

---

## Coliformes y amibas de vida libre presentes en agua subterránea

E. Ramírez-Flores\* E. Robles-Valderrama, Ma. G. Sainz-Morales, R. Ayala-Patiño y E. Campoy-Otero

Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente. FES Iztacala, UNAM. Av. de los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, TLalnepantla 54090, Estado de México, México.

---

### *Occurrence of coliforms and free-living amoebae in groundwater*

#### **Abstract**

Groundwater is one of the main supply sources of drinking water in Mexico, they support a poor biological community, because their low concentration of nutrients. However in the last years, the human activities and the population growth have caused the contamination of aquifers. In this way, the water can have pathogenic microorganisms that can cause sicknesses; this is the case of free-living amoebae (FLA). The objective of the research was to determine the occurrence of coliform bacteria and free-living amoebae in the aquifer of Zacatepec, Morelos. Monthly samplings of thirteen wells were carried out during one year. The following physicochemical parameters were measure *in situ*: pH, dissolved oxygen (DO) and temperature. Total and fecal coliforms were determined by the membrane filter technique. Free-living amoebae were cultured on non-nutritive agar medium (NNE), and the identification was carried out taking in account their morphological features. All the wells were polluted with total coliforms, one with 247 ufc 100ml<sup>-1</sup>, three with 12, 14 and 16, and the others with 1 to 5. Fecal coliforms were absent in four wells, one had 247 ufc 100ml<sup>-1</sup>, two had 10 and 16 and the others had 1 to 3. The well most polluted was the number 3, and the months with more bacteria were April and July. Free-living amoebae were isolated in all the wells, the highest isolation number was found in well number 2, while the lowest were found in wells 4, 5, and 10. December and January were the months with the highest number of amoebae, and April with the lowest. Twenty two species belonging to 16 genera were isolated; the most frequent was *Hartmannella* with 38.1%, this amoeba has been associated to ocular and brain infections in humans. Of the pathogenic amoebae, was isolated *Acanthamoeba polyphaga*, but with low frequency (6.6%). Physicochemical parameters did not show seasonal variation, pH was close to neutrality in a range of 6.4 to 7.3, temperature was in a range of 25.1 to 28° C, and dissolved oxygen of 2.9 to 4.8 mg l<sup>-1</sup>.

**Key words:** coliforms, free-living amoebae, groundwater, aquifer.

#### **Resumen**

El agua subterránea constituye una de las principales fuente de abastecimiento de agua potable en México, estas albergan por lo general, una comunidad biológica escasa debido a su bajo contenido en materias nutritivas. Sin embargo, las actividades humanas y el crecimiento urbano son los principales factores para la contaminación de los acuíferos. De esta forma el agua puede contener microorganismos que causan diversas enfermedades, entre los que están las amibas de vida libre (AVL). El objetivo de la investigación fue determinar la presencia de las bacterias coliformes y las amibas de vida libre en el agua subterránea del acuífero de Zacatepec, Morelos. Para ello se realizaron muestreos mensuales durante un año de 13 pozos del acuífero, se midieron en el lugar los siguientes parámetros fisicoquímicos: pH, oxígeno disuelto y temperatura. Se determinaron los Coliformes totales y Coliformes fecales utilizando la técnica de filtro de membrana; para las amibas se utilizo el medio selectivo Agar no Nutritivo con *Enterobacter aerogenes* (NNE) y la identificación se realizo tomando en cuenta sus características morfológicas. Todos los pozos presentaron

---

\* Autor de correspondencia

E-mail: erf@servidor.unam.mx Fax: +52 (55)53907604

contaminación por coliformes totales, uno de ellos con 247 ufc 100 ml<sup>-1</sup>, tres con 12, 14 y 16 y el resto oscilo entre 1 y 5. En cambio los coliformes fecales estuvieron ausentes en 4 de los pozos, en uno se presento contaminación alta con 247 ufc 100ml<sup>-1</sup>, dos con 10 y 16 y el resto oscilo entre 1 y 3. El pozo más contaminado con bacterias fue el número 3 y la contaminación de coliformes totales y fecales más alta se presentó en los meses de abril y julio. Las amibas de vida libre se detectaron en todos los pozos, en el pozo 2 se encontró el mayor número de aislamientos amibianos, en tanto que en los pozos 4, 5 y 10 se presentaron los más bajos. Se observaron los números más altos en Diciembre y Enero y el más bajo en Abril. Se aislaron 22 especies pertenecientes a 16 géneros, el género más frecuente fue *Hartmannella* con un 38.1%, la cual se ha reportado asociada a infecciones cerebrales y oculares. De las amibas patógenas, se detecto *Acanthamoeba polyphaga*, pero en baja frecuencia (6.6%). Los parámetros fisicoquímicos tuvieron muy poca variación temporal, el pH se mantuvo cercano a la neutralidad en un intervalo promedio de 6.4 a 7.3, la temperatura fue de 25.1 a 28.0° C y el oxígeno disuelto de 2.9 a 4.8 mg l<sup>-1</sup>.

*Palabras clave:* coliformes, amibas de vida libre, agua subterránea, acuífero.

## Introducción

El agua subterránea se ha usado ampliamente para uso doméstico y otras actividades antropogénicas, debido a que se consideraba una fuente de agua inagotable y de buena calidad; sin embargo, se ha observado que es muy susceptible de contaminarse y que los mantos acuíferos han sido objeto de sobreexplotación (García y Piña, 2003). La sobreexplotación de los acuíferos, así como las actividades antropogénicas, han ocasionado condiciones graves de decremento del nivel; además de la disminución de la recarga natural debido a la elevada urbanización, que también influye en la calidad del agua de recarga (Iturbe y Silva, 1992; Price, 2007).

Las fuentes de contaminación química y microbiológica son numerosas, incluyen la práctica de disposición en el suelo de los efluentes de agua de desecho, lodos, desechos sólidos, efluentes de tanques sépticos y escurrimientos urbanos (Gerba y Bitton, 1984; Keswick, 1984; Eitan, 1994; Field y Barber, 1994; Sabatini, 1994; Wallach, 1994). Más de 200 sustancias orgánicas e inorgánicas sintéticas se han identificado en suministros de agua subterránea, estas sustancias químicas pueden provocar diversos tipos de intoxicación (Zoller, 1994; Pacheco et al., 2004).

Con respecto a la contaminación por microorganismos patógenos, la contaminación bacteriana parece ser el problema más común; aunque también se han detectado problemas de salud por brotes de algunos virus como el de la hepatitis (Craun, 1984; Gerba y Bitton, 1984; Bitton

y Harvey, 1992; Cullimore, 1992; Chapelle, 1993; Zellikson, 1994).

En el caso de los protozoarios, no se cuenta con mucha información acerca de su presencia en el agua subterránea. En general, se ha observado que su número es bajo, pero en aguas contaminadas orgánicamente, su número se incrementa debido al aumento de la población bacteriana, que es el principal alimento de los diferentes grupos de protozoarios, entre los que se destacan las amibas de vida libre (AVL) (Chapelle, 1993; Novarino et al., 1997; Ramirez et al., 2001).

Las amibas de vida libre patógenas pueden causar Meningoencefalitis amibiana primaria (MAP) y Encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), que son infecciones graves del sistema nervioso central y casi siempre fatales. También pueden causar infección grave del ojo, conocida como Queratitis amibiana, e infecciones en la piel (John, 1993; Visvesvara et al., 2007; Bonilla y Ramírez, 2008).

Por tales razones el objetivo de la investigación fue determinar la presencia de las bacterias coliformes y las amibas de vida libre en el agua subterránea del acuífero de Zacatepec, Morelos.

## Material y método

El acuífero Zacatepec se localiza a 99°14'20' longitud Oeste y 18°35'22' latitud Norte, en la porción Suroeste del estado de Morelos y es uno de los 4 acuíferos que tiene el estado (CNA, 2000). Se tomaron muestras mensuales durante un año, de 13 pozos distribuidos en el acuífero de Zacatepec (Tabla 1), las muestras de agua se tomaron antes del

proceso de cloración para conocer las condiciones del acuífero en su estado natural.

Para las determinaciones bacteriológicas se tomaron las muestras en bolsas estériles de 250 ml, trasladándose en refrigeración al laboratorio; para el análisis de las amibas de vida libre se tomaron las muestras de agua en envases estériles de 1000 ml y se transportaron al laboratorio a temperatura ambiente. Se determinaron en el lugar los siguientes parámetros físico-químicos: pH (potenciómetro HANNA Instruments HI 8314), Oxígeno Disuelto y Temperatura (Oxímetro YSI. Mod 51-b).

En el laboratorio se determinaron dos parámetros bacteriológicos: Coliformes totales y Coliformes fecales utilizando la técnica de filtro de membrana (APHA-AWWA-WEF, 1998).

Para las amibas se filtraron 1000 ml de la muestra a través de membranas de 5 µm de poro en

condiciones estériles. Las membranas se colocaron hacia abajo en placas de medio Agar no Nutritivo con la bacteria *Enterobacter aerogenes* (NNE). Las placas se incubaron a 30°C y se revisaron después de ocho días para detectar el crecimiento amibiano, usando un microscopio invertido.

La identificación de las amibas se realizó tomando en cuenta las características morfológicas tanto de la forma trófica como quística, observando preparaciones en fresco al microscopio de contraste de fases a 400 y 1000 aumentos y siguiendo las claves taxonómicas de Page (1988).

## Resultados

Con los resultados obtenidos de las coliformes totales y fecales se cálculo la media geométrica, valor mínimo y valor máximo (Tabla 2). Con los

**Tabla 1. Municipios de ubicación de los pozos muestreados en el acuífero de Zacatepec.**

Pozo	Nombre	Municipio	Altitud (m.s.n.m.)
1	Alpuyeca	Xochitepec	1040
2	Avigrupo	Miacatlán	1022
3	La Presa	Miacatlán	998
4	Coatetelco	Miacatlán	974
5	Coatlán del Río	Coatlán del Río	1008
6	Cocoyotla	Coatlán del Río	1050
7	Cuauchichinola	Mazatepec	1050
8	Puente de Ixtla	Puente de Ixtla	909
9	Tequesquitengo	Puente de Ixtla	942
10	Santa María	Xochitepec	918
11	U. Alianza	Puente de Ixtla	943
12	Tlalquitenango	Tlalquitenango	935
13	Las Juntas	Tlaltizapan	956

**Tabla 2. Medias geométricas de los Coliformes Totales y Coliformes Fecales**

Pozo	Coliformes totales (ufc 100ml <sup>-1</sup> )			Coliformes fecales (ufc 100ml <sup>-1</sup> )		
	Media geométrica	Valor máximo	Valor mínimo	Media geométrica	Valor máximo	Valor mínimo
1	14	300	0	10	300	0
2	16	300	0	16	300	0
3	247	600	100	247	600	100
4	1	200	0	0	200	0
5	1	300	0	0	300	0
6	5	300	0	1	125	0
7	3	300	0	3	300	0
8	1	150	0	1	150	0
9	1	46	0	0	46	0
10	1	28	0	0	25	0
11	2	300	0	1	300	0
12	12	300	0	3	300	0
13	1	400	0	1	400	0

valores de las medias geométricas, se observó que todos los pozos presentaron contaminación por coliformes totales, aunque solo uno de ellos presentó el valor máximo de 247 ufc/100 ml, tres con valores de 12, 14 y 16 y el resto osciló entre 1 y 5. Las medias geométricas de coliformes fecales fueron de cero en 4 pozos, uno presentó contaminación alta (247 ufc/100 ml), dos con 10 y 16 y el resto osciló entre 1 y 3.

El pozo más contaminado con bacterias fue el 3, seguido de los pozos 1, 2, 7 y 12 y los menos contaminados fueron 4, 5, 8, 9 y 10 (Fig. 1). Con respecto a la variación temporal, se observó que la contaminación más alta de coliformes totales y fecales se presentó en los meses de abril y julio (Fig. 2). Esos meses coinciden con las épocas de

periodos vacacionales, en los cuales probablemente se incremente la población ambulante (visitantes) y con ello las descargas residuales y su infiltración al subsuelo.

Con respecto a las amibas de vida libre, del total de muestras que se analizaron, en el 81.1% se detectaron amibas. Se observó que en 10 de los pozos se presentaron amibas en todos o casi todos los meses y solamente en los pozos 4 y 5 se detectaron amibas en 5 y 6 meses respectivamente (Tabla 3).

Se aislaron 22 especies pertenecientes a 16 géneros (Tabla 4), siendo *Hartmannella* el género que se presentó con mayor frecuencia con el 38.1%. De las amibas reportadas como patógenas, se aislaron amibas del género *Acanthamoeba*, pero con baja

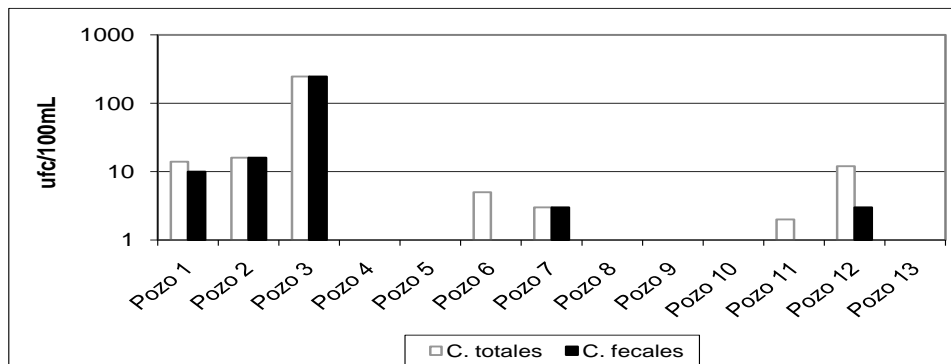


Figura 1. Variación espacial de Coliformes totales y Coliformes fecales (medias geométricas).

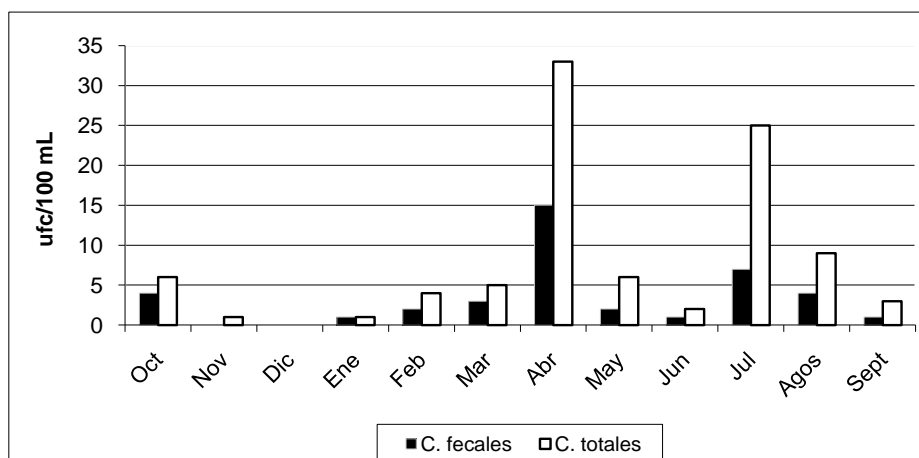


Figura 2. Variación temporal de Coliformes totales y Coliformes fecales (medias geométricas).

frecuencia (6.6%), con dos especies: *A. polyphaga* y *A. royreba*. *Naegleria*, también se detectó con baja frecuencia (9.4%), pero por las características del quiste de la cepa aislada y la temperatura de crecimiento (30°C), probablemente pertenezca a la especie *N. gruberi*, que no es patógena (Fig. 3).

En los meses de Diciembre y Enero se observaron los números de aislamientos más altos y en Abril el más bajo (Fig. 4). En el pozo 2 se encontró el mayor número de aislamientos amibianos, en tanto que en los pozos 4, 5 y 10 se presentaron los más bajos (Fig. 5).

Durante el período de estudio los parámetros fisicoquímicos tuvieron muy poca variación, el pH

se mantuvo cercano a la neutralidad en un intervalo promedio de 6.4 a 7.3, la temperatura fue de 25.1 a 28.0° C y el oxígeno disuelto de 2.9 a 4.8 mg/l.

### Discusión

De los trece pozos analizados, 5 presentaron muy baja contaminación y 4 muy alta, pero todos en uno o más meses presentaron contaminación tanto por coliformes totales como por coliformes fecales, lo cual nos indica que el acuífero está siendo ya afectado por la contaminación urbana.

**Tabla 3. Presencia de las amibas de vida libre en los pozos del acuífero de Zacatepec, Morelos**

Pozo	Mes											
	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep
1	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	nm
4	-	-	+	+	-	-	nm	+	+	-	nm	+
5	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nm
7	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
8	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
10	-	+	+	+	+	+	nm	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	nm	+	nm	+	+	+	+	+
12	nm	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+

nm: no se muestreo

**Tabla 4. Riqueza específica de las amibas de vida libre aisladas del acuífero de Zacatepec, Morelos.**

Género	Especie
<i>Acanthamoeba</i>	<i>polyphaga</i> <i>royreba</i>
<i>Echinamoeba</i>	<i>silvestris</i>
<i>Filamoeba</i>	<i>nolandi</i>
<i>Guttulinopsis</i>	<i>nivea</i>
<i>Hartmannella</i>	<i>cantabrigiensis</i> <i>vermiformes</i>
<i>Mayorella</i>	<i>cultura</i>
<i>Naegleria</i>	<i>sp</i>
<i>Platyamoeba</i>	<i>placida</i>
<i>Rosculus</i>	<i>ithacus</i>
<i>Saccamoeba</i>	<i>stagnicola</i>
<i>Stachyamoeba</i>	<i>lipophora</i>
<i>Tetramitus</i>	<i>rostratus</i>
<i>Thecamoeba</i>	<i>corrugata</i> <i>striata</i>
<i>Vannella</i>	<i>cirrifera</i> <i>cata</i> <i>platypodia</i> <i>simplex</i>
<i>Vahlkampfia</i>	<i>avara</i>
<i>Vexillifera</i>	<i>bacillipedes</i>

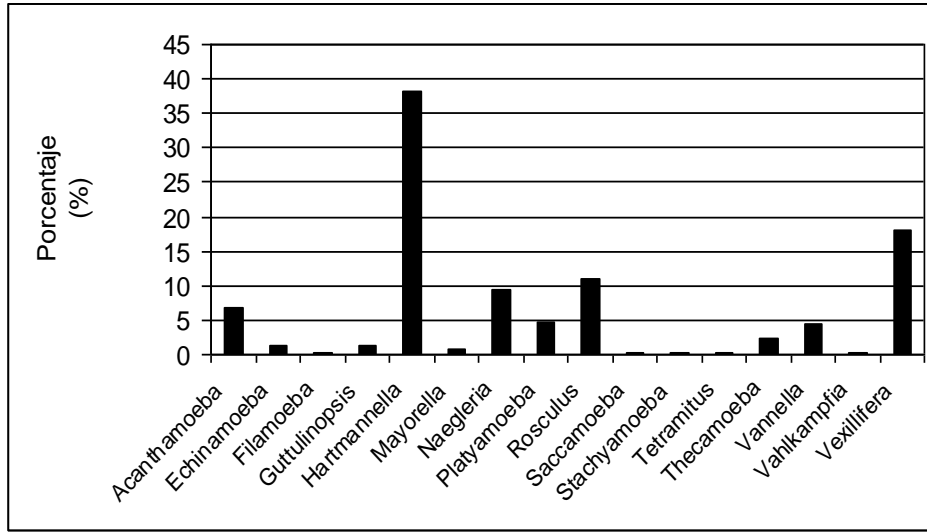


Figura 3. Frecuencia de Amibas de vida libre aisladas del acuífero del agua subterránea del acuífero de Zacatepec, Morelos.

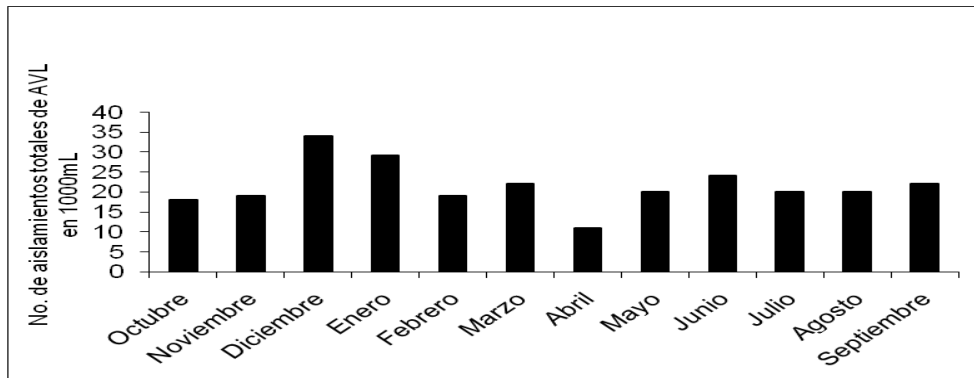


Figura 4. Variación temporal de las amibas de vida libre en el agua subterránea del acuífero de Zacatepec, Morelos.

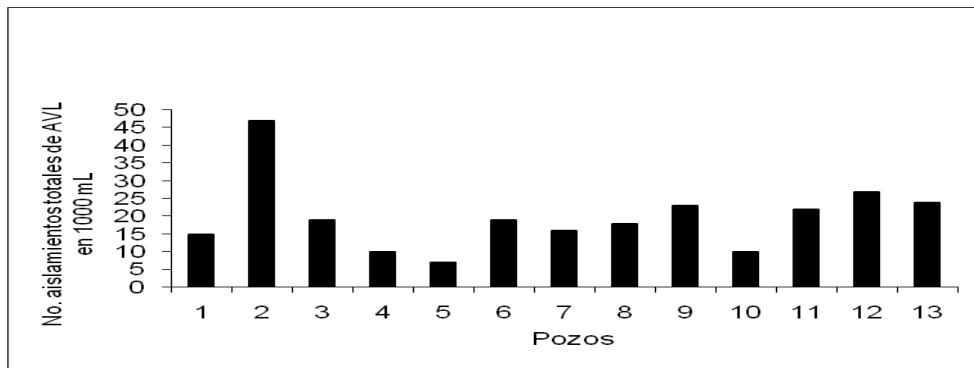


Figura 5. Variación espacial de las amibas de vida libre en los pozos del acuífero de Zacatepec, Morelos.

El agua de los pozos no está cumpliendo con la norma oficial mexicana para agua de consumo humano (NOM-127) (SSA, 1994), ya que a pesar de que en 4 pozos no hubo coliformes fecales, en todos se encontraron coliformes totales y de acuerdo a la norma, tanto las coliformes totales como fecales deben estar ausentes.

La constante presencia de las amibas de vida libre en el acuífero, aunque sea en bajo número, nos indica que estos sistemas acuáticos, pueden soportar una comunidad biológica importante.

La mayoría de las amibas aisladas son exclusivamente de vida libre, pero tienen un papel importante en la naturaleza porque son consumidoras voraces de bacterias (Page, 1988; Bonilla et al., 2004). De las amibas reportadas como patógenas, se aisló *A. polyphaga*, que es causante de queratitis amibiana, una infección ocular grave que si no se diagnostica y trata a tiempo, puede causar la pérdida del ojo (John, 1993; Visvesvara et al., 2007; Bonilla y Ramírez, 2008). La frecuencia con la que se encontró el género *Acanthamoeba* en este acuífero (6.6%), contrasta con lo reportado en el acuífero del valle del Mezquital en Hidalgo (67.3%), en donde se presenta una fuerte contaminación orgánica (Ramírez et al., 2001). Esto sugiere que *Acanthamoeba* puede soportar concentraciones altas de materia orgánica.

La presencia en el acuífero de las amibas de los géneros *Hartmannella*, *Vannella* y *Vahlkampfia* puede ser importante, porque se han reportado en infecciones cerebrales y oculares. *Hartmannella* se encontró en un caso de encefalitis y los tres géneros se han reportado asociadas a casos de queratitis amibiana, aunque no se ha podido comprobar su papel como causantes de las enfermedades (Aitken et al., 1996; Centeno et al., 1996; Dorothy et al., 1996; Dua et al., 1998; Inoue et al., 1998; Michel et al., 2000; Lorenzo et al., 2007; Scheid, 2007).

El patrón temporal de las AVL que se presentó en el agua subterránea, no concuerda con el patrón conocido para estas amibas, en el que el mayor número se presenta en los meses de verano; esto se pudo deber a que la mayoría de las amibas aisladas no son patógenas y pueden estar presentes a temperaturas menores que las patógenas (Bonilla et al., 2004).

El número de aislamientos amibianos relativamente alto que se obtuvo en el pozo 2, se pudo deber a que este pozo se encuentra localizado dentro de una

empresa avícola, que pudiera estar aportando una importante contaminación tanto biológica como orgánica al agua subterránea a través de la disposición de sus efluentes de agua de desecho en el suelo (Gerba y Bitton, 1984; Field y Barber, 1994; Wallach, 1994; Zoller, 1994; García y Piña, 2003).

Los valores de pH y oxígeno disuelto estuvieron dentro de los reportados para la presencia, tanto de las amibas de vida libre no patógenas como patógenas, pero la temperatura no favoreció la mayor presencia de las amibas patógenas, especialmente de *Naegleria fowleri*, debido a que estas prefieren temperaturas por encima de los 30°C (Bonilla et al., 2004; Visvesvara et al., 2007).

### Conclusiones

En general, podemos decir que la calidad bacteriológica de los pozos estudiados del acuífero de Zacatepec se encuentra por encima de los valores establecidos en la norma para agua potable, esto nos indica que el acuífero está afectado por las descargas de aguas residuales que van directo al suelo, las cuales están empezando a tener impacto en este sistema acuático.

Con respecto a las amibas de vida libre patógenas hay que tener cuidado con el uso del agua del acuífero, porque algunas de las amibas presentes se han encontrada asociadas a algunas patologías. Por lo anterior es importante que cumpla con la desinfección del agua antes de ser distribuida a los usuarios.

Es probable que el incremento de asentamientos humanos que carecen de adecuados servicios sanitarios y drenajes, estén influyendo en este deterioro de la calidad del agua del acuífero.

La presente investigación contribuyó al conocimiento de la biología del agua subterránea, especialmente del grupo de las amibas, que ha sido poco estudiado.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Programa PAPCA 2006-2007 de la FES Iztacala de la UNAM por el apoyo económico otorgado para la realización de esta investigación y la Comisión Nacional del Agua por el apoyo en el apoyo logístico en la realización de los muestreos.

## Bibliografía

- Aitken, D., Hay, J., Kinnear, F.B., Kirkness, C.M., Lee, W.R. y Seal, D.V. 1996. Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hartmannella*. *Infection Ophthalmology*, 103: 485-493.
- APHA-AWWA-WEF. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. USA.
- Bitton, G. y Harvey, R.W., 1992. Transport of pathogens through soils and aquifers. En: R. Mitchell (Ed), *Environmental Microbiology*. Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 103-124.
- Bonilla, P., Ramírez, E., Ortiz R. y Eslava, C. 2004. La ecología de las amibas de vida libre en ambientes acuáticos. En: I. Rosas, A. Cravioto y E. Ezcurra (Eds), *Microbiología Ambiental*. Instituto Nacional de Ecología-UNAM, México, pp. 67-78.
- Bonilla, P. y Ramírez, E. 2008. Amebas de vida libre asociadas a patologías en seres humanos. En: M.A. Becerril (Ed), *Parasitología Médica*. McGraw-Hill Interamericana, México, pp. 22-30.
- Centeno, M., Rivera, F., Cerva, L., Tsutsumi, V., Gallegos, E., Calderón, A., Ortiz, R., Bonilla, P., Ramírez, E. y Suárez, G. 1996. *Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient with meningoencephalitis and bronchopneumonia. *Archives of Medical Research*, 27: 579-586.
- Chapelle, H.F. 1993. *Groundwater Microbiology and Geochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- CNA. 2000. Determinación de la disponibilidad del agua en el acuífero de Zacatepec, Estado de Morelos. Gerencia de Aguas Subterráneas, Subgerencia Regional Técnica, México.
- Craun, G.F. 1984. Health aspect of groundwater pollution. En: G. Bitton y Ch.B. Gerba (Eds), *Groundwater pollution microbiology*. John Wiley & Sons, New York, pp. 135-180.
- Cullimore, D.R., 1992. *Practical Manual of Groundwater Microbiology*. Lewis Publishers, New York.
- Dua, H.S., Azuara-Blanco, A., Hossain, M. y Lloyd, J. 1998. Non-Acanthamoeba amebic keratitis. *Cornea*, 18: 499-501.
- Eitan, G., 1994. Groundwater contamination by septic tanks. En: U. Zoller (Ed), *Groundwater Contamination and Control*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 203-208.
- Field, J.A. and Barber, L.B. 1994. Wastewater treatment and groundwater contamination. En: U. Zoller (Ed), *Groundwater Contamination and Control*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 377-390.
- García, C.M. y Piña, C.M. 2003. Evaluación de la contaminación del agua subterránea del valle de Ciudad Juárez, Durango. (en <http://www.uaaan.mx/DirInv/Rdos2003/cont2003.pdf>).
- Gerba, P. and Bitton, G. 1984. Microbial pollutants their survival and transport pattern to groundwater. En: G. Bitton y Ch.B. Gerba (Eds), *Groundwater pollution microbiology*. John Wiley & Sons, New York, pp. 65-88.
- Inoue, T., Asari, S., Tahara, K., Hayashi, K., Kiritoshi, A. y A. Shimomura, A. 1998. *Acanthamoeba* keratitis with symbiosis of *Hartmannella* ameba. *American Journal of Ophthalmology*, 125: 721-723.
- Iturbe, A.R y Silva, M.A.E. 1992. Agua subterránea y contaminación. Series del Instituto de Ingeniería. No. 539. Instituto de Ingeniería UNAM, México.
- John, D.T. 1993. Opportunistic pathogenic free-living amoebae. En: J.P. Kreier y J.R. Baker (Eds), *Parasitic Protozoa*. Vol III. Academic Press, San Diego, pp. 139-246.
- Keswick B.H. 1984. Sources of groundwater pollution. En: G. Bitton y Ch.B. Gerba (Eds), *Groundwater pollution microbiology*. John Wiley & Sons, New York, pp. 39-64.
- Lorenzo-Morales, J., Martínez-Carretero, E., Batista, N., Alvarez-Marin, J., Bahaya, Y., Walochnik, J. y Valladares, B., 2007. Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *Parasitology Research*, 102: 167-169.
- Michel, R., Schmid, E.N., Boker, T., Häger, D.G., Müller, K.D., Hoffmann, R. y Seitz, H.M. 2000. *Vannella* sp. harboring Microsporidia-like organisms isolated from the contact lens and inflamed eye of a female keratitis patient. *Parasitology Research*, 86: 514-520.
- SSA, 1994. Norma Oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano (Modificación). Límites permisibles de calidad y tratamiento a que debe someterse el agua para su potabilización. Diario Oficial de la Federación, 16 de diciembre de 1999. México.
- Novarino, G., Warren, A., Butler, H., Lambourne, G., Boxshall, A., Bateman, J., Kinner, N.E., Harvey, R.W., Mosse, R.A. y Teltsch, B., 1997. Protistan communities in aquifers: a review, *FEMS Microbiology Review*, 20: 261-275.
- Pacheco, A.J., Cabrera, S.A. y Pérez, C.R. 2004. Diagnóstico de la calidad de agua subterránea en los sistemas municipales en el Estado de Yucatán, México. *Ingeniería*, 8: 165-179.
- Page, F.C. 1988. A new key to freshwater and soil gymnamoebae. *Culture Collection of Algae and Protozoa*, Cumbria.
- Price, M. 2007. Agua subterránea. Limusa, México.
- Ramírez, E., Campoy, E., Matus, D., Robles, E., Bonilla, P., Warren, A. y Ortiz, R. 2001. Free-Living amoebae in organically-contaminated aquifer in Mexico. *Proceeding of IXth International Meeting of the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae*. John Libbey. Eurotex, Paris, pp. 109-116.
- Sabatini, D.A. 1994. Sources and types of groundwater contamination. En: U. Zoller (Ed). *Groundwater Contamination and Control*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 97-100.
- Scheid, P. 2007. Mechanism of intrusion of a microsporidian-like organism into the nucleus of host amoebae (*Vannella* sp.) isolated from a keratitis patient. *Parasitology Research*, 101: 1097-1102.
- Visvesvara, G.S., Moura, H. y Schuster, F.L. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunological Medical Microbiology* 50: 1-26.
- Wallach, R. 1994. Groundwater contamination by sewage irrigation. En: U. Zoller, (Ed). *Groundwater Contamination and Control*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 189-202.
- Zelikson, R. 1994. Microorganisms and viruses in groundwater. En: U. Zoller (Ed). *Groundwater Contamination and Control*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 425-436.
- Zoller, U., 1994. Fundamentals, scope, and issues. En: U. Zoller (Ed). *Groundwater Contamination and Control*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 425-436.