



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y
DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.**

**DIVERSIDAD AMBIENTAL DE CEPAS DE
SALMONELLA SPP. AISLADAS DE LA LAGUNA
DE ZAPOTLÁN, JALISCO**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO
ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIA Y
TECNOLOGÍA EN LA ESPECIALIDAD
DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

PRESENTA

IBT. OSIRIS DÍAZ TORRES

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR: Dra. OFELIA YADIRA LUGO MELCHOR

CO-DIRECTOR: Dr. JOSÉ DE ANDA SÁNCHEZ



GUADALAJARA, JAL. A 04 SEPTIEMBRE DE 2017



ACTA DE EXAMEN DE GRADO

En la ciudad de Guadalajara, a los 4 días del mes de Septiembre del año 2017, siendo las 10:00 hrs., se reunieron en el Aula 2 del Edificio de Posgrado del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ). Los señores integrantes del Jurado de Examen de Grado constituido por:

Presidente: Dr. Jacobo Rodríguez Campos

Secretario: Dr. Oscar Aguilar Juárez

Vocal: Dra. Ofelia Yadira Lugo Melchor

y de acuerdo con las disposiciones del Reglamento vigente se procedió a llevar a cabo el Examen de Grado a la C. **Osiris Díaz Torres** egresada del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), candidata a Maestra en Ciencia y Tecnología en la especialidad de Ingeniería Ambiental. Tomando en cuenta los señores del Jurado de Examen de Grado los resultados de la Tesis del Proyecto de Investigación: "**Diversidad ambiental de cepas de Salmonella spp. aisladas de la laguna de Zapotlán, Jalisco**" dictaminaron que fuera aprobada por unanimidad. El Presidente del Jurado le hizo saber a la sustentante el resultado obtenido, dándose por terminado el Examen de Grado a las 11:30 horas del día señalado. Se asentó la presente en el libro de actas para exámenes de grado número VI a las 185 y 186 fojas, autorizado por la Coordinación del Posgrado Interinstitucional en Ciencia y Tecnología con fecha 4 de Septiembre y una vez escrita, leída y aprobada la firmaron para dar constancia las personas que en el acto intervinieron.


Dr. Oscar Aguilar Juárez
Secretario


Dr. Jacobo Rodríguez Campos
Presidente


Dra. Ofelia Yadira Lugo Melchor
Vocal



Dedicatoria

A mi familia, por estar presente aún en la distancia y siempre creer en mí:

A mis papás, Icelá y Manuel. Una parte fuerte de mí, que con sus consejos y ejemplo he sabido convertirme en una persona fuerte y perseverante y gracias a su amor y apoyo incondicional he podido seguir adelante y llegar a donde me encuentro ahora.

A mi hermana, Oryza, un gran ser humano, uno que ha sabido brindarme su apoyo con su carisma y amor, logrando sacar sonrisas en mí.

Este trabajo es también de ustedes, porque fomentaron en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida. Por esto, hoy puedo ver alcanzada mi meta.

Agradecimientos

Agradezco con mucho cariño a mi director de tesis, la Dra. Ofelia Yadira Lugo Melchor, por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la realización de este trabajo. Gracias por su paciencia, dedicación, motivación, criterio y aliento. Hizo fácil lo difícil. Ha sido un privilegio poder contar con su guía y ayuda.

A mi co-director, el Dr. José de Anda Sánchez, por su apoyo académico y técnico, por sus valiosas sugerencias y sus acertados aportes al desarrollo de la presente tesis y por brindarme su amistad.

Al M.C. Ricardo García de Alba, por su apoyo técnico en todos los muestreos de este estudio y por otorgarme su amistad.

Al Dr. Gustavo Dávila Vázquez por todo su apoyo académico y técnico, gracias por todo el tiempo dedicado, siempre lo recordaré Q.D.E.P.

A la Dra. Bianca Anabel Amézquita, por su apoyo y capacitación en los análisis de perfiles genéticos.

A los miembros del comité evaluador, a la Dra. Mitzi Estrada Acosta y el Dr. Jesús Cervantes Martínez, por su tiempo, sus comentarios y sus valiosas observaciones para el enriquecimiento de esta tesis.

Al M.C. Edgar Fausto Bon Haro, Q.F.B. Martha Rentería Ledezma, Q.F.B. Daniel Chavana Naranjo y al Licenciado en Nutrición Ángel de León Márquez Luna, por su apoyo en el trabajo de laboratorio y por brindarme su amistad.

A mi novio Yamani Murillo, por ser alguien muy especial en mi vida y por demostrarme que en todo momento cuento con él.

A la IBT. Deyadira Berenice G3zman Oth3n, mi compa1era de maestr3a y mejor amiga, gracias por su apoyo en todas las 1reas de mi vida y por su amistad incondicional.

A la T.Q. I. Jeaneth Vela y la I.Q. Eva Orozco por ser mi familia en CIATEJ.

A todas las personas que han contribuido a la elaboraci3n del presente trabajo en las diferentes etapas del mismo; la lista ser3a muy larga y muy probablemente se me escapar3a m1s de alguno. A todas ellas quiero expresar mi m1s sincero agradecimiento.

Finalmente me gustar3a agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnolog3a por la beca otorgada a un servidor para la realizaci3n de sus estudios de posgrado y por los fondos otorgados para el desarrollo de este trabajo, y al Centro de Investigaci3n y Asistencia en Tecnolog3a y Dise1o del Estado de Jalisco por todo el apoyo proporcionado tanto en recursos humanos como materiales.

Índice de contenido

	Página
Índice de Tablas	ix
Índice de Figuras	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN	xvii
1 ANTECEDENTES	20
1.1 Generalidades de la laguna de Zapotlán	21
1.2 Hidrología de la laguna de Zapotlán	22
1.3 Valores hidrológicos.....	23
1.4 Impacto ambiental de una mala gestión del agua.....	24
1.5 Contaminación microbiológica del agua	24
1.6 Contaminación del agua superficial	24
1.7 <i>Salmonella</i> spp.....	27
1.8 Epidemiología.....	28
1.9 Patogénesis	29
1.10 <i>Salmonella</i> y el medio ambiente.....	30
1.11 Caracterización del microorganismo	32
1.12 Caracterización fenotípica	32
1.13 Caracterización genotípica.....	36
2 JUSTIFICACIÓN	39
3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	40
3.1 Hipótesis	40
3.2 Objetivo general	40
3.3 Objetivos específicos.....	40
4 METODOLOGÍA	41
4.1 Descripción de la zona de estudio	41
4.2 Selección de los sitios hidrométricos	42

4.3	Periodo de estudio	43
4.4	Análisis de factores fisicoquímicos	44
4.5	Registro de parámetros ambientales	44
4.6	Toma de muestra	45
4.7	Aislamientos de <i>Salmonella</i> spp.....	45
4.8	Purificación.....	46
4.9	Confirmación por PCR	46
4.10	Lisis celular	46
4.11	Condiciones para PCR.....	47
4.12	Electroforesis en gel de agarosa	47
4.13	Preservación bacteriana	48
4.14	Serotipificación.....	48
4.15	Perfil de resistencia a antimicrobianos	49
4.16	Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE).....	50
4.17	Análisis estadísticos.....	51
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
5.1	Parámetros ambientales	52
5.2	Parámetros fisicoquímicos.....	55
5.3	Presencia de <i>Salmonella</i> spp. en la laguna de Zapotlán	63
5.4	Relación entre <i>Salmonella</i> spp. y parámetros ambientales	64
5.5	Relación entre <i>Salmonella</i> spp. y parámetros fisicoquímicos	65
5.6	Distribución de la profundidad con la presencia de <i>Salmonella</i> spp.....	66
5.7	Análisis estadísticos.....	67
5.8	Serotipificación de <i>Salmonella</i> spp. aislada de la laguna de Zapotlán.....	68
5.9	Perfil antimicrobiano de los serotipos de <i>Salmonella</i> spp.....	70
5.10	Perfil genético de los serotipos de <i>Salmonella</i> spp	72
6	CONCLUSIONES	78
7	BIBLIOGRAFIA	79
8	ANEXOS	97
8.1	Anexo 1. Preparación de soluciones.....	97

8.2	Anexo 2. Preparación gel de agarosa	99
8.3	Anexo 3. Preparación de medios	100

Índice de tablas

Página

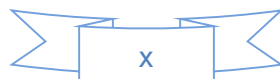
Tabla 1. Uso del agua extraída de la laguna de Zapotlán	22
Tabla 2. Técnicas de caracterización fenotípica y genotípica.....	32
Tabla 3. Serogrupos importantes en enfermedades causadas por <i>Salmonella</i>	34
Tabla 4. Coordenadas y profundidades de los sitios hidrométricos.....	42
Tabla 5. Fechas de muestreo.....	44
Tabla 6. Componentes de la mezcla maestra para PCR.....	47
Tabla 7. Descripción de antibióticos usados para susceptibilidad antimicrobiana.....	49
Tabla 8. Valores de los parámetros ambientales registrados durante el estudio.....	53
Tabla 9. ANOVA de una vía de los valores de precipitación ambiental registrados durante el periodo de estudio.....	54
Tabla 10. ANOVA de una vía de los valores del % de humedad relativa registrados durante el periodo de estudio.....	55
Tabla 11. ANOVA de una vía de los valores de temperatura de la laguna de Zapotlán registrados durante el periodo de estudio.....	56
Tabla 12. ANOVA de una vía de los valores de oxígeno disuelto de la laguna de Zapotlán registrados durante el periodo de estudio.....	58
Tabla 13. Calidad del agua en función del % de saturación de oxígeno en cuerpos acuáticos.....	58
Tabla 14. ANOVA de una vía de los valores de conductividad eléctrica de la laguna de Zapotlán registrados durante el periodo de estudio.....	59
Tabla 15. ANOVA de una vía de los valores de turbidez de la laguna de Zapotlán registrados durante el periodo de estudio.....	61
Tabla 16. ANOVA de una vía de los valores de pH de la laguna de Zapotlán registrados	

durante el periodo de estudio.....62

Tabla 17. Presencia de *Salmonella* spp. en la zona de estudio por sitio de muestreo.....63

Tabla 18. Presencia de *Salmonella* spp. por fecha de muestreo.....65

Tabla 19. Presencia de *Salmonella* spp. a diferentes profundidades.....66



Índice de figuras

	Página
Figura 1. Fotografía de la laguna de Zapotlán, Volcán de Fuego y el Nevado de Colima.....	20
Figura 2. Localización geográfica del lago de Chapala y de la laguna de Zapotlán	21
Figura 3. Delimitación de la cuenca de Zapotlán.....	41
Figura 4. Área de estudios en la laguna de Zapotlán.....	43
Figura 5. Representación gráfica del promedio de temperatura de la laguna de Zapotlán durante el periodo de estudio.....	52
Figura 6. Representación del los valores totales mensuales de la precipitación ambiental registrados durante el periodo de estudio.....	53
Figura 7. Representación gráfica del promedio de % de humedad relativa registrados durante el periodo de estudio.....	54
Figura 8. Representación gráfica del promedio de la temperatura de la laguna de Zapotlán durante el periodo de estudio.....	56
Figura 9. Representación gráfica del promedio de oxígeno disuelto de la laguna de Zapotlán registrados durante el periodo de estudio.....	57
Figura 10. Representación gráfica del promedio de conductividad eléctrica de la laguna de Zapotlán registrados durante el periodo de estudio.....	59
Figura 11. Representación gráfica del promedio de turbidez de la laguna de Zapotlán registrados durante el periodo de estudio.....	60
Figura 12. Representación gráfica del promedio de potencial de hidrógeno de la laguna de Zapotlán registrados durante el periodo de estudio.....	61
Figura 13. Análisis de componentes principales (ACP).....	68
Figura 14. Resistencia de <i>Salmonella</i> spp. a diferentes antimicrobianos.....	70

Figura 15. Perfiles de resistencia antimicrobiana de los serotipos de <i>Salmonella</i> aislados del agua de la laguna de Zapotlán.....	72
Figura 16. Dendograma de <i>Salmonella</i> Agona.....	73
Figura 17. Dendograma del Serogrupo B.....	74
Figura 18. Dendograma de comparación de <i>S. Typhimurium</i> y Weltevreden con una cepa de cada perfil representativo de <i>S. Agona</i> y del serogrupo B.....	75

RESUMEN

Los humedales han estado estrechamente ligados a la incidencia de patógenos como *Salmonella* spp. debido a la contaminación frecuente de acuíferos por aguas residuales que acarrear heces de personas y/o animales infectados. La presencia y prevalencia de patógenos, como es el caso de *Salmonella* spp. es un riesgo permanente para la contaminación de alimentos, además repercute en problemas de salud de las personas, lo cual se ve reflejado en una alta incidencia de brotes diarreicos e intoxicaciones, debido al uso del agua en operaciones agrícolas y de uso y consumo humano. La Comisión Estatal del Agua reportó en el 2012 que la laguna de Zapotlán recibe cada segundo 130 litros de agua sin tratar, además de los arrastres pluviales de toda la cuenca, que deben de incluir residuos agroquímicos y desechos de la producción agropecuaria, lo que impacta en la calidad del agua. Protección y Atención Integral a la Salud de Jalisco, reportó en el 2008 que la enfermedad que más frecuentemente se encuentra en la población dentro de la cuenca, es la infección intestinal, a causa de ella se encuentra el mayor número de fallecimientos reportados y que podrían estar asociadas a la calidad del agua de la laguna de Zapotlán. Por tal motivo, el objetivo de este estudio fue evaluar la presencia y diversidad fenotípica de *Salmonella* spp. aisladas de la laguna de Zapotlán, Jalisco. Dicha información podrá ser de utilidad para desarrollar estrategias apropiadas y eficaces para el control de enfermedades y prevenir la contaminación de alimentos producidos en la cuenca en donde se hace uso del agua de la laguna para riego agrícola. Para ello, se realizó la caracterización fenotípica que consistió en determinar el serotipo de las cepas de *Salmonella* mediante el esquema de Kauffman-White y el perfil de resistencia antimicrobiana por medio del método de Kirby-Baüer. Así mismo, se llevó a cabo la caracterización genotípica, determinando el perfil genético de cada uno de los serotipos identificados mediante Electroforesis en Gel de Campos Pulsados. Se aislaron y confirmaron 19 cepas de 63 (30.15%) muestras del género *Salmonella enterica* subsp. *enterica* de la laguna de Zapotlán, donde el serotipo más predominante fue *S. Agona* con 68.42% (13/19), seguido por el serogrupo *S. B.* con 21.05% (4/19), *S. Typhimurium* con 5.26% (1/19) y *S. Weltevreden* con 5.26% (1/19). El 94.8% (18/19) de las cepas aisladas fueron resistentes al menos a uno de los siguientes antimicrobianos colistina, tetraciclina, ácido nalidíxico, sulfametoxazol y trimetoprima; mientras que, solo el 5.26% (1/19) de las cepas fue susceptible a todos los antimicrobianos usados, obteniéndose 16 perfiles de resistencia

diferentes. *S. Agona* presentó resistencia múltiple (16 perfiles) a todos los antimicrobianos, *Salmonella* Weltevreden, Typhimurium y el serogrupo B. se encontraron en sólo un perfil de resistencia. El análisis de PFGE en el que se utilizó la enzima *Xba*I, mostró que los 3 serotipos y el serogrupo B. de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* analizados, se agruparon en 21 perfiles genéticos diferentes. Siendo *S. Agona* el más predominante al ser ubicado en 8 perfiles genéticos diferentes, seguido por el serogrupo B. (4 perfiles), *S. Typhimurium* y Weltevreden (1 perfil). Es importante señalar que algunas cepas de *S. Agona* fueron aisladas de múltiples muestras del mismo sitio y fecha de muestreo, sin embargo hay casos donde la misma cepa fue aislada en la misma fecha pero de diferentes lugares. Esto sugiere que algunas cepas pueden persistir en el ambiente el tiempo suficiente para ser transportadas a diferentes lugares de la cuenca. Así mismo, se demuestra la diversidad de serotipos presentes en agua de la laguna de Zapotlán y la alta resistencia a varios antimicrobianos y la variedad en la huella genética que presentaron *S. Agona* y el serogrupo B.

ABSTRACT

Wetlands have been closely linked to the incidence of pathogens such as *Salmonella* spp. due to the frequent contamination of aquifers by wastewater that carry feces from infected persons and / or animals. The presence and prevalence of pathogens, as in the case of *Salmonella* spp. is a permanent risk for food contamination, and also has repercussions on human health problems, which is reflected in a high incidence of diarrheal outbreaks and intoxications, due to the use of water in agricultural operations and human consumption and use. The State Water Commission reported in 2012 that lake Zapotlán receives every second 130 liters of untreated water, in addition to rainwater drainage throughout the basin, which must include agrochemical residues and wastes from agricultural production, which impacts in water quality. Protection and Comprehensive Health Care of Jalisco, reported in 2008 that the disease most frequently found in the population within the basin is that of intestinal infection, because of them is the highest number of deaths reported and that could be associated with the water quality of the lake Zapotlán. For this reason, the objective of this study was to evaluate the presence and phenotypic diversity of *Salmonella* spp. isolated from the lake Zapotlán, Jalisco. Such information may be useful for developing appropriate and effective strategies for disease control and prevention of contamination of food produced in the basin where the use of lagoon water for agricultural irrigation is used. To do this, the phenotypic characterization was performed, which consisted of determining the serotype of the *Salmonella* strains by the Kauffman-White scheme and the antimicrobial resistance profile by the Kirby-Baüer method. Likewise, the genotypic characterization was carried out, determining the genetic profile of each of the serotypes identified by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. We isolated and confirmed 19 strains of 63 (30.15%) samples of the genus *Salmonella enterica* subsp. *enterica* of the lake Zapotlán, the most prevalent serotype was *S. Agona* with 68.42% (13/19), followed by *S. B.* serogroup with 21.05% (4/19), *S. typhimurium* with 5.26% (1/19) and *S. Weltevreden* with 5.26% (1/19). 94.8% (18/19) of the isolated strains were resistant to at least one of the following antimicrobials: colistin, tetracycline, nalidixic acid, sulfamethoxazole and trimethoprim; while only 5.26% (1/19) of the strains were susceptible to all the antimicrobials used, obtaining 16 different resistance profiles. *S. Agona* presented multiple resistance (16 profiles) to all antimicrobials, *Salmonella Weltevreden*, *Typhimurium* and serogroup B were found in only one resistance profile. The PFGE analysis using the enzyme *XbaI* showed that the 3 serotypes and the

serogroup B. of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* analyzed, were grouped into 21 different genetic profiles. *S. Agona* was the most predominant to be located in 8 different genetic profiles, followed by serogroup B. (4 profiles), *S. Typhimurium* and *Weltevreden* (1 profile). It is important to note that some strains of *S. Agona* were isolated from multiple samples from the same site and date of sampling, however there are cases where the same strain was isolated on the same date but from different places. This suggests that some strains may persist in the environment long enough to be transported to different parts of the basin. Likewise, we demonstrate the diversity of serotypes present in water in the lake Zapotlán and the high resistance to several antimicrobials and the variety in the genetic footprint presented by *S. Agona* and serogroup B.

INTRODUCCIÓN

Los humedales han estado estrechamente ligados a la incidencia de patógenos como *Salmonella spp.* debido a la contaminación frecuente de las aguas superficiales, por aguas residuales que acarrean heces fecales de personas y/o animales infectados (EPA, 2009). La presencia y prevalencia de patógenos es un riesgo permanente para la contaminación de alimentos y salud de las personas debido al uso del agua en operaciones agrícolas, de uso y consumo humano (Winfield y Groissman, 2003).

Salmonella spp. es un patógeno entérico ubicuo con una distribución mundial que comprende gran número de serovares caracterizados por diferentes especificidades y distribución del huésped. Este microorganismo es una de las principales causas de enfermedades transmitidas por los alimentos, ocasionando enfermedades intestinales en todo el mundo, así como el agente etiológico de enfermedades sistémicas más graves como la fiebre tifoidea y paratifoidea (Pond, 2005). *Salmonella*, al igual que otras bacterias entéricas, se propagan por vía fecal-oral. Este microorganismo puede entrar en el medio acuático directamente por las descargas puntuales que contengan heces fecales de los seres humanos y/o animales infectados o indirectamente, por ejemplo, a través de las descargas de aguas residuales o escorrentías procedentes de tierras agrícolas que han sido previamente abonadas con estiércol de animales. En general *Salmonella spp.* y sus subespecies se pueden encontrar en una gran variedad de vertebrados. Además de los seres humanos, los animales son una fuente de infección que incluye, mascotas, animales de granja y animales salvajes; terneros, aves de corral, cerdos, ovejas, aves silvestres y los reptiles puede ser reservorios de *Salmonella* (Dolejská *et al.*, 2009; Wray y Wray, 2000).

Una vez que los microorganismos patógenos entéricos como *Samonella* dejan su hábitat para entrar en contacto con el medio ambiente, sufren el efecto por los factores estresantes como la precipitación, radiación solar, la escasez de nutrientes, temperaturas variables, pH, humedad relativa entre otros, los que pueden tener una influencia en la supervivencia, persistencia y distribución de estas bacterias (Martínez-Urtaza y Liébana, 2005).

La Laguna de Zapotlán se localiza en la región sur del estado de Jalisco (INEGI, 2009); alberga

gran diversidad de aves acuáticas, principalmente migratorias, las cuales se dan cita cada otoño-invierno para satisfacer sus necesidades de alimentación, descanso y refugio (CONANP, 2005). Por otra parte, representa una importante área de producción pesquera, actividades recreativas y usos artesanales. La cuenca de la Laguna es de característica endorreica, siendo las fuentes pluviales y fluviales las principales fuentes de abastecimiento de agua a la laguna, la cual es aprovechada preferentemente para uso agrícola y en menor escala doméstica y pecuaria (CONANP, 2005; CEA, 2011).

Existe una importante contaminación en la Laguna de Zapotlán por aguas negras de todas las comunidades asentadas en la cuenca, principalmente de Ciudad Guzmán, debido a que la laguna ha sido desatendida por los Ayuntamientos, como consecuencia 130 litros de agua sin tratar entran al cuerpo de agua cada segundo (DIPUTADOSCIUDADANOS.MX, 2016), además los escurrimientos pluviales de toda la cuenca, pueden arrastrar residuos de agroquímicos, desechos de la producción agropecuaria y finalmente la basura que clandestinamente se tira en las barrancas que conforman la cuenca, también termina en la laguna, lo que impacta en la calidad del agua (SEMARNAT, 2014).

Estas fuentes posibles de contaminación ponen en riesgo la calidad del agua que se utiliza para las actividades agropecuarias, además, de que al ser utilizada con fines recreativos, genera un gran impacto en la salud de las personas que entran en contacto con dicha agua (Lightfoot, 2004).

Protección y Atención Integral a la Salud de Jalisco, reportó en el 2008 que las enfermedades que más frecuentemente se encuentran en la población dentro de la cuenca son las de vías urinarias e infecciones intestinales, a causa de ellas se encuentra el mayor número de fallecimientos reportados y que podrían estar asociadas a la calidad del agua de la laguna (Protección y Atención Integral a la Salud, Jalisco, 2008).

Para determinar el origen de contaminación de microorganismos patógenos en un hábitat en particular, se requieren de métodos fenotípicos y genotípicos, que en conjunto permitan llevar a cabo la identificación y caracterización de este microorganismo (Scott *et al.* 2002). Los métodos

de tipificación, han sido usados como una herramienta importante para resolver dudas en el conocimiento de las fuentes de infección o reservorios de brotes epidémicos, para el manejo de distintas enfermedades, la determinación de la existencia de cepas patógenas de diferentes microorganismos en hábitats naturales, así como conocer la clonalidad entre aislados y determinar vías de transmisión (Fernández *et al.*, 2013).

Con la finalidad de generar información que apoye lo anteriormente mencionado, el presente trabajo tiene como objetivo central, determinar la presencia y diversidad fenotípica y genética de cepas de *Salmonella* spp. aisladas de la Laguna de Zapotlán, Jalisco. Esta investigación permitió conocer los serotipos circulantes, su resistencia a antibióticos y la variabilidad genética de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de esta laguna. Dicha información podrá ser de utilidad para desarrollar estrategias apropiadas y eficaces para el control de enfermedades y prevenir la contaminación de alimentos producidos en la cuenca en donde se hace uso del agua de la laguna para riego agrícola.

1. ANTECEDENTES

1.1. Generalidades de la laguna de Zapotlán

La laguna de Zapotlán se localiza en los Municipios de Zapotlán el Grande y de Gómez Farías, en la parte sur del estado de Jalisco, en las coordenadas centrales 19°45'25'' latitud norte y 103°28'44'' latitud oeste. Al este se encuentra limitada por la carretera estatal Ciudad Guzmán-Gómez, al oeste y al norte áreas agrícolas. La laguna de Zapotlán es un cuerpo perenne perteneciente a la Cuenca de Zapotlán. Presenta una superficie promedio entre 900 y 1,000 hectáreas con un máximo de 1,300, y con una profundidad promedio de 4.75m. La capacidad máxima de almacenamiento es de 27 Mm³ (INEGI, 2009). La laguna de Zapotlán cuenta con el decreto de sitio Ramsar, a partir del 5 de junio de 2005 con una superficie de 1,496 hectáreas (CONANP, 2005). La laguna de Zapotlán junto con el Volcán de Fuego y el Nevado de Colima forman un extenso paisaje característico del Occidente de México (Figura 1).



Figura 1. Fotografía de la laguna de Zapotlán, Volcán de Colima y el Nevado de Colima.

La cuenca de la laguna presenta una gran biodiversidad del reino vegetal, que abarca desde plantas acuáticas hasta árboles, donde se encuentran 180 especies diferentes. La calidad y el nivel de vida dependen de las plantas, ya sea por el uso medicinal, artesanal, para construcción, como todos los usos realizados por los seres vivos que habitan permanentemente o estacionalmente en el sitio (CEA, 2011).

En el reino animal en particular, la laguna de Zapotlán alberga gran diversidad de aves acuáticas, principalmente migratorias como: la avoceta americana, ibis cara blanca, ibis blanco americano, gaviota golondrina, garza blanca, garzeta tricolor, gallareta americana, costurero pico largo entre otras especies acuáticas las cuales se dan cita cada otoño-invierno para satisfacer sus necesidades de alimentación, descanso y refugio (CONANP, 2005). Las aves de la laguna forman parte esencial del equilibrio del ecosistema al ser polinizadoras o dispersoras de semillas; otras más son reguladoras de poblaciones de insectos y pequeños roedores; la presencia o ausencia de ciertas especies de aves, nos indica la salud ambiental de la laguna. Por otra parte, la laguna representa una importante área de producción pesquera, actividades recreativas y usos artesanales. Para las poblaciones de alrededor de la laguna, es un paisaje vivo y único, donde entre otras cosas, se tiene un gran jardín bótico natural, un aviario, un acuario y sobre todo, las costumbres del pasado, que todavía están presentes hoy y que debemos buscar que permanezcan en el futuro (CEA, 2011).

1.2. Hidrología de la laguna de Zapotlán

La laguna de Zapotlán pertenece a la cuenca hidrológica del lago de Chapala, la cual cuenta con 4,968.49 km² de superficie y pertenece a la Región Hidrológica 12 Lerma-Santiago, localizadas al sur del estado de Jalisco. La cuenca es drenada por una serie de corrientes intermitentes pequeñas, así como de corrientes perennes. (Ariel Consultores, S. A., 1989-1990).



Figura 2. Localización geográfica del lago de Chapala y de la laguna de Zapotlán.

Los principales recursos hídricos con que cuenta la microcuenca de Zapotlán, son su laguna, las aguas freáticas y los escurrimientos que se forman dentro de la temporada lluviosa, entre las sierras circundantes, los cuales generan la formación de innumerables arroyos de temporal, principalmente en los municipios de Zapotlán el Grande y Gómez Farías, los cuales aportan un escurrimiento medio anual de 17.80 Mm³ (CONANP, 2005). El agua superficial está destinada preferentemente para uso agrícola, y en menor escala doméstica y pecuaria (Tabla 1) (D'Urquiza, 2004).

Tabla 1. Uso del agua extraída de la laguna de Zapotlán.

Uso del Agua extraída de la laguna de Zapotlán	Demanda Anual (Mm³)	Demanda Anual (%)
Agrícola	8.5	65%
Urbano	2.5	19%
Pecuario y otros servicios	2.1	16%
Total	13.1	100%

La laguna de Zapotlán es alimentada principalmente por arroyos intermitentes, entre los que se encuentran: el arroyo La Chala, que llega a la laguna por la parte occidental; los arroyos Las Minas, La Catarina, Chuluapan y Los Guayabos, que llegan con dirección suroeste; los arroyos La Cueva y Agua Nevada, de dirección oeste-este; los arroyos La Llave, Delgado y Las Carboneras, de dirección noroeste; los arroyos La Tijera, El agua, Piedra Ancha, Salto de Cristo y El Chapulín se dirigen a la laguna de dirección noroeste (CONAGUA, 1994).

1.3 Valores hidrológicos

La laguna de Zapotlán capta aproximadamente 34,000m³ de aguas urbanas, un 98% de ellas con tratamiento primario, y forma parte de la subcuenca Zacoalco-Sayula-Zapotlán (INEGI, 1997). Por ser una subcuenca endorreica, depende de la captación del agua de las sierras aledañas y a su vez mantiene los mantos freáticos que se encuentran en el área, permitiendo así que diversos

manantiales, aguas termales, aguas profundas y otros sitios de captación de agua, mantengan sus niveles correspondientes, principalmente para la cordillera del macizo volcánico Nevado de Colima y del Tigre (CONAGUA, 2004).

Por sus características geomorfológicas y físicas, la laguna de Zapotlán actúa como un regulador de temperatura ambiental local, favoreciendo el clima de la región. Juega un papel importante en la actividad pesquera, en actividades ecoturísticas, en canotaje, medio que permite generar transporte, en la recarga hídrica de pozos y manantiales de la región, en el control de inundaciones, en la protección y refugio de fauna y flora silvestre. Es área de descanso, recreación, y un soporte importante para el trabajo artesanal del tule (CEA, 2011).

1.4. Impacto ambiental de una mala gestión del agua

El agua, elemento esencial que dio origen a la vida en la Tierra hace más de 4,600 millones de años, era considerada ya en la antigua Grecia de Sócrates y Platón, uno de los elementos básicos del universo. La contaminación a gran escala se inicia en América, a partir de que los colonizadores generan una explotación desmedida de los recursos naturales y de los seres humanos, debido al impacto de las industrias recién introducidas: la textil, la azucarera y la minera (Nebel *et al.*, 1999).

El desarrollo socioeconómico del ser humano ha provocado que la demanda del agua haya ido en constante aumento. En el mundo, la población se ha incrementado 2.2 veces en los últimos cincuenta años, llegando hoy en día a 7 billones de personas, y el consumo de agua se ha multiplicado por siete. Los principales ecosistemas y biotas terrestres, así como los seres humanos, dependen del agua dulce, aquella cuyo contenido de sales es menor al 0.01% (100 ppm.) (Aguilar *et al.*, 2001; US Census Bureau, 2017).

Los humanos están usando más de la mitad de los recursos de agua accesibles en la superficie. Para el año 2025, se espera que esta proporción llegue al 70%. Más de mil millones de habitantes en los países en desarrollo no tienen acceso al agua potable. Se ha comprobado que el agua

contaminada contribuye a la aparición de una gran cantidad de enfermedades las cuales están asociadas con la muerte de 3.4 millones de personas cada año (Postel *et al.*, 1996). La impureza del agua está íntimamente ligada a la falta de servicios sanitarios, debido a que la mayoría de los casos, el agua es contaminada por causas antropogénicas, naturales, aguas negras y desechos municipales e industriales entre otros. Los lagos, corrientes, ríos y océanos representan el agua superficial susceptible de ser contaminada periódicamente en mayor o menor grado por los microorganismos provenientes del agua atmosférica (precipitación), por la que corre, y por todos los desperdicios que le son arrojados deliberadamente (Postel *et al.*, 1996).

1.5. Contaminación microbiológica del agua

Las enfermedades que se propagan debido al agua contaminada se conocen como "enfermedades transmitidas por el agua" (Medina, 2002). Sus agentes patógenos son biológicos, más que químicos y los males que provocan casi siempre son contagiosos. Por lo general, los agentes patógenos pertenecen al grupo de los microorganismos, que se transmiten en las heces excretadas por individuos infectados o por ciertos animales. De forma que estas enfermedades se suelen contraer al ingerirlos en forma de agua o de alimentos, contaminados por esas heces (vía fecal-oral). Los patógenos humanos transmitidos por el agua incluyen muchos tipos de microorganismos tales como: bacterias, virus, protozoos y, en ocasiones, helmintos (lombrices), todos ellos muy diferentes en tamaño, estructura y composición. Las enfermedades más importantes de este tipo incluyen: la shigelosis, salmonelosis, cólera, las diarreas por *Escherichia coli*, diarreas virales, como hepatitis A, fiebre tifoidea, y demás enfermedades intestinales provocadas por parásitos (Esrey *et al.*, 1991).

1.6. Contaminación del agua superficial

La contaminación de las aguas procedente de fuentes difusas, es resultado de un amplio grupo de actividades humanas en las que los contaminantes no tienen un punto claro de ingreso en los cursos de agua que los reciben. Por el contrario, la contaminación procedente de fuentes puntuales está asociada a las actividades en que el agua residual va a desembocar directamente a las masas de agua receptoras, por ejemplo, mediante cañerías de descarga, en las que se pueden

fácilmente cuantificar y controlar. Obviamente, la contaminación de fuentes difusas es mucho más difícil de identificar, medir y controlar. (IJC, 1974).

Los contaminantes procedentes de fuentes difusas, cualquiera que sea la fuente, se desplazan por la superficie terrestre o penetran en el suelo, arrastrados por el agua de lluvia y la nieve derretida. Estos contaminantes consiguen abrirse paso hasta las aguas subterráneas, tierras húmedas, ríos, lagunas y lagos y, finalmente, hasta los océanos en forma de sedimentos y cargas químicas transportadas por los ríos. La repercusión ecológica de estos contaminantes puede ir desde pequeños trastornos hasta graves catástrofes ecológicas, con repercusiones en los peces, las aves y mamíferos y sobre la salud humana (IJC, 1974).

Lo anterior posee relación con la escorrentía superficial, una forma de contaminación difusa o no localizada. La contaminación por fuentes difusas contribuyen significativamente con niveles altos de agentes patógenos en las aguas superficiales, especialmente coliformes termotolerantes (Ongley, 1997). En este sentido, un suministro de agua para usos domésticos en cantidad y calidad suficiente contribuiría a reducir la incidencia de enfermedades transmitidas por la vía fecal-oral (OMS, 1998).

La agricultura, es el mayor usuario del agua dulce a escala mundial y como consecuencia el principal factor de degradación de los recursos hídricos superficiales y subterráneos así como de la erosión y de la escorrentía química, debido a ello la preocupación existente por sus repercusiones mundiales en la calidad del agua a escala mundial (FAO, 1990a). Otra actividad afín, el sector de la elaboración agroalimentaria, es también una fuente significativa de contaminación orgánica en la mayor parte de los países. En la actualidad, la acuicultura intensiva se ha convertido en un problema con importantes impactos ambientales en los sistemas de agua dulce, estuarios y costas, lo que ha dado lugar a la eutrofización y detrimentos en las características físicas, químicas y biológicas de los ecosistemas de agua dulce y agua salobre (FAO, 2000). Las principales dimensiones ambientales y de salud pública del problema de la calidad del agua dulce en el mundo son los siguientes (FAO, 1993a):

- Cinco millones de defunciones anuales como consecuencia de enfermedades transmitidas por el agua.

- Disfunción del ecosistema y pérdida de biodiversidad.
- Contaminación de los ecosistemas marinos debido a actividades realizadas en tierra.
- Contaminación de los recursos de aguas subterráneas.
- Contaminación mundial por contaminantes orgánicos persistentes.

Por lo general, en la mayor parte de los países, todos los tipos de prácticas agrícolas y formas de utilización de la tierra, incluidas las actividades de alimentación animal (granjas de engorde), se consideran como fuentes difusas de contaminación. Las características principales de las fuentes difusas es que éstas responden a las condiciones hidrológicas (lluvias, tormentas y/o nevadas), por lo que presentan dificultades para su medición o control directo (y, por ello, son difíciles de regular). Su control depende fundamentalmente de las buenas prácticas de ordenamiento del territorio y de los usos del suelo (IJC, 1974). Por otra parte el control de las fuentes puntuales en los países que tienen programas eficaces en ese sentido, se lleva a cabo mediante el tratamiento de efluentes de acuerdo con las normas oficiales de cada país, que por lo general se aplican de acuerdo con un marco regulatorio basado en un sistema de permisos de descarga que se aplica a los usuarios. Por el contrario, para el control de las fuentes difusas, en particular en la agricultura, se ha recurrido ante todo a iniciativas de educación, promoción de buenas prácticas ordenamiento territorial y del uso del suelo (IJC, 1974).

Otra amenaza para el agua superficial lo representa la ganadería de pastoreo porque contribuye a la contaminación y eutrofización de las aguas superficiales y con el tiempo de las aguas subterráneas. En este caso los mayores agentes contaminantes del agua son los desechos animales (estiércol y orina), los antibióticos y las hormonas frecuentemente contenidas en estos desechos, los químicos para el teñido y curtido de los cueros, y los fertilizantes y plaguicidas aplicados en los campos agrícolas. Muchos animales, pueden estar infectados en forma natural con microorganismos patógenos en sus tejidos corporales, la transmisión de estos patógenos al hombre se lleva a cabo generalmente a través de los alimentos y se da con mucha mayor frecuencia que la transmisión de humano a humano o la del humano al animal (Bello *et al.*, 1990).

1.7. *Salmonella* spp.

El género *Salmonella* son bacilos Gram negativos, móviles, de la familia de las *enterobacteriaceae*. La aplicación de técnicas de hibridación del ADN permitió el reconocimiento de dos especies en el género *Salmonella*, *S. enterica* y *S. bongori*. A su vez, *S. enterica* presenta seis subespecies, *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *Salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp. *Indica*. Cada subespecie también posee una gran cantidad de serotipos. Son bacterias intestinales de los animales de sangre caliente o fría y pocas veces del hombre, todas las especies de *Salmonella* deben considerarse parásitas, aunque la virulencia oscila extraordinariamente de una especie a otra y también entre las cepas, se eliminan por heces y pueden sobrevivir un tiempo variable en el medio ambiente, según las condiciones de temperatura, pH y humedad. En el humano pueden causar un gran número de infecciones como: fiebre tifoidea, infecciones focalizadas, septicemias y gastroenteritis (Jawetz *et al.*, 1985; Koneman *et al.*, 1985; Roof *et al.*, 1992; Schwartz, 1996; Milleman, 1998; Wray *et al.*, 2000).

La diferenciación de las dos especies entre sí y de las demás entero bacterias se lleva a cabo por sus propiedades bioquímicas. En general, el género *Salmonella* es móvil, no fermenta la lactosa, fermentan glucosa con producción de gas, genera SH₂ y no producen desaminasas ni ureasas. Algunas excepciones son que la *S. Typhi* que no produce gas y *S. Enteritidis* serotipo Paratyphi *?A* que no produce SH₂ (Jawetz *et al.*, 1985).

En comparación con otros bacilos Gram negativos, *Salmonella* es relativamente resistente a varios factores ambientales: crece a temperaturas que oscilan entre los 8 y 45°C, es sensible al calor y no sobrevive a temperaturas superiores de 70°C, es resistente a la deshidratación por años, sobre todo en heces, polvo y otros materiales secos como algunos alimentos para consumo humano y animal (Chávez, *et al.*, 2001).

Son factores importantes de influencia: la temperatura y humedad (en ambiente cálido y húmedo se multiplican intensamente; en condiciones de frío y sequedad sobreviven largo tiempo), el medio en que se encuentren (se ven favorecidas por las aguas residuales y lodos diluidos ricos

en proteínas), el pH del entorno (los valores de pH < 4.0 las destruyen con rapidez), la concentración inicial de gérmenes vivos (particularmente elevada en residuos procedentes de ciudades y de núcleos de concentración de animales). Las radiaciones UV destruyen al género *Salmonella* con relativa rapidez. Se han observado tiempos de supervivencia especialmente elevados (tres años o más) en heces desecadas y a bajas temperaturas. Entre los alimentos hay que prestar atención particularmente a los huevos, frutas, verduras, carne, leche y sus derivados (Blaha, 1995).

La *Salmonella* es un agente etiológico para diferentes enfermedades colectivamente llamadas salmonelosis. La salmonelosis en humanos puede ser dividido en cuatro síndromes: Fiebre *enterica* (tifoidea), gastroenteritis (contaminación de alimentos), bacteriemia con o sin gastroenteritis y el estado de portador asintomático (Nair *et al.*, 2002)

1.8. Epidemiología

Las infecciones que tienen su origen en el agua son un problema de salud mundial (WHO 2003). En países en vías de desarrollo, el agua contaminada es uno de los diez factores de riesgo principales para ocasionar enfermedades, principalmente gastrointestinales, causando 1.6 millones de muertes en 2004 (WHO, 2009).

Las gastroenteritis se transmiten por la ruta fecal-oral, vía agua y/o alimentos contaminados, y se asocian principalmente con prácticas de higiene deficientes. Estas enfermedades ocurren principalmente en países en vías de desarrollo y son endémicas en el sureste de Asia y África; y también es reportada comúnmente en el centro y sur de América Latina (Majowicz *et al.*, 2010).

Aunque *Salmonella* ha sido reportada en pocas ocasiones como causante de brotes que tienen su origen en agua contaminada (Prüs 1998), esta bacteria podría ser considerada un patógeno de alta significancia para la salud si se presenta en una dosis infecciosa relativamente alta (> 10⁵ células) según lo reportado por Brettar y Höfle (2008).

El aislamiento de *Salmonella* en alimentos o ingredientes alimenticios se ha reportado desde principios de los años 50s. Por lo general, las infecciones y epidemias se originan de alimentos y agua contaminada con heces de roedores, manos de trabajadores que manejan alimentos y equipo y utensilios contaminados. Los casos esporádicos ocurren por contacto directo con un animal o persona infectada. Las fuentes de infección más importante en humanos son: agua, frutas, verduras, hortalizas, leche y derivados, mariscos, huevos secos o congelados, carne y sus productos, colorantes, animales silvestres y domésticos (Carter *et al.*, 1994; Blaha, 1995; Nielsen *et al.*, 1995; Ing *et al.*, 1996; Davies *et al.*, 1997; Turney *et al.*, 1997).

Se estima que a nivel mundial 350,000 personas mueren cada año por más de 200 enfermedades vinculadas a la presencia en los alimentos contaminados de bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas nocivas. Se estima que *Salmonella* es la bacteria más letal con 52,000 muertes anuales, seguida por *E. coli*, con unas 37,000 a nivel mundial (WHO, 2015). Según datos de la Organización Mundial de la Salud, se calcula que en los Estados Unidos de América se presentan anualmente 1,4 millones de casos de salmonelosis no tifoidea, que llevan a 15,000 hospitalizaciones y 580 muertes cada año (WHO, 2013). En México, se registró un incremento de las notificaciones de casos por salmonelosis en los últimos años, en el 2014 se detectaron 70,761 casos de brotes de salmonelosis, en el 2015 se registraron 75,855 y en el 2016 se notificaron 77,238. De igual forma en el Estado de Jalisco, se reportó un incremento, notificando 1,329 casos por salmonelosis en el 2014, 2,390 en el 2015 y 2,348 en el 2016 (SINAVE, 2014, 2015, 2016).

1.9. Patogénesis

Existen algunos factores críticos para que inicie la infección por *Salmonella*, entre ellos, el tipo de cepa, el alimento consumido con la bacteria y el estado fisiológico del hospedero; además, se requiere de una dosis infecciosa de aproximadamente 10^6 a 10^8 bacterias para el desarrollo de la enfermedad sintomática (Sánchez y Cardona, 2003).

Los principales cuadros clínicos manifestados por la infección con *Salmonella* son la gastroenteritis, que es la forma más común de salmonelosis producida por un gran número de

serotipos (principalmente *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*); y la fiebre *enterica*, que puede ser tifoidea (producida por *S. Typhi*), o paratifoidea, una forma leve de la enfermedad anterior (producida por *S. Paratyphi A, B y C*), las cuales solo afectan al humano (Ohl y Miller 2001).

El proceso infeccioso ocurre en el siguiente orden: adhesión, invasión, replicación, resistencia a los mecanismos de defensa y daño al hospedero (Galan, 2001). Durante este proceso, las bacterias se tienen que adaptar a cambios ambientales drásticos cuando entran al hospedero, ya que viajan a lo largo del aparato digestivo y pasan de un medio extracelular a uno intracelular, por ejemplo: pH ácido, aumento de temperatura, baja tensión de oxígeno y alta osmolaridad; en consecuencia, el microorganismo responde a estos cambios debido a una regulación coordinada y precisa de sus genes (Figuroa y Verdugo 2005).

De igual forma, el proceso infeccioso ocurre en el reservorio animal, el cual se mantiene por contacto entre animales y el hombre o el medio ambiente. Sin embargo, cabe señalar que algunos serotipos presentan especificidad por un hospedero como es el caso de *S. Typhi* y *S. Paratyphi*, que causan enfermedad en el humano y no en otros hospederos; otros serotipos como *S. Choleraesuis* están adaptadas a los animales, pero cuando infectan a los humanos pueden causar enfermedad grave; y también, existen serotipos que no muestran especificidad de hospedero y causan enfermedad, tanto en el hombre como en animales (Uzzau *et al.* 2000).

1.10. *Salmonella* y el medio ambiente

En general, los serotipos de *Salmonella* más diseminados en el medio ambiente son aquellos que no tienen especificidad por un hospedero. La ventaja adaptativa es principalmente la temperatura óptima de desarrollo de los microorganismos en sus hospederos, ya que, el medio ambiente puede presentar variaciones drásticas de temperatura incluso en un mismo día (Uzzau *et al.* 2000).

Una vez expuesta en el medio ambiente, *Salmonella* debe sobrevivir a la baja disponibilidad de nutrientes, estrés osmótico, variaciones de pH y temperatura, radiación solar, precipitación, depredación y/o agentes tóxicos (Winfield y Groisman 2003).

Estas bacterias son capaces de sobrevivir en gran variedad de condiciones de estrés por largos períodos de tiempo dado que resisten temperaturas bajas de hasta 8°C; además pueden resistir la deshidratación y sobrevivir en el suelo; sin embargo, la microbiota normal del suelo compete por los nutrientes y tiene la ventaja de la adaptación (Altekruse *et al.* 1997).

También se ha reportado la supervivencia de *Salmonella* en salmuera al 20% y se ha encontrado que el serotipo Seftenberg es muy resistente a ambientes marinos (Martínez-Urtaza y Liébana 2005). Por otro lado, *Salmonella* puede ser diseminada a otros espacios geográficos mediante vehículos ambientales (agua, lluvia, aire), tiempo durante el cual estas bacterias están en el ambiente sin multiplicarse en forma significativa, aunque pueden sobrevivir durante semanas en agua y suelo en condiciones favorables. La capacidad de *Salmonella* para sobrevivir en el ambiente depende de su habilidad para permanecer viable por largos periodos del tiempo a pesar de cambios en el ambiente externo, lo que resulta crítico para su diseminación (Martínez-Urtaza *et al.* 2004).

El estudio de la contaminación microbiana es muy complicado debido a que es necesario determinar su supervivencia en ambientes externos, además de que es importante considerar el efecto de dilución del agua y la resuspensión de sedimentos. Todas estas cuestiones son afectadas por fluctuaciones en las condiciones climáticas como la radiación solar, la lluvia, el viento, entre otras; sin embargo, es posible hacer una correlación entre la presencia del microorganismo y los factores ambientales (Martínez-Urtaza *et al.* 2004).

Se han realizado trabajos donde se evalúan la radiación solar, la temperatura, la salinidad, los metales pesados, la depredación y la competencia para conocer su efecto sobre bacterias indicadoras de contaminación fecal, siendo la alta radiación solar y la alta salinidad los factores que resultaron ser los que más afectaban la supervivencia de esos microorganismos (Bordalo *et al.* 2002).

Por otro lado, el incremento en la presencia de ciertos microorganismos puede estar relacionado con otros factores climatológicos como la lluvia, ya que puede arrastrar patógenos entéricos de

fuentes distantes hasta corrientes de aguas; también puede ocurrir una resuspensión de sedimentos durante una tormenta (Martínez-Urtaza *et al.* 2004).

Cuando *Escherichia coli* y especies del género *Salmonella* llegan al medio ambiente luchan por sobrevivir, dado que se enfrentan a ambientes limitados de nutrientes, estrés osmótico, variaciones bruscas de temperatura y pH. Sin embargo, esto no quiere decir que mueren bajo esas circunstancias, ya que se ha demostrado su presencia y persistencia en diferentes ambientes acuáticos (Lipp *et al.* 2001; Martínez-Urtaza y Liébana, 2005).

1.11. Caracterización del microorganismo

La caracterización es un método preciso que establece relaciones filogenéticas entre cepas, ya que está determinada por genes cromosómicos cuya presencia o ausencia no se ve afectada por factores ambientales, ni por presión selectiva de los elementos extracromosomales (Vásquez *et al.*, 2005), lo que permite identificar fuentes de contaminación, evaluar si una cepa es parte de un brote o por casos esporádicos, determinar si es una infección nueva o recurrente. La caracterización de *Salmonella* incluye técnicas fenotípicas y genotípicas. En la Tabla 2 se pueden observar las técnicas de caracterización fenotípica y genotípica (Labarca, 2002).

Tabla 2. Técnicas de caracterización fenotípica y genotípica.

Métodos fenotípicos	Métodos genotípicos
Serotipificación	Perfil plasmídico
Resistencia a antibióticos	Patrones de digestión de ADN (PFGE)
Fagotipificación	Hibridación con sondas
Perfil bioquímico	Reacción de la cadena de la polimerasa

Fuente: Labarca, 2002.

1.12. Caracterización Fenotípica

Las técnicas fenotípicas de caracterización bacteriana exploran propiedades bioquímicas y

fisiológicas de los microorganismos, convirtiéndola en una herramienta útil para caracterizar las distintas especies de microorganismos. Entre ellos están la serotipificación, el perfil bioquímico, la tipificación por bacteriófagos, la presencia de antígenos y los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana (Scott *et al.* 2002). Estos métodos son una herramienta de suma importancia para la tipificación de muchos patógenos, no obstante, el alcance de estos procedimientos puede encontrar serias restricciones (Vilchez y Alonso 2009).

Serotipificación

Esta técnica utiliza anticuerpos para detectar los distintos factores antigénicos de la célula bacteriana. Se basa en el esquema de Kauffmann-White, en el que los serotipos de *Salmonella* son identificados en una serie de pruebas mediante la determinación de antígenos somáticos (O), flagelares (H) de dos fases H1 y H2, siendo esta una característica exclusiva del género y para ciertos serotipos, el antígeno capsular (Vi), de tal manera que todos los serotipos de *Salmonella* pueden ser designados por una fórmula antigénica (Grimont y Weill, 2007).

La estructura química de diversos factores O (parte específica de lipopolisacárido bacteriano) ha sido determinada y los genes involucrados en la producción de enzimas esenciales para la reunión de algunos factores O también fueron localizados, clonados y secuenciados. El antígeno H se encuentra en los flagelos, estos están compuestos de subunidades de proteína llamada flagelina. El antígeno Vi es un homopolímero lineal de ácido 2-acetamido-2-deoxy-D-galacturónico unidos por enlaces α (1-4). Este polisacárido capsular es encontrado en serotipos Typhi, Paratyphi C y Dublín (Wray y Wray, 2000).

Las complejidades antigénicas de los bacilos entéricos han sido puestas ampliamente de manifiesto en el género *Salmonella*. Por reacciones de aglutinación H, O y Vi se han identificado más de 2400 serotipos. Las reacciones cruzadas demuestran que cada antígeno O de *Salmonella* posee dos o tres determinantes específicos, cada uno de los cuales recibe un número, y que es compartido por otros Antígenos O. *Salmonella* ha sido clasificada en grupos O, siendo designadas las primeras 26 por letras (A-Z) y los subsiguientes por números, cada grupo posee su determinante O principal característico. Los 10 serotipos de cada grupo tienen un

determinante antigénico O común. Hay más grupos, pero las principales bacterias aisladas de muestras biológicas del hombre y animales pertenecen a los grupos A hasta la O. En la Tabla 3 se muestran algunos serogrupos y especies importantes que causan enfermedad en el hombre y los animales. (Jawetz *et al.*, 1985; Koneman *et al.*, 1985; Carter y Chengappa, 1994).

Tabla 3. Serogrupos importantes en enfermedades causadas por *Salmonella*

Serogrupo (Antígeno “O”)	Serovariedades	Enfermedades
A	<i>S. Paratyphi</i>	-Fiebre paratifoidea en el hombre
B	<i>S. Schottmuelleri</i>	-Fiebre paratifoidea en el hombre
	<i>S. Typhimurium</i>	-Gastroenteritis en el hombre, es la especie más prevalente en la infección de varias especies animales
	<i>S. Agona</i>	
	<i>S. Abortus equi</i>	-Varias infeccione equinas y en otros animales
	<i>S. Abortus bovis</i>	- Abortos en yeguas y vacas
	<i>S. Abortus ovis</i>	-Abortos en bovinos -Abortos en ovinos
C₁	<i>S. Choleraesuis</i>	-Enteritis porcina; invasora secundaria frecuente en fiebre porcina clásica, infecciones humanas.
	<i>S. Typhisuis</i>	-Infecciones en cerdos jóvenes
	<i>S. Montevideo</i>	-Infecciones bovinas y porcinas principalmente
C₂	<i>S. Newport</i>	-Infecciones humanas y en varios animales en especial bovinos
D₁	<i>S. Enteritidis</i>	-Infecciones en varios animales; gastroenteritis humana, tifoidea aviar, enfermedad intestinal aguda en pollos y pavos jóvenes
	<i>S. Pollurum</i>	-Infecciones intestinales graves de pollos y pavipollos, infecciones crónicas en aves de corral

	<i>S. Typhi</i>	adultas
	<i>S. Dublin</i>	-Fiebre tifoidea humana -Infecciones graves en terneros
E₁	<i>S. Anatum</i>	-Enfermedades del pecho en crías de patos
	<i>S. Muenster</i>	-Infecciones bovinas

Resistencia antimicrobiana

Existen diversas formas por las que las bacterias generan resistencia a los agentes antimicrobianos. Estos mecanismos incluyen disminución en la acumulación de la droga, modificación del sitio blanco o la modificación del propio antimicrobiano (Braoudaki y Hilton, 2004). Los mecanismos que una bacteria utiliza para evitar la acción del agente antimicrobiano generalmente son producto de la actividad de genes específicos que modifican su fisiología (Solórzano y Miranda, 1998). La resistencia de bacterias patógenas a los agentes antimicrobianos es un problema global que va en aumento y que está ocasionando serios problemas en el tratamiento de las enfermedades infecciosas (Wain *et al.*, 2003).

El conocimiento de los niveles de resistencia a antimicrobianos de *Salmonella* es de interés tanto sanitario como epidemiológico, ya que determina si la bacteria es resistente, intermedia o susceptible frente a la acción de un determinado antimicrobiano. En la actualidad el método más utilizado es el método de difusión Kirby-Baüer, el cual es recomendado por el Comité Nacional de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés). La precisión, reproducibilidad y selección de los antibióticos de esta prueba dependen de mantener un conjunto de estándar de los procedimientos tal como lo describe el método (CLSI, 2005). Se han realizado estudios como el de Berrang *et al.* (2006) quienes llevaron a cabo un análisis de perfil de resistencia evaluando 18 antimicrobianos en 80 cepas de *Salmonella* obtenidas de heces de gallinas, las cuales se clasificaron en 15 serotipos diferentes. El 44% de los serotipos eran resistentes, y de estos un 36% multirresistentes, característica que permitió clasificar 11 patrones de resistencia. Destacando que existen diferentes serotipos con el mismo perfil de resistencia, así mismos, que existen miembros de un mismo serotipo que presentan diferentes perfiles de resistencia. Sin embargo, el perfil de resistencia a antimicrobianos es una característica

fenotípica inestable, y el manifestarla está relacionado a la captación de material genético transferible así como a la exposición previa y continua a antimicrobianos por lo cual es importante llevar junto con estas técnicas la caracterización genotípica para poder tener un mayor poder de discriminación (Cormican *et al.*, 2002).

1.13. Caracterización genotípica

Los métodos basados en marcadores genéticos detectan variaciones en la secuencia de ácidos nucleicos del microorganismo, analizan características mucho más estables que las fenotípicas y pueden ser más discriminatorias. Esto debido a que el genoma de cada cepa es único. Para la caracterización genotípica de *Salmonella* se puede detectar el perfil plasmídico, los patrones de restricción de ADN por endonucleasas (electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE)), hibridación con sondas y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La técnica ideal para la caracterización es aquella que presente una óptima capacidad de subtipificación, alto grado de reproducibilidad, alto poder discriminatorio y fácil interpretación (Woodford *et al.*, 1998; de la Torre, 2006).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es un método selectivo y sensible que amplifica regiones específicas de un gen. Esta técnica se utilizó por primera vez a mediados de 1980, para diagnosticar una enfermedad (anemia) y medicina forense. El químico Kary Mullis describió esta metodología, con el objetivo de replicar el ADN (Mullis y Falona, 1987). En PCR, se utilizan ciclos repetidos para copiar el ADN, estos consisten en tres pasos: la primera fase es la desnaturalización, donde se calienta el ADN para separar la cadena doble en dos cadenas simples. Las temperaturas utilizadas pueden estar entre 90°C – 95°C (Mullis, 1990). Los oligonucleótidos se sintetizan de manera comercial en laboratorios, tienen una longitud máxima de 30 pb, con la secuencia de ADN que se desea replicar, se colocan dos, el oligonucleótido sentido y el antisentido (Maier *et al.*, 2009). En la segunda etapa, se baja la temperatura a 55°C aproximadamente causando que el oligonucleótido se una al ADN, proceso conocido como hibridación o alineamiento. Este

proceso es estable solo si el oligonucleótido es complementario al ADN. La tercera etapa es la extensión, donde la temperatura se incrementa hasta 72°C, ideal para que la enzima ADN polimerasa actúe, extendiendo a los oligonucleótidos. Estas tres etapas se llevan a cabo en cada ciclo, duplicando el ADN. Una reacción de PCR se lleva a cabo de 20-40 ciclos, dando como resultado cerca de un millón de moléculas de un simple segmento de doble cadena de ADN. Los productos de amplificación se visualizan por electroforesis en gel de agarosa. La tecnología de PCR, que se basa en la amplificación específica de fragmentos de ácidos nucleicos, se ha utilizado para identificar la presencia de patógenos específicos directamente de muestras clínicas y ambientales. Además, este procedimiento ofrece rapidez, sensibilidad y bajos costos en cada ensayo (Chiu y Ou *et al.*, 1996).

Chiu y Ou (1996), utilizaron iniciadores del gen *invA* y ellos en sus resultados mencionan que son específicos, ya que no encontraron producto de amplificación con 18 especies y 22 aislados de bacterias que no pertenecían al género *Salmonella*, por lo que sugieren que esta técnica es más específica, rápida y sensible que cualquier otro método anteriormente empleado.

Electroforesis en gel por campos pulsantes (PFGE)

La técnica de PFGE es un procedimiento estandarizado por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), mediante esta técnica, el ADN genómico es digerido con enzimas de restricción que reconocen secuencias específicas de seis a ocho bases, por lo que cortan el ADN produciendo de 20 a 30 fragmentos de ADN. Estos últimos son conocidos como fragmentos de restricción y al ser separados por electroforesis, en un equipo que cambia la dirección de la corriente de forma predeterminada, genera patrones de bandas discretas o patrones de PFGE (Tenover *et al.*, 1995).

La PFGE ha sido muy útil en estudios epidemiológicos, considerada como el estándar de oro por científicos clínicos (Simpson *et al.*, 2002). El análisis puede llevarse a cabo con una, dos o tres enzimas de restricción y ser utilizado para una tipificación molecular confiable de cepas en estudio. De manera que permite conocer si aislados recolectados durante el brote de una enfermedad están relacionados genéticamente (Tynkkyinen *et al.*, 1999). Así, utilizando está

técnica, Duffy *et al.* (2005), encontraron que de 16 cepas de *Salmonella* aisladas de agua de irrigación, todas fueron diferentes a las aisladas de la superficie de melón cantaloupe. También, CDC (2008) reportó que cepas de *S. Saintpaul* con el mismo patrón de PFGE que las causantes del reciente brote de salmonelosis en Estados Unidos de América fueron aisladas de chiles serrano y jalapeño y de agua de irrigación de granjas de Tamaulipas, México. Mientras que, Swanson *et al.* (2007) lograron asociar un brote de salmonelosis ocurrido en 10 estados de EUA entre diciembre de 2003 y septiembre de 2004, con el manejo de mascotas como ratas, ratones y hámster que fueron distribuidos a través de una red de criaderos, distribuidores y tiendas de mascotas, durante el brote, 28 personas resultaron enfermas y 10 fueron hospitalizadas al ser infectadas por *S. Typhimurium* multirresistente.

La electroforesis en gel de campos pulsantes es una técnica que presenta alta discriminación, todos los microorganismos pueden ser tipificados, es reproducible y de fácil interpretación, por lo cual es muy importante en epidemiología. Sin embargo, requiere de base de datos y su elaboración involucra mucho tiempo (Scott *et al.*, 2002; Simpson *et al.*, 2002; Tenover *et al.*, 1997). Por lo cual, el Centro de Control de las Enfermedades (CDC) de USA, ha desarrollado una Red Nacional de Subtipificación Molecular para la vigilancia de las enfermedades transmitidas por los alimentos denominada PulseNet, mejorando la rapidez en la detección de brotes y por tanto, mejorar la intervención oportuna de medidas de control y prevención (Boric, 2008).

2. JUSTIFICACIÓN

La contaminación de las aguas superficiales representa un riesgo latente si ésta se utiliza para la producción de alimentos o durante las actividades de empaque de los productos agrícolas, ya que puede provocar contaminación de los productos frescos durante la irrigación, lavado y/o manipulación de los mismos. El impacto más inmediato sería si una persona llega a tener contacto directo de forma frecuente con esta agua o que haya consumido un producto contaminado y posteriormente desarrolle enfermedades gastrointestinales, esto genera altos costos económicos debido al tratamiento para combatir la enfermedad y casos más graves puede ocasionar la muerte de la persona (Batz *et al.*, 2014; EFSA, 2013; Hoffman *et al.*, 2012; Scallan *et al.*, 2011).

Además de las infecciones a humanos, la presencia de altas tasas de contaminación de los productos alimentarios tiene un efecto directo en la competitividad y en el acceso a los mercados internacionales. Hoy en día se han establecido rigurosas reglamentaciones a nivel mundial por lo tanto obligan a los países a desarrollar estrategias para minimizar el riesgo de la presencia de patógenos en los alimentos y garantizar su inocuidad mediante la implementación de medidas de contención de la contaminación y aplicación de técnicas analíticas más modernas para su detección (Tafur, 2009).

El presente trabajo está dirigido a conseguir un mayor conocimiento de los serotipos circulantes de *Salmonella*, su resistencia a antibióticos y la variabilidad genética aisladas del agua de la laguna de Zapotlán. Dicha información podrá ser utilizada para desarrollar estrategias apropiadas y tomar decisiones eficaces para controlar enfermedades gastrointestinales y prevenir la contaminación de alimentos.

La información referente a la contaminación de las aguas superficiales podrá ser utilizada para concientizar al sector salud y al sector productivo primario acerca de la importancia de las prácticas adecuadas para minimizar la contaminación que se vierte al agua, la cual, podría llegar a los productos agrícolas.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

Existe presencia y diversidad ambiental de *Salmonella* spp. en la laguna de Zapotlán, las cuales presentaran al menos un perfil de resistencia antimicrobiana y variabilidad genética entre serotipos de *Salmonella* spp. aislados.

3.2. Objetivo general

Evaluar la presencia y diversidad fenotípica y genética de *Salmonella* spp. aisladas en la laguna de Zapotlán, Jalisco, y en los principales cuerpos de agua que descargan en la laguna.

3.3. Objetivos específicos

- Describir los parámetros ambientales de la laguna de Zapotlán (temperatura ambiental, precipitación y humedad relativa).
- Describir los parámetros fisicoquímicos del agua de la laguna (pH, OD, temperatura, conductividad eléctrica y turbidez).
- Determinar la presencia de *Salmonella* en la laguna de Zapotlán y en los principales cuerpos de agua que descargan en la laguna.
- Relacionar la presencia de *Salmonella* spp. con los parámetros ambientales y fisicoquímicos registrados.
- Identificar los serotipos de *Salmonella* aislados.
- Determinar el perfil de resistencia antimicrobiana de los serotipos de *Salmonella* aislados.
- Obtener el perfil genético de cada serotipo de *Salmonella* aislados.

4. METODOLOGÍA

4.1. Descripción de la zona de estudio

La laguna de Zapotlán está localizada dentro de los paralelos $19^{\circ} 34' - 19^{\circ} 53' N$ y los meridianos $103^{\circ} 38' - 103^{\circ} 53' O$. Se encuentra dentro de la cuenca de Zapotlán (51,771 Ha) (Figura 3), comprende el territorio municipal de Gómez Farías (65%), Zapotlán el Grande (33%) y pequeñas porciones territoriales (2%) pertenecientes a los municipios de Sayula, Venustiano Carranza y Tuxpan (CONANP, 2005).

La laguna se ubica en el sur del estado de Jalisco, a 124 km de la ciudad de Guadalajara, a 1,500 msnm (INEGI, 2009). La cuenca es de característica endorreica y tiene su longitud máxima de 39.5 km en la dirección noreste-suroeste y ancho máximo de 23.11 km en la dirección norte-sur, un perímetro de 110 km y una superficie total de 445 km^2 . Recibe de manera directa las aguas residuales de tres localidades urbanas principalmente: Ciudad Guzmán, San Sebastián del Sur y San Andrés Ixtlán, Jalisco, con un número de habitantes de 102 000, 7250 y 8 000, respectivamente (CONAPO, 2012).

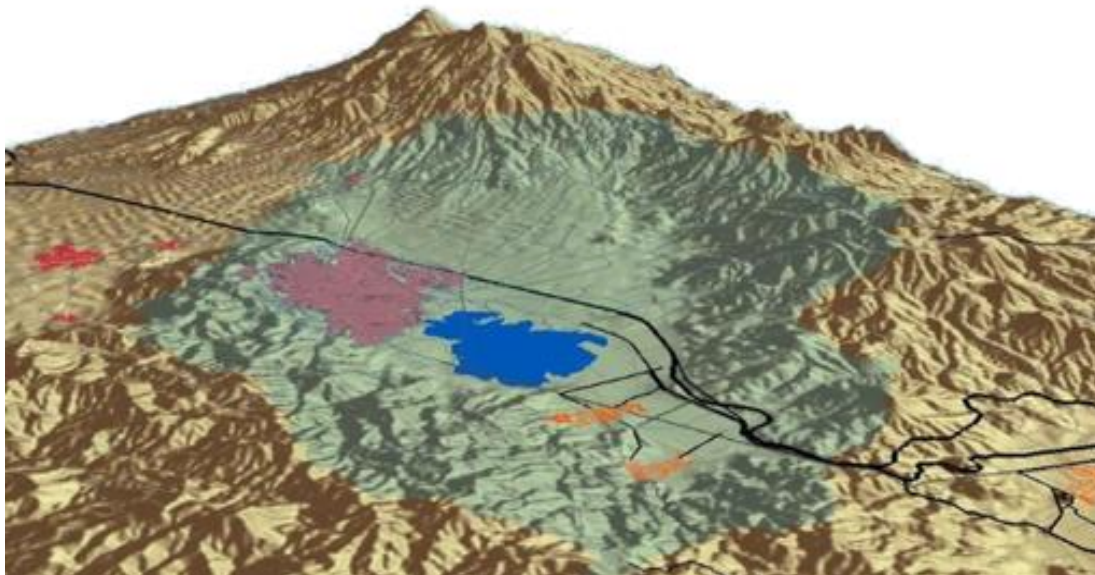


Figura 3. Delimitación de la cuenca de Zapotlán (INEGI, 1991).

4.2. Selección de sitios hidrométricos

Los sitios hidrométricos se seleccionaron de acuerdo a las zonas de descargas de los municipios a la laguna, así como zonas de asentamientos humanos, agrícolas y ganaderas. Se seleccionaron 14 sitios de muestreo, los cuales 5 son internos a la laguna de Zapotlán y 9 son afluentes a la misma. Los sitios externos se seleccionaron en base a su ubicación geográfica, lo que permitió que fueran representativas, debido a que tienen relación directa a la laguna. (Tabla 4) (Figura 4).

Tabla 4. Coordenadas y profundidades de los sitios hidrométricos

Sitios	Referencia	Localización geográfica	Profundidades
hidrométricos			
A	laguna de Zapotlán	19°45'49.0" N 103°28'55.0"W	1, 2 y 3 m
B	Zona profunda de la laguna	19°45'18.67"N 103°28'46.31"W	1, 3 y 4 m
C	DAR de Ciudad Guzmán	19°44'31.27"N 103°29'1.43"W	1 y 3 m
D	Canal/Cofradía del Rosario	19°46'26.83"N 103°29'6.17"W	30 cm
E	Canal/Cofradía del Rosario	19°46'26.85"N 103°29'5.94"W	30 cm
F	Canal/Cofradía del Rosario	19°46'24.68"N 103°29'6.17"W	30 cm
G	Remo y Canotaje CODE	19°45'03.0"N 103°27'58.0"W	30 cm
H	Canal/Puente	19°43'14.0"N 103°29'27.0"W	30 cm
I	Área Fragmentada	19°44'12.0"N 103°28'29.0"W	30 cm
J	Canal/Frente a los aguacateros	19°44'33.0"N 103°28'19.0"W	30 cm

	Noria	19°46'11.0"N 103°28'40.0"W	30 cm
L	DAR de Gómez Farías	19°46'5.69"N 103°29'30.92"W	1 m
M	Canal PTAR	19°42'28.0"N 103°29'14.0"W	30 cm
N	Cerca a DAR	19°44'35.77"N 103°28'47.11"W	1 y 2 m

DAR: Punto de descarga de aguas residuales en la laguna de Zapotlán.

PTAR: Planta de tratamiento de aguas residuales.

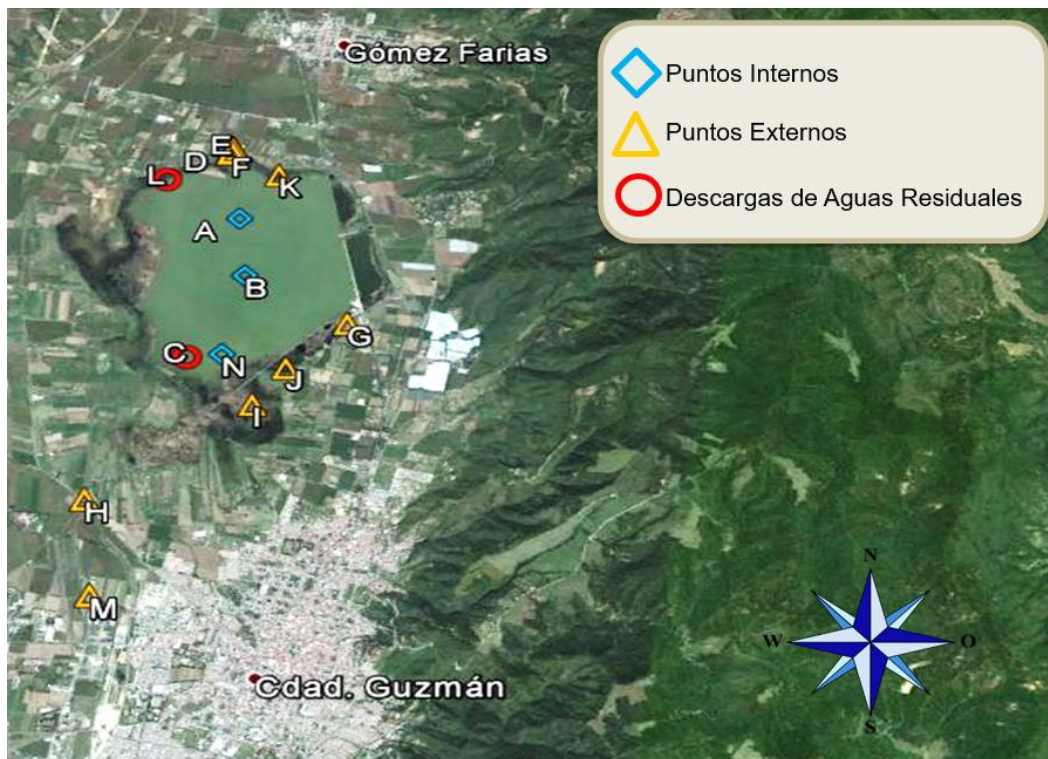


Figura 4. Área de estudio en la laguna de Zapotlán.

Las letras A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M y N representan los sitios de muestreo.

4.3. Periodo de estudio

La recolección de las muestras se realizó con una periodicidad mensual durante los meses de junio a octubre de 2016. Se hicieron 5 muestreos en las fechas que se indican en la Tabla 5.

Tabla 5. Fechas de muestreos

Muestreo	Fecha
1	16 de junio
2	20 de julio
3	08 de agosto
4	20 de septiembre
5	24 de octubre

4.4. Análisis de factores fisicoquímicos

Mediante una sonda multiparamétrica 6600 V2 marca YSI Environmental previamente calibrada se tomaron los siguientes parámetros fisicoquímicos en la laguna de Zapotlán:

- Oxígeno disuelto
- Temperatura del agua
- Conductividad
- Turbidez

Los sensores de esta sonda fueron verificados por la US EPA's Environmental Technology Verification Program.

El pH de la laguna se analizó utilizando un potenciómetro marca Oakton, Mod. Acorn pH 5⁺ calibrado.

4.5. Registro de parámetros ambientales

Se realizó el registro de los datos de la precipitación (mm/m²), temperatura ambiental (°C) y la humedad relativa (%) para determinar la influencia de estos parámetros ambientales sobre la

presencia de *Salmonella* spp. en las muestras de agua mensualmente, durante los meses de junio a octubre. La información climatológica fue obtenida del Servicio Meteorológico Nacional (<http://smn.cna.gob.mx/es/>). Se utilizaron los datos registrados por la estación meteorológica de Cd. Guzmán ID # 766560.

4.6. Toma de muestra

Las muestras de agua interna se recolectaron usando un muestreador tipo “Grab” o Van Dorn a diferentes profundidades y se colocaron en bolsas Whirl-Pak estériles de 300 mL de capacidad, que incluyen 3 pastillas de 10 mg de tiosulfato de sodio para neutralizar la posible presencia de cloro en el agua. La toma de muestra de agua en cada uno de los sitios externos, se tomaron aproximadamente a 30 cm por debajo de la superficie usando un muestreador que sujeta las bolsas Whirl-Pak. Todas las muestras se transportaron a 4°C al Laboratorio de Microbiología y Métodos Moleculares de CIATEJ y se procesaron en un periodo no mayor de 24 horas.

4.7. Aislamiento de *Salmonella* spp.

La presencia de *Salmonella* se determinó mediante la metodología establecida en el método estándar ISO 6579 (2002), con algunas modificaciones. Se tomaron 25 mL de cada muestra de agua en 225 mL de caldo de pre-enriquecimiento (agua peptonada al 1%) y se incubaron a 37°C durante 24 h. Posteriormente, se transfirieron alícuotas de 1 y 10 mL del pre-enriquecimiento a 9 mL de caldo de enriquecimiento Rappaport Vassiliadis R1 y 100 mL de Caldo Selenito Cistina, respectivamente se procedió a incubación a 37°C por 24 h. Finalmente, de los caldos de enriquecimiento se tomaron inóculos con un asa de platino estéril, y se sembraron por estriado en placas con medios selectivos Agar Entérico Hektoen (HE) y Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), los cuales se incubaron a 37°C por 24 h. Se incluyó un control positivo utilizando la cepa bacteriana *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, como control negativo *Escherichia coli* ATCC 25922 y blancos de medios de cultivos.

A las cepas aisladas se le designó un código interno LPM-C (Lugar de muestreo, profundidad, numero de muestreo, numero de la cepa presuntiva); ejemplo A2M4-2 (Punto A, 2 metros de

profundidad, muestreo #4, cepa presuntiva 2).

4.8. Purificación

Del crecimiento bacteriano en cada placa con medio selectivo, se seleccionaron de tres a cuatro colonias características (halo transparente con el centro negro, igual para ambos medios) del género *Salmonella*, la cual fue sembrada nuevamente por estriado en medio selectivo HEKTOEN y XLD y se incubó a 37°C por 24 h. Esto se llevó a cabo hasta obtener un cultivo puro sin contaminación. Finalmente, se tomó una colonia pura y se inoculó en caldo tripticasa de soya (TSB) y se incubó a 37°C por 24 h. Se incluyó un control positivo utilizando la cepa bacteriana *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, como control negativo *Escherichia coli* ATCC 25922 y blancos de medios de cultivos.

4.9. Confirmación por PCR

La confirmación del género *Salmonella* se realizó por medio de PCR utilizando la metodología descrita por Chiu y Ou (1996). Los oligonucleótidos utilizados son: *InvA1* (Sentido: 5' ACA GTG CTC GTT TAC GAC CTG AAT 3') e *InvA2* (Antisentido: 3' AGA CGA CTG GTA CTG ATC GAT AAT 5').

4.10. Lisis celular

Se tomó una colonia pura del género *Salmonella* y se inoculó en 5 mL de caldo tripticasa de soya (TSB). Esta colonia se homogenizó y se incubó a 37°C durante 24 h. Del cultivo bacteriano, se tomó una alícuota de 1.5 mL y se centrifugó en una centrifuga a 16,000 x g por 5 min, se eliminó el sobrenadante, se agregó 1 mL de agua nanopura. Este paso se repitió dos veces. Una vez eliminado el sobrenadante del paso anterior se agregó 200 µL de agua nanopura, para resuspender las células bacterianas. Finalmente, la suspensión bacteriana se colocó en un baño de agua a 100°C durante 5 min para ocasionar la lisis celular y liberar el ADN bacteriano.

4.11. Condiciones para PCR

La mezcla de reacción de PCR se realizó en un volumen de 25 μL . Los reactivos, la concentración y el volumen de los componentes se muestran en el Tabla 6. Una vez realizada la mezcla, se programó las distintas etapas del proceso de amplificación del ADN en un termociclador en gradiente, incluyendo un ciclo por 10 min a 94°C , para la activación de la enzima. Posteriormente, se realizó 30 ciclos de 30 s a 94°C , para la desnaturalización del ADN; 30 s a 56°C , para el alineamiento de los oligonucleótidos y 2 min a 72°C para la elongación. Finalmente, un ciclo de 10 min a 72°C para la extensión final y la reacción se estabiliza a 4°C .

Tabla 6. Componentes de la mezcla maestra para PCR

Reactivos	Concentración inicial	Volumen	Concentración final
Oligonucleótido 1	10 μM	2.5 μL	1 μM
Oligonucleótido 2	10 μM	2.5 μL	1 μM
DNTPs	10 μM	1.0 μL	1 μM
Tampón	10 X	2.5 μL	1X
MgCl₂	25 mM	1.5 μL	1.5 mM
ADN polimerasa	5 U μL -1	0.125 μL	0.025 μL
Agua nanopura		11.875 μL	
Lisado bacteriano		3.0 μL	

μM ; micromolar, mM; milimolar, U μL -1; unidades microlitro -1, μL ; Microlitro

4.12. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos obtenidos de la amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para ello se procedió a pesar 1 g de agarosa y se agregó a 100 mL de Tris Acetato EDTA (TAE) 1X. Posteriormente, se disolvió en un horno de microondas, después se agregó 2.5 μL de GelRed 10,000X. Se depositaron sobre el molde para la cámara de electroforesis con su respectivo peine para formar los pocillos donde se depositaron 10 μL del producto de PCR.

Finalmente, en un pocillo se colocó el marcador de peso molecular de 100 pb como patrón de referencia para las bandas generadas.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis (cámara de electroforesis marca BioRad) a un voltaje de 90 mV durante 80 min. Una vez efectuada la electroforesis, los fragmentos amplificados se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (BioRad Gel Doc XR+). La prueba se consideró positiva, cuando se observó una banda de 244 pb, la cual se comparó con el marcador de 100 pb. En todos los experimentos se corrió un control positivo (lisado de ADN de la cepa bacteriana *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028), control negativo (*Escherichia coli* ATCC 25922), el blanco del medio de cultivo y un blanco de PCR (mezcla sin ADN molde).

4.13. Preservación bacteriana

Las cepas de *Salmonella* purificadas y confirmadas se preservaron en una mezcla de caldo TSB y Glicerol (3:1). Para esto, se procedió a tomar una colonia de *Salmonella* pura y confirmada, se inoculó en 10 mL de TSB, se mezcló (vórtex) y se incubó a 37°C durante 24 h. La preservación se realizó por triplicado en tubos eppendorf de 600 µL donde, 300 µL correspondían a la mezcla de TSB-Glicerol 1:3 y 300 µL de cultivo bacteriano. Los tubos se conservaron a -20°C, para su uso posterior en los análisis de serotipificación, resistencia a antimicrobianos y electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE).

4.14. Serotipificación

La serotipificación se realizó en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) de la Secretaría de Salud y se realizó por pruebas de seroaglutinación de acuerdo con el esquema de Kauffmann-White. Se usaron antiseros polivalentes de *Salmonella* O y H para obtener un diagnóstico presuntivo, y, posteriormente, la designación antigénica definitiva se determinó mediante antiseros monovalentes (Popoff *et al.* 2004).

4.15. Perfil de resistencia a antimicrobianos

El perfil de resistencia a antimicrobianos se llevó a cabo a través del método de difusión Kirby-Bauer, de acuerdo al Instituto de Estándares Clínicos (CLSI, 2005). Las cepas de *Salmonella* preservadas, se recrecieron en TSA y se incubaron a 37°C por 24 h.

Se preparó una suspensión bacteriana, seleccionándose dos o tres colonias aisladas previamente, y se colocaron en tubos con 3 mL de solución salina estéril a 0.87%. Se procedió a ajustar la suspensión en un biofotómetro (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), hasta alcanzar una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de MacFarland (concentración de 1 a 2 X10⁸ UFC/mL). De cada suspensión bacteriana se tomó una muestra con un hisopo estéril, se rotó contra la pared del tubo para eliminar el exceso de inóculo y se estrió en las placas de agar Müeller Hinton (Bioxón, México) tres veces haciendo una rotación de 60° entre una estría y otra para asegurar una adecuada distribución del inóculo. Así como también, se estrió dos o tres veces por la circunferencia de la placa para asegurar la inoculación sobre las orillas. Esto se llevó a cabo por duplicado. Finalmente, se colocaron los discos de antibióticos (Oxoid, USA) en las placas y se incubaron a 35°C por 24 h. Se incluyó un control utilizando la cepa bacteriana *Escherichia coli* ATCC 25922. Los antimicrobianos a utilizar se muestran en el Tabla 7.

Transcurrido el tiempo de incubación, y con la ayuda de un vernier calibrado caliper, se midió el diámetro del halo de inhibición de crecimiento bacteriano para cada disco generado en mm. Los resultados se reportaron como Resistente, Intermedio o Susceptible, basados en las tablas para enterobacterias del Instituto de Estándares Clínicos (CLSI). Se consideraran multiresistentes (MDR) a las cepas con resistencia a dos o más antibióticos de diferentes clases.

Tabla 7. Descripción de antibióticos usados para susceptibilidad antimicrobiana.

Clase	Antimicrobiano	Carga (µg)	R (mm)	I (mm)	S (mm)	Referencia
Aminoglucósidos	Apramicina	30	≤14	13-14	≥15	CLSI,2008
	Amicacina	30	≤14	15-16	≥17	CLSI,2008

	Estreptomina	10	≤11	12-14	≥15	CLSI,2008
	Gentamicina	10	≤12	13-14	≥15	CLSI,2008
	Kanamicina	30	≤13	14-17	≥18	CLSI,2008
Penicilinas	Ampicilinas	10	≤13	14-16	≥17	CLSI,2008
B-Lactámicos	Amoxicilinas /Ácido Clavulanico	20/10	≤13	14-17	≥18	CLSI,2008
Carbacefem	Imipenem	10	≤13	14-15	≥16	CLSI,2008
Cefalosporinas	Cefalotina	30	≤14	15-17	≥18	CLSI,2008
	Cefoperazona	30	≤24		≥25	Andrews,2008
	Ceftriaxona	30	≤13	14-20	≥21	CLSI,2008
	Ceftazidime	30	≤14	15-17	≥18	CLSI,2008
Fenicoles	Cloranfenicol	10	≤12	13-17	≥18	CLSI,2008
Fluorquinolonas	Ciprofloxacino	5	≤15	16-20	≥21	CLSI,2008
Polipéptidos	Colistin Sulfato	25	≤14		≥15	Andrews,2008
Quinolonas	Ácido Nalidixico	30	≤13	14-18	≥19	CLSI,2008
Sulfamidas	Trimetoprina/Su lfametoxazol	25	≤10	11-15	≥16	CLSI,2008
Tetraciclinas	Tetraciclina	10	≤14	15-16	≥19	Andrews,2008

4.16. Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)

Para la subtipificación molecular de *Salmonella* spp. de muestras de agua se siguió el protocolo estandarizado por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, (CDC, 2004). Se crecieron todas las cepas aisladas en TSA y se incubaron a 37°C durante 24 h. Se tomó una colonia y se transfirió a 5 mL de suspensión bacteriana, acto seguido, se ajustó la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a 610nm (densidad óptica 0.6-0.8, absorbancia ideal 0.8). Posteriormente, en un tubo de microcentrífuga se transfirió 400 µL de la suspensión celular y se le añadió 20 µL de proteinasa K (20 mg/mL), se mezcló con 400 µL de agarosa de bajo punto de fusión al 1% y un preparado de dodecil sulfato de sodio con TE (Tris 10 nM, EDTA 1

mM, pH 8). Esta mezcla se colocó en moldes para obtener los bloques. Tres bloques se colocaron en tubos de polipropileno de 50 mL a los cuales se les agregó 5 mL de solución amortiguadora de lisis celular (N-Laurilsarcosina 1, Tris 50 mM, EDTA 50 mM, pH 8), 25 µL de proteinasa K y se incubaron a 54°C en un baño maría con agitación (100 rpm) durante 3 h. Posteriormente, los bloques se lavaron 6 veces con 15 mL de TE m50°C durante 15 min.

Los bloques se digirieron con 50 U de enzima de restricción *Xba*I (5'-TCTAGA-3'), durante 3 h a 37°C. Los bloques digeridos se cargaron en un gel de agarosa al 1% con TBE 10X (Tris 10 mM, Borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8). La PFGE se realizó en un sistema CHEF Mapper (BioRad, California) con un tiempo inicial de 2.2 s, tiempo final de 63.8 s, voltaje de 6v/cm y tiempo de corridos de 20.25 h a 14°C. Se utilizó *Salmonella* Braenderup H9812 como cepa de referencia digerida con la enzima *Xba*I. Los geles se tiñeron con 5 mL de GelRed (10, 0000X) durante 30 min en 400 mL de agua de calidad reactiva, seguido de dos lavados con el mismo tipo de agua. Finalmente, el ADN se visualizó en un fotodocumentador (Bio-Rad) y se tomó una fotografía para su análisis, el cual se llevó a cabo con el sistema BioNumerics versión 6.6.11 (Applied Maths, Belgium). Las relaciones clónales entre estos aislamientos se determinaron utilizando el método del grupo de pares no ponderados utilizando los enlaces medios (UPGMA), con tolerancia de posición de banda y optimización del 1,5% cada uno.

4.17. Análisis estadísticos

Los datos de los parámetros ambientales y fisicoquímicos fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para determinar variaciones temporales durante el periodo de estudio. Para determinar la relación entre la presencia de *Salmonella* con estas variables se realizó un análisis de componentes principales (ACP), que permite explicar con pocos factores gran parte de la variabilidad total de un estudio. Para la realización de estos análisis se utilizó el software Statgraphic Centurion XVI.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Parámetros ambientales

Se analizaron los datos de precipitación ambiental (mm/m^2), temperatura ambiental ($^{\circ}\text{C}$) y humedad relativa (%), los cuales fueron obtenidos del Servicio Meteorológico Nacional. Las siguientes tablas y figuras muestran un resumen de los datos ambientales registrados por la estación meteorológica 766560 de Ciudad Gúzman durante los meses de junio a octubre de 2016.

En la Figura 5 se observa los promedios de la temperatura ambiental durante el periodo de estudio de esta investigación, se puede observar que el promedio más alto de esta variable ocurrió en el mes de junio. Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de una vía, establecen que no existen variaciones temporales de temperatura ambiental, debido a que no existe diferencia estadísticamente significativa, puesto que el valor-P es mayor a 0.05, con un nivel de confianza del 95.0% y una desviación estándar de 1.23 (Tabla 8).

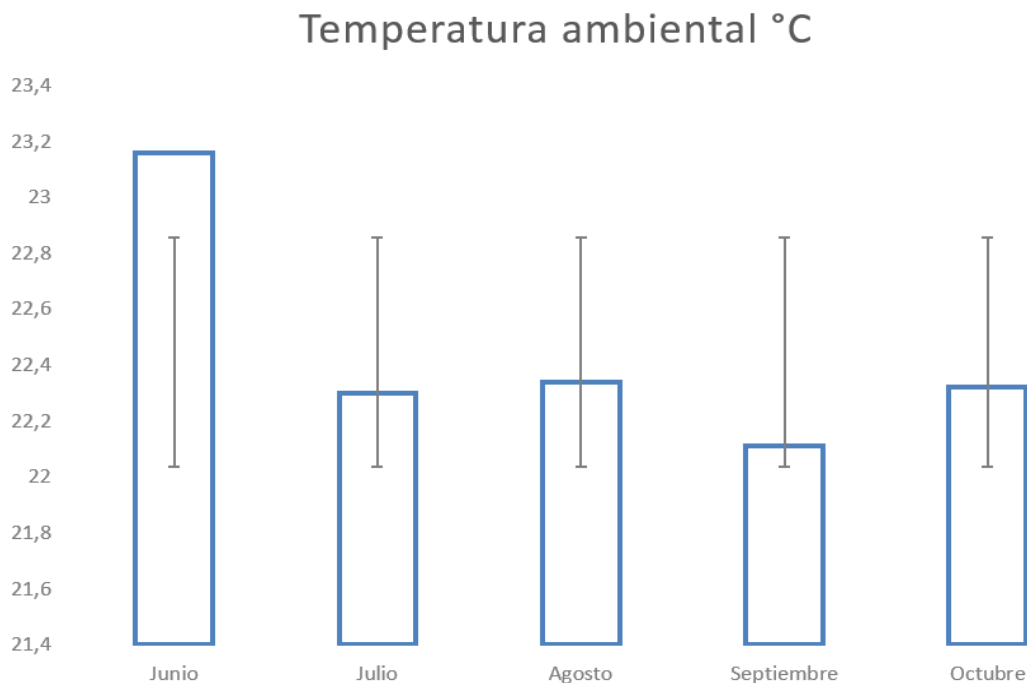


Figura 5. Representación gráfica del promedio de la temperatura ambiental registrada durante el periodo de estudio. (Estación meteorológica 766560, 2016).

Tabla 8. ANOVA de una vía de los valores de temperatura ambiental registrados durante el periodo de estudio.

Mes	Media °C	Desviación estándar	Valor-P
Junio	23.16	1.5483	0.0560
Julio	22.3	0.7916	
Agosto	22.34	1.1093	
Septiembre	22.11	0.9689	
Octubre	22.32	1.4221	
Total	22.42	1.23	

Durante los meses de julio-septiembre se observó que hubo más precipitación que en los otros meses de estudio, cuando ocurrieron estos eventos también aumentó la humedad relativa tal y como se esperaba (Figura 6 y 7). Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de una vía, muestran que existen diferencias estadísticamente significativas en la precipitación ambiental y en la humedad relativa durante el periodo de estudio, debido a que el valor-P es menor a 0.05, con un nivel de confianza del 95% y una desviación estándar de 7.49 y 10.65 respectivamente (Tabla 9 y 10).

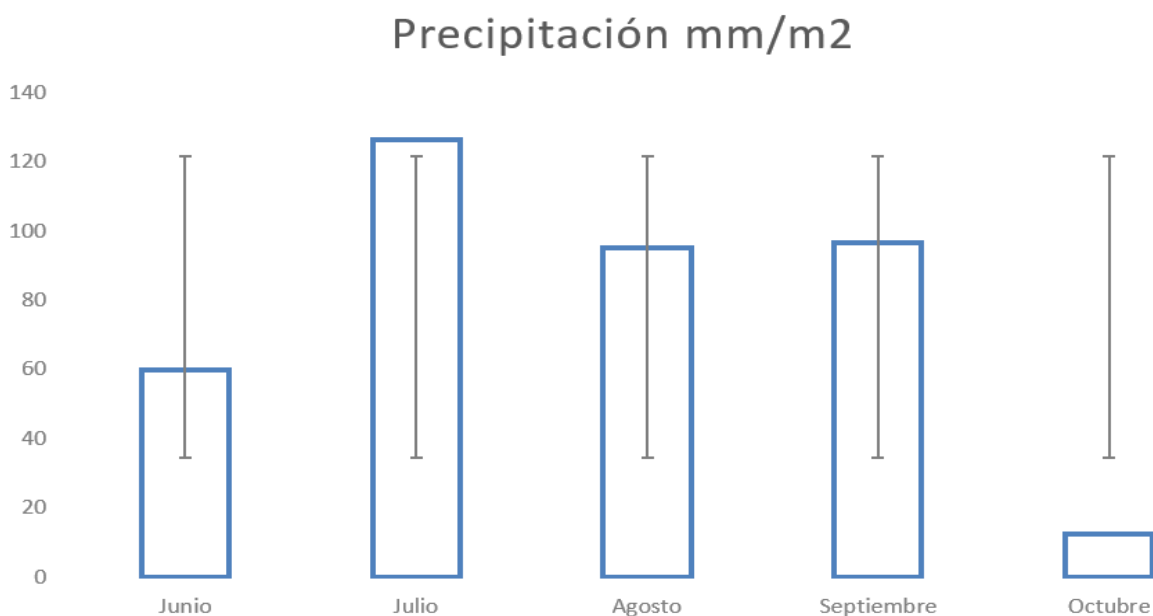


Figura 6. Representación gráfica de los valores totales mensuales de la precipitación ambiental registrados durante el periodo de estudio. (Estación meteorológica 766560, 2016).

Tabla 9. ANOVA de una vía de los valores de precipitación ambiental registrados durante el periodo de estudio.

Mes	Total mensual mm/m ²	Desviación estándar	Valor-P
Junio	59.68	7.2068	0.0463
Julio	126.49	13.82	
Agosto	95.01	6.0811	
Septiembre	96.52	5.8227	
Octubre	12.19	1.5976	
Total	389.89	7.4974	

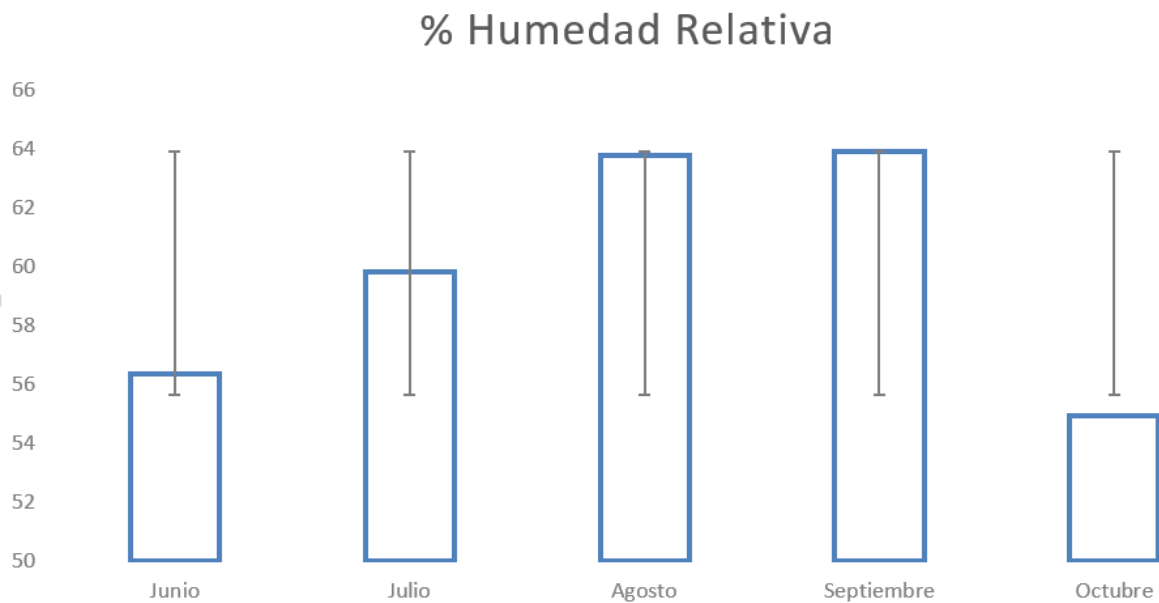


Figura 7. Representación gráfica del promedio de % de humedad relativa registrados durante el periodo de estudio ((Estación meteorológica 766560, 2016).

Tabla 10. ANOVA de una vía de los valores del % de humedad relativa registrados durante el periodo de estudio.

Mes	Media %	Desviación estándar	Valor-P
Junio	56.35	9.0169	0.0046
Julio	59.81	7.25	
Agosto	63.76	15.8655	
Septiembre	63.92	8.9535	
Octubre	54.91	7.6426	
Total	59.98	10.6558	

5.2. Parámetros fisicoquímicos

En el mes de agosto, fue imposible tomar las muestras en la laguna de Zapotlán, debido a que toda el área de la laguna estaba cubierta por lirio y eso imposibilitó el acceso en lancha, para la realización de la toma de muestras.

La Figura 8 muestra el promedio de la temperatura de la laguna de Zapotlán durante el periodo de estudio. La temperatura durante el periodo de estudio se mantuvo constante, con un promedio de 23.3°C. Este resultado coincide con lo reportado por Parra *et al.* (2012) donde obtuvieron una temperatura promedio de 21.76°C en la laguna de Zapotlán durante el periodo de mayo 2011-marzo 2012.

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de una vía, muestran que existen diferencias estadísticamente significativas en la temperatura del agua de la laguna de Zapotlán durante el periodo de estudio, debido a que el valor-P es menor a 0.05, con un nivel de confianza del 95% y una desviación estándar de 0.89 (Tabla 11).

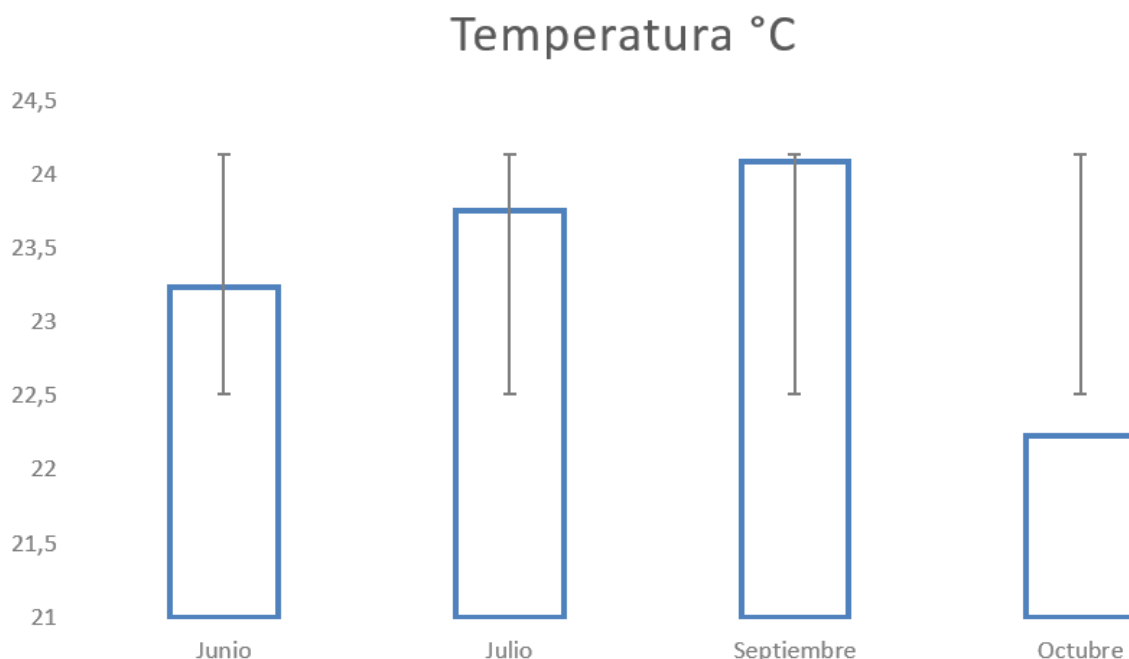


Figura 8. Representación gráfica del promedio de la temperatura de la laguna de Zapotlán durante el periodo de estudio.

Tabla 11. ANOVA de una vía de los valores de temperatura de la laguna de Zapotlán registrados durante el periodo de estudio.

Mes	Media °C	Desviación estándar	Valor-P
Junio	23.23	0.1635	0.0000
Julio	23.75g	0.4582	
Septiembre	24.08	0.5903	
Octubre	22.2	0.9367	
Total	23.32	0.8962	

El promedio de oxígeno disuelto durante el periodo de estudio fue de 3.64mg/L, estos resultados difieren con los resultados reportados en la laguna de Zapotlán por D'Urquiza, (2004); Santoyo *et al.*, (2015) y por Parra *et al.*, (2012), con valores de 7.71 mg/L, 7.1 ± 0.88 mg/L y 6.69 mg/L respectivamente (Figura 9). Los niveles bajos de oxígeno disuelto de la laguna Zapotlán (52.98% de saturación de O₂) indican que la calidad de agua es de clasificación dudosa, además que la contaminación es por materia orgánica proveniente de las descargas de aguas residuales que recibe este cuerpo de agua diariamente, o una alta tasa de actividad respiratoria provocada

por procesos naturales (ej. la caída de hojas en cuerpos acuáticos durante el otoño) (Lynch y Poole, 1979) (Tabla 13). Por otro lado, los microorganismos pueden formar una sobrepoblación, cuando hay altas cargas de materia orgánica en un cuerpo de agua, usando el oxígeno disuelto en grandes cantidades. Los niveles de oxígeno bajos en este estudio también se podrían asociar con una posible sobrefertilización en las áreas agrícolas y por medio de escorrentías, nitratos y fosfatos (ingredientes de los fertilizantes) llegaron a la laguna aumentando el número y el tamaño de las plantas acuáticas (lirio acuático). La respiración de las plantas utiliza mucho oxígeno disuelto disponible (Santoyo *et al.*, 2015). Se mencionó al inicio de los resultados que en el mes de agosto, fue imposible tomar las muestras en la laguna, debido a que toda el área del cuerpo de agua estaba cubierta por lirio acuático.

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de una vía, muestran que existen diferencias estadísticamente significativas en el % de saturación de O₂ de la laguna de Zapotlán durante el periodo de estudio, debido a que el valor-P es menor a 0.05, con un nivel de confianza del 95% y una desviación estándar de 1.66 (Tabla 12).

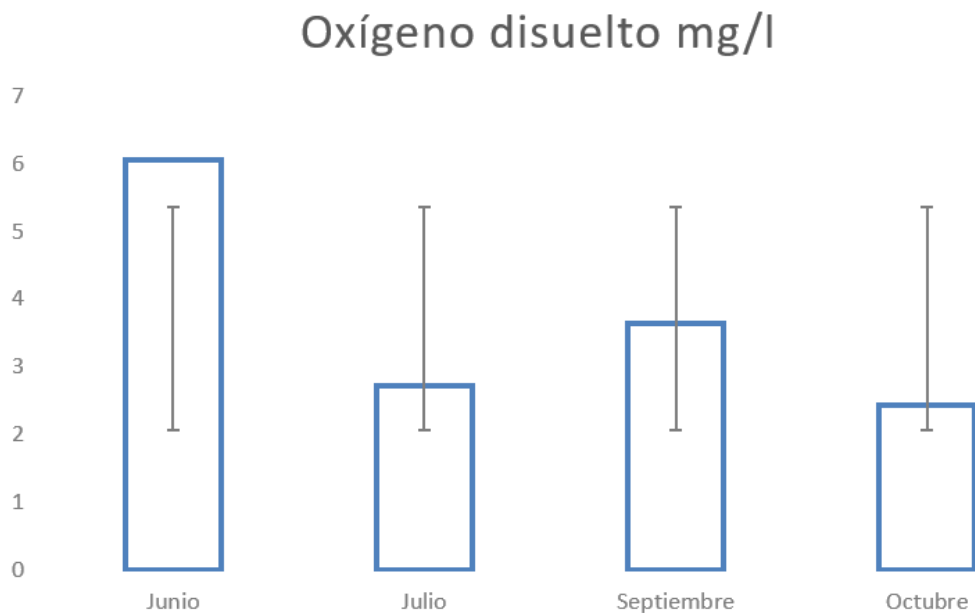


Figura 9. Representación gráfica del promedio de oxígeno disuelto de la laguna de Zapotlán durante el periodo de estudio.

Tabla 12. ANOVA de una vía de los valores de oxígeno disuelto de la laguna de Zapotlán registrados durante el periodo de estudio.

Mes	Media % de Saturación O ₂	Media mg/l	Desviación estándar	Valor-P
Junio	86.37	6.0528	1.1866	0.0000
Julio	39.2	2.7222	0.8246	
Septiembre	52.28	3.6383	0.865	
Octubre	34.1	2.4385	0.5566	
Total	52.98	3.6472	1.6682	

Tabla 13. Calidad del agua en función del % saturación de oxígeno en cuerpos acuáticos.

Calidad	% Saturación de Oxígeno
Buena	90
Regular	89-75
Dudosa	75-50
Contaminada	<50

(Lynch y Poole, 1979)

En la Figura 10 se observa que el promedio de la conductividad eléctrica durante el periodo de estudio, fue de 0.8832 mS/cm, esto difiere de un estudio previo realizado en la laguna de Zapotlán por D'Urquiza, 2004, donde reportó 0.0000928 mS/cm de promedio de CE. La conductividad eléctrica del agua también depende de la temperatura del agua, mientras más alta la temperatura, más alta sería la conductividad eléctrica (Fondriest Environmental, 2004). Durante la época de verano (junio-septiembre) se reportaron valores más altos, esta fue disminuyendo a través del tiempo.

Las exigencias de calidad para el agua de riego, a fin de prevenir la salinización de los suelos se basan en la concentración total de sales solubles, para fines de diagnóstico y clasificación, se puede expresar en términos de conductividad eléctrica y se dividen en cuatro clases: agua de salinidad baja (C1: < 0.250 mS/cm), agua de salinidad media (C2: 0.250 – 0.750 mS/cm), agua de salinidad alta (C3: 0.750 – 2.250 mS/cm) y agua de salinidad muy alta (C4: > 2.250 mS/cm)

(Richards, 1990). Con base a los valores de conductividad eléctrica y de RAS (Relación de Adsorción de Sodio) para los cuatro muestreos en la laguna de Zapotlán, el agua se clasifica como C3 (CE entre 0.75 y 2.25 mS/cm) (Ayers y Westcot, 1987), es decir, agua de “Salinidad Alta” y solamente debe usarse en suelos con buen drenaje y en cultivos resistentes a las sales (Can *et al.*, 2008).

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de una vía, muestran que existen diferencias estadísticamente significativas en la conductividad eléctrica de la laguna de Zapotlán durante el periodo de estudio, debido a que el valor-P es menor a 0.05, con un nivel de confianza del 95% y una desviación estándar de 0.1263 (Tabla 14).

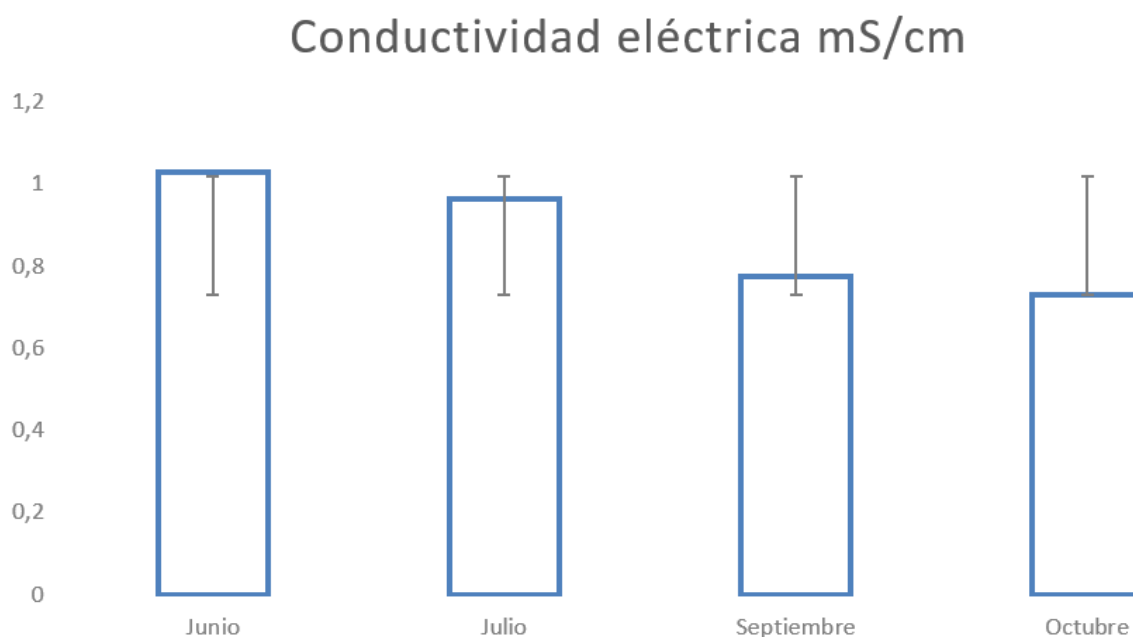


Figura 10. Representación gráfica del promedio de conductividad eléctrica de la laguna de Zapotlán durante el periodo de estudio.

Tabla 14. ANOVA de una vía de los valores de conductividad eléctrica de la laguna de Zapotlán registrados durante el periodo de estudio.

Mes	Media mS/cm	Desviación estándar	Valor-P
Junio	1.02671	0.0025	0.0000

Julio	0.96422	0.0068
Septiembre	0.774833	0.0222
Octubre	0.728571	0.0213
Total	0.883241	0.1263

En la Figura 11 se observa que el promedio de la turbidez durante el estudio fue de 58.73 NTU, estos resultados difieren de un estudio realizado en la laguna de Zapotlán por D'Urquiza, 2004, donde reportó un promedio de turbidez de 72.18 NTU en la laguna. La turbidez está directamente relacionada con el proceso eutrófico de un cuerpo de agua y puede deberse al incremento en la cantidad de fitoplancton por unidad de volumen, o de cualquier materia orgánica disuelta (concentración de sedimentos) (Kim *et al.*, 2001; Schroll, 2002; Weisner *et al.*, 1997). En este estudio, los valores más altos de turbidez se obtuvieron en épocas de lluvia, donde las partículas del suelo suspendidas en el agua por erosión pluvial pudieron ocasionar ese incremento (Goransson, 2013).

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de una vía, muestran que existen diferencias estadísticamente significativas en la turbidez de la laguna de Zapotlán durante el periodo de estudio, debido a que el valor-P es menor a 0.05, con un nivel de confianza del 95% y una desviación estándar de 25.88 (Tabla 15).

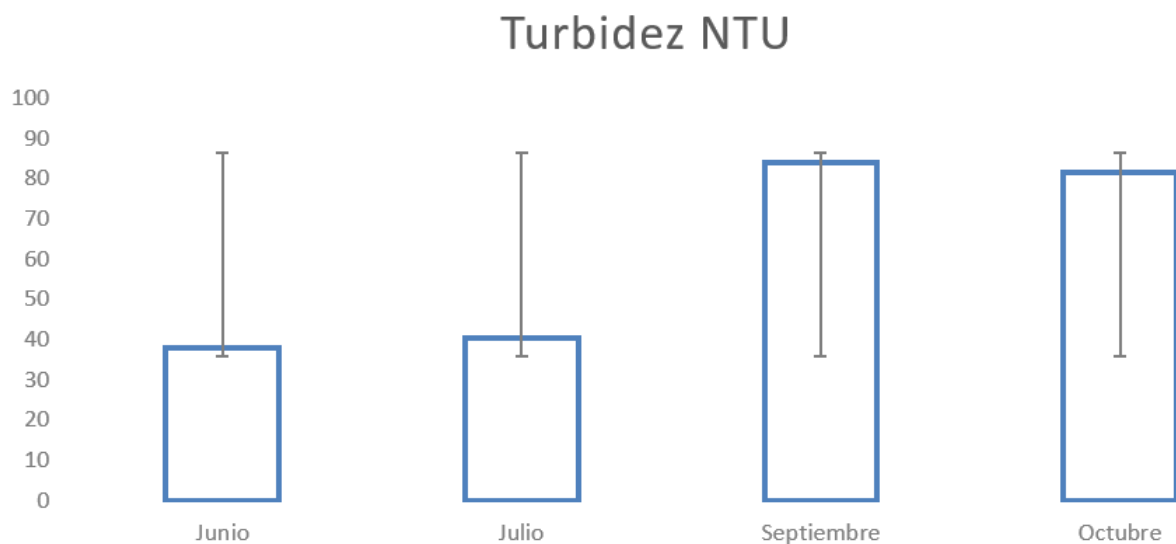


Figura 11. Representación gráfica del promedio de turbidez de la laguna de Zapotlán durante el periodo de estudio.

Tabla 15. ANOVA de una vía de los valores de turbidez de la laguna de Zapotlán registrados durante el periodo de estudio.

Mes	Media NTU	Desviación estándar	Valor-P
Junio	37.85	4.4839	0.0000
Julio	40.3	14.907	
Septiembre	84.05	19.8717	
Octubre	81.62	14.5044	
Total	58.73	25.8835	

En la Figura 12 se observa que el promedio obtenido con respecto al potencial de hidrógeno de 8.07 durante el periodo de estudio, coincidiendo con los resultados reportados por D'Urquiza, 2004; Santoyo *et al.*, 2015 y por Parra *et al.*, 2012, con valores de 9.30, 9.30 ± 0.23 , 9.11 respectivamente.

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de una vía, muestran que existen diferencias estadísticamente significativas en el pH de la laguna de Zapotlán durante el periodo de estudio, debido a que el valor-P es menor a 0.05, con un nivel de confianza del 95% y una desviación estándar de 0.22 (Tabla 16).

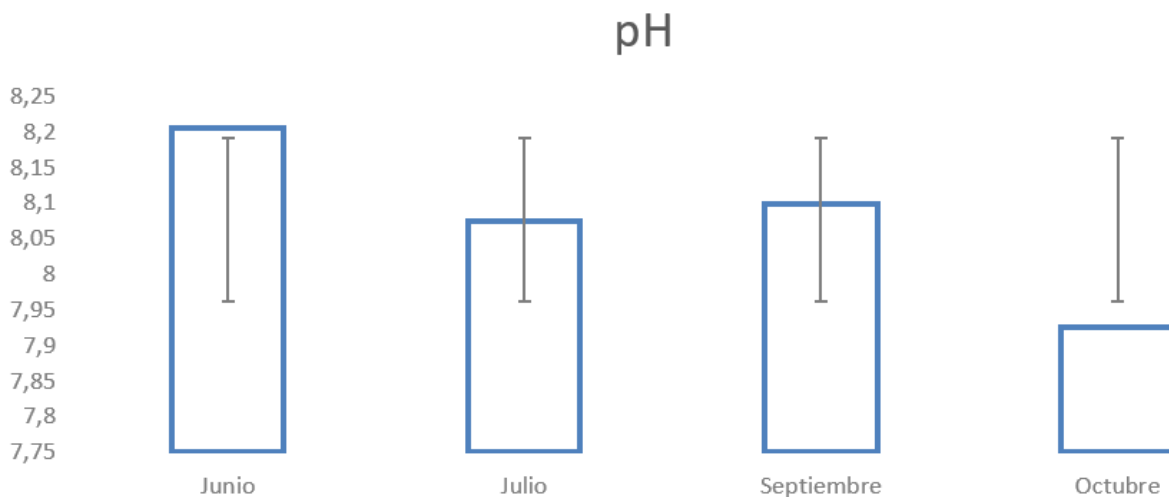


Figura 12. Representación gráfica del promedio de potencial de hidrógeno de la laguna de Zapotlán durante el periodo de estudio.

Tabla 16. ANOVA de una vía de los valores de pH de la laguna de Zapotlán registrados durante el periodo de estudio.

Mes	Media	Desviación estándar	Valor-P
Junio	8.2057	0.0475	0.1383
Julio	8.0755	0.3692	
Septiembre	8.0983	0.0749	
Octubre	7.9257	0.0629	
Total	8.0755	0.2264	

5.3. Presencia de *Salmonella* spp. en la laguna de Zapotlán

Se aislaron y se confirmaron 19 cepas del género *Salmonella enterica* subs. *enterica* de un total de 63 muestras de agua de los sitios de muestreo A, B, C, D, E F, G, H, I, J, K, L, M y N. La distribución de la presencia de *Salmonella* en base al sitio de muestreo se especifica en el Tabla 17.

Tabla 17. Presencia de *Salmonella* spp. en la zona de estudio por sitio de muestreo.

No. de muestras positivas por sitio de muestreo (positivas, %)														
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	Total
5/9	2/12	1/7	0/5	4/4	3/5	3/5	1/4	0/2	0/2	0/4	0/1	0/2	0/1	19/63
55.55%	16.33%	14.28%	**	100%	60%	60%	25%	**	**	**	**	**	**	31.74%

** Ausencia de *Salmonella*

Los resultados de este estudio muestran la presencia de *Salmonella* spp. en la laguna de Zapotlán, con una prevalencia del 31.74% en las muestras de agua. Esto coincide notablemente con trabajos publicados anteriormente que investigan la presencia de *Salmonella* en ambientes acuáticos, donde la prevalencia está reportada en valores del 30% aproximadamente (Arvanitidou *et al.* 2005; Johnson *et al.* 2003; Tavechio *et al.* 2002).

De las 19 cepas aisladas de *Salmonella*, 14 (73.68%) se encontraron en el primer muestreo, 3 cepas en el segundo (15.78%) y el resto en el cuarto muestreo (10.52%). No se encontró la presencia de *Salmonella* en el 3ro y 5to muestreo. La presencia de *Salmonella* en la zona de estudio se puede deber a su gran capacidad de sobrevivir y permanecer viable en el medio ambiente durante largos periodos de tiempo (Winfield y Grosiman, 2003). Sin embargo, factores como la capacidad de soportar una escasa disponibilidad de nutrientes,

fluctuaciones drásticas de temperatura y pH, así como el serotipo pueden determinar su sobrevivencia (Baudart *et al.*, 2000). Las comunidades asentadas en la cuenca de la laguna de Zapotlán descargan aguas residuales sin ser tratada debidamente (CEA, 2012), por lo que el posible origen de la contaminación por *Salmonella* puede provenir de esa fuente (Thurston *et al.*, 2002). Otra fuente de contaminación son los animales, ya que se sabe que el principal reservorio de *Salmonella* son las aves de corral, el ganado vacuno, el porcino y animales domésticos (Morse y Dunca, 1974) y durante el periodo de muestreo del presente estudio se observó la presencia de animales silvestres y ganado en las cercanías de los sitios de muestreo (laguna, noria y canales). Orozco *et al.* (2008) encontraron una mayor incidencia de *Salmonella* en tomates cuando se observó la presencia de animales salvajes dentro de los invernaderos, estos resultados demuestran que posiblemente estos animales pudieron estar en diferentes áreas, como los reservorios de agua de pozo para riego de los cultivos, contaminando así el producto. Gagliardi *et al.*, 2003 aislaron *Salmonella* spp. de agua de riego de canales y filtros por los que pasaba el agua, lo cual hace suponer origen ambiental o silvestre de las *Salmonellas* aisladas. Por otro lado, Duffy *et al.* 2005 analizaron muestras de frutos, superficies, agua de riego y suelo, y encontraron la mayor contaminación por *Salmonella* en agua de irrigación; estos autores propusieron que la interfase que se forma entre el agua y el suelo en los canales, puede servir de reservorio de microorganismos indicadores de contaminación fecal.

5.4. Relación entre *Salmonella* spp. y parámetros ambientales

La prevalencia de *Salmonella* spp. en la laguna de Zapotlán, pudo ser influenciada por efectos de los factores ambientales, tales como la temperatura ambiental, precipitación y humedad relativa. La precipitación y humedad relativa más bajas se presentaron durante el mes de octubre, seguida por el mes de junio, cuando esto ocurrió, se detectó la mayor presencia de *Salmonella* (14/19) (Tabla 18), por el contrario cuando se presentó mayor precipitación y humedad relativa, se encontró menor presencia de esta bacteria (5/19). Estos resultados coinciden con McEgan *et al.* (2013) que reportaron menor concentración de *Salmonella* spp., *E. coli* y coliformes fecales cuando la precipitación fue más alta, mencionan que esto se debió a los efectos de dilución en aguas superficiales. Por el contrario otros estudios han reportado correlaciones positivas entre

Salmonella y la precipitación, estos indican que el escurrimiento superficial desempeña un papel importante como conductor de *Salmonella* en ambientes acuáticos (Levantesi *et al.*, 2012). Cuando el rango de temperatura ambiental fue más alta se detectó la mayor presencia de *Salmonella* (14/19, junio). Estudios previos encontraron que las muestras de agua en temporadas cálidas, se asociaron con mayor tasa de detección de *Salmonella* (El-Gazzar y Marth, 1992; Polo *et al.*, 1998; Martinez-Urtaza *et al.*, 2004) (Tabla 10).

Tabla 18. Presencia de *Salmonella* spp. por fecha de muestreo

Muestreo	Fecha dd/mm/aa	Presencia de <i>Salmonella</i>
1	16-06-16	14
2	19-07-16	3
3	08-08-16	Ausencia
4	20-09-16	2
5	24-10-16	Ausencia

5.5. Relación entre *Salmonella* spp. y parámetros fisicoquímicos

Además de los factores ambientales, los parámetros fisicoquímicos del agua de la laguna como: temperatura y pH, pudieron determinar la presencia de *Salmonella* spp. en la laguna de Zapotlán. Las 19 cepas aisladas de *Salmonella* se detectaron en los primeros 2 muestreos (junio y julio) y en el cuarto (octubre) (Tabla 18). *Salmonella* es una bacteria anaerobia facultativa, por lo cual el oxígeno no es indispensable para su supervivencia. La temperatura óptima de crecimiento de *Salmonella* está en un rango de 35-43°C, en esta investigación la temperatura del agua se mantuvo prácticamente constante durante todo el periodo de estudio, lo que se puede inferir que otros factores gobernaron sobre esta bacteria para obtener la mayoría de los aislamientos durante el mes de junio, debido a que la temperatura más alta de *Salmonella* spp. se registró en los meses de Julio y Septiembre (24°C), donde se aislaron solo 5 cepas de 19. El valor promedio de turbidez se registró

durante el mes de junio (37.85 NTU), cuando ocurrió esto hubo más presencia de *Salmonella*, sin embargo se han reportado estudios donde mencionan que la turbidez no afecta la presencia de esta bacteria (Morales-Morales *et al.*, 2003; Leskinen *et al.*, 2010; Jimenez, 2011), El pH del agua de la laguna de Zapotlán se mantuvo constante durante todo este estudio, con un promedio de 8.07, no muy alejado del rango del pH óptimo de esta bacteria (7-7.5), además se sabe que *Salmonella* puede crecer en un intervalo de pH de 3.8–9.5 (Jay *et al.*, 1997). No existen estudios donde correlacionen el pH con la presencia de *Salmonella* en cuerpos de agua.

5.6 Distribución de la profundidad con la presencia de *Salmonella* spp.

En la Tabla 19 se puede observar que el 57.89% (11/19) de las cepas de *Salmonella* spp. se aislaron a 30 cm de profundidad, todos los sitios donde se aislaron estas cepas son de los afluentes que descargan en la laguna de Zapotlán, en estos puntos de muestreo no se analizaron los factores fisicoquímicos, debido al difícil acceso a esos canales, por lo tanto se puede suponer que la concentración de *Salmonella* spp. en esos sitios era mas alta y/o las condiciones de crecimiento eran más óptimas para la sobrevivencia de esta bacteria (Sherwood y Ray, 1969)

Tabla 19. Presencia de *Salmonella* spp. a diferentes profundidades

Profundidad	Presencia de <i>Salmonella</i>
30 cm	11
1 m	3
2 m	2
3 m	1
4 m	2

5.7. Análisis estadísticos

Análisis de componentes principales (ACP)

Se utilizó un análisis de componentes principales (ACP), el cual nos permite explicar las correlaciones entre conjuntos de valores con el objetivo de reducir el número de variables sin perder información.

El ACP nos indica que dos componentes (CP1 y CP2) son necesarios para interpretar el 80.28% de la variabilidad de los parámetros ambientales y fisicoquímicos con la presencia de *Salmonella* (Figura 13). El CP1 agrupó en su lado positivo la conductividad eléctrica, el oxígeno disuelto, la temperatura del agua y el pH, debido a que estas variables presentaron el mismo comportamiento, con valores constantes durante todo el estudio.

El CP2 agrupó en su lado positivo la turbidez, la precipitación y la humedad relativa, mientras que en su lado negativo agrupó la temperatura ambiental con la presencia de *Salmonella*. En este estudio cuando se observó mayor precipitación, humedad relativa y turbidez, no se encontró o se encontró menor presencia de esta bacteria. La presencia de *Salmonella* y la temperatura ambiental, están correlacionados con la mayor presencia de esta bacteria (14/19 cepas), detectadas durante el mes de junio, cuando el promedio de los valores de temperatura ambiental fueron más altos.

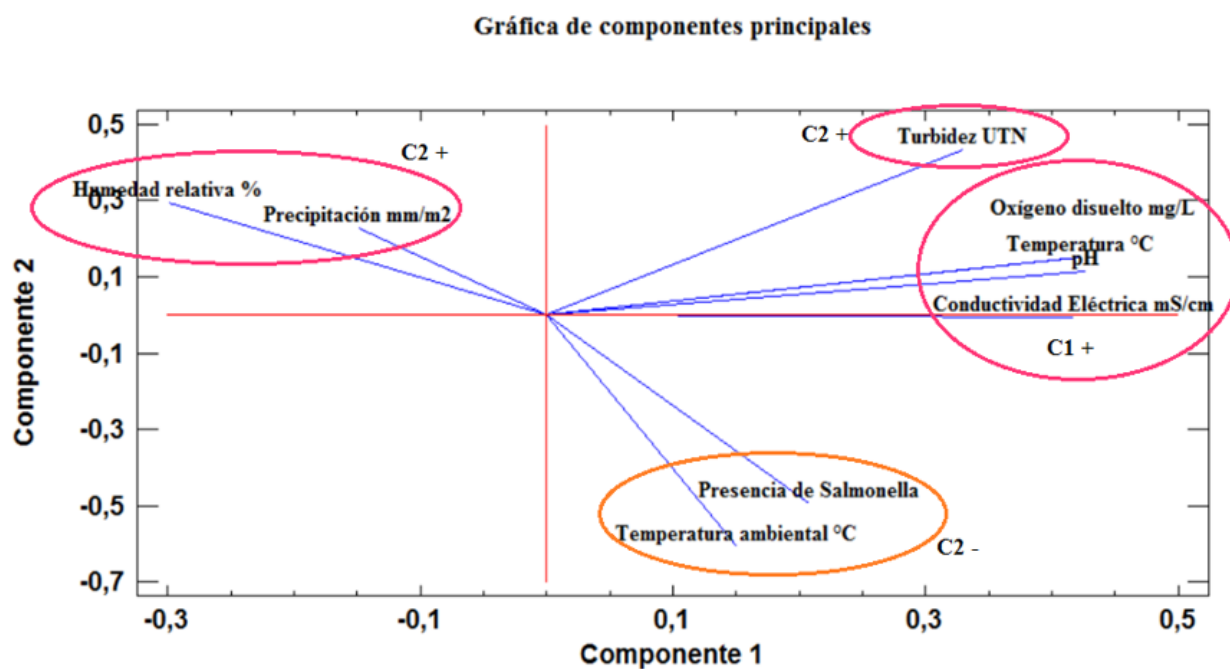


Figura 13. Análisis de componentes principales (ACP).

5.8 Serotipificación de *Salmonella* spp. aislada de la laguna de Zapotlán

De las 19 cepas de *Salmonella* spp. aisladas y confirmadas, se obtuvieron 3 serotipos diferentes y un serogrupo. Las cepas serotipificadas se identificaron como *Salmonella enterica* sub. *enterica*: *S. Agona*, *S. Typhimurium*, *S. Weltevreden* y el serogrupo *S. B. Salmonella Agona* fue el serotipo aislado más predominante con 13 (68.42%), seguido por el serogrupo *Salmonella B.* con 4 (21.05%), *S. Typhimurium* y *S. Weltevreden* con solo una cepa identificada en cada uno. Estos resultados coinciden con otros autores que han reportado diversidad de *Salmonella* spp. en ambientes acuáticos a pesar de que resultan ser pocos los serotipos predominantes (Baudart *et al.*, 2000; Simental *et al.*, 2008). Las cepas de *Salmonella* spp. predominantes reflejan la adaptabilidad de algunos serotipos a un ecosistema específico, sin embargo existen serotipos que carecen de la capacidad de sobrevivir en el medio ambiente por períodos prolongados de tiempo. Esto se debe a la presencia de determinantes genéticos y a modificación de sus características fisiológicas que le confiere la capacidad de adaptación en situaciones adversas (Winfield y Groisman, 2003).

Boletín Epidemiológico de la Secretaría de Salud (Dirección General de Epidemiología) no reporta los serotipos de *Salmonella* spp. que ocasionan las infecciones en humanos, solamente son notificados los casos de salmonellosis en general (DGEPI, 2010). Sin embargo, Gutiérrez-Cogco *et al.* (2000) señalan que *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Agona* y *S. Typhi* fueron los serotipos más frecuentemente aislados de fuentes humanas en México.

En el 2004 la Organización Mundial de la Salud (OMS), a través de la Red Global de Infecciones producidas por los Alimentos (GFN) reportó únicamente 15 cepas de *Salmonella* spp. aisladas del ambiente y que provienen de México, de la cual *S. Agona* fue identificada en 5 ocasiones (GFN, 2010). Alaniz *et al.* (1997) quienes señalan que en granjas de vacas, puercos y gallinas, se encontró la presencia de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* presentándose 25 serotipos diferentes, destacando a *S. Typhimurium*, además de encontrar estos serotipos distribuidos y compartidos entre dichos animales. Al igual, Vásquez *et al.* (2005) señalan que granjas de gallinas están infectadas por *Salmonella* resaltando que las cepas aisladas de aves fueron *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, concluyendo que las aves son una fuente de contaminación para humanos y una vía de diseminación de esta bacteria.

En otro estudio realizado en China en el 2015, identificaron la distribución de serotipos de *Salmonella* aislados de pollos, cerdos y vacas lechera. Los serotipos más predominante en este estudio fueron Typhimurium, Enteritidis y Agona. Los autores mencionan que las diferencias en las tasas de aislamiento pueden interpretarse en función de la región, los tipos de muestra, los serotipos, las estaciones de recolección, los métodos de cultivo, las metodologías de aislamiento, los medios de cultivo y las condiciones ambientales locales (Kuang *et al.*, 2015).

La gran diversidad de *Salmonella* puede atribuirse a que tienen habilidad de sobrevivir en un amplio rango de hospederos (Rabsch *et al.*, 2002), lo cual puede contribuir a la presencia de un nuevo serotipo en zona sur del estado de Jalisco. Además, la naturaleza ubicua de esta bacteria facilita que la bacteria pase de un hospedero al ambiente y regresar a un nuevo hospedero (Winfield y Groisman, 2003). Tal es así, que *Salmonella* es comúnmente aisladas de alimentos, animales, ríos, aguas costeras y suelos, pues estos sirven como ambientes en los que las bacterias pueden sobrevivir, constituyendo una fuente permanente de contaminación y facilitando la transmisión

entre hospederos (Lemarchand *et al.*, 2002; Winfield y Groisman, 2003).

5.9. Perfil Antimicrobiano de los Serotipos de *Salmonella* spp.

En México, se ha reportado que las dosis de antibióticos prescritos con fines terapéuticos en humanos, desempeñan un papel significativo en el aumento de cepas resistentes; esto incluye las sobre-prescripciones (no justificadas generalmente), la selección inadecuada de antibióticos y de dosis, auto-prescripciones y errores en las indicaciones de uso (Dresler *et al.* 2008). El análisis de perfil antimicrobiano mostró que el 94.8 % (18/19) de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas del agua de la laguna de Zapotlán fueron resistentes a uno o más de los antibióticos evaluados. El 52.63% (10/19) cepas presentaron resistencia a colistina, tetraciclina, ácido nalidíxico, sulfametoxazol y trimetoprima, mientras; que solo el 5.26% (1/19) cepa fue susceptible a todos los antimicrobianos usados (Figura 14).

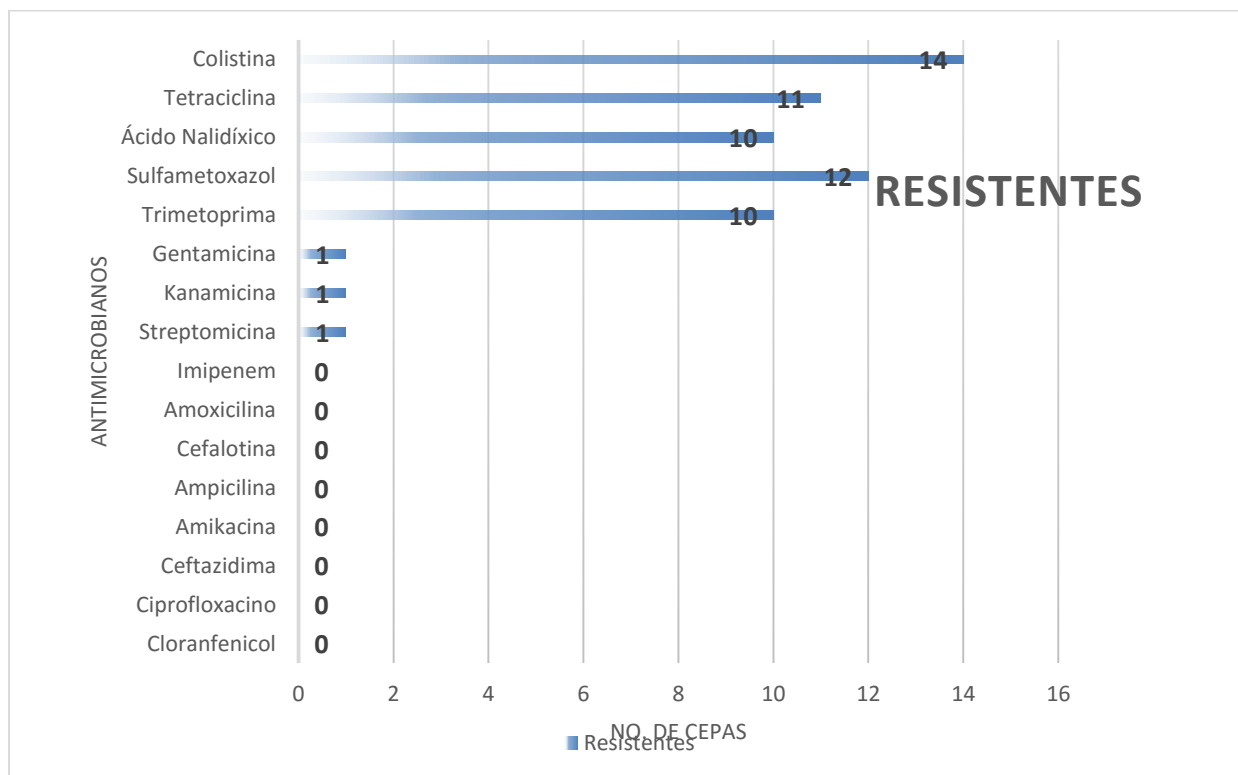


Figura 14. Resistencia de *Salmonella* spp. a diferentes antimicrobianos

Existen varios factores que promueven la resistencia a antibióticos en los microorganismos, entre ellos, el uso indiscriminado de antibióticos en la agricultura, en animales y en humanos, debido a prescripción inadecuada, falta de seguimiento a las indicaciones de uso y deficiencias en las políticas gubernamentales que especifiquen el uso racional de antibióticos en los sectores públicos y privados (Boerlin y Reid-Smith 2008).

Mhongole *et al.* (2017) determinaron el perfil antimicrobiano de *Salmonella* aisladas de aguas residuales y pescado tilapia en Tanzania. Los serotipos de *Salmonella* mostraron resistencia a 8 de cada 14 antimicrobianos: sulfamethaxazol (94%), estreptomycin (61%), tetraciclina (22%), ciprofloxacino y ácido nalidíxico (17%), trimetoprima (11%); gentamicina y cloranfenicol (6%), lo cual coincide con el presente estudio donde 18 cepas fueron resistentes a dichos antimicrobianos. Mhogole *et al.*, (2017) menciona que las aguas residuales es una fuente de contaminación por *Salmonella* en cuerpos de agua, productos alimenticios, incluyendo peces y cultivos de regadío; además, de generar resistencia en esta bacteria.

Las 19 cepas de *Salmonella* resistentes a los antimicrobianos se clasificaron en 16 perfiles diferentes (Figura 15), siendo colistina el antimicrobiano que estuvo presente en todos los perfiles de resistencia. Colistina se ha utilizado en la medicina veterinaria durante décadas, principalmente para la prevención y el tratamiento de infecciones por enterobacterias. Sin embargo, los datos relativos a la resistencia a la colistina en bacterias de animales y alimentos de origen animal son relativamente escasos, la mayoría de los datos relativos a los aislamientos clínicos están relacionados con *Escherichia coli* enteropatógena (Kempf *et al.*, 2016). En un estudio realizado por Morales *et al.* (2012), mencionan que la resistencia adquirida a colistina en diferentes especies de bacterias están aumentando, en este estudio analizaron 124 cepas de *S. enterica* de cerdos enfermos y estos mostraron que el 21% de las cepas analizadas fueron resistentes a colistina (Morales *et al.*, 2012)

Todos los serotipos encontrados presentaron al menos un perfil de resistencia, de los cuales *S. Agona* presentó resistencia múltiple (16 perfiles). *Salmonella* Weltevreden, Typhimurium y el serogrupo B. se encontró en sólo un perfil de resistencia (CL). (Figura 15).

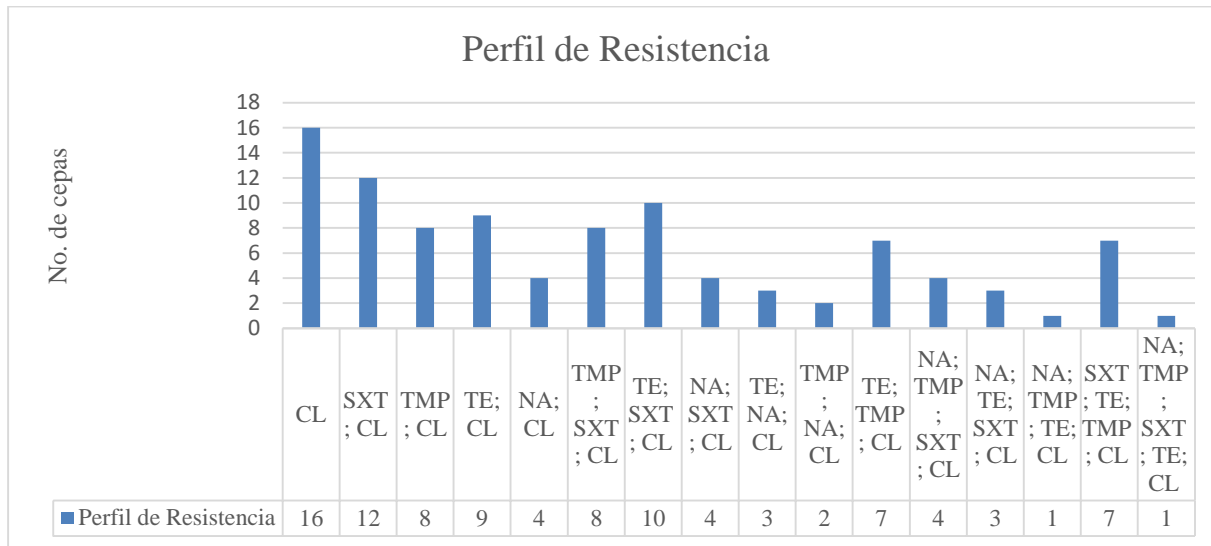


Figura 15. Perfiles de resistencia antimicrobiana de los serotipos de *Salmonella* aislados del agua de la laguna de Zapotlán.

CL: Colistina, TE: Tetraciclina, TMP: Trimetoprima, SXT: Sulfametoxazol, NA; Ácido Nalidíxico.

Las bacterias con múltiples perfiles de resistencia sugieren un contacto exacerbado con ambientes contaminados con antibióticos (Zansky *et al.*, 2002). *Salmonella* y otros grupos bacterianos adquieren la resistencia a antibióticos por mutaciones cromosómicas azarosas, por mutaciones de genes existentes, y a través de transducción, transformación y conjugación. Estos mecanismos involucran la transferencia de genes de resistencia a antimicrobianos por medio de ADN de plásmidos circulantes, tales como factor R, plásmidos conjugativos o elementos cromosómicos (Poppe *et al.*, 1996). El uso indiscriminado de antibióticos ha provocado la aparición de cepas bacterianas resistentes las cuales pueden ser transmitidas al humano a través del agua y alimentos contaminados.

5.10 Perfil genético de los serotipos de *Salmonella*

Las 19 cepas de *Salmonella spp.* aisladas fueron sometidas al análisis por Electroforesis en Gel de campos Pulsantes (PFGE). Se encontró que los 3 serotipos y un serogrupo de *Salmonella* analizados, presentaron 21 perfiles genéticos (designados X01 a X21).

Se observaron distintos perfiles genéticos para *S. Agona* (7 perfiles) y serogrupo B. (4 perfiles). *Salmonella* Typhimurium y Weltevreden fueron determinados a partir de una sola cepa, por lo cual se tuvo que hacer una comparación entre una cepa de cada perfil genético representativo de *S. Agona* y del serogrupo B con *S. Weltevreden* y Typhimurium, donde se identificaron 10 perfiles genéticos, sin embargo no se pudo hacer una comparación para obtener un porcentaje de similitud entre ellos, presentando solo un perfil genético cada una (*S. Weltevreden* y Typhimurium).

Las 13 cepas de *S. Agona* muestran 7 perfiles genéticos diferentes con un porcentaje de similitud del 56.6% (Figura 16), distribuidos en gran parte en los sitios de muestreo de los afluentes que descargan en la laguna de Zapotlán (7 cepas) y en los sitios internos de la laguna (6 cepas). El perfil X05 estuvo conformado por tres cepas, correspondientes al mismo lugar (afluente) y fecha de muestreo, pero diferente punto de muestreo, presentando un 95.0% de similitud. El perfil X06, estuvo conformado por cuatro cepas, dos de ellas son del mismo lugar (laguna), fecha y punto de muestreo, pero a diferentes profundidades. El resto de las cepas, son del mismo lugar (laguna) y fecha de muestreo, pero diferente punto de muestreo, presentando un 92.8% de similitud. También el perfil X07, conformado por dos cepas de la misma fecha de muestreo, pero diferente sitio y punto de muestreo, presentó un 79.5% de similitud.

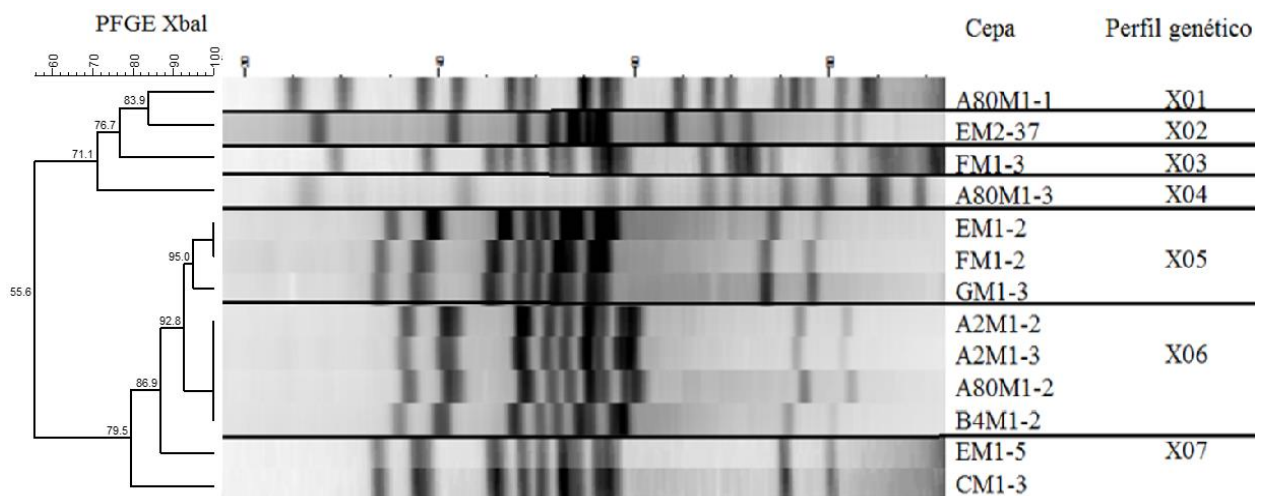


Figura 16. Dendrograma de *Salmonella Agona*.

El serogrupo B. arrojó cuatro perfiles genéticos con porcentaje de similitud del 59.5% (Figura 17). Este serogrupo se encuentra ampliamente distribuido en los afluentes que descargan en la laguna de Zapotlán (3 cepas) y solo una cepa fue aislada de la laguna de Zapotlán. Los perfiles X08, X09, X10 y X11 fueron aislados de diferentes sitios y fechas de muestreo cada uno. Revelaron que no existe ninguna similitud, es decir, son completamente diferentes con respecto al patrón de bandas. Por lo que no comparten una identidad genética.

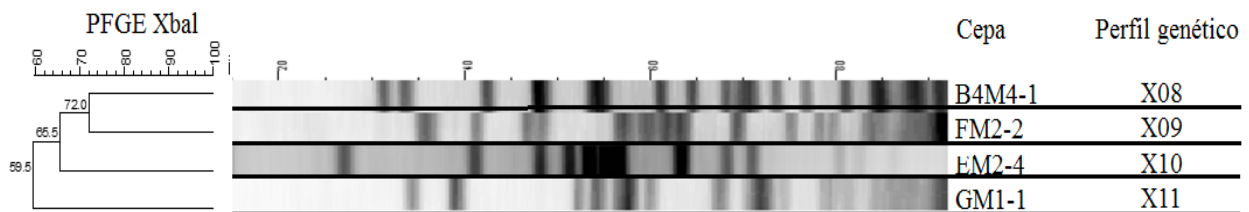


Figura 17. Dendrograma del serogrupo B.

Salmonella Typhimurium y Weltevreden fueron determinados a partir de una sola cepa, por lo cual no se pudo hacer una comparación para obtener un porcentaje de similitud, pero se analizaron estos dos serotipos entre una cepa de cada perfil genético representativo. El análisis de PFGE de los serotipos *S. Agona*, *S. Weltevreden*, *S. Typhimurium* y el serogrupo B arrojaron 10 perfiles genéticos, pero estos no mostraron un porcentaje de similitud entre ellos (Figura 18), sin embargo se observó en el perfil genético X15 una similitud del 96.6%, conformado por dos cepas (*S. Agona* y serogrupo B.), correspondientes al mismo sitio, punto y fecha de muestreo. Como se mencionó anteriormente las cepas aisladas y confirmadas para el género *Salmonella*, se mandaron serotipificar al InDre por medio del esquema Kauffmann-White, esta técnica reconoce 45 antígenos O y 119 antígenos H, los cuales han permitido la caracterización de 2,541 serovares (Lavalett *et al.*, 2009). Con respecto a los resultados obtenidos de esta serotipificación, 94.73% de las cepas (18/19) son del serogrupo B, mientras que sólo una cepa pertenece al serogrupo E (Weltevreden). Sin embargo 4 de las cepas pertenecientes al serogrupo B, fue imposible conocer su serotipo. Para serotipificar los serogrupos de *Salmonella*, se necesitan muchos sueros específicos para los antígenos flagelares de fase 1 y 2. El tipado de estos antígenos mediante procedimientos de aglutinación con sueros monoespecíficos es el método de referencia (Gold Standard), pero para realizarlo se requieren más de 250 sueros ag O y ag H,

sin embargo este método es incapaz de tipificar las cepas rugosas y mucoides, debido a que estas cepas no son aglutinadas por antisueros O, por lo tanto no se puede determinar el ag O (Terzolo, 2013).

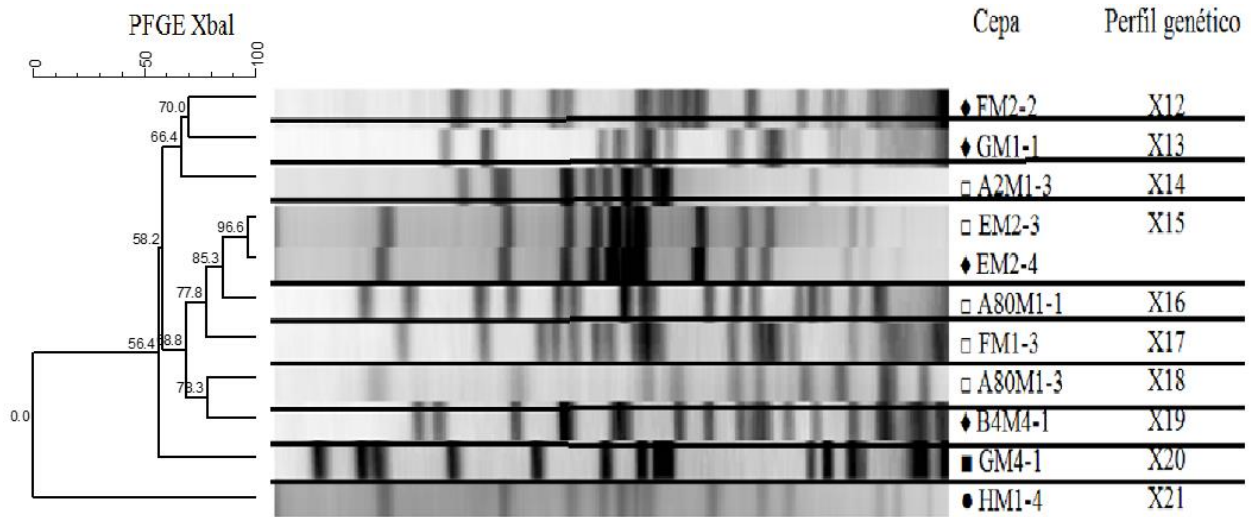


Figura 18. Dendrograma de comparación de *S. Typhimurium* y *Weltevreden* con una cepa de cada perfil representativo de *S. Agona* y del serogrupo B.

◆: Serogrupo B. □: *Salmonella Agona* ■: *Salmonella Typhimurium* ● *Salmonella Weltevreden*

S. Agona mostró tres poblaciones bien definidas que se adaptaron a diferentes regiones geográficas específicas: los perfiles X05, X06 y X07. El perfil X05 a los sitios E, F y G, el perfil X06 a los sitios A y B y el X07 a los sitios E y C (Figura 16), siendo 14 sitios de muestreo; en estos casos es cuando los perfiles de PFGE podrían servir para discriminar entre aislamientos. En este caso, el mantenimiento del perfil genético conservado de este serotipo se puede atribuir a la distribución geográfica restringida de las cepas, que no se adaptaron a nuevos ambientes (Green y Bohannan 2006). Esta situación también podría explicar los patrones indistinguibles obtenidos para el resto de los aislamientos del serotipo *S. Agona* y el serogrupo B. (Figura 16, 17 y 18).

La diversidad de perfiles de PFGE en los serotipos y serogrupo de *Salmonella* podría ser explicado por variaciones en el genoma de la bacteria, ya que durante el proceso de adaptación a condiciones adversas o nuevos ambientes, el microorganismo es capaz de integrar material genético nuevo por el mecanismo de transferencia horizontal (Prosser et al. 2007).

La distribución de los serotipos de *Salmonella* aislados en el presente estudio, pueden atribuirse al transporte y el desprendimiento de esta bacteria por el ganado y la vida silvestre de una localidad, a través de vehículos ambientales como son los cuerpos de agua (Ferguson et al., 2003). Lo cual evidencia la capacidad de sobrevivencia de estos serotipos en el ambiente, lo que contribuye a su distribución en una localidad.

La diversidad de los perfiles en el serotipo *S. Agona* y el serogrupo B aisladas de la laguna de Zapotlán y sus afluentes, podría deberse a que cerca de los sitios de muestreo se observaron animales silvestres y ganado, además también podría atribuirse a las descargas de aguas residuales que se vierten a la laguna. Estas dos fuentes pudieron haber depositado heces de animales y/o personas infectadas dentro de la laguna y de sus afluentes, y de esta manera haber contribuido a su contaminación. Gorski *et al.* en el (2010) reportan 40 perfiles de PFGE de *S. enterica*, Typhimurium, Montevideo e Infantis, aislados de diferentes fuentes (agua, fauna silvestre, ganado, alimento, suelo y sedimento). Dichos perfiles se encontraron dispersos alrededor de un condado de Monterey California, una importante región agrícola de los Estados Unidos. Kérouanton *et al.* (2007) obtuvieron 17 perfiles de PFGE de *S. Agona*, distribuidos en alimentos y en el ecosistema (agua de mar, río y aguas residuales), en este estudio vincularon un patrón PFGE de un brote de *Salmonella* Agona de una formula en polvo infantil reportada en la base de datos moleculares (NCBI) (Espie *et al.*, 2005b). En este brote, las muestras tenían el mismo patrón PFGE. Basado en la capacidad del método de PFGE para discriminar aislamientos de *Salmonella* Agona eficazmente, los investigadores concluyeron que los aislamientos humanos y alimentarios fueron probablemente epidemiológicamente vinculados.

El análisis de PFGE indicó que algunos de los aislados de *Salmonella* son indistinguibles y / o altamente relacionados. Por ejemplo, parece que la misma cepa fue aislada de múltiples muestras de la misma localización en la misma fecha (X06, X05); Sin embargo, hay casos de la misma cepa aislada en la misma fecha pero de diferentes lugares (X06, X07). Esto sugiere que algunas cepas pueden persistir en el ambiente el tiempo suficiente para ser transportadas a diferentes lugares de la cuenca.

Se ha informado que *Salmonella* persiste en el medio ambiente durante varios meses, a más de un año (Lanzas *et al.*, 2010; Thomason *et al.*, 1975; Winfield y Groisman, 2003). Alternativamente, puede haber una o más fuentes que mantienen el patógeno (por ejemplo, colonización) y diseminar el organismo continuamente en el medio ambiente. El monitoreo de *Salmonella* en esta región podría facilitar las evaluaciones de los factores temporales y espaciales relevantes para la incidencia de *Salmonella*, seguimiento de fuentes, subtipado de mayor resolución y comparaciones con datos similares de otras regiones agrícolas en Jalisco.

El análisis de PFGE es una alternativa para conocer la diseminación de *Salmonella* en la laguna de Zapotlán, y así saber si las cepas están relacionadas con las aguas residuales municipales de la región y/o fauna silvestre o ganado. Sin embargo en este estudio no se tomaron muestras de las heces de los animales, por lo tanto no se podría concluir que esta fuente esta involucrada en la contaminación de la laguna por esta bacteria.

6. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demuestran la presencia de *Salmonella* spp. en la laguna de Zapotlán y de los principales cuerpos de agua que descargan en la misma.

Existe diversidad ambiental de *Salmonella* spp. en el agua de la laguna de Zapotlán y de los principales cuerpos de agua que descargan en la misma, predominando el serotipo Agona, seguido por el serogrupo B., Typhimurium y Weltevreden.

Los parámetros ambientales y fisicoquímicos contribuyen con la prevalencia de *Salmonella* sobre su diseminación durante el periodo de estudio en la laguna de Zapotlán.

Las cepas de *Salmonella* spp. presentan resistencia y múltiresistencia a antimicrobianos, como colistina. La resistencia de las cepas de *Salmonella* spp. a diferentes antimicrobianos evaluados, hace suponer que el uso indiscriminado de antimicrobianos en la agricultura, medicina veterinaria, prescripciones inadecuadas en la población, así como deficiencias en las políticas gubernamentales que especifiquen el uso racional de antibióticos en los sectores públicos y privados.

El PFGE mostró que existe variabilidad genética intra serotipo de *Salmonella* Agona y del serogrupo B encontrándose más de 3 perfiles genéticos.

La diversidad ambiental de *Salmonella* se podría interpretar como una dinámica de contaminación dominada por múltiples fuentes de este patógeno (agua residual municipal, animales silvestres y ganado) y de su prevalencia por largos periodos en el ambiente. Estos resultados no permiten establecer rutas de diseminación aparentes de este patógeno, por lo que esta situación plantea la necesidad de explorar nuevos factores implicados en la diseminación de esta bacteria en la laguna de Zapotlán.

7. REFERENCIAS

Aguilar, A., Barocio, R. (2001). México, Visión 2025. Colegio de Ingenieros Civiles de México. Recuperado de: http://www.cicm.fi-p.unam.mx/cicm/WEB_Congreso/Agua_medio_ambiente.html.

Alaniz, O.R., Ríos, I.M., Rosas, B.B., Morales, J. A. (1997). Resistencia a antimicrobianos de cepas aisladas de fuentes animales. *Veterinaria México. Volumen 28 (3)*, 215-220.

Altekruse, S.F., Cohen, M.L., y Swerdlow D.L. (1997). Emerging foodborne diseases. *Emerging Infectious Disease. Volume (3)*, 285-293.

Ariel Construcciones S.A. de C. V. (1989). Estudio Geohidrológico de la zona de Tesistán-Atemajac, Estado de Jalisco. Comisión Nacional del Agua, Gerencia de Aguas Subterráneas, Contrato SGA-89-47.

Arvanitidou, M., Kanellou, K., y Vagiona, D.G. (2005). Diversity of *Salmonella* spp. and fungi in northern Greek rivers and their correlation to fecal pollution indicators. *Environmental Research. Volume (99)*, 278-284

Ayers, R. S., y Westcot, D. W. (1987). La calidad del agua y su uso en la agricultura. Estudio FAO Riego y Drenaje 29, Rev. 1. Roma: FAO.

Baggesen, D.L., Wegener, H.C., Bager, F., Stege, H., y Christensen, J. (1996). Herd prevalence of *Salmonella* enterica infections in Danish slaughter pigs determined by microbiological testing. *Preventive Veterinary Medicine. Volume (26)*, 201-213.

Baudart, J., Lemarchand, K., Brisabois, A., Lebaron, P. (2000). Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. *Applied and Environmental Microbiology. Volume 66 (4)*, 1544-1552.

Batz, M., Hoffmann, S., Morris, J.G. (2014). Disease-Outcome Trees, EQ-5D Scores, and Estimated Annual Losses of Quality-Adjusted Life Years (QALYs) for 14 Foodborne Pathogens in the United States. *Foodborne Pathogens and disease. Volume* (11).

Bello, P.L.A., Ortiz, D.D.M., Perez, M.E., y Castro, D.V. (1990). *Salmonella* en carnes crudas: Un estudio en localidades del Estado de Guerrero. *Salud Pública de México. Volume* (32), 74-79.

Berrang, M., Ladely, S., Simmons, M., Fletcher, D., Fedorka-Cray, P. J. (2006). Antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from retail chicken. *Journal of Poultry Science. Volume* 5 (4), 351-354.

Blaha, T. (1995). *Epidemiología especial veterinaria*. Zaragoza, España.: Acribia.

Boerlin, P., Reid-Smith, R.J. (2008). Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. *Animal Health Research Reviews. Volume* 9(2), 115-26.

Bordalo, A., Onrassami, R., y Dechsakulwatana. (2002). Survival of faecal indicator bacteria in tropical estuarine waters (Bangpakong River, Thailand). *Journal of Applied Microbiology. Volume* (93) 864 – 871.

Boric B.V. (2008). *Molecular Epidemiology applications to detect illnesses transmitted by food. Latinamerican advances*. *Revistas Bolivianas. Volume* (16) n. 1.

Braoudaki, M., Hilton, A. C. (2004). Adaptative resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to Antimicrobial Agents. *Journal of Clinical Microbiology. Volume* 42 (1), 73-78.

Brettar, I., y Höfle, M.G. (2008). Molecular assessment of bacterial pathogens a contribution to drinking water safety. *Current Opinion in Biotechnology. Volume* 19 (3), 274-280.

Can, C. A., Ramírez, A.C., Ortega, E. M., Trejo, L.C., Cruz, D. J. (2008). Evaluación de la relación de adsorción de sodio en las aguas del Rio Tulancingo, Estado de Hidalgo, México. *Terra Lationoamericana*, 243-252.

Carter, G.R., y Chengappa, M.M. (1994). *Microbiología y micología veterinaria. Aspectos esenciales*. (2ª ed.) México, D.F. El Manual Moderno.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2004). The CDC PulseNet one-day (24-28 h) standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, nontyphoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by pulsed field gel electrophoresis (PFGE).

Center for Disease Control and Prevention (CDC). (2008). Outbreak of *Salmonella* serotype Saintpaul infections associated with multiple raw produce items-United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. Vol. 57(34), pp. 929-934.

Chávez, P. M., Eugenia, H. I., Anjarath, L., Huertas, J., Báez, M., Morales, L. J., Arteaga, C. F., Rangel, F. S., Ponce, L. S. (2001). Brote por *Salmonella* enteritidis en trabajadores de un hospital. *SciELO Public Health*. Salud pública Méx. *Volumen* 43 (3).

Chiu, C., Ou, J. T. (1996). Rapid identification of *Salmonella* Serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *Journal of Clinical Microbiology*. *Volumen* 34 (10), 2619-2622.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2005). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing fifteenth informational supplement, M100-S15.

Comisión Estatal del Agua (CEA). (2012). “La laguna de Zapotlán vuelve a ser un vertedero de aguas negras”. Recuperado de: <http://www.jornada.unam.mx/2012/02/02/estados/033n1est>

Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). (2005). Programa de Conservación y Manejo de la laguna de Zapotlán.

Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). (1994). Condiciones geohidrológicas de Jalisco.

Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). (2004). Criterios Ecológicos de Calidad del Agua. Diario Oficial de la Federación.

Comisión Estatal del Agua de Jalisco (CEA). (2011). Síntesis ambiental y cultural de la laguna de Zapotlán. Dirección de Cuencas y Sustentabilidad. Gerencia Ambiental y Desarrollo Sustentable.

CONAPO. (2012). Dinámica demográfica 1990-2010 y proyecciones de población 2010-2030. Consejo Nacional de Población, México. Recuperado de: http://www.conapo.gob.mx/es/CONAPO/Proyecciones_Datos Consultada en el 25 de septiembre de 2016.

Cormican, M., DeLappe, N., O'Hare, C., Doran, G., Morris, D., Corbett-Feeney, G., Fanning, S., Daly, M., Fitzgerald, M. Moore, J. (2002). *Salmonella enterica* serotype bredeney: antimicrobial susceptibility and molecular diversity of isolates from Ireland and Northern Ireland. *Applied Environmental Microbiology*. Volume 68 (1), 181-186.

Davies, R., y Wray, C. (1997). Study of multi-resistant *Salmonella typhimurium* infection in pig herds: Preliminary finding. *The Pig Journal*. Volume (40), 80-88.

de la Torre M. E. (2006). Caracterización molecular y fenotípica como herramienta de marcaje epidemiológico para cepas de *Salmonella* de origen porcino. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria.

Diputados ciudadanos. (2016). Laguna de Zapotlán. La SEMARNAT debe implementar un programa de restauración en la laguna de Zapotlán. Recuperado de: <https://diputadosciudadanos.mx/boletines/laguna-de-zapotlan>

Dirección General de Epidemiología (DGEPI). (2010). Boletín de epidemiología. Recuperado de: http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd_boletin.

Dolejská, M., Bierosová, B., Kohoutová, L., Literák, I., & Cízek, A. (2009). Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls. *Journal of Applied Microbiology*, 106(6), 1941–1950.

Dresler, A., Wirtz, V. J., Corbett, K. K., Echániz, G. (2008). Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud Pública de México. Volumen 50(4)*, S480-S487.

Duffy, E. A., Lucia, L. M., Kells, J. M., Castillo, A., Pillai, S. D., Acuff, G. R. (2005). Concentrations of *Escherichia coli* and Genetic diversity and antibiotic resistance profiling of *Salmonella* isolated from irrigation water, Packing Shed Equipment, and Fresh Produce in Texas. *Journal of Food Protection. Volume 68 (1)*, 70-79.

D'Urquiza Alejandro. (2004). Modelo hidrológico, Calidad del Agua y Control de la Eutroficación en el Lago de Zapotlán.

EI-Gazzar, F. E., G. Rusul, and E. H. Marth. (1992). *Salmonella*, Salmonellosis, and Dairy Foods: A Review. Department of Food Science and the Food Research Institute University of Wisconsin-Madison Madison 53706.

Environmental Protection Agency. (2015). Sediment Related Criteria for Surface Water Quality. Recuperado de: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/sediment-appendix3.pdf>

Esrey, S. A., Potash, J.B., Roberts, L., y Shiff, C. (1991). Effects of improved water supply and sanitation on ascariasis, diarrhoea, dracunculiasis, hookworm infection, schistosomiasis, and trachoma. *Bulletin of the World Health Organization. Volume 69(5)*, 609-621.

Espie, E., Weill, F. X., Brouard, C. (2005b). Nationwide outbreak of *Salmonella* enterica serotype Agona infections in infants in France, linked to infant milk formula, investigations on going.

European Food Safety Authority (EFSA). (2013). Application of systematic review methodology to food and feed safety assessment to support decision making. *Volume* (8), 1637.

FAO. (1990a). Agua y desarrollo agrícola sostenible. Una estrategia para la aplicación del Plan de Acción de Mar del Plata para el decenio de 1990. FAO, Roma.

FAO. (1993a) An overview of pollution of water by agriculture. J.A. Sagardoy. En: Prevention of Water Pollution by Agriculture and Related Activities. Actas de la Consulta de Expertos de la FAO, Santiago, Chile, (1992). Water Report 1.

FAO. (2000). Aquaculture development trends in Europe. Rome, FAO. 27

Ferguson, C., De Roda, H. A. M., Altavilla, N., Deere, D., Ashbolt, N. (2003). Fate and transport of surface water pathogens in watersheds. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. Volume* (33), 299–361

Fernández, A., García, C., Saéz, J.A., Valdezate, S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (EIMC).

Figueroa, I., y Verdugo, A. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología. Volumen* (47), 25-42.

Fondriest Environmental, Inc. “Water Temperature. (2014). Fundamentals of Environmental Measurements. Web. Disponible en línea en: <http://www.fondriest.com/environmental-measurements/parameters/water-quality/water-temperature/>

Gagliardi, J. V., Millner, P. D., Lester, G., Ingram, D. (2003). On-Farm and postharvest processing

sources of bacterial contamination to melon rinds. *Journal of Food Protection*. Volume 66 (1), 82-87.

Galán, J. E. (2001). *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. Annual Review of Cell and Developmental Biology. Volume (17), 53-86.

Global Foodborne Infections Network Country Databank (GFN). (2010). Recuperado de: http://thor.dfvf.dk/portal/page?_pageid=53,1&_dad=portal&_schema=PORTAL

Grimont, P., Weill, F. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th revision. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institute Pasteur.

Green, J., y Bohannan, B. J. (2006). Spatial scaling of microbial biodiversity. Trends in Ecology & Evolution. Volume (21), 501-507.

Gutiérrez-Cogco, L., Montiel, V. E., Aguilera, P. P., y González, A. M. (2000). Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. Salud Pública de México. Volumen (42), 490-495.

Goransson, G. I., Bendz, D., y Larson, P. M. (2013). Variation in turbidity with precipitation and flow in a regulated river system – river Gota “ Alv, SW Sweden. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* Volume (17), 2529–2542.

Gorski, L., Liang, A. S. (2010). Effect of enrichment medium on real-time detection of *Salmonella* enterica from lettuce and tomato enrichment cultures. *J. Food Prot.* Volume (73), 1047–1056

Haley, B. J., Cole, D. J., y Lipp, E. K. (2009). Distribution, diversity, and seasonality of waterborne *Salmonella* in a rural watershed. *Applied and Environmental Microbiology*. Volume (75), 1248-1255.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). (1991, 1997).

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (INEGI). 2009. Recuperado de: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx?e=14>

International Joint Commission (IJC). (1974). Management Programs, Effects of Research, and Present Land Use Activities on Water Quality of the Great Lakes. Pollution from Land Use Activities Reference Group (PLUARG), International Joint Commission, Windsor, Ontario.

International Organization for Standardization 6579. (ISO 6579). (2002). Microbiology of food and animal feeding stuffs horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.

Jawetz, E., Melnick, J.L., y Adelberg, E.A. (1985). Microbiología Médica. (11^a ed.) México D.F. El Manual Moderno.

Jay, S., Grau, F. H., Smith, K., Lightfoot, D., Murray, C. and Davey, G. R. (1997). Foodborne microorganisms of public health significance. Australia: Australian Institute of Food Science and Technology Inc. 169-229.

Jímenez, E. M. (2011). *Salmonella* spp. En ríos del Valle de Culiacán: Detección, Diseminación, PFGE-Tipificación y Resistencia a Antibióticos. Tesis. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

Johnson, J. Y. M., Thomas, J. E., Graham, T. A., Townshend, I., Byrne, J., Selinger, L. B., Gannon, V. P. J. (2003). Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in surface waters of southern Alberta and its relation to manure sources. *Canadian Journal of Microbiology*. Volume 49 (5), 326-335.

Kempf, A. J., Hulsebus, H. J., Akbar, S. (2016). Multiple plasmids contribute to antibiotic resistance and macrophage survival in vitro in CMY2-Bearing *Salmonella* enterica.

Kérouanton, A., Marault, M., Lailier, R., Weill, F-X., Feurer, C., Espie, E., Brisabois, A. (2007). Pulsed-Field gel electrophoresis database for foodborne *Salmonella* enterica serotype discrimination. *Foodborne Pathogene Disease*, Volume (4), 293-303.

Kim, B., Park, J.H., Hwang, G., Jun, M.S., y Choi, K. (2001). Eutrophication in reservoirs of South Korea. *Limnology*. Volume (2), 223-229.

Koneman, W.E., Alien, D.S., Dowell, R.V., y Sommers, M.H. (1985). Diagnóstico Microbiológico. México, D.F.: Médica Panamericana.

Kuang, X., Hao, H., Dai, M., Wang, Y., Ahmad, I., Liu, Z., Zonghui. (2015). Serotypes and Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. isolated from farm animals in China. *Frontiers in Microbiology*. Volume (6), 602.

Labarca J. (2002). Utilización del antibiótico como marcador epidemiológico en infecciones intrahospitalarias: Comparación con la epidemiología molecular. *Revista Chilena de Infectología*. Volume 19 (2), 157-160.

Lanzas, C., Warnick, L. D., James, K. L., Wright, E. M., Wiedmann, M. and Grohn, Y. T. (2010). Transmission dynamics of a multidrug-resistance *Salmonella* typhimurium outbreak in dairy farm. *FoodBorne Pathogens and Diseases* Volume (4), 467-474.

Lavalett, L., Sánchez, M. M., Muñoz, N., Moreno, J., Cardona, C. N. (2009). Desarrollo y validación de una reacción en cadena de la polimerasa múltiple para la identificación de los serogrupos B, C2, D y E de *Salmonella enterica*. *Biomédica*. Volume (29), 244-252.

Lemarchand, K., Lebaron, P. (2002). Influence of mutation frequency on the persistence of *Salmonella enterica* serotypes in natural waters. *FEMS Microbiology Ecology*. Volume 41 (2), 125-131.

Leskinen, S. D., Brownell, M., Lim, D.V., y Harwood VJ. (2010). Hollow-fiber ultrafiltration and PCR detection of human-associated genetic markers from various types of surface water in Florida. *Applied and Environmental Microbiology*. Volume 76(12), 4116-4117.

Levantesi, C., Bonadonna, L., Briancesco, R., Grohmann, E., Toze, S., Tandoi, V. (2012).

Salmonella in Surface and drinking water: occurrence and water-mediated transmission.

Lipp, E. K., Kurz, R., Vincent, R., Rodriguez-Palacios, C., Farrah, S. R., y Rose, J. B. (2001). The effects of seasonal variability and weather on microbial fecal pollution and enteric pathogens in a subtropical estuary. *Estuaries and Coasts*. Volume 24 (2), 266-276.

Lynch, J.M. y N.J. Poole. (1979). *Microbial ecology: a conceptual approach*. Blackwell Scientific Publications.

Maier, R. M., Pepper, I. L., Gerba, C. P. (2009). *Environmental Microbiology*. Ed. Academic Press. 2da edición. 9-36.

Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., Jones, T. F., Fazil, A., Hoekstra, R. M. (2010). International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Disease*. Volume 50 (6), 882-9.

Martinez-Urtaza, J., Liebana, E., Garcia-Migura, L., Perez-Piñeiro, P., y Saco, M. (2004). Characterization of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium from marine environments in coastal waters of Galicia (Spain). *Appl. Environ. Microbiol.* Volume (70), 4030-4034.

Martínez-Urtaza, J., y Liébana, E. (2005). Investigation of clonal distribution and persistence of *Salmonella* Senftenberg in the marine environment and identification of potential sources of contamination. *FEMS Microbiology Ecology*. Volume (52), 255 – 263.

McEgan, R., Rodrigues, C.A.P., Sbodio, A., Suslow, T.V., Goodridge, L. D., Danyluk, M. D. (2013). Detection of *Salmonella* spp. from large volumes of water by modified Moore swabs and tangential flow filtration. *Lett. Appl. Microbiol.* Volume (56), 88 –9.

Medina, P. N.A. (2002). *Estudio hidrobiológico de la cuenca de la cuenca del río Armería para las predicciones de un desarrollo sustentable*. Tesis. Universidad De Colima.

Mhongole, O. J., Mdegela, R. H., Kusiluka, L. J. M., Forslund, A., Dalsgaard, A. (2017). Characterization of *Salmonella* spp. from wastewater used for food production in Morogoro, Tanzania. *World J Microbiol Biotechnol. Volume* (33), 42.

Milleman, Y. (1998). Epidemiologic markers of *Salmonella* Veterinary Research. *Volume* (29), 3-19.

Morales-Morales, H. A., Vidal, G., Olszewski, J., Rock, C. M., Dasgupta, D., Oshima, K. H., y Smith GB. (2003). Optimization of a reusable hollow-fiber ultrafilter for simultaneous concentration of enteric bacteria, protozoa, and viruses from water. *Applied and Environmental Microbiology. Volume* 69(7), 4098-4102.

Morales, S. A., Juliana, F. A., Gomes, V. T. M., Reis, C. A. T., Rodrigues, D. P., Porfida. T. S., Lima, P. H., Felizardo, M. R., Moreno, A. M. (2012). Colistin Resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Strains Isolated from Swine in Brazil. *The Scientific World Journal. Volume* (2012).

Morse, E.V., y Duncan, M.A. (1974). Salmonellosis: an environmental health problem. *Journal of American Veterinary Medical Association. Volume* (164), 81–87.

Mullis, K. B., Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology. Volume* (155), 335-350.

Mullis, K. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am. Volume* 262(4), 56-65.

Nair, S., Kwai, L. T., Pang, T., y Altwegg, M. (2002). Characterization of *Salmonella* serovars by PCR-Single-Strand conformation polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology. Volume* (40), 2346-235.

Nebel, B., Wrigt R. (1999). Ciencias Ambientales, Ecología y Desarrollo Sostenible. (6ª edición). México. Prentice Hall. pp. 264, 299, 302.

Nielsen, B., Baggesen, D., Bager, F., Haugegaard, J., y Lind, P. (1995). The serological response to *Salmonella* serovars typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Veterinary Microbiology. Volume* (47), 205-218.

Ohl, M. E., Miller, S. I. (2001). *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. The Annual Review of Medicine. *Volume* (52), 259-74.

Ongley, E.D. (1997). Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos. Roma, Italia. Estudio FAO Riego y Drenaje 55, 1997. P.116.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (1998). Guías para la calidad del agua potable: vigilancia y control de los abastecimientos de agua a la comunidad. Segunda edición. *Volumen* (3), 1998 – 255.

Orozco, R. L., Iturriaga, M. H., Tamplin, M. L., Fratamico, P. M., Call, J. E., Luchansky, J. B., Escartin, E.F. (2008). Animal and environmental impact on the presence and distribution of *Salmonella* and *Escherichia coli* in hydroponic tomato greenhouses. *Journal of Food Protection. Volume* (71), 676–683

Parra, M., Montaña, I., Díaz, E. (2012). Aportación a la seguridad alimentaria humana por la actividad pesquera en el Lago de Zapotlán y la Presa Basilio Vadillo.

Polo, F., Figueras, M. J., Inza, I., Sala, J., Fleisher, J. M., Guarro, J. (1998). Relationship between presence of *Salmonella* and indicators of faecal pollution in aquatic habitats. *FEMS Microbiology Letters. Volume* 60 (2), 253-256.

Pond, K. (2005). Water recreation and disease infections: Plausibility of associated acute effects, sequelae and mortality. London: IWA Publishing, World Health Organization.

Popoff, M. Y. (2001). Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars (8th ed.). Paris, Institut Pasteur: WHO collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*.

Postel, S. I., Dailly, G.C., Ehrlich, P.R. (1996). Human Appropriation of Renewable Fresh Water. *Science. Volume* (271).

Prosser, J. I., Bohannon, B. J., Curtis, T. P., Ellis, R. J., Firestone, M. K., Freckleton, M.P., Green J. L., Green, L. E., Killham, K., Lennon, J. J., Osborn, A. M., Solan, M., Van der Gast, C. J y Young, J. P. (2007). The role of ecological theory microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology. Volume* (5), 384-392.

Protección y Atención Integral a la Salud, SSA, Jalisco, México. (2008).

Rabsch, W., Andrews, H. L., Kingsley, R. A., Prager, R., Tschape, H., Adams, L. G., Baumler, A. J. (2002). *Salmonella* enterica Serotype Typhimurium and its host adapted variants. *Infection and Immunity. Volume* 70 (5), 2249:2255

Roof, B.M., Roth, J., Kramer, T.T. (1992). Porcine salmonellosis characterization, Immunity and potential vaccines. Compendium on continuing education for the practicing veterinary.

Sánchez, M., y Cardona, N. (2003). Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Infectio. Volume* 7(1), 22-29.

Santoyo, F., Mariscal, J., Gutiérrez, H., Gómez, C. (2015). Aspecto pesquero-ambientales de la población de tilapia *Oreochromis niloticus* en la laguna de Zapotlán, Jalisco, México.

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R.V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones. J. L., Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens. *Emerg Infect Dis. Volume* (17), 7–15.

Schroll, H. (2002). Indicators of the Long-term Eutrophication of a Danish lake (Karlsø), and Water Pollution Management. *The Journal of Transdisciplinary Environmental Studies. Volume* (1), 1-10.

Schwartz, J. K. (1996). La salmonelosis en el cerdo. PIGS-Misset. pp. 18-21.

Scott, T. M., Rose, J. B., Jenkins, T. M., Farrah, S. R., Lukasik, J. (2002). Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Applied and Environmental Microbiology. Volume* 68 (12), 5796-5803.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2014). Programa de Ordenamiento ecológico del municipio de Zapotlán el Grande. Recuperado de: http://www.ciudadguzman.gob.mx/Documentos/Paginas/DocEjec_POEL_ZapotlanelGrande_ver1.pdf

Sherwoo, B., Idso, R. D. J., (1969). Thermal radiation from the atmosphere. *Journal of Geophysical Research. Oceans and Atmospheres Volume* (74), 5397-5403.

Simental, L., and J. Martinez-Urtaza. (2008). Climate patterns governing the presence and permanence of *Salmonellae* in coastal areas of Bahia de Todos Santos, Mexico. *Appl. Environ. Microbiol. Volume* (74), 5918-5924.

Simpson, J. M., Santo, D., Reasoner, D. J. (2002) Microbial source tracking: state of the science. *Environmental Science and Technology. Volume* 36 (24), 5279-5288.

SINAVE/DGE/Salud. (2016). Información preliminar, incluye casos probables. Recuperado de: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2016/BOL-EPID-2016-SE06.pdf>

SINAVE/DGE/Salud. (2015). Información preliminar, incluye casos probables. Recuperado de: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2015/sem38.pdf>

SINAVE/DGE/Salud. (2014). Información preliminar, incluye casos probables. Recuperado de: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2015/sem41.pdf>

Solórzano, S. F., Miranda, N. M. G. (1998). Resistencia de bacterias respiratorias y *entericas* antibióticos. *Salud Pública de México. Volume 40 (6), 510-516.*

Swanson, S. J., Snider, C., Braden, C. R., Boxrud, D., Wünschmann, A., Rudroff, J. A., Lockett, J., Smith, K. E. (2007). Multidrug-resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium associated with pet rodents. *New England Journal of Medicine. Volume 356 (1), 21-28.*

Tafur, G. M. A. (2009). La inocuidad de alimentos y el comercio internacional. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Universidad de Antioquia Medellín, Colombia. Volume (22), 330-338.*

Tavechio, A. T., Ghilardi, A. C., Peresi, J.T., Fuzihara, T. O., Yonamine, E. K., Jakabi, M., y Fernandes, S. A. (2002). *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in Sao Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. *Journal of Food Protection. Volume (65), 1041-1044.*

Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V. (1997). How to select and interpret molecular strains typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infection Control and Hospital Epidemiology. Volume 18 (6), 426-439.*

Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., Swaminathan, B. (1995). Interpreting Chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology. Volume 33 (9), 2233-2239.*

Terzolo, H. R. (2013). Salmonelosis: Concepto general sobre salmonelas y salmonelisis. Generalidades. *Research Gate*. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/280883628_Salmonelosis_Conceptos_generales_sobre_salmonelas_y_salmonelosis_-_Parte_1_Generalidades

Thomason, B.M., Biddle, J.W., Cherry, W.B., (1975). Detection of *Salmonella* in the environment. *Appl. Microbiol. Volume* (30), 764-767.

Thurston-Enriquez J A, Watt P, Down S E, Enriquez R, Pepper I L, Gerba C P. (2002). Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. *Journal of Food Protection. Volume* 65 (2), 378-382.

Turney, H.I., Fedorka-Cray, P.J., Gray, J.T., Thomas, L.A., y Ferris, K. (1997). Prevalence of *Salmonella* organisms in swine feed. *Journal of the American Veterinary Medical Association. Volume* (210).

Tynkkynen, S., Satokari, R., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Saxelin, M. (1999). Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis in Typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. *Applied and Environmental Microbiology. Volume* 65 (9), 3908-3914.

United Census Bureau (US Census Bureau). (2017). Recuperado de: https://www.census.gov/population/international/data/worldpop/table_history.php

Uzzau, S., D. J. Brown, T. Wallis, S. Rubino, G. Leori, S. Bernard, J. Casadesús, D. J. Platt, and J. E. Olsen. (2000). Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol Infect. Volume* (125), 229-255.

Uzzau, S., Brown, D. J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Casadesús, J., Platt, D. J. y Olsen, J. E. (2000). Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiology and Infection. Volume* (125), 229-255.

Vásquez, E., Mattar, S., Mossos, N., Mogollón, D., Poutou, R. A. (2005). Caracterización molecular de cepas colombianas de *Salmonella* spp. a través de RFLP-IS 200. *NOVA-Publicación Científica. Volume 3* (3), 1-120.

Vílchez, G., y Alonso, G. (2009). Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Volumen* (29), 6-12.

Wain, J., Nga, D. L. T., Kidgell, C., James, K., Fortune, S., Diep, T. S., Ali, T., Gaora, P. O., Parry, C., Parkhill, J., Farrar, J., White, N. J., Dougan, G. (2003). Molecular analysis of *incHI1* antimicrobial resistance plasmids from *Salmonella* serovar Typhi strains associated with typhoid fever. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Volume 47* (9), 2737-2739.

Weisner, S. E. B., Strand, J. A., y Sandsten H. (1997). Mechanisms regulating abundance of submerged vegetation in shallow eutrophic lakes. *Oecologia. Volume* (109), 592-599.

Winfield, M. D., and E. A. Groisman. (2003). Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol. Volume* (69), 3687-3694.

Woodford, N., y Johnson, A. (1998). *Molecular bacteriology: Protocols and Clinical Applications*. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.

World Health Organization (WHO). (2009). Global health risks. Mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Recuperado de: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf

World Health Organization (WHO). (2013). *Salmonella* (no tifoidea). Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>

World Health Organization (WHO). (2015). Foodborne disease estimates. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease-estimates/es/#content>

Wray, C., Wray A. (2000). *Salmonella* in domestic animals. Oxon, UK.: *CABI Publishing*.

Zansky, S., Wallace, B., Schoonmaker-Bopp, D., Smith, P., Ramsey, F., Painter, J., Gupta, A., Kalluri, P., Noviello, S. (2002). From the centers for disease control and prevention. Outbreak of multidrug resistant *Salmonella* Newport-United States. *Journal of the American Medical Association*. Volume 288 (8), 951-953.

8. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de soluciones

Solución amortiguadora de lisis celular: 50 mM Tris:50 mM EDTA, pH 8.0 + 1% Sarcosyl

Mezclar 25 mL de Tris 1M (Invitrogen, California) con un pH de 8, 50 mL de EDTA 0.5 M (Invitrogen, USA) pH 8, 50 mL de 10% Sarcosyl ó NLauroylsarcosine, Sodium Salt (Sigma, United Kingdom). Diluir a 500 mL con agua inyectable (Pisa, México).

Solución amortiguadora de lisis celular con proteinasa K:

Colocar 5 mL de buffer de lisis celular por tubo y adicionar 25 µL de proteinasa K que proviene de una solución stock de 20 mg/mL.

Solución amortiguadora de suspensión celular: 100 mM Tris:100 mM EDTA, pH 8.0

Mezclar 10 mL de Tris 1M (Invitrogen, California) con un pH de 8, 20 mL de EDTA 0.5 M (Invitrogen, USA) pH 8.0 y diluirlo en 1000 mL de agua inyectable (Pisa, México).

Solución amortiguadora de TE: 10 mM Tris: 1 mM EDTA, pH 8.0

Mezclar 10 mL de Tris 1 M (Invitrogen, California) pH 8, 2 mL de EDTA 0.5 M (Invitrogen, USA) pH 8. Diluir a 1000 mL con agua inyectable (Pisa, México).

Solución amortiguadora de Tris-Borate EDTA 0.5X (TBE):

Mezclar 110 mL de TBE a 10X (Biorad, California) con 2090 mL de agua inyectable (Pisa, México) para obtener un volumen final de 2200 mL que son los que se ocupan como buffer de corrida de electroforesis.

Solución Salina Estéril al 0.85% Para 1 L de solución salina:

Se pesan 8.5 g de cloruro de sodio y se agregan a 1 L de agua purificada. Mezclar para disolver y esterilizar a 121°C durante 15 min. Los gramos de cloruro de sodio a utilizar van a depender de la cantidad de solución salina que se desee preparar.

Tris Acetato EDTA (TAE) al 1X:

Se toman 100 mL de TAE 10X (Eppendorf, USA) y se agregan en 900 mL de agua destilada, para obtener una concentración final de 1X. La concentración del TAE puede variar por lo que los mL van a depender de ella.

Anexo 2. Preparación de geles de agarosa

Agarosa para plugs de PFGE: Agarosa 1% SeaKem Gold: 1% SDS en buffer TE (10 mM Tris: 1 mM EDTA, pH 8.0)

Pesar 0.25 g de SeaKem Gold agarosa (Lonza, USA) y colocarla en un frasco de 250 mL con taparroca, agregar 23.5 mL del buffer TE, agitar para dispersar la agarosa, colocarlo en un horno de microondas hasta que disuelva completamente y colocarla en un baño maria de 55-60°C por 5 min. Adicionarle 1.25 mL de SDS al 20% (previamente calentado a 55°C) y mezclar.

Gel de agarosa al 1%

Agregar 1 g de agarosa (Promega) a 100 mL de buffer TAE 1X, fundir la solución en un horno de microondas y añadir 1 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL). Dejar solidificar.

Gel de agarosa para PFGE: Agarosa 1% SeaKem Gold in 0.5X TBE

Pesar 1.0 g de SeaKem Gold Agarosa (Lonza, USA) y colocarla en 100 mL de 0.5X TBE. Agitar para dispersar la agarosa, colocarla en un horno de microondas para disolverla y colocarla en un baño de 55-60°C hasta su uso.

Anexo 3. Preparación de medios

Agar de Soya Trypticaseína (TSA) (BD Bioxon, México):

Para 1 L de TSA; pesar 40 g del medio y agregar en 1 L de agua purificada. Calentar con agitación hasta ebullición. Esterilizar a 121°C durante 15 min y vaciar en cajas petri.

Agar Entérico Hektoen (HE) (BD Bioxon, México):

Para 1 L de HE; pesar 76 g del medio y agregar en 1 L de agua purificada. Calentar con agitación hasta ebullición. Enfriar y vaciar en cajas petri.

Agar Müeller Hinton (BD Bioxon, México):

Para 1 L de Müeller Hinton; pesar 38 g del medio y agregar a 1 L de agua purificada. Calentar con agitación hasta ebullición. Esterilizar a 121°C durante 15 min y vaciar en cajas petri.

Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) (BD Bioxon, México):

Para 1 L de XLD; pesar 55 g del medio y agregar en 1 L de agua purificada. Calentar con agitación hasta ebullición. Enfriar y vaciar en cajas petri.

Agua Peptonada al 1% (BD Difco, USA):

Para 1 L de agua peptonada al 1%; pesar 20 g del medio y disolver en 1L de agua purificada. Mezclar y esterilizar a 121°C durante 15 min.

Caldo de Soya Trypticaseína (TSB) (BD Bioxon, México):

Para 1 L de TSB; pesar 30 g del medio y agregar en 1 L de agua purificada. Mezclar y si es necesario calentar ligeramente con agitación hasta disolución. Esterilizar a 121°C durante 15 min.

Caldo Rappaport Vassiliadis R10 (BD Difco, USA):

Para 1 L de caldo de rappaport vassiliadis; pesar 26.6 g del medio y disolver en 1 L de agua purificada. Calentar ligeramente con agitación hasta disolver completamente el medio. Esterilizar a 121°C durante 15 min.

Caldo Selenito Cistina (BD Difco, USA):

Para 1 L de caldo selenito cistina; pesar 23 g del medio y agregar en 1 L de agua purificada.
Calentar con agitación hasta ebullición.