intensivo de tales sustancias en agricultura y en cría de peces, y dichos patógenos multirresistentes son llevados por los animales y sus excrementos a los ríos (Kuczynski, 2016).

Wolf-Rainer (2011) menciona que las bacterias aisladas de los ríos poseen una resistencia considerable a los antimicrobianos, por la presencia de cepas hipermutantes (altas frecuencias de mutación), y también influenciada por la multitud de otras bacterias no patógenas y gran variedad de contaminantes. Los patógenos diarreicos transmitidos por el agua pueden acumularse en el agua de los ríos y causar la contaminación del agua potable y de riego (Guzman-Otazol *et al.*, 2019). El aumento de los riesgos para la salud por especies de peces comestibles y hortalizas podría estar directamente asociado con el uso del agua del río Apatlaco. La elevada contaminación de las aguas residuales en México por microorganismos coliformes y helmintos genera serios problemas de salud a la población consumidora de hortalizas regadas con estas aguas, que es una práctica común entre los productores del estado de Morelos, México, a pesar de los reglamentos que la prohíben (Cuenca-Adame *et al.*, 2001). Comer verduras vegetales o cualquier otra hortaliza regada con las aguas contaminadas con materia fecal del río Apatlaco, y realizar otras actividades como aseo personal, lavar utensilios de cocina, etc., podría provocar enfermedades diarreicas, neumonía, entre otras afecciones serias para la salud. De acuerdo con nuestros resultados, podemos afirmar que el río Apatlaco en presente indicadores importantes de contaminación fecal y patógenos potenciales durante el periodo de estudio.

Con base en los datos recolectados de la presente investigación, se podrían utilizar para desarrollar modelos ambientales como en otros estudios para predecir la supervivencia y el transporte de patógenos a escala de cuencas hidrográficas (Rodríguez-Tapia y Morales-Novelo, 2017), tomando en consideración la salud de toda la población, por lo que se podrían crear/implementar/evaluar programas epidemiológicos y de salud pública orientados a reducir el impacto en la salud ambiental de la contaminación asociada al río Apatlaco, reduciendo los niveles de patógenos en el cuerpo de agua.

Al proporcionar una percepción más amplia de la contaminación por patógenos en los ríos, este trabajo de investigación intenta desarrollar un referente sobre la contaminación por patógenos de interés en dos secciones del río Apatlaco, que corresponden a los municipios de Jojutla y Zacatepec, en el Estado de Morelos.

5. CONCLUSIONES

- Se identificaron un 80% de coliformes fecales y 11 especies con multirresistencia a antimicrobianos; la especie *C. freundii* fue la más multirresistente (a 18 antimicrobianos) y la especie *Klebsiella* del grupo 47 fue la más persistente, ya que se encontró en ambas zonas de muestreo, durante casi todo el año, además de presentar resistencia a 15 antimicrobianos.
- La zona más contaminada fue el Puente de Jojutla con el 90% de bacterias patógenas presentes, en comparación con el Puente a Galeana con el 70%.
- Se identificaron más bacterias patógenas en la época de secas que en la de lluvias.
- Las bacterias patógenas encontradas en el río Apatlaco constituyen una amenaza potencial a la salud humana, debido a su multirresistencia a varios antimicrobianos, así como sus características de patógenos oportunistas.

6. LITERATURA CITADA

1. Aburto-Medina A.; D. Castillo; I. Ortíz; E. Hernández; R. List; y E. Adetutu. 2015. Microbial community and pollutants survey in sediments of biologically important wetlands in Lerma, Mexico. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 31(1): 7-22.
2. Aguilar Z. J. A. 1998. marco de referencia de la subcuenca del rio Apatlaco, subcoordinación de aprovechamiento de aguas residuales, IMTA, Jiutepec, Morelos.
3. Ahmed A. M.; S. Shinoda; y T. Shimamoto. 2005. A variant type of *Vibrio cholerae* SXT element in a multidrug-resistant strain of *Vibrio fluvialis*. *FEMS Microbiology Letters*, 242: 241–247.
4. Al-Hisnawi A.; J. M. Mustafa; Y. K. Yasser; K. A. Hussain; y A. M. Jabur. 2016. Influence of aquatic environment on microbiota of *Liopropoma santi* fish in a local river in Iraq. *Karbala International Journal of Modern Science*, 2: 41e45.
5. Anderson M. T.; L. A. Mitchell; L. Zhao; H. L. T. Mobley. 2018. *Citrobacter freundii* fitness during bloodstream infection. *Scientific reports*, 8: 11793.
6. Anderson K.A.; y P.M. Davidson. 2010. Drinking water and recreational water quality: microbiological criteria. University of Idaho. College of Agriculture. Cooperative Extension System. Moscow, ID, USA. Recuperado de: https://cdm17254.contentdm.oclc.org/utils/getfile/collection/ui_ep/id/31190/filename/ui_ext31190.pdf
7. Annavajhala M.K.; A. Gomez-Simmonds; y A. C. Uhlemann. 2019. Multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* complex emerging as a global, diversifying threat. *Frontiers in Microbiology*, 10:44. doi: 10.3389/fmicb.2019.00044
8. Apella M. C.; y P. Z. Araujo. 2005. Capítulo 2. Microbiología de agua. Conceptos básicos. 33-50 p. In: Emerging Technologies to Address Water Treatment Problems in Developing Countries. SOLAR SAFE WATER. Llevado a cabo en Puerto Iguazú (Misiones, Argentina), 14 y 15 de octubre de 2005. Recuperada de: https://www.psa.es/es/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf Consultada, consultada el 15/08/2020 a las 5:45 pm.

9. Arévalo-Arbeláez Á. J.; K. Bedoya-Urrego; F. Cabarcas-Jaramillo; y J. F. Alzate-Restrepo. 2017. Descripción de la microbiota bacteriana residente en el biosólido generado en la planta de tratamiento de aguas residuales San Fernando. Itagüí, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 19 (6): 806-813.
10. Baker K. H. y D. S. Herson. 1999. Detection and occurrence of indicator organisms and pathogens. *Water Environment Research*, 71 (5): 530-551.
11. Bengoechea J. A.; y J. Sa Pessoa. 2019. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiology Reviews*, 43 (2): 123–144.
12. Bornet C.; A. Davin-Regli; C. Bosi; J. M. Pages; y C. Bollet. 2000. Imipenem resistance of *Enterobacter aerogenes* mediated by outer membrane permeability. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3): 1048–1052.
13. Breton-Deval L.; A. Sanchez-Flores; K. Juárez; R. Vera-Estrella. 2019. Integrative study of microbial community dynamics and water quality along The Apatlaco River. *Environmental Pollution*, 255, 113158: 1-10.
14. Breton-Deval L.; A. Sanchez-Reyes; A. Sanchez-Flores; K. Juárez; I. Salinas-Peralta; y P. Mussali-Galante. 2020. Functional Analysis of a Polluted River Microbiome Reveals a Metabolic Potential for Bioremediation. *Microorganisms*, 8, 554.
15. Brown P. C.; E. Borowska; T. Schwartz; y H. Horn. 2019. Impact of the particulate matter from wastewater discharge on the abundance of antibiotic resistance genes and facultative pathogenic bacteria in downstream river sediments. *Science of the Total Environment*, 649 (2019): 1171–1178.
16. Buckley R.; E. Clough; W. Warnken; y C. Wild. 1998. Coliform bacteria in streambed sediments in a subtropical rainforest conservation reserve. *Water Research*, 32 (6): 1852-1856.
17. Chin D. A. 2010. Linking pathogen sources to water quality in small urban streams. *Journal of Environmental Engineering*, 136: 249-253.
18. Ciulli, S.; E. Volpe; R. Sirri; G. Tura; F. Errani; G. Zamperin; A. Toffan; M. Silvi; A. Renzi; M. Abbadi; L. Biasini; T. Pretto; P. Emmanuele; A. Casalini; G. Sarli; P. Serratore; O. Mordenti; y L. Mandrioli. 2020. Multifactorial causes of chronic mortality in juvenile sturgeon (*Huso huso*). *Animals*, 10 (1886): 1-16.

19. Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). 2008. La cuenca del río Apatlaco, recuperemos el patrimonio ambiental de los morelenses. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). México, D. F. 120 p.
20. Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). 2012. El saneamiento del río Apatlaco. De lo crítico a lo sustentable. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, D.F. 50 p.
21. Cuenca-Adame E.; D. D. Riestra; M. J. M. Pérez; y A. A. Echegaray. 2001. Uso de aguas residuales y control de organismos patógenos en la producción de cebolla, *Agrociencia*, 35:255-265.
22. Darby A.; K. Lertpiriyapong; U. Sarkar; U. Seneviratne; D. S. Park; E. R. Gamazon; C. Batchelder; C. Cheung; E. M. Buckley; N. S. Taylor; Z. Shen; S. R. Tannenbaum; J. S. Wishnok; J. G. Fox. 2014. Cytotoxic and Pathogenic Properties of *Klebsiella oxytoca* Isolated from Laboratory Animals. *PLoS ONE*, 9(7): e100542.
23. Davin-Regli A.; y J. M. Pagès. (2015). *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology*, 6:392. doi: 10.3389/fmicb.2015.00392
24. Echeverri L. M.; y J. C. Cataño. 2010. *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. *Iatreia*, 23(3): 240-249.
25. El-Kowrany S. I., El-Zamarany E. A., El-Nouby K. A., El-Mehy D. A., Abo A. E. A., Ahmad A. Othman, Wesam Salah, Ahmad A. El-Ebiary. 2016. Water pollution in the Middle Nile Delta, Egypt: An environmental study. *Journal of Advanced Research*, 7, 781–794.
26. García I. A.; E. M. Valenzuela de Silva; C. H. Saavedra; A. L. Leal; J. E. Schmalbac; J. R. Mantilla. 2005. Caracterización molecular de aislamientos de *Enterobacter cloacae* multirresistentes, productores β -lactamasas provenientes de pacientes de un hospital de tercer nivel de Bogotá. *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia*, 53(3): 148-159.
27. García S. A. 2015. Vulnerabilidad social y adaptación de la subcuenca del río Apatlaco ante los efectos del cambio climático en materia de disponibilidad de agua. Tesis de maestría. Centro Interdisciplinario de Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo. Instituto Politécnico Nacional. México. 78-79 p.

28. Garrido R.; M. A. Marcondes; R. Pessôa; A. Nascimento; J. R. Victor; A. J. da Silva Duarte; P. B. Clissa; y S. S. Sanabani. 2020. Bacterial community composition and potential pathogens along the pinheiros River in the southeast of Brazil. *Scientific Reports*, 10:9331.
29. Gentile D.; M. Pérez; y M. J. Centelles. 2014. Bacteriemia por *Serratia rubidaea* con fenotipo atípico de resistencia a quinolonas. *Revista Chilena de Infectología*, 31 (3): 351-352.
30. Gobierno del Estado de Morelos. 2008. Evaluación Ambiental Recuperación Ambiental de la Cuenca del Río Apatlaco. 1-58 p. <http://documents1.worldbank.org/curated/en/705301468123556857/pdf/E19490SPANISH01BLIC10LAC1EA1P107134.pdf>
31. Gomez-Simmonds A.; M. K. Annavajhala; Z. Wang; N. Macesic; Y. Hu; M. J. Giddins; A. O'Malley; N. C. Toussaint; S. Whittier; V. J. Torres; y A-C. Uhlemann A-C. 2018. Genomic and geographic context for the evolution of high-risk carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* complex clones ST171 and ST78. *mBio*, 9:e00542-18.
32. Guzmán-Hernández R.; R. Hernández-Vélez; y A. Contreras-Rodríguez. 2016. *Vibrio fluvialis*. *Revista Chilena de Infectología*, 33 (4): 455-456.
33. Guzman-Otazol J.; L. Gonzales-Siles; V. Poma; J. Bengtsson-Palme; K. Thorell; C-F. Flach; V. Iñiguez; y Åsa Sjöling. 2019. Diarrheal bacterial pathogens and multiresistant enterobacteria in the Choqueyapu River in La Paz, Bolivia. *PLoS ONE*, 14(1): e02110735.
34. Hayakawa K.; T. Miyoshi-Akiyama; T. Kirikae; M. Nagamatsu; K. Shimada; K. Mezaki; Y. Sugiki; E. Kuroda; S. Kubota; N. Takeshita; S. Kutsuna; M. Tojo; N. Ohmagaria. 2014. Molecular and Epidemiological Characterization of IMP-Type Metallo- β -Lactamase-Producing *Enterobacter cloacae* in a Large Tertiary Care Hospital in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(6): 3441–3450.
35. Henry J. B. 2005a. Diagnóstico y Tratamiento Clínico por el Laboratorio Tomo I, 20ª Edición. Ed. Marbán. España. 825 p.
36. Henry J. B. 2005b. Diagnóstico y Tratamiento Clínico por el Laboratorio Tomo II, 20ª Edición. Ed. Marbán. España. 641 p.

37. Houmsou R. S., Amuta E. U. y Sar T. T. 2010. Impact of urbanization on parasitic infections in developing countries. *Reviews in Infection*, 1(1): 38-41.
38. Hu J.; J. Shi; H. Chang; D. Li; M. Yang; y Y. Kamagata. 2008. Phenotyping and Genotyping of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Isolated from a Natural River Basin. *Environmental Science and Technology*, 42(9): 3415–3420.
39. Ibekwe A.M.; M. Leddy; y S. E., Murinda. 2013. Potential human pathogenic bacteria in a mixed urban watershed as revealed by pyrosequencing. *PLoS ONE*, 8 (11): e79490.
40. Igbinsosa E. O.; y A. I. Okoh. 2010. *Vibrio fluvialis*: An unusual enteric pathogen of increasing public health concern. *Internatonial Journal of Environmental Research and Public Health*, 7, 3628-3643.
41. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua y Fundación Gonzalo Río Arronte. 2007. Plan estratégico para la recuperación ambiental de la cuenca del río Apatlaco. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. México. 620 p.
42. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2016. Anuario estadístico y geográfico de Morelos 2016. INEGI. México. 524 p.
43. Isaac-Márquez, A.P.; Lezama-Dávila, CM.; Eslava-Campos, C; Navarro Ocana, A.; y Cravioto-Quintana, A. 1998. Serotypes of *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from water supplies for Human consumption in Campeche, Mexico and their antibiotic susceptibility pattern. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(1): 17-22.
44. Jiménez M.; J. Martínez-Urtaza; M. X. Rodríguez-Alvarez; J. León-Félix; y C. Chaidez. 2014. Prevalence and genetic diversity of *Salmonella* spp. in a river in a tropical environment in Mexico. *Journal of Water and Health*, 12,4: 874-884.
45. Jitrwung R.; y V. Yargeau. 2015. Biohydrogen and bioethanol production from biodiesel-based glycerol by *Enterobacter aerogenes* in a continuous stir tank reactor. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16, 10650-10664; doi:10.3390/ijms160510650.
46. Johnson E.; y P. D. Ellner. 1974. Distribution of *Serratia* Species in Clinical Specimens. *Applied Microbiology*, 28(3): 513-514.
47. Kanamori H.; C. M. Parobek; J. J. Juliano; D. van Duin; B. A. Cairns; D. J. Weber; y W. A. Rutala. 2017. A prolonged outbreak of KPC-3- producing *Enterobacter cloacae*

and *Klebsiella pneumoniae* driven by multiple mechanisms of resistance transmission at a large academic burn center. *Antimicrob Agents Chemother*, 61:e01516-16.

48. Karkey A.; N. Joshia; S. Chalised; S. Joshid; S. Shresthad; T. N. T. Nguyenb; S. Dongola; B. Basnyata; S. Bakerb; y C. J. Boinett. 2018. Outbreaks of *Serratia marcescens* and *Serratia rubidaea* bacteremia in a central Kathmandu hospital following the 2015 earthquakes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 112: 467–472.
49. Keskitalo A.; E. Munukka; R. Toivonen; M. Hollmén; H. Kainulainen; P. Huovinen; S. Jalkanen; y S. Pekkala. 2018. *Enterobacter cloacae* administration induces hepatic damage and subcutaneous fat accumulation in high-fat diet fed mice. *PLoS ONE*, 13(5): e0198262.
50. Khatri N.; y S. Tyagi. 2015. Influences of natural and anthropogenic factors on surface and groundwater quality in rural and urban areas. *Frontiers in Life Science*, 8(1): 23–39.
51. Koneman E.; Winn W. C.; Allen S.; Procop G. W.; Janda W. M.; Schreckenberger P. C.; y Woods G. L. 2008. Koneman Diagnóstico Microbiológico, Texto y Atlas en Color, 6ª edición. Editorial Médica Panamericana S.A., Buenos Aires, Argentina. 1695 p.
52. Kuczynski D. 2016. El hallazgo de bacterias patógenas en ríos urbanos y su relación con el cambio climático. *Inmanencia*, 5(1):92-96.
53. Ley de aguas nacionales. 1992. Recuperada en: http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/16_060120.pdf. Consultada el 17 de febrero de 2015, a las 4:50 pm.
54. Lin S-R.; Y-H. Chen; F-J. Tseng; y C-F. Weng. 2020. The production and bioactivity of prodigiosin: quo vadis?. *Drug Discovery Today*, 25(5): 828-836.
55. Liu H.; Z. Zao; Y. Xue; K. Ding; y Q. Xue. 2018a. Fatal cases of *Citrobacter freundii* septicemia and encephalitis in sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 30 (2): 245-248.
56. Liu L.; D. Chen; L. Liu; R. Lan; S. Hao; W. Jin; H. Jun; Y. Wang; Y. Liang; y J. Xu. 2018b. Genetic diversity, multidrug resistance, and virulence of *Citrobacter freundii*

from diarrheal patients and healthy individual. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8: 233.

57. Livrelli V.; C. De Champs; P. Di Martino; A. Darfeuille-Michaud; C. Forestier; y B. Joly. 1996. Adhesive Properties and Antibiotic Resistance of Klebsiella, Enterobacter, and Serratia Clinical Isolates Involved in Nosocomial Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(8): 1963–1969.
58. Mampallil L- J.; M. H. Faizal; y K. N. Anith. 2017. Bacterial bioagents for insect pest management. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(6): 2237-2244.
59. Mazari-Hiriart M.; Y. López-Vidal; S. Ponce-de-León; J. J. Calva; F. Rojo-Callejas; y Gonzalo Castillo-Rojas. 2005. Longitudinal Study of Microbial Diversity and Seasonality in the Mexico City Metropolitan Area Water Supply System. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9): 5129–5137.
60. Mazari-Hiriart M.; G. Pérez-Ortiz; M. T. Orta-Ledesma; F. Armas-Vargas; M. A. Tapia; R. Solano-Ortiz; M. A. Silva; I. Yañez-Noguez; Y. López-Vidal; C. Díaz-Ávalos. 2014. Final opportunity to rehabilitate an urban river as a water source for Mexico City. *PLoS ONE* 9(7): e102081.
61. Miao L.; X. Wang; W. Jiang; S. Yang; H. Zhou; Y. Zhai; X. Zhou; y K. Dong. 2013. Optimization of the culture condition for an antitumor bacterium *Serratia proteamacula* 657 and identification of the active compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29: 855–863.
62. Mondragón V. A.; D. F. Llamas-Pérez; ·G. E. González-Guzmán; A. R. Márquez-González; R. Padilla-Noriega; M. J. Durán-Avelar; y B. Franco. 2011. Identification of Enterococcus faecalis bacteria resistant to heavy metals and antibiotics in surface waters of the Mololoa River in Tepic, Nayarit, Mexico. *Environmental Monitoring Assessment*, 183: 329–340.
63. Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA1-1993. Procedimientos sanitarios para el muestreo de agua para uso y consumo humano en sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados. Recuperado de: <https://agua.org.mx/biblioteca/nom-014-ssa1-1993-qprocedimientos-sanitarios-para-el-muestreo-de-agua-para-uso-y-consumo-humano-en-sistemas-de-abastecimiento-de-agua-publicos-y-privadosq/>

64. Pandey, P.; P. H. Kass; M. L. Soupir; S. Biswas; y V. P. Singh. 2014. Contamination of water resources by pathogenic bacteria. *AMB Express*, 4: 51/1-16.
65. Paveglio S.; N. Ledalab; K. Rezaulb; Q. Linc; Y. Zhoud; A. A. Provatasf; E. Bennettg; T. Lindberga; M. Caimanob; y A. P. Matson. 2020. Cytotoxin-producing *Klebsiella oxytoca* in the preterm gut and its association with necrotizing enterocolitis. *Emerging Microbes and Infections*, 9, 1321-1329.
66. Pérez G.; V. Tamariz; L. López; F. Hernández; R. Castelán; J. L. Morán; W. A. García; A. Díaz; y A. Handal. 2018. Atoyac river pollution in the metropolitan area of Puebla, México. *Water*, 10, 267: 1-17.
67. Peter-Varbanets, M.; Gujer, W. y Pronk, W. 2012. Intermittent operation of ultra-low-pressure ultrafiltration for decentralized drinking water treatment. *Water Research*, 46: 3272–3282.
68. Philippe N.; L. Maigre; S. Santini; E. Pinet; J. M. Claverie; A. V. Davin-Régli; J. M. Pagès; y M. Masi. 2015. In vivo evolution of bacterial resistance in two cases of *Enterobacter aerogenes* infections during treatment with Imipenem. *PLoS ONE*, 10 (9): e0138828. doi:10.1371/journal.pone.0138828.
69. Phillips I., S. Eykyn, A. King, W. R. Gransden, B. Rowe, J. A. Frost y R. J. Gross. 1998. Epidemic multiresistant *Escherichia coli* infection in West Lambeth health district. *The Lancet*, 1 (8593):1038-41. doi: 10.1016/s0140-6736(88)91853-3.
70. Polo, F.; M. J. Figueras; I. Inza; J. Sala; J. M. Fleisher; y J. Guarro. 1998. Relationship between presence of *Salmonella* and indicators of faecal pollution in aquatic habitats. *FEMS Microbiology Letters*, 160: 253-256.
71. Polo, F.; M. J. Figueras; I. Inza; J. Sala; J. M. Fleisher; y J. Guarro. 1999. Prevalence of *Salmonella* serotypes in environmental waters and their relationships with indicator organisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 75: 285–292.
72. Pötgens S. A.; H. Brossel; M. Sboarina; E. Catry; P. D. Cani; A. M. Neyrinck; N. M. Delzenne; y L. B. Bindel. 2018. *Klebsiella oxytoca* expands in cancer cachexia and acts as a gut pathobiont contributing to intestinal dysfunction. *Cientific Reports*, 8:12321.
73. Quayaperu.org .2018. ¿Por qué hay contaminación en los ríos? Cómo se produce y cómo evitarla. Recuperado de: <https://www.qayaperu.org/por-que-hay->

contaminacion-en-los-rios-como-se-produce-y-como-evitarla/. Consultada el 17/08/2020, a las 4:35 pm.

74. Rajpara N.; A. Patel; N. Tiwari; J. Bahuguna; A. Antony; I. Choudhury; A. Ghosh; R. Jain; A. Ghosh; y A. K. Bhardwaj. 2009. Mechanism of drug resistance in a clinical isolate of *Vibrio fluvialis*: involvement of multiple plasmids and integrons. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34: 220–225.
75. Ramírez-Castillo F. Y.; F. J. Avelar; P. Garneau; F. Márquez; A. L. Guerrero; y J. Harel. 2013. Presence of multi-drug resistant pathogenic *Escherichia coli* in the San Pedro River located in the State of Aguascalientes, Mexico. *Frontiers in Microbiology*, 4, 147: 1-16.
76. Ramos-Vivas J.; I. Chapartegui-González; M. Fernández-Martínez; C. González-Rico; J. Barrett; J. Fortún; R. Escudero; F. Marco; L. Linares; J. Nieto; M. Aranzamendi; P. Muñoz; M. Valerio; J. M. Aguado; F. Chaves; I. Gracia-Ahufinger; A. Paez-Vega; L. Martínez-Martínez; y M. C. Fariñas. 2020. Adherence to human colon cells by multidrug resistant Enterobacterales strains isolated from solid organ transplant recipients with a focus on *Citrobacter freundii*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10:447.
77. Ramamurthy T.; G. Chowdhury; G. P. Pazhani; y S. Shinoda. 2014. *Vibrio fluvialis*: an emerging human pathogen. *Frontiers in Microbiology, Aquatic Microbiology*, 5, 91: 1-8.
78. Ramsamy Y.; K. P. Mlisana; D. G. Amoako; M. Allan, A. Ismail; R. Singh; A. Luther King Abia; y S. Y. Essack. 2020. Pathogenomic análisis of a novel extensively drug-resistant *Citrobacter freundii* isolate carrying a bla_{NDM-1}carbapenemase in South Africa. *Pathogens*, 9:89.
79. Reyes M. I. 2015. Análisis de fortalezas y debilidades en la gestión de la regulación de las descargas de aguas residuales, en la CONAGUA. Tesis de maestría. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Jiutepec, Morelos. 246 p.
80. Ribas A.; C. Jollivet; S. Morand; B. Thongmalayvong; S. Somphavong; C.-Chiang Siew; P.-Jun Ting; S. Suputtamongkol; V. Saensombath; S. Sanguankiat; B.-Huan Tan; P. Paboriboune; K. Akkhavong; y K. Chaisiri. 2017. Intestinal Parasitic Infections and Environmental Water Contamination in a Rural Village of Northern Lao PDR.

81. Rivera C. A.; y L. E. Ochoa. 2018. Caracterización microbiológica de las aguas de los ríos de la ciudad de Cuenca. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Cuenca. Cuenca, Ecuador. 72 p.
82. Ríos-Tobón S., Agudelo-Cadavid R.M., Gutiérrez-Builes L.A. 2017. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Revista de la Facultad Nacional de Salud Pública*, 35(2): 236-247. DOI: 10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08.
83. Rodríguez-Tapia L.; y J. A. Morales-Novelo. 2017. Bacterial pollution in river waters and gastrointestinal diseases. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14, 479: 1-11.
84. Rogers B. A.; H. E. Sidjabat; y D. L. Paterson. 2011. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66: 1–14.
85. Rojo P.; M. J. Unzaga; P. Melero; I. Iturburu; C. Ezpeleta; y R. Cisterna. 1996. *Serratia rubidaea* as an invasive pathogen. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(1): 216–217.
86. Romeu B.; P. Salazar; D. Lugo; N. M. Rojas; y C. A. Eslava. 2012. Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Escherichia coli* procedentes de ecosistemas dulceacuícolas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 64(2):132-141.
87. Rondina M. T.; K. Raphael; R. Pendleton; y M. A. Sande. Abdominal Aortitis due to *Streptococcus pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes* A Case Report and Review. *J Journal of General Internal Medicine*, 21: C1–C3.
88. Russo T. A.; y C. M. Marr. 2019. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical Microbiology Reviews*, 32: e00001-19.
89. Sekhsokh Y.; L. Arsalane; M. El Ouenass; T. Doublali; T. Bajjou; I. Lahlou Amine. 2007. *Médecine et maladies infectieuses* 37: 287–289.
90. Shrestha R. G.; S. Tandukar; D. Bhandari; S. P. Sherchan; Y. Tanaka; J. B. Sherchand; y E. Haramoto. 2019. Prevalence of *Arcobacter* and other pathogenic bacteria in river water in Nepal. *Water*, 11, 1416: 1-9.

91. Soares D.; y A. Peña (Coord.). 2018. Impacto del cambio climático para la gestión integral de la cuenca hidrológica del río Apatlaco. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. México. 536 p.
92. Stanish L. F.; N. M. Hull; C. E. Robertson; J. K. Harris; M. J. Stevens; J. R. Spear; y N. R. Pace. 2016. Factors Influencing Bacterial Diversity and Community Composition in Municipal Drinking Waters in the Ohio River Basin, USA. *PLoS ONE*, 11(6): e0157966.
93. Suárez B.; M. Hart; F. Espinosa; y D. Salazar. 2012. Detección de mecanismos de resistencia en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* multidrogosresistentes. *Revista Cubana de Medicina*, 51(3): 228-238.
94. Suárez T. B., P. Y. Bustamante, C. M. Hart, G. M. M. Romero, M. A. González, B. M. Martínez. 2015. Caracterización de aislamientos intrahospitalarios de *Klebsiella pneumoniae* en un hospital terciario. *Revista Cubana de Medicina*, 54 (4): 323-336.
95. Terzieva S.; Y G. Mcfeters. 1991. Survival and injury of *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, and *Yersinia enterocolitica* in stream water. *Canadian Journal of Microbiology*, 37, 785-790.
96. Thermo Scientific. 2012. Thermo Scientific Sensititre, sistema para realización de antibiogramas y pruebas de identificación. 1 - 6 p.
97. Thiolas A.; C. Bollet; B. La Scola; D. Raoult; y J. M. Pagès. 2005. Successive emergence of *Enterobacter aerogenes* strains resistant to imipenem and colistin in a patient. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(4): 1354–1358.
98. TREK Diagnostic System Magellan Bioscience. 2008. Product Catalog for the microbiology diagnostic laboratory. 1 – 37 p.
99. Tzelepi E.; P. Giakkoupi; D. Sofianou; V. Loukova; A. Kemeroglou; y A. Tsakris. 2000. Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(2): 542–546.
100. Vadde K. K.; Q. Feng; J. Wang; A. J. McCarthy; y R. Sekar. 2019. Next-generation sequencing reveals fecal contamination and potentially pathogenic bacteria in a major inflow river of Taihu Lake. *Environmental Pollution*, 254 (113108): 1-13.

101. Valencia V. J. C., F. Mendoza J., L. Vargas M. y M. L. Domínguez (Coords). 2006. El agua en México. Comisión Nacional del Agua. México. 37 p. ISBN 968-817-730-X.
102. Valenzuela J. H. 2016. Resistencia a los antibióticos en cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde cauces de agua de la región metropolitana y su asociación con el área geográfica. Memoria de Título Profesional. Escuela de Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Santiago, Chile. 49 p.
103. Vargas V. S. y Hernández A. C. 2015. Deterioro de la calidad del agua en la cuenca del río Apatlaco. *Inventio, la génesis de la cultura universitaria en Morelos*. 11 (23): 15-22. Recuperado de: <http://inventio.uaem.mx/index.php/inventio/article/view/46/59>
104. Vera-Leiva A.; Carla Barría-Loaiza, Sergio Carrasco-Anabalón, Celia Lima, Alejandro Aguayo-Reyes, Mariana Domínguez, Helia Bello-Toledo y Gerardo González-Roch. 2017. KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Revista Chilena de Infectología*, 34 (5): 476-484
105. Villafaña-Martínez, S. L. 2010. Evaluación Socioeconómica para Proyectos de Recuperación Ambiental; Caso: Cuenca del Río Apatlaco en el Estado de Morelos. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de la Construcción. Guerrero, México. 130 p.
106. Wang J-H.; Yung-Ching Liu, Susan Shin-Jung Lee, Muh-Yong Yen, Yao-Shen Chen, Jao-Hsien Wang, Shue-Ren Wann, and Hsi-Hsun Lin. 1998. Primary liver abscess due to *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clinical Infectious Diseases*, 26:1434–1438.
107. Wang Q.; Y. Xu; L. Liu; L.-Y. Li; H. Lin; X.-Y. Wu; W.-J. Bi; L.-T. Wang; D.-Q. Mao; Y. Luo. 2020. The prevalence of ampicillin-resistant opportunistic pathogenic bacteria undergoing selective stress of heavy metal pollutants in the Xiangjiang River, China. *Environmental Pollution*, 268, 115362: 1-9.
108. WHO. 2000. Water supply and sanitation council, global water supply and sanitation assessment 2000 report. New York: UNICEF. Recuperado de: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42352/9241562021_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
109. Wilkes G.; T. Edge; V. Gannon; C. Jokinen; E. Lyautey; D. Medeiros; N. Neumann; N. Ruecker; E. Topp; y D. R. Lapen. 2009. Seasonal relationships among indicator bacteria, pathogenic bacteria, *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and hydrological

indices for surface waters within an agricultural landscape. *Water Research*, 43: 2209 – 2223.

110. Wolf-Rainer A. 2011. Megacities as sources for pathogenic bacteria in rivers and their fate downstream. *International Journal of Microbiology*, 2011(798292): 1-13, doi:10.1155/2011/798292.
111. Zhou W.; Q. Chen; C. Qian; K. Shen; X. Zhu; D. Zhou; W. Lu; Z. Son; H. Liu; K. Li; T. Xu; Q. Bao; y J. Lu. 2019. In vitro susceptibility and florfenicol resistance in *Citrobacter* isolates and whole genome analysis of multidrug-resistance *Citrobacter freundii*. *International Journal Genomics*, 2019: 7191935.
112. Zollner-Schwetz I.; C. Högenauer; M. Joainig; P. Weberhofer; G. Gorkiewicz; T. Valentin; T. A. Hinterleitner; y R. Krause. 2008. Role of *Klebsiella oxytoca* in antibiotic-associated diarrhea. *Clinical Infectious Diseases*, 47: e74–8.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



El Jicarero, Jojutla, Morelos, 20 de Mayo 2021.

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
PRESENTE.**

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta el Pasante de Licenciado en Ciencias Ambientales: C. GLORIA HUICOCHEA MONTES, con el título del trabajo: **BACTERIAS PATÓGENAS PRESENTES EN DOS ZONAS DEL RIO APATLACO, EN EL ESTADO DE MORELOS**

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: _____ SI _____

VOTO EN CONTRA: _____

NECESITA ARREGLAR O ELIMINAR ALGO: _____

COMENTARIOS: _____

FIRMA

Dr. Luis Javier Mendoza Estrada _____

Dr. Juan Manuel Rivas González _____

M. en C. Humberto Flores Bustamante _____

Mtra. María de los Ángeles Núñez Puente _____

M. en M.M. Isaura Quintana Padilla _____





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUAN MANUEL RIVAS GONZALEZ | Fecha:2021-05-20 16:58:43 | Firmante

eKm0wgpMbBgRPhOrz/BeO8NtGVCS4UI5d2hn2g8EVFntLkJ2JmOa4Uj05MZbQ2ByBzc1AICuB9PvWPC+dmPGxSXJqmbXdWSmm/opth6a5/yTsjfX1c6iBm58kUPdsLIACJnkGZWF+gb2O0pbVmeHWWoq49uuM3AodqxwJbAtHihyXpDmdoAV6Nftz+fqCmejreEMnuqeamGXvhyn+hvIJF1ypalTiveCTII2kJw5r5vGxCqykMBfCE20LJrZVZACmC4z0zNu6gTA+WYk71qhsdno/O6f+IEBs2dFCFyioTAGnlp0/Yar8MBxdkia/hDzBCjnA2ZjnRLtkYU6w==

ISAURA QUINTANA PADILLA | Fecha:2021-05-21 07:19:06 | Firmante

Bmvt7APdLRvewzvdXQPKMSFwt0QdtW5I35Q148Ckid5pdsymVeKvuwRo3VBhJojVJoxJsoArzFhBYMc8TrTawtG4HYKIdpGy5nl/n9IRZu56VNIS50A8Bdb7Wsaq9QGnIIC2JFRtluz5jqtQhTnBHAMuN/UTrhxYNBDe9zglngYEYKQ+MUpRRZelDIRXr0wHScI7ftfNLjXQ/R9JnnF0Q1K7Xuesnc0K43nHarZXdsLyMAe6mmzr/XSXBShan/ft2XlqWtKIZ7NugiERfk7pfw+4kGiqE6P7J7tnCuHsld9lg63zqXojOhOCDhwcW69kanCnHNSPC0w+noTs+I3w==

LUIS JAVIER MENDOZA ESTRADA | Fecha:2021-05-21 08:40:39 | Firmante

GICUIbBPkH9y1Hc/zkQg/hOlqiwX4ISJjHokdQNfcmXxOP5PUMHLeIvPpDx9PnmdXZL9BtgLaNx0k3uybsHhuCxmVnKzG4dGg5BtXiA+20FvalKuv+E5q616JPE2Hh+hBRiwwgHgJTKcfUqx1NWg131TZVKtYPfACfCK0/nNYfgg/d89T4Bhy0LYUvLO3/G0KPZmw9CBozfMGXHYuI2jcBegG11wuZyao6hyY1cmABIOTn6OSbwbg0/BeneZ3OK3hjlXcLLAk80R1W7/RuBswDY+kW56wnfi+i3PqjsQt8n9xB9D3+nrrwtbEjfo+VG87PIEON5cntlC+7whQ==

HUMBERTO FLORES BUSTAMANTE | Fecha:2021-05-21 09:18:45 | Firmante

fyZGOD4IW5im93yyLqd9QeJltDye2QEEmB7K+teLAwrL4RW4nQxxK8S23I69y7VpVYJCHMfq9L6ynobzdn6NN9vryF40ktDQwckdbIVRuQCeEr/9/4z5GuuS8R7E8EoSgMFR6bkG/ZsW472LQuqE/Lu4olaxAerB+ieXTX8AWdRXEw4jr5d8moH9BzbGShrs0QMe9AEdrkws/BaUhEBZcgApcTLN4QWKNp8GSooEQ3vrGdFxmZvvnw4xHTPL8+y4AvBGZ0NrAbtZY9qt9r4WIRVZuHm4gxwtChLDU/UyJTeHuuDY2KNoQJ9JDOhVqZ+DIgO5fhuLhAm9HNHUAkyjaw==

MARIA DE LOS ANGELES NUÑEZ PUENTE | Fecha:2021-05-24 17:05:37 | Firmante

Pf6akB4UPq5x14kW2skVcbGN6iclXHTaM1oO5yIU+PCu8RIEeqzCtZsjfStHoi5dZvDhoFiws6WKn3OesQVVv73Im8cN4KLtMjBkNndbEpZBwx1r3ivS9SLhQKPGW9qngTAfjqGZWZuB382aKdlluavOQw3epTa+gQLWvWQOpSOUEZCdUOiSWHyZtE0yxugd6m0WqJ9gu24/wxLEcfAFHGBSINOI92UAeTIIGTYRtDfolgENQI3VMGPT9maN+P9/DOEZUZL30LhTC+h+wDqjOJlxYASNI41NqXuhKBqAT3ng1hjcQPDYbvp3ICPsNp626AXBEfpLdyr9K188nrpRALg==

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



L6kV4x

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/GPh3Go7V5My0qd24Fws9HDqhHDOoDrh9>

