



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Diversidad, prevalencia y resistencia antimicrobiana de patógenos emergentes asociados a la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en agua purificada embotellada”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

IBQ María Fernanda Ricart Nava

Dirigido por:

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Co-Directora:

Dra. Victoria Hilda Silva Rojas.

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Presidente

Dra. Victoria Hilda Silva Rojas

Secretario

Dra. Minerva Ramos Gómez

Vocal

Dra. Dulce María Pastrana Rivera

Suplente

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Diciembre 2019

México

Agradecimientos

A Dios por permitirme la vida y las experiencias vividas en este lapso que fue la maestría.

A mi asesor el Dr. Gerardo Nava, por reiterar el tipo de persona que quiero ser en la vida, a los miembros de mi comité, por el apoyo en este proyecto.

A la Dra. Estelita, por su apoyo incondicional y creer en mí.

A Dania Vega, por ser mi apoyo, mi pilar y mi fortaleza a seguir adelante, por impulsarme a intentarlo, alentarme a emprender el viaje (sin tu ánimo nunca hubiera llegado al posgrado) y aguantar primero la distancia y el poco tiempo que eso provocó, además soportar conmigo todos los momentos de frustración que conlleva el estudiar un posgrado.

A mi compañera de viaje Lupita Balbuena por acompañarme desde el primero hasta el último día, por permitirme crecer a su lado, por motivarme y llorar juntas para agarrar fuerzas y no tirar la toalla. Sin tu amistad no hubiera llegado hasta este punto.

A mi paisa (Blanca Lilia) y Astrid, por su apoyo incondicional e inspiración en todo.

A Margarita, por ser un apoyo, aunque estaba en la misma situación siempre me apoyo y alentarme a no tirar la toalla, por los momentos de diversión.

A las niñas Italia, Cris, Isa1, Isa2, Ile, Yuri y Martita por confiar y apoyarse en mí, tanto en aspectos académicos como personales, aprendimos juntas cuando no sabíamos a donde dirigir esos proyectos, por esas pijamadas científicas y aportar al proyecto con sus dudas y observaciones, las quiero, esto también es de ustedes.

A mi familia, mi papá José Ricart y mis hermanos Miriam, Joan y Pepe por aguantar la distancia territorial que esta meta produjo entre nosotros.

El más especial a mi madre, María Elena Nava, por ser mi motor desde el cielo, por pedirme que siguiera siempre mis sueños, Gracias.

Al CONACYT por el apoyo económico sin el cual no se hubiera concluido ese proyecto de investigación.

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	4
2.1 Agua potable	4
2.1.2 Agua purificada embotellada.	6
2.1.2 Calidad microbiológica de agua embotellada.	8
2.2 La microbiota intestinal y enfermedades asociadas	9
2.2.1 Enfermedad inflamatoria intestinal	10
2.3 Patógenos emergentes asociados a la EII	10
2.3.1 <i>Bradyrhizobium spp.</i>	12
2.3.2 <i>Methylobacterium spp.</i>	12
2.3.3 <i>Microbacterium spp.</i>	13
2.3.4 <i>Nocardioides spp.</i>	13
2.3.5 <i>Novosphingobium spp.</i>	14
2.3.6 <i>Pseudomonas spp.</i>	14
2.3.7 <i>Rhodococcus spp.</i>	15
2.3.8 <i>Sphingomonas spp.</i>	15
2.3.9 <i>Sphingopyxis spp.</i>	16
2.4 Resistencia a antibióticos de patógenos emergentes	16
III. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo General:	18
3.2 Objetivos específicos:	18
IV. METODOLOGÍA	19
4.1 Etapa I: Estrategia microbiológica enfocada a la detección de patógenos emergentes en agua purificada embotellada.	19
4.1.1 Muestreo.	19
4.1.2 Inoculación y evaluación de medios de cultivo oligotróficos.	19
4.1.2.1 Microorganismos oligotróficos estrictos o facultativos.	21
4.1.3 Identificación taxonómica de bacterias oligotróficas.	21

4.2 Etapa II: Prevalencia de patógenos emergentes asociados a la EII	22
4.2.1 Incidencia de patógenos emergentes a partir de agua purificada.	22
4.3 Etapa III: Resistencia antimicrobiana de patógenos emergentes asociados a la EII.	23
4.3.1 Determinación fenotípica de la resistencia a antibióticos de bacterias oligotróficas.	23
5.1 Estrategia microbiológica para la detección de patógenos emergentes.	24
5.2 Diversidad de bacterias oligotróficas en agua purificada embotellada.	28
5.3 Prevalencia de bacterias patógenas presentes en agua purificada embotellada.	29
5.4 Resistencia a antibióticos.	33
5.5 Multirresistencia a antibióticos.	38
VI. Conclusiones	41
VII.- Referencias	41
VIII. Anexos	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

PÁGINA

1. Clasificación de usos de agua potable	12
2. Consumo de agua embotellada y bebidas carbonatadas a nivel mundial, 2005 y 2015	13
3. Consumo per cápita de agua embotellada en 2015.	14
4. Recuperación de géneros bacterianos por medio de cultivo.	33
5. Diversidad taxonómica de bacterias oligotróficas.	36
6. Resistencia a antibióticos de bacterias aisladas de agua embotellada.	40
7. Resistencia a antibióticos dependiendo el número de antibióticos resistentes.	41
8. Resistencia a antibióticos por marca.	43
9. MRA por categoría de microorganismos.	45
10. MRA por marca.	46

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA

PÁGINA

1. Formulación de medios 1-3	27
2. Formulación de medios oligotróficos 4-6	27
3. Formulación de medios oligotróficos 7-9	28
4. Formulación de medio oligotrófico 10	29
5. Géneros bacterianos y su importancia clínica.	31
6. Géneros obtenidos por medio de cultivo.	34
7. Prevalencia de géneros asociados a la EII.	38
8. Prevalencia de patógenos sistémicos.	39
Anexo 1	65

RESUMEN

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) se caracteriza por un proceso inflamatorio crónico de la mucosa de colon; aunque su etiología se desconoce, numerosos estudios han asociado a los géneros *Sphingomonas*, *Novosphingobium*, *Microbacterium*, *Methylobacterium*, *Nocardioides*, *Rhodococcus*, *Bradyrhizobium* y *Pseudomonas* como potenciales agentes causales. Hasta hace unos años, estos géneros bacterianos no se consideraban patógenos para los seres humanos; sin embargo, su aislamiento a partir de tejidos infectados se ha incrementado en los últimos años. Por esta razón, estos géneros son considerados como patógenos emergentes. Algunos de miembros de estos grupos bacterianos se han logrado recuperar a partir de muestras de agua superficial y sistemas de agua potable; sin embargo, no se han realizado estudios enfocados en agua purificada embotellada, aunado a esto, el agua es reconocido como un medio para la transferencia de genes para la resistencia a antibióticos. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una estrategia microbiológica enfocada aislamiento y caracterización de patógenos emergentes a partir de muestras de agua purificada embotellada y determinar la resistencia a antibióticos *in vitro*. Se evaluó el desempeño de nueve diferentes medios de cultivo y se amplificó el gen *16S ARNr* para la identificación de los géneros bacterianos recuperados. Para este fin, se utilizaron 5 lotes distintos de cinco marcas de agua embotellada. Durante estos estudios se lograron aislar 40 géneros bacterianos, de los cuales nueve (*Sphingomonas*, *Novosphingobium*, *Microbacterium*, *Methylobacterium*, *Nocardioides*, *Rhodococcus*, *Bradyrhizobium* y *Pseudomonas*) se han asociado a EII. El análisis de resistencia a antibióticos reveló que estos géneros fueron resistentes a Colistina (92 %), Gentamicina (73%), Ampicilina (27 %), Cloranfenicol (23%), Ciprofloxacina (21%), Tetraciclina (20%), Sulfametoxazol con Trimetoprim (18%), Amoxicilina con ác. Clavulanico (15%), Ceftriaxona (10%), Oxitetraciclina (10%) e Imipenem (4%). Además, se observó que el 51% de los aislamientos son multirresistentes a los antibióticos (>3 clases de antibióticos). Interesantemente, es importante señalar que el 54% de los patógenos emergentes asociados a EII fueron multirresistentes. Estos resultados sugieren que el agua purificada embotellada es una fuente potencial de patógenos emergentes y un potencial problema de salud pública. Esta información será fundamental para establecer un programa de detección y control de patógenos en agua embotellada.

Palabras clave: Agua purificada embotellada, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), patógenos emergentes, resistencia antibióticos.

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease (IBD) is characterized by a chronic inflammatory process at the colonic mucosa; Although, the etiology remains unknown, numerous studies have associated the genera *Sphingomonas*, *Novosphingobium*, *Microbacterium*, *Methylobacterium*, *Nocardioide*s, *Rhodococcus*, *Bradyrhizobium* and *Pseudomonas* as potential causative agents. A few years ago, these bacterial genera were not considered pathogenic for humans; however, its isolation from infected tissues has increased considerably during the last years. For this reason, these microorganisms are considered emerging pathogens. Members of these bacterial groups have recovered from surface waters and drinking water systems; however, they have not been studied in food matrices. The goal of the present study was to design a microbiological strategy focused on isolation and characterization of emerging pathogens in bottled water samples. The performance of nine different culture media was evaluated and molecular analyzes were performed to identify the isolates. For this purpose, five different lots of five brands of bottled water were analyzed. These studies allowed the isolation of 40 different bacterial genera. Nine of these genera (*Sphingomonas*, *Novosphingobium*, *Microbacterium*, *Methylobacterium*, *Nocardioide*s, *Rhodococcus*, *Bradyrhizobium* and *Pseudomonas*) have been associated with IBD. Analysis of antibiotic resistance revealed that these genera were resistant to Colistin (92%), Gentamicin (73%), Ampicillin (27%), Chloramphenicol (23%), Ciprofloxacin (21%), Tetracycline (20%), Sulfamethoxazole with Trimethoprim (18%), Amoxicillin with Clavulanic acid (15%), Ceftriaxone (10%), oxytetracycline (10%) and Imipenem (4%). In addition, it was observed that 51% of the isolates were multi-resistant to antibiotics (> 3 classes of antibiotics). Interestingly, 54% of the emerging pathogens associated with IBD were multi-resistant. These results suggest that purified bottled water is a potential source of emerging pathogens and a potential public health problem. This information would be essential to establish a program for pathogen detection and control in bottled water.

Keywords: Bottled drinking water, Inflammatory bowel disease (IBD), emerging pathogens, antibiotic resistance.

I. INTRODUCCIÓN

La escasez y mala calidad del agua potable a nivel mundial ha provocado que el consumo de agua purificada embotellada vaya aumentando en los últimos años. El consumo per cápita de agua embotellada a nivel mundial es ~150 litros y México ocupa el primer lugar, con un consumo ~250 litros de este producto.

En la mayoría de los países existen normas para verificar la calidad microbiológica del agua destinada al consumo humano. En general, estos análisis se enfocan específicamente a la detección de bacterias mesófilas y coliformes. Se ha estimado que el 40% de muestras analizadas no cumplen con la calidad microbiológica estipulada.

Además de bacterias mesofílicas y coliformes, algunos estudios han evidenciado la presencia de los géneros *Sphingomonas*, *Novosphingobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhodococcus* en agua potable. Estos organismos son reconocidos como patógenos emergentes para los seres humanos y causan enfermedades intestinales y respiratorias. A pesar que el número de aislamiento de estas bacterias se ha incrementado en los últimos años, hasta el momento no existen protocolos estandarizados para su detección o normas que regulen niveles permitidos.

Una de las principales limitantes para establecer un protocolo de detección, es la dificultad para aislar estos géneros bacterianos. La mayoría de estas bacterias poseen requerimientos nutricionales muy específicos que no pueden ser proporcionados con los medios convencionales. Basado en esta premisa, el presente trabajo se enfocó a desarrollar estrategias microbiológicas dirigidas a la detección oportuna de patógenos emergentes a partir de muestras de agua. Los resultados del presente estudio serán fundamentales para identificar las principales fuentes de contaminación, así como establecer estrategias de prevención y control.

II. ANTECEDENTES

2.1 Agua potable

Según la Organización mundial de la salud (OMS), el agua potable se utiliza para fines domésticos, para beber, cocinar e higiene personal (OMS, 2013). Actualmente, en la mayoría de los países desarrollados, el agua potable es clasificada como un alimento y se han establecido estándares estrictos de calidad (Szewzky, Szewzyk, Manz, & Scheliefr, 2009). Existen 2 fuentes de agua potable, la primera son las aguas superficiales (ríos y lagos); la segunda, son las aguas subterráneas (pozos y manantiales) (OMS, 2006b). Dependiendo el origen, autoridades sanitarias establecen esquemas de tratamientos para asegurar la calidad e inocuidad (Leclerc, 2003; OMS, 2006b; Szewzky *et al.*, 2009).

En México y otros países, el uso de agua potable se clasifica en dos tipos: 1) Doméstico y está destinada al uso particular por personas en viviendas. 2) No Doméstico, se utiliza en las industrias, comercios y servicios para la elaboración de productos (Figura 1) (Comisión Nacional del Agua México, 2007).

El agua potable de uso no doméstico es esencial en el procesamiento y elaboración de alimentos. Este líquido entra en contacto directo con las materias primas (animal y vegetal) durante el lavado, enjuague, escaldado, calentamiento, pasteurización, enfriamiento, producción de vapor, saneamiento, desinfección e inclusive como ingrediente o producto final en el caso del agua embotellada (Casani, Rouhany, & Knøchel, 2005; Comisión Nacional del Agua México, 2007; Escalante-Pozos & Bandala, 2014).

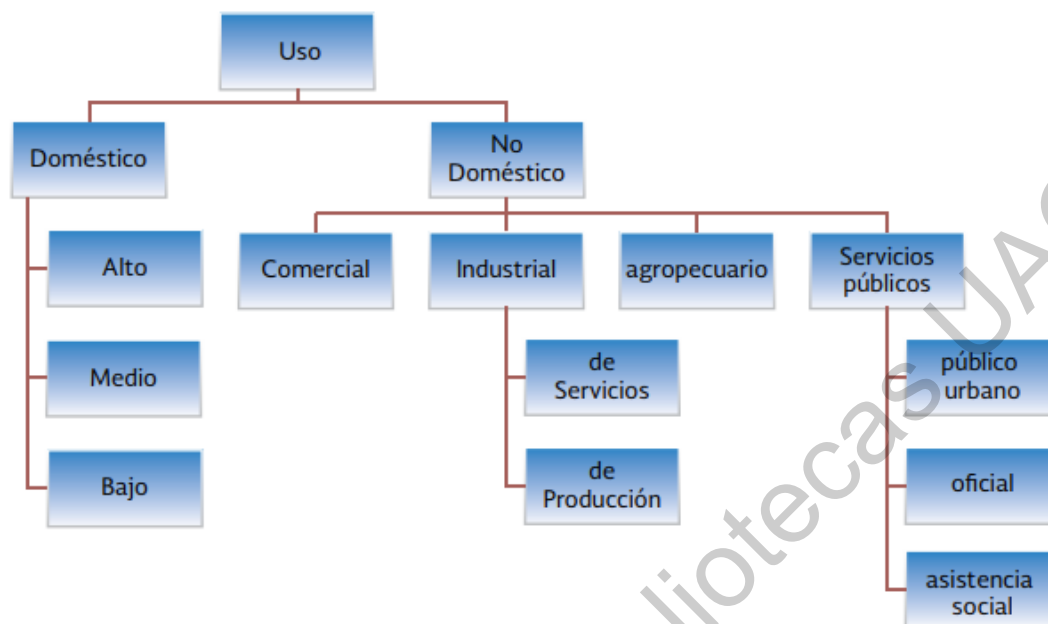


Figura 1. Clasificación de usos de agua potable (Fuente: Comisión Nacional del Agua México, 2007)

Independientemente del tipo uso, la calidad microbiológica es uno de los principales parámetros evaluados. Estos análisis se enfocan a la detección patógenos o ‘microorganismos indicadores’ (coliformes totales, fecales, entre otros) y recuento de heterótrofos (índice de microorganismos patógenos) (OMS, 2006a). En México, la norma oficial mexicana (NOM) NOM-201-SSA-2015 establece que el agua potable deberá presentar ausencia (por método de filtración en membrana) o niveles no detectables (por número más probable) de coliformes fecales (Secretaría de Salud, 2015); sin embargo, en los últimos años se ha generado suficiente evidencia indicando que otros microorganismos potencialmente patógenos deberían ser incluidos en las determinaciones microbiológicas, debido a los altos niveles de contaminación de mantos acuíferos y la baja calidad del agua potable (Leclerc, 2003; Williams *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017).

2.1.2 Agua purificada embotellada.

En los últimos años, el consumo de agua embotellada ha aumentado significativamente a nivel mundial, provocando incluso la disminución en el consumo de bebidas carbonatadas y azucaradas (Figura 2) (Rodwan & John, 2015). En el 2015, se estimó que el consumo per cápita de agua, a nivel mundial, correspondió a 138.2 litros (Rodwan & John, 2015); este nivel de consumo se atribuye a la mala calidad del agua potable prevalente en varios países, y a que los consumidores prefieren el agua embotellada por su sabor, accesibilidad, inocuidad o tendencias culturales (OMS, 2006a; Ward *et al.*, 2009).

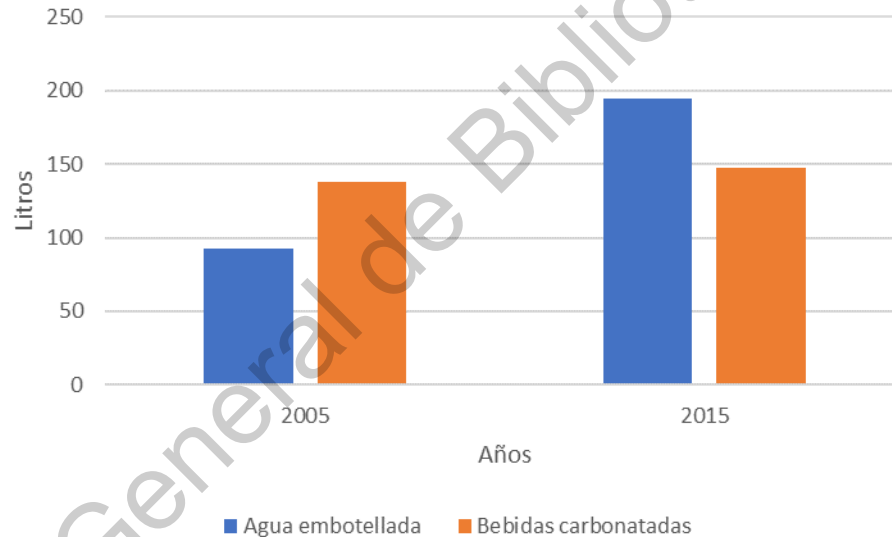


Figura 2. Consumo de agua embotellada y bebidas carbonatadas a nivel mundial, 2005 y 2015 [Adaptado de (Rodwan & John, 2015)].

A nivel mundial, México ocupa el primer lugar en consumo per cápita de agua embotellada (244.2 litros), seguido de Tailandia (203.7 litros) e Italia (177.9 litros) (Figura 3) (Paullier, 2015; Rodwan & John, 2015; Solís, 2017). De acuerdo con la Asociación Nacional de Productores y Distribuidores de Agua Purificada, en México existen aproximadamente 7,000 embotelladoras de agua, de las cuales el 84% son pequeñas empresas y que mayor volumen de venta es en envases de 20

litros (~83%) (Cortés, 2012; Paullier, 2015). También se ha estimado que el 38.5% de estas purificadoras de agua llevan a cabo sus operaciones fuera de la ley (Cortés, 2012; Paullier, 2015). Por otro lado, en el negocio del agua embotellada también participan empresas transnacionales como Danone, Pepsico, y Coca-cola; compañías que acaparan más del 60% de las ventas (Paullier, 2015; Solís, 2017).

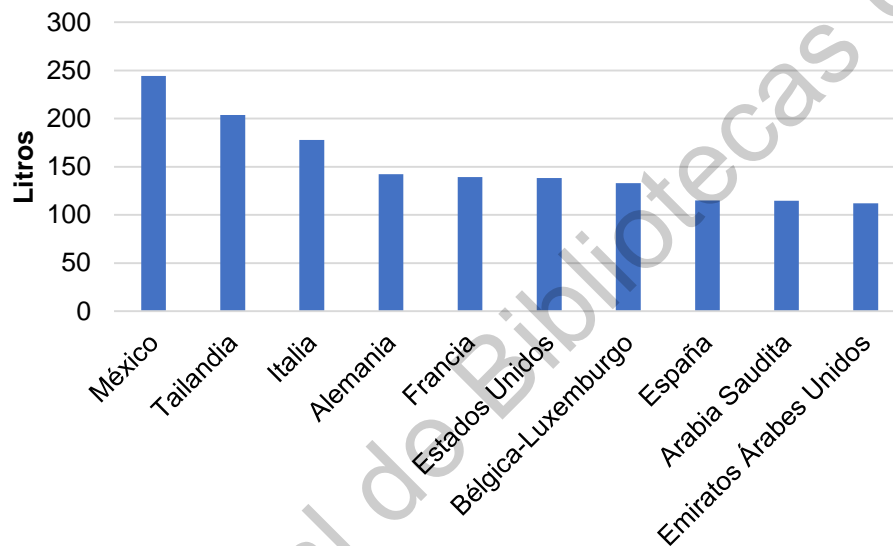


Figura 3. Consumo per cápita de agua embotellada en 2015. [Adaptado de (Rodwan & John, 2015)].

En el proceso de purificación del agua embotellada existen distintas operaciones para eliminar las impurezas disueltas (agentes físicos y biológicos); entre los más importantes se encuentran la filtración, ultrafiltración, osmosis inversa, adsorción con carbón activado y deionización (Valdivia Medina, Pedro Valdés, & Laurel Gómez, 2010). Independientemente del proceso de purificación, el agua embotellada debe cumplir con la reglamentación microbiológica estipulada en la NOM-201-SSA1-2015; que establece que este producto deberá presentar una ausencia (por método de filtración en membrana) o niveles no detectables (por número más probable) de coliformes totales, y <100 UFC/ml de mesófilos aerobios (Secretaría de Salud, 2015). De forma independiente, las empresas

embotelladoras de agua establecen estándares internos para eliminar microorganismos que provoquen un deterioro sensorial del producto; por ejemplo, cambios en el sabor, olor y color (Nescerecka *et al.*, 2014).

2.1.2 Calidad microbiológica de agua embotellada.

Se ha mencionado con anterioridad que una de las principales causas del alto consumo de agua embotellada es la baja calidad en el agua potable, no obstante, la mayoría de los estudios realizados en agua purificada embotellada va enfocado a la detección de los 'microorganismos indicadores' o dirigido a patógenos como *Salmonella*, *Vibrio*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococci* (Bharath *et al.*, 2003; Jeena, Deepa, Mujeeb, Shanthi, & Hatha, 2006; Amenu, 2014; Igbeneghu & Lamikanra, 2014).

Los recuentos de bacterias mesofílicas se usa comúnmente para evaluar la calidad microbiológica general del agua potable (Pavlov *et al.*, 2004). Diversos estudios han documentado niveles superiores a lo permitido para bacterias mesofílicas hasta en el 40% de muestras analizadas, considerándose no aptas para el consumo humano (Bharath *et al.*, 2003; Jeena *et al.*, 2006; Igbeneghu & Lamikanra, 2014).

Algunos estudios también han evidenciado la presencia de bacterias potencialmente patógenas como *Mycobacterium spp.*, *Legionella spp.*, *Moraxella spp.* y *Aeromonas spp.* (Chaidez-Quiroz, 2002; Tafere *et al.*, 2014) que además en sistemas de distribución de agua producen biopelículas y proliferan en bajas concentraciones de nutrientes (Falkinham, 2015). Se ha revelado que estos grupos bacterianos tienen el potencial para alterar el microbioma intestinal (Dias *et al.*, 2018).

2.2 La microbiota intestinal y enfermedades asociadas

La microbiota intestinal es una comunidad de microorganismos que coloniza el intestino de los seres vivos (Marchesi *et al.*, 2016; Libertucci & Young, 2019). Esta cumple un papel importante, protegiendo a su huésped de enfermedades, inhibiendo la proliferación y colonización de patógenos al ocupar nichos intestinales y competir por nutrientes (Nagao-kitamoto, *et al.*, 2016). Diversos estudios han demostrado que la diversidad de la microbiota intestinal es un factor importante en la presentación de enfermedades intestinales y sistémicas (Nie, Zhang, Chen, & Wang, 2019). Las enfermedades asociadas a cambios en el microbioma intestinal son denominadas disbiosis; que en conjunto con alteraciones genéticas en el hospedador y factores ambientales adversos desencadenan alteraciones locales y sistémicas (Pflughoeft & Versalovic, 2011; Nie, Zhang, Chen, & Wang, 2019).

Una disbiosis en el microbioma intestinal puede desencadenar el desarrollo de diversas enfermedades inflamatorias en órganos distales como: páncreas, bazo, hígado e inclusive el sistema nervioso central, debido a que los metabolitos bacterianos participan en la regulación de las respuestas inmunitarias sistémicas (Nagao-kitamoto *et al.*, 2016; Nie *et al.*, 2019). Por lo tanto, la disbiosis intestinal está asociada a diversas enfermedades como: obesidad, diabetes, aterosclerosis, hipertensión, sarcopenia (Shimizu, 2018; Jia *et al.*, 2019).

No obstante, la disbiosis del microbioma intestinal está directamente relacionada con el desarrollo de enfermedades gastrointestinales, incluida enfermedad inflamatoria intestinal (EII), el cáncer de colon, enfermedad celíaca y el síndrome del intestino irritable (Marchesi *et al.*, 2016; Nagao-kitamoto *et al.*, 2016; Nie *et al.*, 2019).

2.2.1 Enfermedad inflamatoria intestinal

La EII es una enfermedad crónica que afecta el tracto gastrointestinal. Esta condición inflamatoria abarca dos formas principales, conocidas como enfermedad de Crohn (EC) y Colitis Ulcerosa (CU) (Nitzan, Elias, Peretz, & Saliba, 2016; Fakhoury, Negrulj, Mooranian, & Hani, 2019). La EC se caracteriza por una inflamación discontinua de la mucosa del colon, mientras que la CU causa inflamación continua y úlceras en la parte distal del colon (Fakhoury *et al.*, 2019).

La causa de la EII es desconocida; sin embargo, se cree que diversos factores genéticos y epigenéticos están involucrados en la presentación de la enfermedad (Pflughoeft & Versalovic, 2011; Nie *et al.*, 2019). Además, es ampliamente aceptado que esta enfermedad crónica resulta por alteraciones en el microbioma y una respuesta inmune exacerbada en un individuo genéticamente susceptible (Pflughoeft & Versalovic, 2011; Nagao-kitamoto *et al.*, 2016). Ensayos con ratas que contienen el transgén HLA-B27 (mutaciones genéticas que se han relacionado con la EII) están protegidos de la EII en estado libre de gérmenes, pero desarrollan EII tras la reconstitución de la microbiota intestinal, lo que implica que la EII depende de la presencia de bacterias intestinales; resultados similares se obtienen al tener ratones genéticamente modificados deficientes de citocinas IL-2 y IL-10 (Nitzan *et al.*, 2016). Algunas de las poblaciones bacterianas asociadas a la inflamación crónica de EII incluye a *Mycobacterium*, *Helicobacter*, *Campylobacter*, *Clostridium difficile* y *E. coli* adherente e invasiva (Marchesi *et al.*, 2016; Nagao-kitamoto *et al.*, 2016).

2.3 Patógenos emergentes asociados a la EII

Los patógenos emergentes son microorganismos que no son considerados en las listas de agentes etiológicos de enfermedades comunes en seres humanos. También, se consideran como patógenos emergentes aquellos microorganismos que se consideraban controlados o erradicados (Fralkinham, 2015; Vouga & Greub, 2016). Estos patógenos causan infecciones graves en poblaciones

inmunocomprometidas y representan un problema recurrente para hospitales o centros de rehabilitación (Larreinaaga & Berdasquera, Luisa Carmen. Corcho, 2000; Szewzky *et al.*, 2009; Vouga & Greub, 2016).

Estudios moleculares recientes han identificado en pacientes con EII, una disminución en la abundancia relativa de Firmicutes, especialmente *Faecalibacterium praisnitzii* (Nie *et al.*, 2019). De igual manera, se ha identificado el incremento en la abundancia relativa de géneros como *Bradyrhizobium*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Nocardioides*, *Novosphingobium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas* y *Sphingopyxis* (Frank *et al.*, 2007; Lepage *et al.*, 2011; Dimitrova *et al.*, 2017; Richard *et al.*, 2018; Chiodini, Dowd, Galandiuk, Davis, & Glassing, 2019).

La mayoría de los patógenos emergentes asociados a la EII se pueden recuperar a partir de muestras de agua potable. Muchos de estos microorganismos poseen un metabolismo oligotrófico, una estrategia biológica para sobrevivir y proliferar en ambientes con baja concentración de nutrientes (Koch, 2011; Kuznetsov, Dubinina, & Lapteva, 1979; Leclerc, 2003). Las bacterias con metabolismo oligotrófico pueden clasificarse en obligadas y facultativas. Las obligadas se desarrollan exclusivamente en ambientes bajos de nutrientes; mientras que, las facultativas se desarrollan en ambientes tanto bajos como ricos de nutrientes (copiótrofos) (Koch, 2011). Desafortunadamente los sistemas de monitoreo microbiológico de la calidad del agua se enfocan principalmente a la detección y cuantificación de microorganismos copiótrofos. Por lo tanto, se necesitan nuevas estrategias para la detección de estos microorganismos en agua destinada al consumo humano.

2.3.1 *Bradyrhizobium spp.*

El género *Bradyrhizobium* está conformado por bacilos Gram-negativos, son móviles, pertenecientes al filo de las *Alphaproteobacteria*. Las especies suelen desarrollar en medios con nutrientes mínimos; además, se caracterizan por tiempos de generación de hasta 18 horas (Kuykendall, 2015). Este género bacteriano es habitante natural de la rizosfera de diversas plantas; sin embargo, también se han identificado en sistemas de distribución (Gomez-alvarez, Revetta, & Domingo, 2012).

Estudios recientes han reportado la presencia de este microorganismo en pacientes pediátricos con enfermedad del hígado graso no alcohólico (Chierico *et al.*, 2017), también, se ha observado una alta prevalencia en pacientes con cuadros clínicos de colitis (Dimitrova *et al.*, 2017).

2.3.2 *Methylobacterium spp.*

Methylobacterium spp., es un género bacteriano perteneciente al filo de las *Alphaproteobacteria*. Son bacilos ramificados Gram-negativos o -variable, móviles que forma colonias con pigmentación de color rosa. Este género está ampliamente distribuido en la naturaleza (hojas, tierra, polvo y principalmente medios acuosos) y con frecuencia se aislada de agua potable en hospitales. Además, tienen gran capacidad de formar biopelículas y desarrollar resistencia a diversos desinfectantes y antibióticos (Green, 2006; Kovaleva, Degener, & Mei, 2014). Se ha reportado una prevalencia del 70% en muestras de agua potable clorada (Kovaleva *et al.*, 2014).

En la actualidad *Methylobacterium spp.* es considerado un patógeno oportunista en pacientes inmunocomprometidos; en general, causan síntomas clínicos leves, como fiebre. También se ha observado en infecciones graves, incluidas infecciones del torrente sanguíneo, peritonitis, úlceras y neumonía, donde la mayoría son infecciones nosocomiales (Kovaleva *et al.*, 2014; Truant, Gulati,

Giger, Satishchandran, & Caya, 2018). Aunado a esto, estudios recientes han reportado un aumento en la abundancia relativa de este patógeno en la mucosa de pacientes con EC (Chiodini *et al.*, 2019) y CU (Dimitrova *et al.*, 2017).

2.3.3 *Microbacterium spp.*

Microbacterium es un género bacteriano en forma de bacilos Gram-positivos, pueden ser móviles o no, las colonias representativas son de color amarillo, perteneciente al filo de las *Actinobacterias*. Este género está distribuido en diversos ambientes como suelo, aguas superficiales y de oceánicas (Takeuchi, 2015; Yuan *et al.*, 2014). Se ha reportado un aumento en la prevalencia de *Microbacterium spp.* en muestras de sangre, orina, tejido óseo, heridas superficiales, fluido pleural y fluido de diálisis, en cuadros de bacteriemias y neumonías (Gneiding, Frodl, & Funke, 2008). Además, se ha observado un incremento de este género en pacientes con cáncer colorectal (Richard *et al.*, 2018).

2.3.4 *Nocardioides spp.*

Nocardioides spp. es un género perteneciente a la familia *Nocardioideaceae*, son bacterias Gram-positivas, no forman endospora y pueden ser móviles. Las colonias formadas por este género son muy variadas, desde blanco hasta pigmentación amarilla y naranja. Algunas especies desarrollan bien en medios copiotrófos; sin embargo, la mayoría requiere medios de cultivo oligotróficos (Evtushenko, Krausova, & Yoon, 2015). Estos microorganismos se han aislado cotidianamente a partir de sedimentos marinos y agua potable (Tóth *et al.*, 2011; Yuan, Yu, Li, Dong, & Zhang, 2014). Aunque no son considerados como patógenos para el humano, se ha reportado una alta prevalencia de esta bacteria en pacientes con EII (Frank *et al.*, 2007).

2.3.5 *Novosphingobium* spp.

Novosphingobium es un género bacteriano perteneciente a la familia *Sphingomonadaceae*, son bacterias en forma de bacilos Gram-negativas, no esporulantes, móviles o no móviles que llegan a medir entre 0.3 a 0.5 μm . Se han identificado 23 especies de este género (Takeuchi, Hamana, & Hiraishi, 2001; Glaeser & Ka, 2014) que se caracteriza por poseer un metabolismo versátil, que les permite habitar diferentes ambientes, oligotróficos como aguas marinas y superficiales (Kumar *et al.*, 2017; Farhat, Alkharsah, Alkhamis, & Bukharie, 2018). Análisis metagenómicos han revelado que este género es dominante en muestras de agua potable (Farhat *et al.*, 2018). Esta bacteria se ha asociado con enfermedades hepáticas como cirrosis biliar y colangitis biliar; esta última, relacionada con la EII debido a una acumulación de productos biliares tóxicos que no solo perpetúa a nivel epitelial biliar, sino que también altera la composición de la microbiota intestinal promoviendo interacciones con el huésped (Frank *et al.*, 2007; Mattner, 2016; Tanaka, Leung, & Gershwin, 2019).

2.3.6 *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas son un género bacteriano, en forma de bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram-negativos, móviles con uno o varios flagelos que pertenecen a la familia *Pseudomonadaceae*. Este género incluye varias especies patógenas para humanos, animales y plantas (Fitzsimmons *et al.*, 2011; Palleroni, 2015). Estas bacterias se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, donde los sistemas de agua se consideran una fuente importante de *Pseudomonas aeruginosa*, patógeno de relevancia en humanos (Szewzky *et al.*, 2009).

La ocurrencia de *P. aeruginosa* en sistemas de distribución de agua potable está asociada a sistemas no sanitizados con frecuencia (Szewzky *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2017). Este género se aísla frecuentemente de lavabos, instalaciones y equipo hospitalario (instrumentos médicos, regaderas, superficies inertes y red de agua); se ha estimado que ~10% de las enfermedades nosocomiales se pueden atribuir a

P. aeruginosa (Leclerc & Moreau, 2002; Szewzky *et al.*, 2009). También se ha reportado la presencia de este patógeno en ~10% de muestras de agua embotellada (Georgieva & Dimitrova, 2016). Recientemente se reportó que alrededor del 20% de los aislamientos son multirresistentes a antibióticos (Callejas-Díaz *et al.*, 2018; Zeinalian, Hashemzadeh-Chaleshtori, Salehi, & Emami, 2018). En muestras de pacientes con CU y EC se han identificado la presencia de *P. mendocina* y *P. fluorescens* (Dimitrova *et al.*, 2017); además de un incremento de miembros de la familia *Pseudomonadaceae* (Chiodini *et al.*, 2019).

2.3.7 *Rhodococcus spp.*

El género *Rhodococcus* es miembro de la familia *Nocardiaceae*. Son bacterias en forma de cocos Gram-positivos o -variables, las colonias aisladas de este género presentan coloraciones amarillo, crema, naranja o rojas. Estas coloraciones pueden ser ocasionadas principalmente por proteínas sideróforas. La distribución de este género bacteriano se da principalmente en medios terrestres (suelo, lodos, sedimentos marinos, materia fecal de animales) y medios acuáticos (aguas residuales). En miembros de este género se han reportado altos niveles de resistencia a sulfonamidas, antibióticos empleados a menudo contra las infecciones sistémicas (Jones & Goodfellow, 2015). Algunas especies son consideradas patógenas oportunistas, debido a que afectan principalmente a personas inmunocomprometidas, involucradas principalmente en casos de neumonía (Ayoade, Mauyoade, & Alam, 2019). También se ha reportado una alta prevalencia de *Rhodococcus erythropolis* en pacientes con CU (Lepage *et al.*, 2011).

2.3.8 *Sphingomonas spp.*

Sphingomonas son un género de bacterias Gram-negativas con forma de bacilo, pertenecen al filo Alphaproteobacteria prevalentes en sistemas de distribución de agua potable (Takeuchi, Sawada, Oyaizu, & Yokota, 1994; Leclerc, 2003; Gulati & Ghosh, 2017). Algunas especies de este género son conocidos por su capacidad

de formar biopelículas (Gulati & Ghosh, 2017). *Sphingomonas paucimobilis* es la especie más relevante por su participación en enfermedades nosocomiales; recientemente, se han identificado dos nuevas especies, *S. mucosissima* y *S. adhesiva*, de importancia clínica moderada (Ryan & Adley, 2010). Se ha reportado que especies de *Sphingomonas* aisladas de agua potable son altamente resistentes a múltiples antibióticos (Jardine, Abia, Mavumengwana, & Ubomba-Jaswa, 2017; Agyepong, Govinden, & Owusu-ofori, 2018). Este género se ha asociado con pacientes de EII y en especial aquellos con EC (Frank *et al.*, 2007; Chiodini *et al.*, 2019).

2.3.9 *Sphingopyxis* spp.

Las especies del género *Sphingopyxis* son bacilos Gram-positivos, pertenece a la familia *Sphingomonadaceae*, pueden ser móviles o no móviles. Se caracterizan por formar colonias color amarillo. Hasta el año 2001, miembros de este género estaban clasificadas como *Sphingomonas*; sin embargo, estudios filogenéticos con el gen *16S rRNA* permitió la asignación de un nuevo género (Takeuchi *et al.*, 2001). Aunque existen pocos casos documentados de infecciones en humanos, *Sphingopyxis* se ha asociados a casos de vaginosis bacteriana (Pflughoeft & Versalovic, 2011), además, este género es parte de la familia *Sphingomonadaceae*, que ha sido involucrada a casos de EC y CU (Frank *et al.*, 2007; Rudi *et al.*, 2012).

2.4 Resistencia a antibióticos de patógenos emergentes

La resistencia a los antibióticos es un problema grave a nivel mundial causando que las terapias con antimicrobianos resulten ineficaces, provocando infecciones persistentes con potencial a una propagación sistémica (OMS, 2017, 2018). Las modificaciones genéticas más comunes derivan de mutaciones puntuales, transferencia vertical u horizontal de elementos genéticos móviles como integrones, transposones y plásmidos (Cuevas *et al.*, 2009; Koch, 2011). Estos elementos genéticos móviles se pueden propagar a bacterias patógenas o comensales causando una diseminación masiva de la resistencia microbiana

(Alós, 2015). Algunos estudios han sugerido que el agua es una de las principales fuentes para la adquisición y transferencia de genes de resistencia a antibióticos ((Falcone-Dias, Vaz-Moreira, & Manaia, 2012) Falcone-Dias 2015, Vaz-Moreira, & Manaia, 2012; Zhou *et al.*, 2018).

Algunos estudios han reportado que miembros de la familia *Sphingomonadaceae* aislados de agua potable, presentan una alta prevalencias de resistencia a betalactámicos, ciprofloxacina y cotrimoxazol (Vaz-Moreira, Nunes, & Manaia, 2011). También se ha reportado que los miembros a esta familia tienen resistencia intrínseca a colistina (Narciso-da-Rocha, Vaz-Moreira, & Manaia, 2014). De igual manera se ha demostrado que las cepas del género *Bradyrhizobium* son resistentes diversos antibióticos como tetraciclinas, vancomicina y estreptomina (Kuykendall, 2015). El género *Rhodococcus*, ha demostrado fenotipos de resistencia a la mayoría de los compuestos antituberculosos como espectomicina, (Jones & Goodfellow, 2015).

Basado en todo lo anterior, el presente trabajo se enfocó a estudiar el agua purificada embotellada comercial como fuente de patógenos emergentes asociados a la EII. Consideramos que esta información es fundamental para establecer nuevas estrategias y políticas de calidad de agua purificada.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General:

Identificar la diversidad, prevalencia y MRA de patógenos emergentes asociados a la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) presentes en agua purificada embotellada.

3.2 Objetivos específicos:

- a) Establecer una estrategia microbiológica enfocada a la detección de patógenos emergentes asociados a la EII en agua purificada embotellada.
- b) Identificar la diversidad taxonómica de patógenos emergentes prevalentes en agua purificada embotellada.
- c) Identificar los patrones de MRA de patógenos emergentes asociados a la EII prevalentes en purificada.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Etapa I: Estrategia microbiológica enfocada a la detección de patógenos emergentes en agua purificada embotellada.

Se realizó una evaluación con diferentes medios de cultivo para identificar el medio de cultivo más adecuado para el aislamiento de patógenos emergentes asociados a la EII.

4.1.1 Muestreo.

Se seleccionaron cinco marcas comerciales de agua potable embotellada, que se adquirieron en tiendas de autoservicio de la Cd. de Querétaro, Qro. Las diferentes marcas comerciales se identificaron como A, B, C, D, E. Todas las aguas analizadas estaban contenidas en botellas de tereftalato de polietileno (PET) de 1 litro. Las muestras se transportaron al laboratorio a 4 °C para su procesamiento.

4.1.2 Evaluación del desempeño de diferentes fórmulas de medios de cultivo para bacterias oligotróficas.

Se evaluó el desempeño de 9 medios de cultivos para recuperar organismos oligotróficos a partir de muestras de agua purificada embotellada. Para este fin, se formularon medios oligotróficos con diferentes concentraciones de nutrientes básicos (Tabla 1, Tabla 2 y **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). En cada medio se depositó 1.0 ml de agua purificada y se extendió en la superficie del agar, para posteriormente ser incubadas a 37 °C, durante 15 días (Paszko-Kolva *et al.*, 1991; Leclerc & Moreau, 2002); en cada experimento se incubó una placa de medio (sin muestra de agua) como control negativo. Al finalizar el periodo de incubación, se colectaron colonias representativas de cada morfología para realizar subcultivos y obtener aislamientos axénicos. Los aislamientos se conservaron en glicerol al 20% (v/v) y a -80 °C.

Tabla 1. Formulación de medios 1-3

Componente	Medio 1 (g/l)	Medio 2 (g/l)	Medio 3 (g/l)
Extracto de levadura	0.5	0.05	0.005
Proteosa peptona	0.5	0.05	0.005
Peptona ácida de caseína	0.5	0.05	0.005
Glucosa	0.5	0.05	0.005
Almidón soluble	0.5	0.05	0.005
Piruvato sódico	0.3	0.03	0.003
Fosfato dipotásico	0.3	0.03	0.003
Sulfato de magnesio anhídrido	0.024	0.0024	0.00024
Agar bacteriológico	15	15	15

Composición de las formulaciones a partir del medio comercial Agar R2A (Acumedia, Neogen).

Tabla 2. Formulación de medios 4-6

Componente	Medio 4 (g/l)	Medio 5 (g/l)	Medio 6 (g/l)
Digerido enzimático de caseína.	0.15	0.015	0.0015
Digerido enzimático de harina de soja	0.05	0.005	0.0005
Cloruro de sodio	0.05	0.005	0.0005
Agar bacteriológico	15	15	15

Composición de las formulaciones a partir del medio comercial Agar soya tripticaseína (CST) (Acumedia, Neogen).

Tabla 3. Formulación de medios oligotróficos 7-9

Componente	Medio 7 (g/l)	Medio 8 (g/l)	Medio 9 (g/l)
Digerido enzimático de gelatina	0.05	0.005	0.0005
Extracto de carne de res	0.03	0.003	0.0003
Agar bacteriológico	15	15	15

Composición de las formulaciones a partir del medio comercial Agar nutritivo (AN) (Acumedia, Neogen).

4.1.2.1 Microorganismos oligotróficos estrictos o facultativos.

Para determinar metabolismo oligotrófico estricto o facultativo, los aislamientos se cultivaron en caldo soya a 37 °C por 96 h. Microorganismos que desarrollaron en CTS se consideraron oligotróficos facultativos y sin desarrollo se consideraron oligotróficos estrictos (Kumar, Arvind. Mukherjee, Shriparna. Charkraborty, 2010).

4.1.3 Identificación taxonómica de bacterias oligotróficas.

Las bacterias aisladas se identificaron mediante amplificación y secuenciación del gen *16S rRNA* utilizando los iniciadores 8F (3'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-5') y 1510R (3'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-5') (Xiang, Yao, An, Xu, & Wang, 2005). La extracción de ADN de todos los aislamientos se realizó con el kit InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EE. UU.), siguiendo las indicaciones del fabricante. El ensayo de PCR se realizó en reacciones de 17 ml que contenían 0.05 mM de cada iniciador, 0.2 mM de cada dNTP, 1 U Dream Taq green buffer, 0.025 U Dream Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) 7 ml (10e100 ng) de ADN genómico. Las reacciones ya estandarizadas incluyeron: desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 45 s, recocido de cebadores a 55.3 °C durante 30 s y elongación a 72 °C durante 30 s y elongación final a 72 °C durante

5 min. Los ensayos de PCR se realizaron en un termociclador térmico C1000 (Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU.) y se corrió un gel de agarosa al 1.5% en una cámara de electroforesis a 90 V por 30 min. Los productos de PCR de ~1500 pb se enviaron a secuenciación con metodología Sanger (GeneWiz, New Jersey, EE. UU.).

Los datos de secuencia obtenidos se introdujeron en el proyecto de base de datos Ribosomal (RDP por sus siglas en Ingles) (<https://rdp.cme.msu.edu/>) y la base de datos de ARN ribosomal de alta calidad SILVA (<https://www.arb-silva.de/>), para ser comparadas y así identificar a nivel de género con un porcentaje de identidad superior al 90% (Alemzadeh, Haddad, & Ahmadi, 2014; Falcone-Dias *et al.*, 2015).

4.2 Etapa II: Prevalencia de patógenos emergentes asociados a la EII

Para la segunda etapa, se eligieron los mejores medios basados en la diversidad y aislamiento de géneros asociados enfermedades sistémicas y a la EII. Se seleccionaron los medios 1, 2, 4 y 7. Además, se utilizó un medio adicional, medio 10 (Tabla 4).

Tabla 4. Formulación de medio oligotrófico 10

Componente	Medio 10 (g/l)
Extracto de levadura	0.5
Dextrosa	0.3

Los componentes fueron reactivos comerciales (Acumedia, Neogen).

4.2.1 Incidencia de patógenos emergentes a partir de agua purificada.

Se analizaron 4 lotes distintos de las cinco marcas de agua purificada embotellada. La metodología empleada se llevó a cabo de la misma manera que en la primera etapa (*Sección 4.1.2*), al arribo de las muestras se inocularon en los

medios 1, 2, 4, 7 y 10. Todos los medios se incubaron a 37 °C durante 15 días. Después del periodo de incubación se colectaron colonias representativas de cada morfología para subcultivo en los correspondientes medios de cultivo para su purificación (Vandermaesen, Lievens, & Springael, 2017).

4.3 Etapa III: Resistencia antimicrobiana de patógenos emergentes asociados a la EII.

Las bacterias prevalentes en agua son una fuente potencial de genes de resistencia a antibióticos que pueden ser transmitidos a patógenos de humanos (Falcone-Dias *et al.*, 2015). Por tal razón, se evaluó el perfil de resistencia a antibióticos de los aislamientos recuperados a partir de agua embotellada.

4.3.1 Determinación fenotípica de la resistencia a antibióticos de bacterias oligotróficas.

El fenotipo de resistencia a los antibióticos se analizó con el método de difusión de disco propuesto por Tehrani y Gilbride (Tehrani & Gilbride, 2018). Brevemente, el inóculo se sembró en el medio agar R2A medio (Acumedia, Lansing, EE. UU.) y se incubó de 48 a 72 h (Lowman & Aithma, 2010; Narciso-da-Rocha *et al.*, 2014). Los antibióticos probados fueron los siguientes: Amoxicilina con ácido clavulánico (30 µl), Ampicilina (10 µl), Colistina (10 µl), Gentamicina (10 µl), Tetraciclina (30 µl), Ceftriaxona (30 µl), Sulfametoxazol con trimetropim (25 µl), Oxitetraciclina (30 µl) Imipenem (10 µl), Cloranfenicol (30 µl) y Ciprofloxacina (5 µl). La cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 se incluyó como control. Los aislamientos se clasificaron como R y S de acuerdo a las especificaciones de fabricante (Magiorakos *et al.*, 2011); además, se clasificaron como multirresistentes cuando presentaron resistencia a 3 o más clases de antibióticos (Narciso-da-Rocha *et al.*, 2014).

V. Resultados y discusión

5.1 Estrategia microbiológica para la detección de patógenos emergentes.

Un total de 5 marcas de agua se sometieron a evaluación microbiológica utilizando 9 medios de cultivo incubados. Las morfologías bacterianas representativas obtenidas en cada medio se identificaron a través de la amplificación y secuenciación del gen *16S rRNA*. El 83% de los aislamientos presentaron metabolismo oligotrófico facultativo (Chakraborty *et al.*, 2013; Shams, Qasemi, Afsharnia, Mohammadzadeh, & Zarei, 2019). En total se identificaron 28 géneros bacterianos (Tablas 5 y 6). Se realizó una revisión exhaustiva de la literatura para clasificar a estos géneros, en microorganismos patógenos emergentes asociados a la i) EII, ii) infecciones sistémicas (IS) y iii) no asociados a procesos infecciosos (PI) (Tabla 5).

La mayor cantidad de géneros bacterianos clasificados como patógenos emergentes de EII se aislaron en los medios 1, 2, 4 y 5 (Figura 4A); mientras que, la mayor cantidad de géneros bacterianos asociadas a enfermedades sistémicas se recuperaron en los medios 1, 2 y 4 (Figura 4B). Algunos géneros bacterianos se lograron aislar en más de un medio bacteriológico. Por ejemplo, *Novosphingobium* se logró aislar en 6/9 medios (1, 2, 3, 5, 7, y 8), *Bacillus* y *Staphylococcus* en medios 1, 2, 4 y 5. En contraste, algunos géneros como *Microbacterium* y *Nocardioides* se recuperaron en un solo medio, 2 y 7 respectivamente (Tabla 6).

Tabla 5. Géneros bacterianos y su importancia clínica.

PATÓGENOS EMERGENTES ASOCIADOS A EII		
Género	Enfermedad	Referencia
<i>Microbacterium</i>	Bacteremia, neumonía, colitis asociada al cáncer	Falcone-Dias <i>et al</i> 2015; Richard <i>et al.</i> , 2018
<i>Nocardioides</i>	Enfermedad inflamatoria intestinal	(Frank <i>et al.</i> , 2007)
<i>Novosphingobium</i>	colangitis biliar primaria, enfermedad inflamatoria intestinal	Tanaka <i>et al</i> 2019, Alleluiah <i>et al</i> 2014; Mattner, 2016; Tanaka, Leung, & Gershwin, 2019
<i>Rhodococcus</i>	Colitis ulcerativa	Lepage <i>et al.</i> , 2011
<i>Bacillus</i>	Gastroenteritis	Bottone 2010; Xaplanteri 2019
<i>Staphylococcus</i>	Diarrea, fiebres, bacteremia,	Szczuka <i>et al</i> 2018
PATÓGENOS ASOCIADOS A IS		
Género	Enfermedad	Referencia
<i>Acinetobacter</i>	Neumonía, bacteriemia, infecciones cutáneas, urinarias, meningitis	Antunes <i>et al.</i> 2014, Wang <i>et al.</i> 2019
<i>Arthrobacter</i>	Infección urinaria, bacteremia	Diaz <i>et al</i> 2019, Shin <i>et al.</i> 2006
<i>Cellulomonas</i>	Colangitis ascendente, bacteriemia, sepsis, endocarditis, osteomielitis	Salas, 2014; Ping-Chang <i>et al</i> 2009
<i>Cellulosimicrobium</i>	Sepsis, endocarditis,	Casanova-Román <i>et al.</i> , 2010; Petkar <i>et al.</i> , 2011
<i>Micrococcus</i>	Endocarditis, meningitis, artritis séptica	Busse <i>et al.</i> , 2015
<i>Paracoccus</i>	Bacteriemia, neumonía	Funke <i>et al</i> 2004, Sack <i>et al</i> 2017
<i>Rothia</i>	Neumonía, septicemia, peritonitis	Maraki & Papadakis 2015, Poyer <i>et al</i> 2019
<i>Gordonia</i>	Bacteriemia, artritis	Ramanam <i>et al</i> 2013, Blaschke 2007
<i>Janibacter</i>	Bacteriemia	Loubinoux <i>et al.</i> , 2005; Elsayed & Zhang 2005
<i>Kocuria</i>	Bacteriemia, ulcera en cornea, fascitis necrotizante	Živković <i>et al.</i> , 2019; Joshi <i>et al</i> 2018

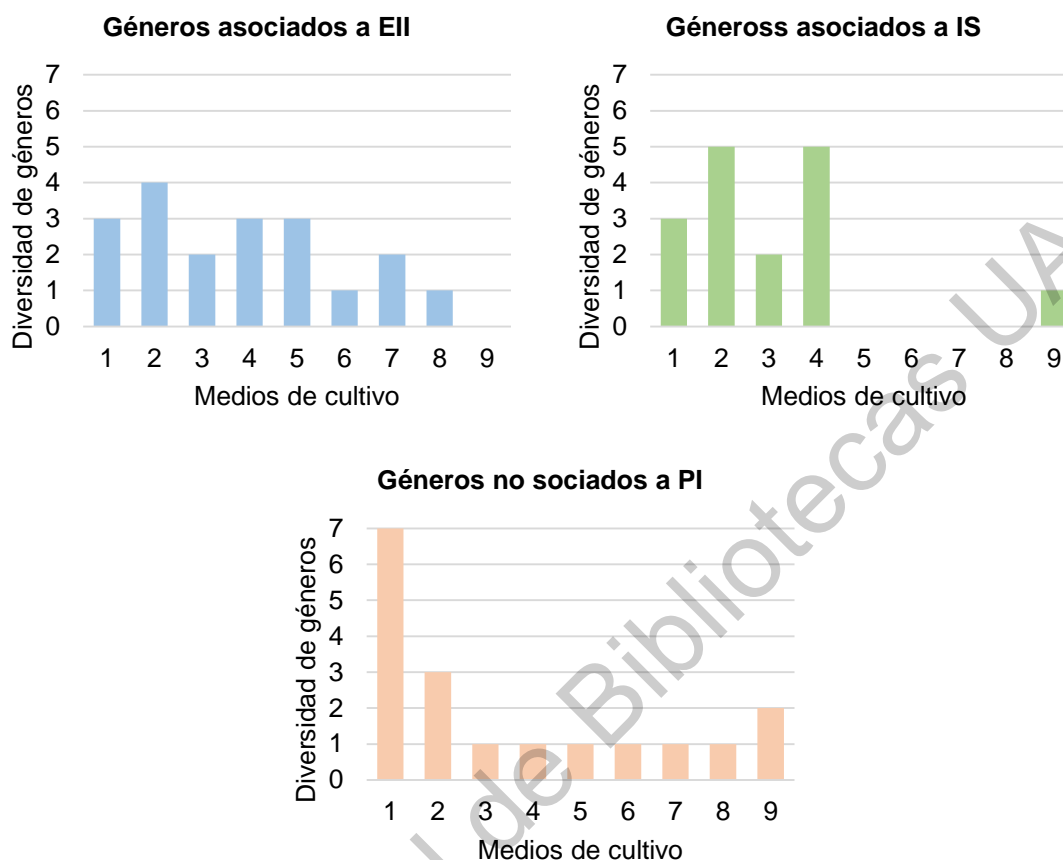


Figura 4. Recuperación de géneros bacterianos por medio de cultivo. A) recuperación de patógenos emergentes asociados a la EII, B) recuperación de géneros asociados a infecciones sistémicas, C) Recuperación de géneros no asociados a procesos infecciosos.

Actualmente, el medio R2A es el único medio oligotrófico disponible comercialmente para análisis de agua potable y embotellada (Reasoner & Geldreich, 1985). No se han desarrollado otros medios de cultivo especializados en el aislamiento de bacterias prevalentes en agua. Algunas de las estrategias enfocadas a mejorar la probabilidad de recuperación se ha basado simplemente en incrementar las horas de incubación (Pulschen *et al.*, 2017); esto ha sido exitoso para recuperar algunas cepas de *Novosphingobium spp.*, *Sphingomonas spp.* y *Sphingopyxis spp.* (Furuhata *et al.*, 2007; Narciso-da-Rocha *et al.*, 2014). Por otra parte, el uso de agar nutritivo diluidos 1:100, 1:1,000 y hasta 1:10,000 ha permitido el aislamiento de los géneros *Pseudomonas*, *Bradyrhizobium* y

Rhodococcus (Tada & Ihmori, 1995; Vandermaesen *et al.*, 2017). Motivo por el cual quizás se logró la recuperación de gran diversidad de géneros.

Tabla 6. Géneros obtenidos por medio de cultivo.

Medios Géneros	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Microbacterium</i>		■							
<i>Nocardioides</i>							■		
<i>Novosphingobium</i>	■	■	■		■		■	■	
<i>Rhodococcus</i>				■		■			
<i>Bacillus</i>	■	■			■				
<i>Staphylococcus</i>	■			■					
<i>Acinetobacter</i>		■	■						
<i>Arthrobacter</i>	■								■
<i>Cellulomonas</i>				■					
<i>Cellulosimicrobium</i>			■						
<i>Gordonia</i>		■							
<i>Janibacter</i>		■							
<i>Kocuria</i>	■	■		■					
<i>Micrococcus</i>		■		■					
<i>Paracoccus</i>									
<i>Rothia</i>									
<i>Blastococcus</i>									■
<i>Bosea</i>						■			
<i>Deinococcus</i>	■	■		■	■				
<i>Enhydrobacter</i>			■				■	■	
<i>Georgenia</i>		■							
<i>Isoptericola</i>	■								
<i>Micromonospora</i>	■								
<i>Microvirga</i>		■							
<i>Noviherbaspirillum</i>	■								
<i>Paenibacillus</i>									■
<i>Promicromonosporaceae</i>									
<i>Ramlibacter</i>									

Las celdas negras representan recuperación del género según corresponde el medio de cultivo.

5.2 Diversidad de bacterias oligotróficas en agua purificada embotellada.

La prevalencia de patógenos emergentes se determinó mediante el análisis microbiológico de 4 lotes distintos por marca de agua embotellada. Para este fin se utilizaron 5 medios distintos (1, 2, 4, 7 y 10). Estos análisis permitieron la recuperación de un total de 189 aislamientos, clasificados en 40 géneros bacterianos distintos. La marca con mayor diversidad de géneros fue B y C con 17 géneros seguida de A con 13 géneros, D y E con 10 géneros cada una (Figura 5). La mayor cantidad de géneros asociados a EII y enfermedades sistémicas se aislaron de la marca B con 7 y 8 géneros, seguido de la marca C con 5 y 6 géneros, A con 5 y 4 géneros, E con 4 y 4 géneros, D 2 y 4 géneros, respectivamente (Tablas 7 y 8). En general, el agua con mayor número de bacterias con potencial patogénico fueron B, C y A (Figura 5).

En la marca A se observó la presencia de *Novosphingobium spp.* y *Bradyrhizobium spp.* El análisis de la marca B evidenció la presencia de *Sphingomonas spp.* y *Sphingopyxis spp.* Mientras que, *Methylobacterium spp.* de la marca C. En la marca E se identificó la presencia de *Microbacterium spp.* (Figura 5). Todos estos géneros han sido asociados al desarrollo de la inflamación crónica característica de EII (Chiodini, Dowd, Galandiuk, Davis, & Glassing, 2019; Dimitrova *et al.*, 2017; Frank *et al.*, 2007; Richard *et al.*, 2018).

Los géneros *Acinetobacter*, *Novosphingobium*, *Sphingomonas*, han sido identificados en agua de hospitales (Farhat, Alkharsah, Alkhamis, & Bukharie, 2018; Furuhashi *et al.*, 2007; Narciso-da-Rocha *et al.*, 2014); mientras que, en plantas tratadoras de agua se ha recuperado a *Rhodococcus spp.* (Vandermaesen *et al.*, 2017), así mismo, en aguas termales existe la presencia de géneros como *Kocuria* y *Arthrobacter* (Jardine *et al.*, 2017). Géneros como *Bradyrhizobium*, *Staphylococcus* y *Microbacterium* se han identificado en agua mineral embotellada (Falcone-Dias *et al.*, 2015).

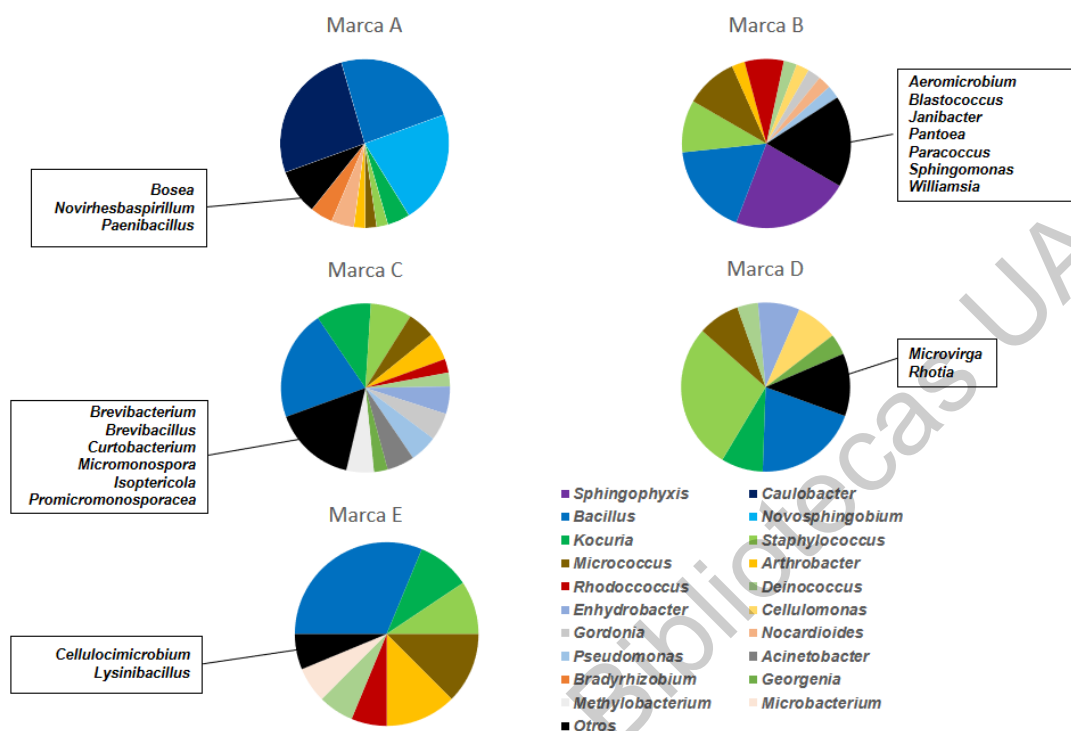


Figura 5. Diversidad taxonómica de bacterias oligotróficas. Los colores que representan a las bacterias para todos los gráficos, se encuentran en la lista inferior derecha. Cada círculo representa una de las marcas analizadas.

5.3 Prevalencia de bacterias patógenas presentes en agua purificada embotellada.

De la diversidad de géneros obtenidos a partir de las muestras de agua embotellada, el 62.5% son considerados como microorganismos con potencial patogénico para el ser humano (Tabla 5, 7 y 8). De éstas, el 44% se ha asociado a EII y el 56% a infecciones sistémicas. El análisis microbiológico utilizando varios lotes de cada marca reveló que varios de estos microorganismos son prevalentes en estos productos. Por ejemplo, en el agua de la marca A, *Bacillus* spp., se recuperó del 80% (4/5) de muestras, seguido de *Novosphingobium* spp. en 60% (3/5) muestras y *Staphylococcus* spp., *Bradyrhizobium* spp. y *Nocardioidea* spp. únicamente en 20% (1/5) muestras, respectivamente (Tabla 7). En la marca B, *Bacillus* spp. y *Staphylococcus* spp. fueron los más prevalentes con 80% (4/5) y

60% (3/5), respectivamente, seguido de *Rhodococcus* spp. y *Sphingopyxis* spp., en 40% (2/5); respectivamente, y finalmente, *Nocardioides* spp., *Pseudomonas* spp. y *Sphingomonas* spp. en 20% (1/5), respectivamente. La marca B presentó la mayor diversidad de patógenos asociados a la EII. En la marca C, *Bacillus* spp. se observó en el 100% (5/5) de las muestras, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp. y *Rhodococcus* spp. en el 20% (1/5) de las muestras, respectivamente. Mientras que la marca D, presentó *Bacillus* spp., y *Staphylococcus* spp. en 60% (3/5) muestras, respectivamente. Por último, en la marca E, *Bacillus* spp. y *Staphylococcus* spp. se observaron en 80% (4/5) y 60% (3/4) de las muestras, respectivamente; seguido de *Rhodococcus* spp. 40% (2/5) y *Microbacterium* spp. 20% (1/5) (Tabla 7).

En los últimos años, se ha evidenciado la presencia de *Novosphingobium* spp. y *Bradyrhizobium* spp, en la mucosa colónica de pacientes con EII (Dimitrova *et al.*, 2017; Frank *et al.*, 2007). Mientras que, la presencia de *Sphingomonas* spp. y *Sphingopyxis* spp. se han asociado a casos de EII (Chiodini *et al.*, 2019; Frank *et al.*, 2007); estos miembros de la familia *Sphingomonadaceae* tienen la capacidad de penetrar y translocar la mucosa intestinal exacerbando la inflamación crónica, esta patobiología también se ha asociado a *Methylobacterium* spp. (Chiodini *et al.*, 2019). De igual manera ha observado que *Microbacterium* spp, una *Actinobacterias* es prevalente en casos de colitis asociada a cáncer (Richard *et al.*, 2018).

Tabla 7. Prevalencia de géneros asociados a EII.

Géneros	Marca A (%)	Marca B (%)	Marca C (%)	Marca D (%)	Marca E (%)
<i>Bacillus</i>	4/5 (80)	4/5 (80)	5/5 (100)	3/5 (60)	4/5 (80%)
<i>Staphylococcus</i>	1/5 (20)	3/5 (60)	1/5 (20)	3/5 (60)	3/5 (60)
<i>Bradyrhizobium</i>	1/5 (20)	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>Methylobacterium</i>	0/5	0/5	1/5 (20)	0/5	0/5
<i>Microbacterium</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5 (20)
<i>Nocardioides</i>	1/5 (20)	1/5 (20)	0/5	0/5	0/5
<i>Novosphingobium</i>	3/5 (60)	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>Pseudomonas</i>	0/5	1/5 (20)	1/5 (20)	0/5	0/5
<i>Rhodococcus</i>	0/5	2/5 (40)	1/5 (20)	0/5	2/5 (40)
<i>Sphingomonas</i>	0/5	1/5 (20)	0/5	0/5	0/5
<i>Sphingophyxis</i>	0/5	2/5 (40)	0/5	0/5	0/5

Número de lotes positivos sobre los 5 lotes analizados, en paréntesis se expresa el porcentaje.

De los géneros asociados a infecciones sistémicas, la mayoría se recuperó en un 20% (1/5) de las muestras. *Kocuria spp.* Se observó en 40% de las marcas A, C, D y E, cada una. *Micrococcus spp.*, prevalente en A, B, C, D y E con un 20, 40, 40, 40 y 60% respectivamente (Tabla 8), (Takeuchi, 2015; Zarić *et al.*, 2019). Con alta prevalencia siendo único por marca se encuentra, *Caulobacter spp.* aislado en el 80% (4/5) de las muestras de la marca A (Tabla 8), *Acinetobacter* que, aunque presentó baja prevalencia (20 %) únicamente en la marca C (Tabla 8).

El género *Caulobacter* se ha asociado a infecciones de las meninges (Bridger *et al.*, 2012); mientras que *Acinetobacter* es considerado patógeno sistémico para

personas inmunocomprometidas y un patógeno altas tasas de MRA (Bergogne-Bérézin & Towner, 1996; Geisinger & Isberg, 2017; Kumar, Arvind. Mukherjee, Shriparna. Charkraborty, 2010). En conjunto, estos resultados resaltan el potencial del agua purificada embotella como fuente de patógenos emergentes para seres humanos.

Tabla 8. Prevalencia de géneros asociados a infecciones sistémicos.

Género	Marca A	Marca B	Marca C	Marca D	Marca E
<i>Acinetobacter</i>	0/5	0/5	1/5 (20)	0/5	0/5
<i>Arthrobacter</i>	1/5 (20)	1/5 (20)	1/5 (20)	0/5	2/5 (40)
<i>Brevibacterium</i>	0/5	0/5	1/5 (20)	0/5	0/5
<i>Caulobacter</i>	4/5 (80)	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>Cellulomonas</i>	0/5	1/5 (20)	0/5	1/5 (20)	0/5
<i>Cellulosimicrobium</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>Gordonia</i>	0/5	1/5 (20)	0/5	0/5	0/5
<i>Janibacter</i>	0/5	1/5 (20)	0/5	0/5	0/5
<i>Kocuria</i>	2/5 (40)	0/5	2/5 (40)	2/5 (40)	2/5 (40)
<i>Micrococcus</i>	1/5 (20)	2/5 (40)	2/5 (40)	2/5 (40)	3/5 (60)
<i>Pantoea</i>	0/5	1/5 (20)	0/5	0/5	0/5
<i>Paracoccus</i>	0/5	1/5 (20)	0/5	0/5	0/5
<i>Rothia</i>	0/5	0/5	0/5	20 (1/5)	0/5
<i>Williamsia</i>	0/5	1/5 (20)	0/5	0/5	0/5

Número de lotes positivos sobre los 5 lotes analizados, en paréntesis se expresa el porcentaje.

5.4 Resistencia a antibióticos.

Las bacterias prevalentes en aguas superficiales y sistemas de agua potable son una fuente potencial para diseminar la resistencia a antibióticos (Falcone-Dias *et al.*, 2015), por tal razón, se evaluó el perfil de resistencia a antibióticos de los aislados a partir de las aguas purificadas embotelladas. Un total de 65 aislamientos se sometieron a ensayos fenotípicos de resistencia. Sorpresivamente, el análisis reveló una alta prevalencia en la resistencia a colistina (92%), seguido de gentamicina (72%), ampicilina (27%), ceftriaxona (23%) y cirpofloxacino (20%). Para el resto de los antibióticos, la resistencia fue menor al 20% (Figura 6 y Anexo 1).

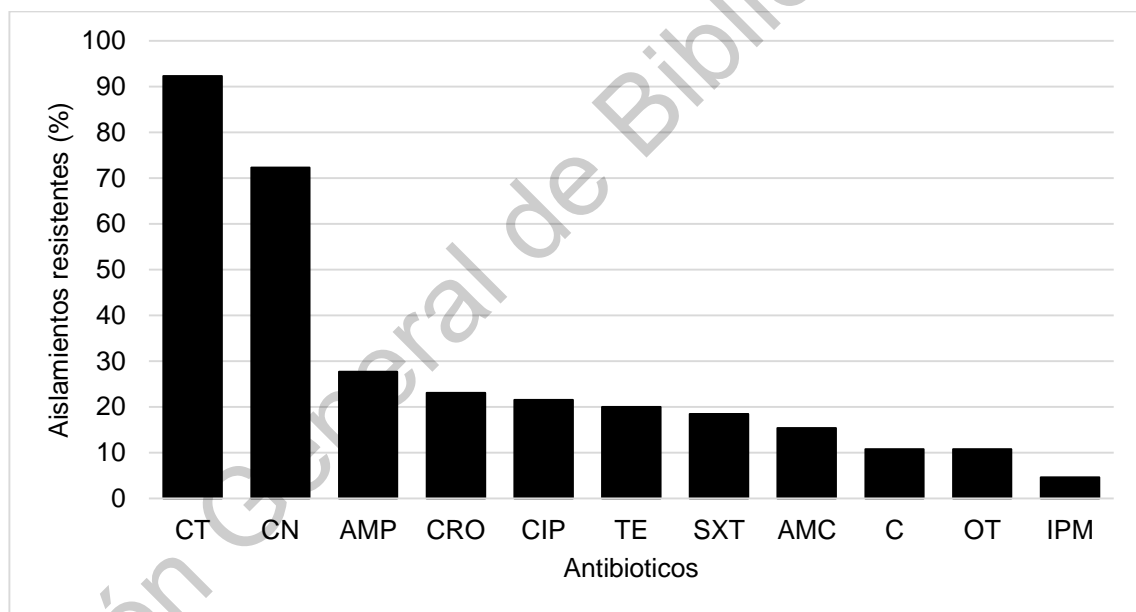


Figura 6. Resistencia a antibióticos de bacterias aisladas de agua embotellada.

CT, Colistina; CN, Gentamicina; AMP, Ampicilina; Cro, Ceftriaxona; CIP, Ciprofloxacina; TE, Tetraciclina SXT, Sulfametoazol con trimetoprim; AMC, Amoxicilina con ác. Clavulanico; C, Cloranfenicol; OT, Oxitetraciclina; IMP, Imipenem.

Diversos estudios en agua potable han evidenciado resistencias a colistina que van de un 92-95% (Narciso-da-Rocha *et al.*, 2014; Vaz-Moreira *et al.*, 2011) de resistencia de las bacterias recuperadas en agua potable, sin embargo, estos

aislamientos son específicos de la familia *Sphingomonadaceae*, los cuales se consideran que tienen resistencia intrínseca a este antibiótico. Para este mismo antibiótico en aislamientos provenientes de agua mineral embotellada se tienen registros de resistencia que van de 38-44 (Falcone-Dias *et al.*, 2015; Falcone-Dias *et al.*, 2012).

Con respecto a la gentamicina, estudios en Portugal e India evalúan aislamientos de potable que presentan resistencias desde 2.3% a un 39% (Narciso-da-Rocha *et al.*, 2014; Vaz-Moreira *et al.*, 2011; Jeena *et al.*, 2006). Mientras que estudios de agua mineral embotellada proveniente de Fiji presentan resistencias del 45% de los aislamientos (Zeenat *et al.*, 2009).

El ciprofloxacino es uno de los antibióticos comúnmente usado en las terapias contra la EII (Nitzan *et al.*, 2016), en el presente estudio se obtuvieron un 20% de aislamientos resistentes a este antibiótico (Figura 6), aislamientos provenientes de agua potable son resistentes en un 7% en estudios recientes (Tehrani *et al.*, 2017) sin embargo, estudios anteriores muestran resistencia hasta en 25% (Narciso-da-Rocha *et al.*, 2014; Vaz-Moreira *et al.*, 2011; Jeena *et al.*, 2006).

Solo el 3% de los aislamientos fue resistente al Imipenem, sin embargo, existen estudios en los cuales ningunos de los aislamientos obtenidos presentan resistencia a este antibiótico (Narciso-da-Rocha *et al.*, 2014, Papandreou *et al.*, 2000).

En la mayoría de los estudios comparados, nuestros datos muestran una mayor resistencia a los diversos antibióticos, pudiendo ser en un riesgo para la salud pública debido a la posible transferencia de resistencia a antibióticos a patógenos humanos dificultando los tratamientos (Carlet *et al.*, 2001).

El presente estudio también reveló que el 4.6%, 1.5%, 4.6%, 1.5%, 9.2% de los aislamientos fueron resistentes a 9, 8, 7, 6, y 5 antibióticos respectivamente (Figura 7). Aislamientos provenientes de agua mineral embotellada obtuvieron aislamientos 70% fueron resistentes a 5 o más antibióticos (Falcone-Dias *et al.*, 2012). Además, estudios realizados por Charkraborty y colaboradores en 2013, obtuvieron aislamientos oligotróficos donde el 20%, 12%, 7%, 5% fueron resistente a 2, 3, 4 y 5 antibióticos respectivamente y a partir de 8 antibióticos la resistencia fue menor al 2% (Charkraborty *et al.*, 2013).

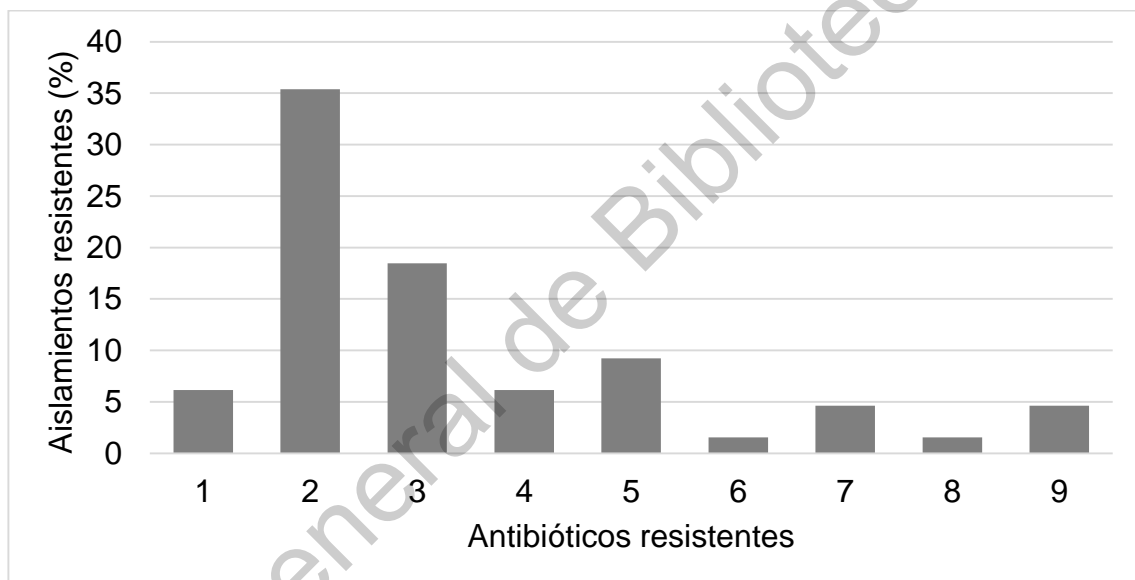


Figura 7. Resistencia a antibióticos dependiendo el número de antibióticos a los cuales presentaron resistencia. Los números representan la cantidad de antibióticos a los cuales fueron resistentes los aislamientos.

El análisis por marca de agua embotellada reveló que las bacterias aisladas de la marca A fueron resistentes a CT (100%), CN (46%), AMP (30%), CRO (15%), TE (46%), SXT (15%), AMC (8%) y OT (23%). En la marca B, los aislamientos fueron resistentes a CT, CN, AMP, CRO, CIP, SXT, AMC y C en un 94, 47, 23, 11, 11, 23, 5 y 5% respectivamente. Mientras que la marca C, presentó bacterias resistentes a CT (88%), CN (35%), AMP (23%), CIP (12%), TE (12%), SXT (6%),

AMC (6%), C (6%) y OT (12%). La marca D, presentó resistencia a CT (75%), CN (62%), AMP (50%), CIP (12%), SXT (12%), AMC (25%) y C (12%); 7 antibióticos, al igual que la marca E, ésta con resistencia a CT, CN, AMP, CRO, TE, AMC y C con un 100%, 60%, 20%, 20%, 10%, 10% y 10% respectivamente (Figura 8).

Análisis en la resistencia a antibióticos por marca de agua son escasos, sin embargo, los realizados por Falcone-Dias y colaboradores (2015), han demostrado que los perfiles de resistencia entre marcas de agua difieren drásticamente, esto puede ser debido a la fuente que se utilizó como suministro para el proceso de purificación (Falcone-Dias *et al.*, 2015), o incluso el mismo proceso de purificación puede modificar las cargas de genes de resistencia a antibióticos (Hu *et al.*, 2019; Sanganyado & Gwenzi, 2019; Shi *et al.*, 2012).

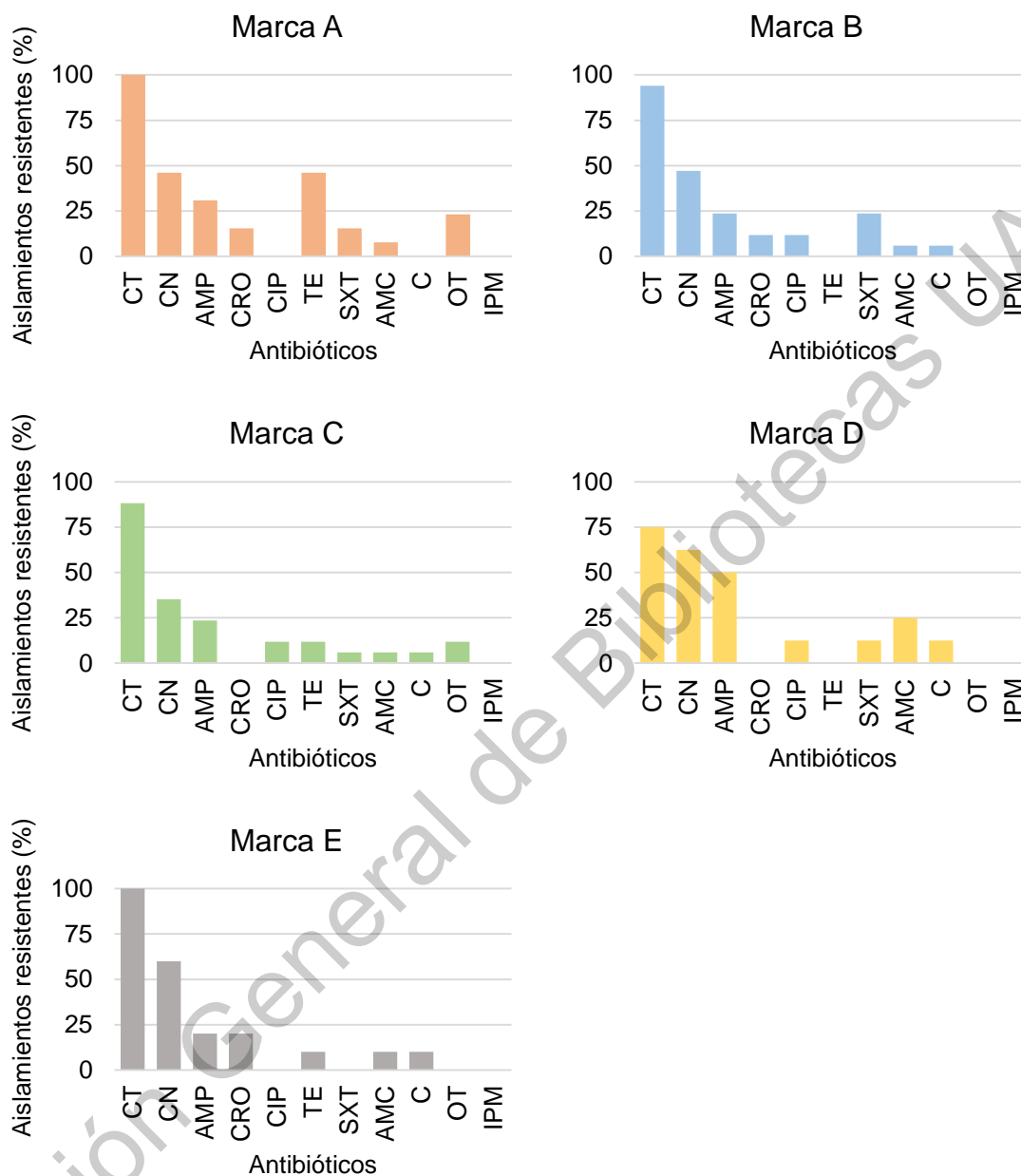


Figura 8. Resistencia a antibióticos por marca analizada de agua purificada embotellada. CT, Colistina; CN, Gentamicina; AMP, Ampicilina; Cro, Ceftriaxona; CIP, Ciprofloxacina; TE, Tetraciclina SXT, Sulfametoazol con trimetoprim; AMC, Amoxicilina con ácido Clavulanico; C, Cloranfenicol; OT, Oxitetraciclina; IMP, Imipenem.

5.5 Multirresistencia a antibióticos.

La MRA es considerada cuando una bacteria es no susceptible a >3 clases de antimicrobianos (Magiorakos *et al.*, 2011). En general, se observó que el 51% de los aislamientos fueron MRA. Para géneros asociados a EII, el 54% de los aislamientos fueron MRA; mientras que, para géneros asociados a infecciones sistémicas y aquellos que no están asociados con procesos infecciosos, el 36% y 67% respectivamente, de los aislamientos fueron MRA (Figura 9 y Anexo 1).

Estudios a partir de agua potable identifican hasta un 45% de aislamientos multirresistentes (Jeena *et al.*, 2006), estudio en el cual los microorganismos con mayor incidencia fueron géneros como *Micrococcus* y *Staphylococcus*, patógenos también identificados en este estudio. Niveles comparables de MRA has sido reportados en análisis de agua mineral embotellada, donde se observó un 68% de MRA (Falcone-Dias *et al.*, 2012). También se ha reportado niveles del 53% de MRA en patógenos oportunistas recuperados a partir de agua mineral embotellada, dentro de los aislamientos que destacan con MRA está *Microbacterium*, implicado en la EII, genero aislado en el presente estudio (Falcone-Dias *et al.*, 2015).

El análisis de las diferentes marcas de agua embotellada reveló una prevalencia de MRA del 61%, 35%, 52%, 62% y 50%, en las marcas A, B, C, D y E; respectivamente (Figura 10). Marcas de agua mineral embotellada han sido analizadas para evidenciar aislamientos multirresistentes, con lo que se ha observado que las diversas marcas aportan de un 36-90% de aislamientos MRA (Falcone-Dias *et al.*, 2012).

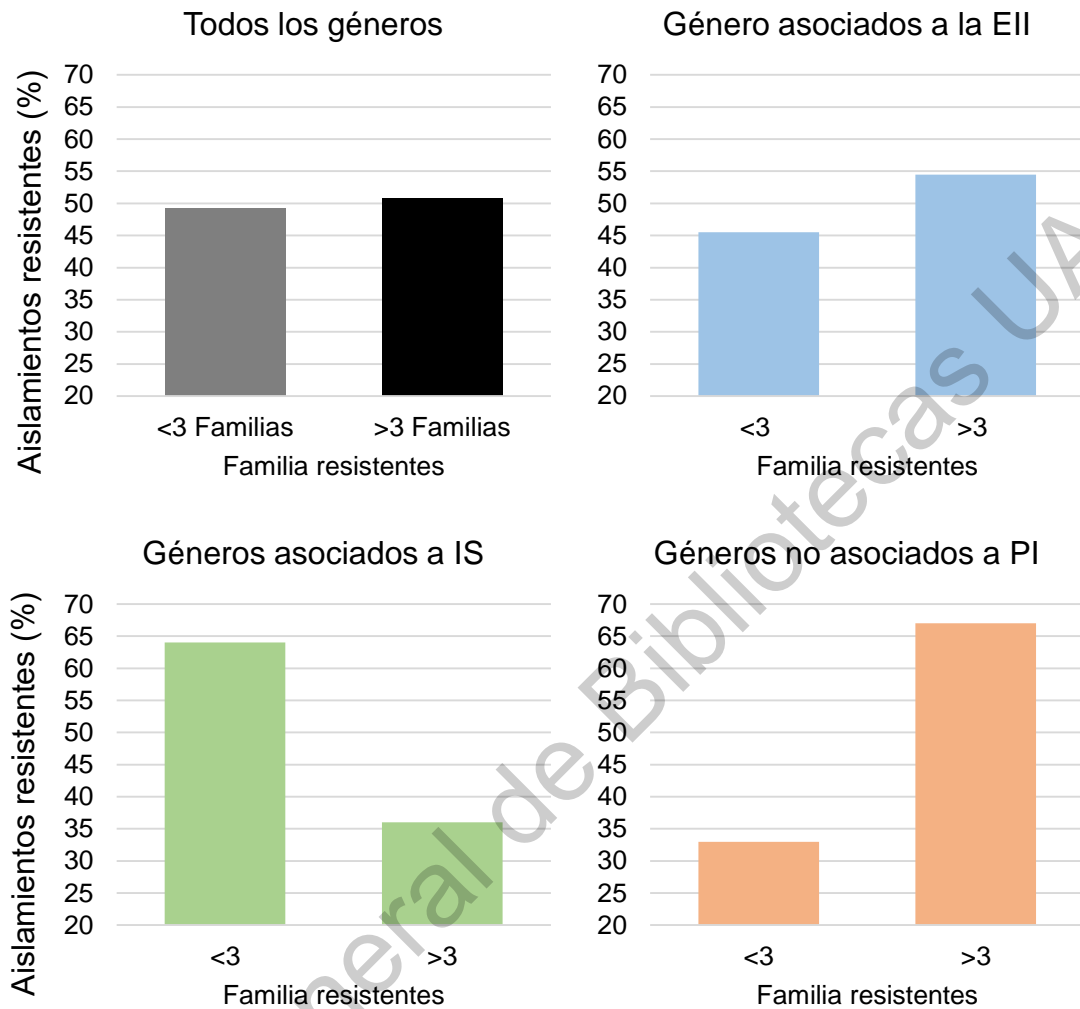


Figura 9. Multirresistencia a antibióticos por categoría de microorganismos.

A) Análisis de la MRA de todos los géneros bacterianos evaluados. B) MRA de patógenos emergentes asociados a la EII, B) MRA de patógenos sistémicos, C) MRA de géneros no asociados a procesos infecciosos.

La presencia de bacterias multirresistentes en agua purificada embotellada representa un problema importante de salud pública, debido a que estos productos podrían ser una fuente de bacterias MRA lo que podría aumentar la propagación de resistencia a antibióticos (Carlet *et al.*, 2011). Por otra parte, esta resistencia puede ser transferida a otras bacterias patógenas o comensales, existiendo una

transferencia bidireccional entre el medio ambiente y el ser humano (Zhou *et al.*, 2018).

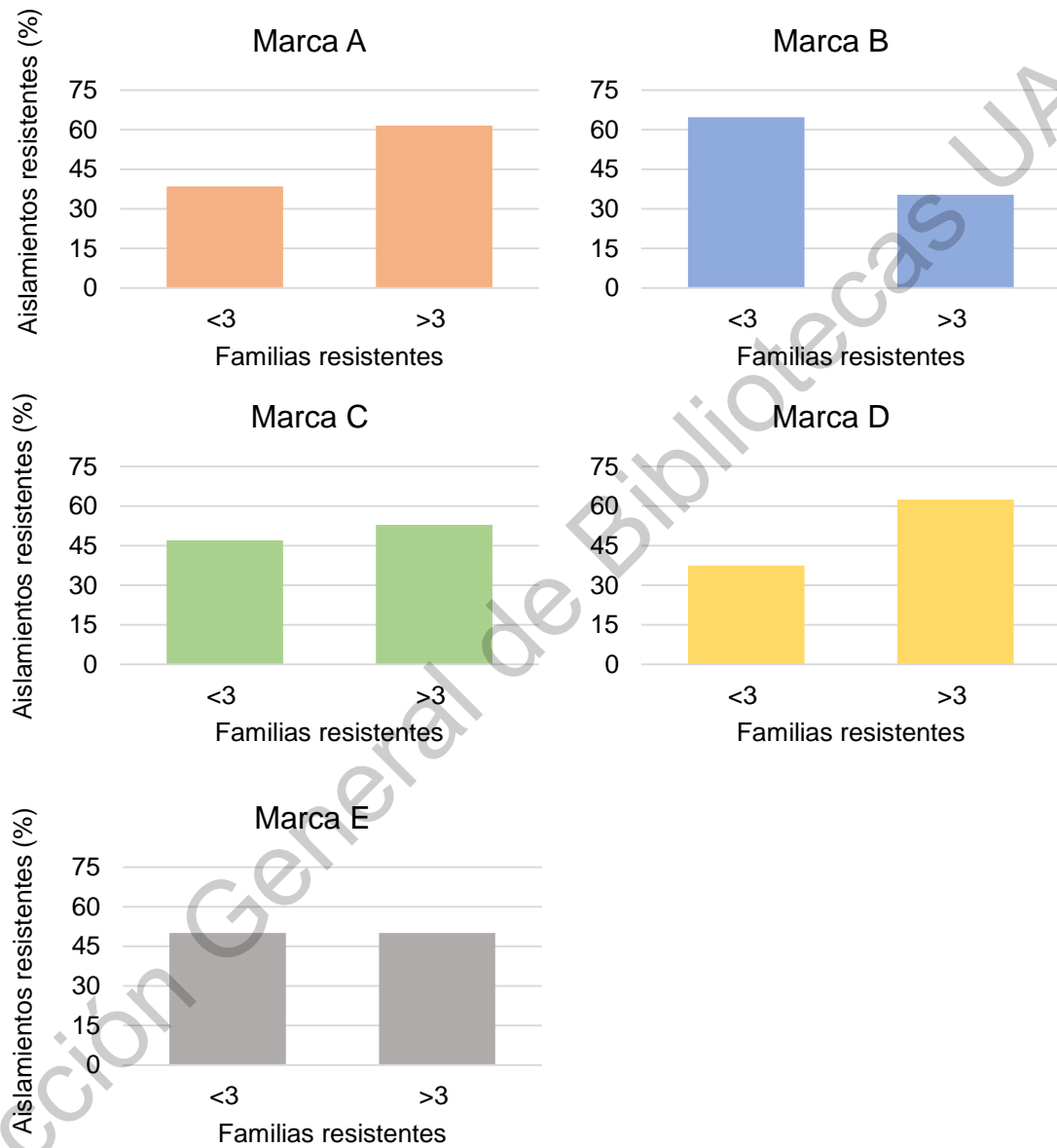


Figura 10. Multirresistencia a antibióticos por marca.

VI. Conclusiones

El agua embotellada es una fuente microorganismos como *Acinetobacter* spp., *Arthrobacter* spp., *Bacillus* spp., *Bradyrhizobium* spp., *Kocuria* spp., *Methylobacterium* spp., *Microbacterium* spp., *Nocardioide*s spp., *Novosphingobium* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhodococcus* spp., *Sphingomonas* spp., *Sphingopyxis* spp., y *Stapgylococcus* spp. que se han asociado a la EII e infecciones sistémicas.

El agua embotellada es fuente potencial de bacterias MRA con un 50.7% de bacterias multirresistentes.

Los factores de virulencia deben considerarse en futuros estudios *in vivo* para determinar el potencial de virulencia y la implicación en la EII y determinar mecanismos de virulencia.

VII.- Referencias

- Agyepong, N., Govinden, U., Owusu-Ofori, A., & Essack, S. Y. (2018). Multidrug-resistant gram-negative bacterial infections in a teaching hospital in Ghana. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 7(1), 37.
- Alemzadeh, E., Haddad, R., & Ahmadi, A. R. (2014). Phytoplanktons and DNA barcoding: Characterization and molecular analysis of phytoplanktons on the Persian Gulf. *Iranian Journal of Microbiology*, 6(4), 296–302.
- Ayoade F, Alam MUAyoade F, A. M. (2019). *Rhodococcus Equi*. Retrieved August 23, 2019, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441978/>
- Bergogne-Berezin, E., & Towner, K. J. (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical*

microbiology reviews, 9(2), 148.

- Bharath, J., Mosodeen, M., Motilal, S., Sandy, S., Sharma, S., Tessaro, T., & Adesiyun, A. A. (2003). Microbial quality of domestic and imported brands of bottled water in Trinidad. *International Journal of Food Microbiology*, 81(1), 53–62. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00193-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00193-9)
- Callejas-Díaz, A., Fernández-Pérez, C., Ramos-Martínez, A., Múñez-Rubio, E., Sánchez-Romero, I., & Núñez, J. A. V. (2019). Impact of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in a tertiary hospital: Mortality and prognostic factors. *Medicina Clínica (English Edition)*, 152(3), 83-89.
- Carlet, J., Collignon, P., Goldmann, D., Goossens, H., Gyssens, I. C., Harbarth, S., & Doye, B. N. (2011). Society's failure to protect a precious resource: antibiotics. *The Lancet*, 378(9788), 369–371. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60401-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60401-7)
- Casani, S., Rouhany, M., & Knøchel, S. (2005). A discussion paper on challenges and limitations to water reuse and hygiene in the food industry. *Water Research*, 39(6), 1134–1146. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.12.015>
- Chaidez-Quiroz, C. (2002). Agua Embotellada y su Calidad Bacteriológica. *Agua Latinoamerica*, septiembre, 38–39.
- Chakraborty, R., Kumar, A., Bhowal, S. S., Mandal, A. K., Tiwary, B. K., & Mukherjee, S. (2013). Diverse gene cassettes in class 1 integrons of facultative oligotrophic bacteria of river Mahananda, West Bengal, India. *PLoS one*, 8(8), e71753.
- Chen, S. S., Sheth, H., Piraino, B., & Bender, F. (2016). Long-term exit-site gentamicin prophylaxis and gentamicin resistance in a peritoneal dialysis program. *Peritoneal Dialysis International*, 36(4), 387-389.
- Cheng, C., Hua, J., Tan, J., Qian, W., Zhang, L., & Hou, X. (2019). Identification of differentially expressed genes, associated functional terms pathways, and candidate diagnostic biomarkers in inflammatory bowel diseases by bioinformatics analysis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 18(1), 278-288.

- Del Chierico, F., Nobili, V., Vernocchi, P., Russo, A., Stefanis, C. D., Gnani, D., ... & Dallapiccola, B. (2017). Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach. *Hepatology*, *65*(2), 451-464.
- Chiodini, R. J., Dowd, S. E., Galandiuk, S., Davis, B., & Glassing, A. (2016). The predominant site of bacterial translocation across the intestinal mucosal barrier occurs at the advancing disease margin in Crohn's disease. *Microbiology*, *162*(9), 1608-1619.
- Comisión Nacional del Agua Mexico. (2007). Manual de agua potable, alcantarillado y saneamiento. *Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales*, (978-968-5), 1-242. <https://doi.org/978-968-817-880-5>
- Cortés, F. I. A. (2012). La desconfianza del usuario vía del éxito de las embotelladoras.
- López Cuevas, O., León Félix, J., Jiménez Edeza, M., & Chaidez Quiroz, C. (2009). Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. *Revista fitotecnia mexicana*, *32*(2), 119-126.
- Dalal, S. R., & Chang, E. B. (2014). The microbial basis of inflammatory bowel diseases. *The Journal of clinical investigation*, *124*(10), 4190-4196.
- Dias, M. F., Reis, M. P., Acurcio, L. B., Carmo, A. O., Diamantino, C. F., Motta, A. M., Nascimento, A. M. A. (2018). Changes in mouse gut bacterial community in response to different types of drinking water. *Water Research*, *132*, 79-89. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.052>
- Dimitrova, N., Zamudio, J. R., Jong, R. M., Soukup, D., Resnick, R., Sarma, K., Jacks, T. (2017). Sequence-Based Discovery of *Bradyrhizobium enterica* in Cord Colitis Syndrome. *PLoS ONE*, *32*(7), 736-740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178059>
- Escalante-Pozos, V., & Bandala, E. (2014). Calidad del agua y su relación con alimentos: aplicación de procesos Fenton y tipo Fenton en la eliminación de contaminantes en agua. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 34-47.
- Evtushenko, L. I., Krausova, V. I., & Yoon, J.-H. (2015). *Nocardioides*. *Bergey's*

Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.

<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00159>

- Fakhoury, M., Negrulj, R., Mooranian, A., & Hani, A.-S. (2019). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *Journal of Inflammation Research*, 16(4), 341–345. <https://doi.org/10.15584/ejcem.2018.4.12>
- Falcone-Dias, M. F., Centrón, D., Pavan, F., Moura, A. C. D. S., Naveca, F. G., De Souza, V. C., Leite, C. Q. F. (2015). Opportunistic pathogens and elements of the resistome that are common in bottled mineral water support the need for continuous surveillance. *PLoS ONE*, 10(3), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121284>
- Falcone-Dias, M. F., Vaz-Moreira, I., & Manaia, C. M. (2012). Bottled mineral water as a potential source of antibiotic resistant bacteria. *Water Research*, 46(11), 3612–3622. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.04.007>
- Falkinham, J. O. (2015). Common features of opportunistic premise plumbing pathogens. *International journal of environmental research and public health*, 12(5), 4533-4545.
- Farhat, M., Alkharsah, K. R., Alkhamis, F. I., & Bukharie, H. A. (2018). Metagenomic study on the composition of culturable and non-culturable bacteria in tap water and biofilms at intensive care units. *Journal of Water and Health*, 17(1), 72–83. <https://doi.org/10.2166/wh.2018.213>
- Fewtrell, L., Kay, D., Wyer, M., Godfree, A., & O'Neill, G. (2014). Microbiological quality of bottled water, international perspective. *World Journal of Natural and Applied Sciences*, 1. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00233-3](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00233-3)
- Fitzsimmons, L. F., Flemer, S., Wurthmann, A. S., Deker, P. B., Sarkar, I. N., & Wargo, M. J. (2011). Small-molecule inhibition of choline catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* and other aerobic choline-catabolizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(13), 4383–4389. <https://doi.org/10.1128/AEM.00504-11>
- Frank, D. N., Amand, A. L. S., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., & Pace, N. R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial

- community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(34), 13780-13785.
- Furuhata, K., Kato, Y., Goto, H., Saitou, K., Sugiyama, J.-I., Hara, M., & Fukuyama, M. (2007). Identification from of Yellow-Pigmented Hospital Their Tap Chlorine Bacteria in Japan and Isolated Water Resistance. *Biocontrol Science*, 12(2), 39–46.
- Geisinger, E., & Isberg, R. R. (2017). Interplay Between Antibiotic Resistance and Virulence During Disease Promoted by Multidrug-Resistant Bacteria. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(Suppl 1), 9–17. <https://doi.org/10.1093/DOI>
- Georgieva, V., & Dimitrova, Y. (2016). Study of the microbiological quality of bulgarian bottled water in terms of its contamination with *Pseudomonas aeruginosa*. *Central European Journal of Public Health*, 24(4), 326–330. <https://doi.org/10.21101/cejph.a4219>
- Glaeser, S. P., & Kämpfer, P. (2014). The family sphingomonadaceae. *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*, 641-707.
- Gneiding, K., Frodl, R., & Funke, G. (2008). Identities of *Microbacterium* spp. encountered in human clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*, 46(11), 3646-3652.
- Gomez-Alvarez, V., Revetta, R. P., & Santo Domingo, J. W. (2012). Metagenomic analyses of drinking water receiving different disinfection treatments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(17), 6095-6102.
- Goodfellow, Z., Goodfellow, M., Building, R., & Ne, T. (2015). *Rhodococcus*. *The Prokaryotes*, <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00033>.
- Green, P. N. (2006). *Methylobacterium*. *The Prokaryotes*, 257–265. https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_14
- Gulati, P., & Ghosh, M. (2017). Biofilm forming ability of *Sphingomonas paucimobilis* isolated from community drinking water systems on plumbing materials used in water distribution. *Journal of Water and Health*, 15(6), 942–954. <https://doi.org/10.2166/wh.2017.294>

- Hu, Y., Zhang, T., Jiang, L., Luo, Y., Yao, S., Zhang, D., Cui, C. (2019). Occurrence and reduction of antibiotic resistance genes in conventional and advanced drinking water treatment processes. *Science of the Total Environment*, 669(130), 777–784. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.143>
- Igbeneghu, O. A., & Lamikanra, A. (2014). The bacteriological quality of different brands of bottled water available to consumers in Ile-Ife, south-western Nigeria. *BMC Research Notes*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-859>
- Jardine, J. L., Abia, A. L. K., Mavumengwana, V., & Ubomba-Jaswa, E. (2017). Phylogenetic analysis and antimicrobial profiles of cultured emerging opportunistic pathogens (Phyla actinobacteria and proteobacteria) identified in hot springs. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/ijerph14091070>
- Jeena, M. I., Deepa, P., Mujeeb Rahiman, K. M., Shanthi, R. T., & Hatha, A. A. M. (2006). Risk assessment of heterotrophic bacteria from bottled drinking water sold in Indian markets. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 209(2), 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2005.11.003>
- Jia, Q., Xie, Y., Lu, C., Zhang, A., Lu, Y., Lv, S., & Zhang, J. (2019). Endocrine organs of cardiovascular diseases: Gut microbiota. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(4), 2314–2323. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14164>
- Joseph, N., Bhat, S., Mahapatra, S., Singh, A., Jain, S., Unissa, A., & Janardhanan, N. (2018). Bacteriological assessment of bottled drinking water available at major transit places in mangalore city of south India. *Journal of Environmental and Public Health*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7472097>
- Kovaleva, J., Degener, J. E., & van der Mei, H. C. (2014). Methylobacterium and its role in health care-associated infection. *Journal of clinical microbiology*, 52(5), 1317-1321.
- Kumar, A., Mukherjee, S., & Chakraborty, R. (2010). Characterization of a novel trimethoprim resistance gene, dfrA28, in class 1 integron of an oligotrophic *Acinetobacter johnsonii* strain, MB52, isolated from River Mahananda,

- India. *Microbial Drug Resistance*, 16(1), 29-37.
- Kumar, R., Verma, H., Haider, S., Bajaj, A., Sood, U., Ponnusamy, K., & Khurana, J. P. (2017). Comparative genomic analysis reveals habitat-specific genes and regulatory hubs within the genus *Novosphingobium*. *MSystems*, 2(3), e00020-17.
- Kushner, B., Allen, P. D., & Crane, B. T. (2016). Frequency and demographics of gentamicin use. *Otology & neurotology: official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*, 37(2), 190.
- Kuykendall, L. D. (2015). *Bradyrhizobium*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-11.
- Kuznetsov, S. I., Dubinina, G. A., & Lapteva, N. A. (1979). Biology of Oligotrophic Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 33(74), 377-387. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.33.100179.002113>
- Larreina, S., & Berdasquera, Luisa Carmen. Corcho, D. (2000). Enfermedades emergentes y reemergentes: Factores causales y vigilancia. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 16(6), 593-597.
- Leclerc, H. (2003). Relationships between common water bacteria and pathogens in drinking-water. *Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety*. London: IWA Publishing, 80-118.
- Leclerc, H., & Moreau, A. (2002). Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(2), 207-222. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(02\)00097-9](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(02)00097-9)
- Lepage, P., Hösler, R., Spehlmann, M. E., Rehman, A., Zvirbliene, A., Begun, A., ... Schreiber, S. (2011). Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 141(1), 227-236. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.011>
- Libertucci, J., & Young, V. B. (2019). The role of the microbiota in infectious diseases. *Nature Microbiology*, 4(1), 35-45. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0278-4>

- Longo, G. A., Sousa, V. S. De, Kraychete, G. B., Justo-da-Silva, L. H., Rocha, J. A., Superti, S. V., ... Moreira, B. M. (2019). Colistin resistance emerges in pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of Antimicrobial Agents*. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.08.017>
- Lowman, W., & Aithma, N. (2010). Antimicrobial susceptibility testing and profiling of *Nocardia* species and other aerobic actinomycetes from South Africa: comparative evaluation of broth microdilution versus the Etest. *Journal of clinical microbiology*, *48*(12), 4534-4540.
- Magiorakos, A., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., & Hindler, J. F. (2011). bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, *18*(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Maran, N., Crispim, B., Iahnn, S., Araújo, R., Grisolia, A., & Oliveira, K. (2016). Depth and well type related to groundwater microbiological contamination. *International journal of environmental research and public health*, *13*(10), 1036.
- Marchesi, J. R., Adams, D. H., Fava, F., Hermes, G. D., Hirschfield, G. M., Hold, G., & Thomas, L. V. (2016). The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*, *65*(2), 330-339.
- Mattner, J. (2016). Impact of microbes on the pathogenesis of primary biliary cirrhosis (PBC) and primary sclerosing cholangitis (PSC). *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(11). <https://doi.org/10.3390/ijms17111864>
- Nagao-kitamoto, H., Kitamoto, S., Kuffa, P., & Kamada, N. (2016). Pathogenic role of the gut microbiota in gastrointestinal diseases, *14*(2), 127–138.
- Narciso-da-Rocha, C., Vaz-Moreira, I., & Manaia, C. M. (2014). Genotypic diversity and antibiotic resistance in Sphingomonadaceae isolated from hospital tap water. *Science of the Total Environment*, *466–467*, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.109>
- Nescerecka, A., Rubulis, J., Vital, M., Juhna, T., & Hammes, F. (2014). Biological

- instability in a chlorinated drinking water distribution network. *PLoS ONE*, 9(5), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096354>
- Nie, P., Li, Z., Wang, Y., Zhang, Y., Zhao, M., Luo, J., & Chen, S. (2019). Gut microbiome interventions in human health and diseases. *Medicinal research reviews*.
- Nitzan, O., Elias, M., Peretz, A., & Saliba, W. (2016). Role of antibiotics for treatment of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 22(3), 1078–1087. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i3.1078>
- OMS. (2006a). Guidelines for Drinking-water Quality. *Atención Primaria*, 23(Vdv), 7. Retrieved from http://201.147.150.252:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1262/Investigao_e_evoluo.pdf?sequence=1, Accessed 2019 Jun 28
- OMS. (2006b). Reunion de expertos de la OMS sobre especificaciones para preparaciones farmacéuticas.
- OMS. (2013). Agua, saneamiento y salud (ASS). Retrieved from http://www.who.int/water_sanitation_health/mdg1/es/, Accessed 2019 Jun 28
- OMS. (2017). La resistencia a los antimicrobianos. Retrieved from <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/es/>, Accessed 2019 Jun 29
- OMS. (2018). Resistencia a los antimicrobianos. Retrieved from <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>, Accessed 2019 Jun 28
- Palleroni, N. J. (2015). Pseudomonas. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01210>
- Paszko-Kolva, C., Yamamoto, H., Shahamat, M., Sawyer, T. K., Morris, G., & Colwell, R. R. (1991). Isolation of amoebae and Pseudomonas and Legionella spp. from eyewash stations. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(1), 163–167. [https://doi.org/0099-2240/91/010163-05\\$02.00/0](https://doi.org/0099-2240/91/010163-05$02.00/0)
- Paullier, J. (2015). Por qué México es el país que más agua embotellada consume en el mundo. Retrieved from http://www.bbc.com/mundo/noticias/2015/07/150722_mexico_consumo_agua

[embotellada.jp](#), Accessed 2019 Jun 29

- Pavlov, D., De Wet, C. M. E., Grabow, W. O. K., & Ehlers, M. M. (2004). Potentially pathogenic features of heterotrophic plate count bacteria isolated from treated and untreated drinking water. *International Journal of Food Microbiology*, 92(3), 275–287. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.08.018>
- Pflughoeft, K. J., & Versalovic, J. (2011). Human Microbiome in Health and Disease. *The Annual Review Of Pathology: Mechanisms of Disease*. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132421>
- Prim, N., Turbau, M., Rivera, A., Rodríguez-Navarro, J., & Coll Pere, B. M. (2017). Prevalence of colistin resistance in clinical isolates of Enterobacteriaceae: a four-year cross-sectional study. *Journal of Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2017.09.008>
- Pulschen, A. A., Bendia, A. G., Fricker, A. D., Pellizari, V. H., Galante, D., & Rodrigues, F. (2017). Isolation of uncultured bacteria from antarctica using long incubation periods and low nutritional media. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUL), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01346>
- Rajilić-Stojanović, M., & de Vos, W. M. (2014). The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), 996–1047. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12075>
- Reasoner, D. J., & Geldreich, E. E. (1985). A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(1), 1–7.
- Richard, M. L., Liguori, G., Lamas, B., Brandi, G., da Costa, G., Hoffmann, T. W., ... Sokol, H. (2018). Mucosa-associated microbiota dysbiosis in colitis associated cancer. *Gut Microbes*, 9(2), 131–142. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1379637>
- Rodwan, G., & John, J. (2015). Bottled water 2015 acceleration.
- Roux, D., Danilchanka, O., Guillard, T., Cattoir, V., Aschard, H., Fu, Y. Skurnik, D. (2015). Fitness cost of antibiotic susceptibility during bacterial infection, 7(297).

- Rudi, K., Ricanek, P., Tannæs, T., Brackmann, S., Perminow, G., & Vatn, M. H. (2012). *Analysing tap-water from households of patients with inflammatory bowel disease in Norway. Case Studies in Food Safety and Authenticity: Lessons from Real-Life Situations*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1016/B978-0-85709-412-4.50015-1>
- Ryan, M. P., & Adley, C. C. (2010). *Sphingomonas paucimobilis*: A persistent Gram-negative nosocomial infectious organism. *Journal of Hospital Infection*, 75(3), 153–157. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2010.03.007>
- Sahu, S. N., Anriany, Y., Grim, C. J., Kim, S., Chang, Z., Joseph, S. W., & Cinar, H. N. (2013). Identification of Virulence Properties in Salmonella Typhimurium DT104 Using *Caenorhabditis elegans*, 8(10), 8–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076673>
- Schroeder, M., Brooks, B. D., & Brooks, A. E. (2017). The complex relationship between virulence and antibiotic resistance. <https://doi.org/10.3390/genes8010039>
- Secretaria de Salud. (1993). Norma Oficial Mexicana Nom-041-Ssa1-1993 Bienes Y Servicios. Agua Purificada Envasada. Especificaciones Sanitarias. *Diario Oficial de La Federacion*. Retrieved from http://www.ceam-ong.org/wp-content/uploads/2014/02/Contaminacion_y_Purificacion_del_Agua.pdf, Accessed 2019 Jun 29
- Shams, M., Qasemi, M., Afsharnia, M., Mohammadzadeh, A., & Zarei, A. (2019). Chemical and microbial quality of bottled drinking water in Gonabad city, Iran: Effect of time and storage conditions on microbial quality of bottled waters. *MethodsX*, 6(January), 273–277. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.02.001>
- Shi, P., Jia, S., Zhang, X., Zhang, T., Cheng, S., & Li, A. (2012). Metagenomic insights into chlorination effects on microbial antibiotic resistance in drinking water. *Water Research*, 47(1), 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.046>
- Shimizu, Y. (2018). Gut microbiota in common elderly diseases affecting activities of daily living. *World Journal of Gastroenterology*, 24(42), 4750–4758.

<https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i42.4750>

- Solís, A. (2017). Agua embotellada, el negocio multimillonario que México no necesita. Retrieved from <https://www.forbes.com.mx/agua-embotellada-el-negocio-multimillonario-que-mexico-no-necesita/>, Accessed 2019 Jun 29
- Stange, C., Sidhu, J. P. S., Toze, S., & Tiehm, A. (2019). Comparative removal of antibiotic resistance genes during chlorination, ozonation, and UV treatment. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, (February), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.02.002>
- Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W., & Schleifer, K. H. (2000). Microbiological safety of drinking water. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 81-127.
- Tada, Y., Ihmori, M., & Yamaguchi, J. (1995). Oligotrophic bacteria isolated from clinical materials. *Journal of clinical microbiology*, 33(2), 493-494.
- Tafere, W., Abera, F., Beyene, Y., & Legesse, T. (2014). Microbiological quality and safety of bottled water brands sold in Ethiopia. *Ethiopian Journal of Health Development*, 28(3), 178–184.
- Takeuchi, A. L. (2015). *Microbacterium* (Vol. 75). <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00104>.
- Takeuchi, M., Hamana, K., & Hiraishi, A. (2001). Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(Pt 4), 1405–1417. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-4-1405>
- Takeuchi, M., Sawada, H., Oyaizu, H., & Yokota, A. (1994). Phylogenetic Evidence for *Sphingomonas* and *Rhizomonas* as Nonphotosynthetic Members of the Alpha-4 Subclass of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(2), 308–314. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-2-308>
- Tanaka, A., Leung, P. S. C., & Gershwin, M. E. (2019). Pathogen infections and primary biliary cholangitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 195(1), 25–34. <https://doi.org/10.1111/cei.13198>
- Tehrani, A. H., & Gilbride, K. A. (2018). A closer look at the antibiotic-resistant bacterial community found in urban wastewater treatment systems.

- MicrobiologyOpen*, 7(4), 1–13. <https://doi.org/10.1002/mbo3.589>
- Tóth, E. M., Kéki, Z., Makk, J., Homonnay, Z. G., Márialigeti, K., & Schumann, P. (2011). *Nocardioides hungaricus* sp. nov., isolated from a drinking water supply system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(3), 549–553. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.022939-0>
- Truant, A. L., Gulati, R., Giger, O., Satishchandran, V., & Caya, J. G. (2018). *Methylobacterium* Species: An Increasingly Important Opportunistic Pathogen, 29(11).
- Tuo, H., Yang, Y., Tao, X., Liu, D., Li, Y., Xie, X., ... & Lei, C. (2018). The prevalence of colistin resistant strains and antibiotic resistance gene profiles in Funan River, China. *Frontiers in microbiology*, 9.
- Valdivia Medina, R. Y., Pedro Valdés, S., & Laurel Gómez, M. (2010). Agua para uso en laboratorios. *Inimet*, 1, 3–10. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/2230/223017807002.pdf>, Accessed 2019 Jun 28
- Vandermaesen, J., Lievens, B., & Springael, D. (2017). Isolation and identification of culturable bacteria, capable of heterotrophic growth, from rapid sand filters of drinking water treatment plants. *Research in Microbiology*, 168(6), 594–607. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.03.008>
- Vaz-Moreira, I., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2011). Diversity and antibiotic resistance patterns of Sphingomonadaceae isolates from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(16), 5697-5706.
- Vouga, M., & Greub, G. (2016). Emerging bacterial pathogens: the past and beyond. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(1), 12-21.
- Wang, H., Emilie, B., Michele, P., Camper, A. K., R., H. V., & Pruden, A. (2017). Methodological approaches for monitoring opportunistic pathogens in premise plumbing: A review. *Water Research*, 117, 68–86. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.046>
- Ward, L. A., Cain, O. L., Mullally, R. A., Holliday, K. S., Wernham, A. G., Baillie, P. D., & Greenfield, S. M. (2009). Health beliefs about bottled water: a qualitative study. *BMC Public Health*, 9(1), 196.

- Williams, K., Pruden, A., Falkinham, J., Edwards, M., Williams, K., Pruden, A., ... Edwards, M. (2015). Relationship between Organic Carbon and Opportunistic Pathogens in Simulated Glass Water Heaters. *Pathogens*, 4(2), 355–372. <https://doi.org/10.3390/pathogens4020355>
- Xiang, S., Yao, T., An, L., Xu, B., & Wang, J. (2005). 16S rRNA sequences and differences in bacteria isolated from the Muztag Ata glacier at increasing depths. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4619–4627. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4619-4627.2005>
- Yuan, M., Yu, Y., Li, H. R., Dong, N., & Zhang, X. H. (2014). Phylogenetic diversity and biological activity of actinobacteria isolated from the chukchi shelf marine sediments in the arctic ocean. *Marine Drugs*, 12(3), 1281–1297. <https://doi.org/10.3390/md12031281>
- Zeenat, A., Hatha, A. A. M., Viola, L., & Vipra, K. (2009). Bacteriological quality and risk assessment of the imported and domestic bottled mineral water sold in Fiji. *Journal of water and health*, 7(4), 642-649
- Zeinalian, M., Hashemzadeh-Chaleshtori, M., Salehi, R., & Emami, M. H. (2018). Clinical Aspects of Microsatellite Instability Testing in Colorectal Cancer. *Advanced Biomedical Research*, 7(28), 1–7. <https://doi.org/10.4103/abr.abr>
- Zhou, Z. C., Feng, W. Q., Han, Y., Zheng, J., Chen, T., Wei, Y. Y., ... Chen, H. (2018). Prevalence and transmission of antibiotic resistance and microbiota between humans and water environments. *Environment International*, 121(September 2018), 1155–1161. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.10.032>

VIII. Anexos

Anexo 1. Perfil de resistencia a antibióticos.

Marca	Género	CT	CN	AMP	CRO	CIP	TE	SXT	AMC	C	OT	IPM
A	<i>Bacillus</i>											
B	<i>Bacillus</i>											

E	<i>Kocuria</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A	<i>Micrococcus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
B	<i>Micrococcus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C	<i>Micrococcus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
D	<i>Micrococcus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
E	<i>Micrococcus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
B	<i>Pantoea</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
B	<i>Paracoccus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
D	<i>Rothia</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
B	<i>Williamsia</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
B	<i>Aeromicrobium</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
B	<i>Blastococcus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A	<i>Bosea</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C	<i>Brevibacillus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C	<i>Curtobacterium</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
B	<i>Deinococcus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C	<i>Deinococcus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
E	<i>Deinococcus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C	<i>Enhydrobacter</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C	<i>Georgenia</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
D	<i>Georgenia</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C	<i>Isoptericola</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
E	<i>Lysinibacillus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C	<i>Micromonospora</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
D	<i>Microvirga</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A	<i>Noverhespirillum</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A	<i>Paenibacillus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A	<i>Rhodopseudomonas</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Las celdas negras representan resistencia del género bacteriano al antibiótico señalado.