



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Aislamiento y caracterización de bacterias
formadoras de endosporas aeróbicas en
muestras de agua potable de la FES Zaragoza
y las Clínicas Universitarias
de Atención a la Salud

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:
MARIO ANTONIO HERNÁNDEZ PÉREZ

DIRECTORA:
MTRA. DORA ALICIA PÉREZ GONZÁLEZ

ASESORA:
Q.F.B. SANDRA ORTEGA MUNGUÍA



CIUDAD DE MÉXICO, 5 DE NOVIEMBRE DE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICADA A:

Mi mamá **María Antonia Pérez Pat**

Por prepararme para enfrentar los retos de la vida, por creer en mí, quererme y apoyarme en todo momento, siendo este el mejor legado que pudo haberme brindado y nunca desistir en su apoyo incondicional.

Mi papá **Mario Hernández Jiménez**

Por enseñarme el camino hacia el éxito, que con trabajo y esfuerzo es posible lograrlo, y su cariño en todo momento. Por nunca dejarme sólo en esos instantes de angustia y por su apoyo incondicional en mis necesidades.

Mi hermano **Alan Yahel Hernández Pérez**

Por ser mi amigo incondicional, mi confidente y quien a pesar de las discusiones siempre he contado con su apoyo y lealtad. Por sus consejos, escucharme y compartir inolvidables experiencias.

Mi hermana **Adriana Guadalupe Hernández Pérez**

Por ser mi consejera y confidente, que nunca dejó de apoyarme y escucharme en los momentos difíciles y de quien he aprendido valiosas enseñanzas.

La memoria de mi abuela **Liboria Pat Kú**

Por su apoyo y cariño incondicional en todo momento y sus grandes enseñanzas.

La memoria de mi abuela **Juana Jiménez Orozco**

Por su cariño y apoyo incondicional en todo momento, sus consejos que han sido grandes aprendizajes en mi vida.

Mi abuelo **Ignacio Mejía**

Por sus consejos y apoyo que en momentos de angustia me ha brindado no importando la situación.

La memoria de mi abuelo ***Eulalio Pérez Gómez***

Por ser un hombre con carácter que me enseñó a ser fuerte y enfrentar con gallardía los retos que se presentan en la vida.

La memoria de mi tía ***María Cecilia Pérez Pat***

Por ser mi gran consejera en vida, por ayudarme con mis problemas y un ejemplo que seguir.

La memoria de mi tía ***María Magdalena Pérez Pat***

Por motivarme en vida y apoyarme en momentos difíciles.

La memoria de mi tía ***Margarita Pérez Pat***

Por quererme en vida y siempre sentirse orgullosa de mí en todo momento.

La memoria de mi tío ***Luis Miguel Pérez Pat***

Por ser gran consejero en vida y siempre brindarme su apoyo sin importar la situación en que estuviera.

Mi tío ***Emmanuel César Mejía Jiménez***

Por sus grandes consejos y apoyo con mis problemas, por escucharme siempre que lo he necesitado.

Mi tío ***Daniel Hernández Jiménez***

Por su apoyo en momentos difíciles.

Mi tía ***María del Pilar Pérez Pat***

Por sus consejos y compartir su alegría incluso en los momentos difíciles.

Mi tía ***María de los Ángeles Pérez Pat***

Por su apoyo en momentos difíciles y sus regaños que me han servido para ser una mejor persona.

Mi primo ***Eduardo de Jesús Pérez Gutiérrez***

Por ser un hermano más y compartir experiencias increíbles.

Mi cuñado ***Noé Carmona Aguilar***

Por siempre contar con su apoyo y amistad.

Mis primos ***Oscar, Rafael, Katherine, Ángeles, Luis, César, Anahí, Atzín, Juan***

Por compartir consejos y grandes experiencias.

A ***Mayra Grisselle Reyes A.***

Por ser una persona incondicional, a quien agradezco compartir experiencias inolvidables y lindos momentos, sus buenos deseos, apoyo y amistad, por el amor que me dio en el tiempo que pudimos estar juntos.

Mi amiga y exnovia ***Ana Greysi Gutiérrez***

Por compartir experiencias inolvidables, su cariño, su amistad y buenos deseos.

Mis amigos del Laboratorio L-313

David Hernández Peñaloza, Ariadna Sharon Sánchez, Silvia Hernández

Por compartir buenos momentos y excelentes deseos.

Mis amigos de diplomados

Paulina, Andrea, Irma, Claudia, Erika, Laura, Roberto, Darwin, Julio, Jessica, Guadalupe, Raúl, Jacqueline, Isabel, Rocío, Leydi, Juan, Gabriela, Abigail, Luis, Luis Manuel

Por compartir buenos momentos en el poco tiempo de conocerlos, por su amistad, lealtad y buenos deseos.

AGRADECIMIENTOS

Mtra. Dora Alicia Pérez González

Por todo su apoyo, tiempo, comprensión y enseñanzas, para la elaboración de este trabajo, de igual forma mostrarme la gran persona que es. Siempre la admiraré y recordaré con mucho cariño por todo este tiempo de conocerla. Siendo un placer haber colaborado con ella todo este tiempo.

Q. F. B. Sandra Ortega Munguía

Por su paciencia, tiempo y correcciones que requirió este trabajo, ser una gran persona y agradecer sus consejos.

Q. Jorge Rivas Montes

Por sus consejos y haberme permitido conocer a la gran persona que es, además de su apoyo y su amistad.

QFB Gabriel Alejandro Romero Díaz

Por su apoyo y comprensión, consejos y amistad durante este tiempo de conocerlo.

Psi. Georgina Romero Díaz

Por sus consejos y excelentes pláticas que fueron necesarias para aprender más sobre valores en la vida, una gran enseñanza.

QFB Patricia Vidal Millán

Por ser una profesora excelente, agradeciendo ser estricta y regañarme en muchas ocasiones, de ella aprendí mucho conociendo a la gran persona que es.

QFI Estela Valencia Plata

Por sus enseñanzas y consejos que alguna vez me otorgó

Mtra. María del Rosario Benítez Velázquez

Por sus pláticas amenas y su apoyo incondicional en los momentos clave, una profesora excelente

M. en F. Leticia Huerta Flores

Por su tiempo, disponibilidad y amabilidad que siempre tuvo hacia mí el tiempo que fui su alumno.

Mtra. Isabel Garduño Pozadas

Por sus consejos y palabras de motivación, a pesar de que no fui su alumno directamente, siempre tuvo atención para mí en momentos buenos y complicados.

El presente trabajo se elaboró en el Laboratorio L-313 del Campus II de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Contenido

Resumen	1
Introducción.....	2
Marco Teórico	4
El agua.....	4
Contaminación del agua	4
Regulación de la contaminación	6
Indicadores microbiológicos del agua.....	7
Coliformes totales	8
Coliformes fecales.....	9
Enterococos fecales	9
Bacterias anaeróbicas.....	9
Bacteriófagos	10
Mesófilos aerobios	10
Otros indicadores de contaminación microbiológica	10
Bacterias Aeróbicas Formadoras de Endosporas (BAFEs)	11
Características de las endosporas.....	13
Detección de BAFEs.....	15
Aislamiento.....	16
Caracterización	16
Planteamiento del problema.....	18
Hipótesis.....	20
Objetivos	21
Objetivo General.....	21
Objetivos Particulares	21
Diseño de investigación	22
Población de estudio	22
Criterios de inclusión	22
Criterios de exclusión	22
Análisis Estadístico	23
Material y procedimiento	24
Material.....	24
Procedimiento.....	26

Diagrama de flujo.....	29
Resultados	30
Discusión de resultados	43
Conclusiones.....	48
Anexos	50
Anexo I.....	50
Anexo II.....	51
Anexo III.....	62
Anexo IV	66
Referencias	69

Resumen

Se realizó un estudio microbiológico de 100 muestras de agua potable de la FES Zaragoza (Campus I, II) y sus siete Clínicas Universitarias de Atención a la Salud (Estado de México, Tamaulipas, Los Reyes, Reforma, Nezahualcóyotl, Benito Juárez, Aurora y Zaragoza), De manera semanal se tomaron las muestras de agua en cisternas, grifos y tanques hidroneumático, con el objetivo de aislar, caracterizar, determinar su frecuencia y distribución de las Bacterias Aeróbicas Formadoras de Endosporas (BAFEs), así como, la relación de la presencia de estas con la potabilidad del agua. Entre las 100 muestras incluidas en el estudio, 29 presentaron BAFEs, de estas se obtuvieron 44 cepas del género *Bacillus* por medio de la técnica de extendido en placa y caracterizadas por medio de pruebas bioquímicas. Las especies que predominaron fueron: *B. circulans* (22.73%), seguida de *B. sphaericus* (20.45%), *B. megaterium* y *B. coagulans* (18.18% cada una) distribuidos principalmente en las cisternas. El 60% del total de aislamientos provenían de las C. Benito Juárez (39%) y C. Reforma (21%). Los resultados de la potabilidad de agua y microbiológicos fueron organizados en una hoja de cálculo de Excel. Se construyeron gráficos circulares y de barras con el propósito de representar las frecuencias relativas de cada especie identificada, así como, de los lugares de donde fueron aisladas. Se llevó a cabo la prueba de Ji-Cuadrada de independencia para determinar la asociación entre la potabilidad y la presencia de las BAFEs. El análisis de Ji-Cuadrada evidenció que la presencia de las BAFEs es independiente a la potabilidad del agua. Los resultados obtenidos, señalan el riesgo potencial que representa para la comunidad zaragozana el uso de esta agua, pues, las endosporas aerobias (EA) de BAFEs son un indicador de la presencia de microorganismos difíciles de eliminar mediante la cloración. Por lo que, se propone: la implementación de la detección de EA en muestras de agua, a la par del análisis microbiológico de coliformes totales, realizado en el programa de servicio social de la FES Zaragoza.

Introducción

El agua es un elemento vital para la vida, es imprescindible para ésta y el desarrollo socioeconómico, industrial y agrícola, sin embargo, la escasez, el desperdicio y contaminación de este recurso, son problemas que se han agudizado con el transcurso de los años. Diversos factores son los que han incrementado la gravedad de este problema, como lo es el desmedido crecimiento de la población, el acelerado desarrollo industrial, entre otras.

En el caso de nuestro país, con la reforma realizada en febrero de 2012 al artículo 4o. de nuestra carta magna ⁽¹⁾ México reconoce el derecho humano al agua, como uno de los más importantes derechos sociales. El Plan Nacional de Desarrollo 2019-2024 ⁽²⁾, de donde se deriva el Programa Nacional Hídrico, tiene como objetivo incrementar la cobertura de los servicios de agua potable en el país; ya que, la falta de acceso al agua potable tiene como consecuencia el padecimiento de enfermedades de origen hídrico.

Razón, por la cual el monitoreo de la calidad del agua en el territorio nacional es obligatorio y corresponde su vigilancia a la Secretaría de Salud, en coordinación con los gobiernos estatales, municipales, gobierno de la Ciudad de México, así como a la Comisión Nacional del Agua.

La desinfección del agua con cloro tiene el propósito de prevenir enfermedades derivadas de la presencia de contaminantes bacteriológicos. Sin embargo, la cloración no elimina a todos los microorganismos ya que su naturaleza les hace resistir este proceso.

Para realizar el debido control microbiológico al tratamiento de potabilización del agua se utilizan microorganismos indicadores. El control microbiológico consiste en monitorear los niveles de microorganismos indicadores que contiene el agua y

evaluar si se encuentran dentro de los límites permitidos de acuerdo con la normatividad.

Los microorganismos que se utilizan con mayor frecuencia como indicadores son las bacterias coliformes, ya sean totales o fecales, los estreptococos fecales y bacterias mesófilas aerobias, entre otras.

La determinación de bacterias coliformes se realiza a través del Número Más Probable (NMP) de microorganismos coliformes, por la técnica fermentación de tubos múltiples. Mientras que los mesófilos aerobios, se determina por el recuento de bacterias mesófilas aerobias por vaciado en placa.

La determinación por el método de NMP, proporciona una estima de los organismos viables en el sustrato. Por lo que, es un concepto estadístico derivado de la probabilidad de tener una contaminación a medida que el NMP en el agua es más grande. Sin embargo, un NMP bajo no indica que puedan ser resistentes a los procesos de desinfección.

Para detectar microorganismos que son difíciles de eliminar con el proceso de cloración, se utiliza a las Bacterias Aeróbicas Formadoras de Endosporas (BAFEs). Las esporas de las BAFEs han sido reconocidas como la forma de vida más resistente en la Tierra.

Su desarrollo y formación generalmente se presenta cuando existe una alta densidad poblacional de células vegetativas que se encuentran en un estado de estrés provocado por el agotamiento de los nutrientes de su entorno; aunque en presencia de nutrientes apropiados, incluida el agua, la endospora es capaz de responder rápidamente por germinación y reanudar el crecimiento vegetativo de dicha célula. Por lo que, este indicador fue aprobado por el Comité de Standard Methods en 2007 ⁽³⁾, para ser una alternativa de la detección de microorganismos contaminantes del agua que no son detectables por otros métodos.

Marco Teórico

El agua

El agua (del latín *aqua*) es el componente más abundante en la superficie terrestre y más o menos puro, forma la lluvia, los ríos y los mares; es parte constituyente de todos los organismos vivos y aparece en compuestos naturales ⁽⁴⁾. Es un elemento vital para la existencia humana, al ser recurso imprescindible para la vida humana y para el desarrollo socioeconómico, industrial y agrícola ⁽⁴⁾.

Contaminación del agua

El agua, además de ser una sustancia imprescindible para la vida, por sus múltiples propiedades, es ampliamente utilizada en actividades diarias, tales como: la agricultura (70% al 80%), la industria (20%), el uso doméstico (6%), entre otras ⁽⁵⁾.

De igual forma Arcos, Ávila y Estupiñán ⁽⁵⁾, mencionan que, la contaminación del agua puede ser producida por desechos industriales, desechos domésticos, pesticidas, metales de transición, elementos radiactivos, entre otros, los cuales se describe a continuación:

1. Desechos orgánicos. Son el conjunto de residuos orgánicos producidos por los seres humanos, ganado, etc. Incluyen heces y otros materiales que pueden ser descompuestos por bacterias aeróbicas, es decir en procesos con consumo de oxígeno. Cuando este tipo de desechos se encuentran en exceso, la proliferación de bacterias agota el oxígeno, en consecuencia, ya no pueden vivir en estas aguas los peces y otros seres vivos.

2. Sustancias químicas inorgánicas. En este grupo están incluidos ácidos, sales y metales tóxicos como el mercurio y el plomo. Si están en cantidades altas pueden

causar graves daños a los seres vivos, disminuir los rendimientos agrícolas y corroer los equipos que se usan para trabajar con el agua.

3. Nutrientes vegetales inorgánicos. Nitratos y fosfatos, son sustancias solubles en agua que las plantas necesitan para su desarrollo, pero si se encuentran en cantidad excesiva inducen el crecimiento desmesurado de algas y otros organismos provocando la eutrofización de las aguas. Cuando estas algas y otros vegetales mueren, al ser descompuestos por los microorganismos, se agota el oxígeno y el resultado es un agua maloliente e inutilizable.

4. Compuestos orgánicos. Muchas moléculas orgánicas como petróleo, gasolina, plásticos, plaguicidas, disolventes, detergentes, etc. acaban en el agua y permanecen, en algunos casos, largos períodos de tiempo, porque, al ser productos fabricados por el hombre, tienen estructuras moleculares complejas difíciles de degradar por los microorganismos.

5. Sedimentos y materiales suspendidos. Muchas partículas arrancadas del suelo y arrastradas a las aguas, junto con otros materiales que hay en suspensión en las aguas, son la mayor fuente de contaminación del agua.

6. Sustancias radiactivas. Isótopos radiactivos solubles pueden estar presentes en el agua y, a veces, se pueden ir acumulando a lo largo de las cadenas tróficas, alcanzando concentraciones considerablemente más altas en algunos tejidos vivos que las que tenían en el agua ⁽⁵⁾.

7. Contaminación térmica. El agua caliente liberada por centrales de energía o procesos industriales eleva, en ocasiones, la temperatura de ríos o embalses con lo que disminuye su capacidad de contener oxígeno y afecta a la vida de los organismos.

8. Microorganismos patógenos. Existen diversos tipos de agentes patógenos que pueden transmitirse por el agua de consumo contaminada. La gama de agentes

patógenos cambia en función de factores variables como el aumento de las poblaciones de personas y animales, el incremento del uso de aguas residuales, los cambios de los hábitos de la población o de las intervenciones médicas, las migraciones y viajes de la población, y presiones selectivas que favorecen la aparición de agentes patógenos nuevos o mutantes, o de recombinaciones de los agentes patógenos existentes.

Regulación de la contaminación

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en sus Guías para la calidad del agua potable y otras normas internacionales, establecen o recomiendan requisitos de calidad para el agua de consumo humano. Las normas establecen que el agua es apta bacteriológicamente para consumo si se encuentra exenta de microorganismos patógenos ⁽⁶⁾.

Por ello, que el control de la calidad del agua ha sido prioritario principalmente en zonas urbanas, para verificar una adecuada potabilización del agua, o cuando se presentan brotes de enfermedades diarreicas en la población consumidora, donde una vez detectado el problema en el suministro de agua se resuelve a corto plazo mejorando las condiciones de desinfección de esta ^(6, 7, 8).

Sin embargo, las comunidades rurales han estado al margen de la verificación de la calidad del agua que utilizan para consumo humano, ya que existen reportes de comunidades con altas incidencias de enfermedades gastrointestinales y parasitarias, donde su origen se ha atribuido a la deficiencia de la calidad del agua que es utilizada para consumo ⁽⁶⁾.

En México el uso y explotación de los recursos acuáticos ha sido reglamentado y legislado por la Ley Federal del Agua desde 1972 ⁽⁹⁾, desde ese tiempo y hasta el sexenio actual, se ha planteado ir más allá de una actitud regulatoria, con cada uno de los Planes Nacionales Hídricos elaborados en el sexenio correspondiente.

A pesar de que las aguas mexicanas han sido consideradas para su protección y conservación a través de decretos y leyes, México tiene problemas de abastecimiento de agua en todos los niveles, y en cuanto a calidad de agua para consumo humano, es por la insuficiencia de los sistemas de distribución de agua tratada.

Lo anterior repercute principalmente en las comunidades rurales, las cuales se abastecen de agua de pozo, pero sin una verificación regular de su calidad ⁽⁷⁾. Debido a la calidad deficiente que presenta el agua y su ineficacia para su uso, las personas se ven en la necesidad de comprar agua embotellada o pipas particulares para su consumo ⁽⁸⁾.

Siguiendo en el mismo contexto, determinar el tipo de microorganismos presentes en el agua y su concentración proporciona herramientas indispensables para conocer la calidad de esta y la toma de decisiones en relación con el control de vertidos, tratamiento de aguas y conservación de ecosistemas, evitando así el riesgo de contaminación de las personas y el ambiente ⁽¹⁰⁾.

Dicha determinación, implica costos elevados, tiempo, y laboratorios especializados. Frente a estas dificultades y a la necesidad de hacer una evaluación rápida y fiable de la presencia de patógenos en el agua, se ha planteado la necesidad de trabajar con determinados grupos indicadores ⁽¹⁰⁾.

Indicadores microbiológicos del agua

Los microorganismos indicadores son aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos, concentración y reacción frente a factores ambientales, pero son más fáciles, rápidos y económicos de identificar. Para que un microorganismo sea considerado como indicador microbiológico debe reunir las siguientes condiciones ^(10, 11):

- Debe ser un miembro de la microflora intestinal de los animales de sangre caliente.
- Debe estar presente a la par que los agentes patógenos y ausentes en las muestras no contaminadas.
- Debe ser, por lo menos, igual de resistentes como los patógenos a agresiones ambientales y a la desinfección del agua en plantas de tratamiento de aguas residuales.
- No debe multiplicarse en el medio ambiente.
- Debe ser detectable por medio de los métodos fáciles, rápidos y de bajo costo.
- El organismo indicador no debe ser patógeno.

Una vez que se ha demostrado la presencia de grupos indicadores, se puede inferir que los patógenos se encuentran presentes en una mínima concentración y que su comportamiento frente a diferentes factores como pH, temperatura, presencia de nutrientes, tiempo de retención hidráulica o sistemas de desinfección es similar a la del indicador.

Se pueden utilizar como organismos indicadores los siguientes grupos de microorganismos: coliformes totales, coliformes fecales, enterococos fecales, bacterias anaerobias, bacteriófagos y mesófilos aerobios ^(10, 11), los cuales, se describen a continuación:

Coliformes totales

El grupo de coliformes totales incluye a todas las bacterias aerobias y anaerobias facultativas no formadoras de esporas, bacterias Gram negativas, bacilos que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de las 48 horas a 35 °C. Este grupo incluye a *Escherichia coli*, *Enterobacter spp*, *Klebsiella spp* y *Citrobacter spp*. Esas bacterias son las que se presentan en mayor número en las heces fecales de humanos y animales, pero no todos son de origen fecal ^(3, 6, 10, 11).

El grupo de coliformes son más resistentes a los desinfectantes que los quistes de protozoarios o virus ⁽⁶⁾.

Coliformes fecales

Este grupo incluye a todos los coliformes que sean capaces de fermentar lactosa a los 44.5 °C. A este grupo pertenecen bacterias como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. La presencia de coliformes fecales indica la existencia de materia fecal de mamíferos. Se ha sugerido el uso exclusivo de *E. coli* como un indicador de la contaminación fecal, ya que puede ser fácilmente distinguido de los otros miembros del grupo de coliformes fecales ^(6, 10, 11).

Enterococos fecales

Este grupo comprende a *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, entre otras; ya que comúnmente habitan en el tracto intestinal de los seres humanos y mamíferos, que se utilizan para detectar la contaminación fecal en agua ⁽⁶⁾.

Bacterias anaeróbicas

Las principales bacterias anaerobias que han sido consideradas como indicadores son *Clostridium perfringens*, Bifidobacterias y los *Bacteroides* spp.

- *Clostridium perfringens*, este es un microorganismo anaeróbico Gram positivo, bacilo formador de esporas, lo que lo hace resistente al medio ambiente y a la desinfección.
- Bifidobacterias, la bifidobacteria es una bacteria Gram positiva que no forma esporas, la cual se ha sugerido como indicador de contaminación fecal.

- *Bacteroides* spp., son bacterias anaeróbicas que se encuentran en el tracto intestinal, la supervivencia de *B. fragilis* en agua es menor que la de *E. coli* o *E. faecalis*.

Bacteriófagos

Son similares a los virus entéricos, pero son más fáciles y rápidos de detectar en el medio ambiente y se encuentran en mayor número que los virus entéricos en agua contaminada y otros ambientes.

Mesófilos aerobios

Las bacterias mesofílicas aerobias son un indicador general de la población que puede estar presente en una muestra y, por lo tanto, de la higiene con que ha sido manejada la fuente de procedencia ⁽¹¹⁾.

Otros indicadores de contaminación microbiológica

Para detectar microorganismos que son difíciles de eliminar con el proceso de cloración, se utiliza la detección de endosporas aeróbicas (EA). Método que determina si existen en el agua estas estructuras formadas por Bacterias Aerobias Formadoras de Endosporas (BAFEs).

Este indicador fue aprobado por el Comité de Standard Methods en 2007 ⁽³⁾, para ser una alternativa de la detección de microorganismos contaminantes del agua que no son detectables por otros métodos.

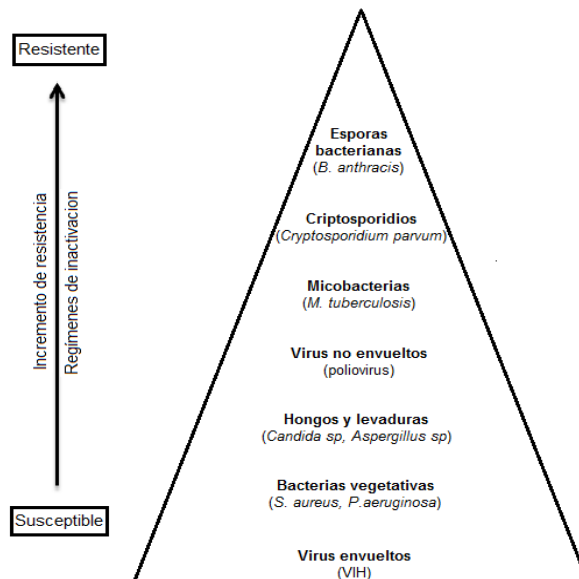
Las BAFEs, por ser tema central de este trabajo, serán revisadas como una sección aparte.

Bacterias Aeróbicas Formadoras de Endosporas (BAFEs)

Las Bacterias Aeróbicas Formadoras de Endosporas son parte de las bacterias más dominantes, activas y reproductivas de los cultivos agrícolas, la tierra, el agua y el aire. El género *Bacillus* incluye casi 200 especies ⁽¹²⁾, por ejemplo: *Bacillus anthracis* y *B. cereus*, que representan riesgo a la salud humana ^(12, 13).

Las BAFEs se caracterizan principalmente por su capacidad de supervivencia ante condiciones climáticas adversas como temperatura extrema, radiación UV, agentes oxidantes y corrosivos, sequías, fuertes lluvias, y procesos de esterilización, gracias a la formación de la endospora, en comparación con otros microorganismos del entorno ^(14, 15), como se puede observar en la Figura 1.

Figura 1. Resistencia a desinfección de diferentes microorganismos ⁽¹⁴⁾



A través de los años, las endosporas de las BAFEs han sido reconocidas como la forma de vida más resistente en la Tierra. Su desarrollo y formación generalmente se presenta cuando existe una alta densidad poblacional de células vegetativas que se encuentran en un estado de estrés provocado por el agotamiento de los

nutrientes de su entorno. Por lo tanto, la formación de esporas representa una estrategia cuando una bacteria escapa temporalmente de las condiciones nutritivas desfavorables, mismas que son trasladadas a través del viento o corrientes de agua naturales ^(13,15).

Cabe destacar, que los géneros bacterianos que son capaces de esporular son *Bacillus* y *Clostridium*, sin embargo, responden de manera diferente al efecto que las condiciones ambientales tienen sobre la formación de la espora, el género *Bacillus* solo esporula en condiciones aeróbicas, mientras que *Clostridium* lo hace en condiciones anaeróbicas ^(3, 16, 17, 18).

El uso de las endosporas de las BAFEs como indicadores es una alternativa atractiva, pues se ha determinado en diversos estudios, que estas son resistentes al tratamiento de desinfección del agua por medio de la cloración, mientras que otros indicadores, como los coliformes, son inactivados con este tratamiento ^(13, 16), por las que, se sugirió utilizar las endosporas de las BAFEs como indicadores para evaluar el rendimiento de las plantas de tratamiento de agua ⁽³⁾.

En lo que se refiere a la eliminación de los quistes de *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium*, los ooquistes no son destruidos por proceso de cloración ^(11, 13). Debido a que, las esporas de las BAFEs se presentan en mayor concentración que las de *Clostridium* y se encuentran presentes en aguas de superficie permiten el cálculo de la eficiencia del tratamiento, por lo cual han sido consideradas como un buen indicador de la calidad del agua potable ⁽¹¹⁾.

Otra razón para usar esporas bacterianas como sustitutos es la metodología relativamente simple disponible para su detección en muestras ambientales ⁽¹¹⁾. Además, pueden ser usadas para evaluar procesos de remoción física como la coagulación y la clarificación del agua, así como, para determinar la integridad física de los sistemas de distribución de agua potable que puede haber sido

comprometida a través de interrupciones del suministro o procedimientos de mantenimiento ⁽³⁾.

Características de las endosporas

La spora bacteriana es una estructura altamente deshidratada y rígida, que es formada por algunos géneros bacterianos, como los son *Bacillus* y *Clostridium*; pueden ser elipsoidales a esféricas y que miden aproximadamente 0.5 x 1.0 x 2.0 µm. Así mismo, muestran una marcada resistencia a medios ambientes adversos como calor, desecación, congelación, agentes químicos y radiaciones ⁽¹⁷⁾.

La alta resistencia de las endosporas es debida principalmente a dos factores: 1) la síntesis de ADN-proteico encargado de reparar los procesos celulares, se activa durante la germinación y 2) el ADN y los contenidos citoplasmáticos (región central o core) son rodeados por dos capas de la membrana citoplásmica (Figura 2). Asimismo, estas dos capas están rodeadas por la corteza, la cual a su vez se encuentra cubierta de una capa proteica semejante a la queratina que la protegen de la lisis. ^(14, 15).

El centro contiene dipicolinato de calcio, mismo que aunado al alto estado de deshidratación del protoplasma, es responsable de la marcada resistencia que muestra la spora al calor y a la desecación ^(17, 18, 19). Las esporas son estructuras ovales o esféricas que pueden encontrarse tanto intracelularmente, como fuera de la bacteria (célula vegetativa).

Por su localización dentro de la célula pueden ser centrales, subterminales o terminales y presentan además variación en su tamaño (Figura 3). Su localización dentro de la célula sirve como descriptor taxonómico para la identificación de algunas especies de los géneros capaces de esporular ⁽¹⁸⁾.

Los miembros del género *Bacillus* son las más utilizadas como agentes antagonistas por sus características de omnipresencia en suelos, tolerancia a altas temperaturas y formación de esporas resistentes, este grupo de microorganismos juegan un papel importante en bioensayo, así como, indicadores para la monitorización de la eficacia de desinfectantes y procedimientos de esterilización (p. ej., *Bacillus stearothermophilus*)⁽¹⁹⁾.

Figura 2. Sección transversal de una espora de *B. subtilis*⁽¹²⁾

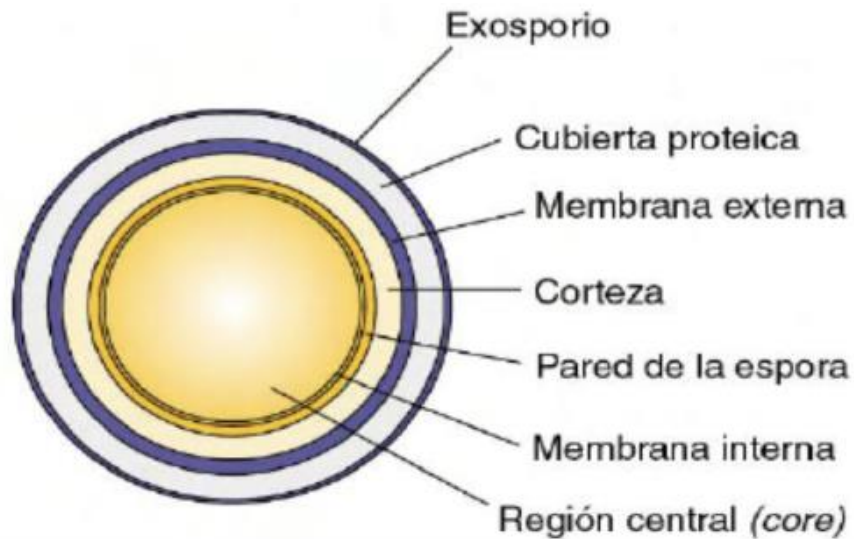


Figura 3. Localización de la espora dentro de la célula (central, subterminal y terminal)⁽²⁰⁾



Detección de BAFEs

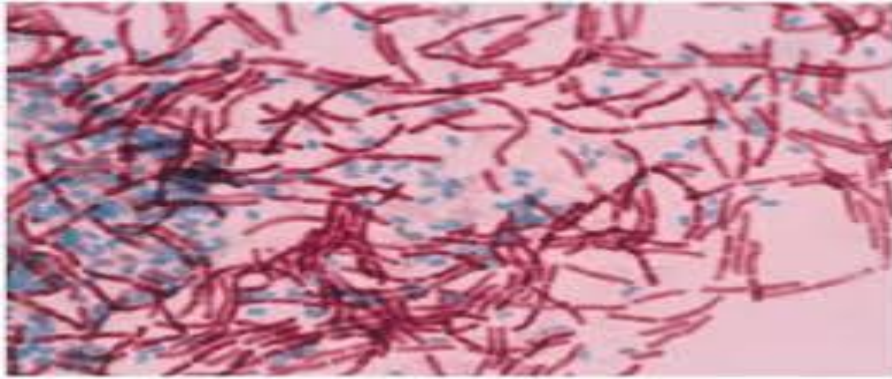
Para realizar su detección, aislamiento y caracterización, se necesita eliminar a las células vegetativas por medio de tratamiento con calor, el método consiste esencialmente en pasteurizar la muestra (60 °C durante 20 min). Las esporas que queden vivas son analizadas después de pasarlas a través de un filtro de membrana, el cual, se inocularon en agar nutritivo suplementado con azul de bromotimol al 0,005%, mismo que, permite la germinación de esporas y el crecimiento de colonias bacterianas, con esto se evalúa la eficiencia de la cloración ^(11, 13, 16).

La detección de las bacterias aerobias formadoras de endosporas se realiza mediante la tinción de Gram en primera instancia, ya que estas son Gram (+) y se deben teñir a partir de cultivos jóvenes. Para el género *Bacillus* es importante destacar una característica que la diferencia de otros microorganismos aerobios es la capacidad de producir estas esporas en presencia de oxígeno ⁽²¹⁾.

Si bien, las esporas no se visualizan con facilidad en todos los frotis que contienen especies de *Bacillus*, su presencia confirma la identificación del género ⁽²²⁾. Las endosporas no pueden ser teñidas por métodos comunes, como la tinción simple o de Gram porque estos colorantes no pueden atravesar la pared. Para teñirlas se utiliza la tinción de Schaeffer-Fulton, en la que es necesario aplicar calor para ayudar la entrada del colorante primario (verde de malaquita) y una vez que este ha penetrado, al lavar la preparación y agregar un colorante de contraste (safranina), las células vegetativas se tiñen de rojo y la espora permanece teñida de verde ^(23, 24).

Figura 4. Tinción de Schaeffer-Fulton para detección de esporas

(24)



Antes de realizar la tinción de esporas, es necesario eliminar las células vegetativas que estén presentes. Este proceso se hace mediante calor húmedo a 100 °C por un período de 10 minutos ⁽²⁴⁾.

Aislamiento

Los miembros del género *Bacillus* aislados en muestras suelen crecer bien y esporular en agar sangre de carnero al 5%, agar chocolate, agar soya Trypticaseína, medios para hemocultivos y caldos nutritivos usados con frecuencia; incubados a 37 °C por 24 horas en condiciones aerobias. La esporulación puede ser estimulada mediante el subcultivo en agar nutritivo con suplemento de $MnSO_4$ (concentración final de 5 $\mu g/mL$) e incubación ^(20, 22, 25).

Caracterización

Los microorganismos que son capaces de formar endosporas aeróbicas se reproducen y esporulan bien en agar sangre de carnero al 5%, donde se distingue principalmente a *B. anthracis* por no presentar hemólisis de la sangre y presentar la forma denominada cabeza de medusa. Por otra parte *B. cereus* producen

lecitinasa en el agar yema de huevo, hidrolizan la caseína, el almidón y la gelatina. La mayoría de las cepas de *Bacillus* reducen el nitrato a nitrito, ninguna produce indol^(21, 26). Además de estas pruebas de identificación existen otras que han sido propuestas por diversos autores y se concentran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Pruebas de identificación para las especies de *Bacillus* propuestas por diversos autores

Autores	Tipo de Prueba
Morfología macro y microscópica	
Pérez ⁽²⁰⁾ , Forbes ⁽²²⁾ , De Vos ⁽²⁶⁾ , Logan ⁽²⁷⁾	Tamaño celular Movilidad (Presencia de flagelos) Tamaño, forma y posición de la espora Diámetro de crecimiento en determinado periodo Textura, color, elevación, forma de las colonias
Pruebas bioquímicas	
Pérez ⁽²⁰⁾ , Forbes ⁽²²⁾ , De Vos ⁽²⁶⁾ , Logan ⁽²⁷⁾ , McFaddin ⁽²⁸⁾ , Reva ⁽²⁹⁾ , Parvathi ⁽³⁰⁾ , Erem ⁽³¹⁾	Producción de ácido a partir de carbohidratos: glucosa, xilosa, manitol, manosa, arabinosa, galactosa, inulina, glucógeno, glicerol, salicina, almidón, rafinosa, fructosa, sorbitol. O/F a partir de glucosa Rojo de metilo, Voges-Proskauer Producción de Indol Utilización de citrato TSI (agar triple azúcar hierro) Movilidad (SIM, MIO) Reducción de nitratos a nitritos Producción de fenilalanina desaminasa Hidrólisis de almidón Hidrólisis de esculina Producción de ureasa
Pruebas especiales	
Forbes ⁽²²⁾ , De Vos ⁽²⁶⁾ , McFaddin ⁽²⁸⁾ , Reva ⁽²⁹⁾ , Parvathi ⁽³⁰⁾	Catalasa y oxidasa β -hemólisis Utilización de la lisozima Licuefacción de la gelatina Hidrólisis de caseína Producción de lecitinasa
Pérez ⁽²⁰⁾ , Logan ⁽²⁷⁾ , Parvathi ⁽³⁰⁾	Sensibilidad a Antibióticos
	Susceptibilidad de <i>Bacillus anthracis</i> a la penicilina Resistencia de cepas de <i>Bacillus pumilus</i> a la polimixina B.
Pérez ⁽²⁰⁾ , Forbes ⁽²²⁾	Características moleculares
	PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) Análisis filogenéticos y secuencia de ADN
Pérez ⁽²⁰⁾ , Logan ⁽²⁷⁾	Diagnóstico serológico
	ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)

Evaluación de la calidad del agua dentro de la FES Zaragoza

La urbanización desordenada ha llevado a un aumento en la contaminación del agua por medio de sustancias químicas, desechos orgánicos y basura entre otras. Esta problemática sobre la degradación en la calidad del agua potable en México no es reciente, ya que desde la década de los 90s las autoridades sanitarias determinaron el uso de cloro como medida preventiva ante la epidemia del cólera que se hizo presente en América Latina ⁽³²⁾.

Ante tal situación las autoridades de la FES Zaragoza implementaron el programa de servicio social “Evaluación microbiológica del agua potable utilizada por la comunidad de la FES Zaragoza y Clínicas Multidisciplinarias”, comenzando con los campus y extendiéndose posteriormente a las clínicas multidisciplinarias con la finalidad de evaluar la calidad microbiológica de la misma. Asimismo se han realizado algunos estudios para la detección de patógenos como *Aeromonas* spp, tanto en la entidad como sus Clínicas de Atención para la Salud, donde se encontró una alta frecuencia de *A. hydrophila* y se determinaron los factores de virulencia en las cepas aisladas, lo que sugirió que las aguas contaminadas con estos microorganismos tienen el riesgo potencial de producir infecciones en el humano ⁽³³⁾.

Planteamiento del problema

La valoración de la calidad microbiológica del agua destinada al consumo humano se lleva a cabo mediante el conteo de bacterias o grupos de bacterias indicadoras de contaminación fecal. No obstante, el Comité del Standard Methods aprobó a las endosporas aeróbicas (EA) como indicador de la calidad del agua desde el 2007⁽³⁾, sin embargo, hasta el momento es muy poco empleado.

La Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, en el Campus II dentro del programa de servicio social (clave 2009-12/48-1865), ha implementado en el Laboratorio de Microbiología Farmacéutica L-313, el análisis microbiológico a muestras de agua, y determina el número más probable (NMP) de coliformes totales por la técnica de fermentación en tubos múltiples y el recuento de bacterias mesófilas aerobias mediante la técnica de vaciado en placa.

Si bien, las BAFEs se mantienen viables durante la cloración, los coliformes son inactivados con este tratamiento. Entonces, factores como: la variabilidad en la supervivencia entre estos grupos de indicadores de contaminación hace que, sea importante la determinación de las BAFEs.

Es por esta razón, que se pretende aislar y caracterizar a las Bacterias Aeróbicas Formadoras de Endosporas (BAFEs) de muestras de agua potable provenientes de la FES Zaragoza y sus Clínicas Universitarias de Atención a la Salud (CUAS), con el propósito de determinar su diversidad y frecuencia, así como, la presencia de las BAFEs en relación con los resultados obtenidos del programa de servicio social "Evaluación microbiológica del agua potable utilizada por la comunidad de la FES Zaragoza y Clínicas Multidisciplinarias" en el mismo periodo de la presente investigación. Con base en los resultados obtenidos, se pretende proponer a las endosporas aeróbicas (EA) como una técnica alternativa o adicional a la determinación de coliformes totales.

Hipótesis

Después de aplicar el tratamiento térmico a las muestras de agua, se espera aislar a las bacterias aeróbicas formadoras de endosporas. La diversidad y frecuencia de las BAFEs será igual en las cisternas y en los grifos, pero se presentarán con mayor recurrencia en los tanques hidroneumáticos, debido a que el agua de los tanques permanece mayor tiempo sin movimiento. La presencia de las BAFEs con relación a la potabilidad del agua será independiente pues, las esporas son estructuras resistentes a condiciones como: temperatura extrema y agentes oxidantes usados en la potabilidad del agua.

Objetivos

Objetivo General

Aislar y caracterizar las bacterias aerobias formadoras de endosporas (BAFEs) de 100 muestras de agua potable provenientes de la FES Zaragoza (Campus I, II) y sus siete Clínicas Universitarias de Atención a la Salud (Estado de México, Tamaulipas, Los Reyes, Reforma, Nezahualcóyotl, Benito Juárez, Aurora y Zaragoza), con el fin de determinar su diversidad y frecuencia, así como, la relación a la potabilidad del agua con la presencia de las BAFEs.

Objetivos Particulares

Aislar y caracterizar los microorganismos formadores de esporas aeróbicas presentes en 100 muestras de agua potable, provenientes de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, y sus siete Clínicas Universitarias de Atención a la Salud (CUAS).

Determinar la distribución y frecuencia de las BAFEs caracterizadas de las 100 muestras de agua.

Relacionar la presencia de las BAFEs con los resultados de potabilidad del agua reportados por el programa de servicio social, durante el mismo periodo de muestreo.

Diseño de investigación

Se realizó un estudio descriptivo, prolectivo y longitudinal a 100 muestras de agua provenientes de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza Campus I y II, y de las Clínicas Universitarias de Atención a la Salud (CUAS), durante un el periodo comprendido de 19 de mayo de 2015 a 19 de junio de 2016.

Población de estudio

Se analizaron un total de 100 muestras de agua provenientes de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza Campus I y II, así como, de las Clínicas Universitarias de Atención a la Salud (Estado de México, Tamaulipas, Aurora, Benito Juárez, Reforma, Los Reyes, Nezahualcóyotl y Zaragoza). De cada campus y cada clínica se recolectaron 5 muestras de cisterna y 5 de grifo o tanque hidroneumático.

Criterios de inclusión

Fueron incluidas todas las muestras de agua potable de 150 mL, colectadas en forma aséptica en matraces Erlenmeyer con tapón de algodón y gasas estériles, con 0.1 mL de tiosulfato de sodio al 10%; provenientes de cisternas y grifos o tanques hidroneumáticos, transportadas adecuadamente al laboratorio de Microbiología Farmacéutica, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Campus II y analizadas dentro de las primeras dos horas después del muestreo.

Criterios de exclusión

Fueron excluidas todas aquellas muestras de agua potable trasladadas de manera inadecuada o sin etiquetar y analizadas después de las dos horas de haber sido tomadas.

Análisis Estadístico

Los datos de potabilidad de agua y microbiológicos fueron organizados en una hoja de cálculo de Excel. Se representó en gráficos de barras y circulares las frecuencias relativas de cada tipo de aislamiento con respecto a los lugares y sitios de muestreo. Se llevó a cabo la prueba de Ji-Cuadrada de independencia para determinar la asociación de la potabilidad con los resultados de los aislamientos de las BAFEs.

Material y procedimiento

Material

Matraces Erlenmeyer de 500 mL con de tiosulfato y tapón de algodón

Cajas de Petri con Agar Soya Tripticaseína (AST), Difco. (ver Anexo I)

Tubos de ensaye de 15 x 180 mm con AST Difco. (ver Anexo I)

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm con caldos rojo de fenol Bioxon. (ver Anexo II)

Tubos de ensaye de 13 x 100mm con caldo nitrato Bioxon. (ver Anexo II)

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm con agar citrato de Simmons Bioxon. (ver Anexo II)

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm con caldo RMVP Bioxon. (ver Anexo II)

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm con caldo nutritivo Bioxon suplementado para Voges Proskauer. (ver Anexo II)

Cajas de Petri con agar bilis esculina Difco. (ver Anexo II)

Tubos de ensaye con agar TSI Bioxon. (ver Anexo II)

Tubos de ensaye de 15 x 180 mm con Medio OF de Hugh-Leifson Bioxon. (ver Anexo II)

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm con medio MIO Difco. (ver Anexo II)

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm con caldo urea de Stuart Dibico. (ver Anexo II)

Cajas de Petri con agar almidón, base Difco. (ver Anexo II)

Cajas de Petri con agar yema de huevo. (ver Anexo III)

Cajas de Petri con agar leche descremada al 10% (ver Anexo III)

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm con gelatina nutritiva Dibico (ver Anexo III)

Cajas de Petri con Agar Sangre de Carnero (ASC) al 5%, base Bioxon (ver Anexo III)

Cepa de *Bacillus subtilis*

Reactivos para las tinciones de: Gram modificada por Hucker, tinción de Schaeffer-Fulton Ziehl-Neelsen (ver Anexo IV).

Balanza granataria de 2600 g OHAUS

Olla de presión de 21 litros Presto Steele

Incubadora a 37 °C RIOSSA

Refrigerador marca Easy

Microscopio óptico marca Zeizz

Procedimiento

Toma de muestras

Se tomaron 100 muestras de agua provenientes de los siguientes lugares de muestreo: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (Campus I y II), y de sus ocho Clínicas Universitarias de Atención a la Salud: una dentro del Campus I (Clínica Zaragoza), otra en el Municipio de Los Reyes (Clínica Los Reyes) y seis más dentro del municipio de Ciudad Nezahualcóyotl (Estado de México, Tamaulipas, Reforma, Nezahualcóyotl, Benito Juárez y Aurora).

Los puntos de muestreo también, denominados sitios de muestreo fueron clasificados en dos: la primera, proveniente del suministro primario de agua (cisterna) y la segunda de puntos de distribución secundarios (grifos o tanques hidroneumáticos).

Para la toma de muestra se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapón de algodón y gasa estéril con 0.1 mL de tiosulfato de sodio al 10% (ver Anexo I).

Para los grifos y tanques hidroneumáticos, en primer lugar, se procedió a limpiar perfectamente con una torunda de algodón (impregnada con etanol absoluto) la boca de la llave (salida de agua), tallando hasta que dejara de desprender suciedad u óxido. Posteriormente, se purgó la tubería al dejar correr el agua durante un minuto y finalmente, se recolectó en el matraz aproximadamente 150 mL agua, cuidando de no contaminar la boca del matraz.

En el caso de las cisternas, la toma de muestra fue por inmersión del matraz Erlenmeyer a una profundidad aproximada de 50 cm, lejos de las orillas y de los bordes de la cisterna, y de existir sedimento se tuvo cuidado de no suspenderlos al introducir y sacar los matraces.

Cada uno de los matraces Erlenmeyer fueron identificados con los datos del lugar y punto de muestreo, fecha y hora de muestreo, y posteriormente trasladados al laboratorio a una temperatura entre 5 y 15 °C.

Eliminación de células vegetativas

Las muestras de agua fueron colocadas dentro del baño de maría a 70 °C por 5 minutos; la temperatura fue revisada constantemente, con la finalidad de que no variara; además de agitación suave para no derramar la muestra. Transcurrido el tiempo de estas, se retiraron del baño colocándolas sobre la superficie con el propósito de enfriarlas. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, estaban listas para su inoculación.

Aislamiento de BAFEs por la técnica de extendido en placa

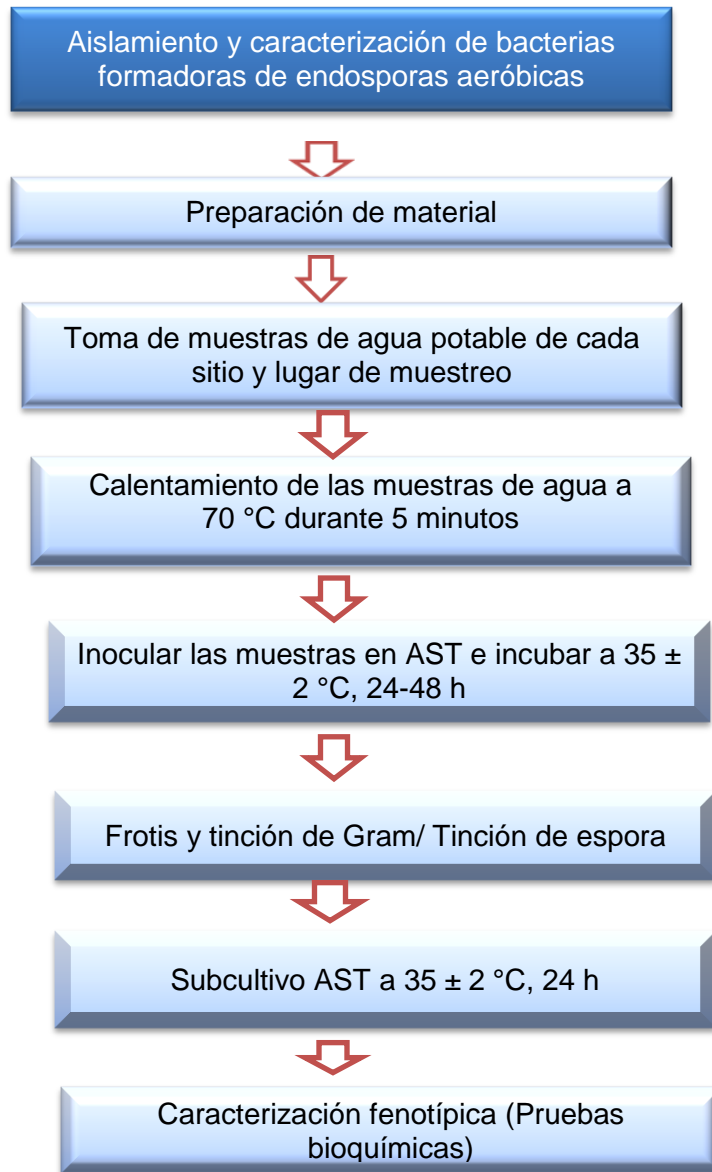
Cada una de las muestras del punto anterior se inocularon por duplicado en placas con Agar Soya Trypticaseína (AST), por medio de la técnica de extendido en placa, la cual, consistió en tomar 1 mL de muestra (con pipeta estéril) y extenderla por toda la superficie del medio de AST hasta cubrirla completamente. Antes de incubar las placas a 35 ± 2 °C de 24 a 48 horas, se dejó secar para evitar derrames o contaminación.

Las placas de AST que desarrollaron crecimiento colonial, les fue realizado su descripción macroscópica y microscópica (Gram modificada por Hucker y examinadas con un objetivo de inmersión, ver Anexo IV). La tinción Schaeffer-Fulton (Anexo IV) para la demostración de esporas, les fue practicado a los bacilos grampositivos, y de estos los que presentaron esporas fueron subcultivados en tubos con AST y sembrados cada mes a fin de obtener cultivos puros.

Caracterización

Se realizaron pruebas bioquímicas a cada una de las colonias de bacilos grampositivos con presencia de espora, provenientes del subcultivo de AST. A la par fue inoculado un control positivo de *B. subtilis* (Ver Anexos II y III).

Diagrama de flujo



Resultados

Es importante aclarar que, para fines prácticos de este trabajo, en adelante se referirá a Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (Campus I y II) como FES Zaragoza y el respectivo campus, mientras que, para las diferentes Clínicas Universitarias de Atención a la Salud, solo se identificaran por la inicial de la palabra clínica (C) y el respectivo nombre de cada una de ellas.

1. Aislamiento de bacterias aeróbicas formadoras de endosporas (BAFEs)

Al seguir el procedimiento para el aislamiento de BAFEs en el agua empleada por la FES Zaragoza (Campus I y II), y sus Clínicas Universitarias de Atención a la Salud, se obtuvieron los siguientes resultados:

De las 100 muestras analizadas, sólo 29 de éstas se aislaron BAFEs (Cuadro 2). La identificación microscópica mostró bacilos grampositivos (Figura 5), crecidos en condiciones aeróbicas, que presentaron esporas con la tinción de Schaeffer-Fulton (Figura 6). En las 71 muestras restantes, se obtuvieron bacilos grampositivos no formadoras de endosporas (Figura 7) así como, la presencia de cocos grampositivos (Figura 8), ambos géneros no fueron caracterizados, por no ser parte de los objetivos de la investigación.

Figura 5. Frotis con tinción Gram modificada por Hucker de una especie de *Bacillus*.



Figura 6. Frotis con tinción de Schaeffer-Fulton de una especie de *Bacillus*.

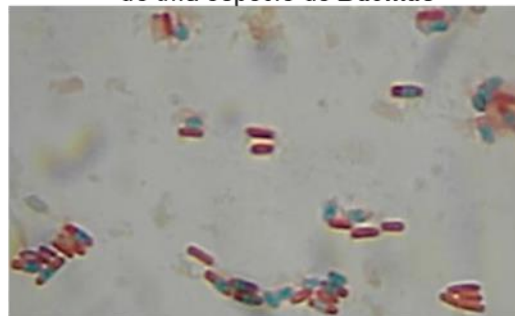


Figura 7. Frotis con tinción Gram de una especie de *Bacillus* no esporulado

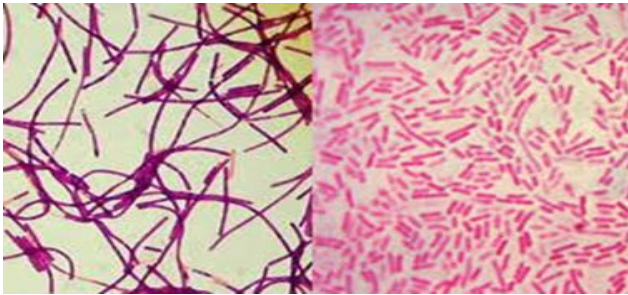
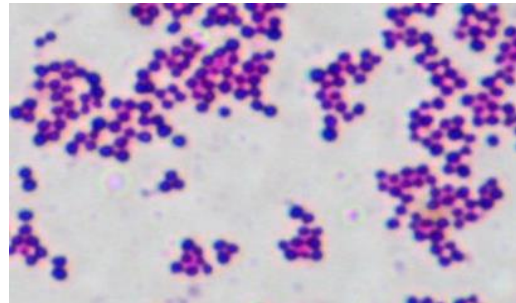


Figura 8. Frotis con tinción Gram de una especie de cocos grampositivos



2. Frecuencia y caracterización de las BAFEs

En cuanto a la frecuencia por lugar y sitio de muestreo (Cuadro 2) se encontró que: en la C. Reforma las BAFEs estuvieron presentes en 7 de las 8 muestras analizadas, lo que representó el 87.5%, mientras que para la C. Benito Juárez fue de 70% (7 de 10 muestras), seguidas de FES Zaragoza CII (4 de 10, 40%), C. Los Reyes (3 de 8, 37.5%) y C. Aurora (3 de 10, 30%). En ninguna ocasión la C. Netzahualcóyotl presentó aislamiento, el resto de las clínicas contaron con menos del 20%.

La incidencia de aislamientos en cada punto de muestreo se exhibe en las Figuras 9, 10 y 11. En la Figura 9 se observa que el 27.5% de las muestras analizadas provenientes de las cisternas tuvieron la presencia de BAFEs (12 de 39), los grifos contribuyeron con el 30.7% de los aislamientos (Figura 10) y finalmente el 30 % corresponden a los tanques hidroneumáticos (Figura 11).

Cuadro 2. Frecuencia de aislamientos de BAFEs para cada lugar y sitio de muestreo en 100 muestras de agua analizada

Lugar de muestreo	Número de aislamientos positivos de BAFEs				Número de aislamientos negativos de BAFEs				Número muestras analizadas
	Sitio de muestreo			Muestras positivas N (%)	Sitio de muestreo			Muestras negativas N (%)	
	Cisterna	Grifo	T.H		Cisterna	Grifo	T.H		
C. Estado México	1	1	----	2 (16.7)	5	5	----	10 (83.3)	12
C. Tamaulipas	0	1	----	1 (8.3)	6	5	----	11 (91.7)	12
C. Aurora	2	1	----	3 (30)	3	4	----	7 (70)	10
C. Benito Juárez	4	3	----	7 (58.3)	1	2	----	3 (41.7)	10
C. Reforma	3	4	----	7 (87.5)	1	0	----	1 (12.5)	8
C. Los Reyes	2	1	----	3 (37.5)	3	2	----	5 (62.5)	8
C. Nezahualcóyotl	0	0	----	0 (0.0)	5	5	----	10 (100)	10
C. Zaragoza	0	1	----	1 (10)	5	4	----	9 (90)	10
FES Zaragoza Campus-II	2	----	2	4 (40)	3	----	3	6 (60)	10
FES Zaragoza Campus-I	0	----	1	1 (10)	5	----	4	9 (90)	10
Aislamientos por sitio de muestreo	14	12	3	29	37	27	7	71	100

Nota 1. T.H = Tanque hidroneumático.

Nota 2. Las muestras de FES Zaragoza CI y CII fueron tomadas de cisterna y tanque hidroneumático, por lo que, en esa columna no hay valores para los otros lugares de muestreo (----).

Figura 9. Gráfica de pastel, porcentajes de la incidencia de BAFEs en muestras de agua de cisternas

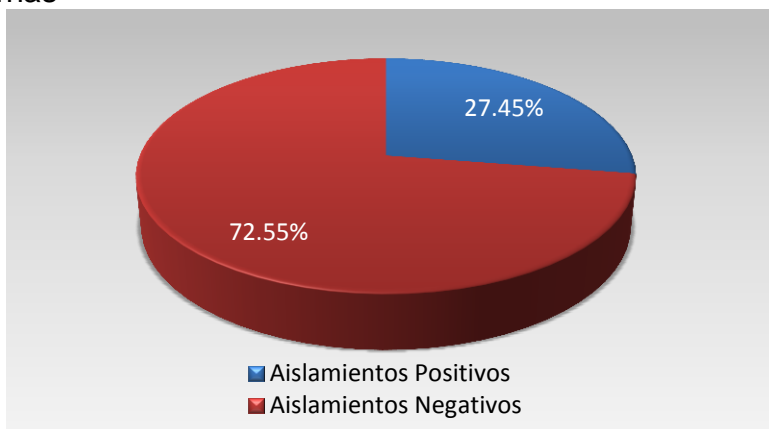


Figura 10. Gráfica de pastel, porcentajes de incidencia de BAFEs en muestras de agua de grifos

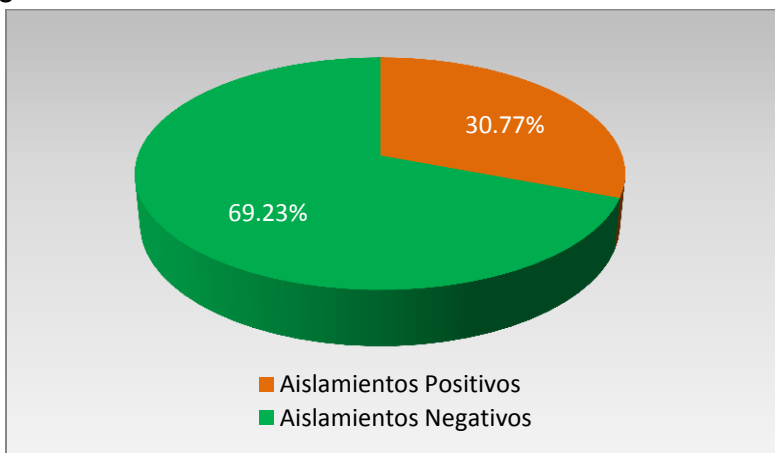
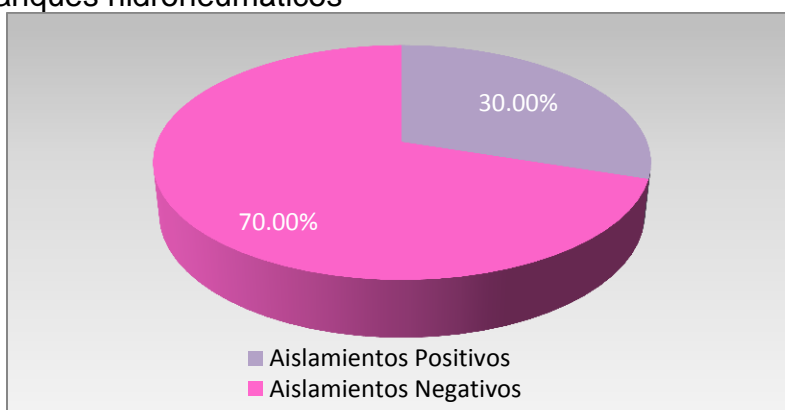


Figura 11. Gráfica de pastel, porcentajes de la incidencia de BAFEs en muestras de agua de tanques hidroneumáticos



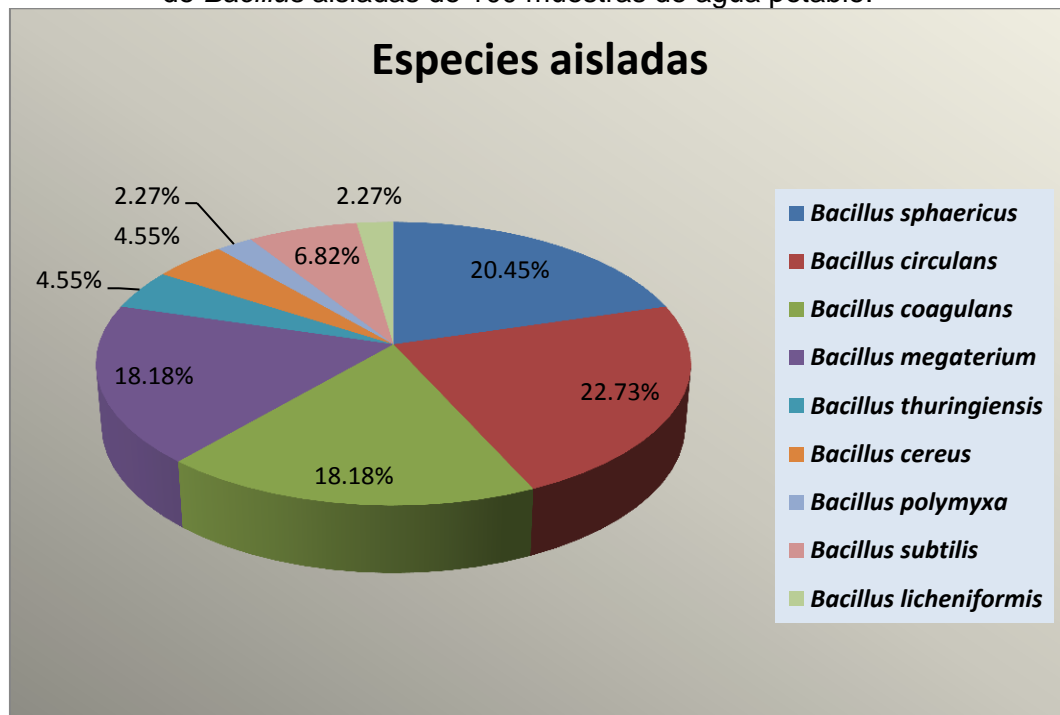
En relación, a la frecuencia de aislamientos por lugar de muestreo (Cuadro 3), se encontró que el 60 % del total los aislamientos provenían de dos clínicas, es decir, el 39% de la C. Benito Juárez con 17 cepas (10 de la cisterna y 7 del grifo) y el 21% de la C. Reforma con 9 cepas (4 de cisterna y 5 del grifo). Se observa en el mismo cuadro, que el resto de las clínicas contribuyeron cada una con menos del 10 %, excepto la C. Netzahualcóyotl que no presentó casos positivos de BAFEs.

El Cuadro 3, evidencia el número de máximos aislamientos para el segundo y tercer muestreo, con 13 y 15 cepas respectivamente.

Cuadro 3. Frecuencia de aislamientos de BAFEs por lugar y sitio de muestreo							
Lugar	Sitio	Número de muestreo					Total
		1	2	3	4	5	
C. Estado de México	Cisterna	0	0	0	1	0	1
	Grifo	0	0	1	0	0	1
C. Tamaulipas	Cisterna	0	0	0	0	0	0
	Grifo	0	0	1	0	0	1
C. Aurora	Cisterna	1	0	1	0	0	2
	Grifo	0	0	2	0	0	2
C. Benito Juárez	Cisterna	2	3	3	0	2	10
	Grifo	1	4	2	0	0	7
C. Los Reyes	Cisterna	0	1	1	0	0	2
	Grifo	0	1	0	0	0	1
C. Reforma	Cisterna	0	0	1	1	2	4
	Grifo	0	2	1	1	1	5
C. Netzahualcóyotl	Cisterna	0	0	0	0	0	0
	Grifo	0	0	0	0	0	0
C. Zaragoza	Cisterna	0	0	0	0	0	0
	Grifo	0	0	0	0	1	1
FES Zaragoza Campus I	Cisterna	0	0	0	0	0	0
	Tanque	0	0	1	0	0	1
FES Zaragoza Campus II	Cisterna	2	2	0	0	0	4
	Tanque	1	0	1	0	0	2
	Total	7	13	15	3	6	44

De las 29 muestras que presentaron BAFEs, se aislaron 44 cepas del género *Bacillus* (Cuadro 4). De las 44 (Figura 12) se caracterizaron 9 especies: destaca en primer lugar, la presencia de *B. circulans* en 10 ocasiones (22.73%), y de estas 5 procedían de la C. Benito Juárez. En segundo lugar; *B. sphaericus* en 9 (20.45%), en tercero; *B. megaterium* y *B. coagulans* en 8 (18.18% cada una). Finalmente, *B. thuringiensis* y *B. cereus* en 2 ocasiones (4.55% cada uno), *B. subtilis* en 3 (6.82%), *B. polymyxa* y *B. licheniformis* (2.27% cada una) fueron aisladas en un solo muestreo.

Figura 12. Gráfica de pastel de la variación porcentual de las especies de *Bacillus* aisladas de 100 muestras de agua potable.

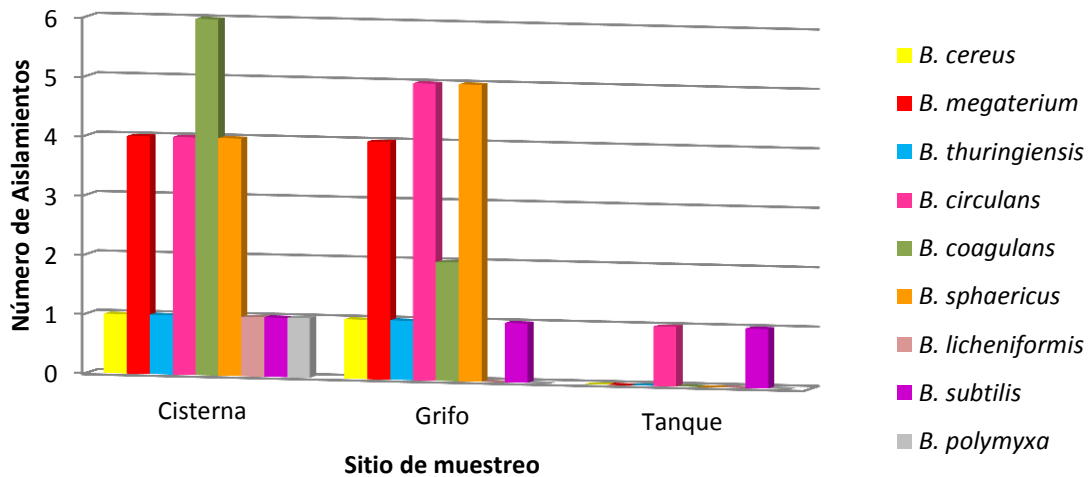


La distribución de las diferentes BAFEs por sitio de muestreo (cisterna, grifo y tanque hidroneumático) se presenta en la Figura 13. Las especies con mayor predominio fueron: *B. coagulans*; *B. sphaericus*, *B. megaterium* y *B. circulans*, cabe destacar, que las tres últimas fueron aisladas de cisternas y de los grifos, así también, estuvieron presentes en una ocasión más en los grifos que en las

cisternas (5 para los grifos y 4 para las cisternas). *B. subtilis* y *B. circulans*, se encontraron en los tres sitios de muestreo.

El Cuadro 4 contiene la frecuencia de las especies de *Bacillus* en los diferentes lugares de muestreo. De las 10 ocasiones que fue aislado *B. circulans*, 5 proviene de la C. Benito Juárez, lo que equivale al 29% de todos los aislamientos de este lugar. La otra especie de BAFEs con mayor incidencia fue *B. sphaericus* con igual frecuencia para C. Benito Juárez (29%) y 44.5% para C. Reforma. Se observa que ambas clínicas presentaron las mismas especies de *Bacillus* con similar asiduidad. Cabe destacar que durante el periodo de análisis en dos ocasiones se identificó *B. cereus*, una en C. Juárez y la otra en C. Los Reyes. *B. subtilis* coincidió en una sola muestra de las C. Reforma y C. Los Reyes.

Figura 13. Gráfica de frecuencia de los aislamientos de *Bacillus* por sitio de muestreo



Cuadro 4. Frecuencia de BAFEs en las 100 muestras agua de los diferentes lugares de muestreo

Cepa identificada	Lugar de muestreo										Total N (%)
	Clínica Estado México	Clínica Tamaulipas	Clínica Aurora	Clínica Benito Juárez	Clínica Reforma	Clínica Los Reyes	Clínica Nezahualcóyotl	Clínica. Zaragoza	Campus I	Campus-II	
	N	N	N	N	N	N	N	N (%)	N (%)	N (%)	
<i>B. cereus</i>	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	2 (4.5)
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	1	1	-	-	1	-	3 (6.8)
<i>B. megaterium</i>	1	-	-	2	1	-	-	1	-	3	8(18.3)
<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	2 (4.5)
<i>B. circulans</i>	-	1	1	5	1	1	-	-	-	1	10 (23)
<i>B. coagulans</i>	1	-	3	2	1	-	-	-	-	1	8(18.3)
<i>B. sphaericus</i>	-	-	-	5	4	-	-	-	-	-	9(20.4)
<i>B. polymyxa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1 (2.3)
<i>B. licheniformis</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1 (2.3)
<i>Total</i>	2	1	4	17	9	3	0	1	1	6	44

La identificación de las BAFEs aisladas se realizó por medio de pruebas bioquímicas (Cuadro 5), las cuales permitieron caracterizar 9 especies del género *Bacillus*.

Cuadro 5. Caracterización bioquímica de las cepas de *Bacillus* aislados

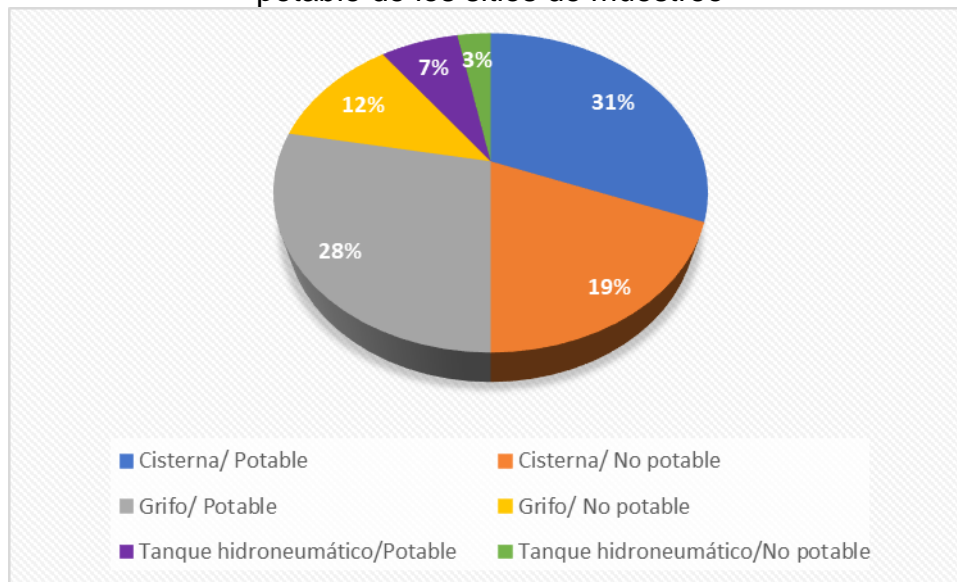
Prueba	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Reducción nitratos	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	+	+	-	+	+	-	+	-	-
RM/VP	+/-	+/-	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-
O/F glucosa	O/F	O	O	O/F	O/F	F	O/F	O	O/F
TSI	K/A	K/K	K/K	K/A	K/A/H ₂ S	A/A	K/A	K/K	K/A
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FD	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis almidón	+	-	+	+	+	-	+	-	+
Hidrólisis esculina	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Ureasa	-	-	-	-	+	+	-	+	-
Ácido de glucosa	A	A	A	A+	A/G	A	A+	A	A
Xilosa	A+	-	-	-	A	-	-	A+	-
Manitol	-	-	-	-	A/G	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	A/G+	-	-	-	-
Manosa	A	-	A	A	A/G	A	A	-	A
Arabinosa	-	-	-	A+	A/G+	-	A+	-	-
Salicina	A	-	A	A+	A/G	A+	A+	-	A
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Posición espora	central	central	subterminal	central	central	subterminal	central	subterminal	subterminal
Pruebas especiales									
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hemólisis β	+	+	-	+	-	-	+	-	+
Lecitinasa	+	-	-	-	+	-	-	-	+
Hidrólisis caseína	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LG	+	-	+	+	+	-	+	-	+
Cepa identificada	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i> *	<i>B. polymyxa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. sphaericus</i>	<i>B. circulans</i>

RMVP, rojo de metilo/Voges-Proskauer; TSI, tripe azúcar, FD; Fenilalanina desaminasa, LG; licuefacción de gelatina, +; positivo; -, negativo; O, oxidación; F, fermentación; O/F, oxidación/fermentación; K/K, alcalino/alcalino; K/A, alcalino/ácido; A/A, ácido/ácido; A, producción de ácido; A+, producción de ácido después de 24 horas; A/G, producción de ácido y gas; * requiere identificación de cristal proteínico.

3. Potabilidad del agua

Durante la determinación del número más probable (NMP) de coliformes totales por la técnica de fermentación en tubos múltiples se encontró que, el 66% de las muestras no rebasaron los límites permisibles establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, "Salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización" ⁽³⁴⁾; por lo que se consideran Potables (Cuadro 6), distribuido de la siguiente forma: cisternas 31%, grifos 28% y tanques hidroneumáticos 7%. El resto de las muestras permanecieron microbiológicamente contaminadas (Figura 14).

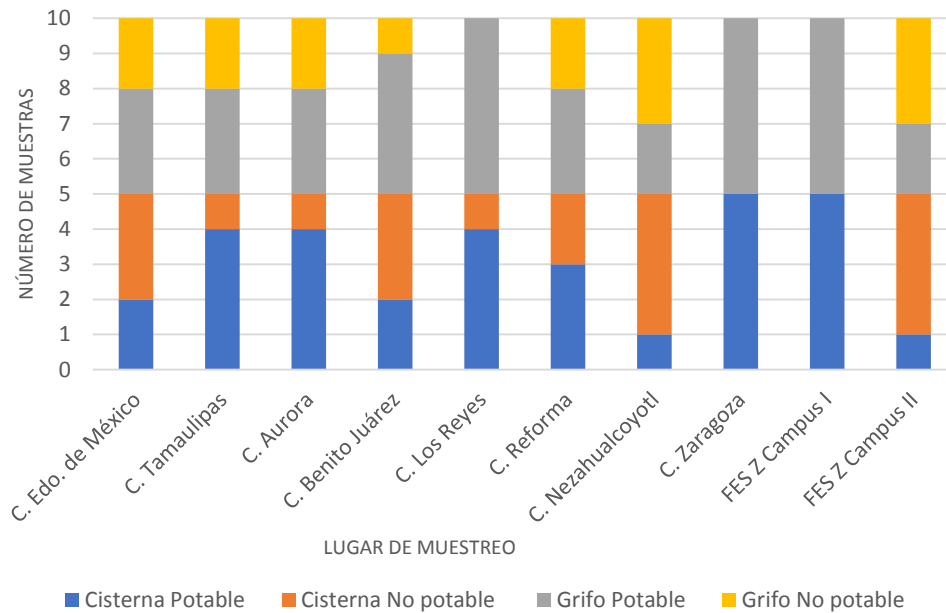
Figura 14. Gráfica de pastel del porcentaje de muestras de agua potable de los sitios de muestreo



La figura 15, presenta la incidencia la potabilidad del agua por lugar y sitio de muestreo, se puede apreciar que el 100% de las muestras de la cisterna y el grifo de la C. Zaragoza y la FES Zaragoza CI fueron Potables. Contrariamente para C. Nezahualcóyotl y FES Zaragoza CII, el agua de la cisterna fue "No potable" en un 80% de los casos y un 60% en los grifos.

Para la cisterna de la C. Los Reyes, C. Aurora y C. Tamaulipas fue del 80% cada una, por lo que se refiere a la C. Edo. de México y C. Benito Juárez este represento el 60% de las muestras.

Figura 15. Gráfico de barras de la incidencia la potabilidad del agua por lugar y sitio de muestreo



4. Presencia de BAFEs en relación con la potabilidad del agua

Las figuras 16 y 17 muestran la distribución de los *Bacillus* en relación con la potabilidad del agua por lugar y sitio de muestreo. En ambas figuras, a primera vista, destaca la ausencia de BAFEs en la C. Netzahualcóyotl, aun cuando las muestras de cisterna (80%) y del grifo (60%) fueran No potable. El número de aislamientos de BAFEs para la C. Benito Juárez y C. Reforma tuvo un comportamiento inusual, ya que, aunque el 60% de las muestras (6 de 10) fueron Potables; estuvo presente la mayoría de las especies de *Bacillus* (Cuadro 4).

Figura 16. Gráfica de barras de la variación de la potabilidad y presencia de BAFEs en el agua de cisterna con respecto al lugar de muestreo

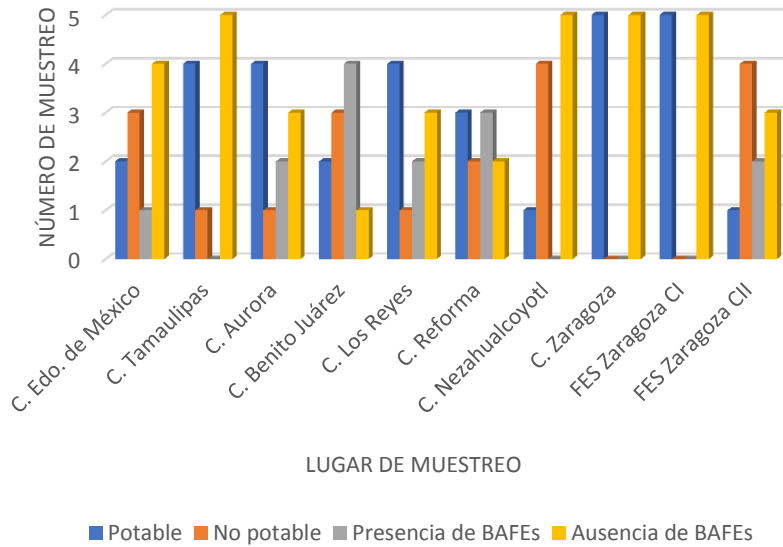
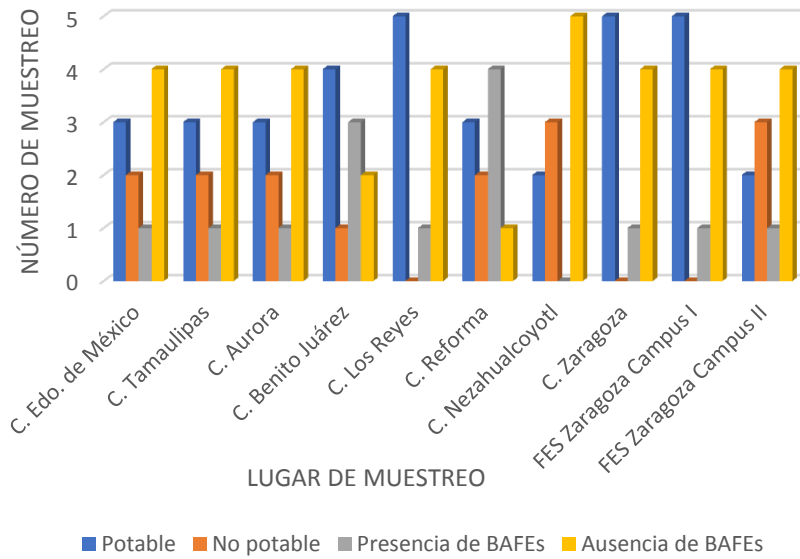


Figura 17. Gráfica de barras de la variación de la potabilidad y presencia de BAFEs en el agua del grifo y tanque hidroneumáticos con respecto al lugar de muestreo



Adicionalmente a la representación gráfica de la presencia de BAFEs y la potabilidad del agua, se realizó la prueba de Ji-Cuadrada de independencia para determinar la asociación entre potabilidad y presencia de BAFEs (Cuadro 6). Al hacer el análisis estadístico se encontró que las diferencias entre los dos grupos no son significativas ($p < 0.05$), es decir, la presencia de las BAFEs es independiente a la potabilidad del agua. Se puede observar del cuadro 6, que hay mayor proporción de la ausencia de BAFEs, sin embargo, los aislamientos cuando el agua es Potable fueron muy similares, que cuando es No potable (16 y 17, respectivamente).

Cuadro 6. Relación de la presencia de BAFEs con la potabilidad durante el periodo de muestreo.

Número de aislamientos de BAFEs	Potabilidad del agua			Ji cuadrada	
	Potable	No Potable	Total	$\alpha = 5\%$	
Presencia	15	14	29	Ji calculada =	3.74
Ausencia	51	20	71	Ji de tabla =	3.81
Total	66	34	100		

Discusión de resultados

Aislamiento y caracterización microbiológica

Uno de los aspectos importante en la calidad del agua, es la estructura de las comunidades bacterianas, tanto en número como en la diversidad de las especies presentes. El presente trabajo tomó como referencia a Rice y cols. ⁽³⁾, para aislar y caracterizar las endosporas de las bacterias aeróbicas presentes en muestras de agua potable almacenada en cisternas y tanques hidroneumáticos, con el fin de determinar la relación de la presencia de las BAFEs y la potabilidad del agua, ya que de acuerdo con Barbeau y colaboradores ⁽¹³⁾, son una potencial alternativa como indicadores de contaminación de agua.

En este estudio se aislaron 44 cepas de BAFEs; así también, bacilos grampositivos no formadores de endosporas (Figura 7) y de cocos grampositivos (Figura 8), aunque estos dos últimos no fue un resultado deseado. Es claro, que tanto los cocos como los bacilos pudieron resistir al tratamiento térmico realizado a las muestras de agua (70 °C por 5 minutos, de acuerdo con la metodología de Tortora ⁽²⁵⁾, por lo que, su presencia puede ser debida a tres factores: son cepas termófilas, el tiempo fue insuficiente o la temperatura no fue controlada por realizarse en un baño maría cuya fuente de calor fue un mechero Bunsen, y resulta difícil mantener la temperatura constante.

En cuanto a la insuficiencia de tiempo de tratamiento térmico en las muestras; Verhille ⁽³⁵⁾ ha propuesto, que la duración sea de 15 minutos a una temperatura de 70 a 75 °C, pues se puede tener una mayor eficiencia en la eliminación de células vegetativas.

Uno de los objetivos de este estudio, fue aislar a las bacterias aeróbicas formadoras de endosporas presentes en los sistemas de almacenamiento de agua, para esto se utilizó el medio en aislamiento en placa. Cartier ⁽³⁶⁾ y Barbeau

⁽³⁷⁾ en el estudio de los ríos Mile-Iles y St. Lawrence; realizaron el método de filtración de membrana para aislarlas, proponen para la detección de las BAFEs un tratamiento de pasteurización a 70 °C durante 15 minutos. La filtración de las BAFEs a través de membrana permite una cuantificación exacta de estas utilizando métodos estadísticos y determinar con mayor certeza la presencia de algún microorganismo patógeno que se encuentre en alguno de los sitios de muestreo ⁽³⁶⁾.

Ahora bien, la frecuencia con la que se aislaron las 9 especies de *Bacillus*, difiere en cuanto a la especie y frecuencia *Bacillus* caracterizados de la investigación reportada por Mazoua ⁽³⁸⁾. Las especies con mayor frecuencia, para Mazoua fueron: *Bacillus cereus* y *Bacillus pumillus* (29%ambos), dentro de esta investigación las especies mencionadas representaron el 5% para la primera y la segunda nunca fue caracterizada.

En este estudio las BAFEs que predominaron (figura 12), fueron *B. circulans* (22.8%), seguida de *B. sphaericus* (20.5%), *B. megaterium* y *B. coagulans* (18.4% cada una), por otro lado, se obtuvo una mayor diversidad de especies puesto que se encontraron 9 diferentes y en el estudio de Mazoua solo fueron 6, por lo que las condiciones de cada lugar de muestreo podrían influir en el desarrollo de cada una de las BAFEs. Hay que hacer notar que Mazoua trabajó con muestras de plantas de agua recolectadas directamente de las cisternas de almacenamiento (sin flujo de agua), contrario a lo realizado en esta investigación, pues no solo se tomaron muestras de cisternas, simultáneamente fueron muestreados los sistemas de distribución (grifos) mismos que tienen flujo constante de agua; y esto pudo influir en la diversidad encontrada.

De las nueve especies caracterizadas dentro de esta investigación, solo *Bacillus cereus* es de importancia médica ^(20, 21), al ser un patógeno oportunista que tiene una capacidad de virulencia baja. De acuerdo con Moreno ⁽³⁹⁾, al consumir agua

con altas concentraciones de este microorganismo o de sus esporas, provoca infecciones gastrointestinales severas.

Algunas especies de *Bacillus* se utilizan en la elaboración de vitaminas y antibióticos, en bioensayos y como indicadores de la monitorización de la eficacia de desinfectantes y procedimientos de esterilización ⁽²¹⁾, p. ej., *Bacillus subtilis* y *B. thuringiensis*, que son utilizadas dentro de la agricultura como biofertilizantes naturales para la eliminación de otros microorganismos que producen daño a la salud. De acuerdo con Méndez-Ubeda ⁽⁴⁰⁾ y Portella-Dussán ⁽⁴¹⁾ el empleo de estos dos microorganismos evita el uso de agentes químicos tóxicos como pesticidas y promueve una agricultura sustentable. Estos autores pusieron a prueba ambos bacilos frente a hongos saprófitos patógenos e insectos, quienes observaron la inhibición y eliminación de los patógenos e insectos en cuestión.

Distribución de BAFEs por lugar y sitio de muestreo

El rasgo más sobresaliente de las BAFEs en los sistemas de estudio fue su heterogeneidad en las diferentes clínicas, porque la C. Netzahualcóyotl en ninguna ocasión presentó BAFEs, y las otras clínicas como: C. Reforma y C. Benito Juárez presentaron el 20% y 39%, respectivamente. Así también, es preponderante señalar que porcentaje de los aislamientos en cada una de las fuentes de distribución fueron muy similares, es decir, los grifos el 30.77%, tanques hidroneumáticos 30.0% y ligeramente más bajo las cisternas 27.45% (Figuras 9,10 y 11).

La similitud de muestras positivas a BAFEs en los tres puntos de distribución (cisternas, grifos y tanques hidroneumáticos) ocurrió posiblemente, porque al ser una clínica tiene alta afluencia de usuarios, por tanto, hay un continuo gasto de agua con un constante flujo de esta y la distribuidos homogénea de microorganismos. Estos no es un fenómeno aislado, pues estudios como el que realizó Torres, citado en Marchand Pajares ⁽⁴²⁾, señalan que los puntos críticos de

contaminación en el sistema de agua potable de las viviendas y hospitales son: el tiempo de almacenamiento en tanques y cisternas, aunado a la deficiente protección física de los reservorios de agua, así como la inadecuada limpieza y desinfección de estos.

Relación de potabilidad del agua con la presencia de BAFEs

Los intentos por evaluar la seguridad del agua respecto a la salud pública han llevado al empleo de organismos indicadores, sin embargo, hay autores como Ríos-Tobón ⁽⁴³⁾ que discute sobre las características deseables de las bacterias indicadoras de contaminación fecal; plantea el uso de otros microorganismos diferentes a los coliformes como indicador de contaminación, tales especies como: *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, entre otras.

Establece, que estas deben tener un comportamiento similar a los microorganismos patógenos, una correlación donde los indicadores se presenten en una mayor proporción, resistan a factores externos y sobrevivan más tiempo en el agua que los patógenos, todo con el fin realizar un control fiable, económico y rápido de la calidad microbiológica del agua.

La importancia de corroborar la existencia de BAFEs en los sistemas en estudio fue, por estar relacionadas con la presencia de microorganismos patógenos difíciles de eliminar en el proceso de cloración como los quistes de *Cryptosporidium* spp y *Giardia intestinalis* ⁽³⁵⁾.

Pese a que el Comité de Standard Methods en 2007 ⁽³⁾; aprobó la determinación de esporas aerobias como una alternativa a los métodos comunes (determinación de coliformes totales y fecales), este tipo de prueba no es empleada en el país y no existen criterios o normas establecidas para este indicador de contaminación microbiológica.

Se encontró que, el 71% de las muestras de agua fueron negativas a BAFEs. Sin embargo, aunque sólo en el 29% de las muestras fue posible aislar a las BAFEs; el hecho de encontrar este tipo de indicador en muestra que son catalogada como potable, pone de manifiesto el peligro que representa para los usuarios el consumo del líquido, donde, la calidad del agua es independiente a los aislamientos positivos, es decir, 14 cuando el resultado fue potable y 15 cuando el agua es No potable (Cuadro 6).

Los resultados obtenidos no son concluyentes, pues el número de muestras analizadas por cada uno de los lugares pudieron ser muy pocas. A pesar de lo anterior, los estudios de Besner ⁽⁴⁴⁾, en el que, hace una cuantificación de tres tipos de indicadores (*Escherichia coli*, los coliformes totales y endosporas sulfito reductoras como *Clostridium spp*), concluye que las BAFEs se presentaron en un mayor número, debido a que los coliformes no son buenos indicadores por su poca resistencia a los tratamientos (radiación o cloro), resultado que viene a apoyar la propuesta del uso de las endosporas de BAFEs, a manera de una alternativa más o conjunta con los coliformes, para ser empleados como indicador microbiológico de contaminación.

De acuerdo con Cartier ⁽⁴⁵⁾, las BAFEs son el indicador ideal para la detección de contaminación fecal y detección de quistes de *Cryptosporidium spp* y *Giardia intestinalis* ⁽³⁵⁾. Pues, acorde a Galofré ⁽⁴⁶⁾ son un buen indicador de la eficiencia de la cloración, además, de su amplia proliferación en los sistemas de almacenamiento ⁽⁴⁷⁾.

Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos de los aislamientos y caracterización de las bacterias aerobias formadoras de endosporas (BAFEs), realizados a muestras de agua de la FES Zaragoza (Campus I, II) y las siete Clínicas Universitarias de Atención a la Salud, se puede concluir lo siguiente:

Con respecto al aislamiento y caracterización realizado a las 100 muestras de agua, solo en 29 de éstas se aislaron BAFEs, de 44 cepas del género *Bacillus* aisladas, se caracterizaron 9 especies de este género.

Las especies que predominaron fueron *B. circulans* (22.73%), *B. sphaericus* (20.45%), *B. megaterium* y *B. coagulans* (18.18% cada una).

En cuanto a la frecuencia de los aislamientos por lugar de muestreo, se encontró que las BAFEs estuvieron presentes mayoritariamente en las clínicas Reforma (87.5%), Benito Juárez (70%), el resto de 40 a 20%; y en ninguna ocasión la C. Netzahualcóyotl presentó aislamiento.

La frecuencia y distribución que mantuvieron las BAFEs en los tres sistemas de distribución (cisterna, grifos y tanques hidroneumáticos) fueron muy similares, todos cercanos al 30%. Posiblemente, porque existió un mayor gasto de agua, lo que provocó que los microorganismos no se concentran en los tanques hidroneumáticos.

No existe una relación entre presencia de BAFEs y la potabilidad del agua, con base en la prueba de Ji-cuadrada ($p < 0.05$). Aunque estos resultados no son concluyentes, pues el número de muestras analizadas para cada uno de los lugares pudieron ser muy pocas, además, la presencia de este género en estudio,

cuando el agua es considerada como Potable es muy similar a cuando resulta No Potable.

El uso de las endosporas de BAFEs, son una buena alternativa, para ser empleados en evaluación de la calidad microbiológica del agua, ya sea conjunta con los coliformes o bien solas. A su vez, estas estructuras son fáciles de detectar, resistentes a condiciones adversas; y el proceso de aislamiento es eficaz y económico.

Anexos

Anexo I

Medios de cultivo

Agar de Soya Trypticaseína con sulfato de manganeso

Cloruro de sodio	5.0 g
Peptona de caseína	15.0 g
Peptona de soya	5.0 g
Agar	15.0 g
Sulfato de manganeso	5.0 mg
Agua destilada	1000 mL
pH	7.3 ± 0.1

Rehidratar 40 g del medio de cultivo en un litro de agua destilada. Añadir 5 mg de sulfato de manganeso al medio hidratado. Calentar agitando frecuentemente hasta la completa disolución del medio. Esterilizar en autoclave a 121 °C (15 lb de presión) durante 15 minutos.

Anexo II

Pruebas bioquímicas

Producción de ácido a partir de carbohidratos

Caldo rojo de fenol

Peptona de caseína	5.0 g
Peptona de carne	5.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Rojo de fenol	0.018 g
Sustancia reaccionante	5.0-10.0 g
Agua destilada	1000 mL
pH	7.4 ± 0.2

Disolver 15 g del medio caldo rojo de fenol en 900 mL de agua destilada, añadir 100 mL de una solución del carbohidrato (dextrosa, xilosa, manitol, sorbitol, manosa, arabinosa, salicina, inulina) al 1%, distribuir 5 mL en cada tubo de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de baquelita, colocar dentro una campana de Durham, esterilizar a 10 libras de presión durante 10 minutos, dejar enfriar. Inocular el tubo con el microorganismo seleccionado incubar a 37 °C durante 24 horas. Observar el cambio de coloración del medio y si hay presencia de una burbuja dentro de la campana. Positivo = amarillo del medio (producción de ácido), Negativo = rojo o rosado, Producción de Gas = se forma burbuja dentro de la campana.

Reducción de nitratos

Caldo nitrato

Extracto de res	3.0 g
Peptona de gelatina	5.0 g
Nitrato de potasio	1.0 g
Agua destilada	1000 mL
pH	7.0 ± 0.2

Disolver 9.0 g del polvo de caldo nitrato en un litro de agua destilada. Mezclar bien, distribuir 5 mL en cada tubo de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de baquelita, colocar campanas de Durham para detectar presencia de gas; esterilizar a 121 °C (15 libras de presión) durante 15 minutos, dejar enfriar. Inocular con el microorganismo a prueba y dejar incubar a 37 °C durante 24 horas. Observar si hay formación de gas, enseguida colocar 5 gotas de reactivo A (α -naftilamina 0.6%) y 5 gotas de reactivo B (ácido sulfanílico 0.8%), en caso de resultar negativo, añadir una pizca (20 mg) de Zinc en polvo (fase 2), la coloración aparecerá a los 5-10 minutos. Fase 1; Positivo = rojo intenso; Negativo = no hay coloración. Fase 2; Positivo = No hay coloración, Negativo = rojizo.

Utilización de citrato

Agar citrato de Simmons

Fosfato dibásico de amonio	1.0 g
Fosfato dipotásico	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Citrato de sodio	2.0 g
Sulfato de magnesio	0.02 g
Azul de bromotimol	0.08 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL
pH	6.9 ± 0.2

Suspender 24.2 g del medio deshidratado citrato de Simmons en un litro de agua destilada. Dejar reposar durante 5 minutos, mezclar bien y calentar con agitación frecuente hasta la ebullición. Distribuir en tubos de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de gasa y algodón. Esterilizar a 121 °C (15 lb de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar los tubos en posición inclinada de manera que el fondo del medio de cultivo alcance una profundidad de 1 cm. Inocular por estría ligera en la superficie e incubar a 37 °C durante 24 horas. Positivo = crecimiento y cambio a azul del medio; Negativo = no hay crecimiento ni cambio de color en el medio.

Producción de fenilalanina desaminasa

Agar fenilalanina

DL- Fenilalanina	2.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato de sodio	1.0 g
Agar	12.0 g
Agua destilada	1000 mL
pH	7.3 ± 0.2

Suspender 23 g del medio deshidratado agar fenilalanina en un litro de agua destilada. Dejar reposar durante 10 minutos, mezclar bien y calentar con agitación frecuente hasta la ebullición. Distribuir en tubos de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de gasa y algodón. Esterilizar a 121 °C (15 lb de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar los tubos en posición inclinada de manera que el fondo del medio de cultivo alcance una profundidad de 1 cm. Inocular por estría ligera en la superficie e incubar a 37 °C durante 24 horas. Colocar 4-5 gotas de reactivo revelador (cloruro férrico). Positivo = reacción verde en la superficie del medio; Negativo = No hay reacción y el reactivo permanece sin cambios de color.

Prueba de rojo de metilo y reacción de Voges-Proskauer

Caldo RMVP (Rojo de Metilo – Voges-Proskauer)

Digerido pancreático de caseína	3.5 g
Digerido péptico de tejido animal	3.5 g
Dextrosa	5.0 g
Fosfato potásico	5.0 g
Agua destilada	1000 mL
pH	6.9 ± 0.2

Disolver 17 g del polvo de caldo RMVP en un litro de agua destilada. Mezclar bien, distribuir 5 mL en cada tubo de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de baquelita, esterilizar a 121 °C (15 libras de presión) durante 15 minutos, dejar enfriar. Inocular con el microorganismo a prueba y dejar incubar a 37 °C durante 24 horas.

Caldo nutritivo suplementado para Voges-Proskauer (alternativo a caldo RMVP)

Peptona de gelatina	5.0 g
Extracto de carne de res	3.0 g
Dextrosa	5.0 g
Agua destilada	1000 mL
pH	6.9 ± 0.2

Disolver 8 gramos del polvo en un litro de agua, añadir la dextrosa. Si es necesario calentar suavemente para disolverlo. Distribuir en tubos con tapón de baquelita y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Prueba de rojo de metilo: agregar 5 gotas de rojo de metilo a 2.5 mL del cultivo incubado; Positivo = rojo, Negativo = amarillo. Reacción de Voges-Proskauer: a 2 mL del cultivo incubado añadir 0.6 mL de α -naftol y 0.2 mL de hidróxido de potasio al 40% (es importante seguir este

orden, se puede alterar el resultado), mezclar suavemente. Realizar la lectura final a los 15 minutos. Positivo = anillo rojo en la superficie del medio, Negativo = no se forma el anillo rojo en la superficie del medio.

Hidrólisis de esculina

Agar bilis esculina

Peptona de gelatina	5.0 g
Extracto de carne	3.0 g
Oxgall (Bilis de buey)	20.0 g
Citrato férrico	0.5 g
Esculina	1.0 g
Agar	14.0 g
Agua destilada	1000 mL
pH	6.8 ± 0.2

Suspender 43.5 g del polvo en un litro de agua destilada y dejar reposar. Calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto hasta la completa disolución. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, dejar enfriar y vaciar en cajas Petri. Inocular con el microorganismo de prueba e incubar a 37°C durante 24 horas. Interpretación: Positivo = cambio de color del medio a negro o castaño oscuro alrededor del crecimiento. Negativo = no hay cambio de coloración del medio.

Fermentación de lactosa y glucosa junto con la formación de sulfuros

Agar TSI (Triple Azúcar Hierro)

Extracto de carne	3.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Peptona de caseína	15.0 g
Peptona de carne	5.0 g
Lactosa	10.0 g
Sacarosa	10.0 g
Dextrosa	1.0 g
Citrato de amonio y hierro (III)	0.5 g
Tiosulfato de sodio	0.5 g
Rojo de fenol	0.024 g
Agar	12.0 g
Agua destilada	1000 mL
pH	7.4 ± 0.1

Suspender 59.4 g del polvo deshidratado agar hierro triple azúcar (TSI) en un litro de agua destilada. Dejar reposar de 10 a 15 minutos. Calentar con agitación hasta la ebullición. Distribuir en tubos de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de gasa y algodón, esterilizar a 121 °C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Enfriar los tubos en posición inclinada, de manera que el fondo del medio alcance una altura de 1.5 cm. Inocular el fondo del medio por picadura y la superficie en estría. Incubar a 37 °C durante 24 horas. K/K = alcalino/alcalino (rojo/rojo) ausencia de fermentación de la glucosa y lactosa, peptonas utilizadas; K/A = alcalino/ácido, sólo la glucosa fermentada y peptonas usadas; A/A = ácido/ácido glucosa y lactosa fermentadas; producción de H₂S = precipitado negro en el fondo del medio; producción de gas = presencia de burbuja y fragmentación del medio.

Oxidación y/o fermentación de glucosa

Medio O/F de Hugh Leifson

Peptona de caseína	2.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato dipotásico	0.3 g
Azul de bromotimol	0.03 g
Agar	2.5 g
Agua destilada	1000 mL
pH	6.8 ± 0.1

Suspender 9.8 g del medio basal OF (de Hugh y Leifson) en un litro de agua destilada. Reposar durante 10 minutos y calentar con agitación frecuente hasta la disolución del medio. Mezclar y distribuir asépticamente 4.5 mL por cada tubo de ensaye de 18 x 150 mm con tapón de baquelita. Esterilizar a 121 °C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Agregar 0.5 mL de una solución de glucosa al 10%, esterilizada mediante filtración, en condiciones asépticas. Inocular dos tubos por punción profunda con el microorganismo en estudio, a uno adicionar una capa de 5 mm de aceite de parafina (sello). Incubar ambos tubos a 37 °C durante 48 horas. Oxidación = amarillo sólo en el tubo que no tiene sello; Fermentación = amarillo sólo en el tubo con sello; Oxidación/Fermentación = amarillo en ambos tubos.

Movilidad y producción de Indol.

Medio MIO (Movilidad-Indol-Ornitina)

Peptona de gelatina	10.0 g
Peptona de caseína	10.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
L-Ornitina	5.0 g
Dextrosa	1.0 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agar	2.0 g
Agua destilada	1000 mL
pH	6.5 ± 0.2

Disolver 31 g del medio deshidratado MIO en un litro de agua destilada. Reposar durante 10 minutos. Calentar hasta la ebullición durante 1 minuto y distribuir 5 mL en cada tubo de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de baquelita, esterilizar a 121 °C (15 lb de presión) durante 15 minutos. Enfriar en posición vertical, inocular el tubo por picadura, incubar a 37 °C durante 24 horas. Observar movilidad, después realizar la prueba de indol, agregar reactivo revelador. Movilidad; Positivo = turbidez y crecimiento más allá de la línea de siembra, Negativo = crecimiento sólo en la línea de siembra. Indol; Positivo = anillo rojo en la superficie del medio al agregar el reactivo revelador, Negativo = el color del reactivo permanece incoloro o amarillento.

Producción de ureasa

Caldo urea de Stuart

Fosfato monopotásico	9.1 g
Fosfato disódico	9.5 g
Extracto de levadura	0.1 g
Urea de alta pureza 20%	20.0 g
Rojo de fenol	0.01 g
Agua destilada	1000 mL
pH	6.8 ± 0.2

Disolver 38.5 g del polvo en un litro de agua destilada. Esterilizar por filtración y añadir 3 mL por cada tubo. No calentar ni esterilizar en autoclave. La urea se descompone con el calor. Inocular con el microorganismo de prueba e incubar a 37°C durante 24 horas. Interpretación: Positivo = cambio del medio a rosa intenso. Negativo = el medio no presenta cambio de coloración.

Hidrólisis de almidón

Agar almidón

Peptona	5.0 g
Extracto de carne	3.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Almidón soluble	20.0 g
Agar	20.0 g
Agua destilada	1000 mL
pH	7.0 ± 0.2

Rehidratar el medio basal (sin almidón) en 500 mL de agua destilada, calentar con suavidad la solución. Disolver 20 g de almidón en 250 mL de agua destilada, con cuidado hervir la solución, no hervir en exceso ya que el sobrecalentamiento puede hidrolizar el almidón. Llevar el volumen a un litro y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y dejar enfriar. Inocular con el microorganismo de prueba y dejar incubar a 37 °C durante 24 horas o hasta que ocurra el crecimiento suficiente y posteriormente añadir el reactivo yodo acuoso de Lugol (solución yodo-yoduro de potasio). Interpretación: Positivo = se formará un halo transparente alrededor del crecimiento. Negativo = el medio se tornará de azul alrededor de la colonia.

Anexo III

Pruebas Especiales

Prueba de la catalasa

Con una aguja de inoculación recoger el centro de una de las colonias aisladas y colocar sobre un portaobjetos de vidrio limpio (no se recomienda utilizar cultivos de agar sangre), agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. Inmediatamente observar la formación de burbujas (liberación de gas), registrar los resultados.

Pruebas para la determinación de productos extracelulares

Determinación de lipasas

Agar yema de huevo

Tripticaseína	20.0 g
Fosfato disódico	2.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Sulfato de magnesio al 5%	0.1 mL
Dextrosa	1.0 g
Agar	12.5 g
Agua destilada	500 mL
pH	7.3 ± 0.1

Disolver los ingredientes, calentar con agitación constante. Esterilizar por autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a 60 °C y agregar una yema de huevo. Mezclar y vaciar en placas. Previamente, los huevos deben sumergirse en etanol absoluto por una hora. Inocular el microorganismo de prueba, dejar incubar

a 37 °C durante 24 horas y observar crecimiento. Interpretación: Positivo = formación de un halo blanquecino insoluble alrededor del crecimiento, Negativo = no hay formación del halo ni cambio de color en el medio.

Determinación de Proteasas

a) Caseinasa

Agar leche descremada al 10%

Peptona de caseína	5.0 g
Extracto de levadura	2.5 g
Dextrosa	1.0 g
Leche descremada al 10%	100 mL
Agar	15.0 g
Agua destilada	900 mL
pH	7.0 ± 0.1

Disolver los ingredientes en 900 mL de agua mediante calentamiento y agitación constante. Hervir durante un minuto. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Por otra parte, la leche descremada esterilizar a 121 °C durante 10 minutos. El medio final se prepara mezclando el medio base y la leche, homogeneizar perfectamente y distribuir en cajas de Petri estériles. Inocular el microorganismo de prueba y dejar incubar durante 24 horas y observar el crecimiento. Interpretación: positivo = se forma un halo transparente alrededor del crecimiento que indica hidrólisis de caseína, negativo = no hay formación del halo alrededor del crecimiento.

b) Gelatinasa

Gelatina nutritiva

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g
Gelatina al 12%	120 g
Agua destilada	1000 mL
pH	6.8 ± 0.2

Agregar la gelatina al agua destilada y dejar reposar de 15 a 30 minutos, calentar a 50 °C para disolver la gelatina. Agregar el extracto de carne y la peptona, y calentar de nuevo a 50 °C para disolver todos los ingredientes. No sobrecalentar. Distribuir en tubos con tapón de baquelita. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, dejar enfriar en posición vertical. Inocular el microorganismo de prueba y dejar incubar durante 24 horas, observar la consistencia del medio y meter a refrigeración durante 20 minutos. Interpretación: Positivo = después de la refrigeración el medio permanecerá líquido. Negativo = después de refrigerar el medio volverá a estar sólido.

Producción de hemolisinas

Agar sangre de carnero al 5%

Extracto de levadura	5.0 g
Infusión de músculo cardíaco	2.0 g
Peptona de caseína	13.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	15.0 g
Sangre desfibrinada	50.0 mL
Agua destilada	1000 mL
pH	7.3 ± 0.2

Suspender 40 g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar perfectamente, calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto hasta la disolución completa. Distribuir y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Para la preparación de placas con sangre, enfriar la base a 45-50 °C y adicionar 5% de sangre estéril desfibrinada. Inocular con el microorganismo de prueba y dejar incubar a 37°C durante 24 horas. Interpretación: hemólisis α = lisis parcial de los glóbulos rojos del medio que forman un color verdoso alrededor del crecimiento, hemólisis β = lisis total de los glóbulos rojos que provoca la formación de un halo transparente alrededor de la colonia, hemólisis γ = no hay lisis de glóbulos rojos, no hay cambio de color del medio.

Anexo IV

Tinciones

Tinción de Gram modificada por Hucker

A. Cristal violeta (solución concentrada)

Cristal violeta	20.0 g
Etanol absoluto	100 mL

B. Solución concentrada de oxalato

Oxalato de amonio	1.0 mL
Agua destilada	100 mL

Mezclar la solución A con la solución B

C. Solución de yodo (Lugol)

Yodo	1.0 g
Yoduro de potasio	2.0 mL

Disolver completamente en 5 mL de agua destilada y agregar 240 mL de agua destilada. Bicarbonato de sodio al 15% en solución acuosa 60 mL. Mezclar bien y conservar en frasco ámbar con tapón esmerilado.

D. Alcohol-acetona para decolorar

Etanol absoluto	250 mL
Acetona	250 mL

Mezclar y conservar en frasco con tapón esmerilado.

E. Solución de safranina concentrada

Safranina O	2.5 g
Etanol absoluto	100 mL

Solución de trabajo: diluir safranina 1:5 o 1:10 en agua destilada, conservar en frasco con tapón esmerilado.

Método

1. Fijar frotis con calor.
2. Cubrir el frotis con cristal violeta y dejar durante 10 segundos.
3. Escurrir el colorante y lavar el resto con Lugol.
4. Cubrir la preparación con Lugol y dejar durante 10 segundos.
5. Lavar con agua de la llave.
6. Decolorar con alcohol-acetona durante 10 segundos e inmediatamente enjuagar.
7. Cubrir la preparación con safranina durante 10 segundos, lavar y dejar secar al aire.
8. Examinar al microscopio con aceite de inmersión (100X).

Tinción de Schaeffer-Fulton

A. Solución de verde de malaquita

Verde de malaquita	5.0 g
Agua destilada	100 mL

B. Solución de safranina concentrada

Safranina O	2.5 g
Etanol absoluto	100 mL

Solución de trabajo: diluir safranina 1:5 o 1:10 en agua destilada, conservar en frasco con tapón esmerilado

Método

1. Fijar frotis con calor.
2. Colocar un recipiente con agua y calentar hasta que hierva.
3. Colocar el frotis sobre los bordes del recipiente.
4. Cubrir el frotis con verde de malaquita.
5. Dejar que el vapor de agua fije el colorante durante 10 minutos.
6. Evitar que el colorante se seque, añadiendo suficiente cantidad al frotis.
7. Dejar enfriar y lavar, cubrir el frotis con safranina durante 1 minuto.
8. Lavar y dejar secar.
9. Examinar al microscopio con aceite de inmersión (100X).

Referencias

1. Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, 20ª edición, Diario Oficial de la Federación, ISBN: 968-805-77-0 (septiembre, 2014).
2. Plan Nacional de Desarrollo 2019-2024, Presidencia de la República [Internet], 2019, disponible en: <https://lopezobrador.org.mx/wp-content/uploads/2019/05/PLAN-NACIONAL-DE-DESARROLLO-2019-2024.pdf>
3. Rice EW, Baird RB, Eaton AD, Clesceri LS, editors. Standard methods. For the examination of water and wastewater. 22nd ed. Washington, D. C: Publication Office APHA; 2012.
4. Félez MS. Situación actual del estado de la depuración biológica. Explicación de los métodos y sus fundamentos. Madrid: Bellisco; 2009.
5. Arcos MP, Ávila SN, Estupiñán MT, Gómez AP. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. Pub Cien (Mad). 2005; 4(3); 69-80.
6. Organización Mundial de la Salud [Internet]. Estados Unidos: OMS [actualizada en julio 2019; acceso 4 de julio de 2019]. Disponible en www.who.int/es/
7. Carabias JL, Landa R. Agua, Medio Ambiente y Sociedad. Hacia la gestión integral de los recursos hídricos en México. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Colegio de México; 2005.
8. Gutiérrez HM. El desabasto del agua en el municipio de Nezahualcóyotl. El caso de la colonia Reforma [Tesis]: Instituto Politécnico Nacional; 2011.
9. Ley Federal de aguas 1972, Diario Oficial de la Federación, 1972/32 (enero 11, 1972).
10. Bitton G. Wastewater microbiology. 3rd ed. Florida: Wiley-Liss; 2005.
11. Bitton G. Wastewater microbiology. 4th ed. Florida: Wiley-Blackwell; 2011.
12. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayshi GS, Pfler MA. Microbiología médica. 4ta ed. St. Louis: Mosby; 2002.

13. Barbeau B, Boulos L, Desjardins R, Coallier J, Prévost M. Examining the use of aerobic spore-forming bacteria to assess the efficiency of chlorination. *Wat. Res.* 1999; 33 (13); 2941-2948.
14. Ponce A, Connon S, To Yung P. Detection and viability Assessment of Endospore-Forming Pathogens. In: Zourob M, Elwary S, Turner A, editors. *Principles of bacterial detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems.* Canada: Springer; 2008. p. 481-523.
15. Horneck G, Rettberg P, Reitz G, Wehner J, Eschweiler U, Strauch K, *et al.* Protection of bacterial spores in space, a contribution to the discussion on panspermia. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere.* 2001; 31: 527-547.
16. Rice EW, Fox KR, Miltner RJ, Lytle DA, Johnson CH. Evaluating plant performance with endospores. *American Water Works Association.* 1996; 88 (9): 122-130.
17. Ryan KJ, Ray G. *Microbiología Médica.* 5ª ed. México: McGraw Hill; 2010.
18. Pommerville JC. *Alcamo's Fundamentals of microbiology.* 7th ed. Arizona: Jones and Bartlett Publishers; 2001.
19. Atrih A, Foster SJ. Bacterial endospores the ultimate survivors. *International Dairy Journal.* 2002; 12: 217-223.
20. Pérez RS, Morales MM. *Manual de Microbiología Farmacéutica.* 2ª Ed. UPIBI-IPN; 2012.
21. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. Koneman. *Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas en color.* 6ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006.
22. Forbes B, Sahm D, Weissfeld AS. *Bailey & Scott. Diagnóstico microbiológico.* 12a edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2010.
23. Mudili J. *Introductory Practical Microbiology.* India: Alpha Science International Ltd; 2007.
24. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiology an introduction.* 9th ed. United States: Pearson Education Inc.; 2007.

25. Rakhisi Z, Amin M, Ahmady AZ. Isolation and identification of *Bacillus* species from soil and evaluation of their antibacterial properties. *Avicenna J Clin Microb Infec.* 2015; 2 (1); 1-4.
26. De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, *et al* editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol III, The Firmicutes. 2nd edition. Georgia: Springer Dordrecht Heidelberg London New York; 2009. 1422.
27. Logan NA, Berge O, Bishop AH, Busse HJ, De Vos P, Fritze D, *et al*. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Inter. Jour. of Syst. and Evol. Microbiol.* 2009; 59 (1): 2114-2121.
28. McFaddin J. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de Importancia Clínica*. 3ª edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S. A.; 2003.
29. Reva ON, Sorokulova IB, Smirnov VV. Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype. *Inter. Jour. of Syst. And Evol. Microbiol.* 2001; 51 (1): 1361-1371.
30. Parvathi A, Krishna K, Jose J, Joseph N, Nair S. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. *Braz. Jour. of Microbiol.* 2009; 40: 269-275
31. Erem F, Certel M, Karakas B. Identification of *Bacillus* species isolated from ropey breads both, with classical methods and API identification kits. *Akd. Univer. Zir. Fak. Derg.* 2009; 22 (2): 201-210.
32. Cruz VJ, Zavala CM, De la Cruz CD. Consumo de agua potable y su posible contribución al incremento de la fluorosis dental. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud.* 2008; 11(1-2): 39-42.
33. Tequianes BL, Pérez GD, González MM, Flores PM, Marroquín SR. Aislamiento de *Aeromonas* productoras de aerolisina y enterotoxina, en muestras de agua potable en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y otras dependencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. *Bioquímica.* 2005; 30 (1): 23-29.

34. Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, "Salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización", Diario Oficial de la Federación (enero, 1995).
35. Verhille S, Hofmann R, Chauret C, Andrews R. Indigenous bacterial spores as indicators of *Cryptosporidium* inactivation using chlorine dioxide. *Journal of Water and Health*. 2003; 1 (2): 91-100.
36. Cartier C, Barbeau B, Besner MC, Payment P, Prévost M. Optimization of the detection of the spores of aerobic spore-forming bacteria (ASFB) in environmental conditions. *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*. 2007; 56 (3): 191-202.
37. Barbeau B, Boulos L, Desjardins R, Coallier J, Prévost M, Duchesne D. A modified method for the enumeration of aerobic spore-forming bacteria. *Canadian Journal Microbiology*. 1997; 43: 976-980.
38. Mazoua S, Chauveheid. Aerobic spore-forming bacteria for assessing quality of drinking water produced from surface water. *Water Research*. 2005; 39: 5186-5198.
39. Moreno D. Aislamiento y caracterización de *Bacillus cereus* en redes de distribución de agua potable en un centro hospitalario de la ciudad de Bogotá [Pregrado]. Universidad de los Andes; 2014.
40. Méndez-Ubeda JM, Flores MS, Páramo-Aguilera LA. Isolation and identification of *Bacillus subtilis* and evaluation of antagonism in vitro against phytopathogenic fungi. *Universidad Nacional de Ingeniería de Nicaragua*. 2017; 30 (2): 96-110.
41. Portela- Dussán D, Chaparro-Giraldo A, López SA. La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. *Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 2013; 11 (20): 87-96.
42. Marchand Pajarés O. Microorganismos indicadores de la calidad del agua de consumo humano en Lima Metropolitana [Profesional]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2002

43. Ríos-Tobón S, Agudelo RM, Gutiérrez L. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. Facultad Nacional de Salud Pública. 2017; 35 (2): 236-247.
44. Besner MC, Lavoie J, Morissette C, Payment P, Prévost M. Effect of water main repairs on water quality. Journal American Water Works Association. 2008; 100 (7): 95-109.
45. Cartier C, Besner MC, Barbeau B, Lavoie J, Desjardins R, Prévost M. Evaluating aerobic endospores as indicators of intrusion in distribution system. Journal American Water Works Association. 2009; 101 (7): 46-58.
46. Gaofré B, Israel S, Delundé J, Ribas F. Aerobic bacterial spores as process indicators for protozoa cysts in water treatment plants. Water Science and Technology. 2004; 50 (1): 165-172.
47. Huertas A, Barbeau B, Desjardins C, Galarza A, Figueroa MA, Toranzos GA. Evaluation of *Bacillus subtilis* and coliphage MS2 as indicators of advanced water treatment efficiency. Water Science and Technology. 2003; 47 (3): 255-259.