



Imágenes de: Canva educativo

Calidad microbiológica: detección de *Aeromonas* sp y *Pseudomonas* sp en garrafones provenientes de pequeñas plantas purificadoras de agua

Microbiological quality: detection of *Aeromonas* sp and *Pseudomonas* sp in jugs from small water purification establishments

Berenice Venegas, Marco Antonio Tello-Hernández, Verónica Cepeda-Cornejo, Dalia Molina-Romero*

RESUMEN

Las plantas purificadoras de agua que carecen de un adecuado sistema de control de calidad pueden generar problemas de salud pública. El objetivo de este estudio fue examinar la calidad microbiológica del agua proveniente de pequeñas plantas purificadoras de la ciudad de Puebla, así como, determinar la existencia de bacterias *Aeromonas* sp y *Pseudomonas* sp, y caracterizar si presentan un fenotipo patógeno oportunista. Se recolectaron 70 muestras de garrafones de agua de 25 establecimientos. La cuantificación bacteriana se realizó mediante el método de goteo en placa. Se comprobaron los géneros microbianos mediante análisis bioquímico. En las cepas que mostraron discrepancia se utilizó la identificación molecular con base a secuencias parciales del gen 16S rRNA para confirmar su especie y se les evaluaron sus características de patogenicidad: multirresistencia a antibióticos, producción de biopelícula y actividad hemolítica. El 40 % de las plantas purificadoras no cumplieron con la calidad microbiológica del agua para consumo humano. El 41.4 % de los garrafones de agua muestreados incumplió la normativa, presentando coliformes totales 35.7 %, *Pseudomonas* 30 %, *Enterococcus faecalis* 8.6 % y bacterias coliformes fecales el 5.7 %. Se obtuvieron 56 aislados, provenientes de los 29 garrafones contaminados; 10 de ellos se caracterizaron molecularmente, resultando 7 aislados relacionados con especies diferentes de *P. aeruginosa* y 3 con especies de *Aeromonas*. De los aislados de *Pseudomonas*, 5 presentaron resistencia a 2 familias de antibióticos y 2 mostraron multirresistencia. El 36 % de los 10 aislados produjeron hemólisis y biopelícula. Dos cepas de *Aeromonas* mostraron resistencia a Cefalosporina 3a generación pero no produjeron hemólisis. Los 10 aislados analizados fueron clasificados como no patógenos. Es necesario un seguimiento sanitario más estricto para lograr el cumplimiento de las normas nacionales e internacionales relacionadas con el consumo de agua purificada, para evitar dañar la salud de los consumidores.

PALABRAS CLAVE: Coliformes, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, biopelícula, multirresistencia.

ABSTRACT

Water purification establishments that lack an adequate quality control system can cause public health problems. The objective of this study was to examine the microbiological quality of water from small purification establishments in the city of Puebla, as well as to determine the existence of *Aeromonas* sp and *Pseudomonas* sp bacteria, and to characterize whether they present an opportunistic pathogenic phenotype. 70 water jug samples were collected from 25 establishments. Bacterial quantification was performed using the drop plate method. Microbial genera were determined by biochemical analysis using the standard methodology. In the strains that showed discrepancy, molecular identification based on partial sequences of the 16S rRNA gene was used to confirm their species, and their pathogenic characteristics were evaluated: multiresistance to antibiotics, biofilm production, and hemolytic activity. The results showed that 40 % of the purification establishments did not comply with the microbiological quality of water for human consumption. Similarly, 41.4 % of the jugs of water sampled failed to comply with the regulations, presenting total coliforms 35.7 %, *Pseudomonas* 30 %, *Enterococcus faecalis* 8.6 % and fecal coliform bacteria 5.7 %. Likewise, 56 isolates were obtained from the 29 contaminated jugs, of which 10 were molecularly characterized, resulting in 4 different species for *P. aeruginosa* and 3 for *Aeromonas*. Of the 7 *Pseudomonas* isolates, 5 presented resistance to 2 families of antibiotics and 2 showed multiresistance. In total, 36 % of the 10 isolates produced hemolysis and biofilm. Two *Aeromonas* strains showed resistance to 3rd generation Cephalosporin but did not produce hemolysis. The 10 isolates analyzed were classified as non-pathogenic. A stricter sanitary monitoring is necessary to achieve compliance with national and international standards related to the consumption of purified water, to avoid harming the health of consumers.

KEYWORDS: Coliforms, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, biofilm, multiresistance.

*Correspondencia: dalia.molina@correo.buap.mx/Fecha de recepción: 9 de agosto de 2022/Fecha de aceptación: 9 de noviembre de 2022/Fecha de publicación: 31 de enero de 2023.

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Biológicas, Ciudad Universitaria, boulevard Valsequillo y Av. San Claudio, Ed. BIO1, colonia Jardines de San Manuel, Puebla, Puebla, México, C. P. 72592.

INTRODUCCIÓN

El agua es esencial para los procesos biológicos y el mantenimiento de los ecosistemas, por lo que es importante para los organismos vivos (Pichel y col., 2019). Son varios los factores que afectan la calidad del agua, siendo los más notables las actividades antropogénicas en los asentamientos urbanos, el aumento de la industrialización y la generación de desechos (Ji y col., 2021; OMS, 2022), que contribuyen a la presencia de agentes infecciosos, químicos tóxicos y radiaciones en el agua, de acuerdo al Diario Oficial de la Federación (DOF, 2015b). La contaminación del agua es un problema de salud pública y su consumo puede causar enfermedades gastrointestinales que pueden llevar a la muerte, como gastroenteritis hemorrágica, cólera y diarrea aguda (Gutiérrez-Del-Río y col., 2018). Las bacterias coliformes causan estas enfermedades (Loyola y col., 2020).

Las infecciones diarreicas provocan alta morbilidad tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, debido a su alta incidencia en la población de niños menores de 5 años y adultos mayores (Saxena y col., 2015; OMS, 2017). Este tipo de enfermedades representa, para ambos grupos de naciones, un alto costo económico a nivel de salud e impacto social (Kamal y Abdel-Latef, 2015; Sacchetti y col., 2015).

Las bacterias comúnmente consideradas agentes etiológicos de la diarrea aguda son los diferentes patotipos de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Campylobacter* sp, *Yersinia* sp, *Vibrio cholerae* y *Enterococcus faecalis* (Wu y col., 2011; DOF, 2015b; DOF, 2021).

También se han identificado otros géneros como patógenos oportunistas que causan diarrea en personas inmunocomprometidas, como *Pseudomonas* sp, *Klebsiella* sp y *Aeromonas* sp. Estas bacterias han sido aisladas del agua potable, de acuerdo con el Diario Oficial de la Federación (DOF, 2015b). Así mismo, *Aeromonas* es capaz de sobrevivir en agua que ha sido clorada, y su presencia se ha asociado con enfermedades gastrointestinales en hu-

manos y animales (Skwor y col., 2014; Miyagi y col., 2017).

La patogenicidad de un microorganismo es la habilidad de causar daño a un hospedero (Madigan y col., 2015), una bacteria patógena emplea diferentes factores de virulencia para dañar y adaptarse contra los diferentes mecanismos de defensa del hospedero (Jurado-Martín y col., 2021). La formación de biopelícula confiere virulencia en bacterias patógenas oportunistas, ya que ayuda a la adhesión y a la colonización bacteriana, reduce la sensibilidad a los antibióticos y evita que el sistema inmunológico reconozca a la bacteria (Chenia y Duma, 2017). La multirresistencia es definida como la resistencia al menos a un antibiótico de tres o más familias diferentes, esto favorece a las bacterias patógenas para continuar con la infección en su hospedero (Madigan y col., 2015), sin ser eliminado aún con el suministro de antibióticos. Estas bacterias aumentan la morbilidad y la mortalidad en la población (Nath y col., 2020). La hemólisis es considerada un factor de virulencia, debido a que la bacteria produce y transporta proteínas y toxinas que destruyen al eritrocito, la hemoglobina y otras células (Madigan y col., 2015).

Aeromonas y *Pseudomonas* han sido descritas como bacterias multirresistentes a antibióticos y formadoras de biopelícula (Govender y col., 2021); algunas especies de estos géneros bacterianos se han reportado con capacidad hemolítica (Nowrotek y col., 2021). La biopelícula es una estructura constituida por exopolisacáridos y bacterias, que le otorga a la comunidad bacteriana protección ante el estrés ambiental (Sala-Comorera y col., 2016). En el caso de las bacterias patógenas, la biopelícula le confiere atributos para el establecimiento de la infección al hospedero, además, que es un ambiente idóneo que favorece la transferencia horizontal de genes que codifican la resistencia a antibióticos. La presencia de estas bacterias en el agua puede ser una fuente de diseminación de dichos genes de multirresistencia entre los miembros de la comunidad bacteriana (Mulamattathil y col., 2014).

Las Naciones Unidas se han encargado de generar políticas de prevención para reducir las enfermedades gastrointestinales provocadas por la contaminación del agua (Cerna-Cortes y col., 2019). La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2022) es responsable de desarrollar estándares internacionales para cumplir con los requisitos que garantizan la calidad del agua y promover la salud de las poblaciones (DOF, 2015c; Pichel y col., 2019). En México, las Normas Oficiales Mexicanas establecidas por el gobierno federal, regulan el saneamiento del agua para consumo personal y doméstico. Estos lineamientos establecen y describen los límites permisibles de los indicadores bacteriológicos, con el fin de asegurar y preservar la calidad del agua que se entrega al consumidor (DOF, 2021): 1) coliformes fecales y totales (DOF, 2015c), 2) *Pseudomonas aeruginosa* (DOF, 2015b), 3) *Enterococcus faecalis* (DOF, 2015b), 4) *Vibrio cholerae* (Loyola y col., 2020), y 5) esporas de *Clostridium* reductoras de sulfito (Miyagi y col., 2017); asimismo, determinan los análisis a los que debe someterse el agua para evaluar el control sanitario del agua (DOF, 2015a).

En México, existen procesos de potabilización de agua en la red municipal de agua que cumplen con los estándares establecidos; sin embargo, los consumidores han optado por obtener agua de establecimientos dedicados a la purificación y embotellamiento debido a su desconfianza hacia los sistemas de abastecimiento, sus métodos y características organolépticas del agua local (DOF, 2015b; DOF, 2021). Aunque, se tiene evidencia que cuestiona el cumplimiento de las normas sanitarias por parte de establecimientos dedicados a la purificación y venta de agua para consumo humano, particularmente de las plantas más pequeñas. La mala calidad de agua que comercializan estas empresas (Aziz y col., 2017; Mohamed y col., 2020), es consecuencia del incumplimiento de las normas sanitarias (DOF, 2015b), o el mal uso de etiquetas y sellos de garantía de empresas que si cumplen con los estándares solicitados (Pichel y col., 2019).

Los estudios de la calidad del agua realizados a pequeñas plantas potabilizadoras, se han en-

focado en grandes ciudades, como la Ciudad de México (Cerna-Cortes y col., 2019); sin considerar la producción de biopelícula y la multirresistencia a antibióticos; además de la identificación del género *Aeromonas* y especies del género *Pseudomonas* distintas a *P. aeruginosa*.

El objetivo de este estudio fue analizar la calidad del agua proveniente de pequeñas plantas purificadoras de la ciudad de Puebla, en función de los indicadores bacteriológicos (coliformes fecales y totales, *P. aeruginosa* y *E. faecalis*) establecidos en las normas nacionales e internacionales; así mismo, identificar a las bacterias que presenten un fenotipo patógeno oportunista, mediante la determinación de multirresistencia a antibióticos, la capacidad de hemólisis y la formación de biopelícula.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de la muestra

La ciudad de Puebla se encuentra en la parte centro occidental del estado de Puebla, México (98°17'38.76" W, 98°01'12.72" W; 18°50'12.48" N, 19°13'51.24" N). Presenta un clima predominante subhúmedo y templado, con lluvias de verano, de acuerdo a la información del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2010).

Las muestras de agua (n = 70) fueron recolectadas a partir de 25 plantas purificadoras de pequeña escala, localizadas en la zona norponiente (NP) y suroriente (SO) en la ciudad de Puebla. Durante el periodo de marzo a noviembre de 2019, se realizó la compra de al menos 1 garrafón de agua de 20 L por semana, proveniente de 1 de las 25 purificadoras pequeñas, hasta completar dos muestras en cada establecimiento (n = 50). Únicamente en 10 establecimientos se compraron dos muestras adicionales (n = 20), debido a la detección de contaminación microbiana. Se verificó que los garrafo- nes estuvieran bien cerrados y con el sello de garantía del proveedor. El día de la compra, a cada garrafón se le quitó el empaque y se tomó una muestra de 350 mL, que se colocó en un recipiente estéril debidamente rotulado. Las muestras se mantuvieron en frío (4 °C a 8 °C) para su análisis inmediato (DOF, 2015c).

Análisis de indicadores bacteriológicos

Para la identificación de coliformes totales, fecales y de las bacterias de *P. aeruginosa* se utilizó el método del número más probable (NMP) con tres réplicas para *P. aeruginosa* y cinco réplicas para coliformes totales y coliformes fecales (Mahapatra y col., 2015; Daley y col., 2018; Zhou y col., 2019). Para la determinación de las bacterias coliformes totales se realizó una prueba presuntiva con caldo Lauril sulfato (Bioxon) a 37 °C, en una incubadora (Labnet, modelo I5110A, New York, EUA), por un periodo de 24 h a 36 h. El análisis confirmatorio se llevó a cabo con caldo bilis verde brillante al 2 % (Bioxon) a 44 °C, en una incubadora (Labnet, modelo I5110A, New York, EUA) durante 24 h (DOF, 2015c; Miyagi y col., 2017). Una muestra se consideró positiva para coliformes totales si presentaba > 1.1 NMP para 100 mL de agua; las muestras negativas fueron aquellas que tenían concentraciones no detectables de bacterias o < 1.1 NMP por 100 mL de agua (Miyagi y col., 2017).

El límite permisible de *P. aeruginosa* es < 1.1 NMP por 100 mL; coliformes fecales = 0 NMP en 100 mL (Loyola y col., 2020) y para *E. faecalis* < 1.1 NMP en 100 mL (DOF, 2015b; Pant y col., 2016).

Se trabajó el método de goteo en placa para cuantificar las bacterias. Se establecieron diluciones decimales seriadas para cada muestra, con un volumen final de 1 mL. Posteriormente, se inocularon 20 µL de cada dilución en placas con medios selectivos. Para cuantificar los coliformes totales y fecales, se utilizaron agar MacConkey y agar eosina azul de metileno (Bioxon) (Farkas y col., 2012; Mohamed y col., 2020). Las bacterias *P. aeruginosa* se detectaron usando un medio selectivo agar leche; y *E. faecalis* utilizando agar bilis esculina (BD Difco) (DOF, 2015a; Pant y col., 2016). Las placas se mantuvieron a 35 °C, en una incubadora (Labnet, modelo I5110A, New York, EUA) durante 24 h.

Selección de los aislados

A partir de las 70 muestras de agua de garrafón colectadas y analizadas, 29 resultaron con-

taminadas. De los 29 garrafones con poblaciones bacteriológicas, se obtuvieron 56 cepas (en 27 garrafones se colectaron 2 cepas en cada uno, por lo que sumaron 54; y en 2 garrafones se colectó 1 cepa por garrafón, obteniendo 2 cepas). El criterio de selección fue la morfología colonial, se buscó que esta fuese idéntica al interior de cada muestra.

Identificación bioquímica

Las colonias presuntivas aisladas (56) se examinaron mediante tinción de Gram. Posteriormente, se realizó una identificación bioquímica a través de la prueba estándar (Farkas y col., 2012) y el kit de identificación TM Identification Systems Enteric/Nonfermenter (BBL Crystal) (Nath y col., 2020). Los 21 aislados identificados de acuerdo con la NOM-127-SSA1-202 como *P. aeruginosa* carecieron de un perfil bioquímico preciso, 14 cepas presentaron un perfil bioquímico similar a *P. aeruginosa*, en un 70 %, y 7 aislados mostraron un perfil ambiguo (40 % de semejanza). Las 25 colonias de coliformes totales se clasificaron, de acuerdo con su perfil bioquímico, como *Enterobacter cloacae* (13) y *Serratia marcescens* (12), pero de estas últimas, 3 colonias presentaron un perfil ambiguo (35 % de semejanza) para coliformes totales. A los 10 aislados (7 de mayor ambigüedad para *P. aeruginosa* y 3 para coliformes, específicamente *Serratia marcescens*) se les realizó la amplificación parcial del gen 16S rRNA, para la confirmación del género bacteriano. El aislado *Escherichia* sp M3 se utilizó como control positivo para *Escherichia coli*, ya que presentó un perfil bioquímico bien definido.

Identificación molecular del gen 16S rRNA

La identificación molecular de las muestras que fueron ambiguas en el género bacteriano (n = 10) se realizó mediante el análisis de secuencias parciales del gen 16S rRNA. El ADN se extrajo usando un kit de purificación de ADN genómico (Promega Co., EE. UU.). Los oligonucleótidos conservados empleados para la reacción de PCR fueron fD1 (5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5AAGGAGGTG ATCCAGCC-3'). Para ello, se utilizó el reactivo Master MIX (Invitrogen), que amplifica un frag-

mento de 1500 pb, que corresponde al 90 % de la longitud del gen 16S rDNA, en un termociclador (Bio-Rad, T100, Berkeley, Estados Unidos de América) (Chenia y Duma, 2017). La amplificación por PCR se llevó a cabo de la siguiente forma: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, alineamiento a 59 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 1 min. Se realizó una etapa de extensión de 10 min a 72 °C después del último ciclo, para asegurar la síntesis completa del fragmento. La amplificación del gen se verificó con una electroforesis en gel de agarosa al 1 %, y la tinción se realizó con bromuro de etidio al 0.5 %. El marcador de peso molecular empleado para verificar el tamaño del amplificado fue de 1 Kb (Thermo Scientific). El gel fue visualizado bajo luz ultravioleta con un fotodocumentador (Witeg, WGD-30, Korea). Los genes purificados se enviaron a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA-UNAM.

Las secuencias parciales se analizaron con el programa informático denominado herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST, por sus siglas en inglés: Basic Local Alignment Search Tool) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica, que es parte de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos (NCBI, por sus siglas en inglés: National Center for Biotechnology Information). El programa BLAST permitió identificar el género bacteriano de los aislados, mediante la búsqueda de secuencias similares en la base de datos internacional del GenBank del NCBI. Los parámetros que indicaron que los aislados pertenecían a un determinado género fueron el porcentaje de identidad superior al 97 % y un valor de E igual a 0 (Aziz y col., 2017; Nath y col., 2020). Las secuencias parciales de los 7 aislados de *Pseudomonas* se alinearon con las secuencias de otros organismos de este mismo género. Los 3 aislados inicialmente identificados como coliformes (*Serratia marcescens*) se alinearon con especies de *Aeromonas*. Lo anterior de acuerdo con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank. Las

secuencias utilizadas correspondieron a los siguientes números: MF716716.1, MK652096.1 y KRO06248.1 para *Aeromonas*; MH211267.1, KJ756337.1, MH304251.1, MG833399.1 y AF390747.1 para las diferentes especies de *Pseudomonas*; y para *Escherichia* sp MH465145.1.

Las secuencias parciales de los 10 aislados y las especies relacionadas filogenéticamente fueron analizadas por alineamientos múltiples de secuencia, para esta determinación se utilizó el programa CLUSTAL-X, y la historia evolutiva se especificó con la construcción de un árbol filogenético y se aplicó el algoritmo de máxima verosimilitud del programa MEGA (versión 7).

Ensayo de cristal violeta para biopelícula en microplacas

La formación de biopelícula en microplacas se cuantificó mediante la tinción cristal violeta reportada por Elhariry y col. (2012) y Huerta y col. (2016). Los cultivos se dejaron crecer durante una noche (18 h) y se diluyeron en una proporción de 1:1000 en caldo glicerol fosfato (GP), las diluciones se transfirieron a microplacas de 96 pozos, a un volumen de 200 µL por pozo. Posteriormente, la placa se mantuvo durante 48 h a 37 °C sin agitación, en una incubadora (Labnet, modelo I5110A, New York, EUA). Los pozos fueron aspirados y lavados con agua destilada y se secaron al aire. Las biopelículas se tiñeron durante 15 min con 250 µL de solución de cristal violeta al 1 %. Los pozos se lavaron minuciosamente con agua corriente y se dejaron secar al aire. La cuantificación del cristal violeta se realizó solubilizando al cristal violeta con etanol durante 30 min y se midió la absorbancia a la densidad óptica de 620 nm, en un espectrofotómetro de ELISA (ThermoLab, LabX Mutiskan, Ontario, Canada). La formación de la biopelícula fue normalizada con la concentración de proteína en función de la densidad óptica (DO/mg de proteína), que fue medida con el espectrofotómetro (DLAB, SP_UV-1100, Beijing, China). Cada determinación se realizó con 9 repeticiones. La cepa control utilizada fue

Pseudomonas putida KT2440, cepa formadora de biopelícula, característica previamente documentada (Liu y col., 2017).

Se establecieron tres niveles de producción de biopelícula utilizando los criterios de clasificación de Basson y col. (2008): nivel bajo ≥ 0.2 y ≤ 0.3 , nivel moderado > 0.3 y < 0.8 , nivel alto > 0.8 de DO/mg de proteína.

Prueba de resistencia a antibióticos

Se empleó el método de difusión en disco para 12 agentes antimicrobianos (Multibac I.D): Nitrofurantoína (NF 300 μg), Sulfametoxazol (SXT 25 μg), Cloranfenicol (CL 30 μg), Norfloxacina (NOF 10 μg), Ciprofloxacina (CPF 5 μg), Netilmicina (NET 30 μg), Cefotaxima (CFX 30 μg), Cefalotina (CF 30 μg), Gentamicina (GE 10 μg), Carbenicilina (CB 100 μg), Amikacina (AK 30 μg) y Ampicilina (AM 10 μg). Las placas se mantuvieron durante 48 h a 37 °C en incubadora Labnet (modelo I5110A, New York, EUA), siguiendo las técnicas descritas por Mohamed y col. (2020); Nowrotek y col. (2021). La sensibilidad fue interpretada de acuerdo con los estándares del Instituto de Normas de Laboratorio Clínico (Nowrotek y col., 2021). La cepa control utilizada fue *Pseudomonas putida* KT2440 por su multirresistencia a antibióticos (Baltrus y col., 2021).

Detección de hemólisis

Se analizó la presencia del factor de virulencia de reacción hemolítica de eritrocitos. Se utilizó la base del agar sangre (Bioxon) más el 5 % de eritrocitos de conejo. Los aislados bacterianos fueron sembrados y se mantuvieron a 37 °C en incubadora Labnet (modelo I5110A, New York, EUA), durante 24 h a 48 h (Skwor y col., 2014; Nath y col., 2020). La cepa control utilizada fue *Pseudomonas putida* KT2440, carente de capacidad hemolítica, característica que se evidenció en este estudio. El tipo de hemólisis presente en las cepas se caracterizó como α (parcial), β (completa), o γ (ausente).

Criterios de patogenicidad

Los criterios establecidos en este experimento para designar a la bacteria como patógeno

oportunistas fueron: presentar dos factores de virulencia, 1) producir biopelícula en alta concentración y 2) mostrar actividad hemolítica; aunado a la ventaja de la multirresistencia, resistente al menos a un antibiótico de tres o más familias diferentes. En contraste, una bacteria se considera no patógena cuando presenta un solo factor de virulencia y no posee multirresistencia a antibióticos.

Datos y análisis estadístico

La calidad bacteriológica del agua se examinó siguiendo los métodos de las Normas Oficiales Mexicanas y de la OMS (2017). Se calcularon la media aritmética y el error estándar. Las mediciones de incidencia de contaminación se describieron mediante frecuencias relativas. La incidencia de los indicadores bacteriológicos fue analizada por región mediante una comparación de Chi-cuadrado, teniendo como variables categóricas a las filas (x): las zonas NP y SO y, columnas (y): el tipo de indicador microbiológico, agrupados en 3 categorías: 1) coliformes totales, 2) coliformes fecales más *Enterococcus faecalis* y 3) *Pseudomonas* sp). La biopelícula producida por las 10 cepas bacterianas y el grupo control, fue comparado mediante un análisis de varianza (ANOVA) paramétrico de una vía. Los datos fueron transformados con la ecuación: $\log(x) + 2.4036$, para cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Se hicieron las comparaciones *a posteriori* a través de la prueba de diferencias honestamente significativas (HSD, por sus siglas en inglés: Honestly Significant Difference) de Tukey-Kramer (Software JMP 10.0.0, Copyright© 2012 SAS Institute Inc.).

RESULTADOS

Indicadores bacteriológicos

El análisis bacteriológico de las 70 muestras de agua indicó que 29 de ellas (41.4 %) estuvieron contaminadas y no cumplieron con la NOM-127-SSA1-2021 (DOF, 2021), así como las normas internacionales (Tabla 1), en tanto que 41 (58.6 %) de ellas si cumplieron con la calidad microbiológica adecuada. De las 70 muestras (Tablas 1 y 2), únicamente

■ **Tabla 1.** Muestras de agua de garrafón provenientes de pequeñas plantas purificadoras con indicadores bacteriológicos por encima de las recomendaciones de la NOM-127-SSA1-2021 (DOF, 2021).
 Table 1. Samples of jug water from small purification establishments with bacteriological indicators above the recommendations of NOM-127-SSA1-2021 (DOF, 2021).

Microorganismos indicadores	*Muestras con contaminación bacteriana		**Plantas purificadoras que presentaron agua con contaminación bacteriana	
	(n)	(%)	(n)	(%)
Bacterias coliformes totales	25	35.7	10	40
Bacterias coliformes fecales	4	5.7	4	16
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	8.6	5	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ***	21	30.0	10	40

*Total de muestras (n = 70), total de muestra contaminadas (n = 29); **Plantas purificadoras (n = 25), plantas purificadoras contaminadas (n = 10). Se empleó el análisis de frecuencia relativas. ***De acuerdo con el método oficial de la NOM-127-SSA1-2021.

■ **Tabla 2.** Frecuencia de indicadores microbiológicos en muestras de agua contaminadas, procedentes de dos regiones de la ciudad de Puebla.

Table 2. Frequency of microbiological indicators in contaminated water samples from two regions of the city of Puebla.

Indicadores microbiológicos*			
Regiones	Coliformes totales	Coliformes fecales y <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ***
Norponiente (NP)	13	7 (3 y 4)**	12
Suroriente (SO)	12	3 (1 y 2)**	9

*La prueba de Chi-cuadrado no indicó diferencias estadísticamente significativas (P < 0.05). Valores obtenidos de 56 aislados provenientes de 29 muestras contaminadas. **Se indica el número de coliformes fecales y *Enterococcus faecalis*, respectivamente. ***De acuerdo con el método oficial de la NOM-127-SSA1-2021 (DOF, 2021).

25 (35.7 %) presentaron contaminación por coliformes totales y 4 (5.7 %) reportaron bacterias coliformes fecales, mientras que 21 (30 %) registraron *Pseudomonas aeruginosa* y 6 (8.6 %) *E. faecalis*. Los garrafones de agua contaminados con bacterias coliformes totales y *Pseudomonas* se reportaron en 40 % (n = 10) de las 25 plantas purificadoras evaluadas; 4 de estas 10 plantas presentaron bacterias coliformes fecales y 5 *E. faecalis* (Tabla 1). El análisis de Chi-cuadrado indicó que no hubo diferencia significativa (P < 0.05) entre el tipo de indicador microbiológico detectado para cada zona de la ciudad (NP y SO) (Tabla 2).

Las muestras de agua presentaron una población bacteriana de coliformes totales entre

10² NMP/100 mL a 10⁶ NMP/100 mL, mientras que para coliformes fecales la población bacteriana fluctuó entre 10⁴ NMP/100 mL a 10⁵ NMP/100 mL. Las muestras con presencia de *E. faecalis* registraron poblaciones entre 10³ NMP/100 mL a 10⁶ NMP/100 mL; mientras que las poblaciones de *P. aeruginosa* se encontraron en el orden de 10⁴ NMP/100 mL a 10⁶ NMP/100 mL (Tabla 3).

Identificación bioquímica

En el caso *P. aeruginosa*, se reportaron 21 organismos presentes en las muestras contaminadas mediante la técnica indicada por la NOM-201-SSA1-2015 (DOF, 2015b) (Tabla 4). La norma establece como prueba positiva para esta especie la producción de sideróforos en el medio

■ Tabla 3. Identificación cuantitativa de los indicadores bacteriológicos en las muestras de agua de garrafón provenientes de pequeñas plantas purificadoras que no cumplen con la NOM-127-SSA1-2021 (DOF, 2021).

Table 3. Quantitative identification of bacteriological indicators in jug water samples from small purification establishments that do not comply with NOM-127-SSA1-2021 (DOF, 2021).

Microorganismos indicadores	Límite permisible*	Cuento de población bacteriana en las muestras UFC/100 mL				
		1.1 (n)	10 ² a 10 ³ (n)	10 ³ a 10 ⁴ (n)	10 ⁴ a 10 ⁵ (n)	10 ⁵ a 10 ⁶ (n)
Bacterias coliformes totales	< 1.1 NMP	0	2	2	19	2
Bacterias coliformes fecales	0 NMP	0	0	0	4	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	< 1.1 NMP	0	0	3	2	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> **	< 1.1 NMP	0	0	0	17	4

*Límites bacteriológicos permisibles de acuerdo con la OMS (2017) y la NOM-127-SSA1-2021 (DOF, 2021); plantas purificadoras (n = 25), muestras de agua (n = 70); UFC: unidades formadoras de colonias. Se presenta la media de tres experimentos independientes. La n representa las muestras positivas con la correspondiente población de cada indicador bacteriológico. **De acuerdo con el método oficial de la NOM-127-SSA1-2021.

■ Tabla 4. Identificación bioquímica estándar de los organismos presentes en las muestras positivas de agua de garrafón provenientes de pequeñas plantas purificadoras.

Table 4. Standard biochemical identification of bacterial genera in positive samples of jug water from small purification establishments.

Género bacteriano	Muestras positivas	
	(n)	(%)
<i>Enterobacter cloacae</i> (coliforme total)	13	44.8
<i>Serratia marcescens</i> (coliforme total)	12**	41.4
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	20.7
<i>Pseudomonas</i> sp	21*	72.4
<i>Escherichia coli</i> (coliforme fecal)	4	13.8

Se analizaron 56 aislados provenientes de las 29 muestras positivas a contaminación. *7 aislados de *Pseudomonas* y **3 aislados de *Serratia* presentaron incongruencias en la identificación del género bacteriano por bioquímica estándar.

selectivo agar leche, visualizados como pigmentos fluorescentes amarillo-verdoso. Sin embargo, al realizar la identificación bioquímica estándar para dicha bacteria, se detectaron discrepancias en las pruebas enzimáticas para la degradación de la fuente de carbono y de aminoácidos, así como, la producción de otros sideróforos, que dificultaron su confirmación. Se encontraron 7 cepas que mostraron eleva-

da inconsistencia en las pruebas bioquímicas confirmatorias para *Pseudomonas aeruginosa*.

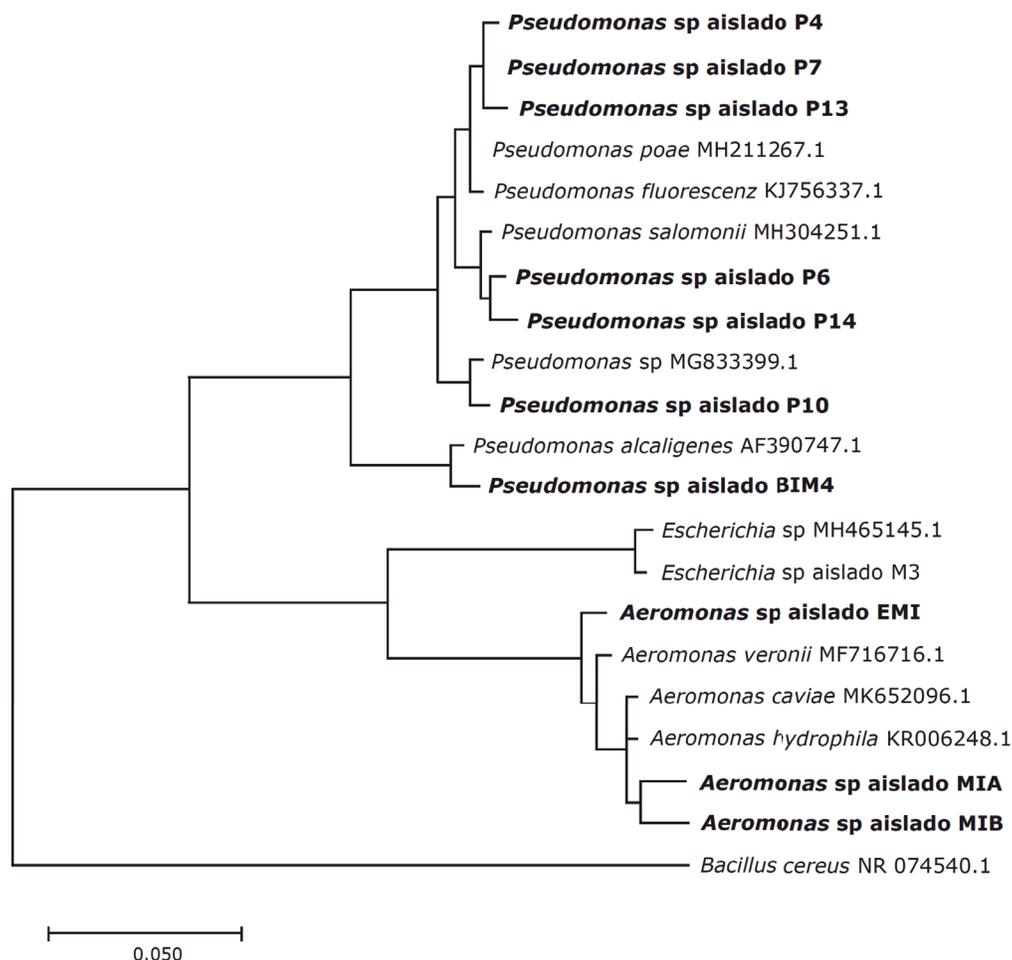
Los 56 aislados obtenidos de las 29 muestras de agua fueron identificados mediante pruebas microbiológicas y reportados en la Tabla 4. Los organismos *E. cloacae*, *E. faecalis* y *E. coli* fueron corroboradas bioquímicamente. En el caso de *S. marcescens* (coliformes totales), 3 cepas

no pudieron ser confirmadas, ya que mostraron variaciones en la degradación de la fuente de carbono y aminoácidos.

Análisis molecular

El análisis molecular identificó que los aislados inicialmente identificados como *P. aeruginosa*, mediante la NOM-201-SSA1-2015, si pertenecen al género *Pseudomonas*, pero se sugiere

que están relacionados filogenéticamente con las especies *P. alcaligenes*, *P. salomonii*, *P. fluorescens* y *P. poae* (Figura 1). Por otra parte, los aislados identificados inicialmente como *S. marcescens* (aislados EMI, MIA y MIB) en realidad forman parte del género *Aeromonas* y presentan relación filogenética con las especies *Aeromonas veronii*, *Aeromonas caviae* y *Aeromonas hydrophila*.



■ Figura 1. Árbol filogenético basado en el análisis de la secuencia parcial del gen del 16S rRNA, de 7 aislados de *Pseudomonas* y 3 aislados de *Aeromonas* (en negritas) que muestra la relación filogenética con los taxones cercanos.

Figure 1. Phylogenetic tree based on partial sequence analysis of the 16S rRNA gene of 7 *Pseudomonas* isolates and 3 *Aeromonas* isolates (in bold) showing the phylogenetic relationship with nearest taxa.

Según un análisis de alineamiento realizado con BLAST. El aislado *Escherichia sp* M3 se utilizó como control positivo. La historia evolutiva de las secuencias se construyó con el algoritmo de estimación de máxima verosimilitud (EMV). La longitud de las secuencias alineadas es de 800 pb. Los números de acceso se indican junto a los nombres de los aislados. La barra de escala representa los valores de distancia. El análisis se realizó con MEGA versión 7.

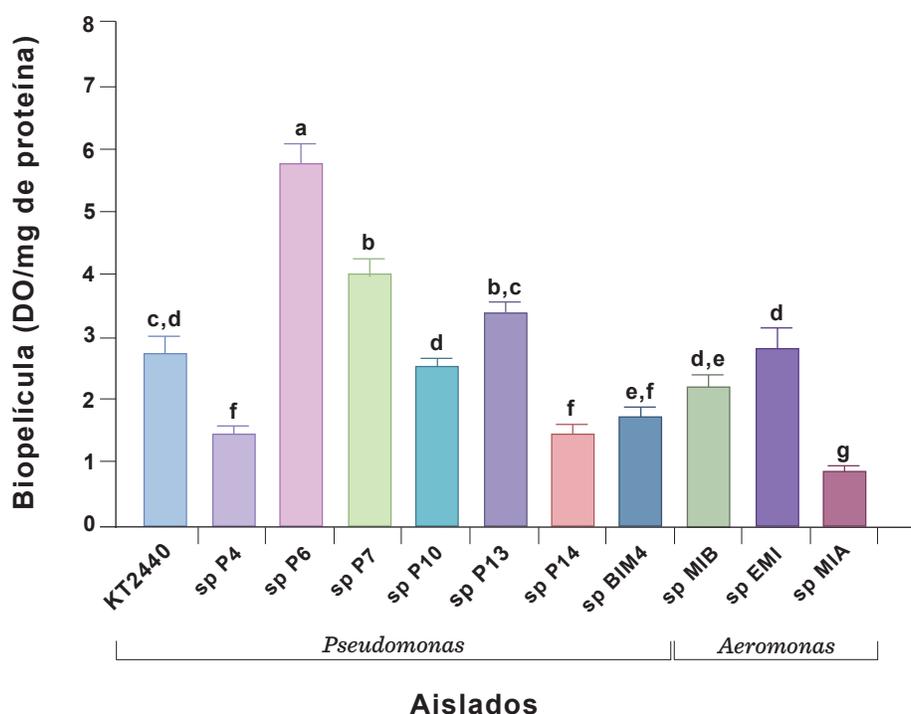
Cuantificación de biopelícula

La presencia y la cuantificación de la biopelícula se le determinó a los 10 aislados confirmados por estudios moleculares y a la cepa control *Pseudomonas putida* KT2440; todos los aislados presentaron producción de biopelícula. En la comparación de la producción de biopelícula entre los aislados se detectó diferencia entre los aislados ($F_{0.05, 10,87} = 109.5$, $P < 0.0001$). La comparación a posteriori de Tukey-Kramer indicó que el aislado *Pseudomonas* sp P6 presentó significativamente los niveles más elevados de producción de biopelícula con un promedio de 5.87 (DO)/mg de proteína, y el aislado de *Aeromonas* sp MIA presentó los niveles significativamente más bajos ($P < 0.001$) con 0.90 (DO)/mg de proteína (Figura 2).

Resistencia a antibióticos y hemólisis

Las cepas con resistencia a un mayor número de antibióticos fueron el control *P. putida* KT2440 y el aislado *Pseudomonas* sp P14, que son resistentes a 9 y 8 antibióticos, respectivamente (Tablas 5 y 6). Los aislados del género *Pseudomonas* son resistentes a norfloxacina, excepto la cepa control KT2440 y el aislado de *Aeromonas* sp MIA.

Los aislados de *Pseudomonas* sp P14 y *Aeromonas* sp EMI son bacterias multirresistentes, así como la cepa control *P. putida* KT2440 (Tabla 6), en contraste, los aislados *Pseudomonas* sp BIM4 y *Pseudomonas* sp P4 presentaron la mayor susceptibilidad a antibióticos (Tabla 5). La tendencia de la mayoría de los aislados de *Pseudomonas* sp mostraron re-



■ Figura 2. Cuantificación de biopelícula de *Pseudomonas* y *Aeromonas* por la técnica de microplaca mediante la tinción con cristal violeta (Huerta y col., 2016).

Figure 2. Quantification of the biofilm of *Pseudomonas* and *Aeromonas* isolates by the microplate technique using crystal violet staining (Huerta y col., 2016).

Se muestra la media y el error estándar de las nueve réplicas. El análisis de varianza de una vía (ANOVA) señala diferencias estadísticas significativas en al menos uno de los grupos ($F = 109.5$, $P < 0.0001$). Las letras diferentes representan una diferencia estadísticamente significativa. La cepa *Pseudomonas putida* KT2440 es el control positivo.

■ Tabla 5. Perfil de resistencia a antibióticos de las cepas bacterianas aisladas en las muestras de agua de garrafón provenientes de pequeñas plantas purificadoras.

Table 5. Profile of resistance to antibiotics of the bacterial strains isolated in the samples of jug water from small purification establishments.

Aislado	Antibióticos	Clasificación
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440*	<i>Nitrofurantoína</i>	Nitrofuranos
	<i>Sulfametoxazol</i>	Sulfonamidas
	<i>Ciprofloxacina</i>	Quinolona 2ª generación
	<i>Cefotaxima</i> ⁺ , <i>Cefalotina</i> [∞]	Betalactámicos/ Cefalosporinas ⁺ 3ª generación, [∞] 1ª generación
	<i>Gentamicina</i>	Aminoglucósidos
	<i>Carbenicilina</i> , <i>Ampicilina</i>	Betalactámicos/ Penicilinas
	<i>Cloranfenicol</i>	Fenicoles
<i>Pseudomonas</i> sp P4	Norfloxacina, Ciprofloxacina	Quinolonas 2ª generación
	Gentamicina	Aminoglucósidos
<i>Pseudomonas</i> sp P6	Norfloxacina, Ciprofloxacina	Quinolonas 2ª generación
	Netilmicina, Gentamicina, Amikacina	Aminoglucósidos
<i>Pseudomonas</i> sp P7	Norfloxacina	Quinolonas 2ª generación
	Netilmicina, Gentamicina, Amikacina	Aminoglucósidos
<i>Pseudomonas</i> sp P10	Norfloxacina	Quinolonas 2ª generación
	Netilmicina, Gentamicina, Amikacina	Aminoglucósidos
<i>Pseudomonas</i> sp P13	Norfloxacina, Ciprofloxacina	Quinolonas 2ª generación
	Netilmicina, Gentamicina, Amikacina	Aminoglucósidos
<i>Pseudomonas</i> sp P14	Sulfametoxazol	Sulfonamidas
	Norfloxacina, Ciprofloxacina	Quinolonas 2ª generación
	Netilmicina, Gentamicina, Amikacina	Aminoglucósidos
	Cefotaxima	Betalactámicos / Cefalosporinas 3ª generación
	Carbenicilina	Betalactámicos/ Penicilinas
<i>Pseudomonas</i> sp BIM4	Norfloxacina	Quinolonas 2ª generación
	Netilmicina, Amikacina	Aminoglucósidos
<i>Aeromonas</i> sp MIB	Cefotaxima	Betalactámicos / Cefalosporinas 3ª generación
<i>Aeromonas</i> sp EMI	Nitrofurantoína	Nitrofuranos
	Norfloxacina, Ciprofloxacina	Quinolonas 2ª generación
	Cefotaxima	Betalactámicos/ Cefalosporinas 3ª generación
	Gentamicina, Amikacina	Aminoglucósidos
	Ampicilina	Betalactámicos/ Penicilinas
<i>Aeromonas</i> sp MIA	Cefalotina	Betalactámicos/ Cefalosporinas 1ª generación
	Carbenicilina, Ampicilina	Betalactámicos/ Penicilinas

Para la determinación del perfil de resistencia se utilizó el método de difusión en disco para 12 agentes antimicrobianos. La hemólisis se evidenció por la capacidad de las bacterias de lisar eritrocitos utilizando el agar sangre. *Cepa control *Pseudomonas putida* KT2440.

■ Tabla 6. Producción de biopelícula, resistencia a antibióticos y grado de hemólisis de los 10 aislados de agua contaminada procedentes de pequeñas purificadoras.

Table 6. Production of biofilm, resistance to antibiotics and degree of hemolysis in the 10 isolates of contaminated water from small purification establishments.

Aislado	Producción de biopelícula	Resistencia a antibióticos	Hemólisis	*Fenotipo de patogenicidad
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440*	Intermedia	Multirresistente	γ (sin hemólisis)	No patógeno
<i>Pseudomonas</i> sp P4	Intermedia	Resistente a dos familias	α (hemólisis parcial)	No patógeno
<i>Pseudomonas</i> sp P6	Alta	Resistente a dos familias	α (hemólisis parcial)	No patógeno
<i>Pseudomonas</i> sp P7	Alta	Resistente a dos familias	α (hemólisis parcial)	No patógeno
<i>Pseudomonas</i> sp P10	Intermedia	Resistente a dos familias	γ (sin hemólisis)	No patógeno
<i>Pseudomonas</i> sp P13	Alta	Resistente a dos familias	β (hemólisis completa)	No patógeno
<i>Pseudomonas</i> sp P14	Intermedia	Multirresistente	γ (sin hemólisis)	No patógeno
<i>Pseudomonas</i> sp BIM4	Intermedia	Resistente a dos familias	γ (sin hemólisis)	No patógeno
<i>Aeromonas</i> sp MIB	Intermedia	Resistente a una familia	γ (sin hemólisis)	No patógeno
<i>Aeromonas</i> sp EMI	Alta	Multirresistente	γ (sin hemólisis)	No patógeno
<i>Aeromonas</i> sp MIA	Baja	Resistente a una familia	γ (sin hemólisis)	No patógeno

*En este estudio se establece el fenotipo de patógeno oportunista y no patógeno de los aislados caracterizados molecularmente. 1) Patógeno oportunista, presenta dos factores de virulencia: producción de biopelícula alta y hemólisis; además, posee la ventaja de ser multirresistente. 2) No patógeno, presenta un único factor de virulencia: producción de biopelícula o hemólisis.

sistencia a dos familias de antibióticos, y los tres aislados de *Aeromonas* MIB y MIA fueron resistentes a betalactámicos.

Los aislados del género *Pseudomonas* sp P4, P6 y P7 presentaron hemólisis parcial. La cepa KT2440 (control), P10, P14 y BIM4 no presentaron hemólisis y solo el aislado de *Pseudomonas* sp P13 presentó hemólisis completa. En el caso del género *Aeromonas*, ninguno aislado presentó hemólisis (Tabla 6).

En este estudio, los 10 aislados caracterizados molecularmente fueron clasificados como no patógenos, dado que se requieren al menos 2 factores de virulencia y la multirresistencia a antibióticos para considerarlos como patógenos oportunistas (Tabla 6).

DISCUSIÓN

El 40 % de las pequeñas plantas purificadoras de la ciudad de Puebla, México, comercializan agua contaminada con coliformes fecales,

coliformes totales, *E. faecalis* y *Pseudomonas* sp (cepas presuntivas *P. aeruginosa*) (Tablas 1 y 2), de acuerdo con la NOM-127-SSA1-2021 (DOF, 2021). Existen pocos estudios que analizan la presencia de indicadores bacteriológicos en el agua de garrafón proveniente de pequeñas plantas purificadoras. Abada y col. (2019) y Cerna-Cortes y col. (2019) determinaron la calidad bacteriológica del agua obtenida de pequeños establecimientos dedicados a su purificación, de Arabia Saudita y de la Ciudad de México, respectivamente, y encontraron bacterias coliformes totales en más del 60 % de sus muestras, y entre el 3 % y el 23 % de las muestras presentaron coliformes fecales, los cuales concuerdan con lo aquí reportado.

En el presente estudio, se registraron seis muestras de agua con contaminación por *E. faecalis*. Algunas investigaciones demostraron que esta bacteria se caracteriza por su capacidad de transferir genes que codifican para la resistencia a antimicrobianos (Chacón y col., 2018; Cho y col., 2020), a pesar de que no cuenta con un potencial alto de virulencia (Enayati y col., 2015).

Existen reportes que establecen la presencia de *Enterococcus* sp en muestras de agua del grifo de Dharan, Nepal (Pant y col., 2016); por lo anterior, el monitoreo de esta bacteria es importante, ya que corrobora la presencia de contaminación fecal.

El análisis de Chi-cuadrado indicó la falta de asociación entre las zonas NP y SO con el indicador bacteriológico, mostrando similitud en la presencia de las bacterias contaminantes en ambas zonas. En el estudio de Tyagi y col. (2015) se realizó la comparación de coliformes fecales y totales en dos regiones del estado de Uttarakhand en la India, Garhwal y Kumaun; encontrando un mayor grado de contaminación en la región Kumaun. No obstante que la investigación de Tyagi se llevó a cabo en agua proveniente de cuerpos de agua naturales. Otros trabajos comparan los marcadores microbiológicos en diferentes fuentes, como tinacos municipales y botellas de agua, sin con-

siderar el origen por zonas (Pant y col., 2016). Las investigaciones que contrastan el agua proveniente de agua embotellada por regiones son escasas en la literatura y este estudio contribuye a establecer la existencia de indicadores microbiológicos por zonas.

Las muestras contaminadas presentaron varias especies de *Pseudomonas* distintas a *P. aeruginosa*, además de *Aeromonas* (Figura 1). Asimismo, solo 2 organismos aislados, más el control, mostraron resistencia a más de dos familias de antibióticos, por lo que, se consideran bacterias multirresistentes; además produjeron biopelícula.

Los resultados indicaron que las muestras de agua contaminadas presentaron hasta 100 000 veces más bacterias coliformes totales (Tabla 3) que lo estipulado en las normas nacionales e internacionales. Los coliformes totales (*Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Proteus*) son indicadores bacteriológicos que están estrechamente relacionados con la contaminación ambiental de suelos, ríos, superficies foliares de plantas y aguas residuales (Wu y col., 2011). Además, un porcentaje pequeño de las muestras de agua contaminada con bacterias coliformes totales (5.7 %), reportó altas poblaciones de *E. coli* (Tabla 3). Dicha bacteria es representativa de los coliformes fecales (DOF, 2015b), lo que sugiere la existencia de contaminación fecal en el agua (Daley y col., 2018). La presencia de *E. coli* está estrechamente relacionada con el aumento de infecciones gastrointestinales en la población (Saxena y col., 2015) por lo que, no debería estar en el agua para consumo humano (Chacón y col., 2018).

Dentro de los indicadores bacteriológicos considerados estratégicos al determinar la calidad de agua para consumo humano, está el análisis de *P. aeruginosa*. El género *Pseudomonas* es ubicuo en la naturaleza y se encuentra comúnmente en la microflora autóctona de las aguas, incluso en aquellas con bajos niveles de nutrientes (Camiade y col., 2020; Nordstedt y col., 2020).

Los resultados de este estudio señalaron que 21 de las muestras de agua embotellada contaminadas con coliformes totales presentaron poblaciones de *Pseudomonas* sp, que superaron en 100 000 veces los límites permisibles establecidos por las normas oficiales. Además, los resultados sugieren que el agua embotellada puede ser un vector de transmisión del género *Pseudomonas* que podrían causar enfermedades en grupos vulnerables y la descomposición de alimentos (Wu y col., 2011).

La versatilidad metabólica que presentan el género *Pseudomonas* y el grupo de las Enterobacterias, en algunas ocasiones, hace variar la producción de metabolitos secundarios; por lo tanto, el perfil bioquímico de estas especies, no siempre coincide con lo establecido en la literatura (Sudan y col., 2018); por ello, se realizaron análisis moleculares para corroborar la identidad del género de los microorganismos aislados.

El análisis filogenético de los 7 aislados de *Pseudomonas* mostró cercanía con las especies *P. alcaligenes*, *P. salomonii*, *P. fluorescens* y *P. poae*. Al respecto, Woodring y Farrell (2019) reportaron que *P. fluorescens* y *P. poae* tienen el potencial genético de ser patógenos oportunistas. Por otra parte, Sala-Comomera y col. (2016), aislaron a otras especies del género *Pseudomonas*, sin aislar a *P. aeruginosa*, y concluyeron que la comunidad bacteriana identificada en el agua purificada por ósmosis reversa no representa un riesgo para la salud (Sacchetti y col., 2015). Es importante, por lo tanto, determinar si las especies de *Pseudomonas*, aisladas en el presente estudio, presentaban patogenicidad. Otro microorganismo de interés para la salud pública es *Aeromonas* sp, que se aísla de forma ubicua de muestras de carne, leche, productos lácteos y agua (Vávrová y col., 2015; Stratev y Odeyemi, 2016). En el presente trabajo, se detectó la existencia de cepas de 3 *Aeromonas*, por lo que se consideró el determinar si mostraban patogenicidad.

En este estudio se identificaron aislados muy cercanamente relacionados con las especies:

A. hydrophila, *A. caviae* y *A. veronii*, que estaban presentes en las muestras contaminadas con coliformes totales. Las características bioquímicas de las especies del género *Aeromonas* sp son similares, lo que dificulta la caracterización y diferenciación fenotípica (Vávrová y col., 2015). *Aeromonas hydrophila* y *A. caviae* son patógenos acuáticos oportunistas que causan infecciones gastrointestinales (Horn y col., 2016) y septicemia en humanos y animales (Stratev y Odeyemi, 2016; Zhou y col., 2019). Los estudios que analizan el género *Aeromonas* en agua embotellada para consumo humano son prácticamente inexistentes. Sin embargo, este género se ha identificado en el agua potable y tiene la capacidad de producir enterotoxinas (Farkas y col., 2012; Miyagi y col., 2017) y su presencia se ha asociado con diarrea infantil (Aziz y col., 2017).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, ha colocado al género *Aeromonas* en la lista de especies candidatas a contaminantes, por lo que la OMS ha propuesto el uso de esta bacteria como marcador de riesgo en los sistemas de distribución de agua (OMS, 2017). Cabe mencionar que, ni el género *Aeromonas*, ni otras especies distintas a *P. aeruginosa*, están reportadas en las normas oficiales como indicadores bacteriológicos del agua para consumo humano; no obstante, han sido catalogadas como bacterias oportunistas que pueden ocasionar daños en pacientes inmunocomprometidos (Wu y col., 2011; Govender y col., 2021).

En este estudio, se analizó la producción de biopelícula en los 4 géneros de *Pseudomonas* y 3 de *Aeromonas*; ambas especies en general mostraron niveles altos e intermedios (Figura 2 y Tabla 6). La biopelícula favorece la colonización de ambos géneros a su hábitat, independientemente de si se trata de cepas patógenas o no patógenas (Maes y col., 2020) y, constituye un ambiente idóneo para la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos (Mulamattathil y col., 2014). La cantidad de biopelícula depende de varios factores, y los más reportados son la temperatu-

ra, aireación, disponibilidad de nutrientes y la especie; por ejemplo, Chenia y Duma (2017) observaron que en los aislados de *Aeromonas* procedentes de pescados y agua de mar, la cantidad de biopelícula producida a 30 °C depende de la especie. De forma similar, Elhariry y col. (2012) aislaron a *Pseudomonas* a partir de agua potable, la cual produjo biopelícula de forma moderada a 30 °C. Esta tendencia también se observó en el presente estudio, con los aislados de *Aeromonas* y *Pseudomonas*, lo que corrobora que la cantidad de biopelícula depende de la especie.

Pseudomonas se caracteriza por ser multirresistente a los antibióticos (Horn y col., 2016; Camiade y col., 2020); sin embargo, los resultados de este estudio muestran que la mayoría de los aislados de *Pseudomonas* son resistentes únicamente a dos grupos de antibióticos: Quinolonas (norfloxacina y ciprofloxacina) y Aminoglucósidos (gentamicina, amikacina y netilmicina), por lo que no se podrían considerar como bacterias multirresistentes. Solo dos excepciones mostraron multirresistencia a antibióticos: un aislado de *Pseudomonas* (P14) y un aislado de *Aeromonas* (EMI) (Tabla 6). El trabajo de Sala-Comorera y col. (2016) señaló que, el 95 % de los aislados en agua purificada fueron resistentes a cloranfenicol, aztreonam y cefotaxima.

Camiade y col. (2020) reportaron que los aislados provenientes de restos fecales de humanos y ganado manifestaron resistencia a betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos), fenicoles (cloranfenicol) y sulfonamidas (trimetoprima y sulfametoxazol), pero fueron sensibles a quinolonas y aminoglucósidos, contrario a lo que se reporta en esta investigación. La tendencia observada en la Tabla 5 es semejante al patrón de resistencia a cefalosporinas, cefixima, trimetoprima y sulfametoxazol, en aislados de aguas superficiales y residuales reportado por Govender y col. (2021).

El aislado de *Aeromonas* (EMI) presentó multirresistencia a los antibióticos (gentamicina, ciprofloxacina y betalactámicos), semejante al

perfil de resistencia de los aislados reportados en heces fecales y alimentos por Kamal y Abdel-Latef (2015) y en el 51.6 % de los aislados provenientes de agua de ambientes acuícolas obtenidos por Dhanapala y col. (2021). La resistencia a penicilina y ampicilina se ha reportado en el 100 % de los aislados de *Aeromonas* a partir de granjas piscícolas (Dhanapala y col., 2021), al igual que en la presente investigación.

La actividad hemolítica fue detectada en más de la mitad de los 7 aislados de *Pseudomonas*, en este estudio. La hemólisis en *Pseudomonas* tiende a presentarse con frecuencia en cepas que se comportan como patógenos oportunistas; por ejemplo, en *P. aeruginosa* aislada a partir de basura proveniente de hospital (Nath y col., 2020), en aislados clínicos de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* corroborados en cultivo celular (Rossignol y col., 2008). Un ejemplo particular, es *P. fluorescens*, carece de hemólisis cuando se comporta como saprófita, contrario a las cepas oportunistas provenientes de aislados clínicos que sí presentan hemólisis (Sperandio y col., 2012). Los aislados de *Aeromonas* en este trabajo no generaron hemólisis, a diferencia de lo reportado en los aislados de *A. caviae* a partir de aguas residuales, que producen beta-hemólisis, biopelícula y multirresistencia (Nowrotek y col., 2021). La actividad hemolítica de *Aeromonas* ha sido comprobada en diversos estudios como en pescados y agua de mar (Kamal y Abdel-Latef, 2015), en alimentos y muestras de heces fecales de humanos (Chenia y Duma, 2017).

De acuerdo con la evidencia en la literatura, para asignar a una bacteria como patógena oportunista se requiere evidenciar al menos tres factores de virulencia (Rossignol y col., 2008; Nowrotek y col., 2021). En este estudio se consideraron como patógenos oportunistas a las bacterias aisladas que presentaron los factores de virulencia, biopelícula y hemólisis, y la multirresistencia a antibióticos (Tabla 6). Con estas características ningún aislado fue clasificado como patógeno oportunista. Sin embargo, destaca la presencia de la *Pseudomo-*

nas sp P 13, con alta producción de biopelícula y hemólisis completa, la cual al ser resistente a dos familias de antibiótico podría afectar a pacientes inmunocomprometidos, si el tratamiento adecuado no se da de manera oportuna.

CONCLUSIONES

El 40 % de las pequeñas plantas purificadoras de agua no cumplieron con la normativa de la calidad de agua para consumo humano. La presencia de *Aeromonas* y *Pseudomonas* fue identificada en las muestras contaminadas. Los aislados de estos géneros bacterianos no

se consideraron patógenos oportunistas al no presentar las tres características evaluadas, sin embargo, destaca el amplio número de antibióticos a los cuales se están volviendo resistentes. Es recomendable ampliar la caracterización a nivel molecular y probar la patogenicidad de los aislados de *Aeromonas* y *Pseudomonas* en un modelo animal.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por el apoyo parcial vía distribución del presupuesto designado a la investigación.

REFERENCIAS

- Abada, E., Al-Fifi, Z., Al-Rajab, A. J., Mahdhi, M., and Sharma, M. (2019). Molecular identification of biological contaminants in different drinking water resources of the Jazan region, Saudi Arabia. *Journal of Water and Health*. 17(4): 622-632.
- Aziz, F., Parrado, R. J., Ouazzani, N., Dary, M., Manyani, H., Rodriguez, M. B., and Mandi, L. (2017). Sanitary impact evaluation of drinking water in storage reservoirs in Moroccan rural area. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 24(4): 767-777.
- Baltrus, D. A., Smith, C., Derrick, M., Leligdon, C., Rosenthal, Z., Mollico, M., and Clark, M. (2021). Genomic Background Governs Opposing Responses to Nalidixic Acid upon Megaplasmid Acquisition in *Pseudomonas*. *MSphere*. 6(1): e00008-21.
- Basson, A., Flemming, L. A., and Chenia, H. Y. (2008). Evaluation of Adherence, Hydrophobicity, Aggregation, and Biofilm Development of *Flavobacterium johnsoniae*-Like Isolates. *Microbial Ecology*. 55(1): 1-14.
- Camiade, M., Bodilis, J., Chaftar, N., Riah-Anglet, W., Gardères, J., Buquet, S., ..., and Pawlak, B. (2020). Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from faecal wastes in the environment and contaminated surface water. *FEMS Microbiology Ecology*. 96(2): fiae008.
- Cerna-Cortes, J. F., Cortes-Cueto, A. L., Villegas-Martínez, D., León-Montes, N., Salas-Rangel, L. P., Rivera-Gutiérrez, S., ..., and González, Y. M. J. A. (2019). Bacteriological quality of bottled water obtained from Mexico City small water purification plants: Incidence and identification of potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria species. *International Journal of Food Microbiology*. 306: 108260.
- Chacón, L., Arias, V., Barrantes, K., Beita-Sandí, W., Reyes, L., and Achí, R. (2018). Enterococci as a key parameter for water quality index: Purires River, Costa Rica. *Journal of Water and Health*. 16(6): 1007-1017.
- Chenia, H. Y. and Duma, S. (2017). Characterization of virulence, cell surface characteristics and biofilm-forming ability of *Aeromonas* spp. isolates from fish and sea water. *Journal of Fish Diseases*. 40(3): 339-350.
- Cho, S., Jackson, C. R., and Frye, J. G. (2020). The prevalence and antimicrobial resistance phenotypes of *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp. in surface water. *Letters in Applied Microbiology*. 71(1): 3-25.
- Daley, K., Truelstrup-Hansen, L., Jamieson, R. C., Hayward, J. L., Piorkowski, G. S., Krkosek, W., ..., and Huang Y. (2018). Chemical and microbial characteristics of municipal drinking water supply systems in the Canadian Arctic. *Environmental Science and Pollution Research*. 25(33): 32926-32937.
- Dhanapala, P. M., Kalupahana, R. S., Kalupahana, A. W., Wijesekera, D. P. H., Kottawatta, S. A., Jayasekera, N. K., ..., and Jagoda, S. D. S. (2021). Characterization and Antimicrobial Resistance of Environmental and Clinical *Aeromonas* Species Isolated from Fresh Water Ornamental Fish and Associated Farming Environment in Sri Lanka. *Microorganisms*. 9(10): 2106.
- DOF, Diario Oficial de la Federación (2015a). NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de

microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos, en *Diario Oficial de la Federación*. [En línea]. Disponible en: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015#gsc.tab=0. Fecha de consulta: 6 de abril de 2021.

DOF, Diario Oficial de la Federación (2015b). NOM-201-SSA1-2015, Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias, en *Diario Oficial de la Federación*. [En línea]. Disponible en: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5420977&fecha=22/12/2015#gsc.tab=0. Fecha de consulta: 6 de abril de 2021.

DOF, Diario Oficial de la Federación (2015c). NMX-AA-042-SCFI-2015. Análisis de agua - Enumeración de organismos coliformes totales, organismos coliformes fecales (Termotolerantes) y *Escherichia coli* - Método del número más probable en tubos múltiples, en *Diario Oficial de la Federación*. [En línea]. Disponible en: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5433394&fecha=18/04/2016#gsc.tab=0. Fecha de consulta: 6 de abril de 2021.

DOF, Diario Oficial de la Federación (2021). NOM-127-SSA1-2021. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de la calidad del agua, en *Diario Oficial de la Federación*. [En línea]. Disponible en: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5650705&fecha=02/05/2022#gsc.tab=0. Fecha de consulta: 6 de abril de 2021.

Elhariry, H., Gherbawy, H., El-Deeb, B., and Alalhi, A. (2012). Molecular Identification and Biofilm-Forming Ability of Culturable Aquatic Bacteria in Microbial Biofilms Formed in Drinking Water Distribution Networks. *Geomicrobiology Journal*. 29(6): 561-569.

Enayati, M., Sadeghi, J., Nahaei, M. R., Aghazadeh, M., Pourshafie, M. R., and Talebi, M. (2015). Virulence and antimicrobial resistance of *Enterococcus faecium* isolated from water samples. *Letters in Applied Microbiology*. 61(4): 339-45.

Farkas, A., Dragan-Bularda, M., Ciataras, D., Bocos, B., and Tigan, S. (2012). Opportunistic pathogens and faecal indicators in drinking water associated biofilms in Cluj, Romania. *Journal of Water and Health*. 10(3): 471-483.

Govender, R., Amoah, I. D., Adegoke, A. A., Singh, G., Kumari, S., Swalaha, F. M., ..., and Stenström, T. A. (2021). Identification, antibiotic resistance, and virulence profiling of *Aeromonas* and *Pseudomonas* species from wastewater and surface water.

Environmental monitoring and assessment. 193(5):294.

Gutiérrez-Del-Río, I., Marín, L., Fernández, J., Álvarez-San-Millán, M., Ferrero, F. J., Valledor, M., ..., and Lombo, F. (2018). Development of a biosensor protein bullet as a fluorescent method for fast detection of *Escherichia coli* in drinking water. *PLoS One*. 13(1): e0184277.

Horn, S., Pieters, R., and Bezuidenhout, C. (2016). Pathogenic features of heterotrophic plate count bacteria from drinking-water boreholes. *Journal of Water and Health*. 14(6): 890-900.

Huerta, J. M., Aguilar, I., López-Pliego, L., Fuentes-Ramírez, L. E., and Castañeda, M. (2016). The Role of the ncRNA RgsA in the Oxidative Stress Response and Biofilm Formation in *Azotobacter vinelandii*. *Current Microbiology*. 72(6): 671-679.

INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2010). Compendio de información geográfica municipal 2010 de los Estados Unidos Mexicanos, Puebla, Puebla. [En línea]. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/app/areasgeograficas/?ag=21114#collapse-Resumen>. Fecha de consulta: 19 de octubre de 2022.

Ji, L., Li, Y., Zhang, G., and Bi, Y. (2021). Anthropogenic Disturbances Have Contributed to Degradation of River Water Quality in Arid Areas. *Water*. 13(22): 3305.

Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., and McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(6): 3128.

Kamal, G. and Abdel-Latef, E. (2015). Detection of Aerolysin, Hemolysin genes and Antimicrobial susceptibility of *Aeromonas hydrophila* isolated from retail foods and human stool. *Global Veterinaria* 14(4): 528-534.

Liu, H., Xiao, Y., Nie, H., Huang, Q., and Chen, W. (2017). Influence of (p) ppGpp on biofilm regulation in *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbiological Research*. 204: 1-8.

Loyola, S., Sanchez, J. F., Maguiña, E., Canal, E., Castillo, R., Bernal, M., ..., and Rocha, C. A. (2020). Fecal contamination of drinking water was associated with diarrheal pathogen carriage among children younger than 5 years in three Peruvian rural communities. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 102(6): 1279-1285.

Madigan, T. M., Martinko, M. J., Bender, K. S., Buckley, D. H., and Stahl, D. A. (2015). *Brock biology of microorganism*. (Fourteenth edition). United State

of America: Pearson Education. 1041 Pp.

Maes, S., De-Reu, K., Van-Weyenberg, S., Lories, B., Heyndrickx, M., and Steenackers, H. (2020). *Pseudomonas putida* as a potential biocontrol agent against *Salmonella* Java biofilm formation in the drinking water system of broiler houses. *BMC Microbiology*. 20(1): 373.

Mahapatra, A., Padhi, N., Mahapatra, D., Bhatt, M., Sahoo, D., Jena, S., ..., and Chayani, N. (2015). Study of biofilm in bacteria from water pipelines. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 9(3): DC09-DC11.

Miyagi, K., Sano, K., and Hirai, I. (2017). Sanitary evaluation of domestic water supply with storage tanks and detection of *Aeromonas*, enteric and bacteria in domestic water facilities in Okinawa Prefecture on Japan. *Water Research*. 119: 171-177.

Mohamed, A., Nyerere, A., Sang, W. K., and Ngayo, M. (2020). Bottled water brands are contaminated with multidrug resistant bacteria in Nairobi, Kenya. *F1000 Research*. 9: 1337.

Mulamattathil, S. G., Bezuidenhout, C., and Mbewe, M. (2014). Biofilm formation in surface and drinking water distribution systems in Mafikeng, South Africa. *South African Journal of Science*. 110(11-12): 01-09.

Nath, S., Sinha, A., Singha, Y. S., Dey, A., Bhattacharjee, N., and Deb, B. (2020). Prevalence of antibiotic-resistant, toxic metal-tolerant and biofilm-forming bacteria in hospital surroundings. *Environmental Analysis, Health and Toxicology*. 35(3): e2020018.

Nordstedt, N. P., Chapin, L. J., Taylor, C. G., and Jones, M. L. (2020). Identification of *Pseudomonas* spp. That Increase Ornamental Crop Quality During Abiotic Stress. *Frontiers in Plant Science*. 10: 1754.

Nowrotek, M., Jałowicki, Ł., and Płaza, G. (2021). Fluoroquinolone Resistance and Virulence Properties Among Wastewater *Aeromonas caviae* Isolates. *Microbial Drug Resistance*. 27(2): 179-189.

OMS, Organización Mundial de la Salud (2017). Guías para la calidad del agua de consumo humano: Cuarta edición que incorpora la primera adenda en *Organización Mundial de la Salud*. [En línea]. Disponible en: <https://www.who.int/es/publications/i/item/9789241549950>. Fecha de consulta: 30 de abril de 2021.

OMS, Organización Mundial de la Salud (2022). Agua para consumo humano, en *Organización Mundial de la Salud*. [En línea]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>. Fecha de consulta: 30 de abril de 2021.

Pant, N. D., Poudyal, N., and Bhattacharya, S. K. (2016). Bacteriological quality of bottled drinking water versus municipal tap water in Dharan municipality, Nepal. *Journal of Health, Population and Nutrition*. 35(1): 1-6.

Pichel, N., Vivar, M., and Fuentes, M. (2019). The problem of drinking water access: A review of disinfection technologies with an emphasis on solar treatment methods. *Chemosphere*. 218: 1014-1030.

Rosignol, G., Merieau, A., Guerillon, J., Veron, W., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M., and Orange, N. (2008). Involvement of a phospholipase C in the hemolytic activity of a clinical strain of *Pseudomonas fluorescens*. *BMC Microbiology*. 8(1): 189.

Sacchetti, R., De-Luca, G., Guberti, E., and Zanetti, F. (2015). Quality of Drinking Water Treated at Point of Use in Residential Healthcare Facilities for the Elderly. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 12(9): 11163-11177.

Sala-Comorera, L., Blanch, A. R., Vilaró, C., Galofré, B., and García-Aljaro, C. (2016). *Pseudomonas*-related populations associated with reverse osmosis in drinking water treatment. *Journal of Environmental Management*. 182: 335-341.

Saxena, G., Bharagava, R. N., Kaithwas, G., and Raj, A. (2015). Microbial indicators, pathogens and methods for their monitoring in water environment. *Journal of Water and Health*. 13(2): 319-339.

Skwor, T., Shinko, J., Augustyniak, A., Gee, C., and Andraso, G. (2014). *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* predominate among potentially pathogenic ciprofloxacin and tetracycline resistant *aeromonas* isolates from Lake Erie. *Applied and Environmental Microbiology*. 80(3): 841-848.

Sperandio, D., Decoin, V., Latour, X., Mijouin, L., Hillion, M., Feuilloley, M. G., ..., and Merieau, A. (2012). Virulence of the *Pseudomonas fluorescens* clinical strain MFN1032 towards *Dictyostelium discoideum* and macrophages in relation with type III secretion system. *BMC Microbiology*. 12(1): 1-10.

Stratev, D. and Odeyemi, O. A. (2016). Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review. *Journal of Infection and Public Health*. 9(5): 535-544.

Sudan, S. K., Pal, D., Bisht, B., Kumar, N., Chaudhry, V., Patil, P., ..., and Krishnamurthi, S. (2018). *Pseudomonas fluvialis* sp. nov., a novel member of the genus *Pseudomonas* isolated from the river Ganges, India. *International Journal of Systematic*

and *Evolutionary Microbiology*. 68(1):402-408.

Tyagi, S., Singh, P., Sharma, B., Singh, R., Dobhal, R., and Uniyal, D. P. (2015). Bacteriological Assessment of Drinking Water Sources of Uttarakhand, India. *National Academy Science Letters-India*. 38(1): 37-44.

Vávrová, A., Balážová, T., Sedláček, I., Tvrzová, L., and Šedo, O. (2015). Evaluation of the MALDI-TOF MS profiling for identification of newly described *Aeromonas* spp. *Folia Microbiologica*. 60(5): 375-383.

Woodring, T. S. and Farrell, J. J. (2019). *Pseudomonas poae*-Associated Fatal Septic Transfusion Reaction, Peoria, Illinois, USA, 2017. *Emerging Infectious Diseases*. 25(8): 1445-1451.

Wu, J., Long, S. C., Das, D., and Dorner, S. M. (2011). Are microbial indicators and pathogens correlated? A statistical analysis of 40 years of research. *Journal of Water and Health*. 9(2): 265-278.

Zhou, H., Gai, C., Ye, G., An, J., Liu, K., Xu, L., and Cao, H. (2019). *Aeromonas hydrophila*, an Emerging Causative Agent of Freshwater-Farmed white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Microorganisms*. 7(10): 450.