



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DETECCIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA  
PRESENTES EN *Aeromonas* spp. AISLADAS DE  
VEGETALES QUE SE CONSUMEN CRUDOS,  
CULTIVADOS EN EL LAGO DE XOCHIMILCO,  
CDMX, MÉXICO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A**

**P R E S E N T A:**

**ALINE CRUZ MARTÍNEZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. IRMA AURORA ROSAS PÉREZ**

**Ciudad Universitaria, CDMX 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Hoja de datos del jurado

### 1. Datos del alumno

Cruz

Martínez

Aline

55 54 32 99 30

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

310127675

### 2. Datos del Asesor

Rosas

Pérez

Irma Aurora

### 3. Datos del sinodal 1

Dra.

Irma Aurora

Rosas

Pérez

### 4. Datos del sinodal 2

Dra.

Ruth Cecilia

Vanegas

Pérez

### 5. Datos del sinodal 3

M. en C.

Manuel

Hernández

Quiroz

### 6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Sebastián Ricardo

Zúñiga

Lagunes

### 7. Datos del sinodal 5

M. en C.

Leticia

Martínez

Romero

9. Datos de la tesis

Detección de factores de virulencia presentes en *Aeromonas* spp. aisladas de vegetales que se consumen crudos, cultivados en el lago de Xochimilco, CDMX, México

74 p.  
2017

10. Palabras clave

Lechuga, *Aeromonas* spp., Xochimilco, factores de virulencia, resistencia a antibióticos, biopelícula.

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a la Dra. Irma Aurora Rosas Pérez por permitirme realizar y desarrollar esta investigación bajo su tutoría, así como el apoyo que me brindo desde el primer día en clase hasta el final de mi proyecto.

A la M. en C. Leticia Martínez Romero agradezco todo el apoyo que me brindó a lo largo del proyecto, su compañía y asesoría durante los muestreos en campo así como en el trabajo de laboratorio y por los conocimientos, tiempo y paciencia que me dedicó para que aprendiera con precisión cada técnica empleada en la realización del proyecto así como los aportes y revisiones a mi proyecto.

A la M. en C. María Eva Salinas Cortés le agradezco el tiempo y conocimiento que me brindó para realizar mi proyecto, las dudas resueltas y los aportes a mi trabajo. Así como su compañía en el laboratorio.

Agradezco al Sistema Nacional de Investigadores, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología – CONACyT, por la beca que se me otorgó durante 2 años para la realización del presente trabajo de investigación.

Agradezco a Axel Xolalpa Jiménez por su apoyo con las fotografías en campo así como su tiempo paciencia y dedicación.

## Dedicatoria

Durante este camino al que llamamos vida he tenido caídas y tropiezos, he tenido soledad y compañía, he tenido apoyo de muchas personas, no puedo mencionar los nombres de todas las personas que han formado parte de mi vida y me han apoyado para llegar hasta este punto, es por eso que doy gracias a todos aquellos que en su corto y largo paso han dejado una enseñanza en mi vida.

Dedico mis esfuerzos y logros a mi Abuelita Soledad Flores Jiménez quien desde lo lejos me ha guiado durante toda la vida, me abrió la primer puerta a hacer lo que más me gusta y nunca perder la alegría de hacerlo; te recuerdo con una sonrisa misma que me heredaste. A mis padres Martín Cruz Flores y Martha Estela Martínez Díaz gracias por brindarme todo lo necesario para tomar las mejores decisiones y permitirme elegir siempre mi futuro, por darme sus conocimientos y llenarme de aventuras, mismas que me llevaron a elegir este camino en la aventura de la Biología. Sus esfuerzos ahora son una realidad, valoro y agradezco todo el tiempo que me han dedicado durante estos años.

Dedico este logro a mi hermano Omar Cruz Martínez, amigo y compañero de alegrías y tristezas, aventuras y enseñanzas, es gracias a ti hermano que logré muchas de las cosas que me propuse, me ayudaste a formar la resistencia que tengo el día de hoy.

Cada paso en mi vida, profesores, amigos y familiares ustedes han sido más que una guía. Gracias profesores desde preescolar hasta la facultad son demasiados nombres los que debo mencionar, cada uno intervino en mis logros y formaron parte importante de mi vida.

Dr. Julio Muñoz Rubio, fue mi primer inspiración en la carrera, me ayudo a confirmar que estaba en la carrera correcta y que cada paso se debe dar con firmeza, sus enseñanzas y consejos han estado presentes no solo en el aula, si no en mi vida. Al M. en C. Roberto Márquez Huitzil, profesor gracias por enseñarme que la Biología puede ser tan inmensa e increíble, por mostrarme la importancia de los recursos de los cuales hacemos uso y del daño que genera nuestra presencia al planeta, así como las formas en las que podemos ayudar a restaurarlo, que cuesta tanto como restaurar nuestra alma cuando se ha roto. A las M. en C. Leticia Martínez Romero y María Eva Salinas Cortés su apoyo, tiempo y conocimientos no fue lo único que me brindaron durante mi estancia en el laboratorio, si no su amistad, fortaleza y largas charlas acerca de la vida.

Amigos que me han acompañado toda la vida a pesar de que ésta nos ha separado en diferentes ocasiones pero siempre encuentra la forma de reunirnos aunque sea por un breve tiempo, Carlos Adrián Jiménez Fragoso, Lucero Mescli Hernández Cedillo, Francis Beymar Cintrón Martínez crecimos juntos y alejados, platicamos tanto todos nuestros sueños, ahora platicamos como estamos haciéndolos realidad. Lesli Yadira Rojas Calderas amiga y compañera de vida, juntas iniciamos un sueño

y asimismo lo terminamos, elegimos nuestras carreras, hoy juntas seguimos dando todo por continuar con nuestras metas, eres un gran apoyo en mi vida has estado ahí en cada momento que te he necesitado. Miguel Ortíz Rentería fue tu compañía, alegría y carácter el mejor apoyo para no darnos por vencidos durante la carrera, prácticas de campo que guardaremos siempre en la memoria más que en los cientos de fotos que tomamos. Compañeros dentro y fuera del aula los tengo en mis recuerdos.

A mis tías Lubia Cruz Flores gracias por creer en mí y darme ánimo a seguir cada que me sentía vencida, usted me enseñó que se debe seguir trabajando todos los días a pesar de estar cansada y Adriana Martínez Díaz has sido como una hermana gracias por estar siempre ahí.

Héctor Flores García, primo amigo casi hermano, eres un apoyo importante, juntos en aventuras y trabajos hemos logrado dar pasos importantes en nuestra vida y juntos seguiremos creciendo.

A aquellas personas que entraron y salieron de mi vida, me dieron un poco de su tiempo y mucho apoyo; así como a aquellas que ahora forman parte importante les dedico unas líneas donde no hay muchas palabras pero si miles de sentimientos que están en mi memoria.

Agradezco a la máxima casa de estudios UNAM, al Colegio de Ciencias y Humanidades Plantel Sur y a la Facultad de Ciencias; en el momento en que se me asignó un número de cuenta supe que mi vida tendría sentido sólo tenía que esforzarme y dar todo hasta demostrar la razón por la cual fui aceptada. Hoy le doy las gracias por todas las oportunidades que se me brindaron, más que una institución se convirtió en mi segundo hogar en el cual he crecido y me he formado no solo académicamente, si no como ser humano con sentimientos y valores. Es un orgullo y satisfacción poder concluir mis estudios de Biología en la Facultad de Ciencias de la UNAM.

## Contenido

<b>I. Resumen</b>	9
<b>1. Introducción</b>	11
<b>2. Antecedentes</b>	13
2.1 Generalidades de <i>Aeromonas</i>	15
2.2 Identificación basada en el gen ARNr 16s	17
2.3 <i>Aeromonas</i> como patógeno emergente	18
2.4 Epidemiología del género <i>Aeromonas</i>	18
2.5 Antecedentes en México	19
2.6 Factores de virulencia en <i>Aeromonas</i>	20
2.7 Sensibilidad a antibióticos	24
2.8 Formación de biopelículas	24
<b>3. Justificación</b>	26
<b>4. Hipótesis</b>	27
<b>5. Objetivos</b>	27
5.1 Objetivo general	27
5.2 Objetivos específicos	27
<b>6. Materiales y métodos</b>	28
6.1 Área de estudio	28
6.2 Registro de parámetros fisicoquímicos	28
6.3 Muestreo de agua	29
6.4 Muestreo de suelo	30
6.5 Muestreo de vegetales (Lechuga)	30
6.6 Aislamiento de <i>Aeromonas</i> en vegetales, agua y suelo	31
6.7 Caracterización fenotípica de aislados presuntivos de <i>Aeromonas</i> spp.	32
6.8 Pruebas bioquímicas tradicionales	33
6.9 Extracción de DNA	35
6.10 Amplificación del gen ARNr 16s por medio de PCR	35
6.11 Purificación y secuenciación	36
6.12 Detección de genes putativos de virulencia	37
6.13 Análisis de susceptibilidad a antibióticos	38
6.14 Formación de biopelículas	39
<b>7. Resultados</b>	41
7.1 Registro de parámetros fisicoquímicos y coordenadas geográficas	41
7.2 Análisis microbiológico	42
7.3 Aislamiento	43
7.4 Secuenciación del gen ARNr 16s	44
7.5 Genes de virulencia	45

7.6 Resistencia a antibióticos	48
7.7 Formación de biopelícula	51
<b>8. Discusión</b>	<b>54</b>
<b>9. Conclusiones</b>	<b>62</b>
<b>10. Bibliografía</b>	<b>63</b>

## Resumen

Las especies del género *Aeromonas* han emergido en los últimos años como un problema de salud pública ya que han sido asociadas con una amplia variedad de infecciones intestinales y extra-intestinales, debido a que poseen diversos factores de virulencia.

Los miembros de este género son bacilos Gram-negativos, no esporulados anaerobios facultativos, ubicuos en ambientes naturales como suelos, ríos, lagos y mares; sin embargo, se ha documentado su presencia en aguas potables, aguas residuales y en una variedad de alimentos frescos incluyendo vegetales como alfalfa, brócoli, coliflor, lechuga, cilantro, perejil y espinacas, entre otros.

En el presente estudio se evaluó la concentración de *Aeromonas* spp. en vegetales cultivados en la zona lacustre de Xochimilco, así como en el agua de riego y el suelo, comparándolos con la concentración presente de esta bacteria en vegetales a la venta en un mercado local. Asimismo se determinó la incidencia de genes putativos de virulencia para conocer el potencial patogénico de estas bacterias y el riesgo que presentan a la salud. De un total de 6 muestreos realizados de enero a mayo del 2016, en la zona lacustre de San Gregorio Atlapulco, Xochimilco, se obtuvieron 205 aislados, las muestras se inocularon en medio selectivo CromoCen (Biocen) y se incubaron a 37°C/24 h. Las colonias consideradas presuntas *Aeromonas* se identificaron con ayuda de pruebas bioquímicas y posterior secuenciación del gen ARNr 16s. A un total de 79 aislados confirmados como *Aeromonas* se les evaluó la presencia de 5 genes de virulencia (*gcat*, *aer/hem*, *lafA*, *ast* y *alt*) y la susceptibilidad a 12 antibióticos por el método de difusión en disco, también se evaluó su capacidad para formar biopelículas.

Se obtuvieron un total de 79 aislados de *Aeromonas*, dentro de las cuales se identificaron 11 especies, las más abundantes fueron *A. hydrophila* (25%), *A. caviae* (19%), *A. allosaccharophila* (19%), *A. salmonicida* (15%) y *A. media* (14%). El 52% se aisló de agua, mientras que el 39% correspondió a lechuga de mercado, en contraste con la lechuga de la parcela donde se obtuvo solo 5% y el suelo de la misma donde se obtuvo un 4%. La presencia de al menos 2 genes de virulencia en las cepas fue de 48%, sólo dos aislados presentaron los 5 genes de virulencia (*A. salmonicida*); mientras que el antibiótico al cual se presentó mayor resistencia fue amoxicilina con ácido clavulánico 54% (43/79) seguido de Imipenem 35% (28/79) y compuestos sulfonados 31% (25/79).

En cuanto a la formación de biopelícula *A. hydrophila* presentó el mayor número de cepas productoras de biofilm 21%, seguido de *A. caviae* 13%, *A. allosaccharophila* y *A. salmonicida* 13%.

De acuerdo a los resultados, podemos sugerir que la elevada presencia de *Aeromonas* en la lechuga de mercado se debe a diferentes factores relacionados con el manejo durante la cosecha, traslado y venta del producto. La ingesta de vegetales crudos así como de cualquier otro producto expedido en un mercado implica un riesgo a la salud si éste no recibe el manejo adecuado.

Palabras clave: Lechuga, *Aeromonas* spp., Xochimilco, factores de virulencia, biopelícula.

## Abstract

*Aeromonas* species have emerged in recent years as a public health problem since they have been associated with a variety of intestinal and extra-intestinal infections due to several virulence factors.

Members of this genus are Gram-negative, non-spore-forming, rod-shaped, facultative anaerobic bacteria and, ubiquitous in aquatic environments such as, rivers, lakes and seas; however, they also have been isolated from drinking water, sewage, soil and a variety of fresh vegetables such as alfalfa, broccoli, cauliflower, lettuce, cilantro, parsley, and spinach, among others. The aim of the present study was to evaluate the concentration of *Aeromonas* spp. in vegetables cultivated in the lacustrine zone of Xochimilco, in the irrigation water and in the soil, as well as to compare with the results obtained in a similar species of vegetables sold in a local market. Also, the incidence of putative virulence genes was determined, in order to know the pathogenic potential risk to human health. During the period of January to May 2016, six samples of water, soil and vegetables were collected in the lacustrine zone of San Gregorio Atlapulco, Xochimilco. Samples were serially diluted, inoculated in CromoCen (Biocen) selective agar, and incubated at 37°C/24h. Colonies of presumptive *Aeromonas* spp. were isolated and identified by biochemical tests, and subsequently sequenced by 16S rRNA gene. A total of 79 *Aeromonas* were identified and evaluated for the presence of five virulence genes (*gcat*, *are/hem*, *lafA*, *ast* and *alt*); also antibiotic sensitivity tests were carried out by the disc diffusion method, the ability to form biofilm to each isolate was also evaluated.

A total of 11 *Aeromonas* species were identified, the most abundant were *A. hydrophila* (25%), *A. caviae* (19%), *A. allosaccharophila* (19%), *A. salmonicida* (15%) and *A. media* (14%). 52% of the strains were isolated from water, 39% from the market lettuce, and 4% from the soil.

48% of *Aeromonas* spp. presented at least two virulence genes; only two strains of *A. salmonicida* presented five virulence genes. 54% of the *Aeromonas* were resistant to amoxicillin with clavulanic acid (43/79), followed by Imipenem 35% (28/79) and sulfonated compounds 32% (25/79).

As for the formation of biofilm, it was obtained that the species *A. hydrophila* presented the highest biofilm formation 21%, followed by *A. caviae* 13%, *A. allosaccharophila* and *A. salmonicida* 13%.

The results suggest that the high presence of *Aeromonas* spp. in the lettuce from the market is due to different factors related to the handling during the harvest, transport, and sale of the product. The consumption of raw vegetables cultivated in this area, as well as any other product sent to markets, implies a risk to human health if the product is not properly managed.

Keywords: Lettuce, *Aeromonas* spp, Xochimilco, virulence factors.

## 1. Introducción

Con el incremento en la demanda de vegetales frescos, orgánicos y listos para ser consumidos en la ciudad de México se han incrementado los problemas de salud de los consumidores debido a la proliferación de microorganismos en estos alimentos, dado el inadecuado seguimiento de los estándares higiénicos se han visto comprometidos al no reducir significativamente la carga microbiana generando como consecuencia problemas en el tracto gastrointestinal de los consumidores (Beuchat, 1996; Arce *et al.*, 2002). Las diarreas eventuales y o problemas de mala absorción, así como problemas extra intestinales, principalmente en pacientes inmunocomprometidos, son los principales síntomas generados como consecuencia de la carga microbiana en los vegetales (Kirov 1993; Pedroso *et al.*, 1997).

Existen estudios epidemiológicos que registran una diversidad de hortalizas identificadas como vehículo de agentes patógenos microbianos entre éstas se encuentran el espárrago, brotes de soja y alfalfa, brócoli, col, coliflor, lechuga, cilantro, perejil, zanahoria, espinaca, tomate y pepino, entre otros (Arce *et al.*, 2002).

En México las bacterias involucradas con mayor frecuencia en las infecciones diarreicas son: *Salmonella*, *Shigella*, algunos serotipos de *Escherichia coli* y *Campylobacter jejuni* (Giono, 1994).

Las especies pertenecientes al género *Aeromonas* han emergido como un problema de salud pública para la población humana ya que ocasionan infecciones intestinales y extra-intestinales (Janda, 2001). En las últimas tres décadas ha surgido un interés por el estudio de *Aeromonas* debido a que algunas de sus especies se han aislado en cultivos puros de muestras clínicas, encontrándose con mayor frecuencia en pacientes con infección gastrointestinal (Joseph y Carnahan, 2000). Los miembros del género *Aeromonas* se encuentran ubicados taxonómicamente en la familia *Aeromonadaceae*, son bacilos Gram-negativos, anaerobios facultativos, que fermentan y oxidan glucosa, y son oxidasa positiva (Morandi *et al.*, 2005).

Habitano ecosistemas acuáticos que incluyen aguas subterráneas, aguas potables y de tratamiento, sistemas de distribución de agua, plantas de reservas de agua, así como lagos y ríos contaminados. También se han encontrado en ambientes marinos con bajas concentraciones de sodio, en estuarios, en el suelo, sedimentos y en alimentos como carne, pescado, vegetales, leche natural y aves comestibles, desempeñando un papel importante como patógeno primario del tracto gastrointestinal (Alavandi y Ananthan, 2003).

Las enfermedades gastrointestinales son uno de los principales problemas de salud pública en México, se transmiten ya sea por vía fecal-oral o bien por el consumo de agua y alimentos contaminados. Afectan a personas de cualquier edad, aunque los grupos más vulnerables son los niños y ancianos; su prevalencia e incidencia se

encuentra relacionada con el nivel socioeconómico de la población (Hernández, 2011).

La prevalencia de las especies de *Aeromonas* en el ambiente, especialmente en el medio acuático, el incremento del espectro y el número de infecciones asociadas con este género en las últimas décadas han generado un interés creciente por establecer el riesgo que representa para la salud pública (Hernández *et al.*, 2011). El daño a la salud que puede presentarse va desde un cuadro diarreico autolimitado y pasajero hasta problemas extra intestinales de gran severidad, incluso letales (Fernández y Peña, 2012).

Al sur de la Ciudad de México se ubica uno de los humedales considerado sitio Ramsar, que son áreas que han sido reconocidas internacionalmente; éstas tienen la característica de ser tipos de humedales representativos, únicos de gran importancia para la conservación de la diversidad biológica (Ramsar, 2014). El Sistema de Ejidos de San Luis Tlaxialtemalco y San Gregorio Atlapulco pertenecen a la zona lacustre del lago de Xochimilco; un sistema agrícola que desde la época prehispánica y hasta la fecha abastece a la Ciudad de México de hortalizas, granos y flores. Además proveía de agua dulce a la ciudad desde hace más de un siglo (Zambrano *et al.*, 2009).

En la actualidad el Lago de Xochimilco y la zona chinampera son sitios perturbados, dando como consecuencia que sea un cuerpo de agua artificial al que se le aporta agua residual proveniente de tres plantas de tratamiento, que además, funcionan con varias irregularidades. Asimismo, debido al crecimiento de la mancha urbana, confluyen cientos de sitios de descarga de aguas negras clandestinas a los diferentes canales que son utilizados para el riego de productos vegetales. Paralelamente en el área turística se carece de una infraestructura sanitaria adecuada por lo cual esto genera un foco grave de contaminación por materia orgánica, dando como resultado la eutrofización del agua que no sólo afecta a la flora y fauna propia del lugar si no también genera un problema de salud pública. (Zaragoza *et al.*, 2016).

## 2. Antecedentes

La contaminación de productos vegetales ha sido un problema común desde principios de la década pasada debido al incremento de demanda de estos alimentos a nivel mundial, teniendo como consecuencia el incremento de la frecuencia de infecciones entéricas (Beuchat, 2002; Sivapalasingam *et al.*, 2004; Pivarnik *et al.*, 2005; Castro-Rosas *et al.*, 2012). Dentro de las principales fuentes de contaminación a considerar se encuentran el uso de estiércol como fertilizante, agua de riego contaminada o sin tratamiento (Islam *et al.*, 2004; Steele y Odumeru, 2004; Steele *et al.*, 2005; Aruscavage *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2012), falta de prácticas higiénicas de los trabajadores en el campo, la presencia de animales en el campo de cultivo, malas prácticas al momento de envasar y transportar al mercado (Franz *et al.*, 2010), así como los cambios en las prácticas agrícolas y de procesamiento de las verduras (Castro, 1990; Beuchat, 2002). Es probable que de entre las fuentes de contaminación mencionadas, la más importante en el campo sean la del agua de riego y la del empleo de estiércol como fertilizante (Matthews, 2006).

Los factores intrínsecos y extrínsecos que determinan la capacidad de los patógenos entéricos para unirse y proliferar en la filósfera de las plantas incluyen la motilidad del patógeno, la lixiviación de nutrientes por la planta y la interacción de los organismos epifitos (Aruscavage *et al.*, 2006). Además existen también factores ambientales que influyen en la supervivencia de los diferentes microorganismos (Oliveira *et al.*, 2012).

Algunos patógenos se pueden eliminar con ayuda de los procedimientos habituales de lavado, sin embargo, la porción significativa que aún queda presente, puede proliferar (Ginestrea *et al.*, 2005; Aruscavage *et al.*, 2006); las principales deficiencias de los desinfectantes es que no tienen acceso a ciertas partes de las estructuras vegetales (Beuchat, 2002; López *et al.*, 2003). Los patógenos sobrevivientes a los procesos de lavado pueden persistir, proliferar, internalizándose en el tejido vegetal o incorporarse en biopelículas (Ginestrea *et al.*, 2005; Aruscavage *et al.*, 2006).

Las infecciones agudas del tracto gastrointestinal figuran entre las enfermedades infecciosas más frecuentes, superadas sólo por infecciones del tracto respiratorio. A nivel mundial las infecciones gastrointestinales siguen siendo una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad entre los lactantes, niños y ancianos. Aunque muchas veces se trata de un ligero contratiempo en los adultos sanos, un desequilibrio electrolítico puede provocar una deshidratación importante. Se ha estimado que, en África, Asia y Latinoamérica, dependiendo de los factores socioeconómicos y nutricionales, la probabilidad de que un niño muera antes de los 5 años por estas causas son de un 50% (Álvarez *et al.*, 2008).

La enfermedad diarreica es definida como un trastorno digestivo manifestado por un incremento en el volumen, fluidez y frecuencia en las deposiciones fecales, el cual provoca una escasa absorción de agua y elementos nutrientes, esta enfermedad representa un problema de salud pública a nivel mundial (Merck,-1997; Romero, 2002).

Los cuadros gastrointestinales pueden presentarse en cualquier época del año, pero el riesgo de sufrir estas enfermedades incrementa en las temporadas de secas cálidas que corresponden a los meses de marzo-junio (Jáuregui, 1995; 2000) por lo que son la principal demanda de atención médica en los centros de salud.

En los últimos años se ha incrementado el conocimiento de agentes bacterianos emergentes causantes de diarrea, entre los que se encuentra el género *Aeromonas*, microorganismo descrito como habitante natural del medio acuático y del cuerpo de algunos animales como ranas, sapos y reptiles (Swartz, 1998; Monge, 2000).

La zona lacustre de Xochimilco representa una región de importancia en nuestro país desde tiempos prehispánicos por sus actividades agrícolas y aporte de agua para la Ciudad de México, sin embargo, ha sufrido un proceso de degradación tras la reducción del nivel de agua y la recarga proveniente de aguas tratadas (Mazarí-Hiriart *et al.*, 2000; Secretaria del Medio Ambiente, 2012) lo que ha aportado grandes cantidades de desechos orgánicos y otras sustancias tóxicas (Balanzario, 1982).

Los humedales de Xochimilco se encuentran localizados en los paralelos 19° 09' y 19° 19' de latitud norte; los meridianos 99° 00' y 99° 10' de longitud oeste, con una altitud entre los 2200 y 3100 m.s.n.m., colinda con las delegaciones Tlalpan, Coyoacán, Iztapalapa, Tláhuac y Milpa Alta (INEGI, 2012).

La zona Ejidos de Xochimilco y San Gregorio Atlapulco fue establecida como Zona Prioritaria de Preservación y Conservación del Equilibrio Ecológico y se declaró Área Natural Protegida (ANP) por decreto publicado el 7 de mayo de 1992 en el Diario Oficial de la Federación, bajo la categoría de Zona Sujeta a Conservación Ecológica. Con una superficie de 2657 ha, la mayor parte de ésta corresponde a la zona chinampera de producción agrícola de los pueblos de San Gregorio Atlapulco y San Luis Tlaxialtemalco.

En esta zona de humedales se ha perdido el control hidrológico, debido al manejo inadecuado del acuífero. El aporte actual de aguas residuales tratadas ocasionó la pérdida de la calidad del agua y la degradación física y química del suelo. En general los canales de Xochimilco y Tláhuac presentan eutroficación con alto contenido de sales. En cuanto a la contaminación biológica se han obtenido registros altos de coliformes fecales que rebasan los niveles permisibles por lo que actualmente sólo un 15% de la superficie tiene uso agrícola (Secretaría del Medio Ambiente, 2012).

Actualmente uno de los usos más extendidos del agua proveniente de los canales, es el riego agrícola pese a los diversos riesgos que esto conlleva, tales como la

contaminación de hortalizas por microorganismos patógenos, presencia de metales pesados, eutroficación de las aguas, muerte de la fauna acuática y salinización de las tierras (Díaz *et al.*, 2004).

Los datos del censo agropecuario de 2007 indican que el tipo de cultivos predominantes producidos en Xochimilco son las flores, hortalizas y frutales. Los principales destinos de la producción agrícola de la zona son los mercados locales de plantas y flores de Nativitas Madreselva, San Luis Tlaxialtemalco y Cuemanco, donde se comercializa alrededor del 58% de la producción local, otro 32% se distribuye en el centro de Xochimilco y un 10% es vendido en la Central de Abastos de la Ciudad de México. El agua juega un papel importante en la producción agropecuaria de la zona, ya que al no recibir un buen tratamiento de saneamiento, la producción agrícola queda expuesta a contaminación por diferentes microorganismos o agentes patógenos, generando un problema importante de salud pública resultante en enfermedades gastrointestinales e infecciones en la piel. Es importante resaltar que el uso agrícola de aguas residuales tratadas mezcladas con aguas negras debe ser visto con criterios sanitarios. Sin duda la tecnología exclusiva de la chinampa fue exitosa pero quizá hoy esté amenazada porque la cantidad y calidad del agua ponen en riesgo la esencia de la chinampa como sistema productivo (López *et al.*, 2015).

Las áreas de cultivo bajo riego en la zona representan el 8.98% con respecto al área total cultivable existente en la Ciudad de México. Los agricultores asentados en las chinampas y zonas aledañas a los canales utilizan el agua de los canales para regar sus cultivos, principalmente hortalizas y flores. El método de riego es muy rudimentario, ya que los productores sólo introducen una manguera y con ayuda de una bomba extraen el agua para llevarla a sus parcelas (Secretaría de Obras y Servicios Públicos, 2001).

## **2.1 Generalidades de *Aeromonas***

Desde el primer aislamiento hasta 1943, año en el que se definió el género, las cepas de *Aeromonas* han sido incluidas en diversos grupos como *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* o *Vibrio*, entre otros (Stainer, 1943).

El género *Aeromonas* estuvo incluido mucho tiempo en la familia *Vibrionaceae* desde 1965 junto a los géneros *Vibrio* y *Plesiomonas*. Sin embargo, en 1984 Baumann y Schubert, a partir de un estudio de reasociación del ARNr-ADN entre miembros de la familia *Vibrionaceae*, observaron que el género *Aeromonas* presentaba diferencias suficientes como para constituir una familia independiente. Años más tarde estos resultados fueron confirmados por Colwell y colaboradores (1986), con base en el análisis de secuencias de los genes del ARNr 5S y 16S, que demostraban que el género *Aeromonas* tenía una divergencia evolutiva equidistante con la Familia *Vibrionaceae* y *Enterobacteriaceae* justificando así la creación de la familia *Aeromonadaceae*. Las secuencias del gen ARNr 16s de todas las especies

de *Aeromonas* definidas hasta 1992 por Martínez y colaboradores corroboraron la posición del género y la propuesta de Colwell.

En la actualidad el género *Aeromonas* de acuerdo con la edición más reciente del manual Bergey's (2005) pertenece a la clase de las *Gammaproteobacterias*, orden *Aeromonadales*, Familia *Aeromonadaceae*, que en la actualidad incluye tres generos: *Aeromonas*, *Oceanimonas* y *Tulomonas*. Se caracterizan por ser bacilos Gram-negativos, no esporulados presentan flagelo polar lo que les permite ser móviles, aunque existen especies no móviles como *Aeromonas salmonicida*. Son aerobios facultativos, oxidasa y catalasa generalmente positivos, capaces de degradar nitratos a nitritos, fermentadores de la glucosa y mayoritariamente resistentes al factor vibriostático O/129 (2,4-Diamino-6,7-diisopropilpteridina fosfato). Son Bacilos cortos 0.3-1.0 x 1.0-3.5  $\mu\text{m}$ .

Los miembros de este género producen varias exoenzimas como: Proteasas, DNasas, RNasas, elastasas, lecitinasas, amilasas, gelatinasas y lipasas, entre otras, considerados factores de virulencia. Cuentan con 30 especies publicadas (Altwegg M., 1999; Bergey 2005).

Se pueden dividir en dos grupos con base en la temperatura óptima de crecimiento y la capacidad de movilidad de las especies:

- El primer grupo es amplio y heterogéneo genéticamente y está formado por especies mesófilas y móviles que crecen óptimamente a 28°C.
- El segundo grupo es más reducido y homogéneo genéticamente, se designa como el grupo psicrófilo cuya temperatura óptima de crecimiento se define entre 22-25°C (Notederdaeme *et al.*, 1996; Pavan *et al.*, 2000).

Las diferentes especies de *Aeromonas* pueden crecer en los medios diferenciales y selectivos empleados para el aislamiento de las bacterias Gram-negativas. Para el caso de muestras provenientes de alimentos es recomendado utilizar un caldo de pre-enriquecimiento, siendo el agua peptonada alcalina de pH 8.7 la mejor elección (Gobat y Jemmi, 1995).

A pesar de ser considerados microorganismos autóctonos del medio acuático, también han sido aislados con frecuencia en alimentos y vegetales destinados al consumo humano, peces sanos y enfermos, huevos de mosquitos y en diversos procesos infecciosos en humanos (Figueras, 2005; Martin-Carnahan y Joseph, 2005; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2012; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2015).

La mayoría de los sistemas de tratamiento de agua potable son capaces de reducir las concentraciones de *Aeromonas* por debajo de 1UFC/100mL, no obstante, cuando los niveles de materia orgánica aumentan, se inactivan los niveles de cloro y estas bacterias pueden crecer e incluso colonizar los sistemas de abastecimiento formando biopelículas en el agua tratada, pueden llegar a alcanzar concentraciones de 103 UFC/100 mL (Pettibone, 1998; Massa, *et al.*, 1999). El aislamiento del género *Aeromonas* de muestras de agua depende de diversos factores, algunos de

ellos son: la estación del año, la concentración de materia orgánica, el oxígeno disponible, los niveles de cloro y la salinidad (McClure *et al.*, 1994).

Algunas de las especies son consideradas como patógeno emergente, capaces de afectar tanto a individuos inmunocompetentes como inmunodeprimidos (Castro-Escarpulli *et al.*, 2002; Figueras, 2005; Janda y Abbott, 2010; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2012).

## 2.2 Identificación basada en el gen ARNr 16s

Las secuencias del gen ARNr 16s han sido consideradas como marcadores moleculares estables y específicos para la identificación de especies bacterianas ya que es un gen con distribución universal, por lo que permite la comparación de todos los microorganismos, además presenta un mosaico de regiones variables útiles en la diferenciación de organismos estrechamente relacionados, presenta regiones conservadas que son útiles para la comparación de organismos lejanos que han permitido el diseño de iniciadores universales y por su tamaño (1550 pb) permite la secuenciación casi completa del gen (Woese, 1987; Martínez *et al.*, 1992; Marchandin *et al.*, 2003).

Una ventaja importante de este gen, es la disponibilidad de numerosas secuencias de especies bacterianas incluidas en bases de datos como el GenBank, esto permite la comparación de similitudes y análisis filogenéticos; sin embargo, debe tenerse en cuenta la calidad de la base de datos para evitar generar interpretaciones erróneas (Figueras *et al.*, 2011b).

Las secuencias del gen ARNr 16s de todas las especies del género *Aeromonas* aceptadas hasta 1999 fueron realizadas por Martínez-Murcia y colaboradores (1992), estableciendo la filogenia del género con base en este gen.

Además de la secuenciación, se han descrito otras técnicas moleculares basadas en este gen para la identificación de especies de *Aeromonas* como:

- Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP). Basado en el análisis de los patrones de restricción de 1503 pb del gen ARNr 16s, obtenido tras la digestión con endonucleasas (Borrel *et al.*, 1997; Figueras *et al.*, 2000).
- La Desorción/Ionización Laser Asistida por Matriz (MALDI-TOF). Es una técnica basada en la determinación de pesos moleculares de biomoléculas principalmente proteínas que se encuentran asociadas al gen ARNr 16s y se obtiene a partir de células enteras o extractos de las mismas. Los perfiles de proteínas son específicos de cada bacteria por lo que asemejan una huella digital para cada género y especie bacteriana (Donohue *et al.*, 2006; 2007)
- Análisis filogenéticos con ayuda de proteínas ribosomales (ribosomal MLST, rMLST). En estos estudios se utilizan genes que codifican para proteínas

ribosomales que son las que ensamblan para formar los ribosomas y que por tanto están presentes en todas las bacterias (Colston *et al.*, 2014).

### **2.3 *Aeromonas* como patógeno emergente**

En la década de los 80 tuvo lugar una explosión de interés científico hacia los miembros del género *Aeromonas* como patógenos para el hombre y animales debido principalmente a la asociación de estas bacterias con procesos gastroentéricos humanos (Arias, 1995).

Se considera que la primera descripción de una cepa del género *Aeromonas* fue la realizada por Sanarelli en 1891, durante un estudio de inmunidad en ranas en el que muchas de éstas desarrollaron una septicemia que se atribuyó a *Bacillus hydrophilus fuscus*. Durante aquella época se aislaron *Aeromonas* de agua, peces enfermos y leche. La primera asociación de *A. salmonicida* con la forunculosis fue en 1894 por Emmerich y Weibel (Farmer *et al.*, 2006).

En la Actualidad el género *Aeromonas* es considerado un patógeno emergente oportunista, se ha aislado como agente etiológico en diversos procesos infecciosos como gastroenteritis, septicemia e infecciones de heridas, así como en otras infecciones que afectan al sistema hepatobiliar y tracto respiratorio, afectando con mayor frecuencia a niños, ancianos e individuos inmunocomprometidos. Se han descrito diferentes casos de bacteriemia e infecciones extra-intestinales como meningitis, neumonía, queratitis y osteomielitis causadas por *Aeromonas* en pacientes sanos e inmunocomprometidos (Figueras, 2005; Dwivedi *et al.*, 2008; Gunasekaran *et al.*, 2009; Janda y Abbott, 2010; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015).

Estudios revelan que *Aeromonas* fue el microorganismo con mayor frecuencia de aislamiento después de desastres naturales como el tsunami en Tailandia del año 2001 el cual correspondió al 22.6% de todos los aislados y con el huracán Katrina en el sureste Estados Unidos en 2005, se asoció principalmente a infecciones de heridas. Hay evidencias de que tanto el aumento como la disminución del volumen de lluvia, preceden los brotes de *Aeromonas* asociado al consumo de agua contaminada (Hiransuthikul *et al.*, 2005; Presley *et al.*, 2006; Figueras y Borrego, 2010).

### **2.4 Epidemiología del género *Aeromonas***

Debido a factores como el aumento de la población, alteración de los patrones pluviométricos y contaminación de las fuentes naturales de agua, éste recurso es más escaso, por lo que se somete a tratamientos físicos, químicos y biológicos en plantas de tratamiento para lograr la mayor depuración posible. Sin embargo, en algunos casos la descarga de aguas residuales que se realiza a los cuerpos de agua va sin tratamiento previo, con lo que se incrementan los nutrientes y materia orgánica en estos cuerpos, afectando el estado trófico o saprobio del sitio. Esto

repercute, entre otras cosas, en la densidad de las bacterias autóctonas, ya que se puede incrementar la población de bacterias con potencial patogénico como es el caso del género *Aeromonas* (Shotts *et al.*, 1972; Bemgozzi *et al.*, 1995; Health Canada, 2006; Navgvenkar y Ramaiah, 2009).

Por otro lado dependiendo de la calidad microbiológica del agua tratada se le puede dar diferentes usos, por ejemplo, para el riego de alimentos como frutas y verduras (Boussaid *et al.*, 1991; Hassani *et al.*, 1992), sin embargo puede tener implicaciones para la salud pública. Existe evidencia de que *Aeromonas* es capaz de proliferar en los sistemas de distribución de agua utilizada para el riego (Pianetti *et al.*, 2004; Al-Jassim *et al.*, 2015).

Las frutas y vegetales que han sido estudiados para detectar la presencia de *Aeromonas* son alfalfa, zanahoria, tomate, lechuga, pepino, papa, cebolla y apio; estos alimentos junto con el agua contaminada son las principales fuentes de infección diarreica generada por *Aeromonas* (Neyts *et al.*, 2000a; Bashir Awan *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2008; Nagar *et al.*, 2011).

Después de la gastroenteritis, la infección de heridas es el cuadro clínico más frecuente provocado por *Aeromonas*, se le suele asociar a eventos traumáticos y quemaduras relacionadas con agua y suelo contaminado con este microorganismo. Las infecciones en algunos casos pueden evolucionar de forma severa a Fascitis necrotizante y gangrena, especialmente en pacientes inmunocomprometidos (Figueras, 2005; Janda y Abbott, 2010; Behera *et al.*, 2011; Igbinosa *et al.*, 2012).

## **2.5 Antecedentes en México**

En México, un estudio gubernamental realizado en 2003 reportó 4 556 decesos causados por infecciones intestinales, por lo general asociadas a microorganismos presentes en el agua, alimentos procesados y crudos (Paniagua *et al.*, 2007). Los patógenos como *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Vibrio*, *Campylobacter* y *Yersinia*, son los más frecuentemente aislados de los cuadros gastrointestinales, por lo que son considerados en el Boletín Epidemiológico Mexicano como los más importantes. Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado el conocimiento de agentes bacterianos emergentes causantes de diarrea como es el caso de *Aeromonas* (Castro *et al.*, 2003). Por ser éste un microorganismo ambiental autóctono de agua se ha sugerido que alimentos como los mariscos y vegetales crudos son un importante vehículo de transmisión (Merino, 1995).

En México los estudios para determinar la incidencia de *Aeromonas* son escasos, destacan los realizados por Rebollo y Escamilla (1984), quienes aislaron esta bacteria con una frecuencia del 17.7% en casos de diarrea aguda en niños menores de 2 años y 7% en adultos.

Algunos otros autores han realizado estudios para el aislamiento e identificación de *Aeromonas* a partir de muestras clínicas, agua, y alimentos; otros se enfocan en la descripción de factores de virulencia y más recientemente, en la caracterización de las cepas desde un punto de vista genético; sin embargo, estos trabajos no han sido publicados, lo que limita su difusión, disminuyendo el impacto o importancia que estos estudios pudieran tener en nuestro país (Castro-Escarpulli, 2002).

## 2.6 Factores de virulencia en *Aeromonas*

La variedad de manifestaciones clínicas observadas en las infecciones provocadas por *Aeromonas* concuerda con la idea de que estas infecciones son causadas por procesos multifactoriales, debido a la existencia de una compleja red de mecanismos de patogenicidad (Yu *et al.*, 2005).

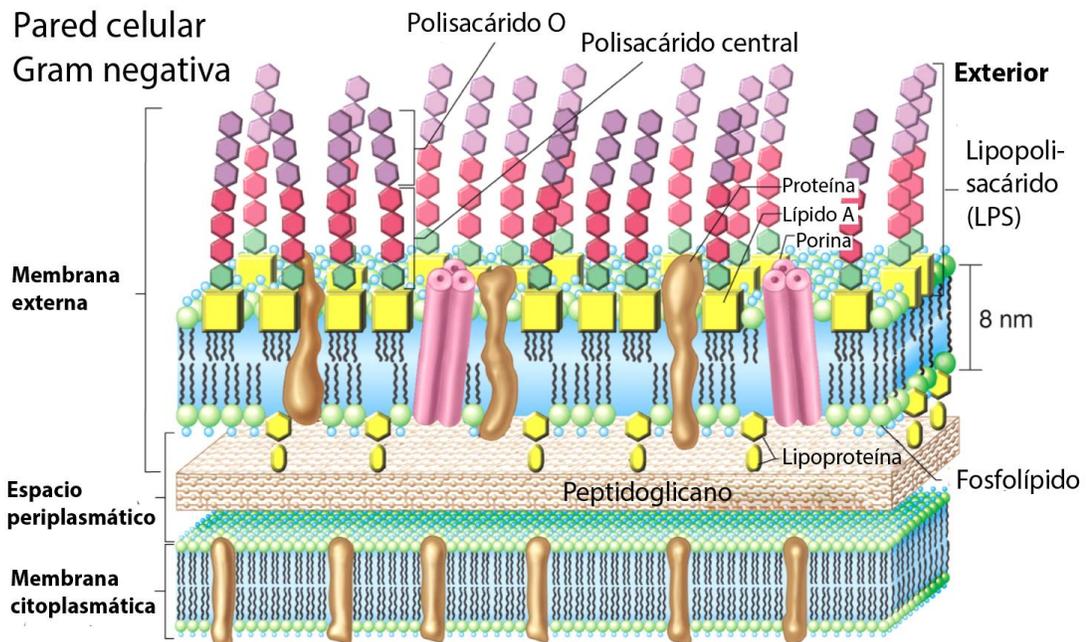
Se ha descrito que las *Aeromonas* poseen factores de virulencia como aerolisinas, enterotoxinas citolíticas y citotónicas, hemolisinas, lipasas, proteasas y/o capacidad invasiva. Aunque no es clara la repercusión relativa de estas propiedades en la patogenicidad, ya que no todas las cepas que las poseen son virulentas, parece ser necesaria la combinación de estas propiedades bacterianas con factores predisponentes en el hospedero para que se desencadene una infección (Kirov, 1993).

Algunos de los factores asociados a la virulencia que se han identificado y caracterizado son los siguientes:

- Cápsula. Es una estructura polisacárida que recubre la membrana externa de la bacteria, se ha descrito como un factor de virulencia importante en diversos patógenos ya que contribuye a la resistencia, favorece la adherencia a otras bacterias o tejidos del hospedero y actúa como barrera frente a moléculas hidrofóbicas tóxicas. En *A. salmonicida* y *A. veronii* se ha documentado la capacidad de formar cápsula tanto *in vitro* (en un medio rico en glucosa TSA) como *in vivo* (Merino *et al.*, 1994). Algunos estudios han demostrado la presencia de cápsula en algunos serogrupos de *A. hydrophila*, aunque se cuenta con poca información sobre su composición y su posible relación con la patogenicidad (Martínez y Simon-Pujol, 1995).
- Capa o Lamina S. Esta estructura de naturaleza proteica, está involucrada en el punto de unión de la bacteria con los componentes celulares de la célula hospedera y confiere resistencia a las propiedades bactericidas del complemento, por lo que es considerada un importante factor de virulencia (Dooley *et al.*, 1988; Kokka *et al.*, 1992). La presencia de lámina S en las especies mesófilas de *Aeromonas* pertenecientes al serogrupo O11 incrementa la capacidad de adhesión de este microorganismo, contribuyendo a la colonización de la mucosa intestinal, pudiendo ser la causa del frecuente

aislamiento de este serotipo en pacientes con gastroenteritis (Merino *et al.*, 1995).

- Lipopolisacárido (LPS). También conocido como endotoxina, es un complejo glucolipídico que constituye el componente mayoritario de la capa externa de la membrana de las bacterias Gram-negativas. Se diferencia en tres regiones: el lípido A, el núcleo de LPS, a su vez subdividido en núcleo interno y núcleo externo y la última región corresponde al antígeno O ó polisacárido O. Las propiedades endotóxicas del LPS son debidas al lípido A ya que al liberarse a causa de su lisis celular es capaz de provocar una importante inflamación sistémica conocida como *shock séptico* o endotóxico (Reeves *et al.*, 1996). Actualmente se reconocen al menos 97 serogrupos distintos con base en los antígenos presentes en la región O del LPS (Thomas *et al.*, 1990). Se ha demostrado que los serotipos O34, O11, O18 y O16 prevalecen en diversas áreas y se relacionan particularmente con septicemias, infecciones sistémicas y en algunos casos de gastroenteritis (Dooley *et al.*, 1985; Janda y Abbott, 1998).



**Figura 1. Estructura y disposición del LPS en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Tomado de Madigan *et al.*, 2000.**

- Pili/Fimbria. Son estructuras filamentosas formadas a partir de subunidades proteicas denominadas pilinas que se encuentran en la superficie bacteriana. Se han descrito diferentes tipos de pili tanto en aislados clínicos como en aislados ambientales atendiendo a su morfología y a los antígenos que presentan (Kirov *et al.*, 1995). Aunque los pili se describen a menudo como organelos adhesivos, se han implicado en otras funciones, tales como la

unión a fagos, transferencia de DNA, formación de biopelículas, agregación e invasión de células (Proft y Baker, 2009). Se han encontrado dos tipos distintos de fimbrias basándose en su morfología: fimbrias cortas y rígidas (S/R) son capaces de causar autoagregación, pero no hemaglutinación o unión a las células intestinales, se pueden encontrar en números altos en la célula bacteriana y fimbrias largas y onduladas (L / W) siendo grandes, finas (4-7 nm), flexibles y consideradas hemaglutininas, que corresponden al pili tipo IV conocido como estructuras importantes para la adhesión a las células epiteliales y que participan en la formación de biopelículas y movimientos de motilidad (Pepe, 1996).

Se han descrito tres tipos de pili: Tipo I, descritos en *A. hydrophila*, este presenta una composición en aminoácidos similar al tipo I de *E. coli*; tipo IV, descritos en *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii*, estos pueden formar bucles (Bfp) y expresarse conjuntamente con pilis tipo I, se encuentran implicadas en la formación de biopelículas; el tercer tipo se denomina mini-pili, se encuentra constituido por una pilina que guarda gran semejanza con la pilina de *V. cholerae*. La adherencia está mediada por estos pilis y favorece el proceso de colonización de las bacterias (Ho Asy, *et al.*, 1992; Pepe, 1996).

- Flagelo. El flagelo bacteriano es un apéndice largo (15-20  $\mu\text{m}$  de longitud) y delgado (aproximadamente 20 nm de diámetro), de naturaleza proteica, con capacidad de rotación y que permite la propulsión de la célula. El flagelo polar es responsable de la movilidad por natación (*swimming*) en ambientes líquidos, mientras que los flagelos laterales son responsables de la movilidad colonial observada en crecimiento en medios sólidos o semisólidos conocida como *swarming* (OToole y Kolter, 1998). En consecuencia, la presencia de flagelo así como su movilidad, participan en las fases iniciales del proceso de infección entre las que cabe destacar la adhesión a células eucariotas, la colonización del hospedero y la formación de biopelículas (Merino *et al.*, 2006).  
Las *Aeromonas* mesófilas expresan un único flagelo polar de manera constitutiva y en un 50-60% de las cepas asociadas a procesos diarreicos, el crecimiento en superficies induce la expresión de flagelos laterales (Kirov *et al.*, 2002).
- Proteínas de membrana (OMP). Se ha identificado una OPM de 34kDa en *A. caviae* que está implicada en la adherencia *in vitro* a células intestinales. También producen una gran cantidad de enzimas extracelulares que degradan activamente complejos proteicos, polisacáridos, mucopolisacáridos y moléculas que contienen lípidos (Jeanteur, 1992; Pemberton *et al.*, 1992).
- Enterotoxinas citotóxicas. También conocidas como enterotoxinas citolíticas,  $\beta$ -hemolisinas o aerolisinas. Denominadas originalmente aerolisinas, son parcialmente similares a la toxina  $\alpha$  de *Staphylococcus aureus* y la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (Howar *et al.*, 1987). La aerolisina se

caracteriza por la formación de poros en la membrana de las células hospederas (efecto citolítico) y por producir acumulación de fluidos en diversos modelos animales, por lo cual se le asocia con la producción de cuadros de gastroenteritis (Buckley 1992). Dañan seriamente al epitelio intestinal y pueden llegar a producir hemólisis, citotoxicidad y enterotoxicidad (Chopra *et al.*, 1993).

- Enterotoxinas citotónicas. Este tipo de toxinas se distinguen *in vitro* de las aerolisinas y  $\beta$ -hemolisinas por su capacidad de producir elongación de las células sin llegar a producir lisis, es decir, no degeneran al epitelio. Se han descrito dos tipos de actividad citotónica, una asociada al incremento del adenosil monofosfato cíclico (AMPC) y prostaglandinas en células del epitelio intestinal, pero no es parecida estructuralmente a la toxina colérica denominada termolábil y el segundo tipo que tiene un mayor grado de homología con la toxina colérica, también llamada termoestable. Estas toxinas se asocian con la producción de diarrea acuosa (Chopra *et al.*, 1999; Chopra *et al.*, 2000).
- Proteasas. En general las proteasas pueden contribuir a la patogenicidad causando lesiones directas al tejido mediante la activación proteolítica de toxinas potenciando la invasión (Kirov, 1997). Son capaces de degradar diferentes compuestos como albúmina, fibrina, gelatina y elastina. Una misma bacteria puede producir diferentes proteasas. Los dos principales tipos de proteasas son las metaloproteasas y las serina proteasas, éstas pueden jugar un papel importante en el mantenimiento de las infecciones en heridas de humanos y en las lesiones de piel de peces (Rodríguez *et al.*, 1992; Cascón *et al.*, 2000). En *Aeromonas* spp. se han identificado tres tipos de proteasas una serina proteasa termolábil y dos metaloproteasas termoestables. Además, también existen aminopeptidasas que pueden presentar diversas actividades específicas como el catabolismo de péptidos exógenos y la activación extracelular de aerolisinas (Pemberton *et al.*, 1997).
- Lipasas/Fosfolipasas. Actúan como hidrolasas sobre los lípidos de membrana. En el serogrupo O 34 de *Aeromonas* spp. se han descrito las fosfolipasas A1 y C. La lecitinasa-fosfolipasa C (Plc) se han asociado con patogenicidad. Las *Aeromonas* también producen glicerofosfolípido colesterol aciltransferasa (GCAT) que funciona como lipasa y puede provocar la lisis en eritrocitos mediante la digestión de sus membranas plasmáticas (Merino *et al.*, 1990; Pemberton *et al.*, 1997; Vipond *et al.*, 1998; Merino *et al.* 1999).

## 2.7 Sensibilidad a antibióticos

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud) los antibióticos son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos o sintetizados por métodos de laboratorio utilizados para el tratamiento de las infecciones causadas

por bacterias, hongos y parásitos. Su descubrimiento fue, desde el punto de vista de la salud, uno de los avances más importantes en la historia de la humanidad. Estos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano. La resistencia de las bacterias a los antibióticos se define como la capacidad de las mismas para resistir la acción de estos fármacos. La resistencia a los antibióticos entre los patógenos entéricos es un problema grave en los países que se encuentran en desarrollo y donde hay una alta frecuencia de enfermedades gastrointestinales, muchos antibióticos caen rutinariamente en un uso inadecuado.

La resistencia a los antibióticos es particularmente relevante en especies de *Aeromonas* patógenas en las que, además de la resistencia clásica a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, se ha identificado con frecuencia resistencia múltiple (Kampfer, *et al.*, 1999; Guñi *et al.*, 2000; Vila *et al.*, 2002; Vila *et al.*, 2003). Estas bacterias pueden recibir y transferir genes de resistencia a los antibióticos a otras bacterias Gram-negativas (Marchandin *et al.*, 2003).

Debido al uso excesivo de antibióticos de amplio espectro en entornos clínicos, agricultura y criaderos de peces, se ha presentado un aumento en la resistencia a los antibióticos entre las especies de *Aeromonas* patógenas (Ko *et al.*, 1996). Se ha observado que los miembros del género *Aeromonas* han mostrado resistencia a los antibióticos de uso común como la ampicilina, así como a un gran número de antibióticos como carbenicilina, ampicilina y cefalosporinas de primera generación (Cabrera *et al.*, 2007). Por el contrario, son susceptibles a tetraciclina, trimetoprima-sulfametoxazol, cloranfenicol, aminoglucósidos, cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima, ceftriaxona) y quinolonas (Wen *et al.*, 1998; Guñi *et al.*, 2000). La susceptibilidad antibiótica de los aislados clínicos ha sido estudiada con mayor frecuencia, sin embargo hay poco conocimiento sobre las cepas aisladas en el ambiente.

## 2.8 Formación de Biopelículas

Las bacterias encontradas en ambientes clínicos, ambientales e industriales a menudo se encuentran como biopelículas asociadas a la superficie (Costerton *et al.*, 1995). Una biopelícula es una estructura compleja conformada por comunidades bacterianas que crecen embebidas en una matriz de exopolisacáridos, dentro de la cual existen canales para la circulación de nutrientes y agua, además permiten la comunicación celular (Costerton *et al.*, 1999; Watnick y Kolter, 2000; Monds, 2009).

La formación de un biofilm es un proceso que involucra la transición a través de distintas etapas de organización multicelular como son:

- Fase planctónica. Las células se encuentran dispersas en el medio.
- Fase de adhesión. Se divide en una etapa reversible e irreversible. En esta etapa se produce la activación de mecanismos específicos que permiten la transición celular a una asociación con la superficie.

- Fase de formación de microcolonias. En esta etapa se da la formación de agrupaciones celulares discretas por crecimiento clonal de las células adheridas o por translocación activa a través de la superficie.
- Fase de formación de macrocolonias. Éstas son el resultado del crecimiento de las microcolonias, están contenidas en una matriz de exopolisacáridos que también contienen restos de células muertas y ADN extracelular.
- Fase de dispersión. Este proceso ocurre cuando las macrocolonias se dispersan, retornando a la fase planctónica (Coogan y Keener 2004).

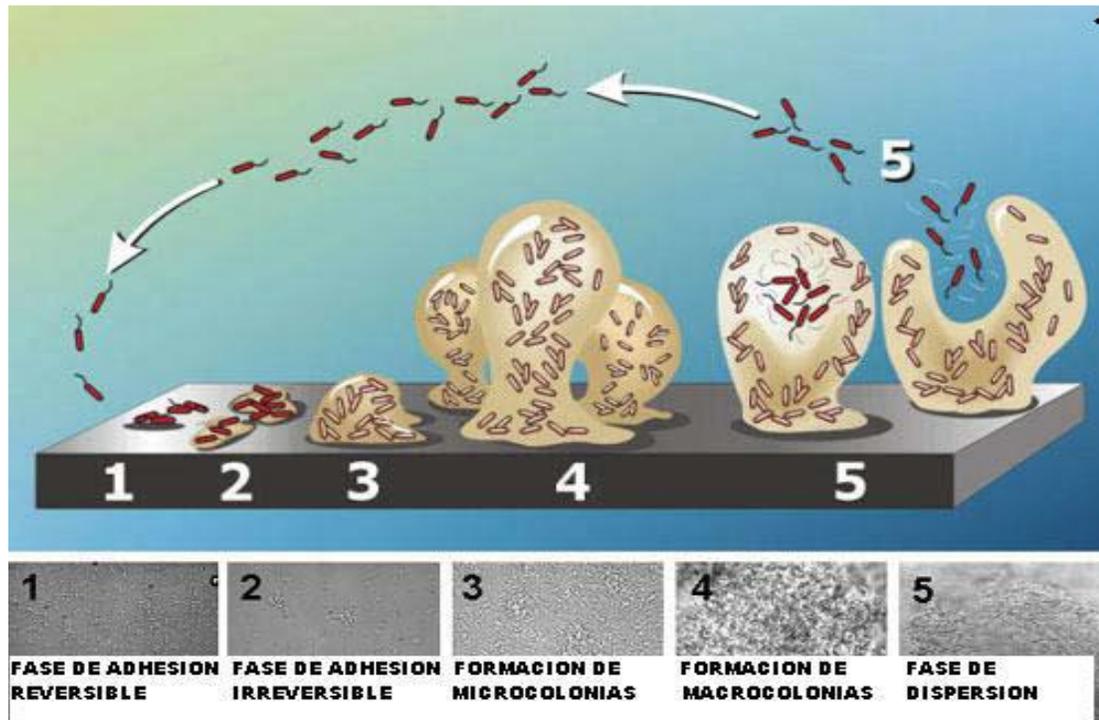


Figura 2. Esquema de las fases de desarrollo de una biopelícula (tomado de Coogan y Keener, 2004)

Dado el potencial para la comunicación interbacterial a través de los procesos de la formación de la biopelícula, se predijo un papel para la comunicación célula-célula o "quorum sensing" en la regulación de la fijación superficial y la maduración de la biopelícula (Williams y Stewart, 1994). El quorum sensing (QS) es un mecanismo que regula la expresión de los genes en función de la densidad celular. Consiste en una molécula señal llamada *autoinductor* que puede difundir hacia afuera o adentro de la célula, como en el caso de bacterias Gram-negativas, o ser sintetizada como péptidos precursores, modificada y exportada a la célula a través de una maquinaria de transporte de proteínas. Los sistemas de QS difieren entre los distintos géneros bacterianos y una misma bacteria puede poseer más de un tipo de sistema (Manefield y Turner, 2000; Taga y Bassler, 2003).

La fisiología de las bacterias de la biopelícula, comparada con la de las bacterias planctónicas, demuestra una amplia y mayor resistencia a agentes antibacterianos, por ejemplo, antibióticos, especies reactivas de oxígeno y detergentes que se usan en la medicina y la industria, por lo que la resistencia es la característica principal de una biopelícula (Costerton *et al.*, 1995; Hpiiby *et al.*, 2010). En consecuencia, las bacterias presentes en una biopelícula plantean un problema significativo y persistente, ya que los antibióticos convencionales o los regímenes de limpieza y desinfección no son eficaces sobre éstas.

La adhesión a las células hospederas es un paso crucial para la colonización e infección de patógenos. Las *Aeromonas* poseen una variedad de adhesinas en la superficie celular, filamentosas y no filamentosas, que contribuyen a este proceso. La capacidad de adherencia de las *Aeromonas* también puede variar debido a una serie de factores tales como la temperatura, los medios de crecimiento y la fase de crecimiento (Ho *et al.*, 1990; Kirov *et al.*, 1995a; Kirov *et al.*, 1995b). Por lo tanto, esto sugiere que la adherencia de *Aeromonas* spp. es un proceso complejo y multifactorial.

### **3. Justificación**

Las especies del género *Aeromonas* son bacterias Gram-negativas de vida libre, consideradas patógenos oportunistas, son transmitidas directamente por el agua a través del riego de vegetales que se consumen crudos así como en otros alimentos, también son patógenos extraintestinales y se transmiten por medio del contacto con agua contaminada a personas con heridas abiertas. Debido a que la zona lacustre de Xochimilco es receptora de la descarga de aguas residuales tratadas, se presenta un incremento en la materia orgánica que favorece el desarrollo de microorganismos, por lo que es importante evaluar la presencia de *Aeromonas* spp. y sus factores putativos de virulencia, que pudieran poner en riesgo a las personas que consumen vegetales crudos cultivados en la zona y regados con el agua contaminada de los canales.

#### 4. Hipótesis

Si la zona lacustre del lago de Xochimilco se considera un humedal urbano altamente contaminado por la descarga de aguas negras con tratamiento secundario y no tratadas, con un alto grado de recepción de materia orgánica que favorece el desarrollo de diversos microorganismos, entonces se incrementa la probabilidad de aislar *Aeromonas* spp. del agua de los canales usada para el riego, así como del suelo de las chinampas y de los vegetales que se cultivan en las mismas.

#### 5. Objetivos

##### 5.1 Objetivo General

Evaluar la concentración de *Aeromonas* spp. en lechugas cultivadas en las chinampas de Xochimilco, en el agua de riego y el suelo, comparándolos con la concentración de bacterias presentes en lechugas que se expenden en un mercado local, así como determinar la incidencia de genes putativos de virulencia y la sensibilidad a diferentes antibióticos en los aislados, para conocer el potencial patogénico de estas bacterias.

##### 5.2 Objetivos específicos

- Cuantificar y aislar *Aeromonas* spp. de lechugas que se consumen crudas y que son regados con el agua de la zona lacustre de Xochimilco.
- Identificar mediante pruebas bioquímicas tradicionales y la secuenciación del gen ARNr 16s, los aislados de *Aeromonas* spp.
- Detectar en las *Aeromonas* identificadas la presencia de cinco genes putativos de virulencia mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR): *gcat* (lipasas), *aer/hem* (toxinas aerolisina/hemolisina), *lafA* (flagelo), *ast*, *alt* (enterotoxinas).
- Evaluar la susceptibilidad a diferentes antibióticos en *Aeromonas* spp.
- Evaluar la formación de biopelículas en *Aeromonas* spp.

## 6. Materiales y Métodos

### I. Trabajo de campo

#### 6.1 Área de estudio

El estudio se realizó en un canal y una parcela de cultivo ubicado en San Gregorio Atlapulco, Xochimilco, CDMX (Figura 3).

El área se encuentra cercana a la avenida principal, por lo que se ubican viviendas cercanas a la zona de estudio, lo cual se considera un punto de perturbación ambiental. Se tomaron muestras de agua del canal aledaño a la parcela y muestras compuestas tanto de lechuga como de suelo en diferentes puntos del área de cultivo.



**Figura 3. Área de estudio. San Gregorio Atlapulco, Xochimilco CDMX. El punto rojo indica la zona de muestreo.**

#### 6.2 Registro de parámetros fisicoquímicos

Las coordenadas geográficas en UTM del sitio a muestrear se determinaron con ayuda de un GPS (GARMIN 12XL, Taiwán).

Se registraron los siguientes parámetros físico-químicos con ayuda de un multiparámetros (HANNA HI 9828, EUA):

- Temperatura (°C),
- pH
- Oxígeno disuelto (mg/L)

- Conductividad (mS/cm)
- Transparencia y profundidad (cm) se utilizó un disco de Secchi

Antes de utilizar el multiparámetros se calibró siguiendo las especificaciones del equipo (Figura 4).



**Figura 4. Registro de transparencia y profundidad con el disco de Secchi y registro de los parámetros físico-químicos con el multiparámetros en agua.**

### 6.3 Muestreo de agua.

El agua fue extraída del canal que delimitaba a la chinampa a la mitad de su profundidad. Las muestras se tomaron con ayuda de una Botella Van Dorn la cual se sumergió aproximadamente a 50 cm de la superficie y se tomaron 250 mL de agua en botellas DBO previamente esterilizadas (Figura 5).



**Figura 5. Toma de la muestra de agua con ayuda de la botella Van Dorn.**

#### 6.4 Muestreo de Suelo

Para el análisis del suelo; se colectó una muestra compuesta superficial con una cuchara de plástico, tomando en consideración tres puntos a lo largo del cultivo de la parcela y se colocó en una bolsa de plástico estéril. (Figura 6)



Figura 6. Toma de la muestra compuesta de suelo.

#### 6.5 Muestreo de vegetales Lechuga (*Lactuca sativa* var. *Longifolia*)

La lechuga se colectó como una muestra compuesta, a lo largo del cultivo, en la misma área donde se tomó el suelo. Para esta muestra se seleccionaron 10 ejemplares y de cada una se tomaron tres hojas de la parte externa del vegetal con su tallo, todas las muestras de hojas se introdujeron en bolsas de plástico, se etiquetaron y se transportaron en hielera con cuerpos fríos para su posterior análisis en laboratorio. (Figura 7).



Figura 7. Área de cultivo y toma de muestras de Lechuga.

## II: Trabajo de laboratorio

### 6.6 Aislamiento de *Aeromonas* spp. en lechuga, agua y suelo

El análisis de las muestras fue realizado en el laboratorio de Aerobiología del Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM.

Los medios de cultivo para el aislamiento de *Aeromonas* fueron:

- TSA (Bioxon, México), para realizar las cuentas totales de bacterias mesofílicas cultivables.
- Medio CromoCen (BioCen, Cuba), para realizar el aislamiento de *Aeromonas*.



**Figura 8. Procesamiento de muestras y siembra en tubos de dilución con agua peptonada.**

Se pesaron 10 g de tallo y hojas de lechuga frescas sin lavar y se introdujeron en un frasco de 200 mL con 90 mL de agua peptonada alcalina estéril (dilución 1:10). El frasco se agitó por tres minutos, se tomó una alícuota de 1 mL, se agregó a un tubo de ensayo con 9 mL de agua peptonada alcalina (dilución 1:100) y agitó en el vortex durante 1 min. El procedimiento se repitió para tener diluciones seriadas de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-4}$ . Este método se realizó para lechuga y suelo con humedad de campo del cual también se pesó 10 g sin tamizar. En el caso del agua se tomaron 45 mL de la muestra sin filtrar y se agregó a un frasco con 45 mL de agua peptonada alcalina, se agitó y se tomó una alícuota de 1 mL para realizar diluciones como en las muestras anteriores (Figura 8).

Se sembraron 100  $\mu$ L de cada dilución en medio TSA (agar de soya y tripticaseína) para realizar conteo total de bacterias mesofílicas cultivables y en agar cromogénico (CromoCen) como medio selectivo para el aislamiento de *Aeromonas* spp. Todas las cajas se incubaron a 37°C durante 24 h para el medio TSA y 24-48 h para el medio cromogénico. Posteriormente se realizó el conteo de colonias desarrolladas (Figura 9).



Figura 9. Siembra en medio TSA y CromoCen; colonias desarrolladas después de 24 h.

### 6.7 Caracterización fenotípica de aislados presuntivos de *Aeromonas* spp.

Se realizó una caracterización fenotípica de cada aislado, iniciando con el registro del color de la colonia, presencia o ausencia de halo y tamaño del mismo, ya que el medio selectivo permite tener el crecimiento de enterobacterias (color violeta) y *Pseudomonas* (salmón), además de *Aeromonas* spp. (verde-morado); se realizó el aislamiento dirigido para colonias verdes (verde fuerte y verde claro), que son las de importancia para este estudio.

Después de sembrar por estría cruzada en medio Cromogénico, se resembraron en medio TSA para obtener colonias puras y aplicar pruebas bioquímicas para su identificación. (Figura 10)



Figura 10. Caracterización fenotípica de colonias en medio CromoCen. Se aislaron por estría colonias de coloración verde claro y fuerte, con y sin formación de halo.

## 6.8 Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas tradicionales para la identificación del género *Aeromonas* incluyen:

➤ Citocromo oxidasa.

Se preparó una solución acuosa del reactivo N-tetrametil-p-phenylenediamine-dihydrochloride al 95% (Sigma-Aldrich, EUA), con el cual se impregna un papel filtro sobre una caja petri; la prueba es positiva si el papel vira a color azul-morado inmediatamente después de tomar con un palillo estéril una muestra del cultivo y frotar sobre éste como se observa en la figura 11. Por el contrario se considera negativa si al frotar no hay cambio de color o se observa amarillo tenue. Las *Aeromonas* son oxidasa positiva ya que presentan la enzima citocromo C oxidasa, la cual les permite oxidar el sustrato presente en el papel filtro en presencia de oxígeno atmosférico. Los aislados negativos para esta primera prueba se descartaron del estudio.



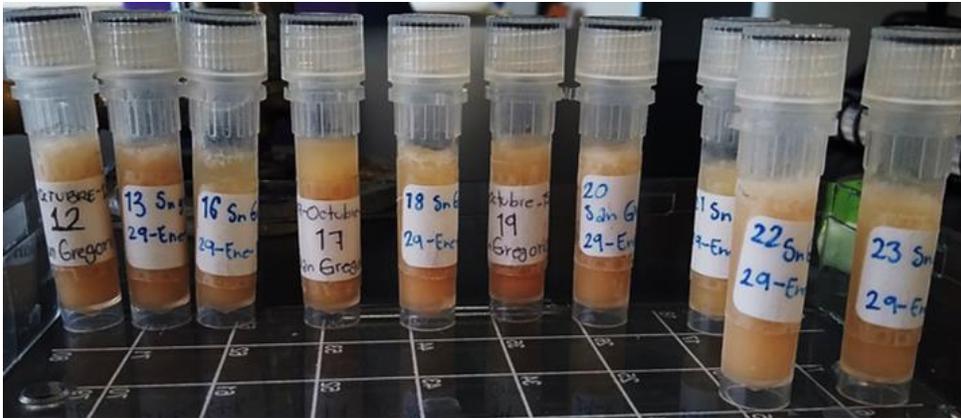
Figura 11. Prueba de Citocromo C Oxidasa realizada a las presuntas *Aeromonas*.

➤ Producción de ácido sulfhídrico y motilidad

Con ayuda del medio semisólido SIM, se observó la motilidad de la bacteria por la presencia de turbiedad en el medio y/o por el crecimiento que se difundió más allá de la línea de siembra. Adicionalmente utilizando el reactivo de Kovac's se determinó la producción de anillos indólicos al formarse un anillo rojo en la superficie, en caso de una reacción positiva (Figura 12).

La inoculación del medio se realizó utilizando un asa recta e introduciéndola a las dos terceras partes del medio, procurando que el asa entrara y saliera por el mismo lugar; se incubó a 37°C de 24-48h.





**Figura 14. Conservación de aislados en viales con medio cerebro-corazón.**

## 6.9 Extracción de DNA

La extracción de DNA genómico se realizó utilizando el kit comercial QIAGEN (QIAmp DNA mini kit, Alemania). Los aislados se sembraron por estría cruzada en TSA para obtener colonias aisladas. Se tomaron dos colonias del cultivo y se resuspendieron en 200  $\mu$ L de buffer TE, se agitó en el vortex y se siguieron las especificaciones del proveedor para llevar a cabo las siguientes reacciones:

- Lisis celular
- Tratamiento con RNasa
- Precipitación de proteínas
- Precipitación de DNA
- Hidratación

## 6.10 Amplificación del gen ARNr 16s por medio de PCR

Una vez realizada la extracción del DNA, se llevó a cabo la amplificación del gen ARNr 16s con la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) bajo las siguientes condiciones y mezclas de reactivos descritos en la tabla 1:

En termociclador (GeneAmp PCR System 9700, AB, Singapur) inició operando el siguiente programa: 94°C seguido de 35 ciclos a:

- 94°C por 1 min.
  - 94°C por 1 min.
  - 56°C por 30 seg.
  - 72°C por 1:30 min
  - 72°C por 5 min.
- } 35 ciclos

Tabla 1. Mezcla de reactivos y concentración utilizados para PCR Universal (Invitrogen, EUA)

*PCR 16s Universal*

Reactivos	$\mu\text{L}$
Buffer 1x	5
dNTPS10 $\mu\text{L}$	1
Mgcl2 1.5 $\mu\text{M}$	1.5
Oligo 27F 0.5 $\mu\text{M}$	2.5
Oligo 149R 0.5 $\mu\text{M}$	2.5
Taq 0.5 U/ $\mu\text{L}$	0.1
Agua	35.4
DNA	2

La amplificación del gen se realizó utilizando los iniciadores universales con las siguientes secuencias:

- 27F: 5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3',
- 1492R: 5'- TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'

Después de la amplificación se corrió un gel horizontal de agarosa al 1.5% en buffer TAE al 1X durante 30 minutos en una cámara de electroforesis (Horizon 58 GIBCOBRL, EUA), posteriormente se tiñó por 20 minutos en bromuro de etidio a una concentración de 20  $\mu\text{L}$  de BrEt 10mg/mL en 100 mL de agua desionizada y se observó el amplificado en un transiluminador (MacroVue UVis-20, Hoefer, EUA) y pantalla (DOC-PRINT VX2, Francia).

### **6.11 Purificación y secuenciación.**

Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  del amplificado y se purificó con ayuda del kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN, Alemania), siguiendo las especificaciones del proveedor. Los amplificados purificados de cada aislado se enviaron a la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca.

Posteriormente las secuencias recibidas fueron analizadas con el programa Chromas versión 2.6 y se compararon con las secuencias disponibles en el GenBank, con ayuda del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Para la identificación de cada especie se tomó en cuenta el porcentaje de homología que presentó la secuencia del aislado con la del GenBank, los resultados obtenidos permitieron realizar la identificación a nivel de especie de cada aislado.

## 6.12 Detección de genes putativos de virulencia

Mediante la realización de una PCR, se analizó la presencia de 5 genes de virulencia: *gcat* 237pb (glicerofosfolípido colesterol acil transferasa), *aer/hem* 431pb (aerolisina/hemolisina), *lafA* 743 pb (flagelo), *alt* 320 pb (enterotoxina citotónica) y *ast* 504pb (proteasa); utilizando como control positivo la cepa de referencia de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 y *A. caviae* Sch3 (García, 2013).

Las condiciones utilizadas para el termociclador y la mezcla de reactivos (Tabla 2) fueron las siguientes:

Tabla 2. Mezcla de reactivos y utilizados para la amplificación y detección de los genes putativos de virulencia por medio de PCR (Invitrogen, EUA).

<i>g-cat</i>		<i>laf A; aer/hem; Alt</i>		<i>Ast</i>	
Reactivos	µL	Reactivos	µL	Reactivos	µL
Buffer 1x	5	Buffer 1x	5	Buffer 1x	5
dNTPS 10µL	1	dNTPS 10µL	1	dNTPS10µL	1
Mgcl2 µM	1.8	Mgcl2	1.8	Mgcl2	1.8
<i>gcat</i> F 0.4 µM	2	<i>laf</i> A F 0.3 µM	1.5	<i>Ast</i> F 0.2 µM	1
<i>gcat</i> R 0.4 µM	2	<i>laf</i> A R 0.3 µM	1.5	<i>Ast</i> R 0.2 µM	1
Taq 0.5 U/µL	0.1	Taq 0.5 U/µL	0.1	Taq 0.5 U/µL	0.1
Agua	33.1	Agua	34.1	Agua	35.5
DNA	5	DNA	5	DNA	5

### ***gcat, aer/hem, lafA***

95°C por 5 minutos  
 94°C por 1 minuto  
 56°C por 1 minuto  
 72°C por 1 minuto  
 72°C por 5 minutos

} 35 ciclos

### ***ast; alt***

95°C por 1 minuto  
 94°C por 1 minuto  
 50°C por 1 minuto  
 72°C por 1 minuto  
 72°C por 10 minutos

} 25 ciclos

La presencia de amplificadores se comprobó corriendo una electroforesis horizontal de la reacción descrita anteriormente, colocando una alícuota de 20 µL por cada pozo y corriendo a 70 volts, durante 30 minutos, posteriormente el gel se tiñó y se observó a través de un transiluminador como ya se describió anteriormente.

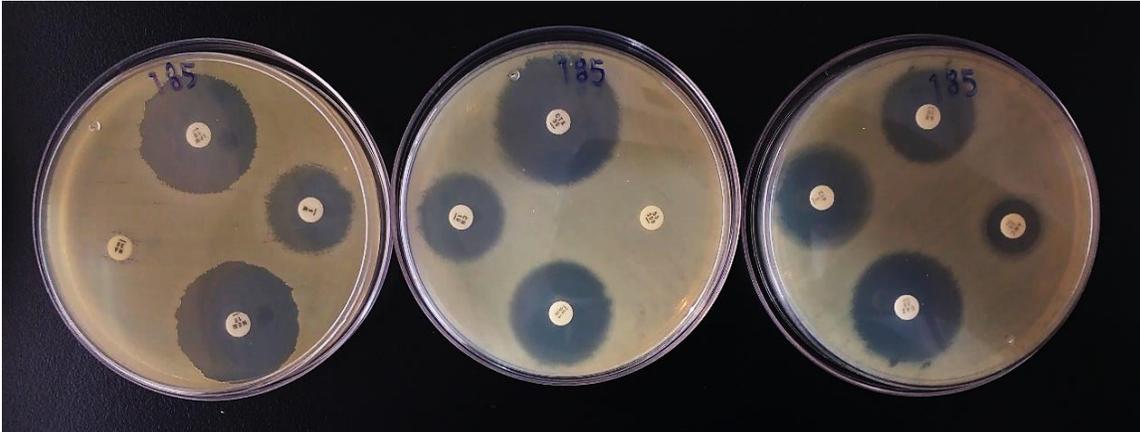
Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos de cada uno de los 5 genes putativos de virulencia. Tomado de Chacón *et al.*, 2002.

Gen	Secuencia de iniciadores (5'-3')	Tamaño del amplificado (pb)
gcat	gcat-F: 5'CTCCTGGAATCCCAAGTATCAG-3' gcat-R: 5'GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT-3'	237
aer/hem	aer-F: 5'CCTATGGCCTGAGCGAGAAG-3' aer-R: 5'CCAGTTCAGTCCCACCACT-3'	431
alt F	alt-F: 5'AAAGCGTCTGACAGCGAAGT-3' alt-R: 5'AGCGCATAGGCGTTCTCTT-3'	320
ast F	ast-F: 5'ATCGTCAGCGACAGCTTCTT-3' ast-R: 5'CTCATCCCTTGGCTTGTGT-3'	504
laf F	lafA-F: 5'CAAACCTT(T/C)GC(C/T)TC(T/C)(C/A)TGACC-3' lafA-R: 5'TCTTGGTCAT(G/A)TTGGTGCT(C/T)-3'	743

### 6.13 Análisis de susceptibilidad a antibióticos

Para llevar a cabo la prueba de susceptibilidad a antibióticos se utilizó agar Mueller-Hinton, considerando un espesor de 4 mm en la caja Petri. Se utilizó un cultivo fresco de cada uno de los aislados y se realizó una suspensión bacteriana en solución salina al 0.45 %, ajustando la turbidez de la misma al 0.5 UFC en la escala de McFarland con ayuda de un densitómetro (DensiCHECK plus, BIOMÉRIEUX, Francia). Para realizar la inoculación del medio, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión bacteriana eliminando el exceso de inóculo presionando el hisopo contra las paredes del tubo, se inoculó por estría cerrada, rotando la caja con agar Mueller-Hinton para asegurar la distribución homogénea del inóculo. Las cajas se dejaron secar antes de aplicar los discos con el antibiótico. Los discos se colocaron con unas pinzas previamente esterilizadas y presionando ligeramente el disco para asegurar su adherencia a la placa. Las placas se incubaron invertidas a 35-37°C durante 18 h.

Los antibióticos utilizados fueron los siguientes: Amikacina (30µg), Amoxicilina con ácido clavulánico (30µg), Ceftazidima (30µg), Ciprofloxacina (5µg), Gentamicina (10µg), Cefotaxima (30 µg), Compuestos Sulfonados (300µg), Tetraciclina (30µg), Meropenem (10µg), Ácido nalidíxico (30µg), Imipenem (10µg), Trimetoprim (w) (OXOID, Reino Unido).



**Figura 15. Prueba de susceptibilidad a antibióticos, se observan diferentes halos de inhibición.**

Los microorganismos fueron clasificados como sensibles o resistentes al antibiótico de acuerdo al diámetro del halo de inhibición alrededor del disco (Figura 15) y los estándares de interpretación ya establecidos (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, 2017). Los microorganismos considerados intermedios se clasificaron dentro de los resistentes

#### **6.14 Formación de Biofilms (Biopelículas)**

A partir de un cultivo fresco se preparó una suspensión en solución fisiológica salina estéril al 0.45 %, ajustándola al 0.5 de la escala de Mac Farland; se inocularon 20  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana en placas estériles de 96 pozos previamente acondicionados con 180  $\mu\text{L}$  de caldo TSA (BIOXON, México) se consideraron cuatro replicas por aislado, por blanco y control positivo. Se utilizó como blanco caldo soya tripticaseína y como control positivo *E. coli* 042 enteroagregativa. Las placas se incubaron a 37°C por 72 h.

Posterior al tiempo de incubación se retiró el cultivo bacteriano y se realizaron tres lavados a la placa con agua destilada teniendo cuidado de no desprender la biopelícula. Se fijó con glutaraldehído al 2.5 % durante 5 minutos y se lavó una vez más. Se tiñó con cristal violeta al 0.4% durante 20 minutos, después se retiró el colorante y se realizaron tres lavados con agua destilada. El colorante adherido a las biopelículas se disolvió con etanol-acetona (80/20, v/v) y se leyó en un espectrofotómetro (xMARK; BioRad) a una longitud de onda de 570 nm. La cantidad de cristal violeta absorbido es directamente proporcional a la cantidad de biopelícula formada (Figura 16).

La adherencia de la biopelícula se clasificó en cuatro categorías de acuerdo a lo establecido por Stepanovic y colaboradores (1999): 1) No adherente, 2) poco

adherente, 3) moderadamente adherente y 4) fuertemente adherente, con referencia al blanco en la lectura en el espectrofotómetro.

1. Si la DO (densidad óptica) es menor o igual a la densidad óptica de corte, entonces se considera no adherente. La densidad óptica de corte ( $OD_c$ ) es igual al promedio de la densidad óptica.

$$OD \leq OD_c \quad \text{No adherente}$$

2. Si la OD es menor o igual a la  $OD_c$  multiplicado por dos entonces:

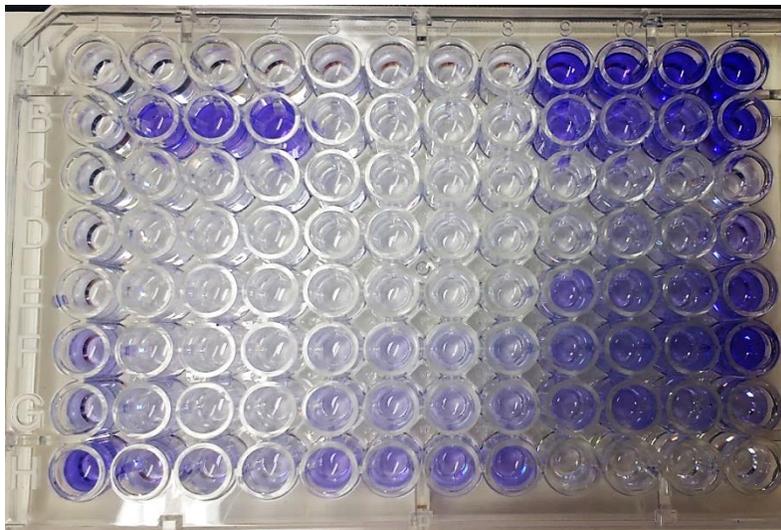
$$OD_c \leq OD \leq 2 \times OD_c \quad \text{Poco adherente}$$

3. Si la OD es menor o igual a la  $OD_c$  multiplicado por cuatro entonces:

$$2 \times OD_c \leq OD \leq 4 \times OD_c \quad \text{Moderadamente adherente}$$

4. Si la  $OD_c$  multiplicada por cuatro es menor a la OD entonces:

$$4 \times OD_c \leq OD \quad \text{Fuertemente adherente}$$



**Figura 16. Formación de biofilm. Los pozos en las diferentes tonalidades de azul muestran la presencia de biofilm y la intensidad del color el grosor del mismo**

## 7. Resultados

### 7.1 Registro de parámetros fisicoquímicos y coordenadas geográficas

El registro de coordenadas se tomó a lo largo de tres puntos de muestreo de la parcela y un punto de muestreo del canal (Tabla 4)

Tabla 4. Coordenadas geográficas de los puntos de muestreo en la zona de estudio

<i>Coordenadas UTM</i>	<i>Latitud E</i>	<i>Longitud N</i>
<i>Parcela</i>	494584	2129206
	494585	2129217
	494590	2129242
<i>Canal</i>	494546	2129139



Figura 17. Parcela de cultivo y canal donde fueron tomadas las muestras.

En la tabla 5 se muestra el registro de los parámetros fisicoquímicos que se tomaron durante los muestreos. El pH o potencial de hidrógeno durante los muestreos se comportó de manera homogénea con valores de 6.13 - 6.87, lo que indica valores ligeramente ácidos. El valor más alto de pH se registró en el mes de enero perteneciente a la temporada de secas-fría. La temperatura también se comportó de manera homogénea de acuerdo a la temporada.

Por otra parte, se puede observar que el oxígeno disuelto mostró valores ligeramente bajos en el mes enero, sin embargo, se encuentran dentro de parámetros reportados en otros estudios (Xolalpa, 2009; Mancilla, 2015). En cuanto a la salinidad se registraron valores homogéneos a lo largo de los muestreos, registrando el valor mínimo en el mes de enero (0.39 %).

La profundidad y transparencia presentaron variaciones, en cuanto más profundidad presentaba el canal, se observó menos claridad, la profundidad se comportó de manera constante a partir del mes de marzo.

Tabla 5. Registro de parámetros fisicoquímicos del agua durante los diferentes muestreos en la zona de estudio.

<i>Fecha de muestreo</i>	<i>18/01/2016</i>	<i>07/03/2016</i>	<i>26/04/2016</i>	<i>31/05/2016</i>
<i>pH</i>	6.87	6.13	6.77	6.56
<i>Temp. (°C)</i>	9.13	13.33	13.46	13.5
<i>Oxígeno D. (ppm)</i>	4.39	6.32	5.3	5.8
<i>Salinidad (%)</i>	0.39	0.42	0.42	0.4
<i>Profundidad (cm)</i>	70	104	104	104
<i>Transparencia (cm)</i>	58	27	27	30

## 7.2 Análisis Microbiológico

La concentración de bacterias mesofílicas totales se obtuvo mediante la cuenta de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en medio TSA, en los casos donde las cajas presentaron más de trescientas colonias se les consideró como no cuantificables (NC) y se utilizó la siguiente dilución mayor para obtener una cuenta más precisa. En la tabla 6 se puede observar la concentración de bacterias mesofílicas por muestra y período de muestreo. Para la muestra de agua los conteos más altos correspondieron a los meses de enero y abril, las concentraciones fluctuaron entre los  $1.1 \times 10^6$  a un máximo de  $6.2^6$  UFC/100 mL. Para la lechuga de mercado se obtuvo valores que van de  $1.7 \times 10^6$  a un máximo de  $28.9 \times 10^6$  UFC/10 g, siendo el mes de marzo el conteo más alto. Se obtuvo un mayor número de aislados de lechuga de mercado en comparación con lechuga de parcela y a pesar de que en algunos muestreos se obtuvo cuentas altas de suelo y lechuga de mercado, no se logró obtener numerosos aislados de estas dos muestras.

Durante los muestreos es importante destacar que las concentraciones más altas en medio CromoCen pertenecieron a las muestras de agua y lechuga provenientes del mercado por lo que el mayor número de aislados se obtuvo de estas dos muestras, además se observó un mayor número de aislados a partir del tercer muestreo, esto puede deberse al aumento de temperatura la cual es un factor que influye de manera importante.

Tabla 6. Concentración de bacterias mesofílicas cultivables en medio TSA

Mes	Suelo UFC/0.5 g	Agua UFC/100 mL	Lechuga Parcela UFC/10 g	Lechuga Mercado UFC/10 g	Temp prom mensual Máx.	Temp prom mensual Min
Enero	2.6 x10 <sup>6</sup>	6.2 x10 <sup>6</sup>	7.8 x10 <sup>6</sup>	3.0 x10 <sup>6</sup>	20.2	7.5
Marzo	5.1 x10 <sup>6</sup>	2.0 x10 <sup>6</sup>	24.0 x10 <sup>6</sup>	28.9 x10 <sup>6</sup>	23.0	10.8
Abril	19.7 x10 <sup>6</sup>	2.1 x10 <sup>6</sup>	17.8 x10 <sup>6</sup>	5.6 x10 <sup>6</sup>	26.5	13.0
Mayo	15.5 x10 <sup>6</sup>	1.1 x10 <sup>6</sup>	24.6 x10 <sup>6</sup>	1.7 x10 <sup>6</sup>	27.8	14.3

UFC: Unidades formadoras de colonias.

La temperatura Promedio mensual (°C) fue tomada de la estación meteorológica ENP1 Xochimilco

### 7.3 Aislamiento

Se aislaron 205 bacterias, de las cuales 100 se consideraron presuntas *Aeromonas* con ayuda de las pruebas bioquímicas (Oxidasa, SIM y Kligler). Posteriormente con la extracción de DNA y secuenciación se logró confirmar 79 aislados como *Aeromonas* de las cuales 52 % fueron aisladas de agua, 39% de lechuga de mercado, 5% de lechuga de la parcela y 4% del suelo de la parcela el cual se muestra en el grafico 1.

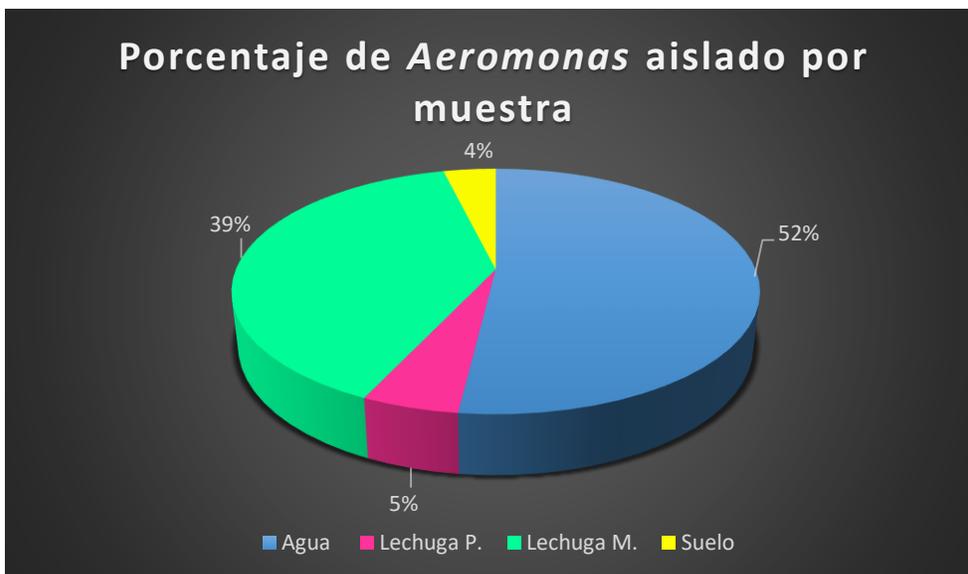
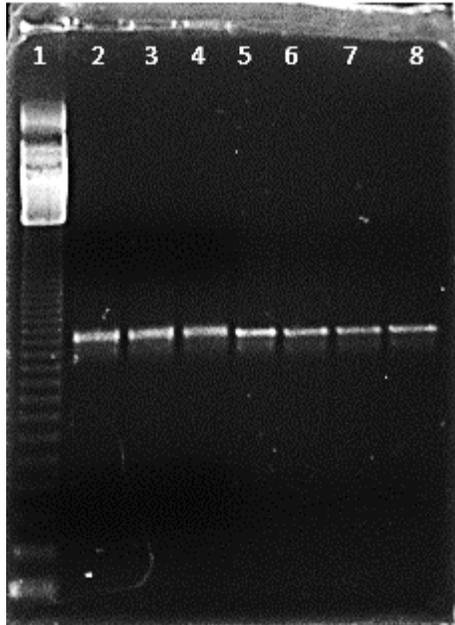


Grafico 1. Porcentaje de aislamiento de *Aeromonas* obtenidos por muestra. Lechuga P (Lechuga de Parcela), Lechuga M (Lechuga de mercado)

#### 7.4 Secuenciación del gen ARNr 16s

En la figura 18 se muestran las bandas de amplificación del gen ARNr 16s de los aislados, las cuales presentan 1502 pares de bases.



**Figura 18. PCR del gen ARNr 16s de los aislados de probables *Aeromonas*, la presencia de la banda muestra la integridad del amplificado. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular de 123 pb; en los carriles 2 a 8 se observan amplificados del gen ARNr 16s de 1502 pb.**

Después de secuenciar y comparar con las secuencias disponibles en el GenBank se pudo constatar la presencia de 11 especies: *A. allosaccharophila*, *A. aquariorum*, *A. caviae*, *A. encheleia*, *A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. media*, *A. popoffii*, *A. salmonicida*, *A. sobria*, *A. veronii*. La abundancia de cada especie por muestra analizada así como la fuente del aislado se representa en la gráfica 2.

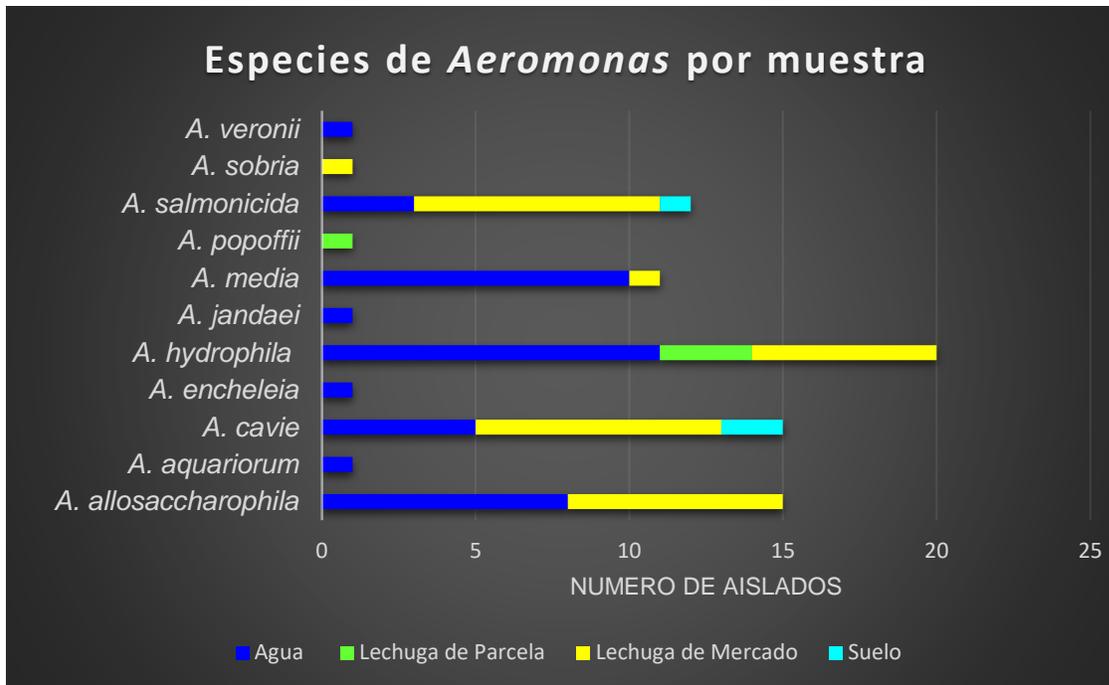


Gráfico 2. Abundancia de especies de *Aeromonas* por muestra

Se puede observar en la gráfica 2 que la mayor diversidad de especies de *Aeromonas* se presentó en las muestras de agua con 41 aislados, seguido de las muestras de lechuga provenientes del mercado donde se obtuvieron 31 aislados. Las especies más abundantes fueron: *A. hydrophila* (25%), *A. allosaccharophila* (19%), *A. caviae* (19%), *A. salmonicida* (15%) y *A. media* (14%). Cabe mencionar que además del género *Aeromonas*, de interés para este estudio, se logró aislar e identificar 6 géneros más: *Pseudomonas Koreensis*, *Lelliottia amnigena*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Pantoea eucalypti*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter cancerogenus*, *Erwinia toleana*, *Erwinia rhapontici* debido a que presentaron semejanzas con las características morfológicas.

## 7.5 Genes de Virulencia

Se evaluó en los 79 aislados identificados como *Aeromonas*, la presencia de 5 genes de virulencia: *gcat* (glicerofosfolípido colesterol acil transferasa), *alt* (enterotoxina citotónica), *aer/hem* (aerolisina/hemolisina), *ast* (proteasa) y *laf A* (flagelo). Considerando como controles positivos las cepas de referencia de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 para los genes *gcat*, *alt*, *aer/hem*, *ast* y *Aeromonas caviae* Sch3 para el gen *lafA*. En la figura 19 se muestra en el primer carril el marcador de peso molecular empleado (Invitrogen), el cual presenta 123 pares de bases; en el segundo carril la amplificación de los cinco genes de virulencia buscados, el cual fue resultado de la amplificación de dos cepas de referencia; finalmente en los carriles 3 al 14 algunos aislados de *Aeromonas* que presentaron de dos a cinco genes.

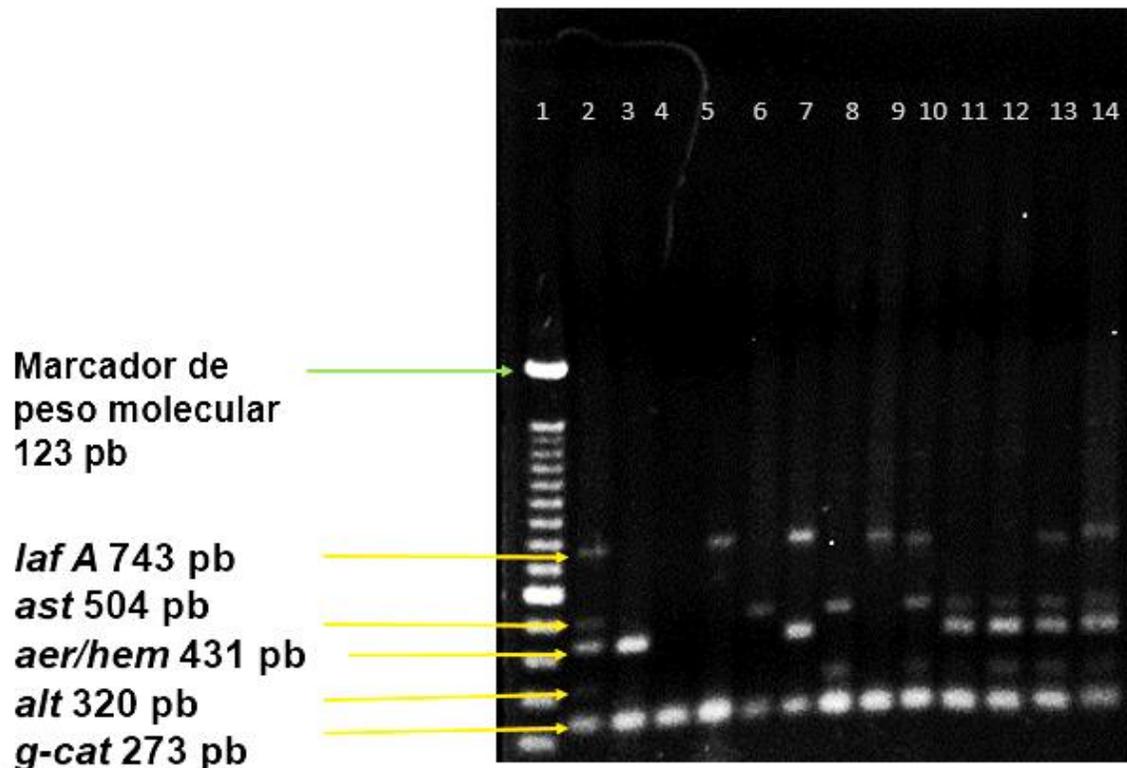


Figura 19. Se muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular utilizado de 123 pb; en el carril 2 las cepas de referencia *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 y *Aeromonas caviae* Sch3; en los carriles 3-14 diferentes especies de *Aeromonas* que presentan de 2 a 5 genes de virulencia.

La frecuencia de aparición de los genes de virulencia en las diferentes especies de *Aeromonas* fue: *g-cat* 100%, *aer/hem* 25%, *laf A* 19%, *ast* 16% y *alt* 14%. Es importante destacar que 30% de los aislados presentó al menos 2 genes de virulencia y sólo dos aislados de *Aeromonas salmonicida* presentaron los 5 genes de virulencia. Estos dos aislados se obtuvieron de las muestras de agua y lechuga de mercado.

Como se observa en la tabla 7, el mayor número de especies con genes de virulencia se presentaron en las muestras de agua y lechuga provenientes del mercado. 26 aislados provenientes de nueve especies diferentes presentaron al menos 2 genes de virulencia; las especies que amplificaron dos o más genes de virulencia fueron: *A. hydrophila* (20), *A. caviae* (15), *A. allosaccharophila* (14), *A. media* y *A. salmonicida* (13).

Tabla 7. Presencia de genes de virulencia en las diferentes especies de *Aeromonas* aisladas de cada fuente.

N° de genes	Especie	Fuente de aislamiento			
		Agua	LM	LP	Suelo
1	<i>A. allosaccharophila</i>	6	4		
	<i>A. caviae</i>	4	5		2
	<i>A. hydrophila</i>	6	3	2	
	<i>A. media</i>	5	1		
	<i>A. popoffii</i>			1	
	<i>A. salmonicida</i>		1		
	<i>A. sobria</i>		1		
2	<i>A. allosaccharophila</i>	2	2		
	<i>A. aquariorum</i>	1			
	<i>A. caviae</i>	1	2		
	<i>A. encheleia</i>	1			
	<i>A. hydrophila</i>	3	2	1	
	<i>A. jandaei</i>	1			
	<i>A. media</i>	5			
	<i>A. salmonicida</i>		2		
<i>A. veronii</i>	1				
3	<i>A. allosaccharophila</i>		1		
	<i>A. caviae</i>		1		
	<i>A. hydrophila</i>	1			
	<i>A. salmonicida</i>	2	3		1
4	<i>A. hydrophila</i>	1			
	<i>A. salmonicida</i>		2		
5	<i>A. salmonicida</i>	1	1		

LM: lechuga del mercado; LP: lechuga de la parcela.

En la tabla 8 se presentan las combinaciones de genes obtenidas, así como el porcentaje de incidencia en los aislados. Como se puede observar el 100% de los aislados presentó el gen *g-cat* (glicerofosfolípido colesterol acil transferasa) seguido de la combinación de *g-cat* con *aer/hem* y *lafA* (13%), los cuales son considerados factores de virulencia.

Por último, la combinación de *g-cat*, *aer/hem* y *ast* se presentó en 5% de los aislados. En total un 18% presentó una combinación de al menos tres genes de virulencia.

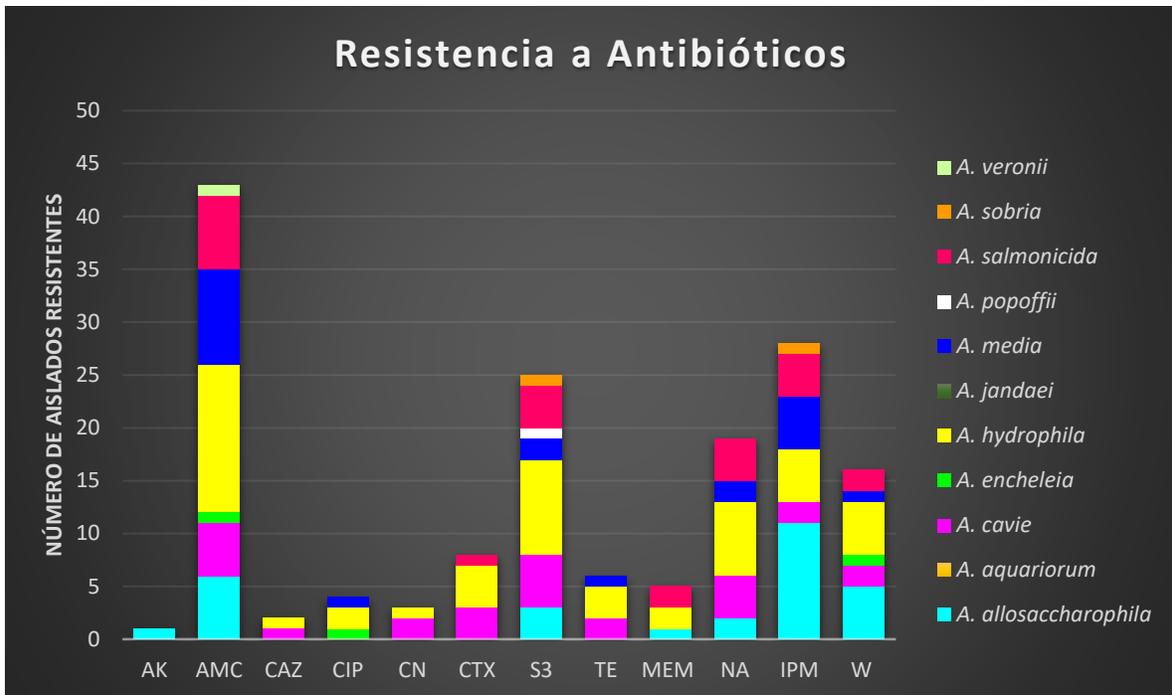
Tabla 8 Porcentaje de las diferentes combinaciones de genes aislados

Combinaciones de genes	Porcentaje
<i>g-cat</i>	100
<i>g-cat aer/hem</i>	13
<i>g-cat lafA</i>	13
<i>g-cat ast</i>	3
<i>g-cat alt</i>	3
<i>g-cat aer/hem ast</i>	5
<i>g-cat aer/hem alt</i>	1
<i>g-cat aer/hem lafA</i>	1
<i>g-cat ast alt</i>	3
<i>g-cat lafA alt</i>	1
<i>g-cat lafA ast alt</i>	1
<i>g-cat aer/hem ast alt</i>	3
<i>g-cat aer/hem lafA ast alt</i>	3

## 7.6 Resistencia a Antibióticos

Los resultados obtenidos para las pruebas de susceptibilidad a antibióticos se obtuvieron con base en los puntos de corte publicados por la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007).

De los 12 antibióticos evaluados se obtuvieron los siguientes porcentajes de resistencia: 55% resistentes a amoxicilina con ácido clavulánico, 36% a imipenem, 32% a compuestos sulfonados, 24% a ácido nalidíxico, 21% a trimetoprima, 10% a cefotaxina, 8% a tetraciclina, 6% a meropenem, 5% a ciprofloxacina, 4% a gentamicina, 3% a ceftazidima y 1% amikacina (Gráfica 3).



Grafica 3. Resistencia a antibióticos de las diferentes especies aisladas de *Aeromonas*. Antibióticos: Amikacina (AK), Amoxicilina con ácido clavulánico (AMC), Ceftazidima (CAZ), Ciprofloxacina (CIP), Gentamicina (CN), Cefotaxina (CTX), Compuestos Sulfonados (S3), Tetraciclina (TE), Meropenem (MEM), Ácido nalidíxico (NA), Imipenem (IPM), Trimetoprim (W)

Los aislados presentaron resistencia desde uno a 5 antibióticos, sólo 10 aislados fueron sensibles a todos los antibióticos seleccionados para las pruebas.

El 33% fue resistente a 2 antibióticos, 23% a 1 antibiótico, 15% a 4 antibióticos, 12% a 3 antibióticos y 4% a 5 antibióticos. Es importante mencionar que los aislados resistentes a cinco antibióticos provinieron de Lechuga del mercado, además son formadores de biofilm y presentaron uno y dos genes de virulencia.

En la gráfica 4 se muestra el número de aislados y su respectiva resistencia de uno a cinco antibióticos.



Grafica 4. Número de aislados que presentan resistencia de uno a 5 antibióticos

Con base a los resultados anteriores se consideró multirresistentes a las especies que presentaron resistencia  $\geq 3$  antibióticos, por lo que 24 aislados resultaron multirresistentes (12 de las muestras de agua, 11 de lechuga de parcela y 1 de suelo) (Tabla 9); el único patrón que se repitió fue AMC-MEM-IPM-W. Las combinaciones de multirresistencia fueron asociadas principalmente a especies como *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media* y *A. allosaccharophila*.

Tabla 9. Patrones de multirresistencia 3-5 antibióticos

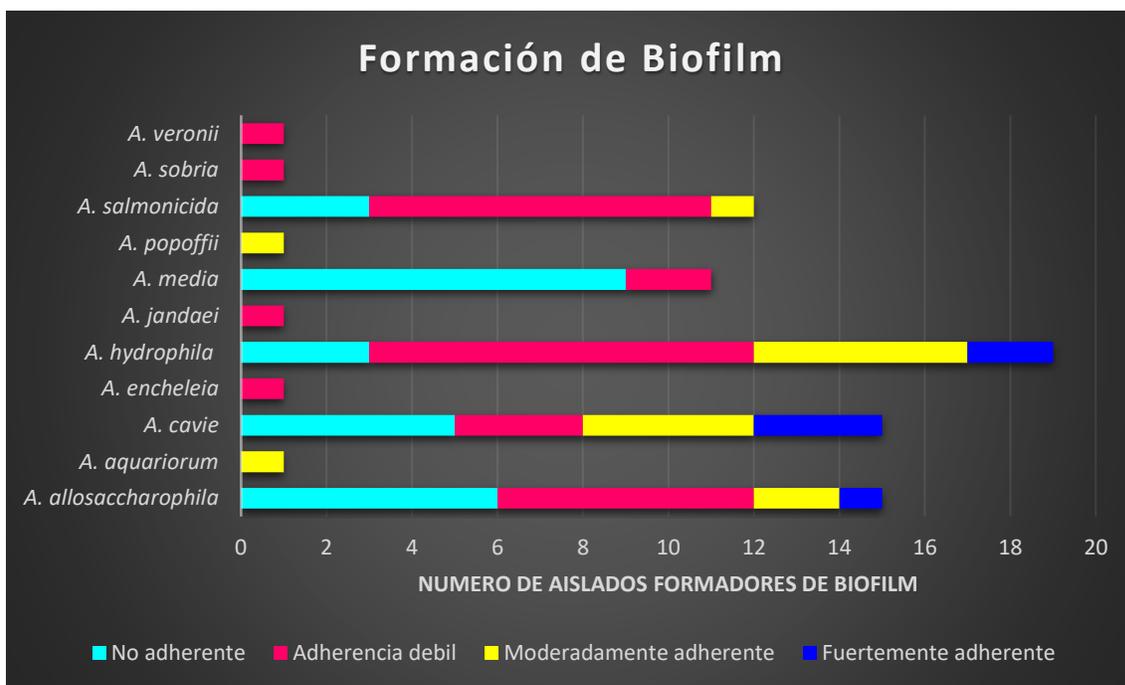
Patrones de multirresistencia			
AMC	CIP	NA	
AMC	CIP	W	
AMC	CTX	S3	
AMC	CTX	NA	
AMC	IPM	S3	
AMC	IPM	NA	
AMC	IPM	W	
S3	NA	W	
S3	NA	MEM	
AMC	CAZ	CTX	W
AMC	CAZ	S3	TE
AMC	CIP	CTX	MEM
AMC	S3	CN	NA
AMC	S3	CTX	NA
AMC	S3	CTX	W
AMC	S3	TE	W
AMC	S3	NA	IPM
AMC	S3	IPM	W
AMC	MEM	IPM	W

CTX	S3	TE	NA	
AK	S3	MEM	IPM	W
AMC	CIP	S3	TE	NA
AMC	S3	NA	IPM	W

## 7.7 Formación de Biopelícula

En los aislados de *Aeromonas* se evaluó la formación de biopelícula, el método de cristal violeta permitió determinar de manera indirecta la cantidad de biopelícula formada, y el cálculo utilizado por Christensen y colaboradores (1985) y Srdjan Stepanovic y colaboradores (1999) permitió evaluarla de manera directa el grado de adherencia que presentaron los aislados .

Un 67% de los aislamientos presentó formación de biopelícula, dentro de las cuales, 41% mostró adherencia débil, 18% fue moderadamente adherente y 8% fuertemente adherente. La especie *A. hydrophila* presentó el mayor número de aislados formadores de biopelícula (16), seguidos de *A. caviae* (9), *A. allosaccharophila* y *A. salmonicida* (9) (Gráfica 5). Cabe mencionar que 26 aislados no presentaron formación de biopelícula.



Gráfica 5. Aislados formadores de Biofilm

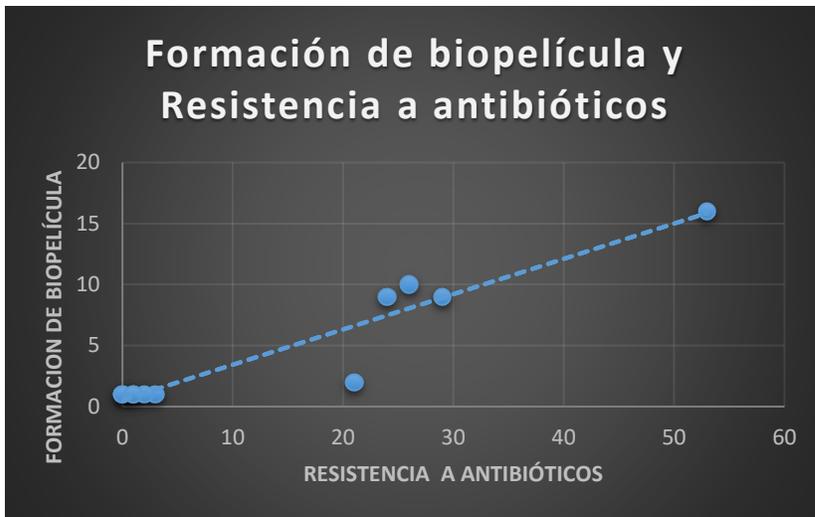
Podemos observar en la tabla 10 la relación que hay entre los aislados que formaron biofilm, así como la presencia de genes de virulencia (1 a 5 genes). Los aislados de lechuga provenientes del mercado y del agua presentan mayor incidencia en la formación de biofilm.

Los seis aislados en los que se observó fuerte adherencia pertenecen a *A. allosaccharophila* (1), *A. caviae* (3) y *A. hydrophila* (2) provienen de la muestra de agua y lechuga del mercado.

Tabla 10 Relación de especies formadoras de biopelícula; genes de virulencia y fuente de aislado.

N° de genes	Especie formadora de biopelícula	Fuente de Aislado			
		Agua	Lechuga mercado	Lechuga parcela	Suelo
1	<i>A. allosaccharophila</i>	2	4		
	<i>A. caviae</i>	3	4		
	<i>A. hydrophila</i>	6	1	2	
	<i>A. media</i>	2			
	<i>A. popoffii</i>			1	
	<i>A. salmonicida</i>		1		
	<i>A. sobria</i>		1		
2	<i>A. allosaccharophila</i>	2	1		
	<i>A. aquariorum</i>	1			
	<i>A. caviae</i>	1	1		
	<i>A. encheleia</i>	1			
	<i>A. hydrophila</i>	2	3	1	
	<i>A. jandaei</i>	1			
	<i>A. media</i>				
	<i>A. salmonicida</i>				
<i>A. veronii</i>	1				
3	<i>A. allosaccharophila</i>		1		
	<i>A. caviae</i>		1		
	<i>A. hydrophila</i>	1			
	<i>A. salmonicida</i>	1	1		1
4	<i>A. hydrophila</i>	1	1		
	<i>A. salmonicida</i>		2		
5	<i>A. salmonicida</i>	1	1		

Con ayuda del programa BioStat 2009, se realizó un análisis de correlación para los aislados formadores de biofilm y la resistencia a antibióticos, se encontró una correlación positiva entre estos parámetros ( $p < 0.05$ ) con una  $r = 0.94$  (Gráfica 6).



Grafica 6. Correlación entre la formación de biopelícula y la resistencia a antibióticos.

## 8. Discusión

El lago de Xochimilco a pesar de ser considerado Patrimonio Cultural de la Humanidad es un sistema rodeado por zonas urbanas y agrícolas donde la descarga de aguas residuales, agroquímicos, fertilizantes y demás contaminantes ha contribuido sin duda a la degradación y eutrofización de dicho ecosistema (Kagalou *et al.*, 2003). Los servicios ambientales que esta zona brindaba se han visto disminuidos debido a las presiones antropocéntricas, de igual forma se ha generado un desnivel con la eutrofización de los canales llevando a la proliferación de diferentes microorganismos que generan problemas de importancia para la salud pública.

El registro de los parámetros fisicoquímicos nos permite conocer el estado en que se encuentra un área de estudio como en este caso.

Los valores de pH del agua del canal muestran una tendencia de ligeramente ácido a neutro. En un estudio realizado por CONAGUA y CONACyT (2012) encontraron valores de pH con tendencia hacia la alcalinidad, con valores en un rango de 7.5 a 9. Lo mismo se registró en el estudio de Quiroz y colaboradores (2008); cabe mencionar que la época de muestreo para dichos estudios fue en temporada de lluvias por lo que ese es el pH representativo para esta temporada en la zona de estudio. Según Ramos y colaboradores (2001), en la época de lluvias se presenta lavado de los suelos circundantes hacia los cuerpos de agua, por lo que se genera el arrastre de compuestos carbonatados incrementando con ello los valores de pH hacia la basicidad, en el caso de la época de secas no hay dichas aportaciones por lo que los niveles de pH no se ven influenciados por estas aportaciones y tienden a disminuir el pH. Sin embargo, hay aportes constantes de materia orgánica que influyen en el proceso de acidificación.

El oxígeno disuelto es considerado un parámetro importante ya que proporciona información acerca de las relaciones biológicas y bioquímicas que ocurren en el agua, además de ser un gas utilizado para la respiración de los organismos, es un componente necesario para la realización de procesos de óxido-reducción de algunos iones como nitrato, amonio, compuestos ferrosos, sulfatos y sulfitos (Stoker y Seager, 1981). Los valores registrados en el período de muestreo son considerados estables para la zona, el valor más bajo 4.39 mg/L se obtuvo en el mes de enero, esto puede deberse a que durante los muestreos, el canal se encontraba con abundante presencia de lirio acuático y lentejilla, los cuales actuaron como barrera física afectando el intercambio gaseoso entre la atmósfera y la superficie del agua del canal, además la descomposición natural de estas plantas acuáticas agota el oxígeno del embalse lo cual coincide con lo reportado por Quiroz y colaboradores en 2008. Los valores registrados se consideran similares a los publicados en otros estudios, como el reporte de CONACyT y CONAGUA (2001), y el estudio de Quiroz y colaboradores (2008). Es importante mencionar que las actividades antropogénicas como la urbanización y la agricultura así como el aporte de aguas residuales no tratadas pueden alterar tanto el balance de los niveles de oxígeno como el de los nutrientes del agua. El área de estudio cuenta con estos

factores de alteración ya que colinda con la zona urbana y existe aporte de aguas negras de algunas viviendas que aún no cuentan con drenaje, por lo que es también considerada un área de disturbio antropogénico.

La concentración de oxígeno se ve influenciada por factores como la temperatura, la salinidad, la presión atmosférica y la penetración de la luz en condiciones normales de un ecosistema estable; así por ejemplo la concentración de oxígeno disuelto es inversamente proporcional con la temperatura, es decir, si hay un aumento de temperatura, las concentraciones de oxígeno disuelto tienden a disminuir (Xolalpa, 2009). Sin embargo para el caso de nuestra área de estudio, los valores registrados de oxígeno disuelto son a consecuencia en su mayoría de factores como la entrada de materia orgánica, la presencia de lirio, lentejilla y la salinidad.

La transparencia de un cuerpo de agua también es un factor importante para conocer su estado y calidad, ya que ésta puede verse afectada por varios factores, como las escorrentías, descargas directas, la remoción de sedimentos y las actividades que se realizan cerca de la zona como la agricultura que es el caso del área de estudio donde se registraron valores de 27 a 58 cm; los valores más bajos se obtuvieron en los meses de marzo y abril, por el contrario el valor máximo se registró en el mes de enero, esto puede deberse a la remoción de sedimentos que realizan los agricultores (técnica de chaponeo) para hacer la siembra de semillas de los cultivos, que son actividades que se realizan de manera normal.

El registro de los parámetros fisicoquímicos nos permitió confirmar que el estado en que se encuentra el área de estudio es eutrófica. El abundante aporte de materia orgánica representa un problema en la calidad del agua ya que propicia el desarrollo de diferentes microorganismos alóctonos y la alta reproducción de los microorganismos autóctonos de la zona generando una alteración trófica.

Las hortalizas por su encontrarse en un ambiente abierto, inevitablemente se exponen a una diversidad de fuentes de contaminación por microorganismos patógenos a lo largo de todo el proceso de producción. Durante el riego también es posible que se depositen contaminantes microbianos sobre el producto, la disponibilidad de una adecuada calidad microbiológica del agua, es una condición obligada para evitar el ingreso de microorganismos patógenos durante el riego de las hortalizas (Fernández, 2012).

El aporte de aguas negras a los canales, las condiciones climáticas y las prácticas agrícolas, influyen de manera directa en la contaminación microbiológica de los vegetales que se producen en la zona de San Gregorio Atlapulco, Xochimilco, ya que estas condiciones influyen en la presencia de microorganismos presentes en el producto vegetal. En los Países Bajos se han establecido estándares de calidad de 20 unidades formadoras de colonias (UFC) de *Aeromonas* por cada 100 mL para agua que ha sido sometida a un proceso en plantas de tratamiento y 200 UFC en 100 mL en el agua que alimenta a los sistemas de distribución; así mismo se menciona que los sistemas de agua potable se ven afectados por las variaciones

estacionales, con un mayor número de *Aeromonas* presentes en los meses más cálidos, que es cuando los casos de gastroenteritis y septicemia atribuidos a este microorganismo son generalmente mayores (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014). De acuerdo con estos datos podemos observar que los resultados obtenidos en el agua muestreada en este estudio superan los niveles establecidos de 200 UFC/100 mL, donde el valor más bajo fue de 270 UFC/100mL para el mes de abril y el valor más alto fue de 4725 UFC/100mL para el mes de marzo mes donde inicia la temporada de secas cálidas.

En este estudio se presentaron con alta frecuencia de aislamiento *Aeromonas hydrophila*, *A. allosaccharophila*, *A. caviae*, *A. salmonicida* y *A. media*, especies involucradas en episodios de diarreas reportadas en muestras clínicas en México (Janda y Abbott, 1988; Castro-Escarpulli *et al.*, 2000). El aislamiento de estas especies generalmente proviene de heces de pacientes con diarrea, seguido de heridas y finalmente de la sangre. En menor proporción se aisló *A. aquariorum*, *A. encheleia*, *A. jandaei*, *A. popoffii*, *A. sobria* y *A. veronii*. *A. sobria* es una especie ambiental típica que con frecuencia es recuperada de peces enfermos (principalmente en trucha) y aunque las especies de *Aeromonas* prevalentes en agua se han considerado diferentes a las reportadas en los casos clínicos, en casos recientes se han reportado las mismas especies en agua y en cuadros clínicos (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014).

Las *Aeromonas* identificadas en este estudio fueron aisladas de muestras ambientales (agua y suelo) y de vegetales (lechuga de la parcela y del mercado). Estudios recientes reportan la presencia de *Aeromonas* aisladas de los alimentos y en el ambiente principalmente acuático, sugiriendo que estos medios son un vehículo importante de diseminación de estas bacterias potencialmente patógenas (Neyts *et al.*, 2000; McMahon and Wilson, 2001; Beuchat, 2002; Ginestrea, 2005; Pérez *et al.*, 2005).

Además se ha reportado que las verduras que se consumen crudas contienen *Aeromonas* en el 26-40% de las muestras (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014) lo que coincide con el porcentaje reportado para el presente estudio que fue de 39.24%. La frecuencia de especies de *Aeromonas* en los vegetales coincide con los estudios realizados por diversos autores como Ginestre y colaboradores en 2005 quienes recuperaron un 18% de *Aeromonas* en muestras de lechuga expandidas en un mercado popular. Brion y colaboradores (1996) recuperaron *Aeromonas* en un 27.38% de muestras de ensaladas de vegetales adquiridas en expendios de comida rápida. En diversas fuentes se reporta que existe un amplio grupo de alimentos en los cuales se han aislado especies de *Aeromonas* entre los que se incluyen: pescado fresco y congelado, mariscos, agua potable, leche cruda y pasteurizada, pollo crudo, tortas y postres con cremas, mayonesas y ensaladas (Beuchat 1996, 1998; Villari *et al.*, 2000; Arce *et al.*, 2002).

Matthews (2006) menciona que los microorganismos patógenos pueden asociarse a los alimentos vegetales en alguno o algunos de los cinco pasos de manipulación y procesamiento de los alimentos los cuales son:

1. El paso previo a la recolección, debido al agua utilizada para regar el producto así como la aplicación de insecticidas, herbicidas y fertilizantes (orgánicos).
2. El período de recolección donde influye de manera importante el manejo del equipo de recolección y la limpieza de los trabajadores.
3. El procesado de los alimentos donde se incluye el envasado y la distribución.
4. La preparación del alimento tanto en el hogar como en cualquier restaurante u otro tipo de instalación de servicio de alimentos.
5. Productos importados donde es importante confirmar el origen del producto.

Esto nos permite sugerir que las prácticas de pos cosecha, transporte y venta de nuestro vegetal de estudio pueden ser en este caso la principal fuente de contaminación, ya que la mayor concentración de los aislados se encontró en las lechugas del mercado. Es importante resaltar que en el agua del canal, que es utilizada para el riego de los vegetales, fue donde se encontró el más alto número de aislados. Además, es una práctica común que esta misma agua se utilice para mantener fresco el producto en los mercados durante su comercialización local. Sin embargo en las lechugas que se encuentran en la parcela y el suelo de esta, es probable que factores ambientales como condiciones más secas, la radiación solar y la temperatura ayuden a disminuir la carga microbiana que se presentó en los mismos.

En este estudio el número más elevado de *Aeromonas* se obtuvo de las muestras de agua, lo que confirma que el agua es el hábitat primario de este género de bacterias, aunado a los aportes de aguas residuales provenientes de las plantas de tratamiento y de las viviendas cercanas que no cuentan con un sistema de drenaje.

La presencia elevada de *Aeromonas* en el agua también representa un riesgo potencial para las personas que trabajan en la parcela, ya que de acuerdo a Figueras (2005), después de la gastroenteritis, las infecciones extraintestinales son el cuadro clínico más frecuente provocado por *Aeromonas*. Las infecciones en algunos casos pueden evolucionar de forma severa a gangrena, especialmente en pacientes inmunocomprometidos.

Para que una bacteria colonice e invada un tejido generando una infección, es necesario que cuente con factores que favorezcan dicha acción. Kirov (1993) y Bravo (2011) han descrito la presencia de factores de virulencia como aerolisinas, enterotoxinas citolíticas y citotónicas, citotoxinas, hemolisinas, lipasas, proteasas y/o capacidad invasiva, aunque no está clara la repercusión relativa de estas propiedades en la patogenicidad, de modo que no todas las especies que las poseen parecen ser virulentas, siendo necesaria la combinación de estas propiedades bacterianas con factores predisponentes en el hospedero para que se desencadene una infección.

En el caso de los aislados obtenidos en donde se realizó la búsqueda de cinco genes de virulencia se encontró que alrededor del 30% presentaron al menos dos genes de virulencia. Todos los aislamientos presentaron el gen *gcat*

(glicerofosfolípido colesterol acil transferasa), el cual de acuerdo con Chacón y colaboradores (2002) la mayoría de las bacterias de este género presentan este gen, por lo que se propone como indicador de la correcta identificación del género. Esta lipasa se ha asociado con daño intestinal e interacción con leucocitos humanos, digiere las membranas de los eritrocitos hasta llevarlos a la lisis (Merino *et al.*, 1990; Pemberton *et al.*, 1997; Vipond *et al.*, 1998; Merino *et al.*, 1999); además está asociada a infecciones en peces favoreciendo la invasión de la bacteria en el hospedero. El segundo gen más abundante fue el gen *aer/hem* (aerolisina/hemolisina) el cual es una toxina formadora de poros, se ha asociado a diarreas y a infecciones internas en humanos (Fivaz *et al.*, 2002).

Aproximadamente un 20% de los aislados presentaron el gen *laf A*, encargado de la síntesis del flagelo lateral, motilidad, mejora la adherencia, permite la formación de biopelícula y la invasión celular, es importante en las fases iniciales para la colonización e infección, ya que los flagelos promueven la colonización e invasión de la mucosa del hospedero. Una vez que las bacterias alcanzan la mucosa, a través de la quimiotaxis, permite que los patógenos alcancen el tejido de la mucosa iniciando la infección. La motilidad y la presencia de flagelos también se asocian con la formación de biopelícula, que generalmente se asocia con las infecciones persistentes (Tomás 2012). Los genes *ast* y *alt* se encontraron entre el 13-16% de las especies y son consideradas enterotoxinas citotónicas encargadas de aumentar el nivel de AMPc y prostaglandinas en la mucosa intestinal creando poros en las membranas de la célula hospedera hasta generar la lisis (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014).

Chacón y colaboradores (2003) mencionan que la expresión de varios genes putativos de virulencia puede considerarse un indicativo del potencial patogénico de las especies, en este estudio se obtuvieron dos aislados de *A. salmonicida* que presentaron los cinco genes de virulencia, uno fue aislado del agua y el segundo de lechuga del mercado por lo tanto podemos sugerir que estos aislados pueden considerarse con alto potencial patogénico y poner en riesgo al trabajador y al consumidor.

Teniendo en cuenta la importancia que representa la resistencia a antibióticos en el tratamiento de las enfermedades generadas por *Aeromonas*, en este estudio se realizó una prueba de susceptibilidad a 12 diferentes antibióticos de los grupos:  $\beta$ -lactámicos (AMC, CAZ, CTX, MEM, IMP), Aminoglucósidos (AK, CN), Quinolonas (NA, CIP), Sulfamidas (S3, W) y Tetraciclinas (TE). Un número considerable de los aislados presentó resistencia a los  $\beta$ -lactámicos, sobre todo a AMC e IMP, así como a las quinolonas y sulfonamidas.

En estudios realizados por Palú y colaboradores en el 2006 con muestras de lechuga, se obtuvo que los aislados fueron sensibles a cefotaxima, ceftazidima, imipenem, amikacina, gentamicina, tobramicina, ciprofloxacina, sulfametoxazol/trimetoprim y cloranfenicol, se presentó resistencia de *A. hydrophila* a ampicilina/sulbactam en un 96%; a tetraciclina del 8% y del 11% intermedio a cefoxitina. Por otra parte, el 55% de aislados de *A. caviae* fue resistente a

ampicilina/sulbactam, el 10% a tetraciclina y el 31% a cefoxitina. En comparación con estos resultados, podemos decir que los aislados obtenidos en este estudio presentan resistencia a antibióticos que no han sido reportados anteriormente.

Estudios realizados por Arteaga y colaboradores en 2006 y Muñoz y colaboradores en 2012, identificaron en muestras ambientales y de alimentos aislados con sensibilidad a amikacina, cefotaxina, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, cefotetan, ofloxacina, piperaciclina, tircarciclina con ácido clavulánico, trobamicina y trimetoprim con sulfametoxazol, y sólo presentaron resistencia a cefazolina en el 35% de las muestras ambientales y el 55% de las muestras de alimentos, lo que indica que las muestras ambientales y de alimentos pueden presentar baja resistencia a antibióticos. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio muestran lo contrario y son más parecidos a reportes de muestras clínicas, donde recientemente se han reportado altos porcentajes de resistencia a antibióticos como ampicilina con sulbactam, cefazolina, cefoxitina, y en menor proporción tetraciclinas, cefalosporinas de tercera generación y cloranfenicol; además se ha reportado sensibilidad con porcentajes bajos de resistencia que van del 1 al 3% para sulfametoxazol con trimetoprim, cefotaxima, cefotetan, ceftazidima, ceftriaxona, imipenem, amikacina, gentamicina, ciprofloxacina, ofloxacina, tobramicina y quinolonas (Altwegg, 1999; Goñi et al., 2000; Arteaga et al., 2006; Palú et al., 2006; Guerra et al., 2007).

Se ha demostrado que el uso extensivo de fármacos antimicrobianos en profilaxis así como en el tratamiento en humanos y animales criados para consumo humano, desempeña sin duda un papel importante en el aumento del número de especies de *Aeromonas* resistentes a fármacos. La propagación de la resistencia a los antimicrobianos en patógenos transmitidos por los alimentos ha aumentado durante las últimas décadas. La presencia de genes de resistencia en elementos móviles, tales como plásmidos, transposones e integrones, facilita su rápida propagación entre las bacterias. Estos elementos móviles podrían ser transmitidos entre las bacterias a través de tres vías: transformación, transducción y conjugación. Los plásmidos transfieren estos genes al cromosoma bacteriano o pueden reunir múltiples genes que confieren resistencia, dando lugar a cepas multirresistentes. (Saavedra et al., 2004; Adebayo et al., 2012). En este estudio 24 aislados presentaron multirresistencia desde 3 a hasta 5 antibióticos.

La resistencia microbiana en *Aeromonas* está mediada cromosómicamente, sin embargo, las  $\beta$ -lactamasas pueden ser codificadas por plásmidos o integrones (Aravena-Roman et al., 2012). Las *Aeromonas* producen diferentes  $\beta$ -lactamasas, que confieren resistencia a un amplio espectro de antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Chen y colaboradores (2012) describen cuatro grupos mediados por cromosomas: (1) Clase A, antibióticos de amplio espectro a  $\beta$ -lactamasas las cuales confieren resistencia a todas las penicilinas, cefalosporinas y monolactámicos, son mediadas por plásmidos; (2) Clase B, metalo- $\beta$ -lactamasas confieren resistencia a penems y carbapenems; (3) Clase C, cefalosporinas confieren resistencia a cefalosporinas de segunda y tercera generación; y (4) Clase D, penicilinasas.

Según Goñi-Urriza (2000), el aporte de aguas residuales a un cuerpo acuático, puede contener fármacos antimicrobianos y bacterias comensales resistentes. Estos microorganismos pueden convertirse en un reservorio de genes que codifican la resistencia a diversos fármacos antimicrobianos. En el caso de la zona de estudio de San Gregorio Atlapulco, es importante resaltar que el agua proveniente del canal es abastecida con aportes de aguas residuales y/o con poco tratamiento; además, las viviendas aledañas a las zonas vierten sus aguas al canal ya que el servicio de drenaje es nulo en aquella zona. Estos son factores importantes que pueden estar involucrados en la resistencia que presentaron los aislados.

Las biopelículas son ecosistemas microbiológicos complejos, embebidos en una matriz de polímeros orgánicos adheridos a una superficie, donde una vez establecidas las bacterias expresan propiedades sobresalientes tales como el aumento de la resistencia a las defensas del hospedero, los biocidas, antibióticos y diversos agentes fisicoquímicos (Prigent-Combaret y Lejeune, 1999; Costerton, 2005). Por lo tanto las biopelículas pueden persistir y sobrevivir incluso después de los procesos de desinfección, lo que representa una posible fuente de contaminación de alimentos y posterior intoxicación alimentaria en seres humanos y animales (Chavant *et al.*, 2007). En este estudio el 67% de las especies aisladas presentaron formación de biopelícula, de débil a fuertemente adherentes, sobre todo de agua y de lechuga del mercado. Las especies que presentaron el mayor número de aislados formadores de biopelículas fueron, en orden de abundancia: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. salmonicida* y *A. allosaccharophila*. En diferentes estudios se ha reportado la formación de biopelícula por las especies de *A. hydrophila* y *A. caviae* obtenidas de muestras clínicas (Lynch *et al.*, 2002; Gavín *et al.*, 2003; Bomo *et al.*, 2004; Khajanchi *et al.*, 2009), pero, para *A. salmonicida* y *A. allosaccharophila* no se han reportado.

En México el estudio de las biopelículas producidas por *Aeromonas* spp. se inició en el año 2005, con estudios de Arteaga-Garibay quien determinó que la presencia del flagelo lateral (*laf*) en cepas de *Aeromonas* spp. contribuye al mecanismo de patogenicidad y formación de esta estructura en cepas de origen clínico. Además plantea que *Aeromonas* adopta la estructura de biopelícula como parte de su ciclo de vida en condiciones ambientales.

Mizan y colaboradores en 2015 mencionan que las *Aeromonas* son capaces de colonizar superficies bióticas como plantas, animales y superficies abióticas, especialmente sedimentos, acero, vidrio y cloruro de polivinilo. Además involucran varias estructuras y/o mecanismos, incluyendo flagelos y quimiotaxis, lipopolisacárido (LPS) y otros polisacáridos superficiales ( $\alpha$ -glucano), transportadores de  $Mg^{2+}$  y citoesqueletos que participan activamente en los primeros pasos de la formación de biofilm (Béchet y Blondeau, 2003; Bomo *et al.*, 2004).

La estructura del biofilm proporciona una cercana proximidad de célula a célula que mejora las transferencias genéticas, principalmente conjugación y transformación natural (Madsen *et al.*, 2012). Las *Aeromonas* pueden albergar la maquinaria para

el sistema de secreción de tipo IV (T4SS), lo que permite la transferencia conjugativa de elementos genéticos móviles entre bacterias. Dentro de las biopelículas, la alta densidad celular puede facilitar la conjugación entre dos *Aeromonas* o entre *Aeromonas* y otras bacteria (Rangrez *et al.*, 2006).

Se ha visto que en los elementos genéticos móviles recuperados de cepas de *Aeromonas* se transportan genes implicados en la virulencia, respuesta al estrés, resistencia a metales pesados como el mercurio y a compuestos tóxicos como el amonio cuaternario, pero los elementos más frecuentemente reportados son los genes de resistencia a los antibióticos (Piotrowska y Popowska, 2015).

De acuerdo con Esteve y colaboradores en 2015, la resistencia adquirida en *Aeromonas* tanto en cepas ambientales como clínicas, el soporte genético de estas resistencias adquiridas es transferible por transposones/integrone cromosómicos o plásmidos que llevan genes asociados con la resistencia a  $\beta$ -lactaminas, quinolonas, macrólidos, tetraciclinas, sulfonamidas y cloranfenicol (Piotrowska y Popowska, 2015). La resistencia de este grupo de antibióticos concuerda con los datos obtenidos en el presente estudio ya que se obtuvo un alto porcentaje de resistencia a algunos antibióticos en aislados que también presentaron la capacidad para formar biopelículas y presentaron de 1 a 5 genes de virulencia, por lo que es posible suponer que tuvieron un tipo de transferencia de resistencia genética. Además con el análisis de correlación se pudo confirmar que existe una correlación positiva entre la formación de biopelículas y la resistencia a antibióticos. Maravić y colaboradores (2013) mencionan que la localización de genes de resistencia en elementos genéticos móviles puede conducir a una resistencia cruzada a múltiples familias de antibióticos en *Aeromonas*, lo que es congruente con los datos obtenidos ya que se obtuvo resistencia a diferentes antibióticos.

En ambientes eutróficos donde el aporte de materia orgánica es constante como la zona de muestreo donde se realizó el presente estudio, el desarrollo de las biopelículas proporcionan un entorno ventajoso para bacterias como *Aeromonas*, ya que al haber una mayor disponibilidad de nutrientes, aumenta sus posibilidades de supervivencia y probablemente su potencial patogénico, por intercambio genético con otras especies, convirtiéndose en un problema latente de salud pública, por la presencia de *Aeromonas* portadoras de genes de virulencia, además resistentes a antibióticos y formadoras de biofilm presentes tanto en el agua de los canales, como en los vegetales que se encuentra a la venta en el mercado.

## 9. Conclusiones

- Los parámetros fisicoquímicos permiten confirmar que el área de San Gregorio Atlapulco se encuentra en un estado eutrófico lo que influye de manera importante en el aumento de la concentración de bacterias presentes en el agua.
- Se logró aislar y caracterizar genotípica y fenotípicamente 11 especies de *Aeromonas* de muestras ambientales y de alimentos (agua, suelo, lechuga de parcela y lechuga de mercado): *A. allosaccharophila*, *A. aquariorum*, *A. caviae*, *A. encheleia*, *A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. media*, *A. popoffii*, *A. salmonicida*, *A. sobria* y *A. veronii*.
- Fue posible el aislamiento de dos especies de *Aeromonas* en muestras de suelo, dicho aislamiento no había sido reportado en estudios previos, las especies aisladas fueron *A. caviae* y *A. salmonicida*. De igual forma llama la atención que los registros de *Aeromonas* provenientes de parcela son muy bajos lo que sugiere que existen factores ambientales o propios de la lechuga que impiden el desarrollo de *Aeromonas* sobre estas.
- Las especies de *Aeromonas* aisladas en este estudio muestran diferentes factores de virulencia, resistencia a antibióticos y formación de biopelículas, que les permiten ser consideradas un patógeno potencial importante al cual se le debe dar seguimiento.
- Es necesario brindarle más atención y/o reglamentar las prácticas de cosecha, traslado y venta de vegetales crudos, como la lechuga, para prevenir la contaminación con microorganismos como *Aeromonas* spp., asimismo es necesario establecer una norma para establecer límites permisibles de *Aeromonas* spp en aguas y alimentos.
- La ingesta de vegetales crudos como la lechuga así como de cualquier otro producto expedido en un mercado implica un riesgo a la salud si éste no recibe el manejo adecuado.

## 10. Referencias

- Adebayo E. A., Majolagbe O. N., Ola I. O., Ogundiran M. A. 2012. Antibiotic resistance pattern of isolated bacterial from salads. *J Res Biol*; 2:136-42.
- Al-Jassim N., Ansari M., Harb M., Hong P. 2015. Removal of bacterial contaminants and antibiotic resistance genes by conventional wastewater treatment processes in Saudi Arabia: Is the treated wastewater safe to reuse for agricultural irrigation. *Water Res.* 15: 277-290.
- Alavandi S. V., Ananthan S. 2003. Biochemical characteristics, serogroups and virulence factors of *Aeromonas* species isolated from cases of diarrhoea and domestic water samples in Chennai. *Indian J Med Microbiol*; 21 (4): 233-8.
- Altwegg M. 1999. *Aeromonas* and *Plesiomonas*, in: Murray P. R., Baron E. J., Tenover F. C., eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: ASM press. p. 507-16.
- Álvarez M., Buesa G., Castillo G., Vila E. 2008. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. *Sociedad Española de enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*. P. 6-7
- Aravena-Roman M., Inglis T. J., Henderson B., Riley T. V., Changa B. J. 2012. Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from clinical and environmental sources to 26 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 56:1110—2.
- Arce G., Ávalos M., Giusi S., Miranda G., Tuhay N. 2002. Consumo de vegetales crudos en la Ciudad de Corrientes en relación con las enfermedades transmitidas por alimentos. *Revista de Posgrado de Vía Cátedra de medicina*; 10-11.
- Arteaga Garibay R. M. 2005. El Papel del flagelo lateral en la adherencia, mecanismos de patogenicidad y formación de biofilm de *Aeromonas* spp. Tesis (Maestría) IPN ENCB. México D. F.
- Aruscavage D., Lee K., Miller S., LeJeune J. T. 2006. Interactions affecting the proliferation and control of human pathogens on edible plants. *J Food Sci* 71: R89-R99.
- Balanzario Z. J. 1982. Contaminación de los canales de Xochimilco y repercusión en las actividades económicas. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Geografía y Estadística*, UNAM, México. 284 pp.
- Baumann P., Schubert R. H. 1965. Family II. *Vibrionaceae*, En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds. Krieg N. R. y Holt G. H. 1984. p. 516-617. EEUU.
- Bashir Awan M., B., Ahmed M. M., Bari A., Krovacek K. 2006. Putative virulence factors of the *Aeromonas* spp. isolated from food and environment in Abu Dhabi, United Arab Emirates. *J Food Prot.* 69: 1713-1716.
- Beaz-Hidalgo R., Figueras M. J. 2012. Molecular detection and characterization of furunculosis and other *Aeromonas* fish infections. En: *Health and Environment in Aquaculture*. Ed. Carvalho E. Brasil. pp. 97-132.
- Beaz-Hidlgo R., Latif-Eugenín F., Hossain M. J., Berg K., Niemi R. M., Rapala J., Lyra C., Liles M. R., Figueras M. J. 2015. *Aeromonas aquatica* sp. nov.,

*Aeromonas finlandiensis* sp. nov. and *Aeromonas lacus* sp. nov. isolated from Finnish waters associated with cyanobacterial blooms. Syst Appl Microbiol. 38: 161-168.

- Béchet M., Blondeau R. 2003. Factors associated with the adherence and biofilm formation by *Aeromonas caviae* on glass surfaces. J. Appl. Microbiol. 94, 1072–1078. 10.1046/j.1365-2672.2003.01931.x
- Behera B., Bhorawal S., Mathur P., Sagar S., Singhal M., Misra M. C. 2011. Post-traumatic skin and soft tissue infection due to *Aeromonas hydrophila*. Indian J. Crit Care Med. 15: 49-51.
- Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. 2005 Don J. Brenner, Noel R. Krieg, James T. Staley. Springer. (volumen 2).
- Beuchat, L. R. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. J. Food Prot. 59, 204-2016.
- Beuchat L. R. 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. Food Safety Unit WHO.
- Beuchat L. R. 2002. Ecological Factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables Microbes. Infect 4:413-423.
- Bomo M., Storey M., Ashbolt N. 2004. Detection, integration and persistence of *Aeromonas* in water distribution pipe Biofilms J. of Water and health. 2(2):83-96.
- Brion D., Diaz R. y Alvarado R. 1996. Incidencia de *Aeromonas* en productos vegetales minimamente procesados. Memorias I Congreso Venezolano de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Caracas, Venezuela.
- Boussaid A., Baleux B., Hassani L., Lesne J. 1991. *Aeromonas* species in stabilization ponds in the arid region of Marrakesh, Morocco, and relation to fecal pollution and climatic factors. Microb Ecol. 21: 11-20.
- Borrell N., Acinas S. G., Figueras M. J., Martínez-Murcia A. J. 1997. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR amplified 16S rRNA genes. J Clin Microbiol. 35: 1671-1674.
- Bravo L., Fernández A., Ledo J., Ramirez M., Aguila A., Nuñez F., Cabrera L., Cruz Y. 2011. Caracterización fenotípica y factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* aisladas de pacientes con enfermedad diarreica en Cuba. Rev. Chil. Infect.
- Buckley J. T. 1992. The channel forming toxin aerolysin. FEMS Microbiol Immunol;5:13-7.
- Cabrera L., Castro G., Ramírez M., Llop A., Llanes R.; Castañeda N., Fernández A.; Bravo L. F. 2007. Aislamiento e identificación de especies pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Vibrio* y *Plesiomonas* procedentes de muestras extra-intestinales en Cuba. Rev. Chil. Infect. 24 (3): 204-208.
- Carnahan A. M. y Joseph S. W. 1993. Systematic assessment of geographically and clinically diverse *Aeromonas*. Syst Appl Microbiol. 16: 7284.
- Cascón A., Yugueros J., Temprano A., Sánchez M., Hernanz C., Luengo J. M. 2000. A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. Infect Immun. 68:3233-41.

- Castro-Escarpulli, Aguilera M. G., Hernández C. H., Arteaga R. I., Carmona A. A., Pérez A., Giono S. 2003. La identificación genética de *Aeromonas*, una realidad y una necesidad para la microbiología diagnóstica. *Bioquimia*; 28: 11-18.
- Castro-Escarpulli., Aguilera A., Giono S., Hernández R., Chacón M., Soler L., Ozores A., Figueras M. 2002. El género *Aeromonas* ¿Un patógeno importante en México?. *Enf Infec Microbiol*. 22: 206-216.
- Castro M. L. 1990. Evaluación de riesgos para la salud por el uso de aguas residuales en agricultura: Aspectos microbiológicos. Vol I. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS). Lima. <http://www.bvsde.paho.org/eswww/fulltext/repind53/rem/rem.html>
- Castro R. J., Cerna C. J., Méndez-Reyes E., López H. D., Gómez A. C., Estrada G. T. 2012. Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. *Int J Food Microbiol* 156: 176-180.
- Chacón M. R., Castro-Escarpulli G., Soler L., Guarro J., Figueras M. J. 2002. A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. *Diagnostic Microbiol Infec Dis*. 44: 221 – 225.
- Chacón M. R., Figueras M. J., Castro-Escarpulli G., Soler L., Guarro J. 2003. Distribution of virulence genes in clinical and environmental strains of *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek*, 84, 269-278.
- Chakravorty S., Helb D., Burday M., Connell N., Alland D. 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*. 69: 330-339.
- Chang Y. C., Wang J. Y., Selvam A., Kao S. C., Yang S. S., Shih D. Y. 2008. Multiplex PCR detection of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. from suspect food samples in northern Taiwan. *J Food Prot*. 71: 2094-2099.
- Chavant P., Gaillard-Mertinie B., Talon R., Hébraud M., Bernardi T. 2007. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Method* 68:605-612.
- Chen P. L., Ko W. C., Wu C. J. 2012. Complexity of  $\beta$ -lactamases among clinical *Aeromonas* isolates and its clinical implications. *J Microbiol Immunol*; 45:398—403.
- Chopra A. K., Houston C. W., Peterson J. W., Jin G. F. 1993. Cloning expression and sequence analysis of a cytolytic enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila*. *Can J. Microbiol*. 39: 513-523.
- Chopra A. K., Xu X. J., Ribardo D., González M., Jul K., Peterson J. M. 2000. The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages. *Infect Immun*; 5:2808-18.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. M45 3rd Ed. ISBN 1-56238-918-1
- Colston S. M., Fullmer M. S., Beka L., Lamy B., Gogarten J. P., Graf J. 2014. Bioinformatic genome comparisons for taxonomic and phylogenetic assignments using *Aeromonas* as a test case. *MBio*. 5:e02136.

- Colwell R. R., MacDonnell M. R., De Ley J. 1986. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 36: 473-477.
- Coogan N., Keener J. 2004. The role of biofilm matrix in structural development. *Math. Med. Biol.* 21:147-166.
- Costerton J. W., Cladwell D. E., Lappin-Scott H. M. 1995. Microbial biofilms. *Ann Rev Microbiol* 49: 711–745.
- Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318–1322.
- Costerton J. W. 2005. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin Orthop Rel Res* 437:7-11.
- Díaz B. C., Ronco A., Pica Y. G. 2004. Ensayo de toxicidad aguda con *Allium cepa* L. mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento promedio de raíces de cebolla. *In: Castillo M.G. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. México, pp. 47-52.*
- Dooley J. S. G., Lallier R., Shaw D. H., Trust T. J. 1985. Electrophoretic and immunochemical analyses of the lipopolysaccharides from various strains of *Aeromonas hydrophila*. *J Bacteriol*; 164:263-9.
- Dooley J. S. G., McCubbin W. D., Kay C. M., Trust T. J. 1988. Isolation and biochemical characterization of the S-layer protein from a pathogenic *Aeromonas hydrophila* strain. *J Bacteriol*; 170:2631-8.
- Donohue M. J., Smallwood A. W., Pfaller S., Rodgers M., Shoemaker J. A. 2006. The development of a matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based method for the protein fingerprinting and identification of *Aeromonas* species using whole cells. *J Microbiol Methods* 65(3):380–389.
- Donohue M. J., Best J. M., Smallwood A. W., Kostich M., Rodgers M., Shoemaker J. A. 2007. Differentiation of *Aeromonas* isolated from drinking water distribution systems using matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry. *Anal Chem.* 79: 1939-1946.
- Dwivedi M., Mishra A., Prasad A., Azim A., Singh R. K., Baronia A. K., Prasad K. N., Dwivedi U. N. 2008. *Aeromonas caviae* septicemia in immunocompetent gastrointestinal carriers. *Braz J Infect Dis.* 12: 547-548.
- Esteve C., Alcaide E., Giménez M. J. 2015. Multidrug-resistant (MDR) *Aeromonas* recovered from the metropolitan area of Valencia (Spain): diseases spectrum and prevalence in the environment. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* 34, 137–145. 10.1007/s10096-014-2210-z.
- Farmer J. J., Arduino, M. J., Hickman-Brenner F. W. 2006. The Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. *En: The Prokaryotes, a handbook on the biology of Bacteria.* Ed. Dworkin M. Springer Science Business Media, LLC. EEUU. pp. 564-596.
- Fernández E., Peña C., 2012. Riesgos microbianos en la producción de alimentos frescos en áreas urbanas y periurbanas de América Latina. 1º edición. CINVESTAV. 361pp.
- Figueras M. J., Soler L., Chacón M. R., Guarro J., Martínez-Murcia A. J. 2000. Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP. *Analysis Int J Syst Evol Microbiol.* 50: 2069-2073.

- Figueras M. J. 2005. Clinical relevance of *Aeromonas*. Rev Med Microbiol. 16: 145-153.
- Figueras M. J., Borrego J. J. 2010. New perspectives in monitoring drinking water microbial quality. J Environ Res Public Health. 7: 4179-4202.
- Figueras M. J., Beaz-Hidalgo R., Collado L., Martínez-Murcia A. J. 2011. Recommendations for a new bacterial species description based on analyses of the unrelated genera *Aeromonas* and *Arcobacter*. The Bulletin of Bergey's International Society for Microbial Systematics. 2, part 1, 1-16.
- Figueras M. J., Beaz-Hidalgo, R., 2014. *Aeromonas*: Introduction. In: Batt, C.A., Tortorello, M.L. (Eds.), Encyclopedia of Food Microbiology, vol 1. Elsevier Ltd, Academic Press, pp. 24–30. ISBN: 9780123847300
- Figueras M. J., Beaz-Hidalgo R. 2015. *Aeromonas* infections in humans. En: *Aeromonas*. Ed. Graf J. Caister Academic Press. EEUU. p. 65-108.
- Franz E., Tromp S. O., Rijgersberg, Van Der Fels-Klerx H. J. 2010. Quantitative microbial risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in leafy green vegetables consumed at salad bars. J Food Protec 73: 274-285.
- Galindo C. L., Chopra A. K., *Aeromonas* and *Plesiomonas* species. 2013. En: Doyle MP Beuch L. R., editores. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. Washington, DC. ASM Press: p 1-56.
- García P. 2013. Detección de factores putativos de virulencia en especies de *Aeromonas* aisladas del agua y de la piel del ajolote (*Ambystoma mexicanum*) en la zona lacustre de Xochimilco, México. Tesis de grado: Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Geología. México, D.F. 100pp.
- Gavín, R., Merino, S., Altarriba, M., Canals, R., Shaw, J. G., Tomás, J. M. 2003. Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. FEMS Microbiology Letters, 224: 77–83. doi:10.1016/S0378-1097(03)00418-X
- Guerra I., Fadanelli R., Figueiro M., Schreiner F., Delamare A., Wollheim C., Costa S., Echeverrigaray S. 2007. *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south Brazil: Prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. In Brazilian Journal of Microbiology. ISSN 1517-8382. 38: 638-643.
- Giono C. S. 1994. Agentes bacterianos de infecciones gastrointestinales, en Giono CS, Escobar G. A. y Valdespino G. J. Eds. Diagnostico de laboratorio de infecciones Gastrointestinales. México D.F.: Secretaria de Salud: 175-9.
- Ginestre M., Rincón G., Romero S., Harris B., Castellano M., Colina G. 2005. Especies de *Aeromonas* en vegetales frescos que se expenden en un mercado popular de Maracaibo. Rev. Soc. Ven Microbiol. 25: 229-235.
- Gobat P., Jemmi T. 1995. Comparison of seven selective media for the isolation of mesophilic *Aeromonas* species in fish and meat. Int J Food Microbiol; 24:375-84.
- Goñi-Urriza M., Capdepuy M., Arpin C., Raymond N., Caumette P. 2000. Impact of the urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. Appl. Environ. Microbiol. 66: 125-32.

- Goñi-Urriza M., Pineau L., Capdepuy M., Roques C., Caumette P., Quentin C. 2000. Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from two European rivers. *J. Antimicrob. Chemother*, 46L, 297-301.
- Hassani L., Imzilin B., Boussaid A., Gauthier M. J. 1992. Seasonal incidence of antibiotic resistance among *Aeromonas* species isolated from domestic wastewater before and after treatment in stabilization ponds. *Microb Ecol*. 23: 227-237.
- Hernández C., Aguilera A., Castro E., 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México, *ENF INF Microbiol*. 31 (4): 137-151.
- Hiransuthikul N., Tantisiriwat W., Lertutsahakul K., Vibhagool A., Boonma P. 2005. Skin and soft tissue infections among tsunami survivors in Southern Thailand. *Clin Infect Dis*. 41: 93-96.
- Ho Asy, Mietzner T. A., Smith, A. J., Schoolnik, G. K. 1990. The pili of *Aeromonas hydrophila* Identification of an environmentally regulated mini pilin. *Journal of Experimental Medicine*, 172(3), 795–806.
- Ho Asy, Sohel I., Schoolnik G., K. 1992. Cloning and characterization of *fxp*, the flexible pilin gene of *Aeromonas hydrophila*. *Mol Microbiol*; 6:2725-32.
- Hoiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Rolin S., Ciofu O. 2010 Antibiotic resistance of bacterial biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35: 322-332.
- Howard S. P., Garland W. J., Green M. J., Buckley J. T. 1987. Nucleotide sequence of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. *J Bacteriol*; 169:2869-71.
- Igbiosa I. H., Igumbor E. U., Aghdasi F., Tom M., Okoh A. I. 2012. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *Scientific World Journal*: 625023.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2008. Sistema para la Consulta del Cuaderno Estadístico Delegacional de Xochimilco. <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/cem08/estatal/df/m013/default.htm>
- Islam M., Morgan J., Doyle M. P., Phatak S. C., Millner P., Jiang X. 2004. Persistence of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* on lettuce and parsley and in soils on which they were grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Foodborne Pathog Dis* 1: 27-35.
- Jáuregui O. E. 1995. Algunas alteraciones de largo período del clima de la Ciudad de México debidas a la urbanización: Revisión y perspectivas. *Investigaciones geográficas*, (31), 09-44. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-46111995000200001&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-46111995000200001&lng=es&tlng=es)
- Jáuregui O. E. 2000. El Clima de la Ciudad de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geografía. Editorial Plaza y Valdés, S. A. de C. V. ISBN: 968-856-819-8.
- Janda J. M. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. 2001. En Sussman M. Editores. *Molecular medical microbiology*. Washington DC. American Society for Microbiology: P1237-1270.
- Janda J. M., Abbott S. 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev*. 23: 35-73.

- Jeanteur D., Gletsu N., Pattus F., Buckley J. T. Purification of *Aeromonas hydrophila* major outer-membrane proteins: N-terminal sequence analysis and channel-forming properties. *Mol Microbiol* 1992; 6:3355-63.
- Joseph S. W., Carnahan A., M. 2000. Update on the genus *Aeromonas*, *ASM News*; 66: 218-232.
- Kampfer P., Christmann C., Swing J., Huys G. 1999. *In vitro* susceptibilities of *Aeromonas* genomic species to 69 antimicrobial agents. *Syst. Appl. Microbiol.*, 22, 662-669.
- Khajanchi B. K., Sha J., Kozlova E. V., Erova T. E., Suarez G., Sierra J. C., Chopra A. K. 2009. *N*-Acylhomoserine lactones involved in quorum sensing control the type VI secretion system, biofilm formation, protease production, and *in vivo* virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Microbiology*, 155 (Pt 11), 3518–3531.  
<http://doi.org/10.1099/mic.0.031575-0>
- Kirov S. M. 1993. The public health significance of *Aeromonas* spp. in foods. A review. *Int J Food Microbiol.* 20, 179-198.
- Kirov S. M., Jacobs I., Hayward L. J., Hapin R. H. 1995. Electron microscopic examination of factors influencing the expression of filamentous surface structures on clinical and environmental isolates of *Aeromonas veronii* Biotype *sobria*. *Microbiol. Immunol.* 39:329-338.
- Kirov S. M., Hayward L. J., Nerrie M. A. 1995. Adhesion of *Aeromonas* spp. to cell lines used as models for intestinal adhesion. *Epidemiology and Infection*, 115, 465–473.
- Kirov S. M. 1997. *Aeromonas* and *Plesiomonas* species. En Doyle M. P., Beuchat L. T., Montville T. J. (ed): *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington D.C., pp. 265-287.
- Kirov S. M., Tassell B. C., Semmler A. B., O'Donovan L. A., Rabaan A. A., Shaw J. G. 2002. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. *J. Bacteriol.* 184: 547-555.
- Ko W. C., Yu K. W., Liu C. Y., Huang C. T., Leu H. S., Chuang Y. C. 1996. Increasing antibiotic resistance in clinical isolates of *Aeromonas* strains in Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:1260–1262.
- Kokka R. P., Velki A. M., Clark R. B., Bottone E. J., Janda J. 1992. Immune response to S layer-positive O:11 *Aeromonas* associated with intestinal and extraintestinal infections. *Immunol Infect Dis*; 2:111-4.
- Lynch M. J., Swift S., Kirke D. F., Keevil C. W., Dodd C. E. R., Williams P. 2002. The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environmental Microbiology*, 4: 18–28.
- López L. V., Romero J., Duarte F. 2003. Calidad microbiológica y efecto del lavado y desinfección en vegetales pretrozados expendidos en Chile. *Arch Latinoam Nutr* 53: 383-388.
- López R., Murillo L., Martínez R., Chávez H. 2015. Alternativas viables para la provisión de servicios básicos en áreas periurbanas: Lecciones desde Xochimilco. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. ISBN 978-607-9358-32-6. 226 pp.

- Madsen J. S., Burmolle M., Hansen L. H., Sorensen S. J. 2012. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 65, 183–195.
- Maravić A., Skočibušić M., Šamanić I., Fredotović Ž., Cvjetan S., Jutronić M., 2013. *Aeromonas* spp. simultaneously harbouring blaCTX-M-15, blaSHV-12, blaPER-1 and blaFOX-2, in wild-growing Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from Adriatic Sea, Croatia. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 301–308.
- Marchandin H., Godreuil S., Darbas H., Jean-Pierre H., Jumas-Bilak E., Chanal C., Bonnet R. 2003. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase TEM-24 in an *Aeromonas* clinical strain: acquisition from the prevalent *Enterobacter aerogenes* clone in France. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47, 3994-3995.
- Marchandin H., Teyssier C., Simeon de Buochberg M., Jeanpierre H., Carriere C., Jumasbilak E. 2003. Intrachromosomal heterogeneity between the four 16S rRNA gene copies in the genus *Veillonella*: implications for phylogeny and taxonomy. *Microbiology.* 149: 1493-1501.
- Mancilla R. J. V., 2015. Estudio de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) como reservorio de *Aeromonas* potencialmente patógenas, en los canales de Xochimilco, D.F., México. Tesis Para obtener el grado de licenciada en Biología
- Manefield M., Turner S. 2002. Quorum sensing in context: out of molecular biology and into microbial ecology. *Microbiol.* 148:3762–3764.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2000. *Brock Biology of Microorganisms*, 9th ed.; Prentice Hall: Upper Saddle River, NJ, USA,
- Martínez-Murcia A. J., Benlloch S., Collins M. D. 1992. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int J Syst Bacteriol.* 42: 412-421.
- Martínez M. J., Simon-Pujol D., Congregado F. 1995. The presence of capsular polysaccharide in mesophilic *Aeromonas hydrophila* serotypes O:11 and O:34. *FEMS Microbiol Lett*;128:69-73.
- Massa S., Armuzzi R., Tosques M., Canganella F., Trovatelli L. D. 1999. Susceptibility to chlorine of *Aeromonas hydrophila* strains. *Lett Appl Microbiol*; 86:169-73.
- Matthews K. R., 2006. Los microorganismos asociados a las frutas y las verduras. En: *Microbiología de las frutas y las verduras frescas*. Matthews, K. R. (ed.). Acribia S. A., Zaragoza, España. p. 2-9.
- McClure P. J., Cole M. B., Davies K. W. 1994. An example of the stages in the development of a predictive mathematical model for microbial growth: the effects of NaCl, pH and temperature on the growth of *Aeromonas hydrophila*. *Int J Food Microbiol*; 23:359-75.
- McMahan M. A., Wilson I. G., 2001. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 22, 155–162.
- Merino S., Aguilar A., Noguerras M. M., Regue M., Swift S., Tomás J. M. 1999. Cloning, sequencing and role in virulence of two phospholipases (A1 and C)

- from mesophilic *Aeromonas* spp. Serogroup O:34. *Infect Immun.* 67:4008-4013.
- Merino S., Albertí S., Tomás J. M. 1994. *Aeromonas salmonicida* resistance to complement mediated killing. *Infect Immun.* 62: 5483-5490.
  - Merino S., Rubires X., Knóchel S., Tomás J. M. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. *Int J Food Microbiol* 1995; 28: 157-168.
  - Merino S., Shaw J. G., Tomás J. M. 2006. Bacterial lateral flagella: and inducible flagella system. *FEMS Microb. Lett.* 263: 127-135.
  - Merck H., Berkow R., Andrew H. 1997. Manual Merck de información para el hogar. Segunda edición. Océano Grupo Editorial S.A., Barcelona-España. 2350 pp.
  - Mizan M. F., Jahid I. K., Ha S. D. 2015. Microbial biofilms in seafood: a food hygiene challenge. *Food Microbiol.* 49, 41–55. 10.1016/j.fm.2015.01.009
  - Monds R. y O'Toole G. 2009. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiol.* 17: 73-87.
  - Monge R., Arias E., Utzinger D. 2000. Presence of *Aeromonas* and *Plesiomonas shigelloides* in fresh vegetables. *Rev. Biomed.;* 9 (3). 176-180.
  - Morandi A., Zhaxybayeva O., Gogarten P., Graf J. 2005. Evolutionary and diagnostic implications of intragenomic heterogeneity in the 16S rRNA gene in *Aeromonas* strains. *J Bacteriol;* 187: 6561-4.
  - Muñoz D., Castañeda D., Graü D., Marval H. 2012. Prevalencia y susceptibilidad a antibióticos de cepas motiles de *Aeromonas* aisladas del ostión de mangle (*Crassostrea rhizophorae*), *Revista Científica* Vol. XXII, N°6. Instituto nacional de Ciencias agrícolas- INIA/Sucre-Nueva Esparta, Venezuela.
  - Nagar V., Shashidhar R., Bandekar J. R. 2011. Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of *Aeromonas* strains from various retail food products in Mumbai, India. *J Food Sci.* 76: 486-492.
  - Nagar V., Shashidhar R., Bandekar J. R. 2013. Characterization of *Aeromonas* strains isolated from Indian foods using *rpoD* gene sequencing and whole cell protein analysis. *World J Microbiol Biotechnol.* 29: 745-752.
  - Neyts K., Huys G., Uyttendaele M., Swings J., Debevere J., 2000. Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. From retail foods. *Lett. Appl. Microbiol.* 31, 359–363.
  - Notederdaeme L., Bigawa S., Steigerwalt A. G., Brenner D. J., Ollevier F. 1996. Numerical taxonomy and biochemical identification of fish associated motile *Aeromonas* spp. *Syst Appl Microbiol;* 19: 624-33.
  - Oliveira M., Viñas I., Usall J., Anguera M., Abadias M. 2012. Presence and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. *Int J Food Microbiol* 156: 133-140.
  - Otoole G. A. y Kolter R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30: 295-304
  - Palú A. P., Gomes L. M., Miguel M. A. L., Balassiano I. T., Queiroz M. L. P., Freitas-Almeida A. C., de Oliveira, S. S. 2006. Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. *Food microbiology*, 23(5), 504-509.

- Paniagua G. L., Monroy E., García-González O., Alonso J., Negrete E., Vaca S. 2007. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. *Annals Clin Microbiol and Antimicrobials*; 6: 1-8.
- Pavan M. E., Abbot S. L., Zorzopulos J., Janda J. M. 2000. *Aeromonas salmonicida* subs. *pectinolytica* subs. nov., a new pectinasepositive subspecies isolated from a heavily polluted river. *Int J Syst Evol Microbiol*; 3:1119-24.
- Pedroso M. N., Laria S. T., Cequeiracampos M. L., Heidtmann S., Rall V. L. M., Pimenta F., Saad S. M. I., 1997. Virulence factors in motile *Aeromonas* spp. isolated from vegetables. *Rev. Microbiol.* 28 (1). 49-54.
- Pemberton J. M., Kidd S.P., Schmidt R. 1997. Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiol. Lett.* 152: 1-10.
- Pepe C. M., Eklund M. W., Strom M. S. 1996. Cloning of an *Aeromonas hydrophila* type IV pilus biogenesis gene cluster: complementation of pilus assembly functions and characterization of a type IV leader peptidase/N-methyltransferase required for extracellular protein secretion. *Mol Microbio*;19: 8578-91.
- Pettibone G. W. 1998. Population dynamics of *Aeromonas* spp. in an urban river watershed. *J Appl Microbiol*; 85:723-30.
- Pianetti A., Sabatini L., Bruscolini F., Chiaverini F., Cecchetti G. 2004. Faecal contamination indicators, *Salmonella*, *Vibrio* and *Aeromonas* in water used for irrigation of agricultural products. *Epidemiol Infect.* 132: 231-238.
- Piotrowska M., Popowska M. 2015. Insight into the mobilome of *Aeromonas* strains. *Front. Microbiol.* 6: 494.
- Pivarnik L. F., Donath H., Patnoad M. S., Roheim C. 2005. New England consumers' willingness to pay for fresh fruits and vegetables grown on CAP certified farms. *Food Protect Trends* 25: 256-266.
- Presley S. M., Rainwater T. R., Austin G. P., Platt S. G., Zak J. C., Cobb G. P., Marsland E. J., Tian K., Zhang B., Anderson T. A. 2006. Assessment of pathogens and toxicants in New Orleans, LA following Hurricane Katrina. *Environ Sci Technol.* 40: 468-474.
- Prigent-Combaret C., Lejeune P. 1999. Monitoring gene expression in biofilms. *Meth Enzymol* 310: 56-79.
- Proft T. and Baker E. N. 2009. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria—structure, assembly and their role in disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 66, no. 4, pp. 613–635.
- Quiroz F., Miranda A., Lot H. 2008. Estudio comparativo de algunas variables fisicoquímicas del agua en canales secundarios de Xochimilco con y sin *Eichhornia crassipes* (Martius) solms-laubach. *Polibotánica*, núm. 25, junio, 2008, pp. 127-133 Departamento de Botánica Distrito Federal, México
- Ramsar, Los sitios Ramsar 2014. <http://www.ramsar.org/es/sitios-paises/los-sitios-ramsar>
- Rangrez A. Y., Dayananda K. M., Atanur S., Joshi R., Patole M. S., Shouche Y. S. 2006. Detection of conjugation related type four secretion machinery in *Aeromonas culicicola*. *PLoS ONE* 1:e115. 10.1371/journal.pone.0000115

- Rebollo B., Escamilla A. E. 1984. Aislamiento e identificación de *Aeromonas* spp. y *Plesiomonas shigelloides* como causa de diarrea en humanos. INNSZ. Memorias Congreso Nacional Mexicano. Veracruz.
- Reeves P. R., Hobbs M., Valvano M. A., Skurnik M., Whitfield C., Coplin D., Kido N., Klena J., Maskell D., Raetz C. R., Rick P. D. 1996. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol.* 4: 495-503
- Rodríguez L. A., Ellis A. E., Nieto T. P. 1992. Purification and characterization of an extracellular metalloprotease, serine protease and haemolysin of *Aeromonas hydrophila* strain B32: all are lethal for fish. *Microb Pathog*; 13:17-24.
- Romero H. 2002. Síndrome diarreico infeccioso. Primera edición. Editorial Medica Panamericana. México D.F. 682pp.
- Saavedra M. J., Guedes-Novais S., Alves A., Rema P., Tacão M., Correia A., Martínez-Murcia A. 2004. Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *International Microbiology*, 7 (3), p. 207-211.
- Secretaría del Medio Ambiente del Gobierno del Distrito Federal. Libros Blancos "Xochimilco". 2012, México. 74 pp.
- Secretaría de Obras y Servicios 2001. Plan de Acciones Hidráulicas 2001-2005 Delegación Xochimilco, archivo magnético.
- Sivapalasingam S., Friedman C. R., Cohen L., Tauxe R. V. 2004. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J Food Protect* 67: 2342-2353.
- Stainer R. Y. 1943. A note on the taxonomy of *Proteus hydrophilus*. *J Bacteriol.* 46: 213--214.
- Steele M., Mahdi A., Odumeru J. 2005. Microbial assessment of irrigation water used for production of fruit and vegetables in Ontario, Canada. *J Food Prot* 68: 1388-1392.
- Steele M., Odumeru J. 2004. Irrigation water as source of foodborne pathogens on fruit and vegetables. *J Food Prot* 67: 2839-2849.
- Stepanović S., Vuković D., Dakić I., Savić B., Švabić-Vlahović M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. microbiological methods*, 40(2), 175-179.
- Stoker H. S., Seager S. L. 1981. Química ambiental. Contaminación del aire y del agua. Ed. Blume. Barcelona.
- Swartz M. Enfermedades infecciosas. Tomo I. Cuarta edición. Editorial Benett. Argentina. 1998; Cap. 72:1010-1032.
- Taga M., Bassler B. 2003. Chemical communication among bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:14549–14554.
- Tena D., González P. A., Gimeno C., Pérez P. M., Bisquert J. 2007. infección extraintestinal por *Aeromonas* spp: Revisión de 38 casos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 25: 235-241.
- Thomas L. V., Gross R. J., Cheasty T., Rowe B. 1990. Extended serogrouping scheme for motile, mesophilic *Aeromonas* species *J. Clin. Microbiol.* 28: 980-984.

- Tomás J. M. 2012. The Main *Aeromonas* Pathogenic Factors, ISRN Microbiology, Article ID 256261, 22 pp. doi:10.5402/2012/256261
- Vila J., Marco F., Soler M., Chacón M. Figueras M. J. 2002. *In vitro* antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, and *Aeromonas veronii* biotype *sobria*. J. Antimicrob. Chemoth., 49, 701-702.
- Vila J., Ruiz J., Gallardo J., Vargas M., Soler L., Figueras M. J., Gascón J. 2003. *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: Clinical features and antimicrobial resistance. Emerg. Infect. Dis., 9, 552-555.
- Villari P., Crispino M., Montuori P., Stanzione S. 2000. Prevalence and molecular characterization of *Aeromonas* spp. in ready-to-eat foods in Italy J. Food Prot. 63, 1754-1757.
- Vipond R., Bricknell I. R., Durant E., Bowden T. J., Ellis A. E., Smith M. 1998. Defined deletion mutants demonstrate that the major secreted toxins are not essential for the virulence of *Aeromonas salmonicida*. Infect Immun; 66:1990-8.
- Watnick P., and Kolter R. 2000. Biofilm, city of microbes. J Bacteriol 182: 2675-2679.
- Williams P., and Stewart G.S.A.B. 1994. Cell density dependent control of gene expression in bacteria implications for biofilm development and control. In: Bacterial Biofilms and Their Control in Medicine and Industry. Wimpenny, J., Nichols, W., Stickler, D., and Lappin-Scott, H. (eds). Cardiff: Bioline, p. 9-12.
- Wen-Chien K., Hsiu-Mei W., Tsung-Chain C., Jing-Jou Y., Jiunn-Jong W. 1998. Inducible  $\beta$ -Lactam resistance in *Aeromonas hydrophila*: therapeutic challenge for antimicrobial therapy. J. Clin. Microbiol. 36 (11): 3188-92.
- Woese C. R. 1987. Bacterial evolution. Microbiol Rev. 51: 221-271.
- Xolalpa F. 2009. Monitoreo quincenal de clorofila y parámetros fisicoquímicos en tres localidades de los canales de Xochimilco (El Bordo, La Virgen, y el Japón) Periodo 11 de agosto al 3 de noviembre 2008. Tesis de grado: Licenciatura en Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, México, CDMX. 66 pp.
- Yu H. B., Zhang Y. L., Lau Y. L., Yao F., Vilches S., Merino S., Tomás J. M., Howard S. P., Leung K. Y. 2005. Identification and Characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91. Appl. Environ. Microbiol. 71: 4469-77.
- Zambrano L., Contreras V., Mazari-Hiriart M., Zarco A. A. 2009. Spatial heterogeneity of water quality in a highly degraded tropical freshwater ecosystem. En Environmental management, 43 (2), p. 249-263
- Zaragoza A., Landázuri B., Vega P., 2016. Disturbio antropogénico como consecuencia del crecimiento urbano. El caso de la zona lacustre y de montaña en la delegación Xochimilco, México. En Sociedad y Ambiente, núm. 11 ISSN: 2007-6576, 42-67.