



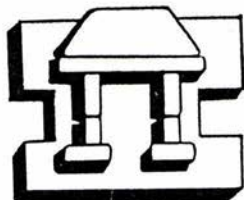
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

AMIBAS DE VIDA LIBRE EN DOS HUMEDADES ARTIFICIALES
CON DISTINTOS PRETRATAMIENTOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A N :
MONICA LOPEZ HERNANDEZ
DE LA CERDA MEDINA JUAN MANUEL



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEXICO

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

En memoria de aquellos que formaron y seguirán formando parte de mi vida
(Adela, Gregorio y Juan G.)(M)

A nuestros padres por darnos la oportunidad y el apoyo para alcanzar esta
meta. los adoro. ¡Gracias infinitas! (M & J)

A mis hermanos por enseñarme que las cosas se pueden conseguir, si uno así lo
quiere. (M)

A mis sobrinos Itzel, Carlos y Janitzio, quienes me han inyectado de energía
nueva para seguir adelante. (M)

A Alejandro, por siempre permanecer a mi lado, aun en los momentos más
difíciles. ¡Gracias!!!(M)

♣ *A ti Juan Manuel, gracias por formar parte de lo que soy, por ser la fuerza que me impulsa día con día a seguir adelante y quien a pesar de cualquier cosa siempre será parte importante de mí. Gracias por ser lo que eres y por darme la oportunidad de también formar parte de tu vida. Te quiero mucho!!!!*

♣ okey gracias ☺

Gracias a.....

- A la M. en C. Elizabeth Ramírez Flores, por ser nuestra asesora de tesis, y por darnos su apoyo y amistad. (M & J)

- ...A la Dra. Patricia Bonilla, por los consejos y el aprendizaje compartidos, además de las atinadas observaciones en la revisión del trabajo de tesis. (M & J)

-A los Doctores Alfonso Lugo, Rosario Sánchez y Elvia Gallegos por los comentarios y revisiones a nuestro trabajo. (M & J)

- A Damaris y Alix por estar siempre en los buenos y malos momentos y por enseñarme que para tener lo que uno quiere hay que esforzarse. (M)

-A todos nuestros compañeros que forman parte proyecto CyMA en especial a Luis Fernando. (M & J)

- a Xochitla por brindarme la oportunidad de crecer..... y en especial a las personas que trabajan en Áreas verdes por todo el conocimiento compartido. (M)

RESUMEN

En el agua residual se encuentran una gran cantidad de microorganismos patógenos, por lo que es necesario darle tratamiento antes de descargarla en el ambiente para evitar problemas de salud. Entre los tratamientos se encuentran los lechos de macrofitas, los cuales basan su funcionamiento en la acción de los microorganismos presentes en el agua residual y tienen una buena eficiencia en la eliminación de patógenos. Estos sistemas son de bajo costo y no necesitan de mantenimiento especializado. Dentro de los microorganismos presentes, destacan las amibas de vida libre, ya que pueden causar enfermedades mortales al ser humano.

Por tal razón, se realizó un estudio en dos sistemas de tratamiento de agua residual doméstica, que utilizan lechos de macrofitas. El agua proviene de casas- habitación de 2 zonas rurales, una en Santa Matilde Hidalgo, y la otra en Chapa de Mota, Edo. de México. Se determinó la presencia de las Gimnamebas, así como las bacterias coliformes, sólidos suspendidos, pH, oxígeno disuelto (OD) y temperatura. Los análisis se realizaron de acuerdo a las normas mexicanas y para las Gimnamebas se utilizaron medios específicos (NNE) para su aislamiento y se identificaron tomando en cuenta sus características morfológicas.

Las bacterias coliformes fecales y totales del sistema en Chapa disminuyeron entre 7 y 6 unidades logarítmicas, mientras que en Matilde solo disminuyeron en 3 y 1 unidad. La temperatura osciló entre los 6.5°C a 8.5°C en Matilde y entre los 7°C a los 10°C en Chapa, el OD para Matilde fue de 0.2 mg/L a 1.8mg/L y para Chapa se fue de 1mg/L a 11mg/L. Los sólidos suspendidos disminuyeron en ambos casos en un 70%. En cuanto a las Gimnamebas en Matilde se aislaron 131 amibas en entrada y 105 en la salida. El género *Acanthamoeba* fue el más abundante con un 59% del total de amibas aisladas, pero se eliminó en un alto porcentaje (93%) en la salida del sistema. En Chapa se obtuvieron 45 aislamientos en entrada y 38 en salida. La amiba más abundante fue *Hartmannella* con un 30%, presentando una remoción en salida del 50%. Cabe destacar que los dos géneros anteriores son considerados como patógenos y su eliminación del agua es importantes. Los sistemas de ambas casas tuvieron un buen porcentaje de remoción, lo que permitió utilizar el agua tratada para regar las áreas verdes.

CONTENIDO

Introducción	3
Humedales artificiales	6
Amibas de vida libre	9
Antecedentes	12
Humedales artificiales	12
Estudios en el Mundo	12
Estudios en México	13
Amibas de vida libre	14
Estudios de las amibas de vida libre en humedales artificiales	15
Objetivos	16
Area de estudio	17
Descripción de los sistemas de tratamiento	17
Material y Métodos	18
Muestreo	19
Aislamiento y Cultivo	19
Identificación	20
Prueba de flagelación	20
Análisis estadístico	20
Resultados y discusión	21
Amibas de vida libre	21
Parámetros físico químicos	25
Parámetros bacteriológicos	34
Conclusiones	38
Anexo	39
Literatura citada	42

Introducción

Los desechos de origen industrial y doméstico son los principales contaminantes de las aguas. La contaminación del agua puede definirse como la adición de materia extraña indeseable que deteriora su calidad. Las aguas contaminadas o residuales están constituidas por agua en un 99.9% y un 0.1% de otros materiales como son los sólidos en suspensión, coloidales o disueltos, los cuales contienen los principales macro y micro nutrimentos de las plantas, además de esos nutrimentos, dichas aguas contienen también gérmenes excretados por el hombre o animales de sangre caliente como son virus, bacterias, protozoos y helmintos causantes de enfermedades y que se encuentran en cantidades variables en todas las aguas residuales (Mara y Cairncross, 1990); aunque esta fracción es muy pequeña representa el mayor problema para su tratamiento y disposición convenientes, esto hace inadecuado su uso para el consumo humano, con lo que se agrava la escasez del líquido vital. Por esta razón, el tratamiento de las aguas residuales es una opción para solucionar el problema (Rivera *et al.*, 1993).

Para tratar el agua residual existen diferentes metodologías, o combinaciones de las mismas. Los métodos que pueden escogerse dependerán del origen del agua, de las impurezas que contienen y del uso que se le dará (Rivera y Calderón, 1993); para ello los tipos de procesos para el tratamiento del agua residual se pueden agrupar de la siguiente manera:

Tratamiento preliminar

- Cribado o desbrozo

Tratamiento primario

- Sedimentación
- Flotación
- Separación de aceites
- Homogeneización
- Neutralización

Tratamiento secundario

- Lodos activados
- Aireación prolongada
- Estabilización por contacto
- Lagunaje por aireación
- Estabilización por lagunaje
- Filtros biológicos
- Discos biológicos
- Tratamientos anaerobios
- Lechos de carrizos o humedales

Tratamiento terciario

- Microtamizado
- Filtración
- Precipitación y coagulación
- Adsorción (carbón activado)
- Intercambio iónico
- Osmosis inversa
- Electrodialisis
- Proceso de reducción de nutrientes

Desinfección

Tratamiento de lodos

Disposición de lodos

(Ramalho, 1993)

En el presente trabajo el Tratamiento secundario es el punto de interés y se caracteriza porque en él se quitan sustancias orgánicas que permanecen después del tratamiento primario, con una eficiencia de hasta el 85%, dado por la descomposición de materia orgánica por medio de los microorganismos (Robles *et al.*, 1993) como sucede

normalmente en los cuerpos de agua, por esta razón también se le conoce como tratamiento biológico. Para un buen funcionamiento se deben cumplir los siguientes requisitos:

- Disponer de una gran cantidad de microorganismos
- Permitir contacto entre éstos y la materia orgánica
- Disponer del oxígeno necesario para mantener a los microorganismos con vida
- Procurar un tiempo de contacto suficiente
- Proporcionar la temperatura adecuada

Los tratamientos biológicos más empleados son:

- Sistemas de película biológica
- Lodos activados
- Estanques de estabilización
- Lechos de carrizos o humedales artificiales

HUMEDALES ARTIFICIALES

Este sistema de tratamiento es de tipo secundario, debido a que se basa en la actividad bioquímica de los microorganismos que remueven materiales disueltos y suspendidos, convirtiéndolos en compuestos más aceptables. La mayoría de estos procesos son aerobios y por ello demandan la presencia de oxígeno, que va a ser utilizado por las poblaciones microbianas en los procesos de oxidación (Rivera y Calderón, 1993); este método no sólo es utilizado en México, sino a nivel mundial.

Existen humedales naturales que se definen como una gran variedad de hábitats como son: cuerpos de agua temporales, playas, márgenes de lagos, planicies, playas costeras, pantanos salados y manglares, los cuales tienen en común que la tierra está húmeda (o bajo el agua) durante al menos una parte del año. Simulando lo que sucede en los humedales naturales, se han implementado humedales artificiales para tratar las aguas de desecho,

y cuya función es la de transformar la materia orgánica a un nivel aprovechable por las plantas, lo cual es con el fin de mejorar la calidad del agua de varias fuentes (industrial, drenaje pluvial, doméstica, etc) y con distintas características. El conocimiento a partir del estudio de los humedales artificiales ha generado la idea de que es una buena alternativa para el tratamiento de aguas residuales en países en vías de desarrollo, ya que este sistema ofrece ventajas sobre el estanque de oxidación como la disminución en la población de mosquitos y malos olores, así como ser un refugio de aves, bajo costo, etc.

Clasificación de los Humedales Artificiales (Vyzamal b, 1998)

Los humedales artificiales se pueden clasificar de acuerdo al tipo de macrófita dominante:

- I.- Humedales con macrófitas flotantes
- II.- Humedales con macrófitas de hojas flotantes
- III.- Humedales con macrófitas subemergentes
- IV.- Humedales con macrófitas emergentes
- V.- Los diferentes tipos de humedales pueden combinarse entre ellos o con otros sistemas para aprovechar las ventajas de estos al máximo

I.- Humedales con macrófitas flotantes: Son muy diversos en forma y hábitat, van desde plantas grandes con rosetas de hojas aéreas y/o flotantes y raíces sumergidas (lirio y lechuga acuática) a plantas flotantes pequeñas o sin raíces (*Lemnaceae*, *Wolffia*, etc). Otras plantas usadas incluyen a *Hydrocotyle* sp. y *Pistia stratiotes* las cuales otorgan una alta capacidad en toma de nutrimentos y transporte de oxígeno.

II.- Humedal con macrófitas de hojas flotantes: aquí se incluyen especies de plantas que enraízan en el sustrato y sus hojas flotan en la superficie del agua, *Nymphaeaceae* sp. y *Nuphar lutea* y *Nelumbo nucifera* son representantes típicos de este grupo, aunque pocos sistemas han usado este tipo de vegetación. En la columna de agua el tratamiento es realizado por la microflora que se encuentra unida a los pedúnculos de las hojas y en el sedimento por raíces y rizomas, los cuales crecen horizontalmente bajo la superficie; estas plantas prefieren sustratos arcillosos.

III.- Humedales con macrófitas subemergentes: las macrófitas tienen su tejido fotosintético sumergido en el agua, el cual puede tomar los minerales de esta; estas plantas crecen sólo en agua bien oxigenada por lo que no pueden ser usadas en agua con alta carga orgánica, debido a que la descomposición de la materia crea condiciones anóxicas, además que un agua muy turbia impide la actividad fotosintética de las plantas. La principal característica de este sistema es la de pulir aguas de desecho tratadas secundariamente; las plantas usadas en este sistema son: *Egeria densa*, *Elodea* sp y *Ceratophyllum* sp., entre otras.

IV.- Humedales con macrófitas emergentes: este tipo de humedales pueden ser construidos de varias formas y pueden ser categorizados de acuerdo al patrón de flujo:

1. Sistemas con superficie acuática libre
2. Sistemas con flujo sub-superficial, que a su vez se dividen en:
 - a) sistemas con flujo vertical sub-superficial
 - b) sistemas con flujo horizontal sub-superficial

1.- Sistemas con superficie acuática libre

Consisten en canales con algún tipo de barrera subsuperficial, suelo y algún medio para permitir la vegetación, con un nivel de agua relativamente profundo con baja velocidad de flujo, estos funcionan como un tratamiento biológico intensivo.

2.- Sistemas con flujo sub –superficial o Método de la Zona de la Raíz (MZR)

Los humedales de este tipo se clasifican en:

a) Humedales con flujo vertical: fueron conocidos en su inicio como campos de infiltración (Holanda), este humedal está compuesto por un substrato de grava cubierto con arena, sembrado con macrófitas, el agua de desecho se suministra gradualmente y es colectada en la base, el substrato drena completamente permitiendo la renovación de aire mejorando el proceso de nitrificación.

b) Humedal con flujo horizontal. Fue desarrollado en Alemania por el profesor Kickut en 1974. La clave del método reside en un lecho de raíces de *Phragmites* sp., *Typha* sp., o *Scirpus* sp. (entre otras), que pertenecen al grupo de las macrófitas, las cuales cumplen un papel muy importante ya que las plantas están morfológicamente adaptadas

para crecer en sedimentos saturados de agua, debido a una gran cantidad de espacios internos de aire para transportar oxígeno desde las hojas a las raíces y rizomas, este transporte de oxígeno provee a la rizósfera de oxígeno (O_2) el cual crea condiciones oxidantes y estimula la descomposición aerobia de materia orgánica y el crecimiento de bacterias nitrificantes. Por otro lado, la presencia de bacterias en el sistema estabiliza la superficie del substrato en todos los sistemas, previniendo la formación de canales de erosión, además reduce la velocidad del agua creando mejores condiciones para la sedimentación de sólidos suspendidos (Figura 1). Las macrófitas presentan otros valores específicos como son hábitat para la vida silvestre y dar una vista estética (Brix, 1994).

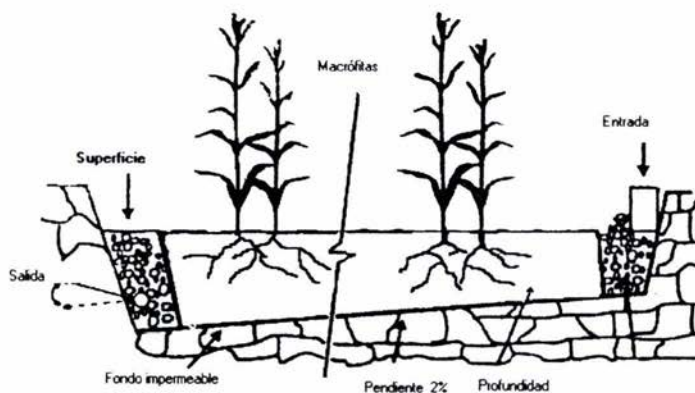


Figura 1. Características principales de un humedal artificial tipo MZR (Rivera y Calderón, 1993)

El proceso de depuración es llevado a cabo tanto por organismos que utilizan oxígeno como por aquellos que no lo utilizan (Decamp y Warren, 1998), dentro de los organismos que habitan estos ecosistemas, existe un grupo denominado de "vida libre", que incluye tres tipos: amibas, flagelados y ciliados. Las amibas desnudas o gimnamebas han sido reconocidas como miembros importantes dentro de los ecosistemas acuáticos por su diversidad, abundancia y productividad ya que además de eliminar bacterias y regular las poblaciones de las mismas con una eficacia de hasta el 60% (Avery *et al.*, 1995., Anderson, 1997), algunas de ellas son potencialmente patógenas para el hombre (Martínez y Visvesvara, 1997) de ahí la importancia de eliminarlas del agua que entra en contacto con el hombre, en forma directa como la de consumo, recreación (albercas, lagos, etc) y de forma indirecta como la de riego.

Amibas de Vida Libre

Las amibas de vida libre (AVL) tienen importancia médica y ecológica. Son organismos capaces de producir infecciones en el Sistema Nervioso Central (SNC) y en el ojo del humano, entre otras (John, 1993). Estas amibas son capaces de sobrevivir en vida libre y como endoparásitos por lo que se ha propuesto el término "anfizoico", que significa de ambos lados (Martínez y Visvesvara, 1997).

Las AVL son prácticamente cosmopolitas, pues se les encuentra en toda la biósfera incluyendo los casquetes polares, suelo, agua y la atmósfera; viven principalmente donde hay agua, como: estanques, ríos, arroyos, lagos, piscinas, sistemas de tratamiento de agua residual (Rivera *et al.*, 1986, 1995; Ramírez *et al.*, 1993), corrientes subterráneas (Matuz, 2001), e incluso en agua mineral embotellada (Rivera *et al.*, 1981). También se ha observado que estos organismos son capaces de soportar variaciones de pH que van desde 3.9 hasta 9.7, así como se pueden encontrar a temperaturas extremas, por debajo de los 4°C y por encima de los 37°C, aunque algunas pueden desarrollarse a 45°C (Bonilla y Ramírez, 1993). Las temperaturas elevadas favorecen su proliferación por lo que se les encuentra comúnmente en aguas termales naturales y en aguas contaminadas térmicamente, ofreciéndoles un hábitat libre de competencia, con escasa o nula depredación (Rivera *et al.*, 1987). En los ambientes acuáticos las AVL se alimentan de bacterias, materia orgánica, hongos, algas y otros protozoos, incluyendo otras amibas (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).

Las AVL también pueden llegar a los cuerpos de agua, a los alimentos y a las heridas superficiales en forma de quiste. Pueden desprenderse de los cuerpos de agua en forma de aerosoles. Dentro de los cuerpos de agua las amibas viven sobre la superficie, adheridas a partículas flotantes de la columna de agua o en los sedimentos (Gallegos, 1997). Dentro del grupo de las AVL existen 3 géneros patógenos para el humano, estos son: *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Balamuthia* (Martínez y Visvesvara, 1997), de las cuales *Naegleria* es la más virulenta con una sola especie, que es *Naegleria fowleri*, además hay otras 5 especies descritas en la literatura, ellas son: *N. andersoni*, *N. australiensis*, *N. gruberi*, *N. jadini* y *N. lovaniensis*, que no son patógenas para el humano

(Visvesvara y Stehr-Green, 1990); sin embargo, Rivera *et al.*, en 1989 encontraron *N. lovaniensis* en líquido cefalorraquídeo en un infante con síndrome de Arnold-Chiari tipo II.

Naegleria fowleri es un organismo que presenta tres estados diferentes durante su ciclo de vida:

- a) Forma vegetativa o trofozoito que mide aproximadamente de 15 a 25 μ m. El citoplasma es finamente granular, con múltiples mitocondrias, lisosomas y vacuolas, además está rodeado por pseudópodos o lobópodos que le dan cierta movilidad. El trofozoito es termofílico y puede crecer y desarrollarse a temperaturas de 40 a 45° C.
- b) Forma flagelada: Es generalmente en forma de pera y es biflagelada, sin embargo, ocasionalmente se pueden encontrar hasta 10 flagelos (Martínez y Visvesvara, 1997).
- c) Quiste: Esta forma es esférica con un diámetro de 8 a 12 μ m, compuesta de una pared de doble capa densa, con uno o dos poros planos. El quiste se forma en respuesta a condiciones ambientales adversas (Martínez y Visvesvara, 1997).

Naegleria fowleri provoca una enfermedad cerebral aguda denominada Meningoencefalitis Amibiana Primaria (MEAP); (Kyle y Noblet, 1985; Cable y John, 1986; Rivera *et al.*, 1990; Visvesvara y Stehr-Green, 1990; Martínez y Visvesvara 1997), esta infección trae consigo un desenlace fatal en un periodo de 5 a 7 días; la MEAP se adquiere por exposición a aguas contaminadas con *Naegleria fowleri* de albercas, estanques y lagos, donde la temperatura elevada (40–45° C) lo que permite un rápido desarrollo de estos organismos (Bonilla y Ramírez, 1993). La MEAP producida por *N. fowleri* fue reportada en el hombre en 1965 por Fowler y Carter en Australia; en 1966 se detectaron otros tres casos de infección por estas amibas en Florida. La sintomatología y los signos de estos casos fueron muy semejantes a los observados en Australia, proporcionando una imagen casi completa de las características clínicas y patológicas de la enfermedad, además de que se hizo notar que la infección se había adquirido por inoculación intranasal durante la natación (Rivera *et al.*, 1983).

Con respecto a *Acanthamoeba* y *Balamuthia*, se puede decir que morfológicamente son similares en algunas de sus etapas ya que *Balamuthia* puede presentar trofozoito con largos y finos pseudópodos (forma de araña) que son más grandes que el otro género (hasta 50 μ m). *Acanthamoeba* presenta medidas que van desde las 13 μ m a las 35 μ m de diámetro, la forma vegetativa posee un abundante citoplasma con elongaciones mitocondriales

múltiples, lisosomas, ribosomas y vacuolas; y un quiste que mide entre 15 y 20 μ m de diámetro con una doble pared (Martínez y Visvesvara, 1997). Uno de los primeros reportes sobre su patogenicidad se dio cuando Culbertson en 1958 encontró en sus cultivos de virus, amibas del género *Acanthamoeba*, y demostró que estas amibas eran capaces de producir alteraciones en mucosa nasal, neumonía, encefalitis y abscesos cerebrales en monos inoculados experimentalmente (Biagi, 1976).

Se han registrado siete especies de *Acanthamoeba* y una sola de *Balamuthia* (*B. mandrillaris*) que pueden invadir al hombre y que provocan una enfermedad cerebral más crónica que la causada por *Naegleria*, ya que estas pueden durar más de 30 días llamada Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG). *Acanthamoeba* causa también infección en el ojo (Queratitis Amibiana) (De Jonckheere, 1981; Shukla *et al.*, 1990; Moura *et al.*, 1992), y así como diversas infecciones en oído, piel y pulmón. La EAG es más frecuente en individuos con sistema inmune débil por ejemplo, enfermos con VIH (Martínez y Visvesvara., 1997).

Los miembros de la familia Acanthamoebidae son encontrados comúnmente en agua y suelo, y se pueden encontrar a lo largo de todo el año (Hernández, 1991), así como a elevadas temperaturas (dentro de aguas termales) esto último de acuerdo a lo reportado por De Jonckheere (1981), quien dice que la densidad del género *Acanthamoeba* aumenta en aguas termales (ya sean naturales o contaminadas térmicamente) y disminuye en aguas más templadas; no obstante Rivera *et al.*, 1986 encontraron especies de este género en aguas con temperaturas desde los 13.5 a los 21°C.

ANTECEDENTES

Humedales Artificiales

Estudios en el Mundo

El uso de humedales como tales han tenido un gran auge desde que se implementaron por primera vez en Alemania por Seidel en la década de los 60's (1964-1966), sin embargo el Método de la Zona de la Raíz (MZR) es implementado hasta 1974 por el profesor Kickut y de ahí su uso se expandió a otros países. En Marruecos, usando *Eichornia crassipes* y *Lemna giba* en 1994 Mandi probó su uso en humedales como medio para purificar agua de desecho de tipo doméstico e industrial, el cual consistió de dos estanques de lirios y un tanque de *Lemna*, encontrando que el lirio reduce de un 61-95% los Sólidos Suspendidos Totales (SST), la Demanda Química de Oxígeno (DQO), los coliformes fecales y estreptococos fecales del 74 al 98% y *Lemna* eliminaba los SST y la DQO de un 61 a un 82%. En Canadá, Vincent en 1994 estudio un humedal el cual usaba varios tipos de macrófitas (*Phragmites*, *Scirpus*, *Typha*, etc) teniendo la función de mantener la calidad del agua en un lago de uso recreacional, encontrando que de siete parámetros tomados en cuenta se obtenía una buena calidad de agua. Hansen *et al.*, 1998 en Estados Unidos estudiaron la capacidad del humedal artificial para remover selenio de refineries de petróleo, en el humedal se emplearon entre otras plantas *Scirpus* sp., *Typha* sp., *Cotula* y *Polypogon*, encontraron que el selenio era removido en un alto porcentaje, arriba del 85%.

En 1998 Haberl en el Instituto de Suministro del Agua de Austria brindaron apoyo a países en vías de desarrollo implementando humedales en Chile, México, Nicaragua, Uganda, Kenia y Tanzania, esto con el fin de extender esta tecnología a zonas de bajos recursos. En ese mismo año Mc Brien y cols. realizaron un estudio en el que analizaron los beneficios de los humedales, mediante un sistema en Egipto y otro en Estados Unidos, encontrando que de 12 parámetros medidos (Demanda Biológica de Oxígeno (DBO), SST, etc) el porcentaje de eliminación en promedio era superior al 60%. En España, Ansola *et al.*, en 1998 realizaron una investigación sobre humedales artificiales para tratar aguas de desecho (rurales) encontrando una eficacia en el sistema (plantado con *Typha latifolia* y *Salix atrocinerea*) de hasta el 90% en reducción de materia orgánica, Nitrógeno (N)

y Fósforo (P) y una remoción de 5 unidades log para organismos patógenos. En Brasil Philippi *et al.*, en 1998 proponen un sistema para tratar el agua residual de zonas rurales, integrando el MZR y el tanque séptico, encontrando una remoción de N y P de más del 70% lo cual da lugar a un afluente de buena calidad. En 1998 Perdomo *et al.*, en Uruguay estudiaron el uso potencial de las macrofitas acuáticas (*Eichornia crassipes* y *Typha*) para mejorar el tratamiento del tanque séptico, encontrando que la remoción (DBO, DQO, $\text{NH}_4^+\text{-N}$) fue elevada dando un efluente de buena calidad. En 1998 Fujita *et al.*, llevan a cabo un estudio en Japón para comprobar la eliminación de nutrimentos por parte de *Wolffia arrhiza* encontrando que con un tiempo de retención de 5 días es efectiva; en el año 2000 en Inglaterra Warren *et al.* observaron la remoción y variabilidad cinética de bacterias en humedales artificiales con flujo horizontal subsuperficial.

Estudios en México

El estudio de los humedales artificiales en nuestro país empezó en 1993 cuando Rivera y cols. trabajaron en un sistema de tratamiento de agua residual utilizando *Phragmites* sp. y *Typha* sp. en San. Luis Potosí, implementaron y observaron que el sistema era eficiente para la eliminación de materia orgánica. Rivera y Calderón (1993) describieron las cualidades y facilidades para ser implementado el MZR en zonas rurales para el tratamiento de agua de desecho; el mismo año Decamp, y cols midieron la remoción de microorganismos patógenos también en aguas residuales en sistemas con el MZR en regiones tropicales y subtropicales del país, comparándolos con sistemas de Inglaterra; posteriormente en 1994 Curds y cols. utilizaron el MZR para tratar aguas de desecho, ubicando sistemas a escala en diferentes zonas del país, así como en Inglaterra probando diferentes sustratos para establecer el mejor; en 1997 Rivera y cols. describieron el comportamiento fisicoquímico y bacteriológico de un humedal con flujo subsuperficial con lecho de grava usado para tratar desechos con alta carga orgánica del rastro municipal de Pachuca, Hgo. Rivera y colaboradores (1991), estudiaron en dos sistemas de tratamiento con *Phragmites australis* el grado de remoción de AVL; en 1993 Ramírez y cols. comprobaron la presencia de AVL potencialmente patógenas en el agua de desecho que llegaba del alcantarillado de 8 suburbios de Londres a un sistema de lodos activados, en el mismo año Rivera y cols. observaron la capacidad para remover AVL probando diferentes tipos de sustratos en el MZR.

Amibas de vida libre

El inicio de la investigación formal de las Amibas de Vida Libre en México fue con Rivera en 1977 con un estudio monográfico de *A. castellanii* y *A. culbertsoni*. En 1981 Rivera *et al.* observaron la presencia de protozoos en agua mineral embotellada, encontrando en ellas organismos pertenecientes a las familias *Vahlkampfiidae* y *Acanthamoebidae*; en 1983 el mismo autor y colaboradores recopilan datos sobre la epidemiología de la Meningoencefalitis causada por *Naegleria fowleri*.

En 1984 se reportaron 2 casos clínicos de meningoencefalitis por *Naegleria*, el primero reportado por Valenzuela, *et al.* el cual era el caso de un joven de 16 años que en 1978 muere por esta enfermedad en Mexicali después de haber nadado en un día caluroso en una fosa de agua estancada y contaminada. El segundo caso fue el de una niña de 1 año, que contrajo la enfermedad después de haber sido bañada con agua caliente proveniente de un tanque de almacenamiento, en este caso no hubo muerte ya que el diagnóstico y tratamiento fueron oportunos (Rodríguez, 1984);

Rivera y colaboradores continuaron sus investigaciones sobre AVL y para 1987 aislaron amibas de la atmósfera de la ciudad de México encontrando entre las especies aisladas algunas con patogenicidad reconocida para el hombre; en 1989 observaron la presencia de trofozoitos de *N. lovaniensis* en líquido cefalorraquídeo de un infante, así como también aislaron amibas del género *Acanthamoeba* en pacientes con signos de rinitis crónica y con quemaduras de piel infectadas; en 1990 aislan una nueva subespecie del género *Naegleria* en aguas termales naturales de Michoacán, a la cual denominaron *N. lovaniensis tarasca*; en 1993 b encontraron amibas de vida libre y patógenas en albercas y tinas de fisioterapia, encontrando que aunque estos lugares eran desinfectados, la cantidad de cloro no era suficiente para eliminar a las amibas. En 1994 reportaron un estudio sobre la distribución estacional de AVL patógenas en aire dentro de algunos suburbios de la ciudad de México.

En 1995 Ramírez y Bonilla publicaron una recopilación sobre la epidemiología de las amibas en donde dan algunas medidas de control y prevención, el mismo año Álvarez, *et al.* encontraron una relación entre el síndrome hemofagocítico y la septicemia por AVL de la familia *Leptomyxidae* en una niña de 9 años con antecedente de haber nadado mes y medio antes en una charca contaminada con aguas negras en Cuernavaca; en 1997 Gallegos aisló AVL patógenas para el hombre en aguas de uso recreativo en San Luis Potosí en donde algunos

organismos pertenecieron a *Naegleria fowleri*; Ramírez *et al.*, 2000a realizaron un estudio microbiológico en el acuífero del Valle del Mezquital, Hgo. en el cual, uno de los puntos importantes fue el determinar la presencia de AVL en el agua subterránea.

Estudio de las AVL en humedales artificiales.

En el año 1991 Rivera y cols. detectaron las AVL aisladas de un humedal en Inglaterra con *Phragmites* encontrando 9 géneros de los cuales *Acanthamoeba* estuvo presente con 5 especies patógenas; en 1993 Ramírez *et al.* estudiaron las amibas presentes en una planta de lodos activados donde encontraron 13 especies y 17 géneros, donde destacaron *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Hartmannella*, que son especies potencialmente patógenas, al mismo tiempo Sánchez y Lugo publicaron un artículo en donde mencionan la importancia de los protozoos (ciliados, flagelados, amibas, etc) en los lechos de raíces, ya que establecen cadenas alimentarias en las cuales regulan las poblaciones de bacterias; así mismo Bonilla y Ramírez en el mismo año publican que las AVL se están bien representados en distintas condiciones climáticas (tropical y subtropical) en el MZR; en 1995b Rivera *et al.* comprobaron que el MZR era eficiente para la remoción de organismos patógenos como amibas y helmintos en regiones tropicales y subtropicales del país; y Ramírez y colaboradores en el 2000b aislaron y observaron el grado de remoción de AVL en sistemas de tratamiento de agua residual doméstica por el MZR con *Phragmites* sp. y *Typha* sp. en zonas rurales del país.

Dado el incremento en la contaminación de cuerpos de agua y por ello la búsqueda e implantación de procesos para reducir la materia orgánica que afecta a las aguas dulces, así como la capacidad del Método de la Zona de la Raíz para la eliminación de organismos patógenos entre ellos las amibas desnudas, es necesario incrementar los estudios sobre estos organismos, así como también dar a conocer a la población en general la importancia de ellos, además de crear en la gente la cultura del tratamiento del agua residual.

OBJETIVOS

GENERALES:

1. Determinar las amibas de vida libre presentes en dos humedales artificiales con flujo subsuperficial que se utilizan para tratar agua residual doméstica.
2. Determinar el grado de eliminación de amibas de vida libre en dos sistemas de humedales artificiales.
3. Comparar dos sistemas de humedales artificiales con diferentes pretratamientos, en cuanto a la presencia de amibas de vida libre

PARTICULARES:

- a. Aislar y cultivar las amibas de vida libre de los dos humedales artificiales
- b. Identificar morfológicamente las amibas de vida libre aisladas de los humedales
- c. Establecer la presencia de las amibas a lo largo del periodo de estudio
- d. Determinar los parámetros físico-químicos y bacteriológicos siguientes: temperatura, pH, oxígeno disuelto, DBO₅, DQO, sólidos totales, suspendidos y disueltos, coliformes totales y fecales.
- e. Relacionar los parámetros bacteriológicos, físicos y químicos con la presencia de amibas de vida libre
- f. Determinar cual sistema de humedales es más eficiente en la remoción de AVL

ÁREA DE ESTUDIO

El estudio se realizó en dos sistemas de tratamiento. Uno se localiza en el poblado de Santa María Estado de México y el otro en el pueblo de Santa Matilde, en el estado de Hidalgo.

El poblado de Santa María se localiza en el municipio de Chapa de Mota, Edo. de México (fig. 2), se encuentra dentro de las siguientes coordenadas: Longitud 98° 46' y Latitud 19° 57', tiene clima templado subhúmedo con lluvias en verano, la precipitación pluvial anual promedio es de 1000 mm, la temperatura media anual oscila de lo 16 a los 18 °C. Presenta vegetación de tipo pastizal y la agricultura es de temporal.

La comunidad de Santa Matilde se encuentra dentro del municipio de Pachuca (fig. 3) en el estado de Hidalgo, se localiza en las coordenadas Longitud $98^{\circ} 44' 09''$ y Latitud $20^{\circ} 08' 21''$, con un clima semiseco templado, presenta una precipitación de 387mm promedio anual, una temperatura promedio de 14°C . La vegetación es de tipo matorral, pastizal y la agricultura es de riego, INEGI 2001.



Figura 2. Ubicación del Municipio de Chapa de Mota en el Estado de México.



Figura 3. Ubicación del municipio de Pachuca en el estado de Hidalgo.

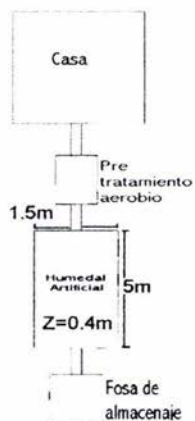


Figura 4. Esquema del humedal artificial del tipo MZR, localizado en Santa María, Chapa de Mota

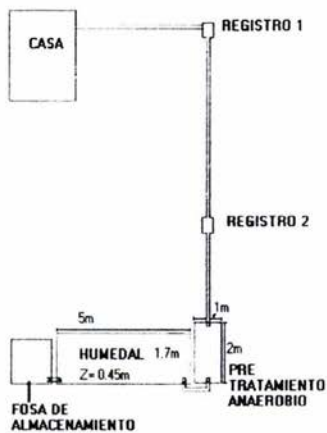


Fig. 5 Esquema del humedal tipo MZR localizado en Santa Matilde Hidalgo

MATERIAL Y MÉTODOS



Muestreo

IZT.

Los muestreos se realizaron mensualmente durante doce meses (figura 6). Se colectaron muestras de agua residual de 2 zonas en cada sistema: la zona de entrada o afluente y la zona de salida o efluente. Se tomaron dos tipos de muestras, las biológicas y las fisicoquímicas. La muestra para la determinación de las amibas se tomó en frascos ámbar de 250 ml, previamente esterilizados a 15 libras de presión por 15 min. La muestra se transportó al laboratorio a temperatura ambiente para su análisis inmediato. *In situ* se midieron algunos parámetros físicos y químicos como: temperatura (termómetro de mercurio Yoshino KEIKI CO de 10°C a 110°C), pH (potenciómetro HANNA Instruments HI 8314) y oxígeno disuelto (oxímetro YSI mod. 51B), y en el laboratorio se analizaron DBO₅, DQO, Sólidos totales, suspendidos y disueltos, coliformes totales y fecales (A.P.H.A., 1985).

Aislamiento y Cultivo

Las muestras biológicas (entrada y salida) se agitaron perfectamente y se tomó una alícuota de 50 ml, la cual se centrifugó (centrífuga marca Beckman modelo TJ-6) a 1200 g durante 15 minutos de donde se obtuvo un sedimento que se inoculó repartiéndolo en 5 gotas separadas en cajas Petri con medio de agar no nutritivo sembrado previamente con *Enterobacter aerogenes* (NNE) (ver anexo). Las cajas se incubaron a 3 distintas temperaturas (22°C, 30°C y 37°C), para tratar de obtener el mayor número de aislamientos y establecer la temperatura en que se presenta el mayor crecimiento. Las placas se observaron por medio de un invertoscopio (marca Zeiss a 10x y 20x) para detectar el crecimiento amebiano a las 48 horas de incubación y después cada 24 hrs hasta completar una semana para detectar el crecimiento de las amibas. Las amebas presentes se resembraron en nuevas placas de NNE para su aislamiento, para ello se tomó un cuadro de 1 cm²

aproximadamente de los cultivos originales, preferentemente con las amibas en estado trófico y se colocó de manera que las amibas estuvieran en contacto con el medio fresco. El manejo de las muestras se llevó a cabo con materiales previamente esterilizados y en una campana de flujo laminar.

Identificación

Las amibas aisladas se identificaron tomando en cuenta las características morfológicas de las formas trófica y quística; así como la temperatura de crecimiento y la prueba de flagelación. Para la observación de las amibas se realizó un lavado con solución salina o agua destilada estéril de las zonas de las placas en donde se detectó crecimiento amibiano, se tomaron unas gotas de esta suspensión y se colocaron en portaobjetos. Las observaciones se realizaron en fresco para poder observar el tipo de pseudópodos y el movimiento de la amiba; se utilizó la técnica microscópica de contraste de fases de un microscopio marca Zeiss a 40x y la determinación se hizo bajo las especificaciones de las claves de Page, (1988).

Prueba de flagelación.

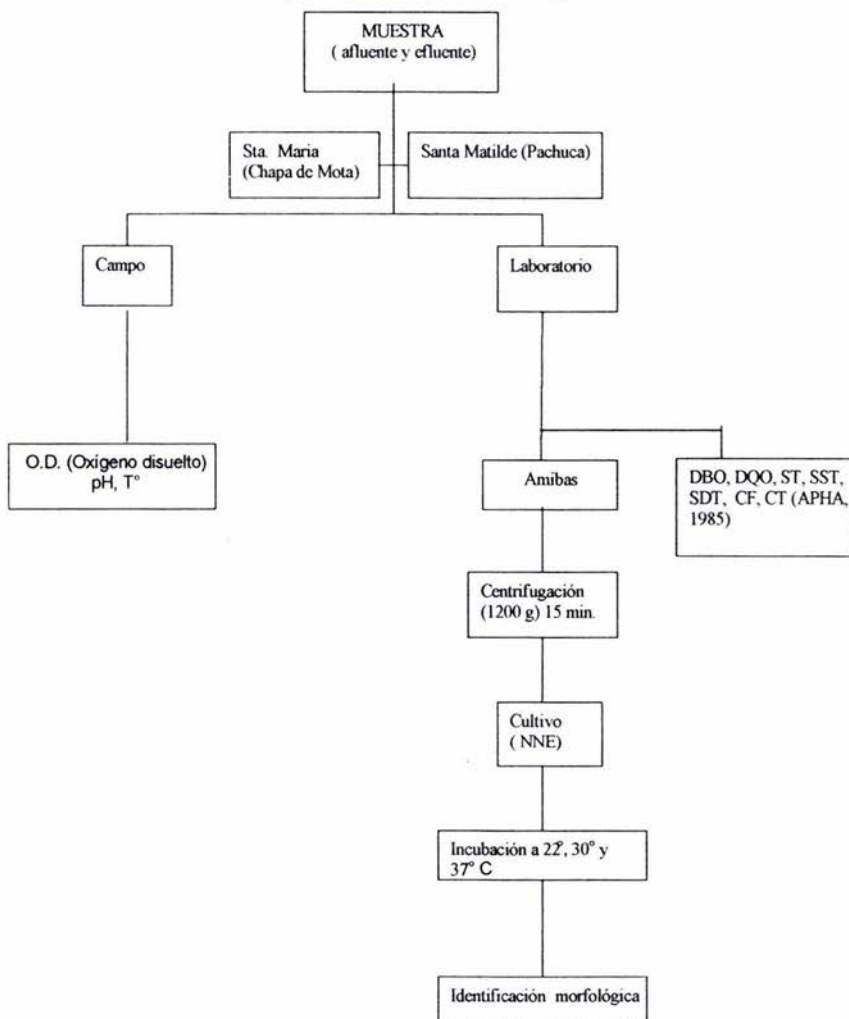
A las amibas de forma limax sospechosas de pertenecer al género *Naegleria* se les realizó esta prueba, la cual consistió en que a una zona bien crecida del cultivo con las amibas en estado de trofozoito se le añadió unas gotas de agua destilada estéril, se mantuvo a temperatura constante de 30 °C y se revisó al invertoscopio a partir de 30 min.

Análisis Estadístico

Se aplicó el método de correlación para determinar la relación entre los parámetros físico químicos con las amibas aisladas de los sistemas de tratamiento. Para contrastar las dos estaciones de

muestreo, así como para la comparación entre ambos sistemas se utilizará la t de Student, para lo anterior se uso el programa Statistic graphics V 5.0 1991.

Fig. 6. Diagrama de flujo de la metodología



Resultados y Discusión

Amibas de vida libre

Los datos que se obtuvieron de cada sistema fueron los siguientes:

En Santa Matilde Hgo. (Tabla 1 y 4) se obtuvieron un total de 32 especies en 236 aislamientos, los cuales pertenecieron a 12 géneros. Para Chapa de Mota Edo. de Méx. el número de aislamientos fue de 83, así como también las especies a 20 con tan solo 9 géneros (Tabla 2 y 3). La diversidad presentada en el sistema de Matilde pudo ser debida en parte a que recibía flujo constante y una mayor carga orgánica, también al hecho de que parámetros como el pH y la temperatura registraron variaciones en el sistema de Chapa de Mota y no así en el sistema de Matilde que se mantuvo estable, y aunque es cierto que las amibas resisten un amplio rango de temperaturas y pH (Bonilla y Ramírez, 1993), el hecho de que existieran variaciones cada mes posiblemente no permitió la existencia de un mayor número de especies.

En el sistema de Matilde el género *Acanthamoeba* fue el que estuvo representado en mayor grado con 88 aislamientos en la entrada (Tabla 1) distribuidos en 10 especies (Tabla 4), y en la salida las especies que tuvieron mayor presencia fueron *Mayorella* y *Vannella* con 24 y 19 aislamientos respectivamente, especies que no han sido reportadas como patógenas para el hombre, lo que da un indicio de buen funcionamiento en la remoción de organismos patógenos de este tipo. Es posible que la predominancia de *Acanthamoeba* en la entrada se debiera a que estos organismos presentan en su quiste celulosa, la cual le confiere una gran resistencia a condiciones ambientales variables las cuales se presentaron en este punto del sistema (Page, 1988).

El número de aislamientos por géneros encontrados en el sistema de Chapa se ilustran en la Tabla 2 donde el género con un mayor número de aislados en la entrada fue *Hartmannella* con 14

aislamientos y 3 especies, en salida fue el género *Vannella* con 15 aislamientos y 7 especies. En ambos sistemas se aislaron los siguientes géneros considerados como potencialmente patógenos: *Acanthamoeba*, y *Hartmannella* (Centeno *et al*, 1996; Martínez y Visvesvara, 1997). El otro género patógeno *Naegleria* se aisló en 2 ocasiones, tanto para entrada como para salida, esto para el sistema de Matilde, para el sistema de Chapa se aisló una vez en entrada y no se detectó en la salida.

Tabla 1. Número de aislamientos ambientales del sistema de Matilde y porcentaje relativo a cada género

Género	Entrada		Salida	
	No de aislamientos	% de aparición	No de aislamientos	% de aparición
<i>Acanthamoeba</i>	88	67.2	6	5.7
<i>Dactylamoeba</i>	6	4.7	5	4.8
<i>Echinamoeba</i>	1	0.8	0	0
<i>Guttulinopsis</i>	4	3	3	2.8
<i>Hartmannella</i>	10	7.6	13	12.4
<i>Mayorella</i>	10	7.6	24	18.3
<i>Naegleria</i>	2	1.5	2	1.9
<i>Platyamoeba</i>	5	3.8	13	12.4
<i>Rosculus</i>	0	0	2	1.9
<i>Techamoeba</i>	1	0.8	0	0
<i>Vahlkampfia</i>	1	0.8	8	7.6
<i>Vannella</i>	3	2.3	19	18.1
Total	131	99.6	105	99.4

Tabla 2. Número de aislamientos ambientales del sistema de Chapa y porcentaje relativo a cada género

Género	Entrada		Salida	
	No de aislamientos	% de aparición	No de aislamientos	% de aparición
<i>Acanthamoeba</i>	7	15.5	2	5.2
<i>Dactyloameba</i>	1	2.2	0	0
<i>Hartmannella</i>	14	31.1	5	12.8
<i>Mayorella</i>	6	13.3	5	12.8
<i>Naegleria</i>	1	2.2	0	0
<i>Platyamoeba</i>	5	11.1	4	10.2
<i>Rosculus</i>	0	0	1	2.6

<i>Vahlkampfia</i>	4	8.9	6	15.8
<i>Vannella</i>	7	15.5	15	39.5
Total	45	99.8	38	99.9

Con respecto a la remoción de amibas para cada sistema se observó lo siguiente: en el sistema del poblado de Chapa no se presentaron diferencias significativas (Tabla 5) ya que mientras en entrada hubo 45 aislamientos, en salida fueron 38 (15.6% de eliminación); y para Matilde con un total de 131 aislamientos en entrada, y en salida 105 (20% de eliminación), esto apoyado mediante el análisis de t de Student con un 95% de nivel de confianza.

En la tabla 2 se observa que los géneros que predominaron en Chapa de Mota fueron *Hartmannella* 32%, *Vannella* 16% y *Acanthamoeba* 16% en la entrada y la salida *Vannella* 39.5% *Mayorella* 13% y *Hartmannella* 13%. Para Matilde *Acanthamoeba* 67.2%, *Mayorella* 7.6% y *Hartmannella* 7.6% predominaron en entrada y en la salida *Mayorella* 18.3%, *Vannella* 18.1% *Hartmannella* 12.4% y (Tabla 1).

Las especies para cada sistema (Matilde y Chapa de Mota) se enlistan en las tablas 3 y 4, en donde se puede ver que en ambos estuvieron presentes especies de los géneros potencialmente patógenos como *Acanthamoeba*, por otro lado el género *Naegleria* sólo se presentó en al menos en una ocasión en cada sistema. En el caso de *Acanthamoeba* la presencia de la misma en la salida de los sistemas fue mínima con valores de 5.7% y 5.2% para Matilde y Chapa, respectivamente, lo que indica que el sistema está funcionando adecuadamente en la remoción de este género patógeno del efluente.

Tabla 3: Especies amibianas encontradas en Chapa de Mota

ESPECIE	E	S	ESPECIE	E	S
<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	x	x	<i>Platyamoeba placida</i>	x	x
<i>Acanthamoeba mauritaniensis</i>	x	0	<i>Rosculus ithacus</i>	0	x
<i>Acanthamoeba palestinensis</i>	x	0	<i>Vahlkampfia aberdonica</i>	x	x
<i>Dactylamoeba stella</i>	x	0	<i>Vahlkampfia avara</i>	x	x
<i>Hartmannella cantabrigiensis</i>	x	x	<i>Vahlkampfia enterica</i>	x	x
<i>Hartmannella vermiformis</i>	x	x	<i>Vannella cirrifera</i>	x	x
<i>Hartmannella sp.</i>	x	0	<i>Vannella lata</i>	0	x
<i>Mayorella microeruca</i>	x	x	<i>Vannella platypodia</i>	0	x
<i>Mayorella penardi</i>	x	x	<i>Vannella simplex</i>	x	x
<i>Mayorella spatula</i>	x	x	x= presente 0=ausente		
<i>Naegleria sp</i>	x	0			

Tabla 4: Especies amibianas encontradas en Santa Matilde

Especie	E	S	Especie	E	S
<i>A astronyxis</i>	x	0	<i>Hartmannella sp</i>	x	0
<i>A castellanii</i>	x	0	<i>H cantabrigiensis</i>	0	x
<i>A comandoni</i>	x	0	<i>H vermiformis</i>	x	x
<i>A cultbertsoni</i>	x	0	<i>M microeruca</i>	x	0
<i>A griffini</i>	x	0	<i>M spatula</i>	x	x
<i>A mauritaniensis</i>	x	x	<i>Naegleria sp</i>	x	x
<i>A palestinensis</i>	x	0	<i>Platyamoeba placida</i>	x	x
<i>A polyphaga</i>	x	0	<i>Platyamoeba stenopodia</i>	x	0
<i>Acanthamoeba sp</i>	0	x	<i>Rosculus ithacus</i>	0	x
<i>A triangularis</i>	x	0	<i>Techamoeba sp</i>	x	0
<i>A tubiashi</i>	x	0	<i>Vahlkampfia aberdonica</i>	0	x
<i>D bulla</i>	x	x	<i>Vahlkampfia enterica</i>	x	x
<i>Dactylamoeba sp</i>	x	x	<i>Vannella cirrifera</i>	0	x
<i>D stella</i>	x	x	<i>Vannella platypodia</i>	0	x
<i>Echinamoeba sp</i>	x	0	<i>Vannella simplex</i>	x	0
<i>G nivea</i>	x	x	x= presente 0=ausente		
<i>Guttulinopsis sp</i>	0	x			

El número de aislamientos durante el periodo de estudio fue mayor en el sistema de Matilde (Tabla 5) donde se aislaron en promedio en entrada 11 y en salida 9. Para el caso de Chapa en promedio hubo 4 para entrada y 3 para la salida, esto se pudo deber a que el sistema de Matilde tenía un flujo continuo y la carga orgánica era constante, lo que represento alimento para las

amibas, no así el sistema de Chapa el cual tenía un uso mucho menor, por lo que la carga orgánica era baja y no había una fuente de alimento constante para que pudieran desarrollarse las amibas en forma adecuada. (Rivera *et al*, 1986,1991)

La diversidad de amibas en la entrada de los sistemas estuvo representada por géneros como: *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Rosculus* y *Vahlkampfia*; mientras que para la salida se aislaron *Mayorella*, *Dactylamoeba*, *Platyamoeba* y *Guttulinopsis*, éste último junto con *Rosculus* son comunes en agua con condiciones de alto grado de contaminación orgánica, además de ser consumidores voraces de bacterias de origen fecal (Bonilla y Ramírez, 1993), lo que apoyó la idea de que la diversidad en Chapa de Mota disminuyó por la baja carga orgánica presente en el sistema, pues sólo fueron aislados en el sistema de Matilde, sin importar que sean de las amibas de vida de libre de tamaño más pequeño (Page, 1988). El género con mayor presencia en Matilde en entrada fue *Acanthamoeba*, y para Chapa fue *Hartmannella*, no obstante que el porcentaje de eliminación fue elevado, con lo que se demuestra la eficacia de estos sistemas para remover amibas potencialmente patógenas, como lo es *Acanthamoeba*.

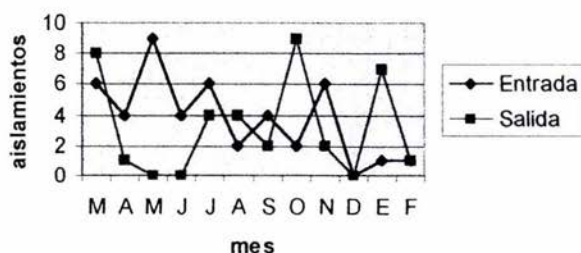
	Matilde			Chapa		
	Entrada	Salida	% de remoción	Entrada	Salida	% de remoción
Mar-00	3	1	66.6	6	8	+
Abr-00	7	2	71.5	4	1	75
May-00	8	6	25	9	0	100
Jun-00	12	10	16.7	4	0	100
Jul-00	8	8	0	6	4	33.4
Ago-00	17	9	47.1	2	4	+
Sep-00	12	12	0	4	2	50
Oct-00	10	12	+	2	9	+
Nov-00	20	19	5	6	2	66.7
Dic-00	16	13	18.8	0	0	0
Ene-01	13	11	15.4	1	7	+
Feb-01	5	2	60	1	1	0
Total	131	105		45	38	
Promedio	11	9		4	3	

La + indica que el valor aumentó en salida con respecto a la entrada

Figura 7 :Aislamientos en el Sistema de Matilde



Figura 8 :Aislamientos en el Sistema de Chapa



A lo largo del periodo de estudio se observó que el mayor número de aislamientos en el sistema de Matilde fue en noviembre (39) diciembre (29) y agosto (26). Mientras que en Chapa fue en Marzo (14), octubre (11) y julio (10). Esto indica que a pesar de que los sistemas de tratamiento están expuestos a las condiciones ambientales éstas no son determinantes para la distribución de las

amibas a lo largo del año, como sucede en sistemas acuáticos naturales como lagos, en donde la temperatura ambiental es importante para la distribución de las amibas habiendo una mayor frecuencia en los meses cálidos (fig. 7 y 8).

Parámetros físico químicos

Las temperaturas registradas en los sistemas (Tabla 6) no representaron un impedimento para el desarrollo de las amibas, ya que estas pueden soportar un amplio intervalo de temperatura que va de los 4°C a temperaturas por encima de los 37°C (Jonckheere, 1981., Bonilla y Ramírez, 1993), aunque cabe aclarar que especies potencialmente patógenas crecen mejor a temperaturas más altas (Rivera *et al*, 1986, Jonckheere, 1981) y esto se puede reflejar en la eliminación de éstas del sistema, las temperaturas más bajas fueron de 13°C (Matilde) y 17°C (Chapa de Mota) y por otro lado la más alta fue de 24.4°C en los dos sistemas.

Con respecto al pH para el sistema de Chapa de Mota (Tabla 6) tuvo un promedio para entrada de 8.2 y para salida de 8.8, para Matilde los promedios fueron de 7.2 y 7.6 respectivamente, se puede notar que el pH de Chapa de Mota, en general es ligeramente básico, el cual se mantuvo relativamente estable por lo cual no fue un factor que impidiera el adecuado desarrollo de las amibas ya que estas pueden soportar pH que van de 3.9 a 9.7 (Bonilla y Ramírez, 1985) dados los valores obtenidos, los dos parámetros anteriores están dentro de los límites óptimos para el desarrollo de la mayoría de las AVL y del adecuado funcionamiento de los sistemas (Sun, *et al* 1998., Rivera *et al*, 1993 a).

En cuanto al oxígeno disuelto (Tabla 6) se observó que en Chapa de Mota hubo una mayor oxigenación que en el sistema de Matilde, lo cual se pudo deber en parte a que el primero de estos sistemas no recibía una carga orgánica constante, con lo cual el oxígeno presente en el sistema era más rápidamente renovado que en el de Matilde, en el que casi no hubo cambio en la concentración del oxígeno en la salida. La carga orgánica recibida por este sistema era durante

toda la semana sometiendo al sistema a un trabajo más intenso, en el que el poco oxígeno se ocupaba inmediatamente, además de que el pretratamiento de Chapa de Mota es de tipo aerobio. (Curds *et al* ,1995, Robles *et al* , 1993) lo que le confiere cierta oxigenación al agua de desecho antes de pasar al humedal. La concentración de oxígeno registrada en los sistemas no fue impedimento para el adecuado desarrollo de las amibas las cuales toleran concentraciones bajas de oxígeno, aunque no toleran la falta de este, cabe la aclaración de que la resistencia a condiciones adversas por parte de las amibas se debe a la formación de quistes. (Bonilla y Ramírez, 1993).

Tabla 6: Parámetros medidos *in situ* en los 2 sistemas de humedales artificiales

	Chapa						Matilde					
	Entrada			Salida			Entrada			Salida		
	T°C	pH	OD mg/l	T°C	pH	OD mg/l	T°C	pH	OD mg/l	T°C	pH	OD mg/l
Mar-00	22.4	8.63	1.8	22.4	8.43	3.1	24.4	7.45	0.6	24.4	7.77	0.6
abril	13	8.2	1	16	9.01	5	24.4	7.26	1.2	24.4	7.65	1.6
mayo	19	9.59	9	19	10.1	10.8	24.4	7.6	1.2	24	7.6	1.2
junio	15	7.75	1	17	9	8.2	24.4	7.38	0.4	24.4	7.64	1.8
julio	15	7.75	1	17	9	8.2	24.4	7.16	0.8	24.4	7.76	0.8
agosto	24	8.59	1	18	9.21	6.7	24.4	7.4	0.7	24.4	7.8	0.8
septiembre	20	7.87	nd	22	9.43	nd	24.4	7	0.8	24.4	7.27	0.8
octubre	nd	nd	nd	nd	nd	nd	20	nd	0.2	17	Nd	0.8
noviembre	24.4	7.64	2.2	24.4	7.39	5.6	24.4	6.7	0.4	24.4	7.27	0.4
diciembre	nd	nd	nd	nd	nd	nd	24.4	6.78	0.2	24.4	6.94	0.2
Enero-01	19	8.2	2	22	8.1	6	19	7.71	1	14	8.4	1.2
febrero	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PROMEDIO	19	8.2	2.38	20	8.9	6.70	24	7.2	0.68	23	7.6	0.93

(nd no se determino)

En cuanto a la DBO (Tabla 7) el porcentaje de remoción para la DBO (Figura 9) estuvo en promedio en un 68% para el sistema de Chapa y en un 55% para el de Matilde, en cuanto a este parámetro la remoción se puede considerar buena (remoción superior al 50% en ambos casos), sin llegar a ser lo óptimo si se compara con otros trabajos como el de Vymazal (1998 a) que obtuvo valores del 81% en la República Checa, la cual, tiene clima más frío que el de los lugares de estudio, con lo cual se hubiera esperado que la remoción fuera mayor en nuestra zona de estudio, esto puede ser explicado por que probablemente exista algún tipo de falla en el diseño de los sistemas y estos no remuevan los valores esperados para el tipo de clima en el país; cabe esperar que con el transcurso del tiempo aumente la remoción en los mismos (Robles *et al.*, 1993). La remoción presentada por los sistemas (Figura 9) fue relativamente menor a lo encontrado en otros trabajos como en el de Rivera *et al.* (1997) donde obtuvo una remoción mayor al 88% y Perdomo *et al.* (1998) que encontró una remoción superior al 80%, así como el trabajo de Nyakang y Bruggen (1998) que encontró una remoción del 93%, aunque en el trabajo realizado por Philippi *et al.*, en 1998 encontró una remoción del 69%, la cual es más cercano a los valores encontrados.



DBO mg/L	Chapa		Matilde	
	ENTRADA	SALIDA	ENTRADA	SALIDA
Mar-00	64.8	114	622	259
abril	182	134	1275	289
mayo	73	42	347	181
junio	76	12	501	279
julio	96	30	605	252
agosto	593	42	509	217
septiembre	376	60	535	228
octubre	157	170	474	241
noviembre	159	30	535	205
diciembre	61	31	437	236
enero	286	60	598	237
febrero	129	44	450	232
PROMEDIO	188	64	574	238

Los resultados de DQO para Chapa en la entrada se obtuvo un promedio de 712mg/L y de 620mg/L para salida en el caso de Matilde los valores fueron de 2856mg/L para entrada y de 558mg/L para la salida (Tabla 8). En el Figura 9 se muestra el porcentaje de remoción para la DQO donde para el sistema de Chapa se obtuvo en promedio una remoción del 60%, y del 70% para el sistema de Matilde, siendo en este ultimo lugar mayor la remoción, y tomando en cuenta que en entrada es mayor la DQO es mayor en este lugar la remoción es más eficiente que en Chapa de Mota. Al comparar los resultados obtenidos con otros estudios realizados se encontró que en el realizado por Mandi en 1994 hubo una remoción del 95%, el de Rivera *et al* que en 1997 obtuvieron una remoción del 87%, y lo realizado por Robles *et al* en 1993 donde indican valores de 45% en una planta en San Luis Potosí, lo que nos indica que los valores obtenidos en los sistemas se encuentran dentro de los valores de remoción aceptables.

Figura 10: Remoción de la Demanda Química de Oxígeno en ambos sistemas de tratamiento

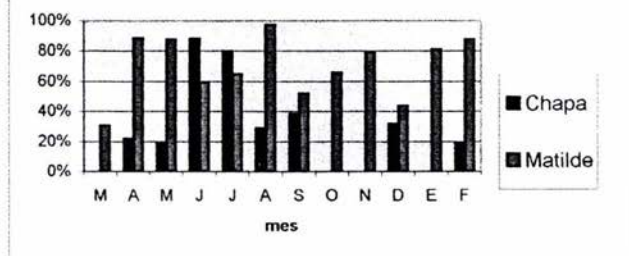


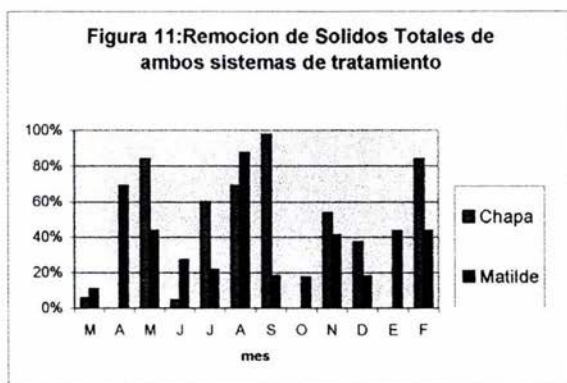
Tabla 8: DQO en los 2 sistemas de humedales artificiales

DQO mg/L	Chapa		Matilde	
	ENTRADA	SALIDA	ENTRADA	SALIDA
Mar-00	380	446	2480	1720
Abril	701	547	4186	480
Mayo	564	455	3564	436
Junio	180	21	1158	469
Julio	196	39	1028	361
Agosto	3041	2250	10624	308
Septiembre	1093	672	1275	613
Octubre	553	1265	1363	464
Noviembre	676	129	1791	372
Diciembre	296	201	1146	642
Enero	295	962	2096	397
Febrero	564	455	3564	436
PROMEDIO	712	620	2856	558

De la remoción presentada en la DBO y la DQO fue mayor para Chapa de Mota ya que el hecho de tener un pretratamiento aerobio le da ventaja sobre el sistema de Matilde que presenta un pretratamiento anaerobio (Rivera *et al*, 1997) ya que para Chapa de Mota la carga era intermitente y continua para Matilde.

ST mg/L	Chapa		Matilde	
	ENTRADA	SALIDA	ENTRADA	SALIDA
Mar-00	1070	1008	1288	1150
Abril	12336	14940	3108	968
Mayo	2736	440	1896	1068
Junio	176	168	1236	900
Julio	794	316	1216	950
Agosto	1388	428	6193	772
Septiembre	1372	31	1276	1044
octubre	1132	3680	1436	1188
noviembre	1276	592	2242	1322
diciembre	1046	658	1460	1200
enero	1236	1360	1670	996
febrero	2736	440	1896	1068
PROMEDIO	2275	2005	2076	1052

Los valores obtenidos para los Sólidos Totales (ST) de ambos sistemas se muestran en la tabla 9, en Chapa se obtuvo en promedio 2275 para entrada y 2005 para salida, en el caso de Matilde se obtuvo 2076 para entrada y 1052 para salida. El porcentaje de remoción obtenido (Figura 11) en Chapa de Mota fue de 41% en promedio y para Matilde un promedio de 37%. Al comparar los resultados obtenidos con otros trabajos, encontramos que, en el trabajo realizado por Philippi *et al* en 1998, en Brasil, se encontró valores en salida de 590 mg/l, y tomando en cuenta el último mes de cada sistema se observa que el sistema de Chapa fue menor, no así en el de Matilde, el cual es casi el doble.



Los valores observados de los sólidos suspendidos totales (SST) para el sistema de Chapa fueron en promedio 329 para entrada y 636 (este valor es mayor debido a que en dos muestreos en dos ocasiones los valores se dispararon) para salida, para Matilde los valores fueron 1060 para entrada y 159 para salida (Tabla 10). El porcentaje de remoción para Chapa (Figura 12) fue de 48% y para el sistema de Matilde fue en promedio un 78%. Los valores obtenidos que son altos nos indican que el sistema presenta una buena remoción de este tipo de materia; esto puede ser debido a que la grava que sirve de sustrato así como el sistema radicular de las hidrofitas retienen los sólidos suspendidos (medios físicos) permitiendo que los microorganismos actúen sobre estos, disminuyendo su concentración en el sistema (Brix, 1994., Vincent, 1994). Comparando la remoción obtenida con otros estudios realizados se encontró que Perdomo *et al* en 1998 encontraron una remoción del 40% (409 mg/L); otro trabajo realizado por Kantawanichkul y Thi en 1998 en Tailandia encontraron una remoción entre el 60 y el 70% (40 mg/L) y comparado con la remoción obtenida se obtuvieron buenos resultados.

SST mg/L	Chapa		Matilde	
	ENTRADA	SALIDA	ENTRADA	SALIDA
Mar-00	520	510	420	1205
abril	580	700	2133	64
mayo	411	68	528	76
junio	33	4	204	56
julio	355	30	152	19
agosto	525	54	6167	38
septiembre	250	2510	280	90
octubre	56	2750	372	46
noviembre	204	46	1100	102
diciembre	336	122	372	96
enero	268	764	460	38
febrero	411	68	528	76
PROMEDIO	329	636	1060	159

Figura 12:Remocion de Solidos Suspendidos Totales en ambos sistemas de tratamiento

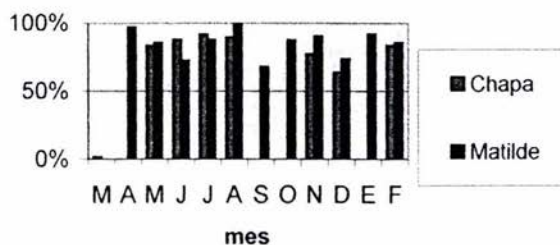
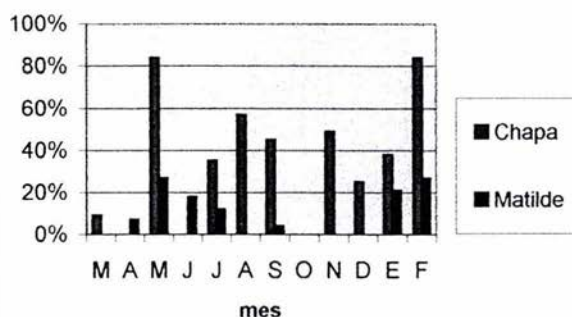


Figura 13:Remocion de Solidos Disueltos Totales en ambos sistemas de tratamiento



Los valores promedio para sólidos disueltos totales (SDT) (Tabla 11) en para Chapa y Matilde fueron en general para entrada superiores que para la salida. Para el sistema de Matilde los valores fueron de 1017 para entrada y de 984 para salida. El porcentaje de remoción para el sistema de Chapa de Mota fue de 36% y para el de Matilde fue de 10% (Figura 13) mostrando que a comparación de los sólidos suspendidos, los sólidos disueltos presentan una menor remoción, esta materia, que es materia en disolución, tal vez no esta siendo utilizada por las plantas y

organismos para su desarrollo, esto puede ser debido a una falta de cuidado en las plantas (hojas), las cuales es preferible eliminar a aquellas que sean viejas esto con el fin de promover el crecimiento de las hojas jóvenes que requerirán de los SDT para crecer (Brix, 1994).

Tabla 11:SDT de los 2 sistemas de humedales artificiales

SDT mg/L	Chapa		Matilde	
	ENTRADA	SALIDA	ENTRADA	SALIDA
Mar-00	550	498	868	1030
Abril	11756	14240	975	904
Mayo	2325	372	1368	992
Junio	143	164	1032	844
Julio	439	286	1064	931
Agosto	863	374	26.7	734
Septiembre	1122	622	996	954
Octubre	1076	930	1064	1142
Noviembre	1072	546	1142	1220
Diciembre	710	536	1088	1104
Enero	968	596	1210	958
Febrero	2324.8	372	1368	992
PROMEDIO	1946	1628	1017	984

Parámetros bacteriológicos

Los coliformes totales son bacterias que pueden indicar la presencia de bacterias patógenas, por lo que su determinación es importante (Manual de tratamiento de aguas negras, 1964). Los valores presentados para estas bacterias en el sistema de Chapa se contabilizaron $2.1E+12$ para entrada y $3.7E+06$ para la salida, mientras que para Matilde los valores fueron de $2E+19$ para entrada y de $2.1E+18$ para la salida (Tabla 12). La remoción obtenida para CT se ilustra en la gráfica 14 y se observa que en Chapa la remoción fue más constante que en Matilde con lo que el sistema funcionó mejor en Chapa de Mota para la remoción de CT.

Los valores comúnmente encontrados para CT van de $7.9E+6$ a $2.4E+8$ encontrándonos en este caso que Chapa de Mota quedó dentro de los límites y Matilde no. Se concluye que este sistema no funciona adecuadamente en la remoción de coliformes (Rivera *et al*, 1997). Además, en otros trabajos realizados como el de Kantawanichkul *et al*, en 1998 en Tailandia encontraron valores de

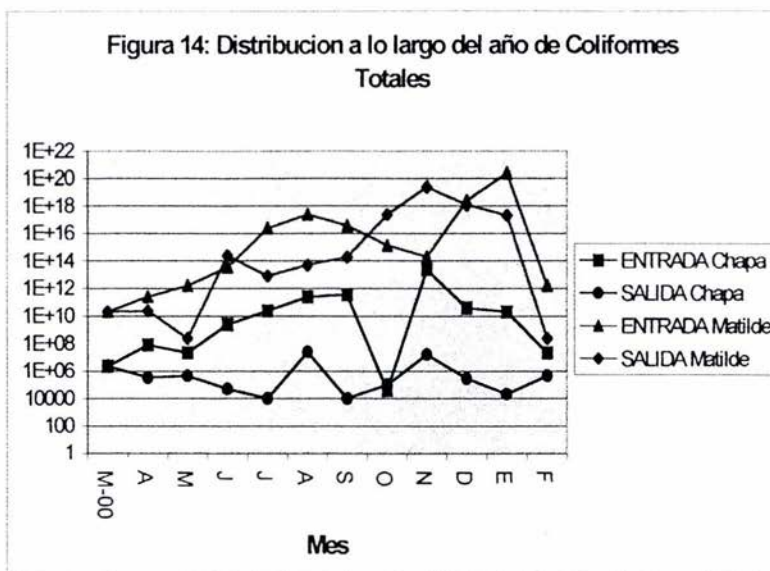
100 ufc/100ml y en el trabajo de Laber *et al* en 1998 en Nepal encontraron una remoción mayor al 90%, por lo que los valores obtenidos en el presente trabajo son extremadamente altos.

En cuanto a la distribución de coliformes totales a lo largo del año, se encontró que para Chapa el mayor número se encontró en los meses de noviembre, septiembre y agosto y para el sistema de Matilde fue en los meses de enero diciembre y agosto, para los coliformes fecales en Chapa fue en noviembre, agosto y septiembre y para Matilde los meses de enero, diciembre y julio

Tabla 12. Coliformes Totales en los 2 sistemas de humedales artificiales

u.f.c/100ml	Chapa			Matilde		
	ENTRADA	SALIDA	REMOCIÓN	ENTRADA	SALIDA	REMOCIÓN
Mar-00	2.2E+06	2.4E+06	0 ulog	2E+10	2E+10	0
abril	7.9E+07	3.3E+05	2 ulog	2E+11	2E+10	1 ulog
mayo	2.1E+07	4.3E+05	2 ulog	2E+12	2E+08	4 ulog
junio	2.4E+09	5.0E+04	5 ulog	4E+13	2E+14	+
julio	2.4E+10	1.0E+04	6 ulog	2E+16	8E+12	4 ulog
agosto	2.4E+11	2.4E+07	4 ulog	2E+17	5E+13	4 ulog
septiembre	3.5E+11	1.0E+04	7 ulog	4E+16	2E+14	2 ulog
octubre	4.0E+04	1.0E+05	+	1E+15	2E+17	+
noviembre	2.4E+13	1.6E+07	6 ulog	2E+14	2E+19	+
diciembre	4.0E+10	2.8E+05	5 ulog	2E+18	1E+18	0
enero	2.0E+10	2.0E+04	6 ulog	2E+20	2E+17	3 ulog
febrero	2.1E+07	4.3E+05	2 ulog	2E+12	2E+08	4 ulog
PROMEDIO	2.1E+12	3.7E+06		2.0E+19	2.1E+18	

En el lugar donde hay + indica que el valor encontrado supera al de entrada



En cuanto a los coliformes fecales (CF) para el sistema de Chapa en entrada se tuvo un promedio de $2.03E+12$ y en salida $2.7E+05$, para Matilde los valores fueron de $2.02E+19$ para entrada y de $5.75E+16$ para la salida (Tabla 13). La Remoción de este tipo de coliformes (Figura 15) es importante ya que están relacionados con la presencia de materia fecal y se obtuvo una remoción de hasta 3 ulog siendo más constante la remoción en Matilde.

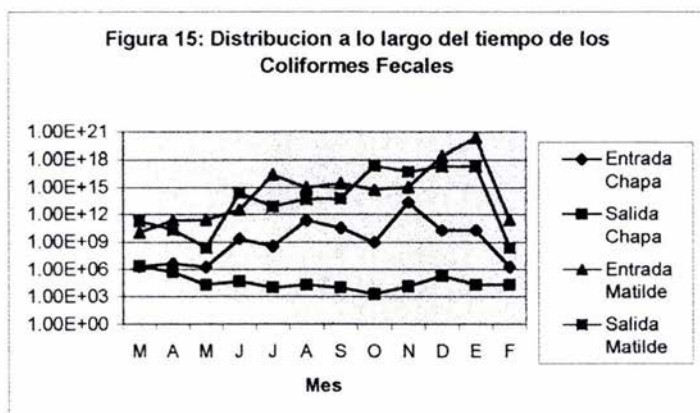
Cabe mencionar que los valores que normalmente se encuentran en aguas de desecho para CF van de 1×10^6 a 5×10^7 por 100ml, los valores encontrados en Chapa de Mota están dentro de ese limite, no así los de Matilde (Rivera *et al*, 1997). La remoción de estas bacterias es importante ya que su presencia en el agua puede indicar un posible riesgo sanitario.

Tabla 13: CF en los 2 sistemas de humedales artificiales

u. f. c/100ml	Chapa			Matilde		
	ENTRADA	SALIDA	REMOCIÓN	ENTRADA	SALIDA	REMOCIÓN
Mar-00	2.2E+06	2.4E+06	0	1.1E+10	2.0E+11	+
abril	4.6E+06	4.9E+05	1 ulog	2.4E+11	2.4E+10	1 ulog
mayo	2.0E+06	2.0E+04	2 ulog	2.8E+11	2.4E+08	3 ulog
junio	2.4E+09	5.0E+04	5 ulog	3.3E+12	2.4E+14	+
julio	3.5E+08	1.0E+04	4 ulog	2.4E+16	8.0E+12	4 ulog
agosto	2.4E+11	2.0E+04	7 ulog	9.0E+14	5.0E+13	1 ulog
septiembre	3.5E+10	1.0E+04	6 ulog	2.8E+15	6.0E+13	2 ulog
octubre	1.0E+09	2.0E+03	6 ulog	5.0E+14	2.4E+17	+
noviembre	2.4E+13	1.3E+04	9 ulog	1.0E+15	5.0E+16	+
diciembre	2.0E+10	1.8E+05	5 ulog	2.4E+18	2.0E+17	1 ulog
enero	2.0E+10	2.0E+04	6 ulog	2.4E+20	2.0E+17	3 ulog
febrero	2.0E+06	2.0E+04	2 ulog	2.8E+11	2.4E+08	3 ulog
PROMEDIO	2.0E+12	2.7E+05		2.0E+19	5.7E+16	

En el lugar donde hay + indica que el valor encontrado supera al de entrada

Figura 15: Distribución a lo largo del tiempo de los Coliformes Fecales



IZT.

En lo que respecta a la relación existente entre los parámetros medidos y la presencia de las amibas, se encontró mediante el análisis de correlación realizado, que en el sistema de Matilde existe una correlación significativa entre las amibas y los CF ($r = 0.72$ $p < 0.1$) y con los CT ($r = 0.64$ $p < 0.1$), esto se debe a que los coliformes representan comida para las amibas y los sólidos son materia orgánica de la cual se alimentan las bacterias, además de que sirven de sustrato para que se fijen las amibas (Bonilla y Ramírez, 1993); una correlación significativa inversa con el pH ($r = -0.53$ $p < 0.1$), lo cual indica que a mayor pH menor sería la cantidad de amibas

presentes en el sistema (Brix, 1994). Para el sistema de Chapa hubo una mayor relación entre amibas y DBO ($r = 0.32$ $p < 0.1$), DQO ($r = 0.35$ $p < 0.1$) y SST ($r = 0.40$ $p < 0.1$), lo cual puede ser debido a que estos dos parámetros representan materia orgánica que sirve como alimento y substrato para las amebas.

Se estableció la diferencia entre entrada y salida de los sistemas para los parámetros físico químicos encontrando que para el sistema de Chapa de Mota, el OD y la DBO tuvieron diferencia entre lo que hubo en entrada y salida, para el sistema de Matilde el pH, DQO, DBO, y ST.

En cuanto a la remoción presentada en ambos sistemas, de acuerdo a los análisis estadísticos realizados (prueba de t de Student con 90% de confianza) se encontró que la remoción presentada en cada uno de los sistemas en cuanto a entrada y salida no presentaban una clara diferencia, pero en un análisis más a fondo y tomando en cuenta los géneros patógenos aislados se puede ver que géneros como *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Hartmannella* son removidos en promedio en un 70% de los sistemas, por otra parte en cuanto a la comparación de la eficacia en la remoción entre los dos sistemas se encontró que no existía diferencia significativa alguna entre estos dos sistemas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- ◊ Las Amibas de Vida Libre estuvieron presentes en los dos sistemas de tratamiento de agua residual, obteniéndose un total de 319 aislamientos, pertenecientes a 12 géneros y 25 especies.
- ◊ De las amibas aisladas se detectaron 13 especies que pertenecen a los géneros de amibas potencialmente patógenas para el hombre.
- ◊ Las especies potencialmente patógenas fueron eliminadas de los sistemas en un 95% para *Acanthamoeba* tanto para Matilde y Chapa de Mota respectivamente.
- ◊ La diversidad y número de amibas fue mayor en Matilde debido a que la carga orgánica fue más continua para éste sistema.
- ◊ Los parámetros físico-químicos no fueron determinantes para la presencia de las amibas.
- ◊ Los porcentajes de remoción para la DBO fue del 55 % y un 72 % para Matilde y Chapa de Mota respectivamente.
- ◊ El resultado del análisis bacteriológico indica que el agua resultante de los dos sistemas no tiene una buena calidad para ser de contacto humano, esto conforme a la norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996.

ANEXO

Composición del medio NNE con *Enterobacter aerogenes*

Compuesto	Cantidad
Cloruro de sodio	0.12 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.004 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.004 g
Na ₂ HPO ₄ Dibásico anhidro	0.142 g
KH ₂ PO ₄ Monobásico	0.136 g
CaCO ₃	0.10 g
Agar bacteriológico	15 g
H ₂ O destilada	1000 ml

Mezclar en seco todos los ingredientes, agregar 500ml de agua destilada y disolver, completar el volumen de 1000ml y hervir hasta que el agar se disuelva por completo. Esterilizar a 121°C durante 20min. Se vierten 20ml 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 min, distribuyendo la suspensión de bacteria sobre la superficie del agar. Las cajas se guardan en el refrigerador

Figura 16



Figura 18



Figura 16.- Toma de parámetros físico-químicos en el sistema de Santa Matilde, en Pachuca Hidalgo

Figura 17.- Vista completa del sistema en Pachuca Hidalgo, en donde se aprecia el lecho de carrizos y la fosa de almacenamiento

Figura 18.- Plantación de árboles frutales regada con el agua que sale del sistema de tratamiento de Santa Matilde, en Pachuca Hidalgo

LITERATURA CITADA

Álvarez, F., Méndez de la Rosa, R., Rivera, F., Ramírez, E., y Bonilla, P. 1995. Síndrome hemofagocítico relacionado con septicemia por amibas de vida libre de la familia Leptomyxidae. *Rev. Salud Distr. Fed.* **3**(5y6): 93-95.

Anderson, O.R., 1997. Annual abundances, diversity and growth of gymnamoebae in a shallow freshwater pond. *J.Euk. Microbiol.* **5** (44): 393-398.

Ansola, G. G., González, J., Soto, F., Garcia, M., Lopez, G., Radoux, M., Cadelli, D., y Luis, E. 1998. Natural integrate systems using constructed wetlands for treating wastewater in northwest Spain. Proceedings-6th International Conference on Wetlands Systems for Water Pollution Control, Brazil, pp 680-687.

A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.F.C. 1985. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, 16th ed.; Washington, 1268 pp.

Avery, S., Harwood, J. L., y Lloyd, D. 1995. Quantification and characterization of phagocytosis in the soil amoeba *Acanthamoeba castellanii* by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(3): 1124-1132.

Biagi, F. 1976. **Enfermedades Parasitarias**. 2^a ed. Ed. Prensa Medica Mexicana. México, pp 376.

Bitton, G. 1999. **Wastewater Microbiology**. 2th ed. Wiley liss. Cánada. 24-26.

Bonilla, P. y Ramírez, E. 1993. Sistemas de tratamiento de lechos de raíces. Las amebas de vida libre. *Inf. Cienc. y Technol.* **15**(203): 22-25.

Breiman, F., Fields, B., Sanden, G., Volmer, L., Meier, A., y Spika, J. 1990. Association of shower use with legionnaires disease. *JAMA* **263** (21):2924-2926.

Brix, H. 1994. Functions of macrophytes in constructed wetlands. *Wat. Sci. Tech.* **29**(4):71-78.

Bonilla, P., Ramírez, E., Ortiz, R., Calderón, A., Gallegos, E., y Hernández, D. 2000. Occurrence of pathogenic and free-living amoebae in aquatic systems of the Huasteca Potosina, Mexico. Munawar, M. Lawrence, S. G. y Malley. In: *Aquatic Ecosystems of Mexico: Status and Scope*. Edited by Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. pp 37-44.

Cable, B. y John, D. 1986. Conditions for maximum enflagellation in *Naegleria fowleri*. *J. Protozool* **33**(4): 467-472.

Centeno, M.; Rivera, F.; Cerva, L.; Tsutsumi, V.; Gallegos, E.; Calderón, A.; Ortiz, R.; Bonilla, P.; Ramírez, E. y Suarez, G. 1996. *Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient with meningoencephalitis and bronchopneumonia. *Archives of Medical Research IMSS* **27**(4): 579-586.

Curds, C. R., Rivera, F., Warren, A., Bonilla, P., Ramírez, E., Gallegos, E., Calderón, A., y Decamp, O. 1994. The treatment of wastewaters in México and the UK by the Root Zone Method. *Memorias. Seminario Internacional del Agua. Contaminación de Cuerpos de Agua Superficiales y Subterráneas por Fuentes no Puntuales, Mazatlán, México.*

Decamp, O. y Warren, A. 1998. Bacterivory in ciliates isolated from constructed wetlands (Reed Beds) used for wastewater treatment. *Wat. Res* **32** (7):1989-1996.

Decamp, O., Rivera, F. y Warren, A. 1993. Removal of Pathogenic Microorganism from wastewater by the Root Zone Method. Technical report by *The Natural History museum of London*.

De Jonckheere, J. F. 1981. Pathogenic and Nonpathogenic *Acanthamoeba* spp. in thermally polluted discharges and surface waters. *J. Protozool.* **28**(1): 56-59.

Departamento de sanidad del estado de NY.1993. **manual de tratamiento de Aguas Negras**. Noriega Editores. México. pp 303

Fujita, M., Mori, K., y Kodera, T. 1998. Nutrient removal and starch production by aquatic plant *Wolffia arrhiza*. Proceedings-6th International Conference on wetlands systems for water pollution control. Brazil. pp 569-576.

Gallegos, N. E. M. 1997. Amibas de Vida Libre Potencialmente Patógenas en Cuerpos de Agua de Uso Recreativo en le Estado de San Luis Potosí. Tesis Doctoral. UNAM. México.

Haberl, R. 1998. Constructed wetlands a chance to solve wastewater problems in developing countries. Proceedings-6th International Conference on wetlands systems for water pollution control. Brazil. pp 72-83.

Hansen, D., Duda, P., Zayed, A., y Terry, N. 1998. Selenium removal by constructed wetlands role of biological volatilization. *Eviron. Sci. Tech.* **32**:591-597.

Hernández, M. D. 1991. Aislamiento de amibas de vida libre a partir de la atmósfera de la Ciudad de México y su área metropolitana. Tesis de Licenciatura. E.N.E.P. Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.

INEGI. 2001, pagina web: www.inegi.gob.mx

Kantawanichkul, S., Pilaila, S., Tanapiyawanich, W., Tikampornpittaya, W y Kamkrua , S.1998. Wastewater treatment by tropical plants in vertical flow constructed wetlands. Proceedings-6th International Conference on wetlands systems for water pollution control. Brazil. pp 640-646.

Kantawanichkul, S y Thi, V. 1998. Ni and Cr removal by aquatic plants. Proceedings-6th International Conference on wetlands systems for water pollution control. Brazil. pp 640-646.

Kyle, D. E., y Noblet, G. P. 1985. Vertical distribution of potentially pathogenic FLA in freshwater lakes. *J Protozool.* **32**(1):99-105.

Laber, J., Haberl, R y Shrestha, R. 1998. Two stage constructed wetland for treating hospital wastewater in Nepal . Proceedings-6th International Conference on wetlands systems for water pollution control. Brazil. pp 90-100

Mandi, L. 1994. Marrakesh wastewater purification experiment using vascular aquatic plants *Eichhornia crassipes* and *Lemna gibba*. *Wat. Sci. Tech.* **29**(4):283-287.

Mara, D., y Cairncross, S. 1990. **Directrices Para el Uso sin Riesgos de Aguas Residuales y Excretas en Agricultura**. OMS. España. pp 26-53.

Matuz, M. D. 2001. Amibas de vida libre aisladas de aguas subterráneas del Valle del Mezquital, Hidalgo México. Tesis de Licenciatura. E.N.E.P. Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.

Martínez, A. J. y Visvesvara, G. S. 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Br. Pathol.* **7**:583-598.

McBrien, M. A., Brocard, D., Henschman, S., y Rogalla, F. 1998. Multiple benefits of treatment wetlands. Proceedings-6th International Conference on wetlands systems for water pollution control. Brazil. pp 343-354.

Moura, H., Wallace, S. y Visvesvara, G. 1992. *Acanthamoeba healy* N. Sp. and the isoenzyme and immunoblot profiles of *Acanthamoeba* spp., Gups I and III. *J. Protozool.* 39(5): 573-583.

Nyakang, J y Bruggen, J. 1998. Combination of a well functioning constructed wetland with a pleasing landscape design in Nairobi, Kenya. Proceedings-6th International Conference on wetlands systems for water pollution control. Brazil. pp 264-275.

Page, F. C. 1988. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. Freshwater Biological Association, Ambleside.

Perdomo, S., Bangueses, C y Fuentes, J. 1998. Potential use of aquatic macrophytes to enhance the treatment of septic tanks liquids. Proceedings-6th International Conference on wetlands systems for water pollution control. Brazil. pp 512-523.

Philippi, L., Costa, R y Sezerino, P. 1998. Domestic effluent treatment through integrated system of septic tank and Root Zone Method. Proceedings-6th International Conference on wetlands systems for water pollution control. Brazil. pp 670-679.

Ramalho, R. S. 1993. **Tratamiento de Aguas Residuales**. Reverte España. pp 8-9.

Ramírez, E, Warren, A., Rivera, F., Bonilla, P., Rodríguez, S., Calderón, A., Ortiz, R. y Gallegos, E. 1993 An investigation of the pathogenic and no pathogenic free-living Amoebae in activated sludge plant. *Wat., air & soil pollut.* 69:135-139.

Ramírez, E., y Bonilla, P. 1995. Epidemiología de las Amebas en México. *Inf. Cienc. y Tecnol.* **17** (220-221): 15-17.

Ramírez, E., 1998. Sistemas de tratamiento de aguas residuales. Memorias del congreso: Hacia una renovación ambiental en México. E.N.E.P. Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. pp 91-96.

Ramírez, F. E., Omaña, M. M., Marcial, Ch. P., Velásquez, E. M., Bonilla, L. P., y Méndez de la Rosa, R. M. 1998. Estudio Epidemiológico de aguas intradomiciliarias como fuente de contaminación de amebas de vida libre. En J. M. Mancilla y Vilaclara, G. (Eds.) Cuadernos de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud, la Educación y el Ambiente. E.N.E.P. Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. Vol. 1:118-126.

Ramírez, E., Campoy, E., Matuz, D., Robles, E., Warren, A., Bonilla, P., Martínez, B., y Ortiz, R. 2000 a. Estudio microbiológico del acuífero del Valle del Mezquital. . *Rev. Lat-amer. Microbiol.* **42**. Suplemento II: 661.

Ramírez, E., Robles, E., Bonilla, P., Gutierrez, A., Ramírez, B., De la Cerda, J. M. y López, M. 2000 b. Amibas de Vida Libre en agua residual doméstica. . *Rev. Lat-amer. Microbiol.* **42**. Suplemento II: 148-149.

Rivera, F. 1977. Estudio monográfico de *Acanthamoeba castellani* y *Acanthamoeba culbertsoni*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM. México.

Rivera, F., Galván, M., Robles, E., Leal, P., González, L., y Lacy, A. M. 1981. Bottled mineral waters polluted by protozoa in México. *J. Protozool.* **28**(1): 54-56.

Rivera, F., Romero, R., y Medina, F. 1983. Meningoencefalitis Ambiana Primaria por *Naegleria fowleri*. *Rev. Fac. Med. Mex.* 24:113-121.

Rivera, F., García, G., Lugo, A., Zierold, E., Islas, J., Ramírez, E., y Bonilla, P. 1986. Amoebae in waste stabilization pond system in México. *Wat., air & soil pollut.* 28:185-198.

Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, I., Ramírez, E., Bonilla, P., y Lares, F. 1987. Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *Env. Research.* 42:149-154.

Rivera, F., Lares, F., Morayta, A., Bonilla, P., Ramírez, E., Xóchihua, L., y Calderón, A. 1989. Contaminación del líquido cefalorraquídeo de un infante con Síndrome de Arnold-Chiari tipo II, hidrocefalia y mielomeningocele por *Naegleria lovaniensis*. *Rev. Enf. Inf. Ped.* 2(9): 91- 94.

Rivera, F., Cerva, L., Martínez, J., Keleti, G., Lares, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Graner, S., Saha, A., y Glew, R. 1990. *Naegleria lovaniensis tarasca* new subspecies and the Purepecha strain, a morphological variant of *N.l. lovaniensis*, isolated from natural thermal waters in Mexico. *J. Protozool.* 37(4):301-310

Rivera, F., Curds, C., Bonilla, P., Warren, R., Ramírez, E., Calderón, A., Rodríguez, S., y Ortiz, R. 1991. Pathogenic and free-living amoebae isolated from a wastewater treatment system with *Phragmites australis* (common reed). *Biological approach to sewage*. P. Madoni (ed), Perugia. pp 123-125.

Rivera, F. y Calderón, A. 1993. Biotratamiento de aguas negras. *Cienc. y tecnol.* 15 (203): 12-15.

Rivera, F., Gallegos, E., Calderón, A., Fernández, B., Bonilla, L., Ramírez, E., Robles, E. y Ortiz, R. 1993 a. Eliminación de materia orgánica en un sistema de tratamiento de aguas residuales con

Phragmites sp. y *Typha* sp. en San Luis Potosí, México. Memorias del Primer congreso internacional de AIDIS de Norteamérica y del Caribe. Capítulo 3. pp 1-3.

Rivera, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Ortiz, R., Zaldivar, B., Ramírez, P., y Duran, A. 1993 b. Pathogenic and Free-Living Amoebae isolated from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. *Env. research*. 62:43-52.

Rivera, F., Rodríguez, S., Warren, A., Bonilla, P., Ramírez, E., Calderón, A., Ortiz, R. 1993 c. An investigation of the pathogenic and non-pathogenic free-living amoebae from the root zone method of wastewater treatment. *Wat. air, & soil poll.* 69: 93-98.

Rivera, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Ortiz, R., Hernández, D., y Rivera, V. 1994. Seasonal Distribution of Air-Borne Pathogenic and Free-Living Amoebae in Mexico City and Suburbs. *Wat. air & soil poll.* 74: 65-87.

Rivera, F., Lares, F., Calderón, A., Rodríguez, S., Ramírez, J., Xóchihua, D. L., y Guzmán, H. 1995 a. *Acanthamoeba* spp. En quemaduras infectadas y rinitis. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 31: 137-140.

Rivera, F., Warren, A., Ramírez, E., Decamp, O., Bonilla, P., Gallegos, E., Calderón, A., y Trinidad, S. 1995 b. Removal of pathogens from wastewaters by the root zone method (RZM). *Wat. Sci. Tech.* 32 (3): 211-218.

Rivera, F., Robles, E., Gutiérrez, A., Gallegos, E., Calderón, A., Ramírez, E., y Bonilla, P. 1997. El Humedal con lecho de grava como una alternativa para el tratamiento de desechos con alta carga orgánica. *Geog. y Des.* 15:37-46.

Rivera, F., Warren, A., Curds, C., Robles, E., Gutierrez, A., Gallegos, E. y Calderon, A. 1997. The application of the root zone method for the treatment and reuse of high-strength abattoir waste in Mexico. *Wat. Sci. Tech.* **35**(5):271-278.

Rodríguez, P. E. 1984. Meningoencefalitis por *Naegleria fowleri*. Informe de un caso. *Infectologia*. IV (10):263-266.

Rodríguez, Z. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Critical Reviews Microbiology*. 20:225-240.

Robles, E., Gallegos, M., Calderón, A., y Sainz, M. 1993. Remoción de materia orgánica. *Inf. Cienc. y tecnol.* **15** (203): 26-28.

Sánchez, R., y Lugo, A. 1993. Protozoos en lechos de raíces. *Inf. Cienc. y tecnol.* **15** (203): 18-21.

Shukla, O. P., Kaul, S. M., y Mehlotra, R. K. 1990. Nutritional Studies on *Acanthamoeba culbertsoni* and Development of Chemically Defined Medium. *J. Protozool.* **37**(3):237-242.

Sun, G., Gray, R., Biddlestone, D y Cooper, J. 1998. Treatment of agricultural wastewater in a combined tidal flow-downflow reed bed system. Proceedings-6th International Conference on wetlands systems for water pollution control. Brazil. pp 343-354.

Valenzuela, G., López-Corella, E y De Jonckheere, J. F. 1984. Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from northwestern Mexico. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**: 722-732.

Vincent, G. 1994. Use of artificial wetlands for the treatment of recreational wastewater. *Wat. Sci. Tech.* **29**(4):67-70.

Visvesvara, S., y Stehr, K. 1990. Epidemiology of free living amoeba infections. *J. Protozool.* **37**(4):25s-33s.

Vymazal, J. 1998 a. Removal of BOD5 in constructed wetlands with horizontal sub-surface flow: Czech experience. Proceedings-6th International Conference on wetlands systems for water pollution control. Brazil. pp 150-166.

Vymazal, J. 1998 b. Types of constructed wetlands for wastewater treatment. Proceedings-6th International Conference on wetlands systems for water pollution control. Brazil. pp 150-166.