



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

CAMPUS "IZTACALA"

AMEBAS DE VIDA LIBRE AISLADAS DE AGUAS
SUBTERRANEAS DEL VALLE DEL MEZQUITAL,
HIDALGO, MEXICO.

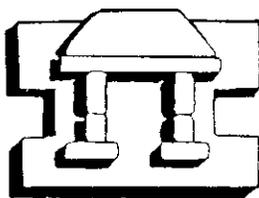
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

MATUZ MARES DEYAMIRA



Dir. M. en C. ELIZABETH RAMIREZ FLORES

IZTACALA TLALNEPANTLA, ESTADO DE MEXICO

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente estudio se realizó en la Unidad Interdisciplinaria de Investigación en Ciencias de la Salud y la Educación (UICSE), en el Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente y contó con el apoyo financiero para su impresión del Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (PROBETEL).

AGRADECIMIENTOS

A Dios por regalarme la vida y permitirme superar mis retos.

A mi madre Enriqueta Mares Ocampo por su fe, su amor, apoyo, confianza, dedicación y amistad, por sus enseñanzas y gran valor para enfrentar la vida y por estar siempre a mi lado, por hacer de mí lo que soy. Mil gracias.

A mi padre Edulfo Matuz López por su amor, apoyo y carácter que me motivaron a ser lo que soy.

A mi hermana Selene Matuz Mares por compartir mis preocupaciones y desvelos, por creer siempre en mí, por sus consejos y apoyo incondicional, pero sobre todo por su infinito amor y alegría.

Al Biólogo Alfonso Martínez Flores que siempre a estado a mi lado impulsándome para alcanzar mis metas brindándome su apoyo y amor.

A mis amigas Selene Celeste Zamudio Rodríguez, Norma Isela Pérez Pérez, María del Carmen Mendoza Pérez y Lizbeth Tenorio Altamirano por tantos años de cariño y amistad pero sobretodo por formar parte de mi vida y enriquecerla.

A la M. en C. Silvana Pertuz Beloso a quien quiero agradecer su cariño, amistad, enseñanzas y apoyo incondicional.

A los Biólogos Tania Garfias Espejo y Edgar Tovar Juárez que me dieron su amistad y confianza.

A todos los profesores de la carrera de Biología que contribuyeron a mi formación profesional.

A la M en C Elizabeth Ramírez Flores por la dirección de ésta tesis, por su confianza, su amistad, su tiempo y enseñanzas.

A la Dra. Patricia Bonilla Lemus, por su amistad, su alegría, su apoyo, su tiempo y sus valiosas observaciones que contribuyeron al enriquecimiento de este trabajo.

A los Doctores Maria del Rosario Sánchez y Alfonso Lugo Vázquez por sus valiosas observaciones y sugerencias que mejoraron el presente trabajo, además de su interés y amistad.

Al Dr. Miroslav Macek por compartir su experiencia conmigo brindándome su apoyo material y amistad incondicional.

A la M en C Emelia Campoy Otero quien me ofreció su amistad y confianza además de compartir sus conocimientos y su tiempo.

Al Químico Luis Fernando González por todas sus enseñanzas, su constancia y amistad.

Al los Doctores Guadalupe Martínez Hernández y Luis Arturo Baiza Gutman por su apoyo material, por permitirme compartir su espacio, por su alegría y amistad.

A todos mis compañeros del proyecto CyMA: Liliana, Nora, Luz, Silvana, Tania, Maria Elena, Juan, Mónica, Luis, Martha, por su amistad, alegría y el arduo trabajo compartido.

CONTENIDO	Página
Resumen	1
1.- Introducción	2
2.- Antecedentes	4
2.1- Historia	4
2.2-Enfermedades	5
2.3-Ecología	5
2.4-Estudios morfológicos	6
2.5 Estudios previos en el ambiente acuático	7
2.6- Trabajos preliminares en la área de estudio	8
3.-Objetivos	9
4.- Descripción del área de estudio	10
5.-Material y Métodos	13
5.1-Muestras del acuífero	13
5.2-Cultivo de las AVL	13
5.3-Pruebas de temperatura	14
5.4-Morfometría	14
5.5-Identificación morfológica	14
5.6-Pruebas de patogenicidad	14
6.-Resultados	16
6.1-Morfometría	19
6.2-Pruebas de patogenicidad	20
6.3-Pruebas de temperatura	20
6.4-Consideraciones ecológicas	21
6.5-Abundancia de organismos por pozo	23
6.6-Distribución estacional	26
6.7-Distribución espacial	30
7.-Discusión	35
8.-Conclusiones	41
9.-Referencias	42
Anexo	50

FIGURAS	PÁGINA
Localización del área de estudio	12
Porcentaje en que se presentan los géneros aislados -fig. 1	17
Aislamientos por especie -fig. 2	17
Imágenes de trofozoítos y quistes de las AVL representativas	18
Consideraciones ecológicas -fig. 3 a 7	22
Abundancia de organismos por pozo - fig. 8 a 14	25
Distribución estacional – fig. 15 a 21	28
Distribución espacial -fig. 22 a 41	32
Diagramas	
Diagrama de flujo del análisis de las muestras de agua	15
Tablas	
Riqueza específica -Tabla 1	16
Medidas morfométricas –Tabla 2	19
Pruebas de patogenicidad -Tabla 3	20
Parámetros registrados por pozo-Tabla 4	21
Abundancia de organismos - Tabla 5	23
Aislamientos obtenidos por estación del año- Tabla 6	27

RESUMEN

El agua subterránea del Valle del Mezquital, Hidalgo, México se analizó durante nueve meses con el objeto de determinar la presencia de amebas de vida libre (AVL), realizar la identificación morfológica, establecer la distribución estacional y espacial, así como el potencial patógeno de las amebas presentes en el acuífero. Las muestras de agua se tomaron en seis pozos a dos profundidades con un muestreador Byle, se concentraron por centrifugación sembrándose en medios específicos para el crecimiento de las AVL, las amebas aisladas se identificaron por morfología, las especies del género *Acanthamoeba* se inocularon por vía intranasal en ratones para probar su patogenicidad.

Se obtuvieron 289 cepas amebianas pertenecientes a 8 géneros y 32 especies. De las pruebas de patogenicidad realizadas a las 17 especies aisladas del género *Acanthamoeba* únicamente seis especies resultaron patógenas (*A. culbertsoni*, *A. rhyodes*, *A. royreba*, *A. lenticulata*, *A. polyphaga*, *A. mauritaniensis*) y las restantes resultaron invasivas atacando principalmente pulmón, hígado, riñón y cerebro. *Acanthamoeba* fue el género que se aisló con mayor frecuencia en los seis pozos. En relación a la distribución espacial el mayor número de aislamientos se dio en el pozo *Exhacienda de San José Boxay*. Con respecto a la distribución estacional el mayor número de aislamientos se presentó en la estación de lluvias, aunque estadísticamente no existió una diferencia significativa entre el número de aislamientos obtenidos en la estación de lluvias y el registrado durante la estación de secas.

La presencia de *Acanthamoeba* en el agua subterránea del Valle del Mezquital, representa un riesgo para la salud pública, debido a que algunas especies resultaron patógenas y otras más fueron invasivas, siendo esto un factor de riesgo importante para las personas con defensas debilitadas o inmunosuprimidas.

Este estudio demuestra la presencia de AVL en el acuífero del Valle del Mezquital, lo que representa un peligro potencial ya que dicho acuífero se usa para suministro de agua potable (de más de 500,000 habitantes) y con fines recreativos. Esta es la primera vez que se informa en México acerca de la presencia de amebas de vida libre patógenas y no patógenas en aguas subterráneas.

INTRODUCCIÓN

El agua desempeña un papel vital en el desarrollo de la vida, ya que absorbe las radiaciones caloríficas manteniendo una temperatura que hace posible el equilibrio de la humedad en el planeta, también es formadora de suelos, hábitat, medio de transporte y fuente de alimento para una gran variedad de organismos incluyendo al hombre (Casanelles, 1983; Gutiérrez, 1997). El abasto fijo mundial de agua en todas sus formas (vapor, líquido, sólido) es enorme, sin embargo el 95% del agua de la tierra es salada y sólo un 5% está disponible para nosotros como agua dulce, y de está el 29.9%, casi la tercera parte del agua dulce total de la tierra, es agua subterránea (UNICEF, 1998).

El agua subterránea es la parte del ciclo hidrológico que se encuentra, en el subsuelo, ya que por la fuerza de gravedad una parte de la precipitación que cae sobre la tierra (en forma de lluvia, nieve, neblinas y heladas), y el agua sobrante de las aguas superficiales (como son ríos, lagos, corrientes etc.), penetra en la capa vegetal, se infiltra y fluye a través de las partículas de tierra, arena, grava, o por las grietas de las rocas; el agua llena los pequeños huecos que hay en los materiales que constituyen el subsuelo. A esto se llama suelo o zona no saturada, porque no se observa completamente llena de agua, mientras que la zona que está saturada es aquella en la que el suelo se encuentra lleno de agua y alimenta las corrientes subterráneas formando los acuíferos (Guzmán, 1996).

México reúne características geográficas, orográficas y climáticas que propician la existencia de grandes áreas en donde la precipitación es muy escasa, lo que hace que existan muy pocos y mal distribuidos recursos hídricos superficiales, por lo que se tiene que recurrir al uso del agua subterránea (Morales, 1990). Ésta se ha aprovechado en nuestro país desde tiempos prehispánicos, pero desde hace varios años presenta serios problemas de contaminación (Arreguín, 1998).

Aunado a esto, el continuo y progresivo aumento en la extracción del agua subterránea ha dado lugar a fallas y fracturas del terreno, lo que aumenta el riesgo de contaminación de los acuíferos; así como la migración o mezcla de aguas de mala calidad que incorporan elementos contaminantes (metales pesados, bacterias, protozoos, virus, helmintos, desechos industriales y domésticos, fertilizantes, plaguicidas, etc.) e infiltración de aguas residuales (Cuadra, 1992; Alfaro, 1998; Arreguín, 1998). México utiliza más de la tercera parte del total del agua subterránea en actividades agrícolas, una quinta parte de la misma se emplea para abastecimiento de agua en poblaciones urbanas y rurales siendo de estas últimas la principal fuente de abastecimiento de agua, y con frecuencia la única (Morales, 1990; Arreguín, 1998).

En las aguas naturales se presentan microorganismos, tales como protozoos, dentro de este conjunto de organismos unicelulares se encuentran las amebas de vida libre (AVL) (Barnes y Ruppert, 1996), algunas de las cuales ocasionan enfermedades tanto a humanos como a animales; tales como rinitis, infecciones en la piel, riñón, hígado, queratitis amebiana, meningoencefalitis amebiana primaria (MAP), y encefalitis amebiana granulomatosa (EAG), siendo estas dos últimas mortales para el ser humano (Biddick *et al.*, 1984; Bonilla y Ramírez, 1993; Martínez y Visvesvara, 1997).

La distribución geográfica de las AVL es cosmopolita (Martínez y Visvesvara, 1997), se les puede encontrar prácticamente en todos los ambientes; se han aislado de agua dulce, agua de mar, sedimentos del océano, albercas, cuerpos de aguas termales, agua residual, agua mineral embotellada, aguas calentadas por fuentes industriales, tinas de fisioterapia, tomas de agua domésticas, sistemas de ventilación, aire acondicionado, suelo, composta, y en la atmósfera (Rivera *et al.*, 1987; Bottone, 1993; Bonilla, 2000).

El ciclo de vida de las AVL consiste en dos estados: una forma activa que se alimenta y reproduce, llamada *trofozoito* y una forma inactiva de resistencia para protegerse de los cambios ambientales, falta de alimento y otros factores adversos, llamada *quiste* (John, 1993; Marciano *et al.*, 2000). Las AVL pueden ser diseminadas en el ambiente adheridas a partículas de polvo o viajar solas (Lawande *et al.*, 1979; Lawande, 1983), la lluvia y el viento pueden transportar dichos organismos de un nivel atmosférico a otro (Magarvey y Hoskins, 1968), además de que estos microorganismos regresan a la tierra con las lluvias y el aire frío (Gislen, 1948).

Dada la importancia del agua subterránea en México tanto para fines agrícolas como de abastecimiento y consumo humano (Morales, 1990), principalmente en zonas rurales (Arreguín, 1998), donde la precipitación en ocasiones es muy escasa, y existen pocos recursos hídricos superficiales, se tiene que recurrir al uso del agua subterránea como principal fuente de abastecimiento, para satisfacer las necesidades crecientes de agua para todo tipo de actividades de las poblaciones, y prioritariamente para abastecimiento de aquellos municipios localizados en áreas áridas y semiáridas donde las actividades preponderantes son de tipo agrícola y el agua subterránea constituye su principal fuente de abastecimiento. Tal es el caso del Valle del Mezquital una de las zonas agrícolas más importantes en el estado de Hidalgo, donde desde hace más de 100 años, además del agua subterránea se han empleado aguas negras crudas provenientes de Valle de México para riego de cultivos; lo anterior, aunado a la sobre explotación del agua subterránea, ha ocasionado hundimientos, grietas, fallas, y fracturas del terreno, favoreciendo la infiltración y migración de aguas tanto superficiales como subterráneas de mala calidad que transportan y difunden contaminantes y microorganismos potencialmente patógenos, como lo son las AVL.

Es por todo lo anterior que el presente proyecto de investigación, se propuso estudiar la población de amebas de vida libre del agua subterránea del Valle del Mezquital, así como su potencial patógeno.

ANTECEDENTES

Historia

Probablemente, la primera observación de protozoos de vida libre fue realizada por Antonie van Leeuwenhoek en 1675 (Martínez, 1985). Pero no fue sino hasta 1755 cuando Rösé Von Rosenhof hace una descripción detallada, con dibujos a color de unos microorganismos ameboideos unicelulares que se podían observar a simple vista, ya que medían aproximadamente 200 µm de longitud. Más adelante Linnaeus (1758) los denominó *Volvox chaos* (Grell, 1973; Jadin, 1987).

En 1841, Felix Dujardin -un naturalista francés- describe por vez primera a una ameba pequeña de vida libre aislada del río Sena, de forma alargada a la que denominó *Amoeba limax* (Martínez, 1985). Penard en 1890 describió otra ameba limax que Scharldinger en 1899 denominó *Naegleria gruberi*, la cual descubrió en las heces de un paciente con disentería (citados en Martínez, 1985; John, 1993). De hecho, fue la primera vez que se asoció la patogenicidad de las amebas de vida libre con el hombre (Grell, 1973; Jadin, 1987). En 1908 Walker realizó un estudio detallado de las AVL en el que aisló varios especímenes de heces fecales humanas y animales, como resultado describió 38 variedades de amebas de vida libre (Jadin, 1987).

Para 1911, Alexeieff establece los géneros *Hartmannella* y *Naegleria* determinando para esta última la capacidad de transformarse temporalmente a una forma flagelada, en tanto que La Lung Bonnaire en 1912 describe el género *Vahlkampfia*, pero no fue sino hasta los años 1920 a 1926 que se logra el crecimiento de AVL en medios de cultivo lo que permitió demostrar el carácter no parasitario de los protozoos de vida libre. Tiempo después, Castellani observó por vez primera contaminación en cultivos de hongos por amebas (Visvesvara, 1991), este hecho motiva el interés de Douglas quien en 1930 clasifica a la ameba responsable de la contaminación de cultivos de laboratorio como *Hartmannella castellanii* (Martínez, 1985; Visvesvara, 1991) la cual es reportada en los años siguientes como contaminante de cultivos bacterianos.

En 1952 Singh comienza a realizar trabajos de tipo taxonómico para clasificar a las amebas sobre la base de su patrón de división nuclear, sentando los pilares de la taxonomía moderna (Martínez, 1985). Para 1956 Jahn et al., señalan a *Hartmannella* sp. como contaminante de cultivos de tejido y causante de efectos citopáticos sobre los mismos, pero no fue sino hasta 1958 cuando Culbertson descubre que las AVL tenían la capacidad de invadir tejidos y mucosas, además de que pueden establecerse en el cerebro donde producen meningoencefalitis, por lo que sugiere que la exposición frecuente de las personas y los animales a estos organismos - que se encuentran de manera natural en el agua, aire y suelo- puede ocasionar infecciones y enfermedades, hecho que fue demostrado posteriormente por el mismo Culbertson, al aislar amebas de muestras de pacientes (Martínez, 1985; Visvesvara, 1991; Marciano et al., 2000).

Posteriormente y de forma esporádica, siguieron surgiendo informes acerca de amebas de vida libre (AVL) asociadas con seres humanos afectados de alguna enfermedad, principalmente con cuadros diarreicos o disentéricos (Martínez, 1985).

Enfermedades.

Las AVL son capaces de causar enfermedades crónicas y letales tanto en el humano como en animales (Beaver *et al.*, 1984; Martínez, 1985). Estos organismos oportunistas, pueden producir infecciones serias del ojo y del sistema nervioso central (John, 1993). Los únicos géneros de amebas de vida libre que hasta hace poco tiempo se conocían como patógenos eran *Naegleria* y *Acanthamoeba* (John, 1993). A medida que se ha estudiado más de cerca este grupo de protozoos, se ha detectado que otras amebas pueden invadir el sistema nervioso central y causar infecciones en el hombre y animales tal es el caso de *Balamuthia mandrillaris* un agente etiológico de encefalitis amebiana granulomatosa (Visvesvara *et al.*, 1993).

Los primeros casos de meningoencefalitis amebiana primaria en humanos son reportados en Australia en 1965, siendo *Naegleria fowleri* la ameba causante de la infección. Subsecuentemente surgen casos en Estados Unidos y Europa (Butt, 1966; Cervá *et al.*, 1968 citados en Marciano *et al.*, 2000), mientras que las primeras infecciones ocasionadas en el sistema nervioso central por *Acanthamoeba* se presentan a partir de la década de los 70 (John, 1993). En 1980 Martínez propone el término encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) para describir la infección causada en el sistema nervioso central por *Acanthamoeba* y diferenciarla de la meningoencefalitis amebiana primaria (MAP) ocasionada por *Naegleria fowleri*. Las infecciones causadas por AVL particularmente por *N. fowleri*, ocurren en individuos jóvenes y saludables, en tanto que las causadas por *Acanthamoeba* usualmente ocurren en individuos inmunodeprimidos e inmunocomprometidos, con excepción de la queratitis, que afecta a individuos sanos (Martínez, 1985).

Para 1995 en México se habían presentado 10 casos de meningoencefalitis amebiana primaria. Entre ellos están los brotes epidémicos que se han presentado en los últimos años en Mexicali, en la zona fronteriza del Río Bravo, y probablemente en la Huasteca Potosina (Ramírez y Bonilla, 1995). Las infecciones ocasionadas por estas amebas van desde rinitis crónica, hasta queratitis; pero pueden encontrarse en el líquido cefalorraquídeo, en el cerebro, en tejidos de la piel, ojos, y pulmón (Ramírez y Bonilla, 1995; Butt, 1964). Para 1998 Martínez y Visvesvara informan que de los 177 casos de EAG reportados, 95 corresponden a los Estados Unidos. Y más de 50 de estos casos se han presentado en pacientes con VIH. En este mismo año Kinnear señala a *Vahlkampfia* y *Hartmannella* como posibles causantes de queratitis en humanos, aunque esto no ha sido comprobado.

Ecología.

Las AVL, incluyendo a las especies patógenas, se encuentran en una amplia gama de hábitats entre los que se incluyen sedimentos, aire, agua y suelo (Martínez, 1985). En este último las AVL son reconocidas como los más importantes depredadores de bacterias (Bamforth, 1985; Weekers *et al.*, 1993; Gonzáles *et al.*, 1992) ya que consumen un 60% de la biomasa bacteriana, además de ser consideradas como las principales controladoras del crecimiento de dichas poblaciones (Clarholm, 1981, 1989; Coleman, *et al.*, 1997; Rivera, citado en Villagrana, 1992; Weekers *et al.*, 1993).

Por otra parte estos protozoos estimulan la actividad microbiana y aumentan el movimiento de los nutrientes, particularmente del nitrógeno el cual de lo contrario permanecería inmovilizado en la biomasa bacteriana; es por tal razón que las AVL juegan un papel activo en la fertilidad del suelo y el reciclado de los nutrientes (Griffiths, 1990; Foster y Dormaar 1991).

En los ambientes acuáticos las AVL se alimentan de bacterias, materia orgánica, hongos, algas y otros protozoos, incluyendo otras amebas (Rodríguez, 1994), esto se debe a que tienen la capacidad de alimentarse tanto de forma osmótrofa (consumen materia orgánica disuelta), como holozóica (ingieren bacterias), de esta forma reducen la población bacteriana y la materia orgánica en suspensión (Bitton, 1999).

Los primeros informes sobre aislamientos de *N. fowleri* en el ambiente, se hicieron en 1972, en Australia donde fue aislada de tuberías de agua potable. En la India la aislaron de lodos de aguas residuales y en un estanque en Estados Unidos (Ramírez y Bonilla, 1995). En 1976 Simitzis logró aislar AVL de los géneros *Hartmannella*, *Vahlkampfia* y *Acanthamoeba* de sistemas para abastecimiento de agua en localidades urbanas y comunales en el área de Brest, Francia. En 1978 Kadlec señala la presencia frecuente de amebas pertenecientes a los géneros *Acanthamoeba*, *Hartmannella* y *Vahlkampfia* en animales domésticos como vacas, perros, conejos, pichones y pavos. Dive *et al.*, en 1979 realizan un estudio en suministros de agua subterránea encontrando ausencia de *Naegleria*, así como de otras amebas patógenas. En cambio, *Acanthamoeba* se ha aislado de casi todos los ambientes como: agua de mar, sedimentos oceánicos, agua fría para nadar, grifos, agua embotellada, aguas residuales, sistemas de aire acondicionado, etc.

En organismos vivos ha sido aislada de vegetales, hongos, peces, reptiles, aves, mamíferos y cultivos celulares (De Jonckheere, 1991). Las especies patógenas son frecuentes en cuerpos de agua termales, pero también se han aislado cepas en el aire (Bonilla, 2000).

Estudios morfológicos.

Las AVL fueron detalladas morfológicamente por varios investigadores (Ehrenberg, 1838; Penard, 1890; Dangeard, 1900 y Valquer, 1908). Nagler en 1909 realizó la descripción de *A. hartmannie*, Puschkarew (1913), Schaffer (1926) quien elaboró la descripción de aproximadamente 200 especies de AVL, y Volkonsky (1931); todos estos investigadores inician el conocimiento morfológico de las amebas mediante descripciones detalladas de diferentes géneros, pero hasta 1952 Singh realiza un trabajo que sirvió como fundamento para establecer la clasificación taxonómica actual de las AVL (Martínez, 1985). Sin embargo el pilar más importante dentro de los estudios morfológicos son los trabajos de Page ya que en 1974 describe 8 nuevas especies y en 1988 sintetizó todos los datos disponibles hasta esa fecha y elaboró una clave taxonómica muy completa para la identificación de amebas del suelo y de agua dulce, la cual es hasta el momento una de las herramientas básicas en la identificación morfológica, aislamiento y cultivo de las AVL.

Han sido muchos los investigadores que han contribuido al conocimiento de las amebas de vida libre, entre ellos se puede destacar a Pussard (1966), Cerva (1968, 1969, 1971, 1973, 1977), Visvesvara y Balamuth (1975), Willaert *et al.*, (1974, 1976), Pussard y Pons (1977) estos últimos proponen una clave taxonómica para el género *Acanthamoeba*, basándose en la morfología de las paredes del quiste (citado en Martínez, 1985). También se cuenta con trabajos más recientes (Page, 1991; Arndt, 1993; Rogerson, 1995 citados en Smirnov y Goodkov, 1999). Siendo estos últimos quienes elaboraron una lista ilustrada de los morfotipos básicos de las *Gimnamoebas* fundamentándola en un análisis de los patrones de organización morfodinámica de las formas móviles de las mismas (Smirnov y Goodkov, 1999).

Estudios previos en el ambiente acuático.

En el ambiente acuático se han realizado trabajos sobre cuantificación de *Naegleria* en columnas de agua de diversos lagos de Florida (Wellings *et al.*, 1977; Kyle y Noblet, 1985), enumeración de amebas de vida libre patógenas del lecho de un lago de Nebraska (O'Dell, 1979), así mismo se ha logrado aislar especies patógenas de *Acanthamoeba* en ríos de Berlín, Alemania (Janitschke *et al.*, 1983) en cuerpos acuáticos en Egipto (Mansour *et al.*, 1991) y Alexandria (Sadaka *et al.*, 1994) en los que además de *Acanthamoeba* se encontraron especies de los géneros *Naegleria* y *Vahlkampfia*. En albercas públicas en Helsinki, Finlandia donde se pudieron detectar AVL de los géneros *Vexillifera* y *Hartmannella* (Vesaluoma *et al.*, 1995). Recientemente se aislaron amebas de los géneros *Vannella* y *Vexillifera* de órganos infectados en peces de agua dulce (Dykova *et al.*, 1998).

En México se han aislado amebas de los géneros *Acanthamoeba*, *Mayorella*, *Pelomyxa*, y *Vahlkampfia* de aguas negras de la zona metropolitana de la ciudad de México (Rico-Ferrat y López-Ochoterena, 1976 citados en Bonilla, 2000). En 1979 Tomasini y López-Ochoterena aislaron *Naegleria* y *Vahlkampfia* de tinacos de casas-habitación del Distrito Federal. Posteriormente Coronado y López-Ochoterena (1980) aislaron amebas de los géneros *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Vahlkampfia* de piscinas de la ciudad de México y del estado de Morelos (Bonilla, 2000).

También se han realizado estudios sobre amebas de vida libre en albercas de aguas termales de la región de Tecozautla, Hidalgo, encontrando especies de los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Willaertia* (Martínez, 1987; Rivera *et al.*, 1989) así como la determinación de *N. fowleri* y *Acanthamoeba* spp. en aguas termales naturales en tres balnearios del estado de Hidalgo, México (Rivera *et al.*, 1989); en piscinas de aguas naturales y termales de la Huasteca Potosina y de tinas de hidroterapia (Bonilla *et al.*, 1999; Rivera *et al.*, 1978, 1981, 1983, 1990, 1993 citados en Bonilla, 2000), también se han aislado amebas del acuífero de la ciudad de León Guanajuato (Campoy *et al.*, 1996). García (2000) realizó un estudio en aguas recreativas (manantiales de aguas sulfurosas, manantiales de aguas alcalinas, pozas alimentadas por cascadas naturales y aguas termales) de San Luis Potosí, México, encontrando *Naegleria* sp. y *N. fowleri*.

Trabajos preliminares en la área de estudio.

Desde 1902 se han realizado diversos trabajos sobre contaminación del caudal del río Tula por aguas negras provenientes del Valle de México (Lozano, 1936), así como estudios realizados en el Valle de Ixmiquilpan en 1909 con motivo de la contaminación de las aguas del río del mismo nombre por descargas de aguas negras provenientes de la Ciudad de México (Paredes, 1909 citado en Arreguín, 1998).

También se han llevado a cabo estudios geológicos como el realizado por Lozano en 1936; en tanto que Blasquez en 1938 informa sobre la existencia de numerosos manantiales y pozos contaminados por bacterias y materia orgánica producto del riego con aguas residuales. En cuanto a las condiciones actuales del acuífero solo se cuenta con un estudio realizado por Gallegos *et al.*, en 1999 quienes se enfocaron a la parte microbiológica, específicamente a bacterias y coliformes totales.

Con respecto a la vegetación en 1936 y 1937 Bravo realizó un estudio en Actopan e Ixmiquilpan, posteriormente, Paray (1944, 1947) hizo una descripción de la vegetación de la barranca de Tolantongo, por su parte Meyrán (1955, 1958) realizó estudios sobre las cactáceas y suculentas (citados en Velasco y Ojeda, 1989).

Para 1962 Segeston realizó estudios geológicos más completos (citado en Hernández, 1994) mientras que Alonso (1961), González (1968), Otelo (1968, 1970), Cantú (1969), Sánchez (1955, 1968, 1978) y Bracamontes (1978) realizaron estudios sobre cactáceas y suculentas (citados en Velasco y Ojeda, 1989; Hernández, 1994). Mas recientemente Carballo (1983) realizó la determinación del uso de suelo, y se retoman los estudios florísticos por Velasco y Ojeda (1989).

Muñoz y López (1987, 1989, 1990, 1991) llevaron acabo estudios acerca de la relación planta-suelo; así como propuestas para el ordenamiento ecológico del Valle del Mezquital (citados en Hernández, 1994) y en la actualidad está en marcha un programa de manejo integral de recursos (López *et al.*, 1999).

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la riqueza específica de las amebas de vida libre (AVL) presentes en el agua subterránea del Valle del Mezquital Estado de Hidalgo, México.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar y cultivar las AVL del agua subterránea del Valle del Mezquital .
- Realizar el diagnóstico morfológico mediante microscopía óptica de las AVL aisladas del agua subterránea del Valle del Mezquital .
- Realizar la morfometría con microscopía óptica, tanto de la forma trófica como del quiste de las amebas.
- Determinar algunas consideraciones ecológicas, como temperatura, pH, oxígeno disuelto, dureza, y alcalinidad en relación con la presencia de las AVL.
- Establecer la distribución estacional de las AVL durante el período de estudio.
- Establecer la distribución espacial de las AVL durante el periodo de estudio.
- Realizar pruebas de crecimiento a diferentes temperaturas (22°C, 37°C, 42°C) de los aislamientos obtenidos.
- Realizar pruebas de patogenicidad de cada una de las especies aisladas del género *Acanthamoeba*.

ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio está comprendida entre las coordenadas 99°23' – 98°55' de longitud oeste y 20°20' – 20° 30' de latitud norte. En esta área la actividad preponderante es la producción agrícola dependiente de riego, por lo que se aprovechan principalmente las aguas negras provenientes del Valle de México y en menor proporción agua de las presas Endhó y Requena (Muñoz y López, 1992; Hernández, 1994). En esta zona el suelo es de tipo rendzina (con una capa superficial rica en humus que descansa sobre roca caliza), asociado a suelo de tipo feozem (con gran aportación de carbonatos) (INEGI, 1997).

El clima de la región es semiseco templado con lluvias en verano, aunque llega a presentar algunos torrenciales en el período que comprende marzo-abril. Presenta una precipitación media anual de 450 mm y un potencial de evaporación de 2100 mm (García, 1988; INEGI, 1997). La temperatura media anual es de 18.3°C presentándose la máxima en mayo y la mínima en noviembre, así mismo durante la estación invernal se presentan heladas en un intervalo de 40 a 60 días (INEGI, 1998).

El Valle del Mezquital está situado en la porción suroeste del estado de Hidalgo, aproximadamente a 50 Km al norte de la Ciudad de México. Se caracteriza por su extensa planicie, así como por la presencia de montañas y colinas de diversas altitudes, presenta una altura sobre el nivel del mar de 2100m. El Valle del Mezquital se encuentra dividido en tres zonas de riego; la región III (Tula), región VI (Ixmiquilpan) y la región VII (Actopan), y abarca un área de 45,517 hectáreas (Arenal, 1978 y 1985).

En la región III se localizan tres de los municipios de muestreo: Atitalaquia, Tezontepec, y Tula; en tanto que los otros tres municipios muestreados Actopan, Mixquiahuala, y San Salvador se localizan en la región VII.

En cuanto a la hidrología del Valle del Mezquital, ésta se encuentra comprendida en la zona del "Alto Pánuco" que comprende las cuencas de los Ríos Tula el cual desde 1902 aumenta su caudal con las aguas negras de la cuenca del Valle de México, que vienen por el tajo de Nochistongo y por el túnel perforado cerca de Tequisquiác que respectivamente desembocan en los ríos del Salto y de Tequisquiác tributarios del Río Tula (Velazco y Ojeda, 1989; INEGI, 1998).

Los principales puntos de drenaje del Valle del Mezquital están al norte y son los ríos Tula y Actopan los cuales forman parte de la base del Pánuco-Moctezuma; al suroeste el Río Tepeji, el cual después de pasar por la presa Endhó se conoce como Río Tula, y es abastecido por el Río Salado; al este el Río Actopan que desciende de las montañas de Pachuca y Chicavasco, uniéndose a los ríos Tula e Ixmiquilpan (Arenal, 1978 y 1985).

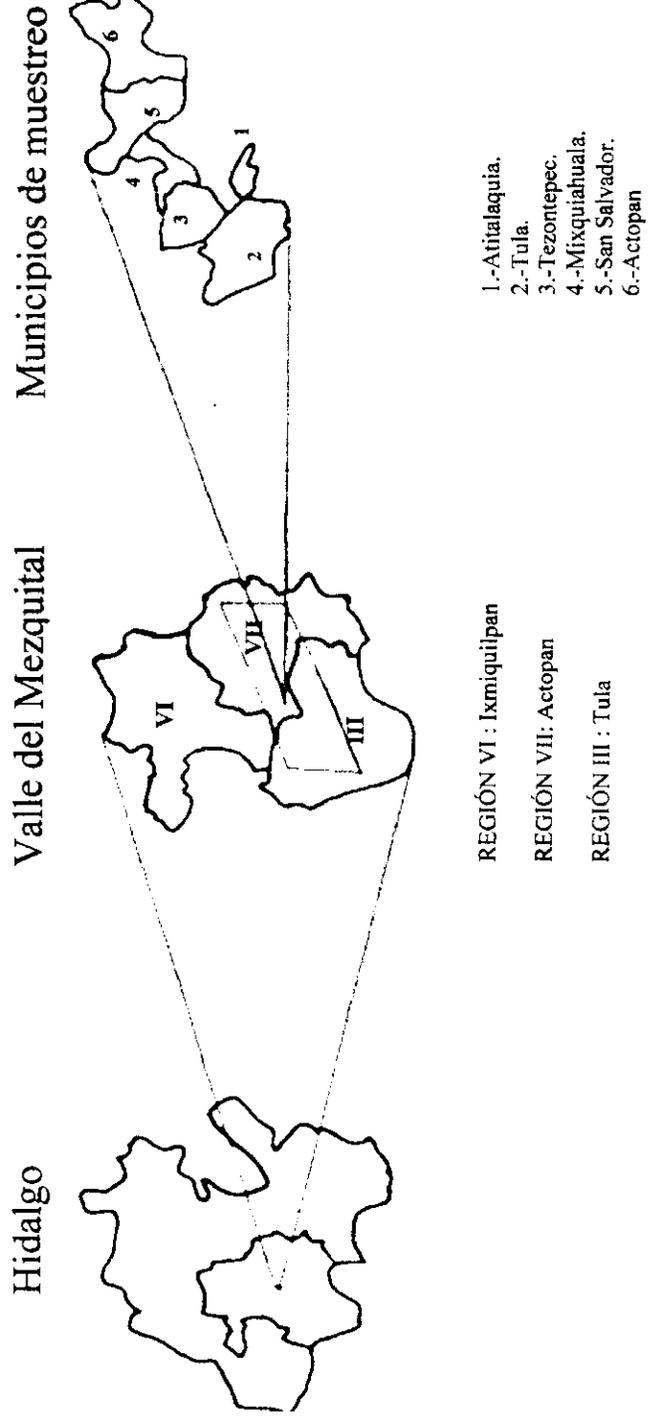
La vegetación del lugar está integrada por comunidades vegetales típicas de zonas áridas, algunas de estas son: *Prosopis leavigata*, *Flourensia ceruna*, *Myrtillocactus sp.*, *Opuntia sp.*, *Stenocereus sp.*, *Cephalocereus sp.*, *Agave lechiguilla*, *Agave striata*, *Dasylium sp.*, *Flourensia resinosa*, *Juniperus flacida*, *Pinus sembroides*, *Quercus microphylla*, *Mammillaria sp.* y *Fouquieria faciculata* (Velazco y Ojeda, 1989).

Los acuíferos de Tepeji de Ocampo, el Valle del Mezquital, Ixmiquilpan, Actopan, Tulancingo, Tecozautla, Pachuca, Tizayuca y Apan suministran 90% a las áreas rurales y pequeñas comunidades siendo fuentes de abastecimiento para agua potable (Arenal, 1978 y 1985).

La principal fuente de agua subterránea se ubica en los acuíferos del Valle del Mezquital cuya recarga se incrementó notablemente al iniciarse el riego con aguas superficiales. El acuífero descarga la mayor parte de su alimentación a través del cauce del Río Tula y de numerosos manantiales entre los que destacan el de Cerro Colorado y el Tephe (Hernández, 1994).

A pesar de esto, la extracción inmoderada del agua del subsuelo, ha traído como consecuencia la utilización de aguas residuales crudas para actividades agrícolas implicando un serio riesgo de contaminación de los acuíferos del Valle del Mezquital y por ende un serio riesgo para la salud de los habitantes de los poblados que dependen del agua de estos acuíferos (Muñoz y López, 1992; Hernández, 1994).

LOCALIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO



MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto constó de dos fases:

En la primera fase, la perforación de los seis pozos para el monitoreo del agua subterránea fue realizado durante 1996 por la Subgerencia de Aguas Subterráneas de la Comisión Nacional del Agua (CNA), en seis localidades diferentes del Valle del Mezquital Estado de Hidalgo. Los pozos tuvieron las siguientes profundidades: (*S = superficial; P = profundo).

Localidad 1 *El Bordo* Mpio. de San Salvador. (S = 21m; P = 29m)*

Localidad 2 *El Tinaco* Mpio. de Mizquiahuala. (S = 7m; P = 14m)

Localidad 3 *Exhacienda de San José Boxay* Mpio. de Atitalaquia. (S = 11m; P = 25m)

Localidad 4 *Cerro Colorado* Mpio. de Tezontepec. (S = 7m; P = 25m)

Localidad 5 *Tula* Mpio. de Tula. (S = 7m; P = 37m)

Localidad 6 *Actopan* Mpio. de Actopan. (S = 7m; P = 30m)

En la segunda fase, se realizó el **Trabajo de Campo** el cual consistió:

-Muestreo.

Se estudió el acuífero, de tal manera que se realizó un muestreo por mes durante un período de 9 meses que comprendió de abril de 1998 a enero de 1999 (exceptuando el mes de diciembre). Para establecer la distribución estacional de las AVL, se consideró un número determinado de meses de muestreo (debido a que la estación de lluvias se encuentra bien definida) para cada estación quedando de la siguiente manera:

ESTACIÓN	MESES DE MUESTREO
Lluvias	mayo, junio, julio, agosto y septiembre
Secas	abril, octubre, noviembre y enero

Las muestras de agua subterránea fueron tomadas a dos diferentes profundidades en cada uno de los seis pozos mediante el uso de un muestreador Byle de 100 ml capacidad. Se realizó en campo la medición de pH (potenciómetro HANNA Instruments HI 8314), temperatura (termómetro de mercurio Yoshino KEIKI CO de 10°C a 110°C) y oxígeno disuelto (oxímetro YSI mod. 51B). Se tomaron muestras de un litro de agua en garrafrones de plástico manteniéndose en refrigeración y se transportaron inmediatamente al laboratorio para la determinación de dureza total y alcalinidad total, de acuerdo a los criterios propuestos por APHA (1980).

Para el aislamiento de las AVL, se tomaron 500 ml de agua (en botellas ámbar de boca ancha esterilizadas), se mantuvieron a temperatura ambiente y se transportaron inmediatamente al laboratorio para su análisis.

Trabajo de Laboratorio

-Cultivo de las AVL. La muestra se homogeneizó, se tomaron 50 ml y se centrifugaron (centrífuga Beckman TJ- 6) aproximadamente a 1201g durante 10 minutos, la pastilla se colocó en cajas Petri con agar no nutritivo con bacteria *Enterobacter aerogenes* (NNE) inactivada a 68°C por una hora, manteniéndose a temperatura ambiente (22°C).

Las placas se revisaron a partir del segundo día para detectar el crecimiento amebiano empleando un invertoscopio (NIKON mod. TMS, a 10× y 20×).

-Cultivo monoxénico. De las placas de NNE con buen crecimiento amebiano (preferentemente en estado de trofozoito) se cortaron cuadros de aproximadamente 1 cm² y se transfirieron a placas con medio NNE fresco manteniéndose a temperatura ambiente (22°C), hasta lograr el aislamiento de las amebas. El manejo de las muestras se llevo a cabo con materiales previamente esterilizados y en una campana de flujo laminar.

-Cultivo axénico. Las cepas amebianas aisladas en medio NNE y con crecimiento abundante se axenizaron mediante la transferencia de pequeñas porciones de agar de aproximadamente 1 cm² a los medios PBSGM (Chang modificado por Rivera *et al.*, 1987), medio Bactocasitona (BC) con 10% de suero neonato de bovino y medio Ringer (Cerva, 1969; Page, 1988; Martínez, 1985) (ver anexo), los cultivos en estos medios se incubaron a 22°C en posición inclinada para que tuvieran una mayor área de crecimiento.

-Pruebas de temperatura. Los aislamientos obtenidos se sembraron por triplicado en tubos con medio PBSGM, debido a que en este se presentó mayor desarrollo amebiano. Cada uno de los tubos se incubó a diferente temperatura (22°C, 37°C, y 42°C), durante cinco días observándose cada 24 horas para establecer la temperatura en que se presentó el mejor crecimiento amebiano.

-Morfometría. Se realizó con preparaciones en fresco de los especímenes. Se midió longitud y ancho de 50 trofozoitos, y diámetro de 50 quistes, se utilizó un microscopio óptico con contraste de fases con micrómetro ocular (Microscopio standard Zeiss a 40× y 100×) (Page 1988).

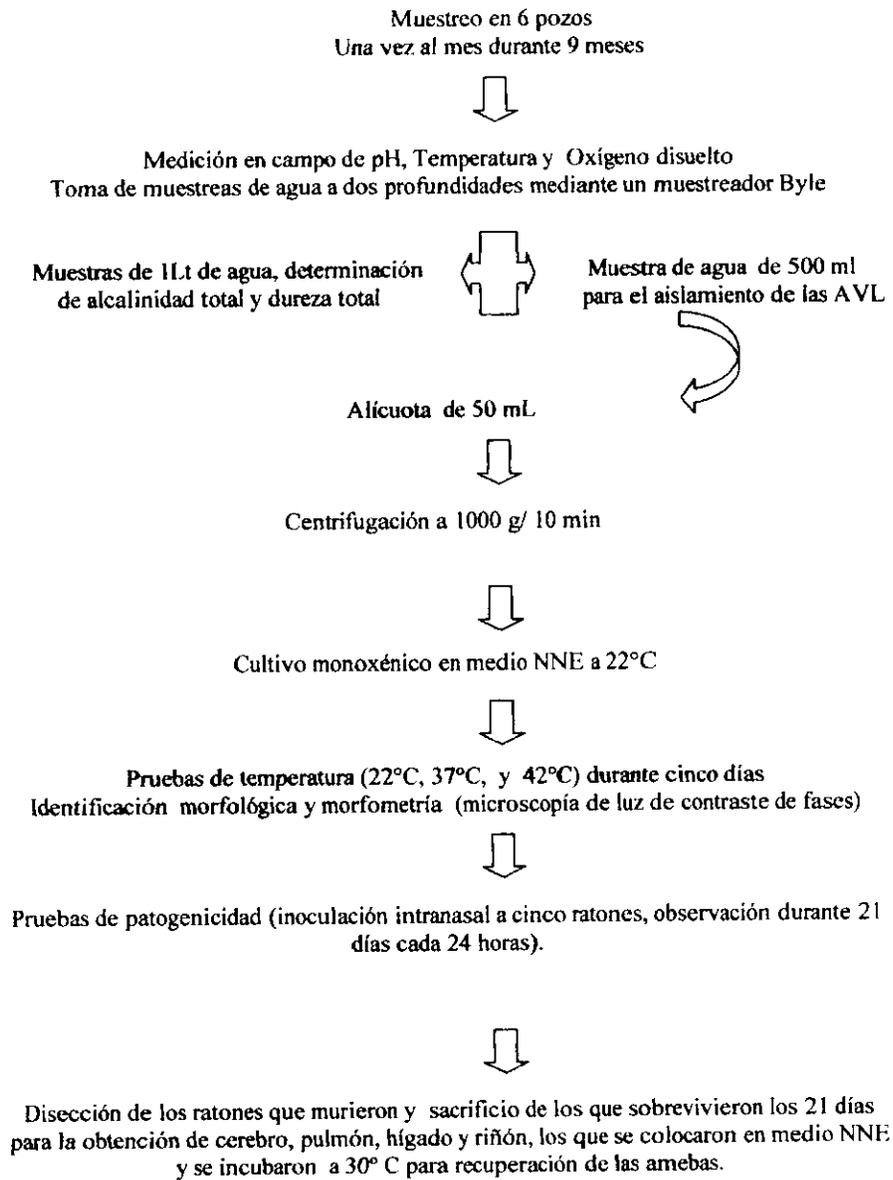
Además de esto, para la identificación morfológica se tomó en cuenta la temperatura de crecimiento y características morfológicas de los quistes. Este tratamiento se dio a cada uno de los aislamientos obtenidos.

-Prueba de patogenicidad. La patogenicidad de las amebas aisladas (prueba que sólo se realizó a las especies pertenecientes al género *Acanthamoeba*, debido a que de los géneros aislados, es el único que presenta especies consideradas como potencialmente patógenas) se determinó por inoculación intranasal a ratones, para lo cual se utilizó un cultivo amebiano axénico, concentrado y centrifugado a aproximadamente a 1201 g por 15 minutos, debiendo alcanzar una concentración de 10³ a 10⁶ en 0.02 ml de medio.

El concentrado se tomó con una jeringa de 1ml y se inoculó a un grupo de cinco ratones (cepa CD-1), machos, blancos, recién destetados y de tres semanas de edad, por cada aislamiento a probar. A cada ratón se le inoculó un volumen de 0.02ml del concentrado en las fosas nasales (Cerva, 1971).

Los ratones inoculados se observaron durante 21 días y se registraron los cambios en su comportamiento, así como el número de ratones muertos. Los ratones que sobrevivieron los 21 días se sacrificaron y se les extrajo cerebro, pulmón, hígado y riñón, los que se colocaron en medio NNE incubándose a 30°C para la recuperación de las amebas, este mismo procedimiento se realizó con los ratones que murieron (Cerva, 1971).

DIAGRAMA DE FLUJO DEL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE AGUA.



RESULTADOS

Un total de 289 aislamientos amebianos pertenecientes a 8 géneros y 32 especies (tabla 1), se obtuvieron de muestras de agua subterránea de 6 pozos de muestreo.

RIQUEZA ESPECÍFICA Y ABUNDANCIA: De los ocho géneros identificados el género *Acanthamoeba* se presentó en un mayor porcentaje, seguido por el género *Hartmannella*, mientras que en un menor porcentaje se presentaron los géneros *Mayorella*, *Vahlkampfia*, *Vannella*, *Platyamoeba*, *Echinamoeba*, y *Vexillifera* (figura 1). Con respecto a la riqueza específica las especies pertenecientes al género *Acanthamoeba* fueron las de mayor riqueza con 17 especies, de éstas a su vez las más abundantes fueron *A. polyphaga*, *A. culbertsoni*, *A. lenticulata*, y *A. castellanii* (figura 2). Las especies del género *Mayorella* ocuparon el segundo lugar de riqueza específica, siendo la especie más abundante *M. cultura*; mientras que del género *Vahlkampfia* solamente se aislaron 3 especies, siendo la de mayor abundancia *V. inornata*. Por otra parte los géneros *Hartmannella*, *Platyamoeba* y *Vannella* únicamente presentaron dos especies, siendo las más abundantes de cada uno de los géneros antes mencionados *H. vermiformis*, *P. placida*, *V. platypodia* respectivamente. Finalmente los géneros *Echinamoeba* y *Vexillifera* fueron los menos abundantes ya que solo se obtuvo una especie por género y a su vez un aislamiento para *V. bacillipedes* y dos para *E. exundans* (tabla 1, figuras 1 y 2).

Tabla 1 . Riqueza específica de las amebas aisladas del acuífero del Valle del Mezquital.

<i>Acanthamoeba</i>	<i>Hartmannella</i>	<i>Platyamoeba</i>	<i>Vahlkampfia</i>	<i>Mayorella</i>	<i>Echinamoeba</i>	<i>Vannella</i>	<i>Vexillifera</i>
<i>A. royreba</i>	<i>H. cantabrigiensis</i>	<i>P. placida</i>	<i>V. inornata</i>	<i>M. spatula</i>	<i>E. exundans</i>	<i>V. lata</i>	<i>V. bacillipedes</i>
<i>A. lenticulata</i>	<i>H. vermiformis</i>	<i>P. stenopodia</i>	<i>V. avara</i>	<i>M. cultura</i>		<i>V. platypodia</i>	
<i>A. rhyodes</i>			<i>V. enterica</i>	<i>M. microeruca</i>			
<i>A. culbertsoni</i>				<i>M. bicornifrons</i>			
<i>A. griffini</i>							
<i>A. triangularis</i>							
<i>A. quina</i>							
<i>A. polyphaga</i>							
<i>A. lugdunensis</i>							
<i>A. palestinesis</i>							
<i>A. astronyxis</i>							
<i>A. hatchetti</i>							
<i>A. castellanii</i>							
<i>A. divionensis</i>							
<i>A. tubiashi</i>							
<i>A. comandoni</i>							
<i>A. mauritaniensis</i>							

Figura 1. Porcentajes en que se aislaron los ocho géneros de AVL en el presente estudio.

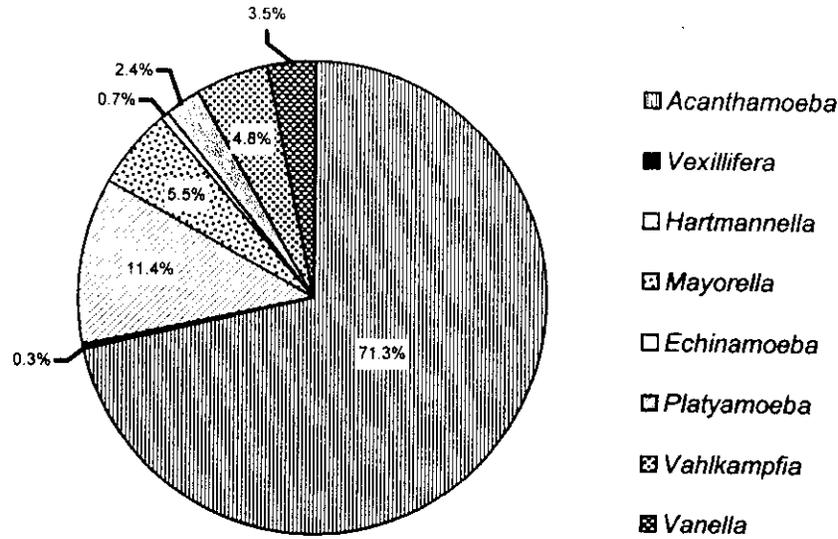
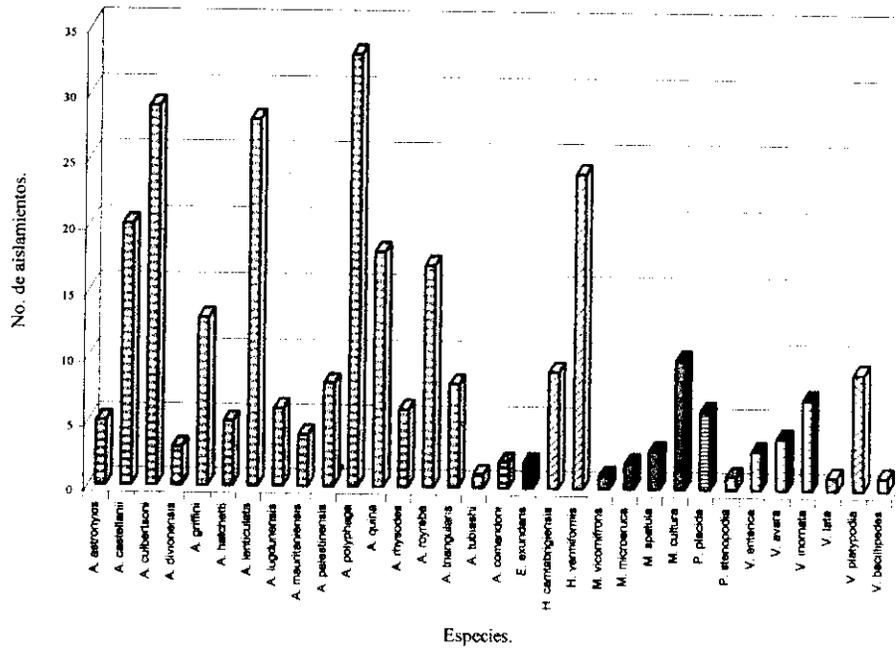
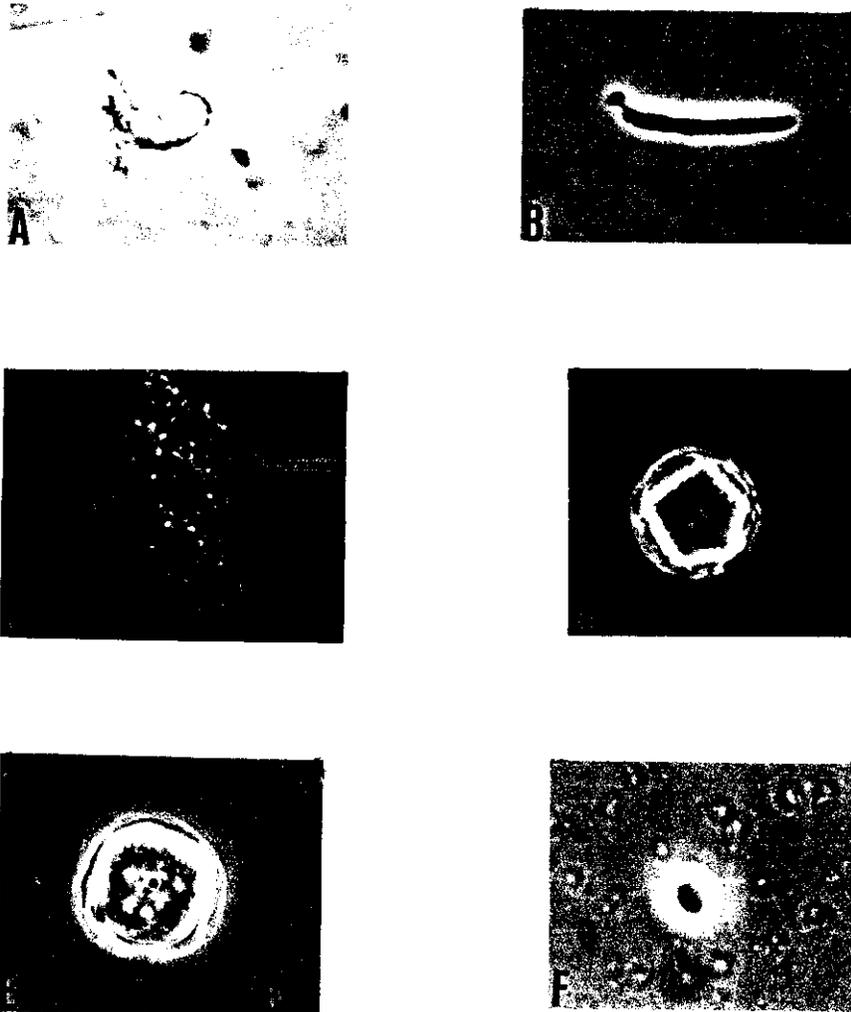


Figura 2. Número de aislamientos obtenidos para cada una de las 32 especies de AVL aisladas a lo largo de los 9 meses de muestreo.



Trofozoitos y quistes de las AVL representativas de los géneros con mayor riqueza específica.



A, trofozoíto *Acanthamoeba*. B, trofozoíto *Hartmannella*. C, quiste *A. astronyxis*. D, quiste *A. polyphaga*. E, quiste *A. culbertsoni*. F, quiste *H. vermiformis*. (A- F 400×) A y C, óptica de Nomarski; B, D, E, F en contraste de fases.

ABUNDANCIA DE ORGANISMOS POR POZO DE MUESTREO

La abundancia de organismos encontrada para cada pozo y en las dos profundidades de muestreo se presenta en la tabla 5. En el pozo *Exhacienda de San José Boxay* se registró el mayor número de aislamientos, en tanto que en el pozo *El Tinaco* se registró el menor (figura 14). Con respecto a la abundancia de organismos en cada una de las dos profundidades de muestreo, se observó que únicamente los pozos *Cerro Colorado*, *Tula* y *Actopan*, presentaron un mayor número de aislamientos en superficie, mientras que en el pozo *Exhacienda de San José Boxay* se obtuvo el mismo número de aislamientos tanto en superficie como en profundidad; únicamente en el pozo *El Bondo* se registró un mayor número de aislamientos en el muestreo profundo (tabla 5).

De manera general para ambas profundidades en todos los pozos los organismos con mayor presencia fueron los pertenecientes al género *Acanthamoeba*, en contraste con esto las especies pertenecientes al género *Vexillifera* fueron las menos abundantes presentándose únicamente en el pozo *Tula*.

Tabla 5. Abundancia de organismos.

POZO	MUESTREO SUPERFICIAL	MUESTREO PROFUNDO	NÚMERO TOTAL DE AISLAMIENTOS
El Bondo	25	28	53
El Tinaco	0	26	26
Exhacienda	29	29	58
Cerro Colorado	28	21	49
Tula	29	23	52
Actopan	28	23	51

Número de aislamientos obtenidos para cada uno de los 6 pozos en ambas profundidades de muestreo y número de aislamientos totales por pozo.

En el pozo *El Bondo*, se obtuvo un mayor número de aislamientos (28) en el muestreo profundo, éstos, pertenecen a los géneros *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Mayorella*, *Vahlkampfia*, y *Vanella*. El mayor número de aislamientos (11) se presentó en el mes de agosto (figura 8).

Para el pozo *El Tinaco*, se registró el menor número de aislamientos (26 en total), debido a que se secó la parte más expuesta y sólo fue posible muestrear en profundidad. En los meses de agosto, septiembre y octubre (figura 9) se registró el mayor número de aislamientos (5 por mes).

Con respecto al pozo *Exhacienda de San José Boxay*, en éste se registró el mayor número de aislamientos (58) de los seis pozos, 40 de los cuales correspondieron al género *Acanthamoeba*. También fue en el único que se obtuvo el mismo número de aislamientos (29) tanto en superficie como en profundidad. Con respecto al mes en que se obtuvo el mayor número de aislamientos (14) fue junio (figura 10).

En tanto que en el pozo *Cerro Colorado*, la mayor diversidad de organismos se presentó en superficie con 28 aislamientos, 20 de los cuales pertenecen al género *Acanthamoeba*. En el muestreo profundo se obtuvieron 21 aislamientos pertenecientes al género *Acanthamoeba*. Por otra parte en enero (figura 11) se registró el mayor número de aislamientos (8).

Así mismo en el pozo *Tula*, la mayor diversidad de organismos se presentó en superficie con un total de 29 aislamientos, pertenecientes en su mayoría (25 aislamientos) al género *Acanthamoeba*. Es importante resaltar que en este pozo fue en el único que se logró un aislamiento del género *Vexillifera*. Los meses en que se registró el mayor número de aislamientos fueron julio, agosto, y noviembre (figura 12).

Para el pozo *Actopan*, se obtuvo un total de 51 aislamientos. La mayor cantidad de organismos se presentó en superficie. Así mismo en el mes de enero (figura 13) se presentó el mayor número de aislamientos (14), siendo los organismos pertenecientes al género *Acanthamoeba* los más abundantes.

Figura 8. Pozo El Bondo.

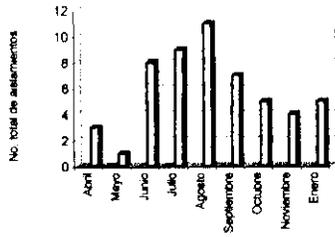


Figura 9. Pozo El Tinaco.

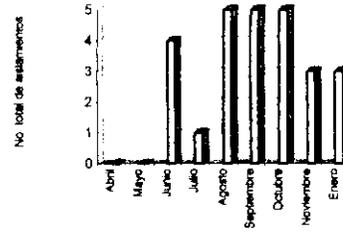


Figura 10. Pozo Exhecienda de san Jose Boxay.

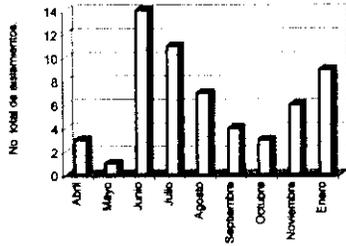


Figura 11. Pozo Cerro Colorado.

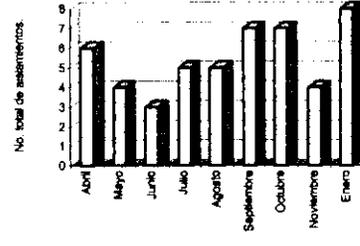


Figura 12. Pozo Tula.

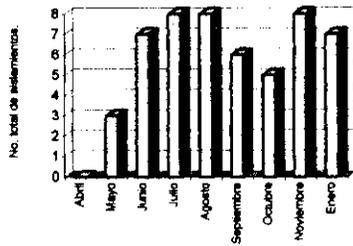


Figura 13. Pozo Actopan.

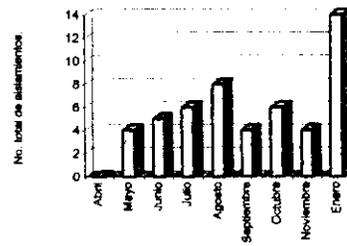
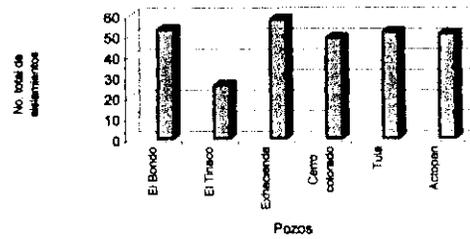


Figura 14. Número total de aislamientos obtenidos por pozo a lo largo del periodo de estudio.



Figuras 8 a 13 muestran el número de aislamientos de AVL obtenidos por mes en cada pozo. 25

DISTRIBUCIÓN ESTACIONAL

Con respecto a la distribución que presentaron las AVL durante la estación de lluvias y la estación de secas a lo largo del período de estudio se obtuvieron los resultados siguientes.

En los pozos *El Bondo*, *El Tinaco*, *Exhacienda*, *Tula* y *Actopan* el mayor número de aislamientos se registró durante la estación de lluvias (figuras 15,16,17,19,20). En el pozo *Cerro Colorado* (figura 18) el mayor número de aislamientos se obtuvo en la estación de secas, aunque es necesario señalar que la diferencia de aislamientos obtenidos durante la estación de secas y lluvias para este pozo fue mínima.

Durante la estación de lluvias el mayor número de aislamientos se presentó de la siguiente manera: en los pozos *El Bondo*, *El Tinaco*, *Tula* y *Actopan* en el mes de agosto, en el pozo *Exhacienda* en el mes de junio y en el pozo *Cerro Colorado* en el mes de septiembre.

Con respecto a la estación de secas en los pozos *Cerro Colorado*, *Exhacienda* y *Actopan* en el mes de enero las AVL alcanzaron su máximo, mientras que en los pozos *El Bondo* y *El Tinaco* se presentó en octubre. En el pozo *Tula* el mayor número de aislamientos se dio en noviembre.

Si consideramos el total de aislamientos obtenidos para la estación de lluvias y la de secas en los seis pozos de muestreo (figura 21) el mayor número de aislamientos (171) se registró en la estación de lluvias, aunque es conveniente señalar que al realizar el análisis estadístico de dichos resultados mediante una Prueba de Z (ver anexo) fue posible establecer que no existe una diferencia significativa entre el número de aislamientos obtenidos en la estación de lluvias y el registrado durante la estación de secas.

Por otra parte se estableció a las especies que presentaron un mayor número de aislamientos para cada estación (tabla 6) de tal manera que se obtuvieron los resultados siguientes: la especie que se presentó en mayor cantidad en la estación de lluvias fue *A. polyphaga* con 23 aislamientos, mientras que en la estación de secas las especies de las que se obtuvieron más aislamientos fueron *A. lenticulata* (17) y *A. culbertsoni* (15).

TABLA 6. Aislamientos obtenidos por estación del año

ESPECIES	ESTACIÓN DE LLUVIAS	ESTACIÓN DE SECAS
<i>A. royreba</i>	9	8
<i>A. lenticulata</i>	11	17
<i>A. rhyodes</i>	3	3
<i>A. culbertsoni</i>	14	15
<i>A. griffini</i>	9	4
<i>A. triangularis</i>	5	3
<i>A. quina</i>	7	11
<i>A. polyphaga</i>	23	10
<i>A. lugdunensis</i>	3	3
<i>A. palestinensis</i>	1	7
<i>A. astronyxis</i>	4	1
<i>A. hatchetti</i>	2	3
<i>A. castellanii</i>	11	9
<i>A. divionensis</i>	0	3
<i>A. tubiashi</i>	0	1
<i>A. comandoni</i>	2	0
<i>A. mauritaniensis</i>	4	0
<i>H. cantabrigiensis</i>	8	1
<i>H. vermiformis</i>	17	7
<i>P. placida</i>	6	0
<i>P. stenopodia</i>	1	0
<i>V. inornata</i>	6	1
<i>V. avara</i>	4	0
<i>V. enterica</i>	1	2
<i>M. spatula</i>	2	1
<i>M. cultura</i>	5	5
<i>M. microeruca</i>	2	0
<i>M. bicornifrons</i>	0	1
<i>E. exundans</i>	1	1
<i>V. lata</i>	1	0
<i>V. platypodia</i>	8	1
<i>V. bacillipedes</i>	1	0

En la estación de lluvias se obtuvieron 171 aislamientos, mientras que en la estación de secas se obtuvieron 118.

Figura 16. Pozo El Bordo

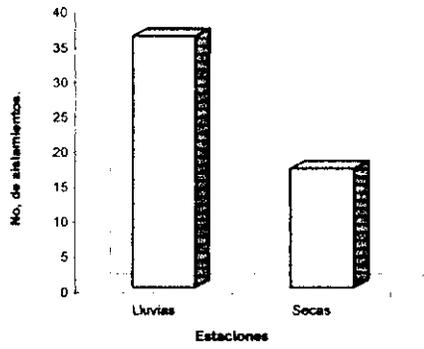


Figura 16. Pozo El Tinaco

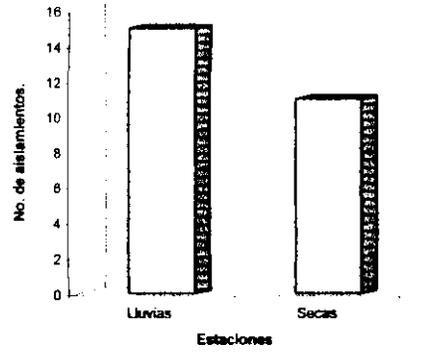


Figura 17. Pozo Exhacienda

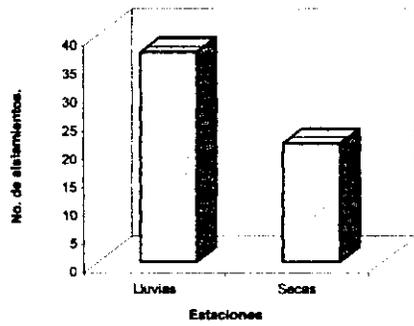
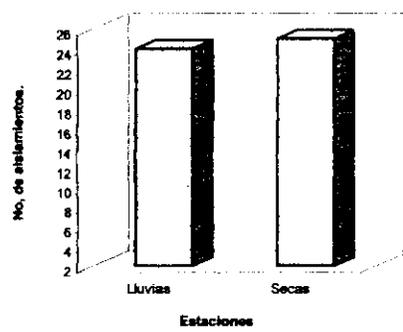


Figura 18. Pozo Cerro Colorado



Figuras 15 a 18 muestran el número de aislamientos de AVL obtenidos por estación en cada pozo. 28

Figura 19. Pozo Tula.

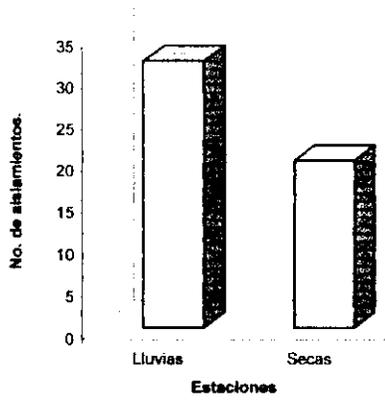


Figura 20. Pozo Actopan.

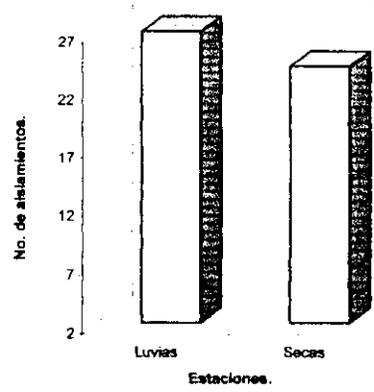
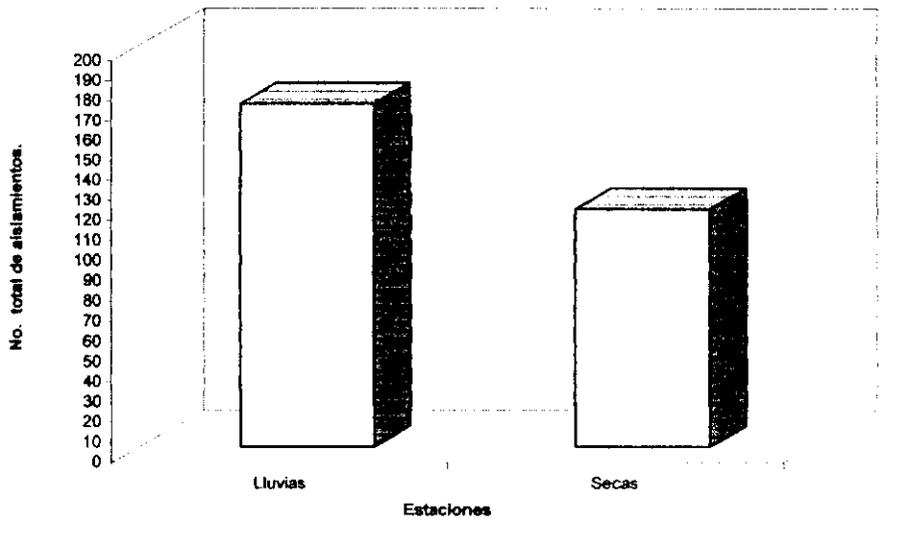


Figura 21. Número total de aislamientos obtenidos por estación durante el período de estudio.



Figuras 19 a 20 muestran el número de aislamientos de AVL obtenidos por estación en cada pozo. 29

DISTRIBUCIÓN ESPACIAL

En relación a la distribución de las AVL durante cada mes de muestreo y en los seis pozos de estudio (figuras 22 a 41) se obtuvieron los siguientes resultados :

En el muestreo correspondiente al mes de Abril (figura 22) el mayor número de aislamientos se presentó en el pozo *Cerro Colorado* tanto en superficie (S), como en el muestreo profundo. Tomando en cuenta ambas profundidades de muestreo (figura 23) el mayor número de aislamientos se obtuvo en el pozo *Cerro Colorado* con 6.

En el mes de Mayo (figura 24) el mayor número de aislamientos en superficie (S) se observó en los pozos *Cerro Colorado* y *Actopan* con 2, mientras que en el muestreo profundo (P) se registró el mayor número de aislamientos (2) en los pozos *Cerro Colorado*, *Tula* y *Actopan*. Considerando ambas profundidades de muestreo (figura 25) el mayor número de aislamientos se registró en los pozos *Cerro Colorado* y *Actopan* con 4.

Durante el mes de Junio (figura 26) el mayor número de aislamientos en superficie (S) se dio en el pozo *Exhacienda* con 10 y en el muestreo profundo (P) en el pozo *El Bondo* con 5. Como resultado de la suma de aislamientos de ambas profundidades de muestreo (figura 27) se obtuvo que el pozo *Exhacienda* registró el mayor número de aislamientos con 14.

Para el muestreo correspondiente al mes de Julio (figura 28) en superficie (S) el mayor número de aislamientos se dio en el pozo *Exhacienda* con 6 y el menor en el pozo *El Tinaco*, mientras en el muestreo profundo (P) en los pozos *Tula* y *Exhacienda* se presentó el mayor número de aislamientos con 5 por pozo. De forma general (figura 29) el pozo *Exhacienda* presentó el mayor número de aislamientos.

En tanto que para el mes de Agosto (figura 30) en superficie (S) el mayor número de aislamientos se dio en los pozos *El Bondo* y *Actopan* con 6 aislamientos por pozo y el menor se dio en el pozo *El Tinaco*. En el muestreo profundo (P) en los pozos *El Bondo* y *El Tinaco* se dio el mayor número de aislamientos y el menor en el pozo *Actopan* con dos. Considerando las dos profundidades de muestreo (figura 31) el mayor número de aislamientos se dio en el pozo *El Bondo* con 11.

Con respecto al mes de Septiembre (figura 32) el mayor número de aislamientos tanto en superficie (S) como profundidad (P) fue para el primer caso el pozo *Cerro Colorado* y para el segundo el pozo *El Tinaco* con 5 aislamientos por pozo. Sumando los resultados de ambas profundidades de muestreo (figura 33) el mayor número de aislamientos correspondió a los pozos *El Bondo* y *Cerro Colorado* con 7.

En el muestreo correspondiente al mes de Octubre (figura 34) en el pozo *Tula* se presentó el mayor número de aislamientos en superficie (S) con 5 y en profundidad (P) con el mismo número de aislamientos en el pozo *El Tinaco*. Tomando en cuenta ambas profundidades de muestreo (figura 35) el mayor número de aislamientos se presentó en el pozo *Cerro Colorado* con 7.

Durante el mes de Noviembre (figura 36) el mayor número de aislamientos en superficie (S) se registró en los pozos *El Bordo*, *Exhacienda* y *Tula* con 3 aislamientos en cada pozo. En el muestreo profundo (P) en el pozo *Tula* se dio el mayor número de aislamientos. De manera general (figura 37) en el pozo *Tula* se dio el mayor número de aislamientos (8) y el menor en el pozo *El Tinaco* con 3.

Para el muestreo del mes de Enero (figura 38) en superficie en los pozos *Cerro Colorado* y *Actopan* se registró el mayor número de aislamientos 6 por pozo, y en profundidad (P) esto se dio en el pozo *Actopan* con 8. Considerando las dos profundidades de muestreo (figura 39) el mayor número de aislamientos se presentó en el pozo *Actopan* con 14 y el menor en el pozo *El Tinaco*.

Finalmente si consideramos los aislamientos obtenidos en cada pozo para los dos profundidades de muestreo (figura 40) podemos indicar que en el muestreo superficial (S) los pozos *Exhacienda* y *Tula* presentaron el mayor número de aislamientos 29 por pozo, en tanto que en profundidad (P) esta misma situación se dio con el mismo número de aislamientos en el pozo *Exhacienda*. Tomando en cuenta ambas profundidades de muestreo (figura 41) el mayor número de aislamientos se registró en el pozo *Exhacienda* con 58 y la menor se dio en el pozo *El Tinaco* con 26.

Figura 22. Muestreo 1 (Abril). Distribución espacial de las AVL por niveles de muestreo en los seis pozos

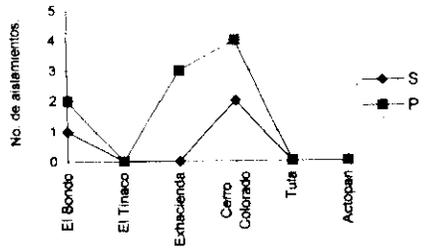


Figura 23. Muestreo 1 (Abril). Distribuci6n espacial de las AVL tomando en cuenta el n6mero de aislamientos obtenido por pozo.

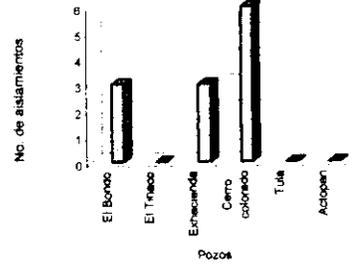


Figura 24. Muestreo 2 (Mayo). Distribuci6n espacial de las AVL por niveles de muestreo en los seis pozos.

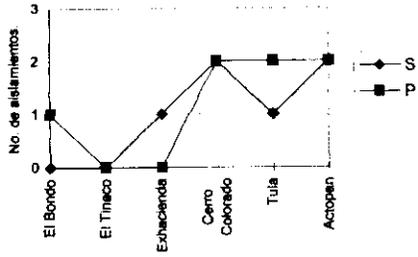


Figura 25. Muestreo 2 (Mayo). Distribuci6n espacial de las AVL tomando en cuenta el n6mero de aislamientos obtenidos por pozo.

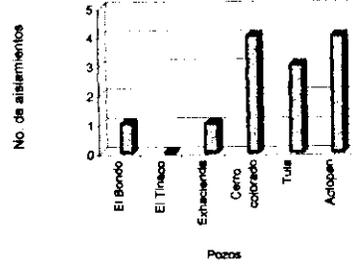


Figura 26. Muestreo 3 (Junio). Distribuci6n espacial de las AVL por niveles de muestreo en los seis pozos.

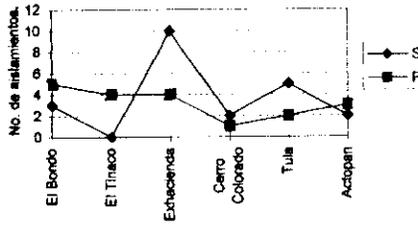


Figura 27. Muestreo 3 (Junio). Distribuci6n espacial de las AVL tomando en cuenta el n6mero de aislamientos obtenidos por pozo.

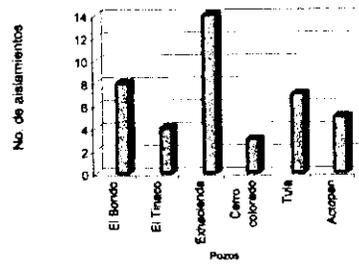


Figura 28. Muestreo 4 (Julio). Distribuci6n espacial de las AVL por niveles de muestreo en los seis pozos.

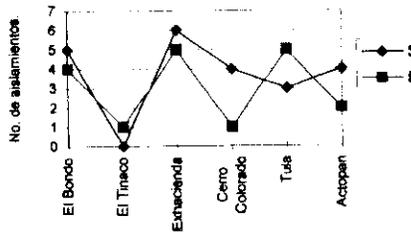


Figura 29. Muestreo 4 (Julio). Distribuci6n espacial de las AVL tomando en cuenta el n6mero de aislamientos por mes.

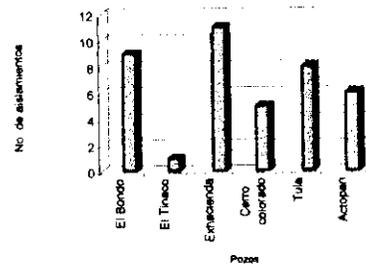


Figura 30. Muestreo 5 (Agosto). Distribución espacial de las AVL por niveles de muestreo en los seis pozos.

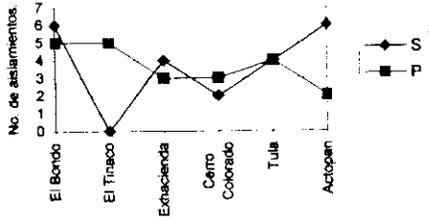


Figura 31. Muestreo 5 (Agosto). Distribuci6n espacial de las AVL tomando en cuenta el n6mero de aislamientos obtenidos por pozo.

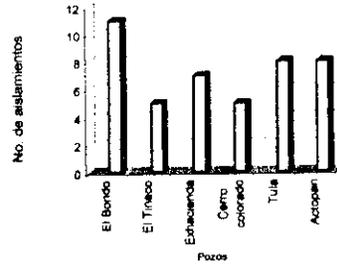


Figura 32. Muestreo 6 (Septiembre). Distribuci6n espacial de las AVL por niveles de muestreo en los seis pozos.

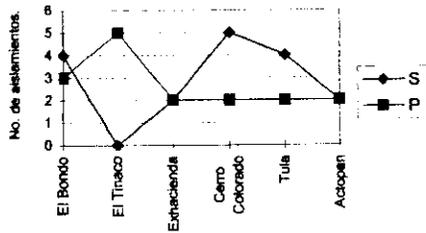


Figura 33. Muestreo 6 (Septiembre). Distribuci6n espacial de las AVL tomando en cuenta el n6mero de aislamientos por pozo.

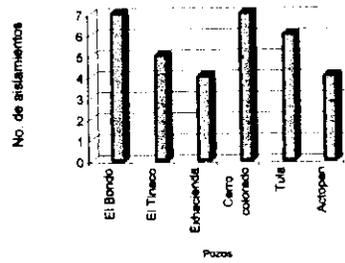


Figura 34. Muestreo 7 (Octubre). Distribuci6n espacial de las AVL por niveles de muestreo en los seis pozos.

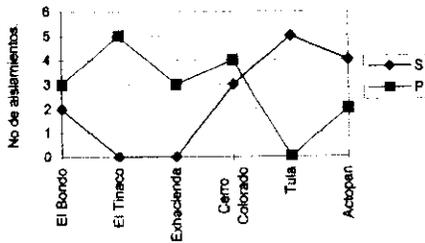


Figura 35. Muestreo 7 (Octubre). Distribuci6n espacial de las AVL tomando en cuenta el n6mero de aislamientos por pozo.

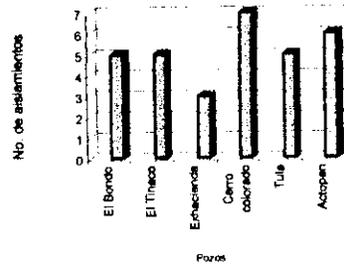


Figura 36. Muestreo 8 (Noviembre). Distribución espacial de las AVL por niveles de muestreo en los seis pozos.

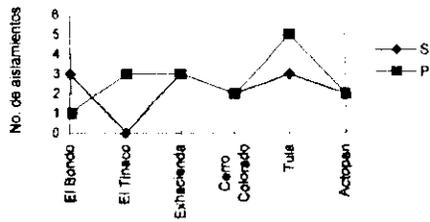


Figura 37. Muestreo 8 (Noviembre). Distribuci6n espacial de las AVL tomando en cuenta el n6mero de aislamientos por pozo.

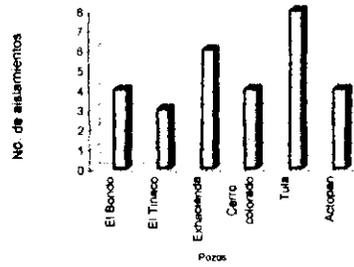


Figura 38. Muestreo 9 (Enero). Distribuci6n espacial de las AVL por niveles de muestreo en los seis pozos.

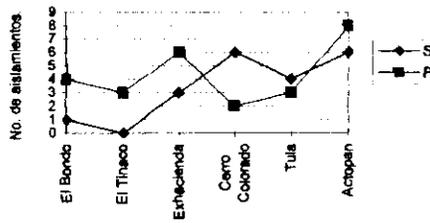


Figura 39. Muestreo 9 (Enero). Distribuci6n espacial de las AVL tomando en cuenta el n6mero de aislamientos obtenidos por pozo.

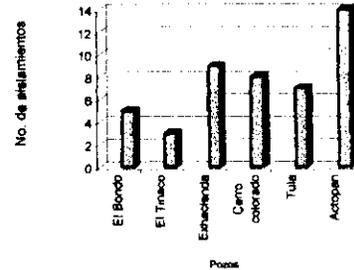


Figura 40. No. de aislamientos obtenidos tanto anivel superficial como profundo durante los 9 meses de muestreo.

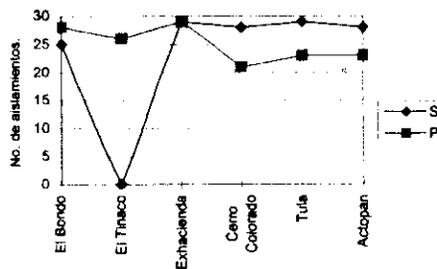
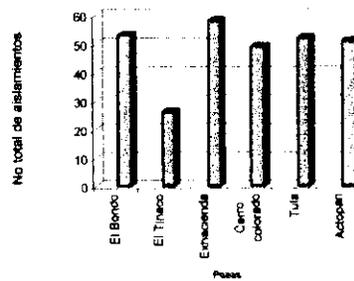


Figura 41. N6mero total de aislamientos para cada pozo de estudio.



DISCUSIÓN

Los organismos con mayor abundancia correspondieron al género *Acanthamoeba* que representa el 71.3 % del total de los aislamientos obtenidos. Las especies más abundantes pertenecientes a este género fueron *A. polyphaga* y *A. culbertsoni* que representan el 11.4 % y el 10 % respectivamente del total de las especies aisladas. El que las especies pertenecientes al género *Acanthamoeba* sean las más abundantes posiblemente se debe a que son muy tolerantes a condiciones extremas, esta resistencia esta dada por la estructura de su quiste que presenta pared doble constituida de celulosa, el cual le sirve como medio de dispersión (Sleigh, 1989 citado en Bonilla *et al.*, 1999). Además de la capacidad de su trofozoito para tolerar variaciones en las condiciones de los ambientes acuáticos como cambios de pH, temperatura y disponibilidad de oxígeno disuelto (Rodríguez, 1994; John, 1993).

El que el género *Acanthamoeba* se encuentre en mayor porcentaje en las aguas subterráneas concuerda con los trabajos realizados en otros ambientes acuáticos por Kyle y Noblet, 1986; Mansour *et al.*, 1991; Rivera *et al.*, 1993; Sadaka *et al.*, 1994; Anderson, 1997 y Bonilla *et al.*, 1999, quienes indican que las poblaciones de *Acanthamoeba* pueden subsistir en condiciones extremas tales como anoxia y que su quiste es más resistente a variaciones químicas que el de otras amibas de vida libre, lo que favorece su sobrevivencia y desarrollo ya que las condiciones antes mencionadas eliminan a las especies menos resistentes que normalmente compiten por el alimento con ellas.

Page (1988); Finlay *et al.* (1988) y De Jonckheere (1991) indicaron que las amebas más comúnmente aisladas tanto de sedimentos de lagos como de otros ecosistemas acuáticos son las pertenecientes al género *Acanthamoeba* ya que no presentan estado flagelado y dependen de la presencia de partículas de materia para desplazarse.

Por otra parte, se sabe por reportes previos (Martínez, 1985; Rodríguez, 1994) que las especies pertenecientes al género *Acanthamoeba* constituyen una proporción alta de las AVL presentes en ambientes contaminados.

En segundo lugar de abundancia encontramos al género *Hartmannella* con sólo 11.4 %. Ésto, se debió principalmente a que el quiste que presenta *Hartmannella* así como su trofozoito son menos resistentes a las variaciones ambientales (Page, 1988) El que las especies pertenecientes al género *Hartmannella* se presentaran en menor cantidad, que las del género *Acanthamoeba* concuerda con lo encontrado por Anderson (1997) quien señala que las amebas del género *Hartmannella* son considerablemente menos abundantes que las pertenecientes al género *Acanthamoeba*, debido a que son menos resistentes a las variaciones que se presentan en los ambientes acuáticos (Sawyer *et al.*, 1998; Rohr *et al.*, 1998).

En menores porcentajes se presentaron los géneros *Echinamoeba* (0.7 %), *Platyamoeba* (2.4 %), *Vannella* (3.5 %), *Vahlkampfia* (4.8 %), *Mayorella* (5.5 %), y *Vexillifera* (0.3 %), debido a que algunos de estos organismos no forman una estructura de resistencia (quiste), como es el caso de *Vexillifera*, *Mayorella* y *Vannella* (Page, 1988). Se observaron los mismos resultados que los obtenidos en ambientes acuáticos por Kyle y Noblet en 1985 y 1986, y más recientemente el realizado por Bonilla *et al.*, (1999) en la Huasteca Potosina, en donde se presenta una menor cantidad de las amebas pertenecientes a los géneros arriba mencionados.

La temperatura en que se presentó un crecimiento óptimo de las diferentes especies de AVL correspondió a 22°C; mientras que a 37°C el crecimiento es lento. Al someter a los cultivos a temperaturas de 42°C se enquistaron después de un tiempo y comenzaron a morir las amebas. Estos resultados coinciden con lo encontrado por Scaglia *et al.*, (1987) quienes señalan que las especies del género *Acanthamoeba* toleran una temperatura máxima de aislamiento y crecimiento *in vitro* de 37°C a excepción de *A. culbertsoni* que únicamente resiste temperaturas menores a 34°C. También señalan que las AVL pertenecientes a los géneros *Hartmannella*, *Vahlkampfia*, *Mayorella* y *Vannella*, a pesar de no ser patógenas toleran temperaturas de 37°C. De la misma forma los trabajos realizados por Sawyer *et al.* en 1998; Rohr *et al.* en 1998 y Bonilla *et al.* en 1999, indican que las AVL de los géneros *Echinamoeba*, *Hartmannella*, *Mayorella*, *Platyamoeba*, *Vannella*, *Vexillifera* y *Vahlkampfia* crecen a intervalos de temperaturas entre 21°C a 37°C.

El valor de pH registrado en el agua de los seis pozos de estudio fue muy homogéneo durante los nueve meses de muestreo y se mantuvo en un intervalo de 6.8 a 7. Estos valores de pH están dentro de los límites que permiten el crecimiento óptimo de las AVL de acuerdo con informes de diversos autores como Kyle y Noblet (1985), Costas y Griffiths (1986), Rivera *et al.*, (1993), y Bonilla *et al.*, (1999) quienes señalan que las amebas toleran amplios intervalos de pH que pueden ir desde valores de 4 hasta valores de 8.6, por lo que el pH no fue un factor limitante para ellas. Además de lo anteriormente mencionado es importante señalar que los valores de pH registrados en el acuífero están dentro del intervalo estipulado por la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos en su legislación relativa al agua y su contaminación en la cual consideran como aguas adecuadas para uso recreativo a aquellas que presenten valores de pH entre 6 y 9 (SARH, 1984).

En cuanto a la alcalinidad, el valor más alto se registró en el pozo El Bondo y el valor más bajo se obtuvo en el pozo Exhacienda de San José Boxay. Aparentemente las variaciones en la alcalinidad no representan un factor limitante para el desarrollo de las AVL ya que en el presente estudio obtuvieron AVL en un intervalo de alcalinidad de 319 mg/L a 560 mg/L las amebas pueden desarrollarse bien, sin embargo podemos considerar los valores de alcalinidad de los 6 pozos como muy altos, si los comparamos con aguas superficiales en un estado semejante de contaminación, por lo que presentan una alta capacidad amortiguadora lo que explicaría la poca variabilidad en los valores de pH de los 6 pozos de estudio.

En relación con la dureza se observó el valor más alto en el pozo Tula (436 mg/L), y su valor más bajo en el pozo El Tinaco (282 mg/L), lo que nos permite establecer que estas aguas son muy duras, pero no representan un factor limitante para el desarrollo de las AVL. Por otra parte los valores registrados de este parámetro en los seis pozos de estudio se encuentran por debajo del límite permisible (500mg / L) establecido por la Secretaría de Salud (1994) por lo que se considera como adecuada para el uso y consumo humano.

En relación al oxígeno disuelto su valor más alto (4.26 mg/l) se dio en el pozo el Bondo, mientras que su valor más bajo (1.80 mg/ L), se observó en el pozo Actopan. Las cantidades de oxígeno disuelto presente permitieron un buen crecimiento de las AVL debido a que son organismos aerobios (Bonilla *et al.*, 1999). Salvo el caso de las especies pertenecientes al género *Acanthamoeba* que pueden soportar condiciones de anoxia e incrementarse con respecto a las amebas de otros géneros como *Hartmannella* y *Vahlkampfia* que en estas condiciones disminuyen (O'Dell, 1979), situación que da ventajas adaptativas a *Acanthamoeba* y seguramente es una de las razones de que su número sea el más alto prácticamente en cualquier ambiente.

Aunque no fue objetivo de este trabajo determinar la calidad del agua del acuífero con respecto a su uso, se puede señalar que por los valores registrados para los parámetros físico-químicos contemplados en el presente estudio (pH, dureza) y de acuerdo con los lineamientos de la SAHR y la Secretaría de Salud se considera a estas aguas como aptas para uso y consumo humano. No obstante lo anterior, es necesario considerar los resultados obtenidos por Gallegos *et al.*, (1999) con respecto a las concentraciones de coliformes totales y fecales presentes en el acuífero del Valle del Mezquital, las cuales en ambos casos sobrepasan los límites permisibles establecidos para los organismos antes mencionados, por lo que bacteriológicamente dichas aguas son consideradas como no aptas para el uso y consumo humano. Este hecho, aunado a la presencia de AVL, debe de limitar el uso del agua subterránea en actividades diversas a fin de prevenir y evitar efectos nocivos en la salud de los usuarios.

Respecto a la distribución estacional de las AVL (por no existir otros estudios de amebas en aguas subterráneas se compararon los resultados encontrados en otros tipos de agua considerando que no tienen las mismas características) podemos señalar que la presencia de las AVL en los pozos de estudio se incrementa durante la estación de lluvias y que esto se debe a que la lluvia aumenta el flujo de agua a través del subsuelo y en consecuencia de los microorganismos en el mismo (Gallegos *et al.* en 1999).

El mecanismo por el cual esto es logrado no es claro pero probablemente incluye un incremento en el volumen y la velocidad de infiltración del agua en el suelo, baja de las concentraciones iónicas y aumento en la sobrevivencia de las bacterias como resultado del alto contenido de humedad del suelo, éste último aspecto favorece la presencia e incremento de las AVL (Millar *et al.*, 1979; Gallegos *et al.* en 1999), por lo que en tales circunstancias la lluvia permite el transporte de las amebas que se presentan en un alto número en el suelo a través del mismo y hasta el acuífero en donde se presentan en concentraciones mayores que durante el resto del año (Kyle y Noblet, 1986).

Por otra parte durante la estación de lluvias el mayor número de aislamientos en los pozos El Bondo, El Tinaco, Tula y Actopan se dio en el mes de agosto lo que concuerda con los trabajos realizados por Rivera *et al.*, (1993), Martínez (1985), y Kyle y Noblet, (1986) , quienes observaron que en cuerpos de agua la mayor abundancia se presentó en los meses de lluvias alcanzando su máximo en agosto. Para el pozo Exhacienda el mayor número de aislamientos se presentó en el mes de junio, este resultado concuerda con lo reportado por Anderson (1997) quien indica que durante los meses de junio y agosto se observan las mayores concentraciones de AVL.

Así mismo en el pozo Cerro Colorado el mayor número de aislamientos se dio en el mes de septiembre, dicho resultado coincide con lo reportado por O'Dell en 1979 quien señala que la mayor cantidad de amebas se presenta en el mes de septiembre. En general los autores antes mencionados concuerdan en señalar que en los ecosistemas acuáticos el aumento en las poblaciones de AVL se registra durante el periodo de junio a septiembre.

Con respecto a los resultados obtenidos para la estación de secas en los pozos Cerro Colorado, Exhacienda y Actopan el mayor número de aislamientos se dio en enero y en el pozo Tula en noviembre lo cual es comparable a los resultados obtenidos por Kyle y Noblet (1985) y Anderson (1997) quienes indican que en la estación de secas se presentan dos picos de abundancia de las AVL uno en noviembre y otro enero. En el pozo El Tinaco el máximo de aislamientos se presentó en octubre lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Kyle y Noblet, (1986) quienes indican que durante la época de secas la mayor abundancia de las AVL se da en octubre.

Con respecto a la distribución espacial que presentaron las amebas durante los 9 meses de estudio encontramos que en el mes de abril el mayor número de aislamientos se presentó en el pozo Cerro Colorado, este hecho podría deberse a las elevadas cantidades de coliformes fecales que de acuerdo con lo señalado por Gallegos *et al.* en 1999 se presentan en dicho pozo y cuyos valores son superiores a 240 ufc/100 ml y al hecho de que la presencia de las amebas se encuentra relacionada con la existencia de bacterias indicadoras de contaminación fecal (De Jonckheere, 1991).

En el muestreo correspondiente al mes de mayo el mayor número de aislamientos a nivel superficial se presentó en los pozos Cerro Colorado y Actopan, mientras que a nivel profundo se dio en los pozos Cerro Colorado, Tula y Actopan, esto puede deberse en el caso del pozo Cerro Colorado al alto contenido de coliformes 240 ufc/100 ml (Gallegos *et al.*, 1999). Para los pozos Tula y Actopan la causa posible es la continua irrigación de los terrenos aledaños a éstos, con aguas residuales (Siebe y Cifuentes, 1995 citados en Gallegos *et al.*, 1999).

Durante el mes de junio y julio la mayor abundancia se registró en el pozo Exhacienda, posiblemente esto se debió a que las temperaturas registradas en ambos meses para dicho pozo (18.8°C y 19°C) favorecen el mayor crecimiento de las AVL. En el mes de agosto la mayor abundancia a nivel superficial se dio en los pozos El Tinaco y Actopan tal situación puede deberse a que el primer pozo se localiza en el municipio de Ixmiquilpan por el cual pasa el río Ixmiquilpan que incrementa su caudal con aguas residuales, además de que el terreno circundante a dicho pozo es irrigado con aguas negras desde hace 100 años (Arenal, 1978), ambas situaciones incrementan la cantidad de bacterias y materia orgánica favoreciendo el crecimiento de la amebas. En tanto que en los terrenos circundantes al pozo Actopan se practica la irrigación con aguas negras (Gallegos *et al.*, 1999). A nivel profundo el mayor número de aislamientos se dio en el pozo El Bondo y Actopan.

En el mes de septiembre la mayor cantidad de aislamientos se dio en el pozo Cerro Colorado, el cual se localiza en el municipio de Tezontepec el cual presenta uno de los mayores porcentajes de riego con aguas negras (INEGI, 1997), a nivel profundo la mayor abundancia se registró en el pozo El Tinaco. Con relación al muestreo correspondiente al mes de octubre se dio en el pozo Tula a nivel superficial y a nivel profundo en el pozo El Tinaco en ambos casos esto es favorecido por las descargas de aguas residuales (Arenal, 1985).

En el mes de noviembre la mayor abundancia se dio en los pozos El Bondo, Tula, y Exhacienda, a nivel profundo y de manera general la mayor abundancia se presentó en el pozo Tula, dicha abundancia es propiciada por las temperaturas registradas (19 y 20°C) que favorece el desarrollo de las AVL, así como la irrigación con aguas residuales (Arenal, 1985). Para el mes de enero la mayor abundancia se registró en los pozos Cerro Colorado y Actopan a nivel superficial, en ambos casos favorecido por el continuo riego con aguas residuales (INEGI, 1997). A nivel profundo y de forma general la misma situación se presentó en el pozo Actopan como consecuencia de la irrigación continua con aguas residuales (Gallegos *et al.*, 1999).

Finalmente considerando los aislamientos obtenidos en cada pozo por mes de muestreo indican que el mayor número de aislamientos se obtuvo en el pozo Exhacienda de San José Boxay lo cual podría deberse a que el área circundante es irrigada con aguas residuales lo que incrementa la cantidad de bacterias y materia orgánica además de los intervalos de temperatura registrados en dicho pozo lo que favoreció el crecimiento de las AVL (Arenal, 1985, Gallegos *et al.*, 1999).

De las 340 pruebas de patogenicidad realizadas únicamente seis aislamientos resultaron patógenas para ratón, dichos aislamientos pertenecen a los géneros *A. culbertsoni*, *A. royreba*, *A. rhyodes*, *A. polyphaga*, *A. lenticulata*, *A. mauritaniensis* las cuales fueron recuperadas de hígado, pulmón, riñón y cerebro, esto concuerda con los reportes realizados por Culbertson *et al.*, 1959; De Jonckheere, 1976; Martínez y Amado-Ledo, 1979, Martínez *et al.*, 1980; Martínez, 1985, Ferrante, 1991, quienes reportan a *A. polyphaga*, *A. lenticulata*, *A. culbertsoni* y *A. rhyodes* como amebas capaces de ocasionar la muerte de un organismo e invadir órganos como el cerebro, el pulmón, hígado y riñón además, señalan la tendencia de las AVL para diseminarse vía sanguínea desde un foco primario de infección como puede ser la piel o el tracto respiratorio.

Sin embargo, en el caso de *A. royreba* hasta el momento solamente se cuenta con el estudio realizado por Willaert *et al.*, en 1978 (citado en Martínez, 1985) en el cual establecen que esta especie de ameba es patógena para ratón pero únicamente cuando es inoculada por vía intracerebral.

Así mismo en el caso de *A. mauritaniensis* hasta el momento no ha sido reportada como un organismo patógeno, por el contrario el resultado obtenido en el presente estudio se contraponen con los estudios realizados por Page en 1988 quien considera a esta especie como no patógena.

Además de las cepas antes mencionadas se recuperaron 12 cepas más de distintos órganos (como el hígado, pulmón y riñón), pero estas no ocasionaron la muerte de los organismos por lo que se les considera invasivas (Martínez, 1985, Ferrante, 1991). Es necesario mencionar el hecho de que algunas de las especies que resultaron ser invasivas en el presente trabajo (*A. lugdunensis*, *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. hatchetti*, *A. quina*, *A. palestineensis*, *A. astronyxis*, *A. lenticulata*), han sido reportadas por Janitschke *et al.*, 1983; Rivera *et al.*, 1983, 1989, 1993; Page, 1988; Mansour, 1991; Marciano-Cabral *et al.*, 2000, como organismos patógenos capaces de producir infecciones y enfermedades tanto en humanos como en animales.

Finalmente es de suma importancia resaltar el papel que juegan las amebas pertenecientes al género *Acanthamoeba* y *Hartmannella* como vehículos de transporte de bacterias patógenas (Baker y Brown, 1994, Bonilla *et al.*, 2000; Marciano-Cabral *et al.*, 2000) como *Legionella*, *Listeria* y *Vibrio*, protegiéndolas de condiciones ambientales adversas, lo que permite la supervivencia, replicación y diseminación de dichas bacterias en los ecosistemas naturales (lagos, ríos, acuíferos) y artificiales (estanques, tuberías y piscinas). Dichas circunstancias aunadas a las posibles repercusiones que implican la presencia de las AVL en el acuífero estudiado vienen a remarcar la necesidad de conocer el estado en que se encuentran las fuentes de abastecimiento público de agua, sobre todo en comunidades agrícolas localizadas en regiones semiáridas como es caso del Valle del Mezquital en el cual más de 500,000 personas dependen del agua subterránea como única fuente de abastecimiento.

CONCLUSIONES.

- Existen AVL en el acuífero del Valle del Mezquital.
- Los géneros encontrados fueron *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Platyamoeba*, *Vahlkampfia*, *Vanella*, *Mayorella*, *Echinamoeba* y *Vexillifera*.
- El género preponderante fue *Acanthamoeba* el cual presentó una mayor capacidad de adaptación y tolerancia a diversas condiciones ambientales.
- Las condiciones físicas y químicas imperantes en el agua del acuífero no fueron obstáculo para que las amebas de vida libre estuvieran presentes en el mismo.
- Las AVL pueden desarrollarse bien en aguas con altos valores de alcalinidad.
- Las AVL pueden desarrollarse bien en aguas muy duras.
- Se da un mayor número de aislamientos durante la estación de lluvias, aunque este no es estadísticamente significativo.
- La especie que presentó un mayor número de aislamientos en la estación de lluvias fue *A. polyphaga*.
- Las especies que presentaron un mayor número de aislamientos durante la estación de secas fueron *A. lenticulata* y *A. culbertsoni*.
- Espacialmente la mayor abundancia de amebas se presentó en el pozo Exhacienda de San José Boxay.
- El mejor crecimiento de las amebas *in vitro* se observó a 22°C .
- Únicamente seis aislamientos resultaron patógenos para ratón.
- Tanto *A. royreba* como *A. mauritaniensis* fueron patógenas al ser inoculadas vía intranasal.
- En los pozos estudiados se observó que se presenta contaminación por amebas patógenas, lo cual representa un riesgo potencial para el usuario del agua de estos pozos, debido a que se utilizan para el riego de cultivos en la región, uso doméstico y actividades recreativas de contacto directo.
- Este trabajo constituye el primer reporte de AVL aisladas de aguas subterráneas en México.

REFERENCIAS

- Alfaro, I. B. (ed) 1998. El universo ambiental: Uso eficiente del agua. *El universal*, pp1-6.
- Anderson, O. R. 1997. Annual abundance, diversity and growth potential of *Gymnamoebae* in a shallow freshwater pond. *J. Euk. Microbiol.*, 44: 393-398.
- Andriulo, A., Cordone, G., Ferreira C. & Rivero Ma. L. 1997. Los fertilizantes en el partido de pergamino. ¿ Contaminantes de las aguas subterráneas ?. *Notas EcoWeb*. pp1-5.
- APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Work Association) & WPCF (Water Pollution Control Federation) 1980. *Standard methods for the examination of water and waster-water*. 14th ed.
- Arenal, R. 1978. *Carta hidrogeológica del área de Actopan-Ixmiquilpan*, estado de Hidalgo. Instituto de Geología, México, 2:98-105.
- Arenal, R. 1985. *Estudio Hidrogeoquímico de la porción centro-oriental del Valle del Mezquital, Hidalgo*. Instituto de Geología, México, 6: 86-97.
- Arreguín, M. J. P. 1998. *Aportaciones a la historia de la geohidrología en México, 1890-1985*. Ed. CIESA. Biblioteca del agua. México, pp1-144.
- Bamforth, S. S. 1985. The role of protozoa in litters and soils. *J. Protozool.* 32:404 - 409.
- Baker, J. & Brown, M. R. W. 1994. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiol.*, 140: 1253-1259.
- Barnes, D. R. & Ruppert, E. E. 1996. *Zoología de los invertebrados*. 6th ed. Ed. McGraw Hill International, México, p 10-69.
- Beaver, P. C., Jung, R. C. & Cupp (Eds), 1984. *Clinical parasitology*. 9th ed, Lea Feibiger, Philadelphia
- Biddick, J.C., Lynnette, H. Rogers & Brown T. J. 1984. Viability of pathogenic and nonpathogenic Free Living amoebae in long -term storage at a range of temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 859-860.
- Bitton, G. 1999. *Wastewater microbiology* .2th ed. Wiley liss. Canada. p24-26.
- Blasquez, L. L. 1938. *Memorias de la comisión geológica del Valle del Mezquital, Hidalgo*. Instituto de de Geología UNAM: México. p 1-9, 70-74, 92-103.

- Bottone, E. J. 1993. Free-living amebas of the genera *Acanthamoeba* and *Naegleria*: An overview and basic microbiologic correlates. *Mt. Sinai J. Med*, 60:260-270.
- Bonilla, L. P. 2000. Heterogeneidad de las amebas de vida libre con potencial patógeno aisladas de la atmósfera de la ciudad de México. Tesis Doctoral (Biología), Facultad de Ciencias UNAM. p 106.
- Bonilla, P. & Ramírez, E. 1993. Las amibas de vida libre. *Información Científica y Tecnológica*, 15 : 22-25.
- Bonilla, P., Ramírez, E., Ortiz, R., Calderón, A., Gallegos, E. & Hernández, D. 1999. Occurrence of pathogenic and free-living amoeba in aquatic systems of the Huasteca Potosina, Mexico. *Aquatic Ecosystems of Mexico: Status and Scope*. Ecovision World Monograph Series. Backhuys Publishers. Leiden. The Netherlands.
- Butt, C. G. 1964. Amebic meningoencephalitis. *Am. J. Clin. Pathol*, 42:516.
- Campoy, E., Gallegos, E., Robles, E., Calderón, A., Ramírez, E. & Warren, A. 1996. Estudio microbiológico del acuífero de la Cd. de León, Guanajuato, México. *Memorias del XVI Coloquio de Investigación. ENEP Iztacala- UNAM. México. pp 309*.
- Carballo, H. A. 1983. Determinación de la capacidad del suelo del estado de Hidalgo. Tesis licenciatura. UNAM. ENEP Iztacala. p 89.
- Casanelles, E. 1983. *La contaminación, hoy*. Ed. Teide. Barcelona, España. p 1-46.
- Cerva, L. 1969. Amoebic meningoencephalitis: axenic culture of *Naegleria*. *Science*, 163:576.
- Cerva, L. 1971. Experimental infection of laboratory animals by the pathogenic *Naegleria gruberi*, strain Vitek. *Folia Parasitol*, 18:171.
- Clarholm, M. 1981. Protozoan grazing of bacteria in soil-impact and importance. *Microbiol. Ecol.*, 7:343-350.
- Clarholm, M. 1989. Effects of plant-bacterial-amebal interactions on plant uptake of nitrogen under field conditions. *Biol. Fert. Soils*, 8:373-378.
- Coleman, D. C., Cole, C. V., Anderson, R. V., Blaha, M., Campion, M. K., Clarholm, M., Elliot, E. T., Hunt, H. W., Shaefer, B. & Sinclairs, J. 1997. An analysis of rhizosphere-saprophyte interactions in terrestrial ecosystems. *Ecol. Bull (Stockholm)*, 25:299-309.
- Costas, M. & Griffiths, A. J. 1986. Physiological characterization of *Acanthamoeba* strains. *J. Protozool.*, 33:304-309.

- Cuadra, M. J. 1992. La contaminación del agua en México. *Rescate Ecológico* 40: 145.
- Culbertson, C. G., Smith, J.W., Cohen, H.K. & Minner, J. R. 1958. *Acanthamoeba*: observation on animal pathogenicity. *Science*, 127: 1506.
- Culbertson, C. G., Smith, J.W., Cohen, H.K. & Minner, J. R. 1959. Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Am. J. Pathol.*, 35: 179-185.
- De Jonckheere, J. F. 1976. Differences in destruction of cysts of pathogenic and non pathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31: 294-297.
- De Jonckheere, J. F. 1991. Ecology of *Acanthamoeba*. *Rev. Infect. Dis.*, 13:S385-S387.
- Dive, D., Picard, J. P., Leclere, H. 1979. Amoebae in the water supply: An epidemiological study. *Ann. Microbiol.*, 130:487-498.
- Dykova, I., Lom, J., Machaekova, B., Peckova, H. 1998. *Vexillifera expectata* sp and other non-encysting amoebae isolated from organs of freshwater fish. *Folia Parasitol*, 45: 17-26.
- Ferrante, A. 1991. Immunity to *Acanthamoeba*. *Rev. Infect. Dis.*, 13 : S403- S409.
- Ferrante, A. 1991. Free-living amoebae: pathogenicity and immunity. *Parasite Immunology.*, 13: 31-47.
- Finlay, B. J., A. Rogerson., & Clowling, A. J. 1988. A beginners guide to the collection, isolation, cultivation and identification of freshwater protozoa. *Culture collection of algae and protozoa*.
- Foster, R. C. & Dormaar, J. F. 1991. Bacteria-grazing amoeba in the rhizosphere. *Biol. Fertil. Soils.* 11:83-87.
- Gallegos, E., Warren, A., Robles, E., Campoy, E., Calderon, A., Sainz, Ma. G., Bonilla, P., & Escolero, O. 1999. The effects of wastewater irrigation on groundwater quality in Mexico. *Wat. Sci. Tech.*, 40: 45-52.
- García, E. 1988. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. E. García Ed. México. p 217.
- García, D. 2000. Detección de *Naegleria fowleri* en cuerpos de agua de importancia turística en el estado de San Luis Potosí. Tesis Licenciatura. UNAM, ENEP Iztacala, p 56.
- Griffiths, B. S. 1990. A comparison of microbial-feeding, nematodes and protozoa in the rhizosphere of different plants. *Biol. Fertil. Soils.* 9: 83-88.

- Gislen, T. 1948. Aerial plankton and its conditions of life. *Biol. Rev.*, 23: 109-126.
- Grell, K.G. 1973. *Protozoology*. Springer- Verlag. Berlin, Germany. pp 1-554.
- Gutiérrez, R. L. 1997. Educación ambiental, caminos ecológicos. Ed. Limusa, México, D. F. p 12, 20-24, 66-69, 79-85.
- Guzmán, A. F. 1996. El consumo de agua de manantial embotellada, un poquito de moda. *UNAM. Hoy*, año 5, 25: 47-54.
- González, J. M., J. Iriberry, J., Egea, L. & Barcina, I. 1992. Characterization of culturability, protistan grazing and death of enteric bacteria in aquatic ecosystems. *Appl. Environ. microbiol.* 50. 998-1004.
- Hernández, G. L. 1994. Uso potencial agrícola, pecuario, y forestal en el Valle del Mezquital Hidalgo. Tesis licenciatura. UNAM, ENEP Iztacala, p 131.
- INEGI. 1995. Imágenes económicas. Censos económicos de Hidalgo correspondientes a 1994.
- INEGI. 1997. Destino de la producción agropecuaria en el estado de Hidalgo.
- INEGI. 1997. Hidalgo. Datos por ejido y comunidad agraria. XI censo general de población y vivienda, 1990. VII censo agropecuario.
- INEGI. 1998. Anuario estadístico del estado de Hidalgo.
- Jadin J.B. 1987. History. En: E.G. Rondanelli (ed) *Amphizoic Amoebae: Human pathology infectious diseases*. Color Atlas Monograph. Piccin Nuova Libreria, Pavia, Italy. pp 1-20.
- Janitschke, K., Lichy, S., & Thalmann, U. 1983. Pathogenicity of *Acanthamoeba* isolated from water. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg.*, 177: 350-358.
- John, D.T. 1993. Opportunistically pathogenic free-living amoebae. *Parasitic Protozoa*, 2th ed. Volumen 3. Ed. Julius P. Kreier & John, R. Baker. Academic Press, Inc. San Diego, p. 135-150.
- Kadlec, V. 1978. The occurrence of amphizoic amoebae in domestic animals. *J. Protozool.* 25: 235-237.
- Kinnear, B. F. 1998. Cytopathogenicity of *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia* and *Hartmanella* for human corneal keratocytes. **8th International conference on the biology and pathogenicity of free living amoebae**. Tennessee, USA.

- Kyle, E. D. & Noblet, G. P. 1985. Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in fresh water lakes. *J. Protozool.*, 32: 99-105.
- Kyle, E. D. & Noblet, G. P. 1986. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. I. Willard's pond. *J. Protozool.*, 33: 422-434.
- Lawande, R. V., Abraham, S. N., John, I. & L. J. Engler. 1979. Recovery of soil amebas from the nasal passages of children during the dusty Harmattam period in Zaria. *Am. J. Clin. Pathol.*, 71: 201-203.
- Lawande, R. V. 1983. Recovery of soil amoebae from the air during the harmattam in Zaria, Nigeria. *Ann Trop. Med. Parasitol.*, 77: 45-49.
- López, G., Muñoz, F. D., Hernández, M., & Soler, A. 1999. Programa de manejo integral de recursos e investigación participativa en el alto Mezquital, Hidalgo (centro piloto Dexthi- Valle del Mezquital). Cuadernos de investigación en ciencias de la salud, la educación y el ambiente, Volumen II. (ed) José Jaime Ávila Valdivieso. UNAM. Campus Iztacala.
- Lozano, D. R. 1936. *Estudio geológico del Valle del Mezquital, Hidalgo*. Publicaciones de la Secretaría de la Economía Nacional. p 5-8.
- Mansour, N. S., Saoud, A. F., Nashed, N. N. & Yousser, F. G. 1991. Fresh-water amoebae from four aquatic sites in Egypt. *J. Egypt Soc. Parasitol.*, 21: 15-22.
- Marciano, C. F., Puffenbarger, R. & Cabral, G. A. 2000. The increasing importance of *Acanthamoeba* infections. *J. Euk. Microbiol.*, 47: 29-36.
- Magarvey, R. H. & Hoskins, J. 1968. Entrainment of small particles by a large sphere. *Nature* (London), 218: 460.
- Martínez, A. J. & Amado-Ledo, E. D. 1979. Meningoencefalitis y encefalitis producidas por amebas de vida libre. *Protozoología, epidemiología y neuropatología. Morfol. Nor. Patol.*, 3 (sect B), 679.
- Martínez, A. J., García, C. A., Halks-Miller, M. & Arce-Vela, R. 1980. Granulomatous amebic encephalitis presenting as a cerebral mass lesion. *Acta Neuropatológica (Berl.)*, 51: 85-91.
- Martínez, A. G. J. 1987. Estudio protozoológico (Subphylum Sarcodina, Clase Lobosea), de piscinas de agua termal de la región de Tecozautla, Hidalgo. Tesis licenciatura. UNAM, ENEP Iztacala, pp75.

- Martínez, A.J. 1980. Is *Acanthamoeba* encephalitis an opportunistic infection?. *Neurology*, 30: 567.
- Martínez, A.J. 1985. *Free living amoeba: natural history, prevention, diagnosis, pathology and treatment of diseases*. CRC. Press INC. Boca Raton Florida.
- Martínez A. J. & Visvesvara, G. S. 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain. Pathol.*, 7:583-598.
- Martínez, A. J. & Visvesvara, G. S. 1998. Pathogenic and opportunistic free living amebic. Infections in animals. **8th international conference on the biology and pathogenicity of free living amoebae**. Tennessee, USA.
- Millar, C. E; Turk, I. M & Foth, H. D. 1979. Fundamentos de la ciencia del suelo. 5th ed. Ed. Compañía Editorial Continental S. A. México, D. F., p 67-68, 146, 254- 322.
- Morales, E. R. 1990. Sobreexplotación del agua subterránea en México. *Información Científica y tecnológica*, 12: 5-9.
- Morton, L. D., McLaughlin, G. L. & Whiteley, H. E. 1991. Effects of temperature, amebic strain, and carbohydrates on *Acanthamoeba* adherence to corneal epithelium in vitro. *Rev. Infect. Dis.*, 10: 3819-3822.
- Muñoz, I. D. & López, G. F. 1992. El impacto ecológico por el uso de las aguas residuales en el DDR 0-63, del Mezquital Hidalgo. **XII coloquio de investigación**. 30 de noviembre al 4 de diciembre. UNAM ENEP Iztacala, México.
- O'Dell, W.D. 1979. Isolation numeration and identification of amoebae from Nebraska lake. *J. Protozool* 26:265-269.
- Page, F. 1988. *A new Key to freshwater and soil gymnamoeba*. England: Freshwater Biological Association Scientific Press.
- Ramírez, E. & Bonilla, P. 1995. Epidemiología de las amebas en México. *Información Científica y Tecnológica*, 17:15-17.
- Rivera, F., Ortega, A., López-Ochoterena, A. & Paz, M. E. 1979. A quantitative morphological and ecological study of protozoa polluting tap water in México city. *Trans. Amer. Micros.*, 98: 465-469.
- Rivera, F., Ramírez, P., Vilaclara, G., Robles, E. & Medina, F. 1983. A survey of pathogenic and free-living amoebae inhabiting swimming pool water in México city. *Environ. Res.*, 32:205-211.

- Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, I., Ramírez, E., Bonilla, P. & Lares, F. 1987. Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico city and environs. *Environ. Res.*, 42: 149-154.
- Rivera, F., Lares, F., Gallegos, E., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Martínez, J. I., Rodríguez, S. & J. Alcocer. 1989. Pathogenic amoebae in natural thermal waters of three resorts of Hidalgo, Mexico. *Environ. Res.*, 50:289-295.
- Rivera, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Ortiz, R., Zaldivar, B., Ramírez, P & A. Duran. 1993. Pathogenic and free-living amoebae isolated from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. *Environ. Res.*, 62: 43-52.
- Rodríguez, Z. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Critical Reviews Microbiology*. 20 : 225-240.
- Rodríguez, Z. & García, S. 1997. Species richness and abundance of naked amebae in the rhizoplane of the desert plant *Escontria chiotilla* (Cactaceae). *J. Euk. Microbiol.*, 44 : 122-126.
- Rohr, U., Weber, S., Michel, R., Selenka, F. & Wilhelm, M. 1998. Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Appl Environ. Microbiol.*, 64: 1822-1824.
- Sadaka, H. A., El-Nassery, S. F., Samra, L. M. & H. N. Awadalla. 1994. Isolation and identification of free-living amoebae from some water sources in Alexandria. *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, 24:247-257.
- Sawyer, W. T., Nerad, T. A., Cahoon, L. B. & Nearhoo, J. E. 1998. *Learamoeba waccamawensis*, N. G., N. sp. (*Heterolobosea: Vahlkampfiidae*), a new temperature-tolerant cyst-forming soil amoeba. *J. Euk. Microbiol.*, 45:260-264.
- Scaglia, M., Gattis, S., Brustia, R., Strosselli, M., Bemuzzi, A. M. & Cevini, C. 1987. Pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* spp: a new autochthonous isolate from an Italian thermal area. *Microbiologica.*, 10: 171-182.
- Secretaría de Salud. 1994. Norma Oficial Mexicana, NOM-127-SSA1
- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. 1984. Legislación relativa al agua y su contaminación.

- Smirnov, A. V. & Goodkov, A. V. 1999. An illustrated list of basic morphotypes of *Gymnamoeba* (*Rhizopoda*, *Lobosea*). *Protistology*, 1: 20-29.
- Smitzis-Le, F. A. M. 1976. Presence of free-living amoeba in urban and communal water-supply systems of the Brest area. *Bull. Soc. Pathol., Exot. Foliales*, 69:302-309.
- Tomasini, P., & López-Ochoterena, E. 1979. Análisis taxonómico de las especies de protozoarios encontrados en el agua potable de la Ciudad de México D.F. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 21: 147-151.
- Unicef. 1998, pagina web.
- Velasco, S. C. & Ojeda, R: F. 1989. Clasificación y caracterización fisonómica de la vegetación del Valle del Mezquital, Hidalgo. Tesis Licenciatura . UNAM ENEP Iztacala. p 160.
- Vesaluoma, M., Kalso, S., Jokipii, L., Warhust, D., Ponka, A. & Tero, T. 1995. Microbiological quality in finnish public swimming pools and whirlpools with special reference to free-living amoebae: A risk factor for contact lens wearers?. *Br. J. Ophthalmol.*, 79: 178-181.
- Villagrana, L. J. 1992. Análisis sobre amibas de vida libre. *UNAM. Hoy* año 3 pp. 17-22.
- Visvesvara, G. S. 1991. Classification of *Acanthamoeba*. *Rev. Infect. Dis.*, 13:S369-S372.
- Visvesvara, G., Schuster, F., & Martínez, J. A. 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N. G. N. sp. agent of amebic meningoencephalitis en humans and other animals. *J. Euk. Microbiol.*, 40: 504-514.
- Weekers, P. H. H. 1959. *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. Ecophysiological, biochemical and molecular biological differences. Universite it Nijmegen. The Netherlands. pp 122.
- Weekers, P. H. H., Bodeliers, P. L. E., Wijen, J. P. H. & Vogels G. D. 1993. Effects of grazing by the free-living soil amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on various bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2317-2319.
- Wellings F., Amuso, P. T., Chang, S. L. & Lewis, A. L. 1977. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria* from Florida lakes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34: 661-667.

ANEXO

Agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes* (NNE)

NaCl-----	0.12 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O-----	0.004 g
CaCl ₂ • 2H ₂ O-----	0.004 g
Na HPO ₄ -----	0.142 g
KH ₂ PO ₄ -----	0.136 g
Bactoagar-----	15.0 g
Agua destilada-----	1000 ml

Mezclar en seco todos los ingredientes, agregar 500 ml de agua destilada y disolver, completar el volumen de 1000 ml y hervir hasta que se disuelva el agar completamente. Esterilizar a 121°C durante 20 min. Se vierten 20 ml en cajas Petri. Cuando el agar se haya solidificado se vierten 5 gotas de una suspensión concentrada de bacteria *E. aerogenes* muerta por calor a 68°C durante 60 minutos, distribuyendo la suspensión de bacteria sobre la superficie del agar. Las cajas se guardan en el refrigerador.

Medio PBSGM (Chang modificado)

Peptona Biotriptasa-----	16.6 g
Dextrosa-----	2.7 g
Na HPO ₄ -----	1.5 g
KH ₂ PO ₄ -----	0.9 g
Agua destilada-----	1000 ml

Mezclar en seco todos los ingredientes y disolver en agua destilada. Se envasan 2.7 ml del medio en tubos con tapón de rosca y se esterilizan a 121°C durante 15 min. Ya frío el medio, a cada tubo se le agrega 0.3 ml de suero neonato de bovino con antibiótico. Se guardan en el congelador.

Preparación de suero neonato bovino para medio PBSGM

El suero se descongela y se pone en baño María a 56°C durante 30 minutos para descomplementarlo. Se prepara un mezcla de antibióticos a base de penicilina G sal sódica y Kanamicina de la siguiente manera:

Penicilina G 1000 000 U en 2 ml de agua destilada

Kanamicina 1 g en solución 3 ml

Volumen total 5 ml de estos se agrega 1ml por cada 100 ml de suero descomplementado.

Medio Bactocasitona (BC)

Bactocasitona-----20 g
Agua destilada-----1000 ml

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos, se deja enfriar y se agregan 0.3 ml de suero neonato de bovino con antibiótico. Se guarda en el congelador.

Medio Ringer

NaCl-----6 g
KCL-----0.075 g
CaCL₂-----0.1 g
NaHCO₃-----0.1 g
Agua destilada-----1000 ml
pH -----7.74

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos, se deja enfriar y se agregar *Enterobacter aerogenes* inactivada.

ESTADISTICO

LLUVIAS	SECAS
13	31
41	29
40	46
44	12
33	

Hipotesis

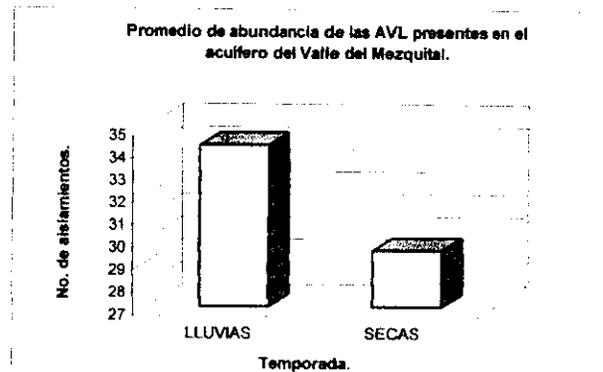
Ha: el número de aislamientos de AVL durante la estación de lluvias es mayor que durante la estación de secas.

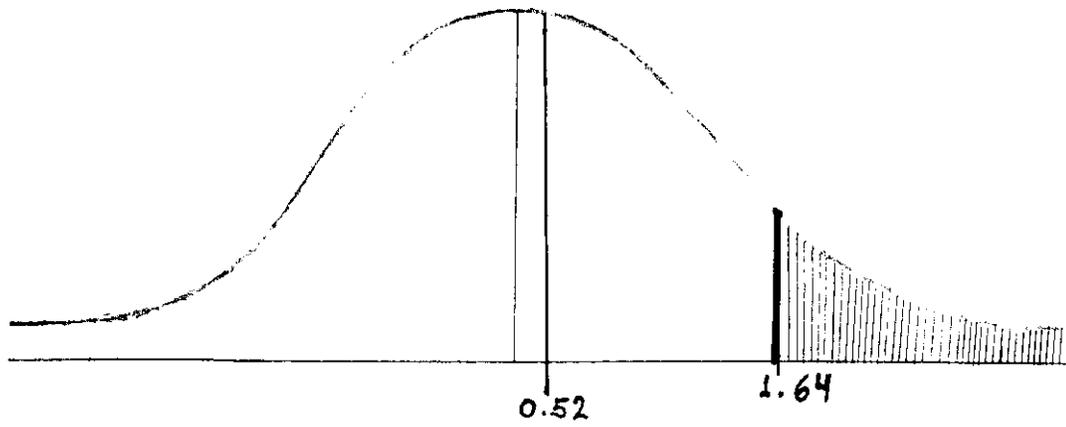
Ho: el número de aislamientos de AVL durante la estación de lluvias es menor o igual que durante la estación de secas.

	LLUVIAS	SECAS
Media	34.2	29.5
Error típico	5.598214	6.95820858
Mediana	40	30
Moda	#N/A	#N/A
Desviación estándar	12.5179871	13.9164172
Varianza de la muestra	156.7	193.666667
Curtosis	2.91899903	1.42301391
Coefficiente de asimetría	-1.7161266	-0.21371754
Rango	31	34
Mínimo	13	12
Máximo	44	46
Suma	171	118
Cuenta	5	4

Prueba z para medias de dos muestras

	LLUVIAS	SECAS
Media	34.2	29.5
Varianza (conocida)	156	193
Observaciones	5	4
Diferencia hipotética de las medias	0	
z	0.52729167	
P(Z<=z) una cola	0.29899551	
Valor crítico de z (una cola)	1.644853	
Valor crítico de z (dos colas)	0.59799102	
Valor crítico de z (dos colas)	1.95996108	





Conclusión: como el valor experimental de Z (0.52) se encuentra dentro del área de aceptación de H_0 podemos concluir que no existen diferencias significativas entre el número de aislamientos de AVL obtenidos durante la estación de lluvias y el obtenido durante la estación de secas.