



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL HIPOCLORITO DE SODIO  
EN ENDOSPORAS DE UNA CEPA CERTIFICADA DE  
*Bacillus subtilis*

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

CLAUDIA LIZETH MONROY PEDRAZA

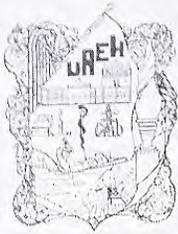
DIRECTORA: DRA. CLAUDIA CORONEL OLIVARES

CO-DIRECTORA: DRA. SYLVIA MARTÍNEZ HERNÁNDEZ



MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO

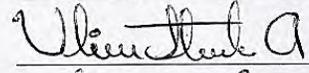
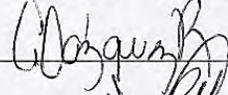
2019



**M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO**  
**DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR, UAEH.**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado a la pasante de Licenciatura en Biología **Claudia Lizeth Monroy Pedraza** quien presenta el trabajo recepcional de tesis intitulado **Evaluación de la eficiencia del hipoclorito de sodio en endosporas de una cepa certificada de *Bacillus subtilis***, después de revisarlo en reunión de sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE:	Dra. Claudia Coronel Olivares	
SECRETARIO	Biol. Ulises Iturbe Acosta	
PRIMER VOCAL:	Dra. Gabriela Alejandra Vázquez Rodríguez	
SEGUNDO VOCAL:	Dra. María del Refugio González Sandoval	
TERCER VOCAL:	Dra. Sylvia Martínez Hernández	
PRIMER SUPLENTE:	Dr. Carlos Alexander Lucho Constantino	
SEGUNDO SUPLENTE:	Dr. Jesús Alan Reyes Silva	

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi más atenta consideración.

**ATENTAMENTE**  
**"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"**  
**Mineral de la Reforma, Hidalgo a 9 de Enero de 2019**

  
**M. en C. MAGDALENA MEZA SANCHEZ**  
**COORDINADOR ADJUNTO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**



Ciudad del Conocimiento  
 Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia  
 Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo,  
 México. C.P. 42184  
 Teléfono: +52 (771) 71 720 00 ext. 6640, 6642  
 Fax 2112  
 aab\_icbi@uah.edu.mx



Los resultados de esta investigación se presentaron y publicaron en:



8° Simposio Internacional de Bioseguridad y Biocustodia 2016, Cd. de México.



Monroy Pedraza, C. L., Coronel Olivares C., Martínez Hernández S., Iturbe Acosta U. y Lucho Constantino C. A. (2016). Evaluación de la eficiencia del hipoclorito de sodio y ácido peracético en endosporas de *Bacillus subtilis* en una cepa certificada. Lineamientos para la gestión de riesgo biológico. Revista mexicana de bioseguridad. AMEXBIO. 95p.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, porque siempre han confiado en mí y me han apoyado en todas las decisiones de mi vida. Ustedes son el cimiento de mis sueños.

A mi hermano, porque siempre ha encontrado una razón para impulsarme a hacer cosas nuevas.

A mi abue, porque en todo momento ha sido un centro de apoyo y cariño desmedido.

A mi familia, por poner todas sus expectativas en mí y motivarme a ser siempre mejor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y la Licenciatura en Biología, que me abrieron las puertas de su seno científico y me permitieron prepararme profesionalmente.

A Claudia Coronel Olivares, por haberme permitido trabajar en este proyecto y compartir sus conocimientos conmigo. Por enseñarme muchas cosas nuevas y ser mi guía de principio a fin, así también, mil gracias por todo su tiempo, paciencia, motivación y su valiosa amistad.

A la Dra. Sylvia Martínez Hernández y el Maestro Ulises Iturbe Acosta, por ser partícipes desde la propuesta de este trabajo, por todo su apoyo y tiempo destinado a esclarecer mis dudas.

A todos mis sinodales, por sus sugerencias y observaciones que permitieron enriquecer este trabajo.

A Hansel, por su disponibilidad y apoyo para auxiliarme en el análisis de datos.

A Lizbeth, Maribel, Araceli y Anahí, las amistades más apreciadas que me dejó la Biología y que perdurarán por siempre.

*“El éxito consiste en obtener lo que se desea.  
La felicidad, en disfrutar lo que se obtiene”.*

*Ralph Waldo Emerson*

# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	III
ÍNDICE DE FIGURAS .....	IV
RESUMEN .....	V
1 INTRODUCCIÓN .....	1
2 ANTECEDENTES .....	3
2.1 Microorganismos del agua residual.....	3
2.2. <i>Bacillus</i> .....	6
2.2.1 <i>Bacillus subtilis</i> .....	7
2.2.2 Endosporas .....	8
2.2.3 Esporulación y germinación .....	9
2.3 Desinfección.....	11
2.3.1 Cloración .....	13
2.3.2 Hipoclorito de sodio .....	15
3 JUSTIFICACIÓN .....	16
4 OBJETIVOS .....	17
4.1 General.....	17
4.2 Particulares .....	17
5 MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
5.1 Activación de la cepa certificada. ....	18
5.2 Producción de endosporas a partir de células vegetativas.....	18
5.3 Tinción de endosporas por la técnica verde de malaquita.....	19
5.4 Conteo de células viables cultivables a partir de endosporas .....	20
5.5 Desinfección en endosporas con hipoclorito de sodio.....	21
5.5.1 Análisis estadístico de desinfección de endosporas con NaClO .....	23
5.6 Germinación de endosporas .....	23
5.7 Tratamiento de desinfección .....	24
5.7.1 Desinfección de endosporas .....	25
5.7.2 Germinación de endosporas remanentes.....	25
5.7.3 Desinfección de células vegetativas.....	26

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
6.1 Obtención de endosporas de <i>Bacillus subtilis</i> .....	28
6.2 Desinfección en endosporas con hipoclorito de sodio.....	29
6.2.1 Análisis estadístico de desinfección de endosporas con NaClO .....	33
6.3 Germinación de endosporas .....	35
6.4 Tratamiento de desinfección .....	38
7 CONCLUSIONES.....	42
8 LITERATURA CITADA.....	43
9 ANEXOS .....	49

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Agentes patógenos transmitidos por el agua y su importancia sanitaria...5	
Tabla 2. Ejemplos de desinfectantes y su principal aplicación.....11	
Tabla 3. Condiciones de pH, concentración y tiempo de contacto empleadas en la desinfección de endosporas con NaClO .....21	
Tabla 4. Unidades de Inactivación $-\text{Log}(N/N_0)$ , porcentajes de remoción (%R) y cloro residual libre (CRL) durante la desinfección de endosporas de <i>B. subtilis</i> con NaClO .....29	
Tabla 5. Valores del análisis ANOVA factorial.....33	
Tabla 6. Conteo de endosporas de <i>B. subtilis</i> antes y después de la pregerminación.....35	
Tabla 7. Conteo de las unidades Log (UFC/mL), unidades de inactivación $-\text{Log}(N/N_0)$ y porcentaje de remoción (%R) de <i>B. subtilis</i> durante el tratamiento consecutivo. ....38	

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Células vegetativas y endosporas elipsoidales y subterminales de <i>B. subtilis</i> . .....	7
Figura 2. Representación de una espora bacteriana "típica" (las estructuras no están dibujadas a escala).....	8
Figura 3. Ciclo de esporulación y germinación en <i>B. subtilis</i> . .....	10
Figura 4. Formas del cloro presentes en agua. ....	14
Figura 5. Esquema general del tratamiento de desinfección consecutivo con NaClO.....	24
Figura 6. Relación de la cantidad de endosporas (formas esféricas) con respecto a las células vegetativas (cuerpos bacilares) de <i>B. subtilis</i> (1000X). .....	28
Figura 7. Unidades de Inactivación $-\text{Log}(N/N_0)$ de endosporas de <i>B. subtilis</i> con NaClO a pH 6, 7 y 8; concentraciones de 15, 20 y 30 mg/L; a tiempos de contacto de 30 y 45 minutos. ....	31
Figura 8. Prueba Tukey para el factor pH .....	34
Figura 9. Prueba Tukey para el factor concentración.....	34
Figura 10. Absorbancias registradas a diferentes tiempos durante la prueba de germinación de endosporas de <i>B. subtilis</i> . ....	36
Figura 11. Microfotografías durante la germinación de endosporas de <i>B. subtilis</i> . ....	37
Figura 12. Conteo de las unidades Log (UFC/mL) de <i>B. subtilis</i> presentes en cada fase del tratamiento de desinfección consecutivo .....	40

## RESUMEN

Las diversas actividades antropogénicas han mermado la calidad del agua, lo que constituye un riesgo sanitario para la humanidad y el ambiente. Por ello, se han desarrollado múltiples tratamientos de desinfección para eliminar los microorganismos de aguas residuales tratadas, incluyendo sus estructuras de resistencia. La presente investigación se dividió en tres partes: en la primera se establecieron las condiciones óptimas de pH, concentración y tiempo de contacto del hipoclorito de sodio (NaClO) para la remoción de endosporas de una cepa certificada de *Bacillus subtilis*; enseguida se estandarizó el proceso de germinación de endosporas y finalmente se planteó un tratamiento de desinfección consecutivo con NaClO, que contempló: una desinfección de endosporas, germinación de endosporas remanentes y una segunda desinfección de células vegetativas.

A partir del cultivo de *B. subtilis* en caja de Petri se obtuvo una suspensión de  $1.28 \times 10^{11}$  endosporas/mL a la cual se le añadió NaClO en tres diferentes concentraciones (15, 20 y 30 mg/L); se ajustó a tres pH (6, 7 y 8) y se dejó actuar a tres tiempos de contacto (0, 30 y 45 min). Las mejores condiciones de remoción de endosporas con NaClO se encontraron a pH 6, con una concentración de 30 mg/L y 45 minutos de contacto, con la eliminación de 6.27 unidades logarítmicas (55.63% de remoción). Por el contrario, las condiciones de menor remoción de endosporas se presentaron a pH 8, con una concentración de NaClO de 15 mg/L y 30 minutos de contacto, en cuyo caso se eliminaron 1.75 unidades logarítmicas (15.74% de remoción). Los valores del cloro residual libre se encontraron por debajo del rango permitido por las normativas de calidad del agua establecidas por la Organización Mundial de la Salud. Para la segunda parte, en el proceso de germinación, se logró obtener células vegetativas a partir de endosporas a los 45 minutos.

Finalmente, el tratamiento de desinfección consecutivo logró eliminar hasta 9.65 unidades logarítmicas, lo que corresponde al 87.7% de remoción de la concentración inicial de endosporas. Los resultados obtenidos en este trabajo pretenden aportar elementos para contribuir al mejoramiento en la desinfección del agua residual tratada mediante dos desinfecciones y así elevar su calidad con fines de reúso.

# 1 INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso natural esencial pues es indispensable para el desarrollo de las múltiples formas de vida. Sin embargo, a través del tiempo la calidad del agua se ha deteriorado debido al impacto negativo de las diversas actividades antropogénicas, tales como la agricultura, la industria y la urbanización. Dichas actividades representan las principales fuentes de contaminación que originan las aguas residuales (Aguilar y Durán, 2010).

Para satisfacer la demanda creciente del recurso hídrico, las plantas de tratamiento de aguas residuales juegan un papel importante porque permiten minimizar los efectos de la contaminación y llevar a cabo el reciclaje del agua. Es una práctica que se ha realizado desde la antigüedad y que hoy en día es fundamental para resguardar la calidad de vida (Fernández-Alba *et al.*, 2006).

Dentro de la última etapa del tratamiento del agua, la desinfección es la fase más importante para contrarrestar la contaminación biológica, especialmente cuando la disposición del agua tratada está orientada al contacto con personas. En términos prácticos, desinfectar el agua significa eliminar de ella los microorganismos como bacterias, virus, protistas y helmintos. Sin embargo, la desinfección es un proceso selectivo, no destruye a todos los organismos presentes en el agua y no siempre elimina a los patógenos (Vargas, 2004).

Tradicionalmente, la sustancia activa más utilizada en procesos de desinfección es el NaClO debido a su alta capacidad oxidante, su disponibilidad comercial, la facilidad de empleo y su efecto residual (Rojas-Valencia *et al.*, 2008).

En las aguas residuales existe una gran diversidad microbiana y dentro de las bacterias existen algunas especies que presentan la formación de estructuras de resistencia denominadas endosporas, las cuales poseen un alto rango de resistencia a factores físicos como el calor, la congelación y la radiación, así como a los agentes químicos. Sin embargo, cuando las condiciones de su entorno son óptimas, las

endosporas poseen la capacidad de liberar células vegetativas y multiplicarse rápidamente (Atrih y Foster, 2001).

Algunas especies bacterianas que presentan endosporas pueden propiciar el surgimiento de enfermedades en animales y humanos debido a su presencia en el agua y desechos sólidos en el ambiente. Bajo este contexto, se han desarrollado líneas de investigación que pretenden remover o destruir la mayor cantidad de endosporas empleando diferentes métodos de desinfección.

Por lo tanto, la presente investigación tiene como finalidad realizar pruebas experimentales que permitan establecer condiciones óptimas de pH, concentración de NaClO y tiempo de contacto para la remoción de endosporas y células vegetativas de *B. subtilis* mediante un tratamiento de cloración consecutivo que consta de tres fases: a) desinfección de endosporas, b) germinación de endosporas remanentes y c) desinfección de células vegetativas. Los datos obtenidos en este trabajo permitirán aportar elementos para contribuir al mejoramiento en la desinfección del agua tratada y así garantizar su calidad con fines de reúso.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Microorganismos del agua residual

El impacto de las aguas residuales ha traído diversas problemáticas de salud y seguridad pública. Los microorganismos presentes en el agua engloban una gran diversidad de agentes patógenos como bacterias, virus, protistas y helmintos, los cuales desencadenan una serie de padecimientos en la población mundial (OMS, 2011).

#### ❖ Bacterias

Son microorganismos unicelulares procariontes, es decir, que carecen de un núcleo celular y de organelos, por lo que su material genético se encuentra disperso en el citoplasma. Miden entre 0.5 y 10  $\mu\text{m}$  de longitud y presentan una gran diversidad de formas como cocos, bacilos, vibrios y espirilos. Más del 80% de las bacterias descritas en el manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (Bergey's manual) pueden aislarse del agua (Apella y Araujo, 2005).

Dentro de las bacterias establecidas como contaminantes del agua se han aislado Gram negativas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Gallionella*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Edwarsiella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, y *Citrobacter*. Por otro lado, dentro del grupo de las Gram positivas se incluyen algunos patógenos de humanos aislados especialmente de aguas subterráneas y aguas residuales sin tratar; los géneros más comunes son *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* y *Clostridium*. En su mayoría, estas bacterias repercuten patológicamente en el aparato digestivo y son excretadas en las heces de las personas o animales infectados (Ríos-Tobón *et al.*, 2017).

#### ❖ Virus

Son agentes no vivos que miden de 50 a 100 nm, poseen una región central de un ácido nucleico (DNA o RNA) y están rodeados por una cubierta de proteínas denominada cápside. Los virus sólo pueden multiplicarse cuando invaden células y difieren entre sí por el tamaño, la forma y la composición química de su genoma. Los

virus son la principal causa de morbilidad y mortalidad en enfermedades de transmisión hídrica. El 87% de las enfermedades virales transmitidas por agua contaminada son causadas por el virus de la hepatitis, adenovirus y rotavirus (OMS, 2011).

#### ❖ **Protistas**

Son parásitos eucariontes unicelulares cuyo ciclo de vida incluye una forma vegetativa (trofozoito) y una forma resistente (quiste). Sus formas parasitarias son causantes de enfermedades diarreicas con múltiples síntomas e incluso la muerte (Neira-Muñoz *et al.*, 2007). Los quistes más comunes en el agua son de *Cryptosporidium* y *Giardia*, que pueden permanecer viables hasta 140 días y son muy resistentes a la mayoría de los desinfectantes, lo que dificulta mucho su destrucción con la cloración tradicional de las aguas. Algunos brotes mundiales de estos patógenos han sido causados por el contacto con el agua de plantas de tratamiento en grandes ciudades (Takagi *et al.*, 2008).

#### ❖ **Helmintos**

La palabra «helminto» es un término general para referirse a un grupo de organismos con forma de gusano, los cuales pueden ser de vida libre o parásitos. Dentro del grupo se incluyen representantes de cuatro *phyla* que no están relacionados genealógicamente: Platyhelminthes, Acanthocephala, Nematoda y Annelida (Ríos-Tobón *et al.*, 2017). Estos organismos son altamente resistentes a los cambios de pH, humedad y temperatura, tanto del ambiente como del agua. Los huevos de estos parásitos logran sobrevivir durante largos períodos de tiempo en el ambiente (OMS, 2011). Los principales helmintos patógenos encontrados en el agua son *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Paragonimus* spp., *Schistosoma* spp., *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale* (Arcos-Pulido *et al.*, 2005).

En general, los grupos descritos pueden causar distintas enfermedades a diferentes niveles, desde una gastroenteritis simple hasta cuadros graves de diarrea, hepatitis o fiebre. Las enfermedades hídricas son transmitidas por la ruta fecal-oral de manera

directa: de persona a persona o indirecta: a través de agua o alimentos contaminados (OMS, 2011).

En la tabla 1 se proporciona información general sobre los microorganismos más comunes que se encuentran en el agua, las enfermedades asociadas con los mismos, la resistencia al cloro basada en datos que consideran dosis y tiempos de contacto convencionales en agua tratada, así como la infectividad relativa, que se refiere a la capacidad de un agente patógeno para invadir un organismo y desencadenar una patología. Los datos están basados en información epidemiológica (OMS, 2011).

Tabla 1. Agentes patógenos transmitidos por el agua y su importancia sanitaria (modificado de OMS, 2011; USEPA 1999).

Agente patógeno	Enfermedad	Importancia para la salud	Persistencia en abastecimiento de agua potable	Resistencia al cloro	Infectividad relativa
<b>Bacterias</b>					
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Melioidosis	Baja	Puede proliferar	Baja	Baja
<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i>	Diarrea aguda	Alta	Puede proliferar	Baja	Moderada
<i>Escherichia coli</i>	Gastroenteritis	Alta	Moderada	Baja	Baja
<i>Legionella</i> spp.	Legionelosis neumónica	Alta	Moderada	Baja	Moderada
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infecciones pulmonares	Moderada	Prolifera	Moderada	Baja
<i>Salmonella typhi</i>	Fiebre tifoidea	Alta	Puede proliferar	Baja	Baja
Otras salmonelas	Salmonelosis	Alta	Puede proliferar	Baja	Baja
<i>Shigella</i> spp.	Shigelosis (Disentería)	Alta	Moderada	Baja	Moderada
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera	Alta	Puede proliferar	Baja	Baja
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastroenteritis aguda	Alta	Puede proliferar	Baja	Baja
<b>Virus</b>					
Adenovirus	Infecciones digestivas y respiratorias	Alta	Larga	Moderada	Alta
Enterovirus	Gastroenteritis	Alta	Larga	Moderada	Alta
Virus de la hepatitis A	Hepatitis infecciosa	Alta	Larga	Moderada	Alta
Virus de la hepatitis E	Hepatitis	Alta	Larga	Moderada	Alta
Rotavirus	Gastroenteritis aguda	Alta	Larga	Moderada	Alta
<b>Protistas</b>					
<i>Acanthamoeba</i> spp.	Encefalitis y queratitis	Alta	Larga	Alta	Alta
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Criptosporidiasis	Alta	Larga	Alta	Alta
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Ciclosporiasis	Alta	Larga	Alta	Alta
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amebiasis	Alta	Moderada	Alta	Alta
<i>Giardia intestinalis</i>	Giardiasis	Alta	Moderada	Alta	Alta
<i>Naegleria fowleri</i>	Meningoencefalitis	Alta	Puede proliferar	Alta	Alta
<b>Helmintos</b>					
<i>Schistosoma</i> spp.	Esquistosomiasis	Alta	Corta	Moderada	Alta
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascariasis	Alta	Moderada	Moderada	Alta
<i>Taenia solium</i>	Teniasis	Alta	Moderada	Moderada	Alta

La creciente presencia de estos patógenos en el agua surge usualmente por efecto de cambios en el ambiente y en la población, tales como urbanización no controlada, crecimiento industrial, ocupación de regiones antes deshabitadas y la disposición inadecuada de excretas humanas y animales. Los cambios relacionados con las

actividades antropogénicas se ven reflejados directamente en el entorno y, por consiguiente, en el recurso hídrico (Núñez *et al.*, 2009).

Como respuesta a estas preocupaciones, la desinfección se ha convertido en el mecanismo principal para la desactivación o destrucción de los microorganismos patógenos (OMS, 2011).

Para que la remoción sea efectiva, el agua residual debe ser tratada adecuadamente, pues se ha observado la presencia de patógenos resistentes incluso después de la desinfección (Doménech-Sánchez *et al.*, 2008). La cloración crea una presión de selección para los microorganismos que puede terminar en la adaptación de sus poblaciones a este compuesto, es decir, el surgimiento de la resistencia.

## **2.2. *Bacillus***

El género *Bacillus* fue descrito por primera vez por Cohn en 1872 y comprende un grupo de más de 100 especies. La especie tipo es *Bacillus subtilis* (Cohn, 1872).

Son bacterias en forma de bacilo, Gram positivas, aerobios estrictos o anaerobios facultativos y catalasa positiva (Wang *et al.*, 2007). Presentan la formación de endosporas, una estructura de resistencia que les permite sobrevivir a condiciones de estrés y que puede permanecer viable durante largos periodos de tiempo, pero cuando las condiciones de su medio se tornan favorables, la endospora desarrolla la forma vegetativa. Esto explica su amplia distribución en diversos hábitats, ya que se han aislado en ambientes de agua dulce, marinos, suelo, así como de plantas y alimentos (De Vos *et al.*, 2009). Además, se usan ampliamente en el estudio de formación de biopelículas (Earl *et al.*, 2008).

La mayoría de las especies del género tienen poco o nulo potencial patógeno, con excepción de *B. anthracis* y *B. cereus*, responsables de los padecimientos del ántrax y de intoxicaciones alimentarias en humanos y animales (Macedo y Vola, 2005).

Se ha detectado con frecuencia la presencia de *Bacillus* spp. en aguas de consumo, fuentes hídricas subterráneas, incluso en aguas que han sido tratadas y desinfectadas mediante procedimientos convencionales. Esto se debe, principalmente a la resistencia de sus endosporas a los procesos de desinfección (OMS, 2011).

### 2.2.1 *Bacillus subtilis*

Dicha especie es considerada el modelo genético de las bacterias Gram positivas, debido a que se conoce la secuencia completa de su genoma y es de fácil manipulación, por lo cual es objeto de muchos trabajos de investigación (Nicholson *et al.*, 2000; Setlow, 2006).

Son células con forma de bacilo que miden 0.7-0.8  $\mu\text{m}$  de ancho por 2.0-3.0  $\mu\text{m}$  de largo. Son aerobias, producen endosporas elipsoidales o cilíndricas que miden entre 0.7–0.8  $\mu\text{m}$  y se forman en la zona centro o subterminal de la célula (Figura 1). El crecimiento puede llevarse a cabo en agar nutritivo y sus colonias son redondas de color blanquecino. Sus condiciones óptimas de crecimiento requieren temperatura entre 28 a 36 °C y pH entre 5.5 y 8.5. Producen enzimas hidrófilas extracelulares que descomponen polisacáridos para emplearlos como fuente de carbono (Setlow, 2006). *B. subtilis* no es considerado patógeno humano, sin embargo, raramente se asocia con intoxicaciones alimenticias y enfermedades de la vista tales como: endoftalmitis, conjuntivitis, queratitis y úlceras corneales (Romero-Aroca *et al.*, 2003).

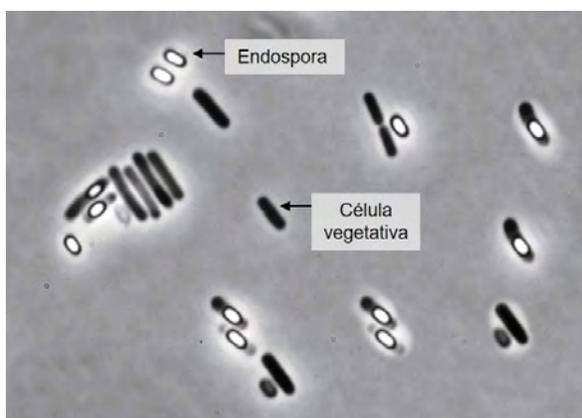


Figura 1. Células vegetativas y endosporas elipsoidales y subterminales de *B. subtilis*.  
Fuente: De Vos *et al.* (2009).

De acuerdo con De Vos *et al.* (2009), la taxonomía de *Bacillus subtilis* es la siguiente:

Phylum XIII. *Firmicutes*

Clase I. "*Bacilli*"

Orden I. *Bacillales*

Familia I. *Bacillaceae*

Género I. *Bacillus*

## 2.2.2 Endosporas

Se definen como estructuras de resistencia metabólicamente inactivas que resguardan el genoma de las bacterias. Se denominan “endosporas” porque se forman de manera intracelular, en cuyo caso una célula vegetativa puede originar únicamente una endospora (De Vos *et al.*, 2009). Es un estado latente que les permite sobrevivir en medios hostiles durante un tiempo prolongado, debido a su gran resistencia a los factores físicos, como el calor, la sequedad, la congelación y la radiación, así como a diversos agentes químicos como los desinfectantes (Setlow y Johnson, 2012). Estas propiedades son conferidas por la composición química y estructura de las múltiples capas que las componen (Demidova y Hamblin, 2005).

Las endosporas bacterianas están constituidas por varias capas: del exterior al interior, estas son: el *exosporium*, capas de recubrimiento, la membrana externa, el córtex, la membrana interna y el núcleo (Figura 2). El genoma está contenido en el núcleo parcialmente deshidratado y la mayor parte del agua ha sido reemplazada por ácido dipicolínico. Cada estrato que lo rodea está constituido de proteínas y peptidoglucano compactadas entre sí, que en conjunto proporcionan resistencia, protección e impermeabilidad a cualquier agente externo, lo que permite preservar el material genético y, por ende, perpetuar su especie (Setlow, 2006).

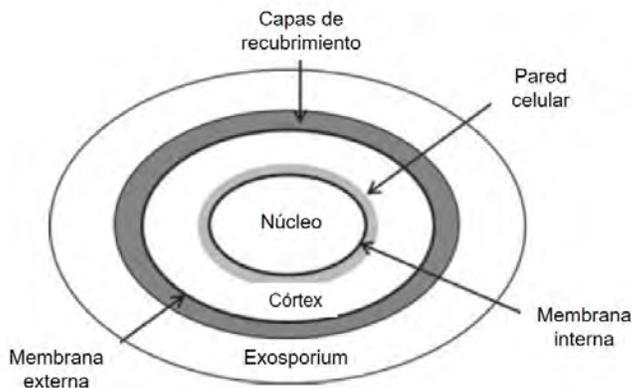


Figura 2. Representación de una espora bacteriana "típica" (las estructuras no están dibujadas a escala). Fuente: Modificado de Setlow, 2006.

### 2.2.3 Esporulaci3n y germinaci3n

El proceso de esporulaci3n comienza al final de la fase de crecimiento exponencial, cuando las bacterias se encuentran en un ambiente de estr3s. Existen dos factores o est3mulos implicados en la formaci3n de endosporas; el primero es la limitaci3n por alg3n nutriente (amino3cido o az3car) y el segundo es una alta densidad celular, ya que a medida que aumenta la masa de un cultivo, existe una acumulaci3n extracelular de un p3ptido secretado (factor de esporulaci3n), que cuando alcanza una concentraci3n particular, conduce a la activaci3n de varios genes necesarios para la esporulaci3n (Sonenshein, 2000).

De acuerdo a McKenney *et al.* (2013) la esporulaci3n se lleva a cabo de la siguiente manera (Figura 3):

- a) La c3lula vegetativa replica su DNA y se somete a una divisi3n asim3trica para formar dos compartimentos: uno grande (c3lula madre) y uno peque1o (preespora) separados por un septo.
- b) La c3lula madre envuelve el compartimento precursor de la endospora.
- c) Se realiza la s3ntesis del c3rtex, que se ensambla entre las membranas interna y externas de la preespora.
- d) La c3lula madre produce las capas de recubrimiento constituida por al menos 70 prote3nas y se logra una consistencia densa.
- e) Se lleva a cabo la lisis de la c3lula madre y la liberaci3n de la endospora madura.

Por el contrario, cuando las endosporas encuentran las condiciones 3ptimas para su desarrollo, poseen la capacidad de germinar (Figura 3), es decir, liberan c3lulas vegetativas que contin3an con su crecimiento y actividad metab3lica (McKenney *et al.*, 2013). Por lo tanto, la germinaci3n se refiere a la transici3n de endospora latente a una c3lula vegetativa (Leggett *et al.*, 2012).

Durante este proceso ocurren varios cambios tras los cuales vierten todas sus capas para permitir que las c3lulas vegetativas j3venes emerjan, aumenten de tama1o y se dividan de manera r3pida (Russell, 1990). Se ha reportado que la germinaci3n de

endosporas de *B. subtilis* se ha logrado entre 60 y 120 minutos (Alzahrani y Moir, 2014; Chirakkal *et al.*, 2002).

Leggett y colaboradores (2012), resumen la germinación en tres fases:

- 1) Activación: se desencadena por condiciones apropiadas de calor, pH o exposición química, lo que conduce a que la endospora rompa el estado de latencia y esté lista para germinar.
- 2) Germinación: se inicia en respuesta a diversos estímulos como aminoácidos (L-alanina), azúcares y algunos tratamientos físicos (calor y altas presiones). Las endosporas entran en un estado metabólicamente activo y pierden sus capas de protección.
- 3) Crecimiento: abarca desde la síntesis macromolecular de proteínas, la emergencia de la célula vegetativa y el crecimiento de la misma.

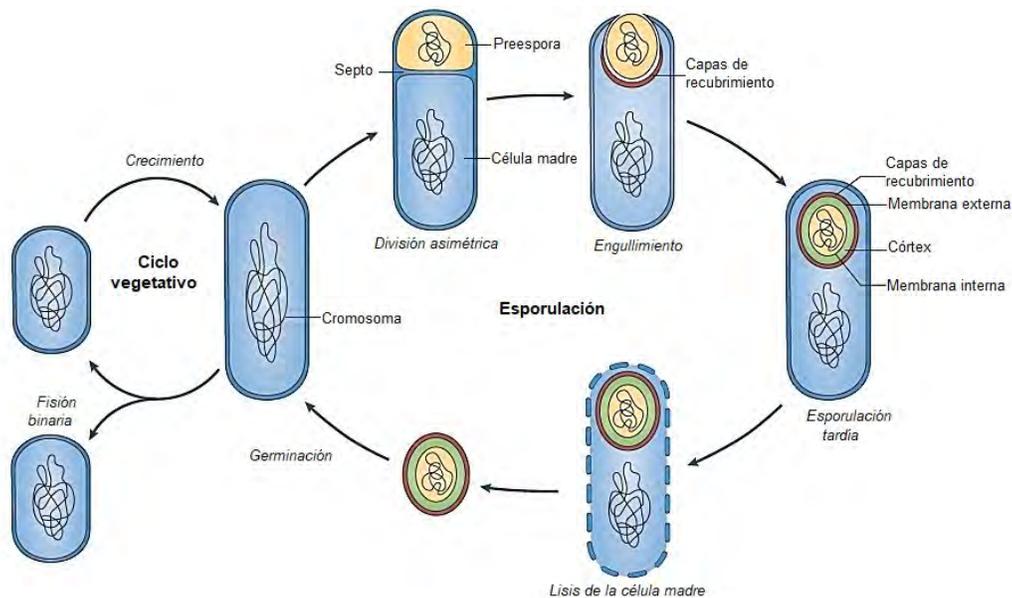


Figura 3. Ciclo de esporulación y germinación en *B. subtilis*.  
Modificado de: McKenney *et al.*, 2013.

Aunque las endosporas se encuentran en otros géneros como *Amphibacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporohalobacter*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina*, *Sulfidobacillus* y *Syntrophospora*, las endosporas de *Bacillus* son las más estudiadas y aplicadas a trabajos de investigación por su fácil manejo. Además, este género tiene grandes implicaciones en campos como la medicina en la desinfección de material quirúrgico y de curación, en la agricultura como agente de control biológico de hongos en suelo y otras bacterias, en la industria alimentaria para el control de la producción de toxinas, así como en procesos de desinfección y bioseguridad sobre superficies y materiales sólidos y finalmente, se ha empleado en ensayos como indicador para la remoción de otros microorganismos (Driks y Eichenberger, 2016).

## 2.3 Desinfección

La desinfección es el último proceso unitario del tratamiento del agua y tiene como objetivo garantizar la calidad microbiológica de la misma. Este proceso es imprescindible para la protección de la salud pública y de suma importancia, principalmente en aguas que están destinadas al consumo o la reutilización (Fernández-Alba *et al.*, 2006).

Para efectuar esta tarea, se han empleado métodos de desinfección tanto físicos y químicos que permiten destruir a los microorganismos que usan el agua como vehículo pasivo (Rojas-Valencia *et al.*, 2008). En la tabla 2 se comparan los mecanismos de acción de las principales aplicaciones de los desinfectantes empleados en aguas.

Tabla 2. Ejemplos de desinfectantes y su principal aplicación (Rojas-Valencia *et al.*, 2008).

Tipo	Ejemplos	Aplicación
Físico	UV	Los microorganismos son inactivados por la luz UV como resultado del daño fotoquímico que sostiene el material genético.
	Filtración	Sólo retiene a los microorganismos, no les causa daño.
	Sedimentación	Se retienen esporas y los huevos de helmintos; sin embargo, no se remueven patógenos de menor tamaño.
Químico	Cloro	Oxidación de grupos funcionales de las enzimas.
	Ozono	La oxidación o destrucción directa de la pared de la célula, daño a los componentes de los ácidos nucleicos y ruptura de las uniones de carbono-nitrógeno.
	Peróxido de hidrógeno	Es efectivo contra esporas y virus, produce radicales libres H y OH, por lo que oxida y reduce los grupos funcionales de las enzimas.
	Ácido peracético	Es esporicida a bajas temperaturas; su efectividad permanece inalterable ante la presencia de materia orgánica.

Un desinfectante se define como un germicida que inactiva prácticamente todos los organismos patógenos, pero no necesariamente elimina todas sus formas. Estos pueden no ser eficientes contra las endosporas bacterianas o quistes de protistas (DEHS, 2008).

Teóricamente, la acción desinfectante de las sustancias químicas se realiza en dos etapas: la primera se refiere a la penetración del desinfectante a través de la pared celular y la segunda a la inhibición de la acción enzimática que controla el metabolismo y al daño en el DNA de la célula (Vargas, 2004).

De acuerdo con Vargas (2004), existen algunas consideraciones que permiten realizar el proceso de desinfección en el agua con mayor eficiencia, estos se describen a continuación:

- Agitación durante el proceso: para evitar que las bacterias formen aglomerados celulares que impidan el contacto con el desinfectante, es necesario favorecer la distribución uniforme de los microorganismos mediante la agitación.
- Naturaleza y concentración del desinfectante: es necesario considerar que el cloro y derivados pueden formar en el agua una serie de productos de diferente eficiencia desinfectante. Así mismo, la concentración del desinfectante determinará el tiempo de contacto necesario para destruir todos los microorganismos presentes en el agua.
- Calidad del agua: evitar la materia en suspensión que pueda proteger a los microorganismos, así como la materia orgánica que pueda reaccionar con los desinfectantes químicos y cambiar su estructura.
- pH: la acción de los desinfectantes químicos es fuertemente influenciada por el pH del agua. Cada desinfectante tiene un rango de pH de mayor efectividad; sin embargo, la práctica demuestra que cuanto más alcalina es el agua requiere mayor dosis de desinfectante para una misma temperatura y tiempo de contacto.
- Tiempo de contacto: cuanto mayor es el tiempo de contacto, mayor será la posibilidad de destrucción de los microorganismos para una cierta dosis de desinfectante.

Los compuestos químicos usados en la desinfección del agua son, por lo general, oxidantes eficientes en la eliminación de los microorganismos y pueden dejar remanentes tóxicos en el agua que permiten garantizar la desinfección por más tiempo. El ejemplo más común es el cloro (Fernández-Alba *et al.*, 2006).

### **2.3.1 Cloración**

En todo el mundo, el mecanismo de desinfección más aplicado en los sistemas de tratamiento y abastecimiento de agua es el que emplea cloro y sus compuestos derivados como agentes desinfectantes (Méndez y Solsona, 2002).

La clave del éxito del cloro es su alta capacidad oxidante que reúne todas las características necesarias de un buen desinfectante de aguas. Algunas de estas ventajas son su amplia disponibilidad (líquido, gas o polvo), posee una acción germicida de espectro amplio, mantiene un efecto residual que previene de una contaminación futura, se maneja fácilmente, su dosificación es práctica y es económicamente accesible. Algunas de sus sales más usadas son el hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) y el hipoclorito de calcio ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ), cuya eficiencia bactericida es idéntica a la del cloro y producen reacciones similares en el agua. Todo esto permite en forma bastante simple asegurar la calidad del agua, por lo que el uso del cloro es muy frecuente tanto en sistemas pequeños como en redes de grandes ciudades (Méndez y Solsona, 2002).

De acuerdo con Vargas (2004), durante el proceso de cloración ocurren una serie de reacciones que permiten comprender el proceso de desinfección y la importancia que tiene la presencia de las diversas formas del cloro en el agua (Figura 4).

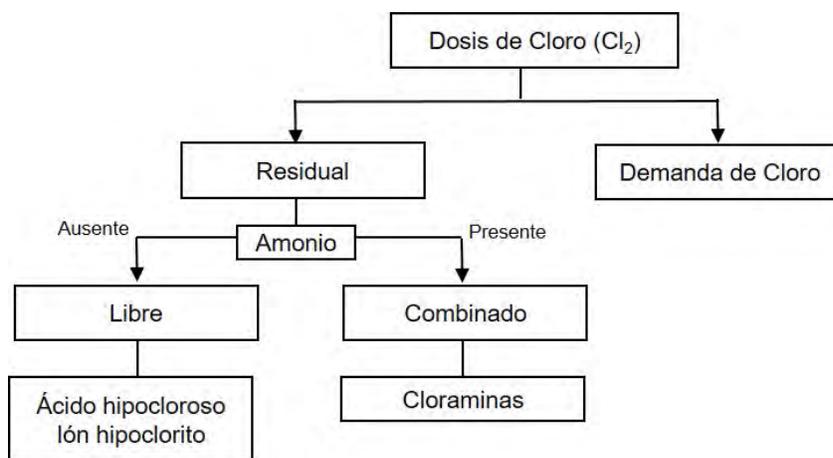


Figura 4. Formas del cloro presentes en agua. Modificado de Vargas (2004).

Después de que se agrega la dosis de cloro al agua, la primera reacción que ocurre es la combinación rápida del cloro con agentes reductores, metales y compuestos orgánicos, es decir, se satisface la demanda de cloro. Después de que se contabiliza la demanda de cloro, la concentración remanente se denomina cloro residual.

El cloro residual puede ser libre o combinado y esta reacción dependerá de la ausencia o presencia de amonio en el agua.

En aguas sin amonio se forma el cloro residual libre (ácido hipocloroso e ion hipoclorito) que es la concentración de cloro disponible para la desinfección de contaminaciones futuras durante el almacenamiento o distribución, por lo tanto, es una medida para determinar y garantizar la calidad del agua. En caso contrario, cuando hay presencia de amonio se forma el cloro residual combinado, el cual no está disponible para la desinfección porque el cloro ha reaccionado con nitratos u otros compuestos nitrogenados produciendo monoclорaminas, dicloroaminas y tricloruro de nitrógeno, sustancias consideradas potencialmente cancerígenas (Vargas, 2004).

La concentración y presencia de cloro residual libre y combinado depende del pH, proporción cloro-nitrógeno, tiempo de reacción; y ambos pueden encontrarse simultáneamente en el agua. Sin embargo, el exceso de cloro residual podría resultar perjudicial, ya que se induce a la formación de subproductos organoclorados,

que son tóxicos y carcinogénicos. Por esta razón, para que la desinfección sea eficaz, la Organización Mundial de la Salud recomienda una concentración de cloro residual libre mayor o igual a 0.5 mg/L, después de un tiempo de contacto de al menos 30 minutos a un pH menor a 8.0. En aguas residuales no se suele establecer diferenciación entre cloro libre y cloro combinado, debido a que la cloración de aguas residuales raramente alcanza el nivel suficiente para producir cloro libre (Fernández-Alba *et al.*, 2006).

Las dosis típicas de cloro para una desinfección de aguas residuales son aproximadamente entre 5 y 30 mg/L y de 30 a 60 minutos de tiempo de contacto y por lo general son necesarias para cumplir con los permisos de los indicadores bacterianos convencionales (Lazarova, 1999). Además, es necesario conocer el pH del agua porque cuanto más alcalina sea mayor será el tiempo de contacto necesario o mayor será la concentración de cloro libre residual al final del tiempo de contacto necesario para una desinfección adecuada (0.4-0.5 mg/L a pH 6-8 aumenta a 0.6 mg/L a pH 8-9). La cloración puede ser ineficaz si el pH es superior a 9 (OMS, 2011).

### **2.3.2 Hipoclorito de sodio**

Es un líquido de color verde amarillento con alto poder oxidante; tiene un promedio de 12% de cloro activo. Se produce a partir de la cloración del hidróxido de sodio (sosa cáustica), y se distribuye en depósitos de plástico o vidrio. Su mecanismo de acción como desinfectante confiere daño a la membrana celular, y conduce a una inhibición enzimática (Vargas, 2004).

De acuerdo con Méndez y Solsona (2002), el NaClO cumple con todas las características de un buen desinfectante de aguas como derivado del cloro: destruye los microorganismos en un tiempo razonable, en las dosis permitidas no constituye riesgos para los animales y humanos, es de fácil aplicación y deja un efecto residual persistente que protege el agua. Algunas de sus desventajas son que es corrosivo e inestable, pierde su efectividad al someterlo a altas temperaturas o al estar expuesto a la luz solar, puede formar compuestos organoclorados y su constante uso ocasiona resistencia bacteriana.

### 3 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad las aguas residuales se utilizan frecuentemente para la agricultura o actividades recreativas, principalmente en regiones que poseen un limitado abastecimiento. Por esta razón, es necesario desarrollar tratamientos que logren una mayor eficiencia de desinfección del agua y que permitan remover la mayor cantidad de microorganismos posible, incluso aquellos que posean estructuras de resistencia.

La destrucción de las endosporas se ha investigado principalmente en los géneros *Bacillus* y *Clostridium* con objetivos médicos, ya que al entrar en contacto directo con las personas pueden provocar algunas enfermedades asociadas con infecciones de la piel, intoxicaciones alimentarias y alteraciones gastrointestinales (Murray *et al.*, 2002). Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre la remoción de endosporas se han realizado en sólidos, metales o material de curación, pero no enfocado directamente al tratamiento de aguas. Por lo tanto, las investigaciones realizadas sobre desinfección de endosporas tienen gran importancia en la salud debido a su presencia en el agua, residuos sólidos y desechos en el ambiente.

Se toma como referencia a *B. subtilis*, puesto que es el modelo genético de bacterias Gram positivas y se ha empleado en numerosos estudios *in vitro* debido a su fácil manejo (Setlow, 2006). Además, los ensayos de inactivación de endosporas de *B. subtilis* son utilizados como indicadores potenciales para la remoción de endosporas de *B. cereus* y *B. anthracis* y de quistes de algunos protistas como *C. parvum* y *G. lamblia*, que son patógenos de animales y humanos (Radziminski *et al.*, 2002). También se considera el empleo del NaClO ya que es el desinfectante más utilizado para el tratamiento de aguas residuales por su amplia disponibilidad, es económicamente accesible y de fácil manejo (Méndez y Solsona, 2002).

Por tanto, la presente investigación tiene como propósito realizar pruebas experimentales con *B. subtilis* que permitan establecer condiciones óptimas para la remoción de endosporas y células vegetativas, mediante el empleo de hipoclorito de sodio a diferentes pH, concentraciones y tiempos de contacto, para crear un tratamiento de cloración consecutivo. Los resultados permitirán crear perspectivas en el mejoramiento de la calidad del agua y su adecuado tratamiento.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 General**

Evaluar la eficiencia del hipoclorito de sodio en la remoción de endosporas y células vegetativas de *B. subtilis* mediante la exposición a diferentes condiciones de pH, concentración y tiempo de contacto del desinfectante, para establecer un tratamiento de cloración consecutiva que mejore la desinfección del agua.

### **4.2 Particulares**

- 1) Producir una suspensión de endosporas de una cepa certificada de *B. subtilis*.
- 2) Obtener las condiciones óptimas de remoción de endosporas a diversos pH, concentración y tiempo de contacto mediante la desinfección con hipoclorito de sodio.
- 3) Estandarizar el proceso de germinación de endosporas para obtener células vegetativas.
- 4) Evaluar la eficiencia de un tratamiento de cloración consecutiva mediante la desinfección de endosporas, germinación de endosporas remanentes y desinfección de células vegetativas.

## **5 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Activación de la cepa certificada.**

La cepa que se utilizó en este trabajo fue *B. subtilis* ATCC® 19659™ (American Type Culture Collection), destinada únicamente para fines de investigación. Se ha usado en proyectos que se basan en pruebas de agentes antimicrobianos, pruebas de esporulación, así como referencia en el control de calidad de las endosporas. Dicha cepa fue empleada por Radziminski *et al.* (2002) para desinfección de endosporas con dióxido de cloro.

De la cepa certificada se tomaron tres asadas para inocular tubos de vidrio con tapón de rosca que contenían 3 mL de caldo nutritivo; posteriormente los tubos se agitaron suavemente y se incubaron durante 48 horas a 37 °C.

Después de la incubación, se seleccionaron los tubos que presentaron un mayor crecimiento bacteriano; estos se resembraron mediante la técnica de estría cruzada en cajas Petri con agar nutritivo. Posteriormente se incubaron a 37 °C durante 48 horas.

### **5.2 Producción de endosporas a partir de células vegetativas**

Para la producción de endosporas, se prosiguió conforme al método 966.04 (Prueba de actividad esporicida de desinfectantes) establecido por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2006). Los pasos se detallan a continuación:

- a) A partir de un cultivo puro, se obtuvo una muestra de las colonias de *B. subtilis* para inocular tubos con tapón de rosca con 10 mL de caldo nutritivo, se agitaron suavemente y se incubaron a 37 °C durante 48 horas.
- b) De los tubos con mayor crecimiento bacteriano, se tomaron muestras de 500 µL y se sembraron 50 cajas por extensión en placa en agar nutritivo. Posteriormente, las cajas se sellaron con parafilm y se incubaron de manera invertida a 37 °C durante 14 días.

- c) Para obtener las endosporas, se agregaron 5 mL de solución salina isotónica (SSI) estéril fría (0.85% de cloruro de sodio) a cada placa. Se realizaron movimientos circulares suaves y después, se succionó la suspensión de cada caja con una pipeta estéril y se depositó en tubos de centrifuga.
- d) Los tubos se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Enseguida, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento de cada tubo con 5 mL de SSI fría. Los tubos se agitaron hasta disolver el botón y se centrifugaron dos veces más a 4000 rpm durante 5 minutos.
- e) Después de los tres lavados, se adicionó 3 mL de solución salina a cada tubo para disolver el botón y posteriormente la suspensión de endosporas se conservó en refrigeración a 5 °C.
- f) Finalmente, para evaluar la calidad y cantidad de las endosporas se realizó una tinción y observación en microscopio de contraste de fases.

### **5.3 Tinción de endosporas por la técnica verde de malaquita**

Para esta técnica se prosiguió conforme al protocolo de Granados y Villaverde (1997), que a continuación se describe:

- a) Se preparó un frotis a partir de la suspensión de endosporas sobre un portaobjetos limpio.
- b) Se le agregó la solución verde de malaquita al 5% y se colocó un trozo de papel filtro sobre el frotis para agregar más colorante.
- c) Con ayuda de unas pinzas, se colocó el portaobjetos durante 7 minutos sobre la boca de un vaso de precipitado con agua hirviendo y se le agregó más colorante de manera constante para evitar que la muestra se seque.
- d) Con una piseta, se lavó la muestra con agua hasta eliminar el exceso de colorante.
- e) En seguida, se cubrió la preparación con la solución de safranina al 5% y se dejó actuar el colorante durante un minuto.
- f) Posteriormente, se lavó la muestra con agua hasta eliminar el exceso de colorante y se dejó secar al aire.

- g) Por último, se observó la preparación al microscopio en contraste de fases con el objetivo 100X y aceite de inmersión.

**Interpretación de resultados:** Las esporas se observan teñidas de color verde y las formas bacilares de color rosa.

#### **5.4 Conteo de células viables cultivables a partir de endosporas**

Con la finalidad de estimar la cantidad de células viables cultivables que germinan a partir de la suspensión de endosporas colectada, se realizaron diluciones decimales seriadas de acuerdo la NOM-110-SSA1-1994 (DOF, 1994a).

- a) En condiciones de asepsia, se agregó 9 mL de SSI al 0.85% a cada tubo de ensaye y se rotularon con la numeración correspondiente.
- b) De la suspensión de endosporas previamente agitadas con vórtex, se tomó 1 mL y se agregó al primer tubo que corresponde a la dilución  $1 \times 10^{-1}$ .
- c) Enseguida se tomó 1 mL del primer tubo y se añadió al segundo que corresponde a la dilución  $1 \times 10^{-2}$ . Este proceso se repitió hasta llegar a la dilución  $1 \times 10^{-7}$ .
- d) Posteriormente, de cada tubo se tomaron 100  $\mu$ L de muestra y se sembraron por duplicado mediante la técnica de extensión en placa en cajas de agar nutritivo.
- e) Las cajas se incubaron de manera invertida a 37 °C durante 48 horas.

Transcurrido el periodo de incubación, se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) bajo los lineamientos establecidos por la NOM-092-SSA1-1994 (DOF, 1994b), que propone el método para el conteo de bacterias aerobias en placa. Los resultados se reportaron en UFC por mL.

## 5.5 Desinfección en endosporas con hipoclorito de sodio

Para conocer las condiciones de mayor remoción de endosporas se usó NaClO como desinfectante, y se probaron todas las posibles combinaciones de tres variables (pH, concentración y tiempo de contacto) (Tabla 3).

Tabla 3. Condiciones de pH, concentración y tiempo de contacto empleadas en la desinfección de endosporas con NaClO

pH	Concentración (mg/L)	Tiempo de contacto (minutos)		
		0	30	45
6	15	0	30	45
	20	0	30	45
	30	0	30	45
7	15	0	30	45
	20	0	30	45
	30	0	30	45
8	15	0	30	45
	20	0	30	45
	30	0	30	45

El protocolo de desinfección se desarrolló de la siguiente manera:

- En un matraz con 100 mL de agua destilada estéril se agregó 1 mL de la suspensión de endosporas y se ajustó el pH correspondiente (6, 7 ó 8) usando ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1 M.
- Se agregó la dosis de NaClO correspondiente (15, 20 y 30 mg/L) y se dejó actuar durante los tiempos establecidos en constante agitación (100 rpm).
- En cada tiempo de contacto (0, 30 y 45 min) se tomó una alícuota de 11 mL del contenido del matraz y se depositó en un vaso de precipitado; enseguida se agregaron 18  $\mu$ L de la solución de tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) al 3% para detener la acción del desinfectante.
- La medición del cloro residual libre se realizó con el fotómetro multiparamétrico HANNA Instrument (525 nm). Se colocó 10 mL del contenido del matraz en la celda y se equilibró el fotómetro. Después se le agregó el reactivo DPD HI 93701-0, se agitó durante 20 segundos (hasta observar un

tono rosa) y finalmente se insertó en el fotómetro para la lectura. La medición de este parámetro está basada en el método 4500-Cl G. DPD Colorimetric Method, en donde las formas del cloro (ion hipoclorito y ácido hipocloroso) liberan el yodo del yoduro de potasio; mismo que reacciona con la N, N-dietil-p-fenilendiamina (DPD) para producir un color rosa en la muestra. Esta técnica es aplicada en aguas naturales y tratadas que presentan concentraciones de cloro residual libre entre 0.2-4 mg/L (APHA, 2012).

- e) De forma simultánea, se realizaron las diluciones decimales seriadas de acuerdo con la NOM-110-SSA1-1994 (DOF, 1994a), previamente explicada, para lo cual se sembraron por duplicado 100 µL de cada dilución mediante la técnica de extensión en placa.
- f) Las cajas se incubaron de manera invertida a 37 °C durante 48 horas y posteriormente se realizó el conteo de UFC bajo los lineamientos establecidos por la NOM-092-SSA1-1994 (DOF, 1994b).

Para cada una de las condiciones se obtuvieron los valores según las siguientes ecuaciones:

$$\text{Unidades de inactivación} = -\text{Log} (N / N_0) \quad (\text{Ecuación 1})$$

Unidades de inactivación: donde N es el número de UFC que sobrevivieron en cada tiempo de contacto establecido y  $N_0$  es el número de UFC antes de la desinfección.

$$C_{Rt} = \text{Dosis (mg/L)} \times \text{Tiempo (minutos)} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$C_{Rt}$ : para unificar los valores de la concentración del desinfectante (mg/L) y el tiempo de contacto (minutos).

$$\%R = (T_0 - T_i) / T_0 \times 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Porcentaje de remoción de endosporas (%R): donde  $T_i$  es el conteo UFC en cada tiempo de contacto establecido y  $T_0$  es el número de UFC antes de la desinfección.

### **5.5.1 Análisis estadístico de desinfección de endosporas con NaClO**

Con la finalidad de comparar las variables consideradas en la desinfección de endosporas (pH, concentración y tiempo de contacto) se realizó una prueba ANOVA factorial con el 95% de confianza ( $p < 0.05$ ). Este análisis permite evaluar el efecto individual y el conjunto de dos o más factores (variables independientes) sobre una variable dependiente cuantitativa. Previamente, se realizó una prueba Kolmogorov-Smirnov para constatar la distribución normal de los datos y la prueba de Bartlett para la homogeneidad de varianzas. Finalmente, se realizaron comparaciones post hoc mediante una prueba Tukey, que es un procedimiento adicional al análisis de varianza, el cual permite comparar las diferencias entre medias de niveles de los factores.

Estos análisis se realizaron con el programa STATISTICA versión 7, 2004 (StatSoft, Inc. Data Analysis Software System).

## **5.6 Germinación de endosporas**

La germinación de las endosporas se realizó en dos fases mediante la combinación de los protocolos propuestos por Banfalvi (2011) y Alzahrani y Moir (2014):

### **Fase de pre-germinación**

- a) Se prepararon 5 tubos de centrífuga con 9 mL de la suspensión de endosporas. Se sonicaron a una frecuencia de 40 kHz a 37 °C durante 5 minutos, después, se calentaron a 70 °C durante 30 minutos y posteriormente, se colocaron en hielo durante 3 minutos.
- b) Enseguida, los tubos se centrifugaron a 5500 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y el botón de cada tubo se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril.
- c) Para contabilizar la cantidad de endosporas presentes hasta ese momento, se realizaron diluciones decimales seriadas de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994 (DOF, 1994a). De cada dilución se sembraron 100  $\mu$ L mediante la técnica de extensión en placa por duplicado en agar nutritivo.

## Fase de germinación

- a) En un matraz se preparó 100 mL del medio germinante constituido de:  
L-alanina (20 mmol), L-asparagina (30 mmol), fructosa (5.6 mmol), glucosa (5.6 mmol), cloruro de potasio (KCl, 20 mmol) y tris clorhidrato (Tris-HCl, 50 mmol).  
El medio se esterilizó por filtración y se ajustó a un pH de 8.4 y una temperatura de 37 °C.
- b) La suspensión de endosporas se añadió al matraz en condiciones de agitación (100 rpm).
- c) Posteriormente, se utilizó un espectrofotómetro para monitorear el proceso de germinación durante 2 horas (lapsos de 5 minutos), midiendo la absorbancia a una densidad óptica de 525 nm.

## 5.7 Tratamiento de desinfección

Con la finalidad de lograr una mayor eliminación de endosporas, se realizó un tratamiento continuo de desinfección empleando las mejores condiciones obtenidas tanto en los ensayos de desinfección (Sección 5.5) como en la prueba de germinación (Sección 5.6). Este proceso se realizó en tres fases como se muestra en el siguiente esquema (Figura 5):

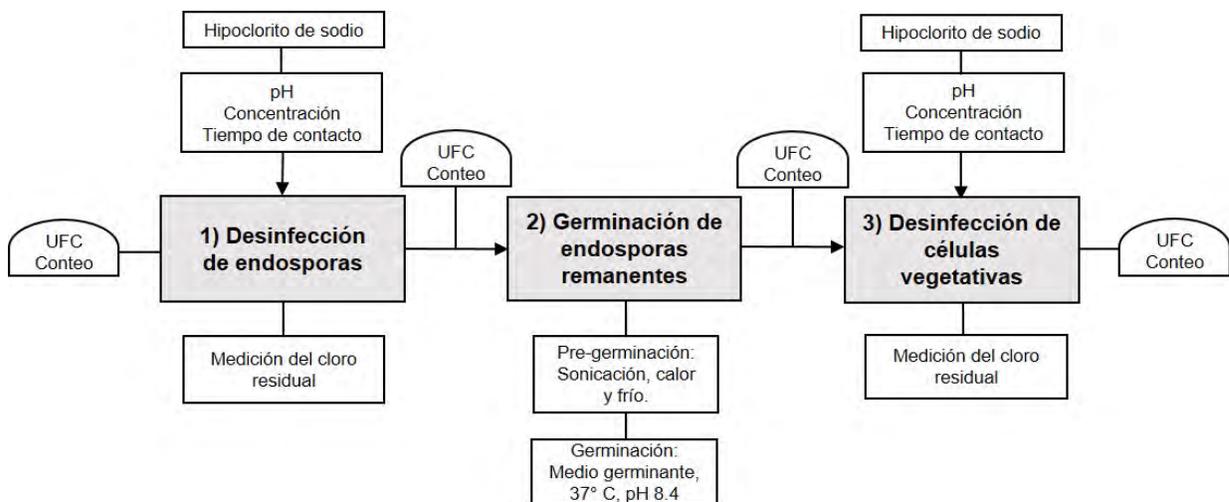


Figura 5. Esquema general del tratamiento de desinfección consecutivo con NaClO.

### **5.7.1 Desinfección de endosporas**

- 1) En un matraz con 100 mL de agua destilada estéril se agregó la suspensión de endosporas (previamente contadas), se ajustó el pH, se agregó la dosis del desinfectante y se dejó actuar durante los tiempos de contacto 0, 15, 30 y 45 minutos en constante agitación (100 rpm).
- 2) A los 15 y 30 minutos de tiempo de contacto se tomó una alícuota de 11 mL, se adicionó  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  al 3% para frenar la desinfección y se midió el cloro residual libre con el fotómetro HANNA Instrument. Este paso se repitió a los 45 minutos, para lo cual se frenó la desinfección en todo el matraz.
- 3) En cada tiempo, se realizó la técnica de diluciones decimales seriadas establecida en la NOM-110-SSA1-1994 (DOF,1994a), se sembró por triplicado 100  $\mu\text{L}$  de cada dilución mediante la técnica de extensión en placa (Sección 5.4).
- 4) El contenido remanente del matraz se depositó en tubos de centrifuga. Las endosporas se lavaron por triplicado, para lo cual los tubos se centrifugaron a 4500 rpm durante 10 minutos y después se resuspendieron con solución salina isotónica estéril.

### **5.7.2 Germinación de endosporas remanentes**

Se prosiguió conforme a los protocolos propuestos por Banfalvi (2011) y Alzahrani y Moir (2014) (Sección 5.6):

#### **Fase de pre-germinación**

- 1) Los tubos que contenían las endosporas remanentes se sonicaron a una frecuencia de 40 kHz a 37°C durante 5 minutos, se calentaron a 70°C durante 30 minutos, se colocaron en hielo por 3 minutos y después, se centrifugaron a 5500 rpm durante 10 minutos.
- d) Se realizó la técnica de diluciones decimales seriadas establecida en la NOM-110-SSA1-1994 (DOF,1994a). De cada dilución se sembraron 100  $\mu\text{L}$  mediante la técnica de extensión en placa por triplicado en agar nutritivo.

### **Fase de germinación**

- 1) En un matraz se preparó el medio germinante ya descrito, a una temperatura de 37 °C y pH 8.4, y luego se añadió la suspensión de endosporas y se mantuvo en agitación (100 rpm).
- 2) Se monitoreó la absorbancia a una densidad óptica de 525 nm en periodos de 5 minutos durante 45 minutos.
- 3) De las muestras obtenidas a los tiempos 0, 15, 30 y 45 minutos se realizaron diluciones decimales seriadas de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994 (DOF,1994a), se sembró por triplicado 100 µL de cada dilución mediante la técnica de extensión en placa.
- 4) El contenido restante del matraz se depositó en tubos, los cuales se centrifugaron a 4500 rpm durante 10 minutos (3 repeticiones) y después se resuspendieron con solución salina (0.85%) para eliminar cualquier residuo del medio de germinación.

### **5.7.3 Desinfección de células vegetativas**

Se repitió el mismo protocolo de la sección 5.7.1, que emplea las mismas condiciones de pH, concentración y tiempos de contacto en la desinfección de endosporas.

- 1) En un matraz con 100 mL de agua destilada estéril se agregó la suspensión de células vegetativas resultantes de la germinación (previamente contadas), se ajustó el pH, se agregó la dosis del desinfectante y se dejó actuar durante los diferentes tiempos de contacto 0, 15, 30 y 45 minutos en constante agitación (100 rpm).
- 2) A los 15, 30 y 45 minutos de tiempo de contacto se tomó una alícuota de 11 mL, se adicionó Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> al 3% para frenar la desinfección y se midió el cloro residual libre con el fotómetro HANNA Instrument.

3) En cada tiempo, se realizó la técnica de diluciones decimales seriadas establecida en la NOM-110-SSA1-1994 (DOF, 1994a), se sembró por triplicado 100  $\mu$ L de cada dilución mediante la técnica de extensión en placa.

Finalmente, todas las cajas se incubaron de manera invertida a 37 °C durante 48 horas y pasando este lapso de tiempo, se realizó el conteo de UFC bajo los lineamientos establecidos por la NOM-092-SSA1-1994 (DOF, 1994b), que propone el método para el conteo de bacterias aerobias en placa. Los resultados del conteo se reportaron en UFC por mL,  $\text{Log}_{10}$  y se obtuvieron los porcentajes de remoción.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Obtención de endosporas de *Bacillus subtilis*

La activación de la cepa permitió corroborar que el cultivo era axénico y viable. Después de 14 días de incubación se realizó la colecta de endosporas de 50 cajas sembradas con *B. subtilis* y se logró obtener 25 mL de suspensión con una concentración promedio de  $1.28 \times 10^{11}$  endosporas/mL, equivalente a 11.10 Log (Anexo D). Esta cifra superó la concentración sugerida en el protocolo de la AOAC (2006), que establece como referencia obtener una concentración de  $1 \times 10^9$  endosporas/mL por cada diez placas sembradas. Evidentemente, el aumento de la concentración obtenida estuvo en función al número de cajas sembradas, así como el tamaño y la cantidad de agar de las mismas. Además, el sellado de las cajas con parafilm ayudó a evitar la deshidratación del agar, por lo que el grosor se mantuvo casi sin alteración.

La tinción y observación al microscopio en contraste de fases (Figura 6), permitió confirmar que la suspensión de endosporas estaba constituida por un 95% de estas con respecto al número de células vegetativas, como lo sugiere la AOAC (2006).

La suspensión de endosporas se destinó a realizar las diferentes pruebas de desinfección con NaClO, el ensayo de germinación y el tratamiento de desinfección consecutivo.

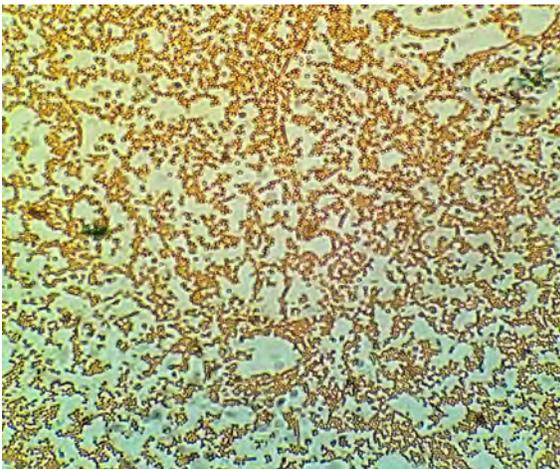


Figura 6. Relación de la cantidad de endosporas (formas esféricas) con respecto a las células vegetativas (cuerpos bacilares) de *B. subtilis* (1000X). Fuente: propia.

De acuerdo a Demidova y Hamblin (2005), la esporulación se inicia cuando las bacterias se encuentran en un ambiente de estrés, con bajos niveles de nutrientes o cualquier otra condición desfavorable para su supervivencia; en este caso, el factor de inicio para la formación de endosporas fue la escasez de nutrientes en el agar después de dos semanas de incubación.

La conversión de una célula vegetativa en endospora, puede durar alrededor de ocho horas en laboratorio y tiene una alta eficiencia, con lo que se logra la esporulación en más del 75% de las células en un cultivo (Setlow, 2005).

## 6.2 Desinfección en endosporas con hipoclorito de sodio

De todos los tratamientos a diferentes pH (6, 7 y 8), con concentraciones de NaClO de 15, 20 y 30 mg/L y tiempos de contacto de 0, 30 y 45 minutos probados, la mayor remoción de endosporas se presentó a pH 6, concentración de 30 mg/L y 45 minutos de contacto, con la eliminación de 6.27 Log (Anexo E). Esto es equivalente al 55.63% de remoción de la concentración inicial de endosporas ( $1 \times 10^{11}$ ). Bajo estas mismas condiciones el valor del cloro residual libre fue de 0.27 mg/L (Tabla 4).

Sin embargo, a pH 7 se obtuvo una remoción similar (6.02 Log), pero con un valor del cloro residual libre que se encuentra dentro de la normativa (1.83 mg/L), por lo tanto, estas condiciones también pueden ser consideradas óptimas, puesto que las aguas residuales tratadas, en su mayoría, llegan al proceso de desinfección con un pH entre 7 y 8.

Por el contrario, la menor remoción de endosporas se obtuvo en el tratamiento a pH 8, concentración de 15 mg/L y 30 minutos de contacto, con la inactivación de 1.75 Log, que representa el 15.74% de remoción.

Tabla 4. Unidades de Inactivación  $-\text{Log}(N/\text{No})$ , porcentajes de remoción (%R) y cloro residual libre (CRL) durante la desinfección de endosporas de *B. subtilis* con NaClO.

Concen- tración (mg/L)	Tiempo (min)	Crt (mg-min/L)	pH 6			pH 7			pH 8		
			-Log (N/No)	% R	CRL (mg/L)	-Log (N/No)	% R	CRL (mg/L)	-Log (N/No)	% R	CRL (mg/L)
15	30	450	2.30	20.26	0.22	1.89	17.22	1.83	1.75	15.74	1.78
15	45	675	4.85	42.76	0.21	4.46	40.69	1.55	4.30	38.63	0.76
20	30	600	2.53	22.27	0.25	2.14	19.05	1.23	1.94	17.22	2.43
20	45	900	5.28	46.44	0.22	4.95	43.99	1.1	4.80	42.63	2.23
30	30	900	3.03	26.88	0.33	2.74	24.58	1.44	2.18	19.42	2.25
30	45	1350	6.27	55.63	0.27	6.02	54.14	1.83	5.53	49.2	2.05

El mayor porcentaje de remoción de este trabajo difiere a lo reportado por Sagripanti y Bonifacino (1996) quienes emplearon NaClO a pH 7, a una concentración de 500 mg/L y después de 30 minutos de contacto ( $C_{Rt}$ : 15,000), lograron inactivar 99.9% de endosporas de *B. subtilis* con una concentración inicial de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Evidentemente, el factor que más influyó para remover casi la totalidad de endosporas fue emplear una dosis 16 veces mayor a lo reportado en este trabajo, ya que numerosos estudios han demostrado que los aumentos en la concentración del desinfectante promueven la remoción microbiana (Sobsey, 1989).

Las unidades de inactivación obtenidas en las condiciones de mayor remoción son superiores a los resultados de Radziminski *et al.* (2002), que luego de emplear cloro en una concentración similar, pH 6 y después de 50 minutos de contacto ( $C_{Rt}$ : 1,500) removieron únicamente 2 Log de una carga inicial de  $2 \times 10^8$  UFC/mL endosporas de *B. subtilis*. También reportaron un valor mayor de cloro residual libre, 0.8 mg/L en sus experimentos.

De la misma manera, las unidades de inactivación de este trabajo son mayores a lo reportado por DeQueiroz y Day (2008), quienes aplicaron una solución de NaClO de 25,000 mg/L y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) de 2,500 mg/L sobre superficies contaminadas con endosporas de *B. subtilis* con una concentración inicial de 5.7- 6.6 Log UFC/cm<sup>2</sup>. A pesar de que implementaron una combinación de dos desinfectantes en grandes concentraciones, sólo lograron eliminar 5 Log en un lapso de 5 minutos ( $C_{Rt}$ : 125,000).

En la Figura 7 se observa que el efecto esporicida del NaClO del presente trabajo está influenciado por el pH, la concentración del desinfectante y el tiempo de contacto del mismo.

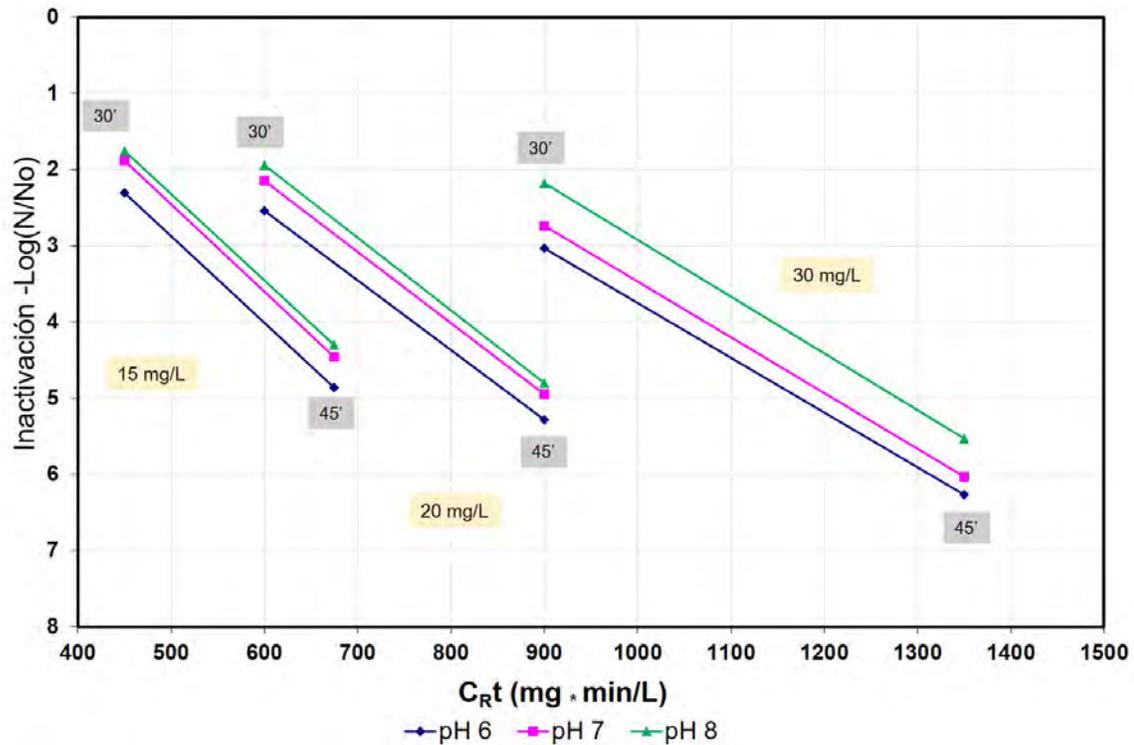


Figura 7. Unidades de Inactivación  $-\log(N/N_0)$  de endosporas de *B. subtilis* con NaClO a pH 6, 7 y 8; concentraciones 15, 20 y 30 mg/L; tiempo de contacto 30 y 45 minutos.

De todas las condiciones probadas experimentalmente, la mayor remoción se logró en el pH más bajo. Esto concuerda con los resultados de Rice *et al.* (2005), quienes probaron la efectividad del NaClO a diferentes pH (7, 7.5, 8 y 8.5) y lograron una mayor remoción de endosporas de *B. cereus* y *B. thuringiensis* en el menor pH.

En el caso del tratamiento de aguas, cuanto más alcalina sea el agua mayor será el tiempo de contacto necesario para una desinfección adecuada (OMS, 2011). Esto se debe a que cuando el pH oscila alrededor de 4 a 6 se presenta la fracción más activa del cloro que es el ácido hipocloroso (HClO); por el contrario, cuando el pH del agua se encuentra entre 8 y 9 abunda la fracción menos efectiva, que es el ion hipoclorito (ClO<sup>-</sup>). La especie desinfectante es el ácido hipocloroso (HClO), el cual al disociarse adquiere sus propiedades oxidantes, mismas que son por lo menos 80 veces mayores que la del hipoclorito (ClO<sup>-</sup>) (Vargas, 2004).

Sin duda, la concentración del desinfectante es importante porque permite lograr una desinfección eficiente en menor tiempo. Como lo demuestran Sagong *et al.* (2013), que usaron 200 mg/L de cloro ( $\text{Cl}_2$ ) para remover casi 2 Log de endosporas de *B. cereus* en verduras después de 5 minutos ( $\text{C}_{\text{RT}}$ : 1,000). Así también, Muhammad *et al.* (2013) emplearon una concentración de 50,000 mg/L de NaClO logrando inactivar 7 Log de endosporas de *B. atrophaeus* en tan solo 10 minutos de contacto ( $\text{C}_{\text{RT}}$ : 500,000).

Para este trabajo, se comprobó experimentalmente que la determinación de estos factores incide directamente en la desinfección. Así mismo, se observó que a menor pH, mayor concentración de NaClO y mayor tiempo de contacto, se obtiene más inactivación de endosporas.

De acuerdo con la OMS (2011) la presencia de cloro residual libre en el agua indica que inicialmente se agregó una cantidad suficiente de cloro para inactivar los microorganismos y que el agua está protegida contra la contaminación futura durante el almacenamiento. Ahora bien, considerando la cantidad de cloro residual libre en las condiciones que mostraron mayor remoción, se observa que 0.27 mg/L se encuentra por debajo de los valores que establece la OMS. Sin embargo, aunque la presencia del cloro residual libre permite garantizar la calidad del agua, este trabajo demuestra que para la inactivación de endosporas no es así, puesto que, a pesar de haber un valor considerable de este parámetro, se eliminó únicamente el 55.63 % de la concentración inicial de endosporas.

Se ha reportado que en presencia de valores altos de cloro residual libre es posible eliminar hasta 4 Log de endosporas, como lo demostraron Rice *et al.* (2005), que removieron endosporas de *B. cereus* y *B. thuringiensis* con registro de 2.0 mg/L de cloro residual libre. También, con cifras mucho más altas (entre 1,160 y 2,850 mg/L) Muhammad *et al.* (2014) eliminaron hasta 7 Log de endosporas de *B. atrophaeus*.

El mecanismo de eliminación de endosporas de *B. subtilis* con NaClO no ocurre por el daño en el DNA, sino por el deterioro severo en la membrana interna de la endospora que las hace defectuosas para continuar con la germinación. Las endosporas que han quedado inactivadas con NaClO no pueden iniciar el proceso de germinación ni con nutrientes ni ningún otro factor, pero, aunque algunas veces pueden experimentar los pasos iniciales en la germinación, no pueden activar su metabolismo. Sin embargo, si después de la cloración el daño es insuficiente, las endosporas germinan y continúan con su metabolismo (Young y Setlow, 2003).

### 6.2.1 Análisis estadístico de desinfección de endosporas con NaClO

De acuerdo con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y de Bartlett, los datos sí presentaron una distribución normal y pasaron la prueba de homogeneidad de varianzas.

Mediante el ANOVA factorial las variables independientes presentaron diferencias significativas durante las pruebas de desinfección; éstas variables son el pH y la concentración (Tabla 5).

Tabla 5. Valores del análisis ANOVA factorial representando las variables y sus combinaciones.

Variables	Grados de libertad	Fisher	$p (< 0.05)$
pH	2	17.01	0.00
Tiempo	1	0.00	0.92
Concentración	2	6.36	0.00
pH+Tiempo	2	0.00	0.99
pH+Concentración	4	2.05	0.12
Tiempo+Concentración	2	0.00	0.99
pH+Tiempo+Concentración	4	0.00	1.00

El análisis realizado con la prueba de Tukey (Figura 8) muestra que el nivel pH 6 tiene una diferencia con respecto al pH 7 y pH 8. Este resultado, concuerda con los datos antes presentados, que corroboran que el cloro tiene una mayor actividad esporicida entre un pH 4 y 6 por la formación de ácido hipocloroso (HClO) (Vargas, 2004).

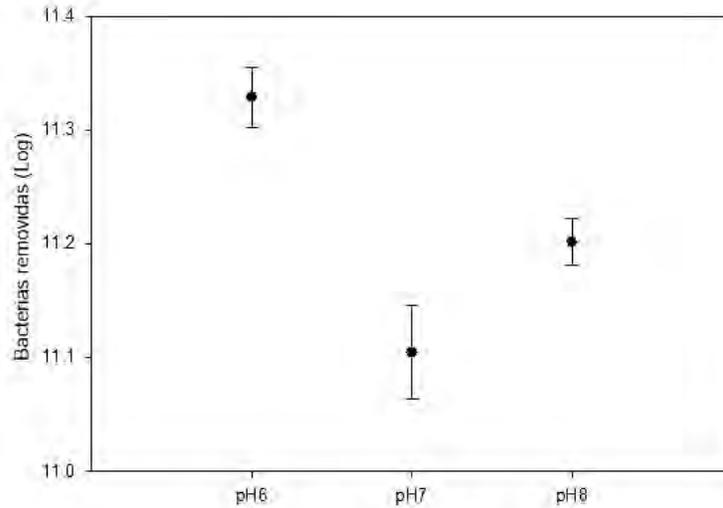


Figura 8. Prueba Tukey para el factor pH.

Por otro lado, la concentración de 20 mg/L muestra una diferencia con respecto a las concentraciones 15 y 30 mg/L (Figura 9). Esta concentración de hipoclorito de sodio se ha reportado también para en la remoción de cepas bacterianas aisladas de una planta de tratamiento de aguas residuales (Martínez-Hernández *et al.*, 2013).

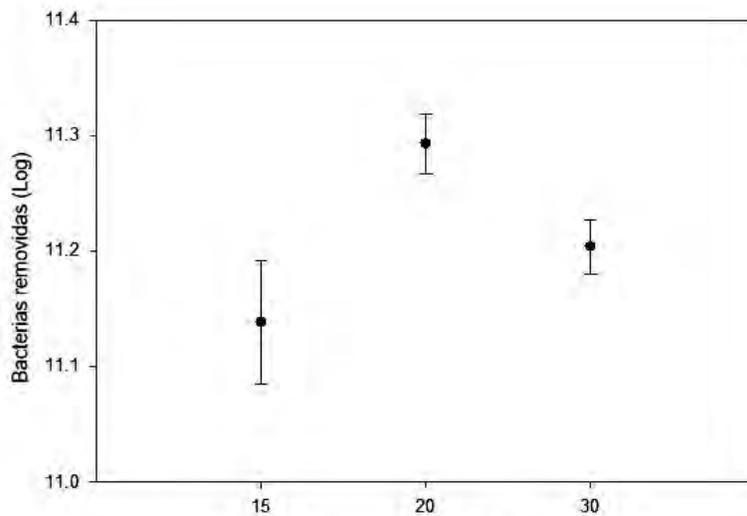


Figura 9. Prueba Tukey para el factor concentración (mg/L).

## 6.3 Germinación de endosporas

### Pre-germinación

Esta fase se realizó con un botón inicial de endosporas de 9.62 Log y después de someterlas a sonicación, calor y frío se obtuvo un conteo final equivalente a 9.37 Log. Estos valores indican que el 2.62% de las endosporas fueron inviables después de pasar por estos procesos físicos (Tabla 6).

Tabla 6. Conteo de UFC de *B. subtilis* antes y después de la pregerminación.

Etapa	UFC/mL	Log (UFC/mL)	Porcentaje de viabilidad
Inicial	4.17x10 <sup>9</sup>	9.62	97.38%
Final	2.33x10 <sup>9</sup>	9.37	

Durante esta etapa las endosporas sufren deterioro físico en las capas externas y el *exosporium* que las predisponen para la germinación (Banfalvi, 2011).

### Germinación

Como ya se mencionó, el proceso de germinación es la transición de una endospora a una célula vegetativa (Leggett *et al.*, 2012). En la Figura 10 se muestran los valores de las absorbancias registradas en lapsos de 5 minutos durante el proceso de germinación, donde las endosporas se sometieron a un medio rico en nutrientes. La germinación puede desencadenarse por cambios de temperatura (pre-germinación), presión hidrostática y una variedad de productos químicos, principalmente nutritivos. Sin embargo, en el ensayo se empleó la L-alanina, considerado como uno de los mejores agentes germinantes (Setlow y Johnson, 2012).

De acuerdo con Russell (1990) y Banfalvi (2011), cuando los valores de las absorbancias son equivalentes o cercanas a cero, es porque se ha logrado la germinación de todas las endosporas. Por lo tanto, la fase de germinación en este trabajo se logró a los 45 minutos, indicando que, a este tiempo las endosporas derivaron a células vegetativas (Figura 10).

Después de los 45 minutos se observó un ligero incremento en la absorbancia, esto indica que las endosporas recién germinadas se encuentran en el proceso de hinchamiento, donde aumentan su tamaño, vierten sus capas, reactivan su metabolismo, y en poco tiempo las células vegetativas que emerjan se encontrarán listas para dividirse (Russell, 1990).

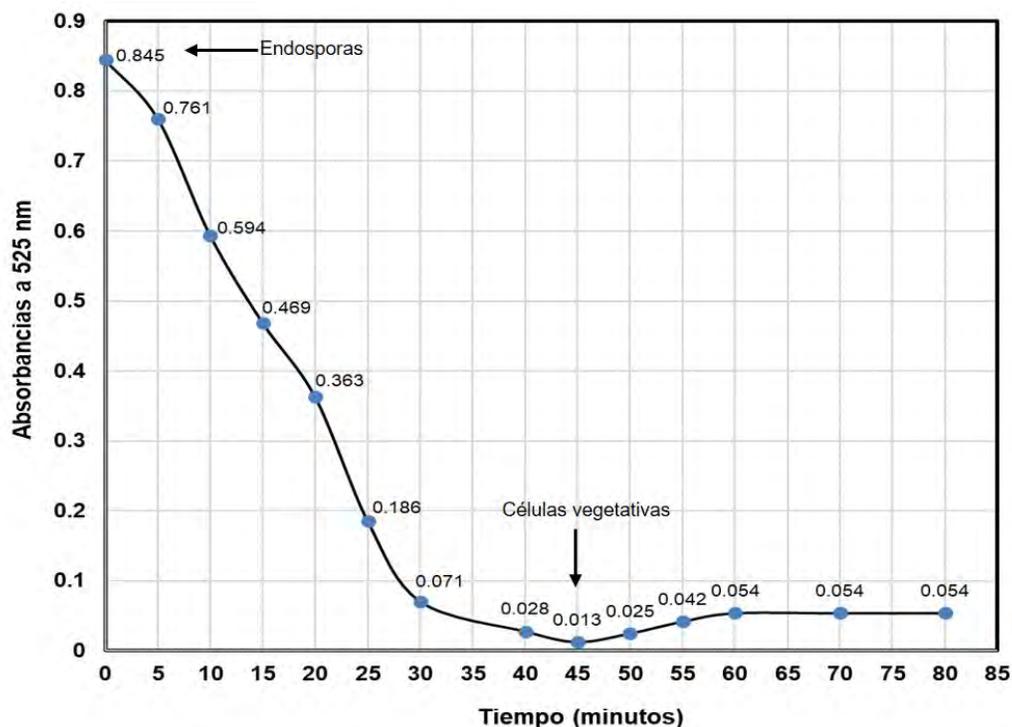


Figura 10. Absorbancias registradas a diferentes tiempos durante la prueba de germinación de endosporas de *B. subtilis*.

Como ya se mencionó, la germinación se logró a los 45 minutos. El tiempo fue menor comparado con los resultados de Alzahrani y Moir (2014), quienes emplearon los mismos nutrientes en el medio y lograron germinar endosporas de *B. subtilis* entre 60 y 80 minutos. Lo mismo sucedió con Chirakkal *et al.* (2002), quienes probaron un medio germinante similar y reportaron que a los 120 minutos obtuvieron la absorbancia (OD) más cercana a cero, en la germinación de endosporas de *B. subtilis*.

El proceso de germinación desencadena una serie de cambios en la célula que incluyen: pérdida de resistencia a los agentes dañinos como el calor o los metales pesados, disminución del peso seco y pérdida de la refractilidad (Figura 11).

Al inicio de la germinación las endosporas maduras tienen una fase brillante, conforme avanza el proceso comienzan a desarrollarse las formas de fase oscura y finalmente cuando la conversión a células vegetativas se completa, sólo existen formas oscuras (Russell,1990).

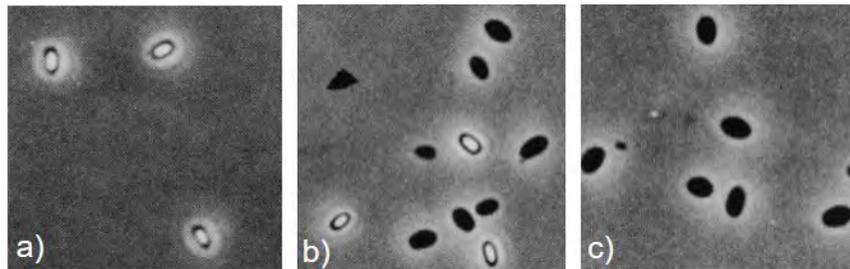


Figura 11. Microfotografías durante la germinación de endosporas de *B. subtilis*.  
a) Endosporas b) Germinación c) Células vegetativas Fuente: Russel (1990).

Como la mayoría de las propiedades latentes y resistentes de una endospora se pierden rápidamente en la germinación. Este proceso puede generar perspectivas de investigación que coadyuven en el tratamiento de aguas, ya que es el momento ideal del sistema biológico en cuestión para establecer métodos de desinfección (Setlow, 2013).

## 6.4 Tratamiento de desinfección

De acuerdo con las condiciones que mostraron la mayor remoción de endosporas con NaClO y el tiempo establecido en la prueba de germinación (sección 6.2 y 6.3), se realizó un tratamiento de desinfección de manera consecutiva que contempla tres fases: 1) desinfección de endosporas, 2) germinación de endosporas remanentes y 3) desinfección de células vegetativas. Los resultados se muestran en la Tabla 7 (Anexo F).

Tabla 7. Conteo de las unidades Log (UFC/mL), unidades de inactivación  $-\text{Log}(N/\text{No})$  y porcentaje de remoción (%R) de *B. subtilis* durante el tratamiento consecutivo.

Etapas del tratamiento (Condiciones)		Tiempo (minutos)	UFC/mL	Log UFC/mL	-Log (N/No)	(%R)	Cloro residual libre (mg/L)	Forma bacteriana
1ª Desinfección pH 6 30 mg/L NaClO		0	9.90E+10	<b>11.00</b>	0	0		Endospora
		15	2.57E+9	<b>9.41</b>	1.59	14.4	1.14	
		30	1.32E+7	<b>7.12</b>	3.88	35.2	0.55	
		45	3.16E+6	<b>6.50</b>	4.50	40.8	0.38	
Germinación	Pre-germinación		2.72E+6	<b>6.43</b>	4.56	41.4		Células vegetativas
	Germinación pH 8.4 37°C	0	2.38E+6	<b>6.38</b>	4.62	42.0		
		15	2.03E+6	<b>6.31</b>	4.69	42.6		
		30	2.10E+6	<b>6.32</b>	4.67	42.5		
		45	2.23E+6	<b>6.35</b>	4.65	42.2		
2ª Desinfección pH 6 30 mg/L NaClO		0	1.58E+6	<b>6.20</b>	4.80	43.6		
		15	9.71E+4	<b>4.99</b>	6.01	54.6	0.43	
		30	1.27E+3	<b>3.10</b>	7.89	71.7	0.28	
		45	2.22E+1	<b>1.35</b>	9.65	87.7	0.16	

El tratamiento se realizó con una concentración inicial de endosporas de  $9.90 \times 10^{10}$  equivalente a 11.00 Log. Después de realizar la primera desinfección con NaClO, se obtuvo un conteo de 6.50 Log. Es decir, se removió el 40.8% de la concentración inicial de endosporas.

Luego de someter a las endosporas remanentes a la etapa de pre-germinación, se removieron 0.07 Log que se atribuye a los cambios de temperatura; sin embargo, el propósito de esta fase es preparar a las endosporas para la germinación.

Durante la etapa de germinación se observó que la cantidad de endosporas y células se mantuvo constante, es decir, no hubo aumento ni disminución en el número de endosporas o células debido a que sólo se realizó la transformación biológica.

La segunda desinfección con células vegetativas se inició con una concentración de 6.20 Log y después de los 45 minutos de tratamiento con NaClO se obtuvo un conteo final de 1.35 Log. Esto indica que las células sobrevivieron a pesar de que se realizó una doble cloración cuando se encontraban biológicamente más vulnerables a la remoción.

Finalmente, el tratamiento de desinfección logró remover 9.65 Log, es decir, se removió un 87.7% de la concentración inicial de endosporas. El conteo de las unidades (Log UFC/mL) de *B. subtilis* (como endosporas o células vegetativas) durante cada fase del tratamiento consecutivo se representa en la Figura 12.

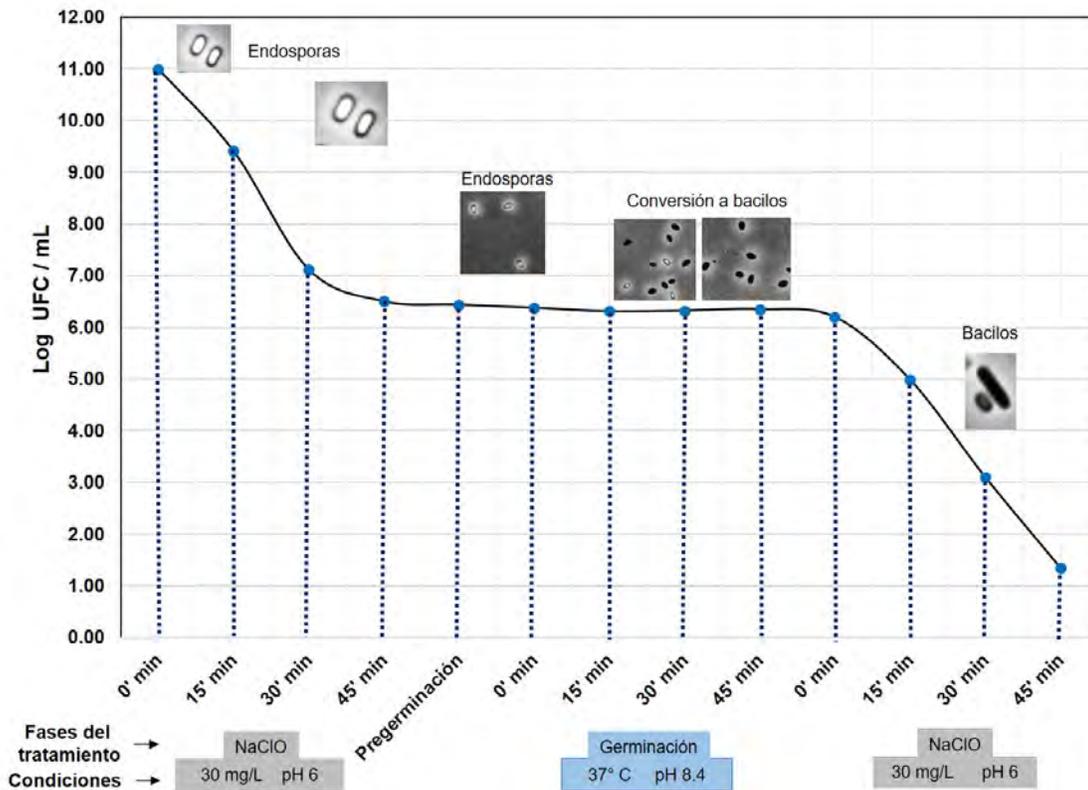


Figura 12. Unidades Log (UFC/mL) de *B. subtilis* presentes en cada fase del tratamiento de desinfección consecutivo.

Es importante señalar que, bajo el contexto de la desinfección, la germinación podría considerarse el inicio de un riesgo sanitario cuando se trate de endosporas de especies patógenas. Por lo tanto, sería acertado, aplicar una segunda desinfección en células vegetativas recién germinadas para impedir su proliferación.

La cantidad de cloro residual libre que se registró durante la primera y segunda desinfección en el tratamiento se encuentra por debajo de los valores que establece la OMS. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, los valores del cloro residual libre no permiten garantizar la calidad del agua, ya que el conteo reflejó la presencia de cantidades considerables, tanto de endosporas remanentes en la primera desinfección como de células vegetativas en la segunda desinfección. A pesar de esto, es importante medir y mantener los niveles del cloro residual libre para impedir que el exceso desencadene la formación de subproductos organoclorados (trihalometanos o ácidos haloacéticos) que resultan perjudiciales a la población y el ambiente (Méndez y Solsona, 2002).

Las unidades de inactivación (9.65 Log) obtenidas en este trabajo después de todo el tratamiento consecutivo, son considerablemente mayores a lo reportado por Cho *et al.* (2006), quienes eliminaron 4.9 Log al realizar una desinfección secuencial con dióxido de cloro seguido por cloro libre sobre una concentración inicial de  $1 \times 10^7$  de endosporas de *B. subtilis*. Del mismo modo, Pennell *et al.* (2008) removieron 6 Log de endosporas de *B. subtilis* al emplear una desinfección secuencial de radiación UV (254 nm) seguida de cloro libre sobre una concentración inicial de  $1 \times 10^7$  de endosporas.

Por lo tanto, los resultados de este tratamiento permiten generar las bases para mejorar la desinfección del agua y al mismo tiempo, justificar la importancia de realizar una cloración consecutiva que propicie una mayor remoción de microorganismos que incluyan las estructuras de resistencia.

## 7 CONCLUSIONES

La concentración de la suspensión de endosporas de *B. subtilis* obtenida, fue mayor a la que se establece por la AOAC.

Se comprobó que la eficiencia del desinfectante empleado está en función del pH, la concentración y el tiempo de contacto del mismo. De todas las condiciones probadas, aquella que obtuvo la mayor remoción de las endosporas con NaClO se presentó al menor pH, mayor concentración y mayor tiempo de contacto. El cloro residual libre se encontró por debajo de los valores permitidos por las normativas de calidad del agua, por tanto, no es suficiente para actuar sobre las estructuras de resistencia. La menor remoción de las endosporas ante el efecto del desinfectante se presentó a mayor pH, menor concentración y menor tiempo de contacto.

A partir de dos metodologías de germinación de endosporas previamente reportadas, se logró optimizar el tiempo de obtención de células vegetativas.

El tratamiento de una doble cloración, a partir del monitoreo de estructuras de resistencia hasta su transformación en células vegetativas, comprobó que los microorganismos no se eliminaron en su totalidad.

La cloración consecutiva puede considerarse como una alternativa en el tratamiento del agua por la mayor remoción de microorganismos, tanto de endosporas como de células vegetativas, en comparación con una desinfección tradicional.

## 8 LITERATURA CITADA

- Aguilar, A. y Durán, N. (2010). Conceptos de calidad del agua: un enfoque multidisciplinario. En: Aguilar, A. (Ed.), *Calidad del Agua*, (p.11-21). México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Alzahrani, O. M., y Moir, A. (2014). Spore germination and germinant receptor genes in wild strains of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Microbiology*. 117 (3): 741-749.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. (2006). Method 966.04 Sporicidal Activity of Disinfectants Test. Virginia, USA.
- Apella, M. C. y Araujo P. Z. (2005). Microbiología de agua. Conceptos básicos. En: Blesa, M. A. y Blanco-Gálvez, J. (Eds.). *Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua*. (27-44). Buenos Aires: UNSAM.
- APHA, American Public Health Association. (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. DPD Colorimetric Method. 22<sup>a</sup> Edición. Ed. W. Rice Eugene. S.A. Washington.
- Arcos-Pulido, M, Ávila, S. L., Estupiñán-Torres, S. M. y Gómez-Prieto, A. C. (2005). Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *NOVA Publicación en Ciencias Biomédicas*. 3 (4): 69-79.
- Atrih, A. y Foster, S. (2001). Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 364-372.
- Banfalvi, G. (2011). Synchronization of *Bacillus subtilis* cells by spore germination and outgrowth. In *Cell Cycle Synchronization*. Humana Press. 163-171 p.
- Chirakkal, H., O'Rourke, M., Atrih, A., Foster, S. J., y Moir, A. (2002). Analysis of spore cortex lytic enzymes and related proteins in *Bacillus subtilis* endospore germination. *Microbiology*. 148 (8): 2383-2392.

- Cho, M., Kim, J. H., y Yoon, J. (2006). Investigating synergism during sequential inactivation of *Bacillus subtilis* spores with several disinfectants. *Water Research*. 40 (15): 2911-2920.
- Cohn, F. (1872). Untersuchungen Über Bakterien. *Bertr. Biol. Pflanz*. 1(Heft II): 127–224.
- De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A. y Whitman, W. B. (Eds.). (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer Science & Business Media. 1746 p.
- DEHS, Department of Environmental Health and Safety. (2008). Environmental health & safety guidance document for: disinfectants and sterilization methods. University of Colorado at Boulder. 1-20 p.
- Demidova, T. N. y Hamblin, M. R. (2005). Photodynamic inactivation of *Bacillus* spores, mediated by phenothiazinium dyes. *Applied and environmental microbiology*. 71 (11): 6918-6925.
- DeQueiroz, G. A. y Day, D. F. (2008). Disinfection of *Bacillus subtilis* spore-contaminated surface materials with a sodium hypochlorite and a hydrogen peroxide-based sanitizer. *Letters in Applied Microbiology*. 46 (2): 176-180.
- DOF, Diario Oficial de la Federación. (1994a). Norma Oficial Mexicana. NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- DOF, Diario Oficial de la Federación. (1994b). Norma Oficial Mexicana. NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- Doménech-Sánchez, A., Olea, F. y Berrocal, C. I. (2008). Infecciones relacionadas con las aguas de recreo. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 26: 32-37.

- Driks, A. y Eichenberger, P. (2016). The bacterial spore: from molecules to systems. American Society of Microbiology.
- Earl, M.A., Losick, R. y Kolter, R. (2008). Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiology*. 16 (6): 269.
- Fernández-Alba, A., Letón P., Rosal R., Dorado, M., Villar, S. y Sanz, J. (2006). Tratamientos avanzados de aguas residuales industriales. Madrid, España. 10 p.
- Granados P.R. y Villaverde P. Ma. del C. (1997). Microbiología. Bacteriología, medios de cultivo y pruebas bioquímicas. Micología general. Parasitología general. 1ª edición. Ed. Paraninfo, España. 365 p.
- Lazarova, V., Savoye, P., Janex, M. L., Blatchley, E. R. y Pommepuy, M. (1999). Advanced wastewater disinfection technologies: state of the art and perspectives. *Water Science and Technology*. 40 (4-5): 203-213.
- Leggett, M. J., McDonnell, G., Denyer, S. P., Setlow, P. y Maillard, J. Y. (2012). Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *Journal of Applied Microbiology*. 113 (3): 485-498.
- Macedo, M., y Vola, M. (2005). Principales grupos de bacilos Gram positivos aerobios. *Temas de bacteriología y virología médica. 2a. ed. Editorial FEFMUR, Universidad de la República, Instituto de Higiene, Capítulo 20.*
- Martínez-Hernández, S., Vázquez-Rodríguez, G. A., Beltrán-Hernández, R. I., Prieto-García, F., Miranda-López, J. M., Franco-Abuín, C. M., y Coronel-Olivares, C. (2013). Resistance and inactivation kinetics of bacterial strains isolated from the non-chlorinated and chlorinated effluents of a WWTP. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10 (8), 3363-3383.
- McKenney, P. T., Driks, A. y Eichenberger, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology*. 11 (1): 33.

- Méndez, J. P., y Solsona, F. (2002). Desinfección del agua. United States Environmental Protection Agency, USEPA. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. 158 p.
- Morató J., Mir J., Codony F., Mas J. y Ribas, F. (2003). Microbial Response to disinfectants. In: *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. (Eds.) Mara, D. y Horan, N. Ed. Academic Press. London. 657-693.
- Muhammad, N., Gallardo, V. J., Schupp, D. A., Krishnan, E. R., Minamyer, K. S., y Rice, E. W. (2013). Inactivation of *Bacillus* spores in decontamination wash down wastewater using chlorine bleach solution. *Canadian Journal of Civil Engineering*. 41 (1): 40-47.
- Murray, R.P., Rosenthal, S.K., Kobayashi, S.G. y Pfaller, A.M. (2002). *Microbiología médica*. 4 ed. Editorial Mosby. Elsevier España, S. A. 810 p.
- Neira-Muñoz, E., Okoro, C. y McCarthy N. D. (2007). Outbreak of waterborne cryptosporidiosis associated with low oocyst concentrations. *Epidemiology & Infection*. 135 (7): 1159-1164.
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J. y Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64 (3): 548-572.
- Núñez, N., Fraile, I. y Lizarazu, J. (2009). Microorganismos patógenos del agua. Estudio de Molinayo Erreka. Meridies [Revista en Internet] 13: 69–76. Disponible en: <http://www.laanunciataikerketa.com/trabajos/microorganismos/in.html>.
- OMS, Organización Mundial de la Salud. (2011). Guías para la calidad del agua potable: Recomendaciones (Vol. 1). 4ta Edición. Geneva. 564 p.
- Pennell, K. G., Naunovic, Z. y Blatchley III, E. R. (2008). Sequential inactivation of *Bacillus subtilis* spores with ultraviolet radiation and iodine. *Journal of Environmental Engineering*. 134 (7): 513-520.

- Radziminski, C., Ballantyne, L., Hodson, J., Creason, R., Andrews, R. C. y Chauret, C. (2002). Disinfection of *Bacillus subtilis* spores with chlorine dioxide: a bench-scale and pilot-scale study. *Water Research*. 36 (6):1629-1639.
- Rice, E. W., Adcock, N. J., Sivaganesan, M. y Rose, L. J. (2005). Inactivation of spores of *Bacillus anthracis* Sterne, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis by chlorination. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (9): 5587-5589.
- Ríos-Tobón, S., Agudelo-Cadavid, R. M. y Gutiérrez-Builes, L. A. (2017). Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*. 35 (2): 236-247.
- Rojas-Valencia, M., Orta, M. y Franco, V. (2008). Comparación de mecanismos de acción de desinfectantes aplicados en aguas residuales. *Aquaforum*. 12 (49):19-22.
- Romero-Aroca, P., Méndez Marín, I., Salvat Serra, M., Pujol Bajador, I., y Ballester Basterdie, F. (2003). Endoftalmitis crónica en el seudofaco por *Bacillus subtilis*. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 78 (2): 107-109.
- Russell, A. D. (1990). Bacterial spores and chemical sporicidal agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 3 (2): 99-119.
- Sagong, H. G., Cheon, H. L., Kim, S. O., Lee, S. Y., Park, K. H., Chung, M. S. y Kang, D. H. (2013). Combined effects of ultrasound and surfactants to reduce *Bacillus cereus* spores on lettuce and carrots. *International Journal of Food Microbiology*. 160 (3): 367-372.
- Sagripanti, J. L. y Bonifacino, A. (1996). Comparative sporicidal effects of liquid chemical agents. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (2): 545-551.
- Setlow, P. (2005). The bacterial spore: nature's survival package. *Culture*. 26 (2): 1-8.
- Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*. 101 (3): 514-525.

- Setlow, P. (2013). Summer meeting 2013—When the sleepers wake: the germination of spores of *Bacillus* species. *Journal of Applied Microbiology*. 115 (6): 1251-1268.
- Setlow, P. y Johnson, E. A. (2012). Spores and their significance. In *Food Microbiology*. Washington, DC. American Society of Microbiology. 45-79.
- Sobsey, M. D. (1989). Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfection processes. *Water Science and Technology*. 21(3): 179-195.
- Sonenshein, A. L. (2000). Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*. 3 (6): 561-566.
- StatSoft, Inc. (2004). STATISTICA (Data Analysis Software System), versión 7.0. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)
- Takagi, M., Toriumi, H., Endo, T., Yamamoto, N., y Kuroki, T. (2008). An outbreak of cryptosporidiosis associated with swimming pools. *Kansenshogaku zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*. 82 (1): 14-19.
- USEPA, United States Environmental Protection Agency. (1999). Folleto informativo de tecnología de aguas residuales: Desinfección con cloro. Office of Water, Washington. 9 p.
- Vargas, L. D. (2004). Tratamiento de agua para consumo humano. Plantas de filtración rápida. Manual I: Teoría, Tomo 1. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. 283 p.
- Wang, L. T., Lee, F. L., Tai, C. J. y Kasai, H. (2007). Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57 (8): 1846-1850.
- Young, S. B., y Setlow, P. (2003). Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. *Journal of Applied Microbiology*. 95 (1): 54-67.

## 9 ANEXOS

### A) Medios de cultivo

#### Caldo nutritivo (Bioxon)

Fórmula por litro	
Peptona 5 g	Extracto de carne 3 g

Modo de preparación:

Suspender y disolver 8 g en un litro de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Almacenar a una temperatura de 2°C a 10°C.

#### Agar nutritivo (Bioxon)

Fórmula por litro		
Peptona 5 g	Extracto de carne 3 g	Agar 15 g

Modo de preparación:

Suspender 23 g en un litro de agua destilada. Mezclar y calentar a ebullición de 1 a 2 minutos hasta disolver el producto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Almacenar a una temperatura de 2°C a 10°C.

### B) Reactivos

- ❖ Verde de malaquita al 0.5% (Reasol)
- ❖ Safranina al 0.5% (Química Meyer Ref. No. 2245-10)
- ❖ Tiosulfato de sodio anhidro (Química Meyer Ref. No. 2535-500)

### C) Equipos

- ❖ Contador de colonias: tipo Québec Marca Sol-Bat, México.
- ❖ Fotómetro multiparamétrico HANNA Instrument: HI 83206, USA.
- ❖ Espectrofotómetro: Thermo Scientific, Genesys 10 Vis, USA.
- ❖ Incubadora 305 M Marca Lab-Line. Instruments, Inc., USA.
- ❖ Microscopio óptico B3 Professional. Marca Motic, USA.
- ❖ Centrifuga Hermle Z 200A. Marca Labne, USA

**D) Conteo de UFC para la suspensión de endosporas**

<b>Dilución</b>	<b>UFC</b>	<b>UFC/100µL</b>	<b>UFC/mL</b>
1x10 <sup>-5</sup>	1034	1.03E+08	1.03E+09
1x10 <sup>-5</sup>	1244	1.24E+08	1.24E+09
1x10 <sup>-5</sup>	810	8.10E+07	8.10E+08
1x10 <sup>-5</sup>	754	7.54E+07	7.54E+08
1x10 <sup>-5</sup>	1424	1.42E+08	1.42E+09
1x10 <sup>-5</sup>	1518	1.52E+08	1.52E+09
1x10 <sup>-6</sup>	688	6.88E+08	6.88E+09
1x10 <sup>-6</sup>	724	7.24E+08	7.24E+09
1x10 <sup>-6</sup>	632	6.32E+08	6.32E+09
1x10 <sup>-6</sup>	522	5.22E+08	5.22E+09
1x10 <sup>-6</sup>	1082	1.08E+09	1.08E+10
1x10 <sup>-6</sup>	1222	1.22E+09	1.22E+10
1x10 <sup>-7</sup>	570	5.70E+09	5.70E+10
1x10 <sup>-7</sup>	562	5.62E+09	5.62E+10
1x10 <sup>-7</sup>	414	4.14E+09	4.14E+10
1x10 <sup>-7</sup>	534	5.34E+09	5.34E+10
1x10 <sup>-7</sup>	868	8.68E+09	8.68E+10
1x10 <sup>-7</sup>	726	7.26E+09	7.26E+10
1x10 <sup>-8</sup>	454	4.54E+10	4.54E+11
1x10 <sup>-8</sup>	522	5.22E+10	5.22E+11
1x10 <sup>-8</sup>	324	3.24E+10	3.24E+11
1x10 <sup>-8</sup>	426	4.26E+10	4.26E+11
1x10 <sup>-8</sup>	521	5.21E+10	5.21E+11
1x10 <sup>-8</sup>	412	4.12E+10	4.12E+11
Promedio		1.28E+10	1.28E+11
Log			11.10

**E) Conteo de UFC durante las pruebas de desinfección con NaClO**

<b>15 mg/L</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>pH 6</b>	<b>pH 7</b>	<b>pH 8</b>
	0	2.26E+11	8.93E+10	1.36E+11
	30	1.13E+09	1.16E+09	2.40E+09
	45	3.15E+06	3.12E+06	6.79E+06

<b>20 mg/L</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>pH 6</b>	<b>pH 7</b>	<b>pH 8</b>
	0	2.42E+11	1.78E+11	1.82E+11
	30	7.04E+08	1.28E+09	2.09E+09
	45	1.25E+06	2.00E+06	2.88E+06

<b>30 mg/ L</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>pH 6</b>	<b>pH 7</b>	<b>pH 8</b>
	0	1.85E+11	1.35E+11	1.68E+11
	30	1.73E+08	2.48E+08	1.11E+09
	45	9.98E+04	1.27E+05	5.04E+05

## F) Conteo de UFC durante el tratamiento de desinfección consecutiva

### 1ª Desinfección: endosporas

Tiempo (minutos) 0		
Dilución	UFC	UFC/100µL
1x10 <sup>-7</sup>	82	8.20E+08
1x10 <sup>-7</sup>	47	4.70E+08
1x10 <sup>-7</sup>	64	6.40E+08
1x10 <sup>-8</sup>	11	1.10E+09
1x10 <sup>-8</sup>	19	1.90E+09
1x10 <sup>-8</sup>	12	1.20E+09
1x10 <sup>-9</sup>	22	2.20E+10
1x10 <sup>-9</sup>	38	3.80E+10
1x10 <sup>-9</sup>	23	2.30E+10
Promedio UFC/100µL		9.90E+09
Promedio UFC/mL		9.90E+10

Tiempo (minutos) 15		
Dilución	UFC	UFC/100µL
1x10 <sup>-6</sup>	89	8.90E+07
1x10 <sup>-6</sup>	52	5.20E+07
1x10 <sup>-6</sup>	66	6.60E+07
1x10 <sup>-7</sup>	13	1.30E+08
1x10 <sup>-7</sup>	29	2.90E+08
1x10 <sup>-7</sup>	19	1.90E+08
1x10 <sup>-8</sup>	7	7.00E+08
1x10 <sup>-8</sup>	5	5.00E+08
1x10 <sup>-8</sup>	3	3.00E+08
Promedio UFC/100µL		2.57E+08
Promedio UFC/mL		2.57E+09

Tiempo (minutos) 30		
Dilución	UFC	UFC/100µL
1x10 <sup>-4</sup>	76	7.60E+05
1x10 <sup>-4</sup>	46	4.60E+05
1x10 <sup>-4</sup>	32	3.20E+05
1x10 <sup>-5</sup>	16	1.60E+06
1x10 <sup>-5</sup>	8	8.00E+05
1x10 <sup>-5</sup>	19	1.90E+06
1x10 <sup>-6</sup>	1	1.00E+06
1x10 <sup>-6</sup>	5	5.00E+06
1x10 <sup>-6</sup>	0	0.00E+00
Promedio UFC/100µL		1.32E+06
Promedio UFC/mL		1.32E+07

Tiempo (minutos) 45		
Dilución	UFC	UFC/100µL
1x10 <sup>-4</sup>	24	2.40E+05
1x10 <sup>-4</sup>	28	2.80E+05
1x10 <sup>-4</sup>	12	1.20E+05
1x10 <sup>-5</sup>	7	7.00E+05
1x10 <sup>-5</sup>	9	9.00E+05
1x10 <sup>-5</sup>	6	6.00E+05
1x10 <sup>-6</sup>	0	0.00E+00
1x10 <sup>-6</sup>	0	0.00E+00
1x10 <sup>-6</sup>	0	0.00E+00
Promedio UFC/100µL		3.16E+05
Promedio UFC/mL		3.16E+06

## 2ª Desinfección: células vegetativas

Tiempo (minutos) 0		
Dilución	UFC	UFC/100µL
1x10 <sup>-2</sup>	204	2.04E+04
1x10 <sup>-2</sup>	254	2.54E+04
1x10 <sup>-2</sup>	188	1.88E+04
1x10 <sup>-3</sup>	122	1.22E+05
1x10 <sup>-3</sup>	94	9.40E+04
1x10 <sup>-3</sup>	102	1.02E+05
1x10 <sup>-4</sup>	8	8.00E+04
1x10 <sup>-4</sup>	9	9.00E+04
1x10 <sup>-4</sup>	4	4.00E+04
1x10 <sup>-5</sup>	4	4.00E+05
1x10 <sup>-5</sup>	6	6.00E+05
1x10 <sup>-5</sup>	3	3.00E+05
Promedio UFC/100µL		1.58E+05
Promedio UFC/mL		1.58E+06

Tiempo (minutos) 15		
Dilución	UFC	UFC/100µL
1x10 <sup>-2</sup>	154	1.54E+04
1x10 <sup>-2</sup>	128	1.28E+04
1x10 <sup>-2</sup>	112	1.12E+04
1x10 <sup>-3</sup>	11	1.10E+04
1x10 <sup>-3</sup>	9	9.00E+03
1x10 <sup>-3</sup>	8	8.00E+03
1x10 <sup>-4</sup>	1	1.00E+04
1x10 <sup>-4</sup>	1	1.00E+04
1x10 <sup>-4</sup>	0	0.00E+00
Promedio UFC/100µL		9.71E+03
Promedio UFC/mL		9.71E+04

Tiempo (minutos) 30		
Dilución	UFC	UFC/100µL
1x10 <sup>-1</sup>	8	8.00E+01
1x10 <sup>-1</sup>	9	9.00E+01
1x10 <sup>-1</sup>	7	7.00E+01
1x10 <sup>-2</sup>	2	2.00E+02
1x10 <sup>-2</sup>	3	3.00E+02
1x10 <sup>-2</sup>	4	4.00E+02
1x10 <sup>-3</sup>	0	0.00E+00
1x10 <sup>-3</sup>	0	0.00E+00
1x10 <sup>-3</sup>	0	0.00E+00
Promedio UFC/100µL		1.27E+02
Promedio UFC/mL		1.27E+03

Tiempo (minutos) 45		
Dilución	UFC	UFC/100µL
1x10 <sup>-1</sup>	1	1.00E+01
1x10 <sup>-1</sup>	1	1.00E+01
1x10 <sup>-1</sup>	0	0.00E+00
1x10 <sup>-2</sup>	0	0.00E+00
1x10 <sup>-2</sup>	0	0.00E+00
1x10 <sup>-2</sup>	0	0.00E+00
1x10 <sup>-3</sup>	0	0.00E+00
1x10 <sup>-3</sup>	0	0.00E+00
1x10 <sup>-3</sup>	0	0.00E+00
Promedio UFC/100µL		2.22E+00
Promedio UFC/mL		2.22E+01