

Susceptibilidad de bacterias *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* a los antibióticos

Susceptibility of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria to antibiotics

Martínez-Hernández, Francisco¹, Briones-Vázquez Hugo C.¹, Cortés-Villaseñor María G.¹, Juárez-Chino Esmeralda A.¹, Pantoja-Ramírez Yoel A.¹, Ortega-Avila Ariadna N.¹, Ángel-Sahagún César A.²

¹Programa Educativo de Medicina Veterinaria y Zootecnia. DICIVA, CIS, Universidad de Guanajuato. ²Departamento de Veterinaria y Zootecnia, DICIVA, CIS, Universidad de Guanajuato. Correo de autor de correspondencia: csahagun@ugto.mx

Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar la susceptibilidad de bacterias *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* a los antibióticos provenientes de suelos pecuarios y agrícolas del estado de Guanajuato. Se realizaron los experimentos en el Laboratorio de Parasitología y Control Biológico de la Universidad de Guanajuato, en los cuales se utilizaron cepas de nematodos entomopatógenos previamente resguardadas en el laboratorio, la evaluación de la patogenicidad se inició inoculando 200µ de nematodos entomopatógenos a larvas de *Galleria mellonella* los cuales se infectaron, después se tomó hemolinfa con una jeringa de las larvas muertas y se colocó en agar MacConkey por aspersión, se dejó incubar 72 horas y se procedió a realizar un cultivo líquido en caldo nutritivo, se dejó incubar por 48 horas en agitación a la oscuridad y posteriormente se realizó un conteo de bacterias y se ajustó a una concentración a 1.4×10^3 bacterias por ml, se aplicó 0.02ml por inyección en larvas de *G. mellonella* y se determinó la mortalidad a las 48 horas. La evaluación de la susceptibilidad de bacterias se realizó un cultivo por la técnica de dispersión en disco en agar Mueller Hinton, se utilizaron antibiogramas de la marca PT_35 Multibac I.D. para bacterias Gram – los cuales constan de 12 antibióticos diferentes, se colocaron en el agar cultivado con bacterias y se incubaron por 24 horas, se midieron los halos de inhibición formados por los discos; Los resultados de la evaluación de patogenicidad fueron el 100% de mortalidad pasadas las 48 horas en las cepas evaluadas y 0% en los grupos testigos, mientras que en la evaluación de la susceptibilidad a los antibióticos se observó que todas las cepas fueron resistentes al menos un antibiótico mientras que una cepa que se le puede considerar multiresistente fue la M4; por lo tanto las conclusiones de este trabajo fueron que el inyectar 0.02ml de bacterias a una concentración de 1.4×10^3 provoca la muerte del 100% de larvas de *G. mellonella* y las diferentes cepas de bacterias entomopatógenas utilizadas en el presente estudio se les puede considerar susceptibles, intermedias y resistentes a los antibióticos evaluados, además de que existen cepas que se les puede considerar multiresistentes a los antibióticos utilizados.

Palabras clave: Resistencia antibiótica; Bacterias resistentes; Suelos pecuarios.

Introducción

Actualmente la resistencia bacteriana a los antibióticos es un fenómeno de gran importancia para la salud pública pues supone un alto riesgo (Jin *et al.*, 2024) y es ocasionada por los cambios evolutivos que sufren las bacterias como respuesta a la exposición a los diversos antibióticos que se encuentran de forma natural en el ambiente (Read y Woods, 2014). La resistencia antimicrobiana es un tema ampliamente investigado y que genera serias preocupaciones para el futuro de los antibióticos, ya que la generación de bacterias multiresistentes es mucho mayor que la producción de nuevos antibióticos capaces de hacerles frente (Murray *et al.*, 2022). La propagación de genes de resistencia a antimicrobianos (ARG) es más común día con día, debido al alto contenido de antibióticos en el estiércol que se utiliza como abono (Laconi *et al.*, 2021), situación que desencadena muchas otras acciones, como lo es la generación de resistencia en bacterias no blanco al ser expuestas a grandes cantidades de antibióticos desechados en heces de animales, cuando son utilizados como abono para las cultivos, lugar en el cual entran en contacto el antibiótico y la bacteria; esto podría provocar la transmisión de esta resistencia hacia otras bacterias de importancia en la salud pública de manera horizontal por medio de plásmidos u otro medio genético (Fernández *et al.*, 2003).

Xenorhabdus y *Photorhabdus* son bacterias Gram-negativas, emparentadas filogenéticamente, que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae; se caracterizan por generar asociaciones simbióticas con nemátodos entomopatógenos (Rivera *et al.*, 2022), la simbiosis nematodo-bacteria favorece ambas partes, el nematodo brinda un medio de protección y transporte para las bacterias y a cambio estas últimas producen enzimas y metabolitos en favor de la digestión y reproducción del nematodo dentro del insecto o larva, provocando en la mayoría de casos la muerte del hospedero (Ulug *et al.*, 2024).

Cuando un antibiótico se aplica a un animal no es completamente degradado, sino que se expulsan subproductos de la metabolización y partes integrales del mismo que se van junto a la orina y heces cual sea el caso, dirigiéndose en donde el animal orine o defeque (Jhon y Ruiz, 2001). Michael *et al.* (2013) reportan que la reserva de genes de resistencia es significativa en aguas residuales, suelo fertilizado con abono animal. Estudios realizados en diferentes granjas en el Sur de China encontraron presencia de 28 diferentes antibióticos en muestras de alimento, aguas residuales y estiércol de la zona pecuaria, destacando fuertemente las tetraciclinas, bacitracina, lincomicina, sulfonamidas, fluoroquinolonas, ceftiofur, trimetoprima, macrólidos y florfenicol (Zhou *et al.*, 2013).

Desde este punto de vista, es perceptible la idea de que la resistencia a los antibióticos no es un fenómeno exclusivo de las bacterias diana o blanco, si no de cualquiera presente donde se excreten los antibióticos. Por lo antes mencionado, el monitorear la susceptibilidad de bacterias no blanco nos puede ayudar a dimensionar el impacto ecológico de estos productos en otras especies bacterianas de importancia para la salud pública, por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar la sensibilidad y resistencia a los antibióticos de diversas cepas de *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* provenientes de diversas muestras de suelos pecuarios y agrícolas del estado de Guanajuato.

Materiales y métodos

El estudio se realizó en el Laboratorio de Parasitología y Control Biológico (LPCB), del Departamento de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, División Ciencias de la Vida, ubicada en la comunidad Ex-Hacienda del Copal, Irapuato, Guanajuato. El experimento se realizó con cepas de nemátodos entomopatógenos (NEP) conservadas en el LPCB de la Universidad de Guanajuato, las cuales inicialmente se obtuvieron a partir de muestras de suelo agrícola y pecuario por la técnica de cinco de oros (SAGARPA, 2012; Rendón, 1994; Infante y Zarate, 2003). El aislamiento de NEP se realizó utilizando el insecto trampa *G. mellonella* el cual después de 7 días que se colocó en un bote de plástico de 1 l se buscó cada *G. mellonella* y se desinfectaron del exterior con una solución de hipoclorito de sodio al 0.2%, con el objetivo de disminuir la carga de microorganismos de no interés, posteriormente se lavaron por tres ocasiones en agua destilada y se transfirieron las larvas a una cada caja Petri 100 x 15 milímetros (mm). Permanecieron en reposo por una semana, humedeciéndose y monitoreando la presencia de nemátodos diariamente (López *et al.*, 2016).

Una vez ubicadas las larvas infectadas, se lavaron en una solución de hipoclorito de sodio al 3% y se transfirieron, de manera individual, a una trampa de White modificada, la cual se humedeció en abundancia, buscando que los nemátodos salieran de la larva infectada. A continuación, se incubaron a una temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Amador *et al.*, 2015) durante 3 días en oscuridad antes de realizar la recolección de los nemátodos. Para realizar el aislamiento de bacterias entomopatógenas de las larvas de nemátodos se colocaron 2 nuevas larvas de *G. mellonella* por cada caja Petri, limpias y con papel filtro húmedo y se tomaron 200 μl de nemátodos, los cuales se vertieron sobre cada una de las larvas para infectarlas de forma tópica, se incubaron durante 3 días en la oscuridad a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Thanwisai *et al.*, 2012). Una vez transcurrido este tiempo se observaron las larvas en el microscopio estereoscópico para confirmar la infección y después se extrajo la hemolinfa con una jeringa de 3 mL para posteriormente se asperjó el contenido sobre el agar MacConkey; el cual se dejó incubar por 72 horas a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; pasado el tiempo, se observó crecimiento de colonias bacterianas, las cuales se utilizaron para realizar un cultivo puro para posteriormente cultivarla en caldo nutritivo, dejándolas reposar por 48 horas en agitación a la oscuridad a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Para la identificación de las bacterias se utilizó la técnica de frotis con tinción de Gram en las colonias desarrolladas en los agares sólidos de MacConkey. Se reconocieron las bacterias del género *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, como bacilos Gram- (Guerra *et al.*, 2014). Una vez pasadas las 48 horas de incubación del caldo se realizó un conteo de bacterias en una cámara de Neubauer y se ajustó una dilución de 1.4×10^3 bacterias por mililitro la cual se utilizó para realizar la infección por inyección de 0.02ml en cada una de 5 larvas de *G. mellonella* con un ángulo de 45° en el abdomen. Se utilizaron 3 repeticiones por cepa y tratamiento testigo; adicionalmente, como testigos se utilizó la inyección de caldo nutritivo puro y otro testigo

de agua destilada, aplicándoles la misma cantidad de volumen que a los tratamientos con bacterias. Se evaluó la mortalidad con la observación pasadas 48 horas.

Posteriormente se cultivaron, cada una de las cepas de bacterias, en caldo Mueller Hinton y se incubaron por 48 horas en agitación a la oscuridad a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Mühlhauser *et al.*, 2014), posteriormente; se realizó la técnica de dispersión en disco para el cual se tomaron 40µl de una de cepas y se depositaron en la parte central del medio de cultivo con agar Mueller Hinton, enseguida la caja de Petri con el medio de cultivo se colocó sobre un dispersor celular y se dispersaron las bacterias con ayuda de un asa triangular hasta que esta se secó completamente. Después, con ayuda de pinzas estériles, se colocaron los sensidiscos sobre el cultivo para lo cual se utilizaron los antibiogramas PT-35 Multibac I.D. para bacterias Gram - los cuales incluyen los antibióticos: Amikacina (AK), Ampicilina (AM), Carbencilina (CB), Cefalotina (CF), Cefotaxima (CFX), Ciprofloxacina (CPF), Cloranfenicol (CL), Gentamicina (GL), Netilmicina (NET), Nitrofurantoína (NF), Norfloxacina (NOF) y Sulfametoxazol/Trimetoprim (STX). Todo el proceso se realizó en una campana de extracción y cerca de un mechero para reducir el riesgo de contaminantes en los medios, se repitió el procedimiento con cada cepa aislada. Los antibiogramas se dejaron en una incubadora durante 24 horas a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. Tras el tiempo de incubación, se determinó el nivel de sensibilidad hacia cada antibiótico de manera cuantitativa, midiendo el diámetro del halo inhibitorio que se formó alrededor de los discos con ayuda de un vernier digital. Dependiendo de la medida de los diámetros, las cepas se clasificaron en: Sensible, intermedio o resistente (Cantón, 2010). Además, se realizaron dos grupos testigos el primero solo con cultivo bacteriano y el segundo un testigo blanco (sin muestra).

Para el diseño estadístico en cual se evaluó la patogenicidad se realizó una prueba de normalidad de los porcentajes de normalidad y después se realizó una transformación ArcoSen⁻¹, una vez hecha se realizó un análisis de varianza completamente al azar; después se realizó una comparación de medias con el método de Tukey ($P<0.05$). Los resultados de la prueba de susceptibilidad se presentaron de manera descriptiva.

Resultados

La evaluación de la patogenicidad de bacterias sobre larvas de *G. mellonella* se realizó con solo cinco cepas (M4, M18, M26, M28, M40); la mortalidad general varió de 0 al 100% a las 48 horas, todas las cepas evaluadas mataron al 100% de las larvas y solo los grupos testigo presentó una mortalidad del 0% (Cuadro 1). El análisis estadístico mostró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P<0.05$), la prueba de Tukey formó dos grupos, el más sobresaliente fue el formado por las cepas de bacterias y el menos sobresaliente el de los grupos testigo (Cuadro 1).

CUADRO 1. Porcentaje de mortalidad de *G. mellonella* infectadas con bacterias entomopatógenas a 1.4×10^3 bacterias a las 48 horas.

Cepa	Mortalidad
M40	100% ^a
M26	100% ^a
M28	100% ^a
M4	100% ^a
M18	100% ^a
Testigo de caldo	0% ^b
Testigo de agua	0% ^b

Diferente literal por columna indica diferencia estadísticamente significativa ($P<0.05$).

Se utilizaron seis cepas para evaluar la susceptibilidad a los antibióticos, se observó susceptibilidad 5 cepas de las 6 evaluadas al menos 1 antibiótico de los utilizados (NF, CL, CFX, CF, CB, AK y AM). La cepa M4 mostró baja susceptibilidad para todos los antibióticos y se le puede considerar una cepa multiresistente; la cepa con mayor sensibilidad fue M40 siendo sensible al Sulfametoxazol/Trimetoprim, ciprofloxacina y a la gentamicina. En los grupos testigos se pudo observar el crecimiento bacteriano de cada muestra del primer grupo, mientras en el segundo grupo no se observó ningún crecimiento.

CUADRO 2. Milímetros de inhibición de crecimiento bacteriano a las 24 horas de la colocación de los antibiogramas y su consideración de Resistentes, Intermedios o Sensibles.

Cepa	Antibióticos											
	NF	STX	CL	NOF	CPF	NET	CFX	CF	GE	CB	AK	AM
M18	6.0(R)±0.0	12.2(I)±2.7	7.7(R)±2.1	14.0(I)±1.4	22.2(S)±4.4	8.4(R)±12.0	13.3(R)±1.0	6.0(R)±0.0	14.0(I)±3.4	8.5(R)±4.3	12.0(R)±2.4	6.0(R)±0.0
M40	6.0(R)±0.0	16.1(S)±0.7	9.2(R)±2.9	15.6(I)±0.9	35.5(S)±0.9	10.3(R)±1.1	14.2(R)±3.6	6.0(R)±0.0	17.8(S)±1.9	7.1(R)±2.0	12.4(R)±2.7	6.0(R)±0.0
M35	6.0(R)±0.0	16.0(S)±1.6	6.0(R)±0.0	14.9(I)±0.6	20.6(I)±2.4	10.5(R)±0.9	12.9(R)±1.0	6.0(R)±0.0	6.0(R)±0.0	6.0(R)±0.0	8.1(R)±1.8	6.0(R)±0.0
M28	6.0(R)±0.0	16.2(S)±1.7	6.0(R)±0.0	15.5(I)±2.0	24.3(S)±5.3	14.7(I)±2.3	10.2(R)±0.1	6.0(R)±0.0	13.9(I)±1.6	6.0(R)±0.0	13.5(R)±1.7	6.0(R)±0.0
M26	6.0(R)±0.0	12.1(I)±5.3	8.1(R)±3.7	15.7(I)±2.3	24.7(S)±3.7	10.8(R)±0.8	6.0(R)±0.0	6.0(R)±0.0	15.0(S)±0.6	6.0(R)±0.0	13.6(R)±1.1	6.0(R)±0.0
M4	11.5(R)±2.4	6.0(R)±0.0	10.5(R)±1.3	6.0(R)±0.0	6.0(R)±0.0	7.5(R)±2.6	7.0(R)±1.7	9.3(R)±0.4	9.2(R)±0.6	6.0(R)±0.0	12.6(R)±2.0	6.0(R)±0.0

R: Resistente; I: Intermedio; S: Sensible

AK: Amikacina, AM: Ampicilina, CB: Carbencilina, CF: Cefalotina, CFX: Cefotaxima, CPF: Ciprofloxacina, CL: Cloranfenicol, GE: Gentamicina, NET: Netilmicina, NF: Nitrofurantoína, NOF: Norfloxacin; STX: Sulfametoxazol/Trimetoprim

±: Desviación estándar

Conclusión

Con los resultados del presente estudio podemos concluir que 0.02 ml de una concentración de 1.4×10^3 bacterias por mililitro de las cepas de bacterias entomopatógenas inyectadas a larvas de *G. mellonella* son eficientes en provocar la mortalidad del 100%.

A las diferentes cepas de bacterias entomopatógenas utilizadas en el presente estudio se les puede considerar susceptibles, intermedias y resistentes a los antibióticos evaluados, además de que existen cepas que se les puede considerar multiresistentes a los antibióticos utilizados.

Referencias

- Amador, M., Molina, D., Guillen, C., Parajales, E., Jiménez, K., Uribe, L. (2015). Utilización del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis atacamensis* cia-ne07 en el control del picudo del banano *Cosmopolites sordidus* en condiciones in vitro, Agronomía Costarricense, Revista de Ciencias Agrícolas, 39 (3): 47-60. <https://doi.org/10.15517/rac.v39i3.21791>
- Cantón, R. (2010) Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica, Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 28 (6): 375-385. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.01.001>
- Fernández, F., López, J., Ponce, LM., Machado, C. (2003). Resistencia bacteriana. Revista Cubana de Medicina Militar, 32(1). <https://www.imbiomed.com.mx/articulo.php?id=17378>
- Guerra, BE., Chacón, JG., Muñoz, JE., Caicedo, AM. (2014) Evaluación de la patogenicidad de *Xenorhabdus* spp. Nativos en Colombia, Revista Colombiana de Biotecnología, 16 (1). <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n1.44277>
- Infante, GS. y Zárate, GP. (2003). Métodos Estadísticos. Un enfoque multidisciplinario. 2a Ed. Trillas. México, D. F. 643 p. ISBN: 9682438381.
- Jhen, D.-y Jin, C., Yang, S., Ma, H., Zhang, X., Zhang, K., Zou, W. (2024). Ubiquitous nanocolloids suppress the conjugative transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance in aqueous environment. Environmental Pollution, 355. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.124231>
- Laconi, A., Mughini, L., Tolosi, R., Grilli, G., Trocino, A., Carraro, L., Di Cesare, F., Cagnardi, P., Piccirillo, A. (2021). Microbial community composition and antimicrobial resistance in agricultural soils fertilized with livestock manure from conventional farming in Northern Italy, Science of the total environment, 760. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143404>
- López, RA. y Soto, A. (2016). Aislamiento de nematodos entomopatógenos nativos en cultivos de caña panelera y pruebas de patogenicidad sobre *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: crambidae), Boletín Científico Museo de Historia Natural, 20 (2): 114-123. <https://doi.org/10.17151/bccm.2016.20.2.8>
- Michael, I., Rizzo, L., McArdell, CS., Manaia, CM., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatments plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. Water Research, 47 (3): 957-995. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.027>
- Mühlhauser, PM. y Rivas, JL. (2014) Laboratorio de microbiología: conocimientos básicos para un clínico, Revista Médica de Clínica Las Condes, 25 (3): 569-579. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70072-0](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70072-0)
- Murray, CJ., Ikuta, KS., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S., Browne, AJ., Give, M., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef, B. H., Kumaran, EAP., McManigal, B., Achalapong, S., Agarwal, R., Akech, S., Albertson, S., Amuasi, J., Andrews, J., Aravkin, A., Ashley, E., Babin, F. X., Bailey, F., Baker, S., Basnyat, B., Bekker, A., Bender, R., Berkley, JA., Bethou, A., Bielicki, J., Boonkasidecha, S., Bukosia, J., Carvalho, C., Castañeda-Orjuela, C., Chansamouth, V., Chaurasia, S., Chiurchiù, S., Chowdhury, F., Clotaire, R., Cook, AJ., Cooper, B., Cressey, TR., Criollo-Mora, E., Cunningham, M., Darboe, S., Day, NPJ., De Luca, M., Dokova, K., Dramowski, A., Dunachie, SJ., Bich, TD., Eckmanns, T., Eibach, D., Emami, A., Feasey, N., Fisher-Pearson, N., Forrest, K., Garcia, C., Garrett, D., Gastmeier, P., Zergaw, A., Greer, RC., Gupta, V., Haller, S., Haselbeck, A., Hay, SI., Holm, M., Hopkins, S., Hsia, Y., Iregbu, KC., Jacobs, J., Jarovsky, D., Javanmardi, F., Jenney, AWJ., Khorana, M., Khusuwan, S., Kissoon, N., Kobeissi, E., Kostyanov, T., Krapp, F., Krumkamp, R., Kumar, A., Kyu, HH., Lim, C., Lim, K., Limmathurotsakul, D., Loftus, MJ., Lunn, M., Ma, J., Manoharan, A., Marks, F., May, J., Mayxay, M., Mturi, N., Munera-Huertas, T., Musicha, P., Musila, LA., Mussi-Pinhata, MM., Naidu, RN., Nakamura, T., Nanavati, R., Nangia, S., Newton, P., Ngoun, C., Novotney, A., Nwakanma, D., Obiero, CW., Ochoa, TJ., Olivas-Martínez, A., Olliaro, P., Ooko, E., Ortiz-Brizuela, E., Ounchanum, P., Pak, GD., Paredes, JL., Peleg, AY., Perrone, C., Phe, T., Phommasone, K., Plakkal, N., Ponce-de-Leon, A., Raad, M., Ramdin, T., Rattanavong, S., Riddell, A., Roberts, T., Robotham, JV., Roca, A., Rosenthal, VD., Rudd, KE., Russell, N., Sader, HS., Saengchan, W., Schnall, J., Gerard, JA., Seekaew, S., Sharland, M., Shivamallappa, M., Sifuentes-Osorio, J., Simpson, AJ., Steenkeste, N., Stewardson, AJ., Stoeva, T., Tasak, N., Thaiprakong, A., Thwaites, G., Tigoi, C., Turner, C., Turner, P., Doorn, HR., Velaphi, S.,

- Vongpradith, A., Vongsouvath, M., Vu, H., Walsh, T., Walson, J.L., Waner, S., Wangrangsimakul, T., Wannapinij, P., Wozniak, T., Young, TEMW., Yu, K.C., Zheng, P., Sartorius, B., López, A.D., Stergachis, A., Moore, C., Dolecek, C., Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399: 629–55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Read, A.F. y Woods, R.J. (2014). Antibiotic resistance management. *Evolution, Medicine y Public Health*, 2014 (1): 147. <https://doi.org/10.1093/emph/eou024>
- Rendón, S.G. (1994). Muestreo. Aplicación en la estimación simultanea de varios parámetros. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. 246 p.
- Rivera-Ramírez, A., Salgado-Morales, R., Jiménez-Pérez, A., Pérez-Martínez, R., García-Gómez, B.I., Dantán-González, E. (2022). Comparative Genomics and Pathogenicity Analysis of Two Bacterial Symbionts of Entomopathogenic Nematodes: The Role of the GroEL Protein in Virulence. *Microorganisms*, 10 (3): 486. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030486>
- Ruiz, J.D. (2016) Factores fisiológicos que modifican la acción de los fármacos en medicina veterinaria. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 14 (1): 36-48. <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.323750>
- SAGARPA, Gobierno Federal y Senasica. (2012). Manual Técnico de Muestreo de Productos Agrícolas para Determinación de Residuos de Plaguicidas. Gobierno Federal. México. Consultado (29 de julio de 2024). https://agrolab.com.mx/sitev002/descargas/Manual_muestreo_Plaguicidas_SENASICA.pdf
- Thanwisai, A., Tandhavanant, S., Saiprom, N., Waterfield, N.R., Long, P.K., Bode, H.B., Peacock, S.J., Chantratita, N. (2012). Diversity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. and Their Symbiotic Entomopathogenic Nematodes from Thailand. *PLoS One*, 7 (9): e43835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043835>
- Ulug, D., Touray, M., Hazal, S., Cimen, H., Hazir, C., Bode, H., Hazir, S. (2024). A taste of a toxin paradise: *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacterial secondary metabolites against *Aedes aegypti* larvae and eggs. *Journal of Invertebrate Pathology*. 205: 108126. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2024.108126>
- Zhou, L.J., Ying, G.G., Liu, S., Zhang, R.Q., Lai, H.J., Chen, Z.F., Pan, C.G. (2013) Excretion masses and environmental occurrence of antibiotics in typical swine and dairy cattle farms in China, *Science of The Total Environment*, 444: 183-195. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.087>.