



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA



DISTRIBUCION TEMPORAL DE LAS AMIBAS DE VIDA LIBRE EN DOS
MANANTIALES DEL ACUIFERO DEL VALLE DE CUERNAVACA MORELOS

TESIS

QUE PARA OBTENER TITULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

PRESENTA:

LUIS URIEL CAMPOS LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. ELIZABETH RAMIREZ FLORES

Los Reyes Iztacala, Edo. de México 2007



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.

Dedicatoria:

Esta Tesis esta dedicada principalmente a mi padre: José Luis Campos Chávez que gracias a su apoyo y su cariño logre salir adelante, gracias papá que Dios te tenga en el cielo al lado suyo, esperando algún día volver a reunirnos allá donde las almas van.

También quiero agradecer a mi Madre Carmen López Romero, por todo su cariño y sus consejos, sabiendo que no hay mayor forma de agradecerle que correspondiéndole con el título, Gracias Mamá.

No puedo pasar por alto a los dos aliados que dios me dio en este mundo para salir adelante mis dos hermanos: Julio Cesar y Nallely, gracias por estar siempre conmigo y ayudarme a salir adelante.

Por ultimo quiero dedicar esta Tesis a todos mis sobrinos: Yamilet, Yael, Kelly, Yeni y a Paola esperando que este gran logro sirva en sus vidas como un gran estimulo para salir adelante Dios los bendiga los quiero mucho.

Agradecimientos:

Agradezco en primer lugar a Dios por permitirme culminar esta etapa de mi vida, gracias señor.

También agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala que es una de las mejores instituciones formadoras de Biólogos.

Agradezco a mi asesora de de tesis la M. en C. Elizabeth Ramirez Flores, por aceptar la dirección de esta tesis, además de todo su apoyo, estimulo y paciencia para la realización de la misma. Gracias profesora.

A mis revisores de tesis por sus valiosos comentarios, observaciones y sugerencias para el mejoramiento del presente trabajo:

*Dra. Patricia Bonilla Lemus.
QFB. Esperanza del Socorro Robles Valderrama.
M en C. Maria Dolores Hernández Martínez.
M en C. Emelia Campoy Otero.*

Agradezco a TODOS mis compañeros y amigos de carrera, que en realidad son muchos y no acabaría la lista de todos ellos, pero que los llevo siempre conmigo, a todos los profesores de carrera, ya que gracias a ellos forme una visión más amplia acerca de la vida y del estudio de la misma, gracias al profesor Sergio Chayaro Olvera, que fue un buen profesor al cual admiro y respeto por su forma de ser.

*Por ultimo quiero agradecer a una persona especial a mi amigo del alma David Romero Hurtado, por todo el apoyo en las buenas y en las malas, sabiendo que no hay palabras para describir todo lo que implica una verdadera amistad, gracias
Mi Brother.*

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MARCO TEÓRICO.....	3
Acuíferos.....	3
Amibas de Vida Libre.....	4
ANTECEDENTES.....	8
JUSTIFICACIÓN.....	11
ÁREA DE ESTUDIO.....	12
OBJETIVOS.....	15
MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
Trabajo de campo.....	17
Trabajo de laboratorio.....	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
CONCLUSIONES.....	31
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
ANEXO.....	35
Medio de cultivo.....	35
Fotografías de amibas aisladas.....	36

RESUMEN

El agua subterránea es considerada una fuente inagotable y en general de buena calidad. Sin embargo recientemente se ha observado que es susceptible de contaminarse, ocasionando el deterioro de su calidad, aunado a condiciones graves de decremento del nivel de los acuíferos; además de la disminución de la recarga natural. En el agua subterránea se han encontrado diversos contaminantes que amenazan a la salud de los usuarios, por tal razón es importante entender como es el proceso mediante el cual el agua subterránea se contamina y el tipo de contaminantes, tanto fisicoquímicos como microbiológicos, que pueden estar presentes en ella. Las Amibas de Vida Libre (AVL) son protozoos cosmopolitas que habitan en ambientes como el suelo y el agua, aunque también se pueden encontrar en el aire. Su eficiencia en el uso de los recursos es un enlace fundamental entre niveles tróficos superiores. Algunas AVL, pueden causar enfermedades fatales en el humano y otros animales. Por lo cual, los objetivos del trabajo fueron: Determinar la distribución temporal de las amibas de vida libre en los manantiales "Las Fuentes" y "El Túnel" del acuífero del valle de Cuernavaca en el estado de Morelos y relacionar la presencia de las amibas con algunos parámetros fisicoquímicos. Se realizaron 12 muestreos mensuales de mayo de 2005 a abril del 2006. Para la determinación de la presencia de las AVL se colectaron 500 ml de agua de los manantiales, en envases esterilizados y se transportaron al laboratorio a temperatura ambiente. *In situ* se midieron los parámetros: oxígeno disuelto (O.D.), temperatura y pH. Se sembraron alícuotas de las muestras de agua en placas del medio Agar no Nutritivo con la bacteria *Enterobacter aerogenes* (NNE) para el aislamiento de las amibas. Las placas se incubaron a 25°C y se revisaron después de siete días para detectar el crecimiento amibiano, usando un microscopio invertido. La cuantificación de las amibas se realizó utilizando una variante de la Técnica del Número Más probable (NMP), para lo que se utilizaron 3 volúmenes de muestras (50, 10 y 1 ml) con 3 repeticiones de cada uno. Se encontró un mayor número de amibas en los meses de mayo, junio y julio, presentándose un decremento en los meses anteriores y posteriores a este período. Se obtuvieron amibas de los siguientes géneros: *Hartmannella*, *Naegleria*, *Vannella*, *Vahlkampfia*, *Rosculus*, *Dactylamoeba*, *Platyamoeba* y *Filamoeba*. En el manantial Las Fuentes se presentó la mayor riqueza específica amibiana, se aislaron amibas en siete de los doce muestreos y el género más frecuente fue *Hartmannella* con un 26.31%. Mientras que en el manantial El Túnel, solamente se presentaron dos géneros: *Hartmannella* con 66.6% y *Vahlkampfia* con un 33.3%, aislándose amibas solamente en tres meses: noviembre marzo y abril. El rango de los parámetros físico-químicos fue similar en los dos puntos de muestreo obteniendo un pH entre 5.7-7.3, un rango de O.D. entre 2.4-6.8 y un rango de temperatura de 16-19°C. Estos parámetros se encuentran dentro de los rangos señalados en la bibliografía para la presencia de las AVL.

INTRODUCCIÓN

El agua subterránea se considera una fuente inagotable y en general de buena calidad, por lo que se ha usado ampliamente para uso doméstico y otros propósitos. Recientemente se ha observado que es muy susceptible de contaminarse además de una sobreexplotación de los mantos acuíferos (García y Piña, 2003).

La sobreexplotación de acuíferos en muchas zonas, así como otras actividades antropogénicas, han ocasionado deterioro de la calidad en algunos sitios y en muchos otros, condiciones graves de decremento del nivel de los acuíferos; además de la disminución de la recarga natural debido a la elevada urbanización, que también influye en la calidad del agua de recarga (Iturbe y Silva, 1992).

De los recursos acuáticos existentes en México, el agua subterránea es una de las principales fuentes de abastecimiento de agua potable. En el Valle de México, el 70 % de la población se abastece con agua extraída a través de pozos. De acuerdo con la Comisión Nacional del Agua hasta ahora se han identificado en México 459 acuíferos con más del 20% de sobreexplotación, la extracción promedio anual de estos se calcula en 24 km³ la cual es a través de 140 mil aprovechamientos subterráneos. El mayor número de estos se encuentran en el noroeste del país, sin embargo los que reciben una descarga significativa se localizan en el sureste; de hecho a excepción de esta zona, existen problemas de disponibilidad debido a que las recargas son menores a las extracciones, esto se agrava aún más por el deterioro de su calidad, debido a la contaminación (Campoy, 2001; CNA, 1994).

En el agua subterránea se han encontrado diversos contaminantes que amenazan la salud de los usuarios. Remover algunos de estos contaminantes podría ser muy costoso, por lo cual el agua resultaría virtualmente inservible para el consumo humano, por tal razón es importante entender el proceso mediante el cual se contamina el agua subterránea y el tipo de contaminantes, tanto fisicoquímicos como microbiológicos, que pueden estar presentes en ella. (García y Piña 2003).

En la microbiología del agua subterránea, se pueden distinguir dos componentes, los microorganismos que habitan en este ambiente (autóctonos) y los microorganismos contaminantes relacionados con los problemas de salud pública. Este último tiene que ver con el estudio de la persistencia de los contaminantes biológicos en ambientes subsuperficiales y la dispersión de enfermedades hidrotansmisibles por medio del agua subterránea, lo que constituye un riesgo para la salud de los usuarios (Bitton y Gerba, 1984; Chapelle, 1993).

Algunas AVL, además de estar en el ambiente, pueden causar enfermedades en el humano y otros animales. Las especies con potencial patógeno pertenecen a los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Balamuthia* (Martínez y Visvesvara, 1997; Schuster y Visvesvara, 2004).

MARCO TEÓRICO

Acuíferos.

El acuífero es la formación geológica que almacena agua y actúa como depósito y reserva. La mayoría conforman grandes extensiones y su alimentación es por el aporte de aguas pluviales, corrientes superficiales y lagos que se infiltran a través del suelo hacia el acuífero, el agua escurre debido a la gravedad desde las zonas de recarga hacia la de descarga, las cuales pueden ser ríos, lagos o manantiales. La explotación se efectúa mediante el bombeo en pozos. En los acuíferos hay que distinguir, normalmente, una zona de recarga que es la parte por donde entra agua y otra zona de descarga que es por donde sale el líquido, pudiendo localizarse estas zonas en la superficie o en otros acuíferos subterráneos (Iturbe y Silva, 1992; Jiménez, 2002).

Los acuíferos se clasifican, según la estructura geológica, en libres, semiconfinados y confinados. Un acuífero libre consiste en una zona impermeable que sirve de base a una zona permeable saturada de agua, sobre la que existe una capa permeable sin saturar. Si el estrato está cubierto por una capa también impermeable, el acuífero recibe el nombre de acuífero confinado. Este tipo de acuífero presenta una permeabilidad muy pequeña o nula y, a veces, al estar limitado por estratos impermeables suprayacentes y subyacentes, impiden al agua moverse más allá de la región confinada. Cuando esto último sucede y ocupa una cuenca más o menos extensa, se habla de cuenca artesianas. Aquí, el agua suele estar sometida a fuertes presiones por lo que, en los pozos abiertos en estas cuencas, denominados pozos artesianos, el agua asciende hacia la superficie, que a menudo alcanza sin necesidad de bombeo, de ahí que el agua almacenada pueda liberarse a través de manantiales y pozos. Existen pocos acuíferos verdaderamente confinados; la mayoría recibe apreciables cantidades de agua por filtración, lentamente, durante largos periodos de tiempo, por una de las capas de confinación; reciben entonces el nombre de acuíferos semiconfinados (Iturbe y Silva, 1992).

Antes de los años 70's el estudio de la biología del agua subterránea, fue relativamente limitado, sin embargo se hizo cada vez más obvio que la eliminación de desperdicios contaminaban ambientes subsuperficiales, esto condujo a un creciente interés en el estudio de este tipo de ambientes; además de los organismos que se encontraban en estos, para llevar a cabo la degradación de contaminantes potenciales es decir la biorremediación (Leclerc y Moreau 2002).

Las fuentes de contaminación química y microbiológica son numerosas. Estas fuentes incluyen la práctica de disposición en el suelo de los efluentes de agua de desecho, lodos, desechos sólidos, efluentes de tanques sépticos y escurrimientos urbanos (Gerba y Bitton, 1984., Zoller, 1994). Más de 200 sustancias orgánicas e inorgánicas sintéticas se han identificado en suministros de agua subterránea (Zoller, 1994). Con respecto a la contaminación por microorganismos patógenos, la contaminación bacteriana parece ser el problema más común; aunque también

se han detectado problemas de salud por brotes de algunos virus como el de la hepatitis y la gastroenteritis (Craun, 1984; Cullimore, 1992; Chapelle, 1993; Zellikson, 1996).

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

Amibas de vida libre.

Las Amibas de Vida Libre (AVL) son protozoos cosmopolitas que habitan en ambientes como el suelo y el agua, aunque también se pueden encontrar en el aire, medio que utilizan como forma de dispersión. En los ecosistemas acuáticos desempeñan un papel muy importante en el mantenimiento de flujo de energía y el reciclado de los nutrimentos. Su eficiencia en el uso de los recursos las convierte en un enlace fundamental entre los organismos desintegradores y aquellos pertenecientes a niveles tróficos superiores. (Schuster y Visvesvara, 2004).

Algunas AVL, además de estar en el ambiente, pueden causar enfermedades en el humano y otros animales. Las especies reportadas hasta el momento como patógenas pertenecen a los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Sappinia* (Martinez y Visvesvara, 1997; Schuster y Visvesvara, 2004).

Naegleria.

El género *Naegleria* vive principalmente en el suelo, en ambientes acuáticos como aguas termales y aguas calentadas artificialmente (piscinas), aunque también se puede encontrar en estanques, cascadas, manantiales, lagos y ríos con temperaturas menores a los 30°C.

Las especies patógenas se observan con mayor frecuencia en cuerpos de agua con temperaturas mayores a los 30°C y aguas naturales de los trópicos y subtrópicos. Los factores ambientales favorables para el desarrollo de este género son: intervalos de temperatura entre los 30°C y 45°C, niveles óptimos de oxígeno (mínimo 2 mg/l), pH cercano a la neutralidad y alimento suficiente (bacterias y materia orgánica); sin embargo, en su forma de quiste, pueden soportar variaciones amplias de los parámetros antes mencionados. Un hallazgo interesante a este respecto, es que hasta el momento todas las especies patógenas que se han aislados han sido termotolerantes, aunque no todas las termotolerantes han sido patógenas (Rodríguez, 1994).

Naegleria fowleri es la única especie patógena para el humano, que se ha detectado en este género; causa una infección aguda que afecta al sistema

nervioso central (SNC) llamada *Meningoencefalitis Amebiana Primaria* (MEAP) o Naegleriosis. Es una enfermedad aguda y casi siempre fatal, la mayoría de los individuos mueren en la primera o segunda semana después de la manifestación de los primeros síntomas, dependiendo del manejo y resistencia del paciente, así como de la virulencia de las amibas. Se presenta principalmente en individuos jóvenes y sanos con antecedente de natación (Bonilla *et al.*, 2004; Martínez y Visvesvara, 1997; Schuster y Visvesvara, 2004).

Naegleria fowleri es una especie que durante su ciclo de vida puede presentar 3 estadios morfológicos: el trofozoito, el quiste y el estadio de flagelado. Los trofozoitos son activos y por lo general se encuentran elongados, que se conoce como forma limax, presenta un pseudópodo ancho denominado lobópodo, su citoplasma es granular y contiene vacuolas. La etapa flagelar se forma del trofozoito y presenta dos flagelos. Los quistes son por lo general esféricos, lisos con una doble capa, su tamaño se encuentra entre 7-15 μm de diámetro; esta estructura se forma cuando las condiciones ambientales son adversas (Martínez y Visvesvara, 1997).

La puerta de entrada es la aspiración por las fosas nasales de agua contaminada; las amibas alcanzan el techo de la cavidad hasta llegar a la mucosa olfatoria, migran al nervio olfatorio, atraviesan la lámina cribiforme y avanzan hasta el espacio subaracnoideo. En el cerebro, las amibas provocan necrosis por producción de hidrolasas lisosomales y fosfolipasas que degradan la mielina y provocan que la persona invadida sufra daños graves e irreversibles. Las amebas penetran el tejido del SNC y ocasionan necrosis hemorrágica y edema, que son las características histopatológicas de la MEAP (Bonilla y Ramírez, 2004).

A nivel mundial se habían reportado hasta el 2001, 196 casos de MEAP, de los cuales 29 casos corresponden a México. Aunque el número de casos pueden parecer bajos, la exposición a estos organismos puede ser relativamente común (Marshall *et al.*, 1997; Martínez, 2001).

Acanthamoeba.

Acanthamoeba es otro de los géneros de amibas de vida libre al que pertenecen varias especies potencialmente patógenas para el humano. Se encuentra distribuida en todos los ambientes, y probablemente es la amiba con mayor distribución en la naturaleza, debido a la gran resistencia de su quiste. De las AVL potencialmente patógenas, *Acanthamoeba* es la única especie que se ha aislado de muestras de aire extra e intramuros, así como de conductos de aire acondicionado (Bonilla *et al.*, 2004; Martínez y Visvesvara, 1997).

El ciclo de vida de *Acanthamoeba* tiene dos estadios el trofozoito y el quiste, los trofozoitos presentan pseudópodos parecidos a espinas, denominados acantópodos, los cuales le permiten la movilidad al organismo. Los quistes son circulares con una doble membrana, donde la capa interna puede tener formas estrelladas o hexagonales con dos o más poros. *Acanthamoeba* es mayor que *Naegleria* llegando a medir de 10-50 μm de diámetro, este tipo de organismos se

dividen por fisión binaria (Bonilla *et al.*, 2004; Schuster y Visvesvara, 2004).

Acanthamoeba es una ameba oportunista capaz de producir Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG) también conocida como acanthamoebosis; es una enfermedad subaguda o crónica. Se presenta en individuos inmunosuprimidos o inmunodeficientes, como alcohólicos crónicos, embarazadas, VIH positivos, enfermos con SIDA, con lupus eritematoso sistémico o cáncer; aunque también se han descrito casos de EAG sin ninguna predisposición.

La puerta de entrada al torrente sanguíneo puede ser a través de los pulmones vía neuroepitelio olfativo y lesiones de la piel. Las lesiones que produce *Acanthamoeba* son granulomatosas, encontrándose en ellas trofozoítos y quistes.

Los datos clínicos comparados con los que provoca *Naegleria* son menos intensos y de un curso más lento.

Otra infección importante causada por *Acanthamoeba* spp., es la Queratitis amebiana (QA). Esta es una inflamación crónica en la córnea que puede causar la pérdida del ojo. Se caracteriza por un dolor ocular severo asociado con fotofobia, generalmente unilateral, visión borrosa y congestión de la conjuntiva. Los principales factores de riesgo son el uso de lentes de contacto suaves, uso de soluciones salinas caseras, exposición a agua contaminada y traumatismos menores del ojo. Otros factores que favorecen el establecimiento de la Queratitis amibiana (QA) son la producción de lágrimas con baja actividad microbiana y la contaminación bacteriana secundaria (Bonilla *et al.*, 2004; Marshall *et al.*, 1997; Schuster y Visvesvara, 2004).

Balamuthia.

Otra de las especies de AVL que se ha detectado como patógena es *Balamuthia mandrillaris* la cual se desarrolla preferentemente en cultivos de tejido y en un medio axénico muy específico, su búsqueda en el ambiente ha sido escasa y no se conoce exactamente su hábitat (Bonilla *et al.*, 2004).

Durante los años 80's, en Estados Unidos, la ameba se aisló por primera vez de un mandril de zoológico que murió por encefalitis, a lo que debe su nombre. Los estudios de microscopía electrónica, las pruebas de patogenicidad en animales y los patrones de inmunofluorescencia sugirieron que se trataba de una nueva especie de ameba de vida libre, llevando a la propuesta de un nuevo género; *Balamuthia* con una sola especie *B. mandrillaris*, perteneciente a la familia Leptomyxidae (Schuster y Visvesvara, 2004).

Un cuadro muy similar al descrito para *Acanthamoeba* es producido por *B. mandrillaris*. Sin embargo, no está claro si *Balamuthia* se comporta como organismo oportunista o si es un patógeno primario letal, que no depende del estado del hospedero. La información al respecto es escasa y los cuadros observados se han presentado principalmente en individuos inmunocomprometidos (Bonilla *et al.*, 2004).

Sappinia.

Recientemente se reportó un caso de EAG causado por *Sappinia diploidea* en un paciente de 38 años inmunocompetente, en el cual se aislaron trofozoitos de la masa cerebral. El examen histopatológico del tejido cerebral mostró trofozoitos pero no quistes y no se observó ninguna evidencia de reacción granulomatosa. Se extrajo quirúrgicamente la única lesión que se apreció por resonancia magnética y se le dio tratamiento con azitromicina, isotionato de pentamidina, itraconazol y flucitosina, con lo que el paciente se recuperó sin secuelas neurológicas. Se cree que la puerta de entrada fue a través del tracto respiratorio, porque el paciente presentó una infección nasal importante. Los síntomas en el caso reportado fueron dolor de cabeza, visión borrosa, ataques, fotofobia y vómito (Gelman *et al.*, 2003).

Esta amiba había sido aislada del medio ambiente en heces humanas, de bisontes y del ganado pero no se había detectado como patógena. *S. diploidea* presenta un tamaño mayor, llegando a medir de 45 a 85 μm con pseudópodos indistintos y una película que se puede ondular cuando la amiba esta en movimiento. Un carácter distintivo de la amiba es la presencia de 2 núcleos los cuales están colocados muy cerca uno del otro; esta característica también se encuentra presente en el quiste (Schuster y Visvesvara, 2004).

ANTECEDENTES

A la fecha son relativamente pocos los estudios de amibas de vida libre realizados en agua natural, entre los que se pueden mencionar los siguientes.

O'Dell citado por Sawyer *et al.*, 1993, realizó una investigación acerca de la distribución estacional de AVL en el fondo de un lago en Nebraska, E.U., llevando a cabo muestreos mensuales a lo largo de un año, encontrando que *Acanthamoeba* fue la amiba mas frecuente en el sedimento litoral y que al menos una especie de este género estuvo presente en el 60% de las estaciones del muestreo; lo que probablemente se debió a la temperatura registrada, la cual de acuerdo al reporte se mantuvo en un intervalo medio de 38 a 40°C. de acuerdo con lo reportado por el autor.

Dive y colaboradores citados por Kyle y Noblet, 1986, realizaron un estudio acerca de las AVL termotolerantes en un estanque de enfriamiento el cual estaba ubicado en una planta de energía eléctrica en Francia a través de el ciclo anual, reportando un cambio importante en el tipo de amibas presentes en el agua. A menores temperaturas se presentaron amibas del género *Vahlkampfia* y alrededor del verano cuando la temperatura se incrementó, aparecieron algunas amibas patógenas de la especie *Naegleria fowleri*.

Kyle y Noblet en 1986 realizaron un estudio cuantitativo para conocer la distribución estacional de las AVL termotolerantes en un lago cálido en el sur de Carolina, E. U.; analizaron la relación entre los parámetros fisicoquímicos con la presencia o ausencia de las amibas, en tres diferentes hábitats del lago (bentos, plancton y neuston). Encontraron que las densidades poblacionales de AVL presentaron un aumento durante los meses de verano en los tres hábitats; pero la riqueza específica era distinta entre ellos. Además observaron que el hábitat principal para las AVL fue el sedimento del litoral; presentando un aumento en el mes de agosto para *Acanthamoeba* y *Naegleria*, en julio para *Hartmannella* y en mayo para *Vahlkampfia*.

El género amibiano más abundante en el bentos fue *Acanthamoeba*, presentándose en un 82%. Las poblaciones de AVL en el bentos presentaron cambios drásticos en respuesta a los cambios climáticos estacionales.

Los patrones de distribución y composición de especies de las AVL en el agua de la superficie fueron similares a los del sedimento litoral; sin embargo un mayor porcentaje de *Naegleria* se encontró en la superficie. Se aisló un gran número de AVL de la zona del neuston, observándose que en la parte central del lago el número de AVL aisladas en la superficie fue mayor que el encontrado en la zona subsuperficial.

Durante el verano, la población de AVL fue mas alta en el plancton, el cual se encontraba a una profundidad de 3 a 3.4 metros, reportándose un alto porcentaje de *Naegleria* en esta capa. Los autores sugirieron que esto tal vez se debió a que

los ameboflagelados de *Naegleria* fueron capaces de migrar en respuesta a una reducción de los nutrientes o a la presencia de anoxia en otras zonas del lago.

Finalmente, concluyeron que las condiciones ambientales tuvieron un papel importante en la distribución de las AVL en los diferentes hábitats del lago.

Sawyer y colaboradores en 1993 examinaron sedimentos marinos en la Bahía de Raritan, Nueva York, en la cual eran vertidas aguas residuales sin tratar. Reportando la predominancia del género *Acanthamoeba* con la presencia de las especies *A. castellanii*, *A. comandoni*, *A. hatchetti*, *A. lenticulata*, *A. polyphaga*, *A. rhysodes* y *Acanthamoeba spp.* Las cuales fueron reportadas a temperaturas de 38-40°C. Además, se reportó una nueva especie, la cual se nombró *Acanthamoeba stevensoni*.

Anderson y Rogerson en 1995 estudiaron las amibas de vida libre en los estuarios de Hudson y Clyde en los Estados Unidos, en el periodo de noviembre de 1992 a noviembre de 1993. Reportando que en el estuario de Hudson las AVL presentaron un decremento importante durante los meses de invierno, así como un aumento de la población en los meses de verano precedido por un incremento en la primavera.

Un incremento similar se presentó en el estuario de Clyde en primavera (abril y mayo). Con esto se sugiere que los patrones estacionales de la abundancia de amibas son similares en localidades geográficas separadas. Los autores recomendaron que debido a que alrededor del 50-60% de las amibas encontradas presentaron una longitud menor a las 10µm, el estudio de los protozoos del plancton debe de ser muy cuidadoso para que estas amibas pequeñas no pasen desapercibidas.

En un estudio realizado por Anderson en 1997 en la capa superficial de una poza poco profunda, ubicada en el noroeste de los Estados Unidos, se estudió durante un año a intervalos mensuales, la abundancia y la diversidad de las Gymnamoebae (amibas desnudas). La abundancia de amibas se mantuvo en un intervalo de 81 amibas/ml en enero a 1568 amibas/ml en junio y 1813 amibas/ml en octubre. Este último es equivalente a 1.8 millones por litro, por lo cual es uno de los valores mas altos reportados para las Gymnamoebae de agua dulce. La diversidad máxima se presentó en los meses de abril, julio y agosto.

Novarino y colaboradores en 1997, realizaron un estudio en el acuífero llamado El Cabo en el estado de Massachussets, E. U.; reportando aislamientos de amibas desnudas pertenecientes a los géneros, *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Mayorella*, *Rosculus*, *Vahlkampfia*, *Vannella* y *Platyamoeba*.

Bonilla y colaboradores en el 2000, reportan el estudio que se realizó en la zona de la Huasteca Potosina, México. En este estudio se tomaron muestras de 12 sitios utilizados para la natación como albercas, cascadas y lagunas; durante las

temporadas de secas y lluvias. Se obtuvo un total de 54 aislamientos amibianos en 9 de los 12 lugares muestreados, siendo los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* los más frecuentes. Hubo un mayor número de aislamientos durante la temporada seca y además de que un 70% de las amibas fueron aisladas de las albercas. Se presentaron 5 cepas de *Naegleria*, 4 de *Acanthamoeba* y 3 de *Hartmannella* las cuales resultaron patógenas en ratones por vía intracerebral.

De los pocos estudios realizados para las AVL en agua subterránea, se encuentra el realizado en el acuífero del Valle del Mezquital, Hidalgo, México; el cual es un acuífero que ha sido contaminado orgánicamente durante muchos años. Se obtuvieron 289 aislamientos, predominando las amibas del género *Acanthamoeba* en un 67.3%, de las cuales 6.5% fueron patógenas en ratón (Campoy, 2001; Ramirez, *et al.*, 2001).

JUSTIFICACIÓN

De todos los ambientes, la biología del agua subterránea es una de las menos estudiadas. Hasta hace relativamente poco tiempo se consideraba que la posibilidad de que ocurrieran procesos biológicos en el agua subterránea era poca y no significativa. Sin embargo en las últimas décadas algunos estudios han reportado que los microorganismos existen en el agua subterránea profunda y que pueden realizar funciones importantes.

Específicamente se conoce poco de los aspectos microbiológicos de la contaminación que ocurre en este ambiente en comparación con las aguas superficiales, principalmente debido a la creencia de que este tipo de agua era esencialmente limpia por la acción filtrante del medio poroso por el cual pasa el agua, por lo que la determinación del número de bacterias en el agua subterránea se consideraba no necesaria (Gerba y Bitton, 1984).

El interés en las investigaciones de la microbiología del agua subterránea se ha incrementado por la creciente demanda de esta fuente, ya que se requiere que no exista riesgo a la salud por el uso de ella (Iturbe y Silva, 1992).

Un caso interesante es el acuífero del Valle de Cuernavaca porque se ha dado una continua degradación en la calidad fisicoquímica y microbiológica del agua debido a que se descargan aguas residuales domésticas y municipales sin tratamiento en arroyos y ríos, que debido a la alta vulnerabilidad de los materiales que van circulando, infiltran y alteran la calidad del agua subterránea. En algunos pozos de la porción Sur del valle de Cuernavaca se han identificado concentraciones de nitratos que superan los límites permisibles de acuerdo con las normas oficiales mexicanas establecidas (CNA, 2002).

A fines de la década de los 70's y principios de los 80's se elaboraron y ejecutaron estudios para un mejor conocimiento geohidrológico, con el objetivo principal de determinar su funcionamiento hidráulico y disponibilidad de agua subterránea y con base en ello establecer normas y criterios para un manejo racional del acuífero, aunque los estudios no consideraron la descarga de manantiales ni aspectos de contaminación microbiológica (CNA, 2002).

Otro aspecto importante del estudio es que debido al desarrollo del valle de

Cuernavaca, los usuarios de algunos ramos como el industrial y el agrícola han solicitado incrementos de agua. Asimismo, el desarrollo de la población demanda nuevas fuentes de abastecimiento de agua como apoyo a las ya existentes, por lo que es necesario que las fuentes sean de buena calidad.

La presente investigación contribuirá al conocimiento de las poblaciones microbianas presentes en el agua subterránea, específicamente de las amibas de vida libre patógenas. Además se conocerá la calidad amebológica de los manantiales monitoreados, ya que en el caso de presentarse amibas con potencial patógeno se pueden presentar repercusiones para la salud de los usuarios.

ÁREA DE ESTUDIO

Localización.

El acuífero del valle de Cuernavaca se localiza entre las coordenadas geográficas de $18^{\circ} 47'$ y $19^{\circ} 07'$ de latitud Norte y los $99^{\circ} 07'$ y $99^{\circ} 25'$ de longitud Oeste del meridiano de Greenwich. Colinda en la porción Norte con las Cuencas Hidrológicas del Valle de México y del río Lerma. Al Este y Sur colinda con los acuíferos de Cuautla-Yautepec y Zacatepec, respectivamente, ambos en el estado de Morelos. Al poniente colinda con la subcuenca del río Chalma en el estado de México (figura 1).

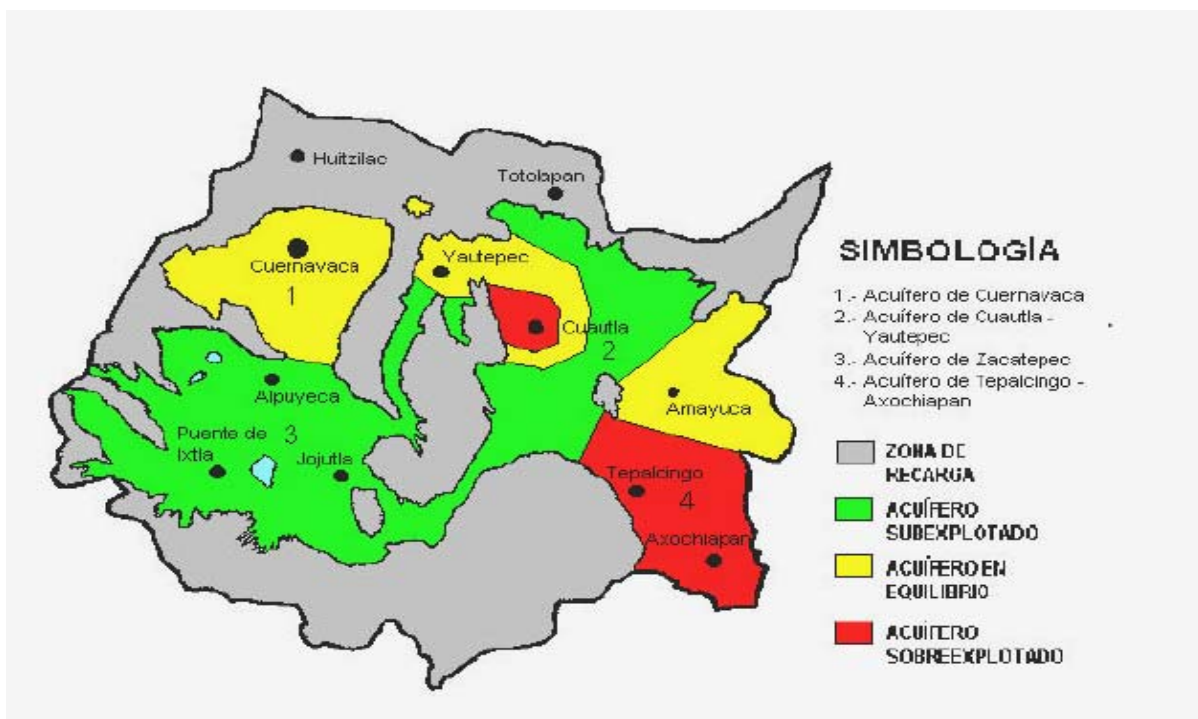


Figura 1. Localización del acuífero de Cuernavaca en el estado de Morelos.

Los municipios que se incluyen en la zona acuífera son: Huitzilac, Cuernavaca, Emiliano Zapata, Jiutepec, Temixco y la porción Norte del municipio de Xochitepec y al poniente de los municipios de Tepoztlan y Yautepec, todos en el estado de Morelos.

La zona conurbada de Cuernavaca, Jiutepec, Temixco y Emiliano Zapata concentra la mayor densidad de pozos y manantiales del acuífero. En el caso particular de la zona ubicada entre Cuernavaca y Jiutepec, se presenta permanentemente un cono de abatimiento local, con niveles de 40 metros por debajo del nivel estático, que ha dado como resultado que en los últimos tiempos algunos usuarios de la zona hayan solicitado la reposición de pozos profundos por el abatimiento y niveles piezométricos que se presentan (CNA, 2002).

En la presente investigación se estudiaron dos manantiales del acuífero del valle de Cuernavaca. El manantial “Las Fuentes” que se localiza en el municipio de Jiutepec, el cual es un manantial superficial que se utiliza para fines recreativos y el manantial “El Túnel” que se localiza en el municipio de Cuernavaca y que es un manantial que no se encuentra a la intemperie, por lo que se ha tenido que realizar una excavación para su explotación como suministro de agua potable.

Región Hidrológica.

El acuífero del valle de Cuernavaca se ubica en la región hidrológica del río Balsas, que incluye parcialmente a los estados de Jalisco, Michoacán, Guerrero, México, Oaxaca, Puebla Tlaxcala, Veracruz, Distrito Federal y la totalidad del estado de Morelos a su vez esta región se divide en las subregiones del Alto, Medio y Bajo Balsas (figura 2).



Figura 2. Región hidrológica del Balsas.

En la porción central de la cuenca del río Amacuzac se incluye el acuífero del valle de Cuernavaca; la superficie de drenaje de dicha cuenca es de 9,470 km² de los cuales 4,392 km² se localizan en el estado de Morelos. Las subcuencas que se incluyen en esta cuenca hidrográfica son: Chontalcuatlán, San Jerónimo, Chalma, Tembembe, Apatlaco, Yautepec y Cuautla (CNA 2002).

Clima

El clima del estado de Morelos y específicamente en la zona del acuífero del valle de Cuernavaca, esta dado principalmente por dos características geográficas de la zona: la altitud del Eje Neovolcánico (ENV) y la influencia de la Sierra Madre del Sur (SMS). El ENV constituye una barrera orográfica que bloquea el paso de los vientos húmedos provenientes del Océano Pacífico y la SMS da lugar a la presencia de pequeños valles ínter montañosos.

Se presentan cuatro tipos de climas: semifrío, templado, semicálido y cálido. Los climas semifrío y templado se localizan en la porción norte del valle y el clima semicálido y cálido al centro y sur, respectivamente. El clima semifrío presenta temperaturas que fluctúan entre 5 a 12° C y ocurre en altitudes mayores de 2800 msnm. (CNA, 2002).

Aspectos económicos

En el Valle de Cuernavaca se ha dado un acelerado desarrollo urbano, industrial y de servicios durante las últimas dos décadas, por lo que se han generado importantes demandas de agua. En el caso contrario, están las actividades agrícolas, las cuales han tenido una disminución, debido principalmente a que las zonas urbanas se encuentran en constante crecimiento, por lo cual requieren un mayor espacio, generando un cambio progresivo del uso de suelo y como consecuencia del uso del agua. Entre las actividades agrícolas que se han desarrollado se encuentra la instalación de viveros o invernaderos, que contribuyen con la demanda de flores y plantas de ornato para consumo de centros de población locales y mercados circunvecinos, aprovechando las bondades del clima del valle de Cuernavaca (CNA, 2002).

OBJETIVOS

Objetivo general:

-Determinar la distribución temporal de las amibas de vida libre en los manantiales “Las Fuentes” y “El Túnel” del acuífero del valle de Cuernavaca en el estado de Morelos.

Objetivos particulares:

- Aislar las amibas de vida libre presentes en los manantiales.
- Cuantificar las amibas de vida libre presentes en los manantiales.
- Relacionar la presencia de las amibas de vida libre con los parámetros fisicoquímicos: temperatura, pH y oxígeno disuelto del agua.

CONCLUSIONES

*En Las Fuentes hubo una mayor riqueza específica y un número de amibas de vida libre mayor en comparación con el manantial El Túnel.

*La abundancia y diversidad de especies encontrados en los manantiales fueron relativamente bajos, comparado con lo reportado en otros acuíferos como el del Valle del Mezquital.

*Los parámetros fisicoquímicos observados, estuvieron dentro de los parámetros reportados para la presencia de las amibas.

*De las especies aisladas en ambos manantiales ninguna ha sido reportada como patógena. En el caso de las amibas del género *Naegleria* que fueron aisladas, probablemente pertenezcan a la especie *N. gruberi* por las características de su quiste, que es una de las especies no patógenas de este grupo.

*No se encontraron amibas pertenecientes al genero *Acanthamoeba* las cuales son comunes en la naturaleza.

*En cuanto a las AVL, el uso del agua de los manantiales tanto para fines recreativos (natación) y de consumo para los usuarios no representa peligro debido a que no se detectaron amibas reportadas como patógenas.

ANEXO

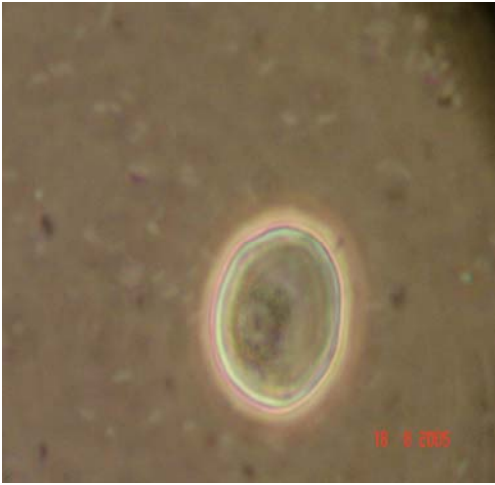
Medio de cultivo.

Agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes* (NNE).

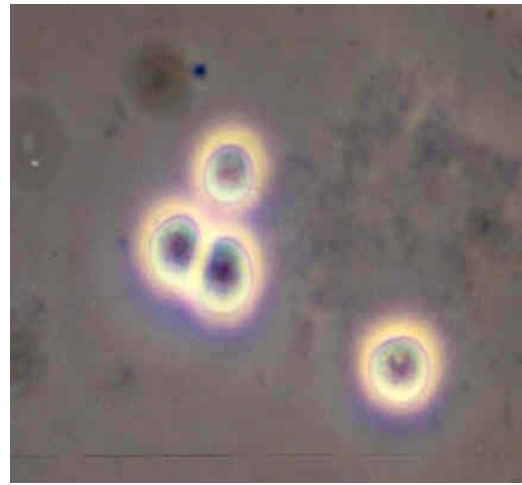
NaCl-----	0.12g
MgSO ₄ ·7H ₂ O-----	0.004g
CaCl ₂ ·2H ₂ O-----	0.004g
Na ₂ HPO ₄ -----	0.142g
KH ₂ PO ₄ -----	0.136g
Bactoagar-----	15.0g
Agua destilada-----	1000ml

Mezclar en seco todos los ingredientes, agregar 500ml. De agua destilada y disolver, completar el volumen a 1000ml. Y hervir hasta que se disuelva el agar completamente. Esterilizar a 121°C durante 20 minutos. Se vierten aproximadamente 2 ml en cada pozo. Cuando el agar se ha solidificado se vierten 2 gotas de 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.

Fotografías de las amibas aisladas.



Quiste *Naegleria* 400x



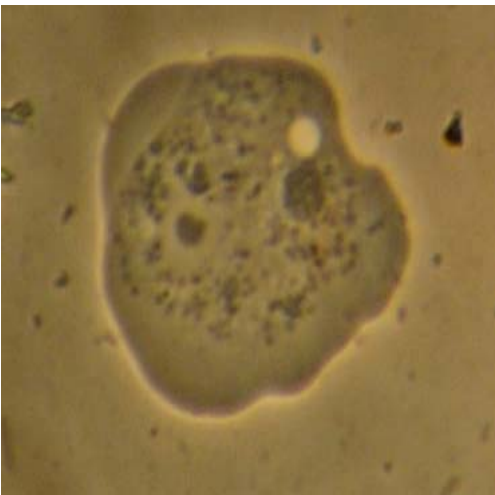
Quiste *Hartmannella* 400x



Trofozoito *Hartmannella* 400x



Trofozoito *Vahlkampfia* 400x



Trofozoito *Vannella* 400x

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson, O.R. y Rogerson, A. 1995. Annual abundances and growth potential *Gymnamoebae* in the Hudson estuary with comparative data from the Firth of Clyde. *Europ. J. Protistol.* 31: 223-233.

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

Bitton, G. y Gerba, Ch. P. 1984. Groundwater Pollution Microbiology: The emerging issue. En: G. Bitton y Ch. B. Gerba. (eds). *Groundwater Pollution Microbiology*. John Wiley & Sons. New York. Pp.1-7.

Bonilla, P., Ramirez, E., Ortiz, R., Calderon, A., Gallegos, y E., Hernandez, D. 2000 Occurrence of pathogenic and free-living amoebae in aquatic systems of the Huasteca Potosina, Mexico. En: M.S. Munawar, I.F. Lawrence, I.F. Munawar y D. Malley (eds.), *Aquatic Ecosystems of Mexico: Status and Scope*. Backhuys Publishers. Pp. 37-44.

Bonilla, P. y Ramirez, E. 2004. Infecciones por amebas de vida libre. En *parasitología Médica (de las moléculas a ala enfermedad)* Mc Graw-Hill Interamericana.

Bonilla, P., Ramirez, E., Ortiz, R. y Eslava, C. 2004. La ecología de las amibas patógenas de vida libre en ambientes acuáticos. En: I. Rosas, A. Cravioto y E. Ezcurra (comps.). *Microbiología Ambiental SEMARNAT, INE, UNAM. PUMA* Pp. 67-81.

Campoy, O. E. 2001. Análisis microbiológico y fisicoquímico del acuífero del Valle del Mezquital, Estado de Hidalgo. Tesis de Maestría. FES Cuautitlán. UNAM. México. 101 Pp.

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

Comisión Nacional del Agua. 1994. Manual para evaluar recursos hidráulicos subterráneos. México.

Comisión Nacional del Agua 2002 Determinación de la disponibilidad de agua en el acuífero de Cuernavaca, estado de Morelos. México.

Craun, G. F. 1984. Health aspect of groundwater pollution. En: G. Bitton y Ch. B. Gerba. (eds.). John Wiley & Sons. New York. Pp. 135-180.

Cullimore, D. R. 1992. *Practical Manual of Groundwater Microbiology*. Lewis

Publishers. New York 320 pp.

Chapelle, H. F. 1993. Ground-water Microbiology and Geochemistry. John Wiley & Sons, Inc. New York. 424 Pp.

Duran, A., Cisneros, A., y Vargas, A., 2005, Bioestadística, FES Iztacala UNAM. Pp. 136-144.

García, C. M. y Piña, C. M. 2003, Evaluación de la contaminación del agua subterránea del valle de Ciudad Juárez, Durango. <http://www.uaaan.mx/DirInv/Rdos2003/cont2003.pdf>

Gelman B.B., Popov V., Chaljub G., Nader R., Rauf S.J., Nauta H.W., y Visvesvara G.S. 2003. Neuropathological and ultrastructural features of amebic encephalitis caused by *Sappinia diploidea*. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 62 (10) :990-8.

Gerba, P. y Bitton, G. 1984. Microbial pollutants their survival and transport pattern to groundwater environmental science and technology. En: G. Bitton y Ch. B. Gerba. (eds). John Wiley & Sons. New York. Pp. 65-88.

Gómez, G. D. 2003. Estudio cuantitativo de las Amibas de Vida Libre presentes en un sistema de tratamiento del agua residual del tipo del método de la zona de la raíz (MZR) en el poblado de Matilde, Hidalgo. FES Iztacala. UNAM. México 60 Pp.

Ingham, R.E. 1993. Standard operating procedure for protozoan population dynamics and community structure. (*Project SOP*) Number 7.05, version 1.0.

Iturbe A.R. y Silva, M.A.E. 1992. Agua subterránea y contaminación. Series del Instituto de Ingeniería. No. 539. Instituto de Ingeniería UNAM. México. 54 Pp.

Jiménez, C.B.E. 2002. La Contaminación Ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada. Editorial LIMUSA. México. 300 Pp.

John, D.T., 1993. Opportunistic Pathogenic free-living amoebae: in Parasitic Protozoa, Kreier J.P. and Baker J.R: (eds). Vol III. 2ª ed. Academic Press. Inc. San Diego. Pp. 139-246.

Kyle, D.E. y Noblet, G.P. 1986. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. I. Willard's Pond. J. Protozool. 33:422-434

Leclerc, H. y Moreau A. Microbiological safety of natural mineral water FEMS microbiology Reviews 26 (2002) 207-222

Marshall, M. Naumovitz, D. Ortega, Y. Sterling, R. Waterborne Protozoan Pathogens. Clinical Microbiology Reviews, Jan. 1997, Pp. 67-85

Martinez, A.J. 2001. Free-living amebas and the immune deficient host. En: S. Billot- Bonef, P.A. Cabanes, F. Marciano- Cabral, P. Pernin y E. Pringuez (eds.). IX International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-living Amoebae Proceedings. John Libbey. Eurotext. Pp. 1-12.

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

Novarino, G. Warren, A. Butler, H. Lambourne, G. Boxshall, A. Bateman, J. Kinner, E. Harvey, W. Mosse, A. y Teltsch, B. 1997 Protistan communities in aquifers: a review. Fems Microbiology Reviews (20): 261-275.

Page, F.C. 1988. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. CCAP. Cumbria. England. 122 Pp.

Ramirez, E., Campoy, E., Matuz, D., Robles, E., Bonilla, P., Warren, A. y Ortiz , R. 2001. Free- Living amoebae in organically-contaminated aquifer in México. En: S. Billot- Bonef, P.A. Cabanes, F. Marciano- Cabral, P. Pernin y E. Pringuez (eds.). IX International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-living Amoebae Proceedings. John Libbey. Eurotext. Pp. 109-116.

Ramirez, E., Robles, E., Bonilla, P., Sainz, G., López, M., De La Cerda, J.M y Warren, A. 2005. Occurrence of pathogenic free-living amoebae and the indicators in a constructed wetland treating domestic wastewater. Eng. Life Sci. 5(3): 1-6.

Rodríguez, Z. S.1994. Ecology of Free-Living Amoebae. Critical Rev. Microbiol. 20(3):225-241.

Sawyer, T. K., Nerad, T.A., Lewis, E.J. y McLaughlin, S. M. 1993. *Acanthamoeba stevensoni* . sp. (Protozoa: Amoebida) from sewage-contaminated shellfish beds in Raritan Bay, New York. J. Microbiol. 40(6): 742-746.

Schuster, F.L. y Visvesvara, G.S. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int. J. Parasitol. 34:1001-1027.

Zelikson R. Microorganisms and Viruses in Groundwater Environmental Science and Pollution Control. Series Haifa University- Oranim Pp. 435-436

Zoller, U. 1994. Groundwater Contamination and Control. Marcel Dekker, Inc. New York. Pp. 410