



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“Detección de Amibas de Vida Libre en pozos de agua potable del
Municipio de Tizayuca, Hidalgo.”**

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 :

Guadalupe Lizbeth Morales Pérez

DIRECTORA DE TESIS:

M. EN C. ELIZABETH RAMIREZ FLORES





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.

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MEXICO 2012

A G R A D E C I M I E N T O S

Por todas las facilidades brindadas para la realización de este trabajo le agradezco a la:

Subgerencia de Explotación y Monitoreo Geohidrológico

Gerencia de Aguas Subterráneas

Subdirección General Técnica

Comisión Nacional del Agua (CNA)

Al programa PAPCA 2010-2011 de la FES Iztacala, UNAM, por el apoyo económico otorgado para la realización de esta investigación.

A mis sinodales: la profesora Esperanza Robles Valderrama, la maestra Dolores Hernández Martínez, Dr. Victor Manuel y la Dra. Patricia Bonilla Lemus, gracias por todas sus atenciones, tiempo y valiosos comentarios.

A mi directora de Tesis la Maestra Elizabeth Ramírez Flores por su apoyo, paciencia y dedicación.

Contenido

Resumen	5
Introducción.....	6
Marco Teórico	8
Amibas de vida libre.....	8
Acuíferos.....	11
Antecedentes	12
Justificación.....	14
Objetivos	15
Área de Estudio.....	16
Materiales y Métodos	18
Trabajo en Campo	18
Trabajo en laboratorio	19
Resultados y Discusión	21
Presencia de AVL	21
Riqueza Específica	21
Frecuencia	23
Distribución Temporal	25
Distribución Espacial.....	26
Parámetros fisicoquímicos	28
Análisis Estadístico	32
Conclusiones.....	33
Referencias Bibliográficas.....	34

Resumen

El agua utilizada en las actividades humanas procede tanto de fuentes superficiales, como subterráneas, pero se requiere que el recurso sea apto para el consumo humano. Los mantos subterráneos constituyen una de las principales fuentes de abastecimiento de agua potable en México. Sin embargo en las últimas décadas algunos estudios han reportado que en el agua subterránea existen microorganismos como lo son algunas especies de amibas de vida libre (AVL) que pueden afectar la salud de los consumidores. Por lo que en éste trabajo se determinó la presencia de AVL en pozos de agua potable del Municipio de Tizayuca, Hidalgo. Se realizaron 6 muestreos bimensuales, se colectaron 1000 ml de agua en recipientes de plástico estériles, *in situ* se midieron los parámetros de pH, temperatura y Oxígeno Disuelto. Las muestras se filtraron a través de membranas de 1.2 micras que se colocaron en placas de medio Agar no Nutritivo con la bacteria *Enterobacter aerogenes* para el aislamiento de las AVL. Posteriormente las placas se incubaron a 30°C y se revisaron después de ocho días para observar el crecimiento amibiano, las cuales se identificaron por morfología, siguiendo las claves taxonómicas de Page 1988. Se detectaron AVL en los 6 pozos, en donde se encontraron 13 especies pertenecientes a 9 géneros: *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Mayorella*, *Platyamoeba*, *Rosculus*, *Thecamoeba*, *Vahlkampfia*, *Vannella* y *Vexillifera*, siendo *Hartmannella vermiformis* la que se presentó con mayor frecuencia (44%). El pozo con mayor número de aislamientos fue el pozo 9 con 15 aislamientos. De las amibas encontradas en los pozos solamente *A. polyphaga* se ha reportada como patógena y los géneros *Hartmannella*, *Vahlkampfia* y *Vannella* se han encontrado asociadas a infecciones oculares y cerebrales; esto es una llamada de atención para tener precaución en el uso del agua y no descuidar su desinfección, para evitar un posible riesgo de salud a los usuarios. No se encontraron relaciones estadísticamente significativas entre las amibas y los parámetros fisicoquímicos analizados.

Introducción

El agua es un recurso natural indispensable para la vida, es renovable pero su calidad disminuye de manera paulatina, lo que puede dar lugar a problemas de escasez. A pesar de que tres cuartas partes del planeta están cubiertas de agua, sólo una mínima parte es apta para el consumo humano. La importancia del agua para la vida en la Tierra se debe principalmente a que es el componente mayoritario en la estructura de los seres vivos, esencial para su metabolismo (CNA 2002).

El agua procede tanto de fuentes superficiales, como subterráneas, desde donde es transportada a través de grandes conducciones, potabilizada en estaciones de tratamiento y a continuación, elevada a depósitos desde donde se distribuye por todas las viviendas mediante una red de abastecimiento (CNA 2002).

Los mantos subterráneos constituyen una de las principales fuentes de abastecimiento de agua potable en México. El agua subterránea localizada en la Cuenca del Balsas es de vital importancia para el abastecimiento de la población de varios estados de nuestro país, por lo que se requiere que este recurso sea apto para consumo humano, sin embargo la descarga de aguas residuales en zonas permeables puede alterar la calidad de la misma. El crecimiento poblacional ha provocado que una gran cantidad de asentamientos irregulares que en ocasiones no cuentan con un sistema de suministro de agua potable, así como un sistema de drenaje regularizado; los habitantes viertan sus aguas residuales a corrientes o ríos y otros cuerpos de agua natural (CNA 2002).

El agua subterránea, por lo general, alberga sólo a ciertos organismos debido a su bajo contenido en materias nutritivas. Sin embargo, las actividades humanas y el crecimiento urbano son los principales factores para la contaminación de los

acuíferos. De esta forma, el agua puede contener contaminantes químicos y biológicos que causan diversas enfermedades. Estos padecimientos son causados por bacterias, virus y protozoarios que se dispersan principalmente a través de la ruta fecal-oral y que potencialmente puede ser transmitidos por el agua de consumo utilizada para diversas actividades en el hogar, incluyendo la higiene personal o a través del contacto primario con aguas para uso recreativo contaminadas. Entre estos microorganismos están las amibas de vida libre (AVL), que pueden causar daño al sistema nervioso central en el humano y otros animales (Ramírez *et al*, 2009).

Las AVL del orden *Amoebida*; se han encontrado en una gran diversidad de hábitats: atmósfera, agua (albercas, lagos, etc.) y como flora normal en seres humanos. Estas amibas llaman la atención por su capacidad de causar enfermedad, e incluso la muerte en el humano. Por mucho tiempo las AVL fueron consideradas protozoarios sin importancia para la comunidad médica, hasta que *Naegleria* y *Acanthamoeba* mostraron capacidad de causar graves enfermedades en el hombre, detectándose posteriormente que otros dos géneros *Balamuthia* y *Sappinea* también producen graves infecciones cerebrales (Ferreira, 1994; Visvesvara *et al.*, 2007). Las enfermedades ocasionadas por las AVL son Meningoencefalitis amebiana primaria (MAP), Encefalitis amebiana Granulomatosa (EAG), Queratitis Amebiana (QA) e infecciones de la piel (Oddó 2006; Visvesvara *et al.*, 2007).

Marco Teórico

Amibas de vida libre

Las Amibas de Vida Libre son protozoarios anfizoicos término usado para describir la capacidad de estos microorganismos para vivir en el ambiente externo, es decir exozoico, y para vivir como parásito facultativo en el cuerpo de animales y seres humanos, es decir endozoico. Son cosmopolitas que habitan ambientes húmedos como el suelo y el agua, aunque también se pueden encontrar en el aire, vehículo que utilizan como medio de dispersión. Las AVL patógenas son más frecuentes en cuerpos de agua con temperatura por arriba de los 25° C y aguas naturales de los trópicos y subtrópicos (Bonilla *et al.*, 2004; Oddó 2006).

En los ecosistemas acuáticos desempeñan un papel muy importante en el mantenimiento del flujo de energía y el reciclado de los nutrimentos. Su eficiencia en el uso de los recursos los convierte en un enlace fundamental entre los organismos desintegradores y aquéllos pertenecientes a niveles tróficos superiores (Bonilla *et al.*, 2004).

Dentro de este grupo de protozoarios, existen 4 géneros importantes, que pueden causar daño al hombre y animales. Entre ellos tenemos al género *Naegleria* con la especie patógena; *Naegleria fowleri*, causante de Meningoencefalitis amebiana primaria (MAP), enfermedad fulminante que ocurre en personas sanas que han tenido contacto con agua a temperaturas elevadas e insuficiente cloro libre

residual. Otra especie es *Balamuthia mandrillaris*, amiba oportunista causante de encefalitis amibiana Granulomatosa y lesiones cutáneas. El tercer género es *Acanthamoeba* con varias especies, causante de infecciones cerebrales en pacientes inmunocompetentes e inmunosuprimidos, que también causa infecciones oculares, principalmente en individuos usuarios de lentes de contacto. Finalmente se reportó un caso de encefalitis, pero sin la formación de granulomas, causado por *Sappinea pedata* (Suárez *et al.*, 2002; Visvesvara *et al.*, 2007; Bonilla *et al.*, 2008).

Las AVL se han encontrado distribuidas ampliamente alrededor del mundo y se han aislado de diversos medios tales como: agua de río, piscinas, tierra, agua mineral, unidades de aire acondicionado, equipos de diálisis, lentes de contactos e incluso de las secreciones nasales y exudados faríngeos de pacientes con enfermedades respiratorias, pero también de pacientes sanos (Viera y Gotuzzo, 2001).

Naegleria fowleri

Las amibas de la especie *N. fowleri* son termófilas y pueden desarrollarse y multiplicarse por división binaria a temperaturas de 40 a 45 °C en el medio ambiente y en cultivos de laboratorio. En el medio acuoso y cálido los trofozoitos pueden originar una forma transitoria, la que puede reconvertirse a trofozoito de forma espontánea, además como respuesta a condiciones ambientales adversas los trofozoitos se enquistan. El enquistamiento se produce en el agua y en los medios de cultivo, pero no en los tejidos. Los quistes son altamente susceptibles a la desecación y se destruyen rápidamente en condiciones de sequedad; el desenquistamiento ocurre en un ambiente acuoso y de alta temperatura. *Naegleria fowleri* es un protozoo ubicuo y se presenta en todo el mundo, ha sido encontrado en el suelo, polvo, agua dulce, piscinas, lagos, reservorios de agua doméstica, sistemas de humidificación, aguas residuales y en las fosas nasales de individuos sanos. Se desarrolla bien en climas tropicales y temperaturas calurosas entre 40 y

45 °C, en aguas termales naturales limpias y contaminadas y agua de piscina calentada artificialmente. Se ha observado que las cepas de *N. fowleri* adaptadas a altas temperaturas son virulentas en los animales de experimentación, mientras que las cepas no termófilas no presentan virulencia (Bonilla *et al.*, 2004; Oddó, 2006; Visvesvara *et al.*, 2007).

Acanthamoeba spp

El trofozoíto de *Acanthamoeba* presenta unas proyecciones finas llamadas acantópodos, su citoplasma es granular con numerosas vacuolas alimentarias, distribuidas alrededor del núcleo. El núcleo es evidente como una estructura retráctil, con un cariosoma redondeado. Los quistes de *Acanthamoeba* spp, son estrellados o poligonales y tienen una doble pared, miden de 6 a 30 µm de diámetro, aunque generalmente son de 15 a 25 µm.

Las acantamibas son ubicuas y se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, se han aislado de numerosos hábitats, como enfriadores de agua, filtros de acondicionadores de aire, agua de mar, agua de charcos, aguas residuales, lagunas, ríos, polvo, estaciones de lavado ocular e incluso de la boca y de la nariz de individuos sanos (Bonilla *et al.*, 2004; Oddó, 2006).

Balamuthia mandrillaris

El ciclo de vida de *B. mandrillaris* presenta un trofozoíto grande de aproximadamente 40 a 50 µm y un quiste con triple pared. *Balamuthia mandrillaris* no había sido aislada del medio ambiente, como *Naegleria* y *Acanthamoeba*, solamente se había recuperado de muestras de autopsia de humanos y animales infectados; hasta que recientemente se aisló de tierra de macetas. Su hábitat principal es el suelo y desde ahí pueden llegar a los cuerpos de agua arrastradas por escurrimientos o a través del aire (Dunnebacke *et al.*, 2003; Bonilla *et al.*, 2004; Oddó, 2006).

Los factores ambientales favorables para el desarrollo de las amibas patógenas son intervalos de temperatura entre 30° y 45° C, niveles óptimos de oxígeno entre 2.8 a 4.8 mg/l, pH cercano a la neutralidad, alimento suficiente (bacterias y materia orgánica) y un mínimo de humedad; sin embargo, gracias a la formación del quiste pueden soportar variaciones amplias de estos factores. En piscinas la presencia de cloro libre residual en concentraciones de 2 mgL⁻¹ puede inhibir su presencia (Bonilla *et al.*, 2004).

Sappinia pedata (diploidea)

Hasta la fecha solamente se ha informado de un solo caso clínico, en el que el manejo de ganado fue un factor importante en la transmisión del parásito. Esta ameba se ha aislado de suelo contaminado con heces de bovino, de otros animales y del humano. Por lo que se piensa que su ciclo de vida tal vez implique un huésped animal intermediario, a diferencia de las otras amibas de vida libre patógenas que no dependen de un huésped para la transmisión y distribución de la enfermedad (Bonilla y Ramírez, 2008).

Acuíferos

La mayor parte de los espacios porosos de las rocas bajo el nivel freático están llenos de agua. Pero las rocas tienen una porosidad diferente y características permeables diferentes, lo que significa que el agua no se mueve de igual manera en todo tipo de rocas. Cuando la roca almacenadora de agua permite que la misma se fluya hacia los pozos y en los arroyos, recibe el nombre de “acuífero” (IMTA, 2008).

De manera general, un acuífero es una unidad geológica saturada que contiene y transmite agua de buena calidad, de tal manera que pueda extraerse en cantidades económicamente aprovechables. De acuerdo con las condiciones de

presión a que se encuentra sometida el agua en el subsuelo, los acuíferos se clasifican en: libre, confinado, colgado y poroso (IMTA, 2008).

Acuíferos libres: es aquel acuífero que se encuentra en contacto directo con la zona subsaturada del suelo. En este acuífero la presión de agua en la zona superior es igual a la presión atmosférica, aumentando en profundidad a medida que aumenta el espesor saturado (Sánchez, 2001).

Acuíferos confinados: es aquel que se encuentra cubierto por algún nivel relativamente impermeable. En estos acuíferos la presión del agua es mayor que la presión atmosférica. (Sánchez, 2001).

Acuíferos colgados: se presentan por debajo del nivel freático una o más capas de material de baja conductividad hidráulica. El agua que se infiltra es detenida por esta capa para formar una lente de agua, la cual es generalmente de extensión limitada y se encuentra sobre la zona de saturación del acuífero principal (Price, 2007).

Acuíferos porosos: el agua circula a través de sus poros o espacios existentes entre los granos del terreno (Price, 2007).

Antecedentes

Se han detectado AVL en agua subterránea de algunos acuíferos de México, como los de Cuernavaca, Zacatepec, Cuautla-Yautepec y Tepancingo-Axochiapan en el estado de Morelos y en el acuífero del Valle del Mezquital en el estado de Hidalgo entre otros.

- Novarino *et al.* en 1997 menciona que los flagelados pequeños predominan en los acuíferos, aunque las amibas y de vez en cuando los ciliados pueden estar presentes en menos proporción. Reportando los siguientes géneros

amibianos: *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Mayorella*, *Rosculus*, *Vahlkampfia*, *Vannella* y *Platyamoeba*.

- En el 2006, Ramírez y col. publicaron un estudio de aguas subterráneas sobre AVL, en el Valle del Mezquital, Hidalgo, una zona contaminada por materia orgánica, aquí aislaron un total de 31 especies, representadas por ocho diferentes géneros: *Acanthamoeba*, *Echinamoeba*, *Hartmannella*, *Mayorella*, *Platyamoeba*, *Vahlkampfia*, *Vannella* y *Vexillifera*. *Acanthamoeba* fue la más frecuente y 6.5% de éstas fueron patógenas en animales de experimentación.
- Campos en 2007 realizó un trabajo de la distribución temporal de las amibas de vida libre en dos manantiales del acuífero del Valle de Cuernavaca, Morelos, realizando 12 muestreos mensuales de Mayo del 2005 a Abril del 2006. Obtuvo amibas de los siguientes géneros: *Hartmannella*, *Naegleria*, *Vannella*, *Vahlkampfia*, *Rosculus*, *Dactylamoeba*, *Platyamoeba* y *Filamoeba*.
- Limón en el 2007 reportó la distribución temporal y espacial de las AVL en ocho pozos del acuífero de Zacatepec, Morelos; dónde encontró que *Hartmannella vermiformis* fue la más frecuente con el 41.5%, también encontró dos especies de *Acanthamoeba* reportadas como patógenas *A. polyphaga* y *A. royreba*.
- Beltrán en 2008 realizó un estudio de las Amibas de Vida Libre en 10 pozos del acuífero de Cuernavaca, Mor., en el periodo de un año, encontrando 19 especies pertenecientes a 14 géneros. La especie más frecuente fue *Hartmannella vermiformis* con el 24%.
- Ramírez *et al.* en el 2009 determinaron la presencia de amibas de vida libre en el agua subterránea del acuífero de Zacatepec, Morelos. Para ello se realizaron muestreos mensuales durante un año de 13 pozos. Se detectaron Amibas de Vida Libre en todos los pozos. Se aislaron 22 especies pertenecientes a 16 géneros, el género más frecuente fue

Hartmannella con un 38.1%. De las amibas reportadas como patógenas, se detectó *Acanthamoeba polyphaga*, pero en baja frecuencia (6.6%).

- Vicente en 2009 realizó un estudio de la distribución temporal y espacial de AVL presentes en pozos de la zona suroeste del acuífero de Zacatepec, Morelos; encontrando 21 especies de AVL pertenecientes a 16 géneros. La especie con mayor frecuencia fue *Hartmannella vermiformis* que se ha encontrado asociada a infecciones cerebrales y oculares. Se encontraron dos especies con potencial patógeno: *Acanthamoeba polyphaga* y *Acanthamoeba royreba* con uno y dos aislamientos, respectivamente.
- Gómez en el 2009 reportó la distribución temporal y espacial de Amibas de Vida Libre presentes en agua subterránea del Acuífero de Cuautla, Morelos. Obteniendo 29 especies de Amibas de Vida Libre pertenecientes a 16 géneros diferentes. Encontrando con mayor frecuencia a *Hartmannella vermiformis* y las amibas con potencial patógeno: *Acanthamoeba castellanii* y *Acanthamoeba polyphaga*, pero también en bajos porcentajes.

Justificación

El agua es uno de los recursos naturales fundamentales y es uno de los recursos básicos en que se apoya el desarrollo, puesto que sirve para satisfacer diversas actividades humanas. Sin embargo no todas las personas disponen de él, esto sucede por varios motivos, entre los cuales se puede mencionar la desigual distribución natural del agua en la superficie terrestre. Esta imposibilidad lleva a situaciones de escasez y cuanto mayor es el desarrollo, mayor es la capacidad para obtenerla y mayor es su contaminación, convirtiéndose en agua nociva y de calidad deficiente.

El agua subterránea se ha usado ampliamente para uso doméstico ya que se consideraba una fuente de agua inagotable y de buena calidad; pero es susceptible de contaminarse y los mantos acuíferos han sido objeto de

sobreexplotación. En la parte central de México una parte importante de la población se abastece con el agua extraída a través de los pozos (CNA, 2002).

La importancia que ha cobrado el tema sobre la calidad del agua ha permitido evidenciar que entre los factores o agentes que causan la contaminación de ella están: agentes patógenos, tales como bacterias, virus y protozoos como las Amibas de Vida Libre, las cuales han cobrado importancia debido a su patogenicidad y las graves infecciones que produce, principalmente en el sistema nervioso central. Por lo que la mayoría de los estudios de este grupo de amibas, se ha enfocado a su patogenicidad y son relativamente pocos los que se han realizado acerca de su ecología. Si bien se conoce de manera general su distribución en la naturaleza y los factores que las afectan, aún falta conocer con más detalle cómo se dan estas relaciones.

Es por eso que con este trabajo se pretende ampliar el conocimiento acerca de la ecología de estas amibas, que podría ayudar a establecer medidas para la prevención y control de las enfermedades que causan las AVL, ya que si se detecta que algún parámetro físico o químico favorece la presencia de las amibas, se le podría dar tratamiento al agua para cambiar o eliminar ese parámetro. Por otra parte, cabe mencionar que el estudio de los organismos presentes en el agua subterránea, han sido pocos en comparación con los del agua superficial, por lo que esta investigación también contribuirá al conocimiento de la biología de este ambiente.

Objetivos

- General

Determinar la presencia de las Amibas de Vida Libre en seis pozos de agua del municipio de Tizayuca, Hidalgo.

- Particulares
- Determinar la Riqueza Específica de las Amibas de Vida Libre en los pozos de agua.
- Determinar la distribución espacio-temporal de las Amibas de Vida Libre.
- Determinar los siguientes Parámetros Físicoquímicos: pH, Temperatura y Oxígeno Disuelto.
- Relacionar la presencia de las Amibas de Vida Libre con los parámetros físicoquímicos.

Área de Estudio

El centro del país depende fundamentalmente del agua subterránea para abastecimiento de agua potable. El municipio de Tizayuca en el estado de Hidalgo, se encuentra situado a los 19° 50´ de latitud Norte y 98° 59´ de longitud Oeste del Meridiano de Greenwich a una altura de 2,260 metros sobre el nivel del mar. Tizayuca es atravesado por el río el Papalote, el cual viene de Pachuca y llega a Zumpango. En la zona se encuentran 42 pozos en operación. Colinda al Norte con Tolcayuca y el Estado de México al Sur y cuenta con un clima generalmente semifrío, subhúmedo con lluvias en verano, de mayor humedad.

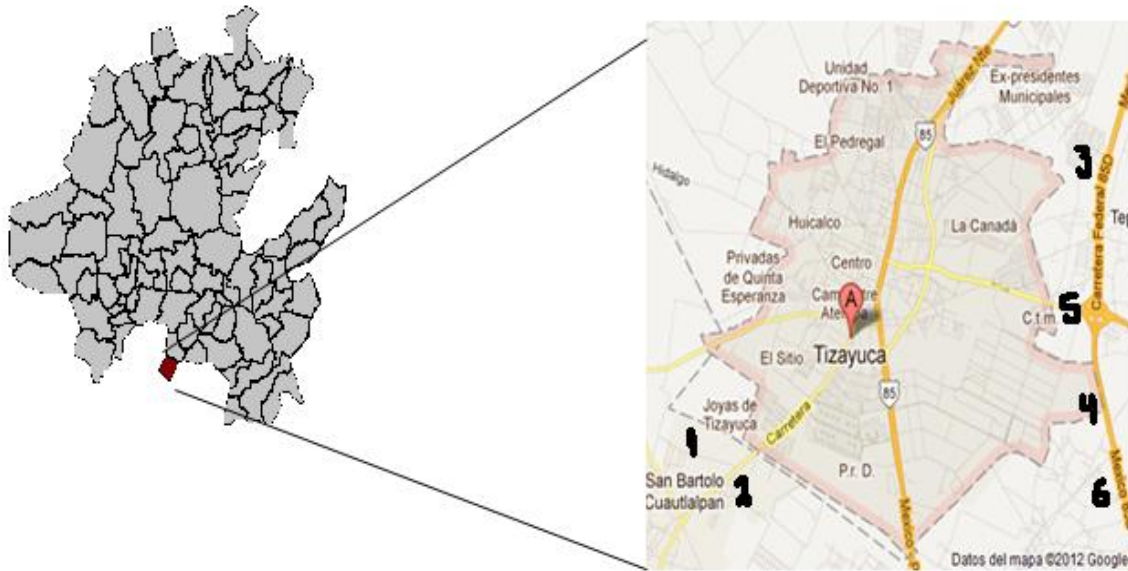


Figura 1. Localización de los pozos en el Municipio de Tizayuca, Hidalgo

Tabla 1. Descripción de los pozos muestreados en el municipio de Tizayuca, Hidalgo.

No. de Pozo	Nombre	Coordenadas	Dirección	Descripción
T1	Pozo ZUM 39	L. N – 19° 49' 44.2'' L.O – 99° 01' 6.5''	Km 4+100 caminos de operación Tizayuca-Coyotepec, San Bartolo Cuautlalpan Zumpango, Méx.	Zona rural, zonas de cultivo, pastoreo de ganado, tiradero de basura a unos kilómetros.
T2	Pozo ZUM 35	L. N – 19° 49' 17.0'' L.O – 99° 02' 11.2''	Km 6+200 camino de operación Tizayuca-Coyotepec, San Bartolo Cuautlalpan Zumpango, Méx	Zona rural, áreas de cultivo, zonas de pastoreo de ganado.
T3	Pozo 9	L. N – 19° 52' 95.9'' L.O – 98° 56' 51''	Km 56+000 Carretera Federal Méx-Pachuca Tizayuca Hidalgo.	Gasolinera a un lado, al frente carretera, al otro costado una serie de comercios.

T4	Pozo 12 A	L. N – 19° 53' 07.6'' L.O – 98° 56' 27''	Km 57 +000 Carretera Federal Méx-Pachuca Tizayuca Hidalgo	Zona urbana.
T5	Pozo 3 BIS	L. N – 19° 49'21.1'' L.O – 98° 58'38.2''	Km 50+600 Carretera Federal Méx-Pachuca Tizayuca Hidalgo	Zona urbana, pavimentado, comercios a su alrededor,
T6	Pozo 2	L. N – 19° 48'34.6'' L.O – 98° 58'28.3''	Km 49+100 Carretera Federal Méx-Pachuca Tecamac, Méx.	Zona urbana, unidades habitacional, pavimentado. A su alrededor hay presencia de basura.

Materiales y Métodos

Trabajo en Campo

Se realizaron seis muestreos bimensuales durante un año en seis pozos del municipio de Tizayuca. Para la determinación de las amibas de vida libre, se recolectaron 1000 ml de agua subterránea en envases esterilizados y se transportaron al laboratorio de Microbiología Ambiental en la UIICSE a temperatura ambiente para evitar cambios en la estructura de las amibas. Los pozos muestreados se encuentran en uso para consumo de agua potable, por lo que están entubados, las muestras se tomaron de la válvula que está antes de la cloración.

En el sitio se midieron los siguientes parámetros fisicoquímicos: pH (potenciómetro HANNA Instruments HI 8314), Oxígeno disuelto y temperatura (Oxímetro YSI. Mod. 51-b)

Trabajo en laboratorio

Aislamiento y cultivo de AVL

Las muestras de 1000 ml se filtraron a través de membranas Millipore de 1.2 μm de poro en condiciones estériles. Las membranas se colocaron hacia abajo en placas de medio agar no nutritivo con bacterias *Enterobacter aerógenes* (NNE) para el aislamiento de las amibas (Limón, 2007). Las placas se incubaron a 30° C y se revisaron después de ocho días para detectar el crecimiento amibiano, usando un microscopio invertido marca Zeiss.

Identificación morfológica

La identificación de las amibas se realizó tomando en cuenta sus características morfológicas tanto trófica como quística, se observaron las preparaciones al microscopio de contraste de fases marca Zeiss, a 400x y 1000x, y se siguieron las claves taxonómicas de Page (1988).

Prueba de tolerancia a la temperatura

De las cajas que tuvieron presencia de amibas registradas bibliográficamente como patógenas (géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria*) se realizó un resembrado por duplicado, las cuales se incubaron a 37° C y a 42° C por 48 hrs para observar el desarrollo de las amibas. La identificación de las amibas se realizó de la misma manera que a 30° C, tomando en cuenta sus características morfológicas tróficas y quísticas, se observaron las muestras al microscopio de contraste de fases a 400x y 1000x y se siguieron las claves taxonómicas de Page (1988).

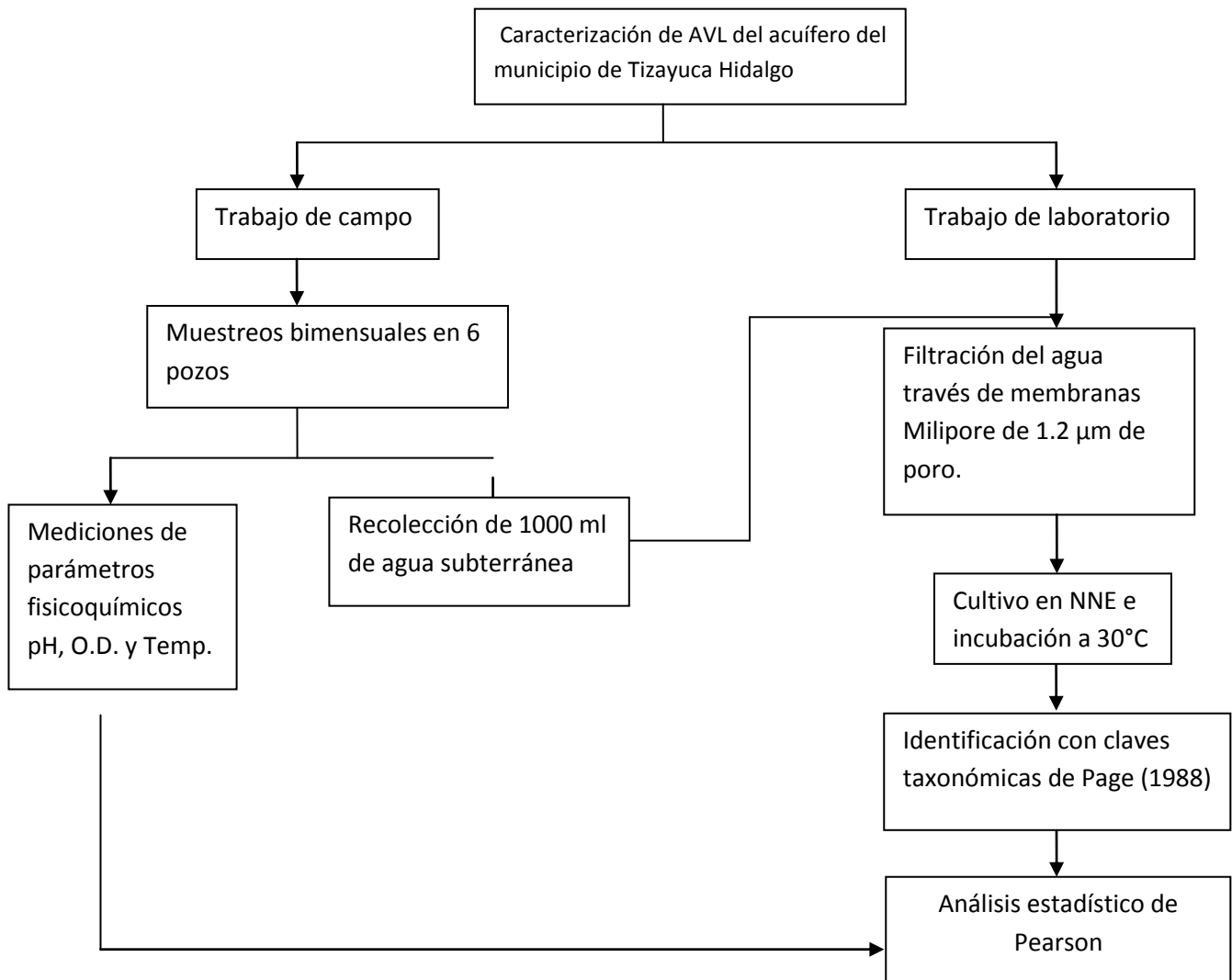


Figura 2. Diagrama de flujo del método para la determinación de las AVL.

Análisis estadístico

Se utilizó el coeficiente de Pearson para determinar la relación de las amibas de vida libre presentes en los pozos con los parámetros fisicoquímicos analizados (Durán *et al.*, 2003)

Resultados y Discusión

Presencia de AVL

En la tabla 2 se puede observar que las amibas de vida libre se presentaron constantemente en los pozos estudiados. En los pozos 35, 12A y 9 encontraron AVL durante todos los meses muestreados, en el pozo 2 en cinco de los seis meses, excepto noviembre del 2010 y en el pozo 39 en 4 muestreos, siendo febrero y mayo del 2011 los meses que no tuvieron presencia de amibas. En cambio en el pozo 3BIS, se aislaron amibas solamente en un mes (junio 2011) (Tabla 2). La presencia de amibas de vida libre en agua subterránea de nuestro país ya se había reportado con anterioridad en los acuíferos de Morelos y en el del Valle del Mezquital en Hidalgo (Ramírez *et al.*, 2006; Limón, 2007; Beltrán, 2008; Gómez, 2009; Vicente, 2009).

Tabla 2. Presencia de Amibas de Vida Libre en los pozos muestreados

POZOS	16/11/10	08/02/11	08/03/11	03/05/11	28/06/11	16/08/11
Pozo 39	+	-	+	-	+	+
Pozo 35	+	+	+	+	+	+
Pozo 12A	+	+	+	+	+	+
Pozo 9	+	+	+	+	+	+
Pozo 3BIS	-	-	-	-	+	-
Pozo 2	-	+	+	+	+	+

Con respecto a la riqueza específica se encontraron 13 especies de Amibas de Vida Libre pertenecientes a 9 géneros (Tabla 3), el cual es un número bajo en comparación con lo reportado por Vicente (2009), que encontró 21 especies de AVL pertenecientes a 16 géneros en el acuífero de Zacatepec. Esta diferencia se puede deber a que el acuífero de Zacatepec es un acuífero fracturado que permite que los contaminantes acarreados por agua de infiltración lleguen al agua subterránea (CNA, 2002).

Tabla 3: Amibas de Vida Libre encontradas en los pozos

GÉNERO	ESPECIE
<i>Acanthamoeba</i>	<i>polyphaga</i>
<i>Hartmannella</i>	<i>vermiformis</i>
<i>Mayorella</i>	<i>spatula</i>
<i>Platyamoeba</i>	<i>placida</i>
	<i>stenopodia</i>
<i>Rosculus</i>	<i>ithacus</i>
<i>Thecamoeba</i>	<i>similis</i>
	<i>striata</i>
<i>Vahlkampfia</i>	<i>avara</i>
	<i>ustiana</i>
<i>Vannella</i>	<i>miroides</i>
	<i>platypodia</i>
<i>Vexillifera</i>	<i>bacillipedes</i>

De las especies encontradas en esta investigación *Acanthamoeba polyphaga*, *Hartmannella vermiformis*, *Vahlkampfia avara*, *Vannella platypodia* y *Vexillifera bacillipedes* ya se habían reportado previamente en los acuíferos de Cuernavaca, Zacatepec y Cuautla del estado de Morelos (Campos, 2007; Limón, 2007; Beltrán,

2008; Gómez, 2009; Vicente, 2009). La coincidencia en algunas especies se puede deber a que tanto el acuífero donde están localizados los pozos estudiados y los acuíferos de Morelos, se encuentran en un estado de contaminación orgánica relativamente bajo (Robles *et al*, 2012 en revisión).

La mayoría de las amibas que se presentaron no han sido reportadas como patógenas, esto se puede deber a que predominaron temperaturas por debajo de los 30°C, lo que no favoreció la presencia de las amibas patógenas, las cuales son termófilas Bonilla *et al.*, 2004).

De acuerdo con lo que menciona Ramírez *et al.* en el 2009, la presencia en el acuífero de las amibas de los géneros *Hartmannella*, *Vannella* y *Vahlkampfia* puede ser importante, porque se han reportado asociadas a infecciones; *Hartmannella* se encontró en un caso de encefalitis (Centeno *et al.*, 2006) y los tres géneros se han reportado asociadas a casos de queratitis amebiana, aunque no se ha podido comprobar su papel como causantes de las enfermedades (Aitken *et al.*, 1996; Dua *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 1998; Lorenzo *et al.*, 2007).

Frecuencia

La especie con mayor frecuencia de aparición en este estudio fue *Hartmannella vermiformis* con el 44%, seguida de *Vexillifera bacillipedes* con un 13%, *Vahlkampfia avara* con un 13%. Con menor frecuencia se presentaron *Platyamoeba stenopodia*, *Vannella miroides*, *Mayorella spatula*, *Thecamoeba striata*, *Vahlkampfia ustiana*, con solo un 2% (Gráfico 1). La predominancia de *H. vermiformis* fue similar a la reportada por Limón (2007), Beltrán (2008), Vicente, (2009) y Gómez (2009) en los acuíferos de Morelos, en donde también se encontró esta amiba como la más frecuente.

Respecto a las Amibas de Vida Libre reportadas como patógenas, se encontró a la especie *Acanthamoeba polyphaga*, pero con poca frecuencia ya que únicamente se presentó en el muestreo 2 en el pozo 9 y en el muestreo 6 en el pozo 39. Esto

contrasta con lo reportado por Ramírez *et al.*, en 2006 en el acuífero de Valle del Mezquital, Hidalgo, en donde *Acanthamoeba* se presentó con una frecuencia de 67.3% (Ramírez *et al.*, 2006). Esto se puede deber a que el quiste de *Acanthamoeba* es muy resistente y puede soportar condiciones de mayor contaminación que otras amibas, como la que se presenta en el acuífero del Valle del Mezquital (Ramírez *et al.*, 2009).

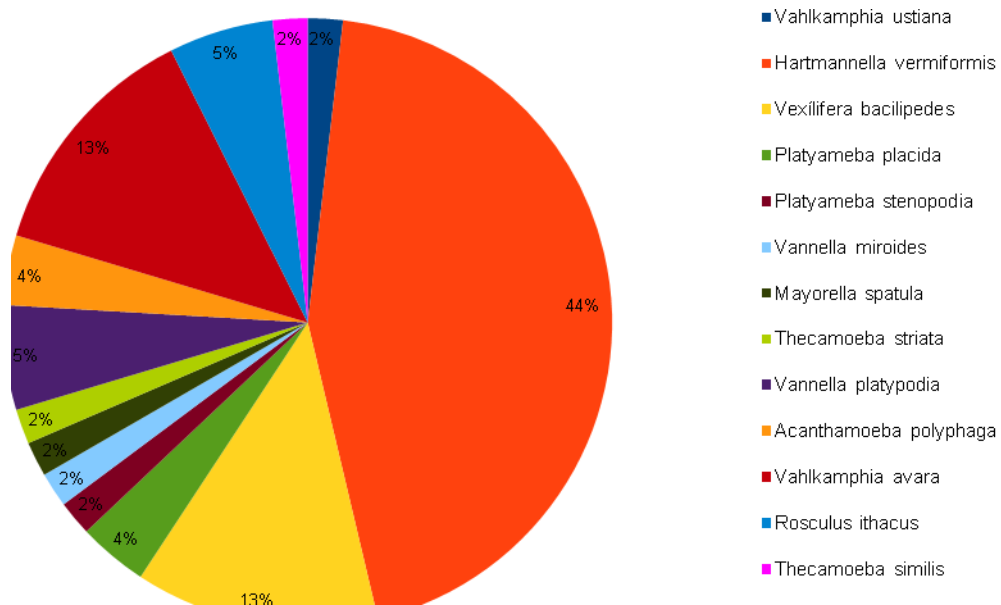


Gráfico 1: Frecuencia de AVL en pozos del municipio de Tizayuca, Hidalgo.

Distribución Temporal

La presencia de las amibas de vida libre a lo largo del período de estudio fue variable, no se observó un patrón de comportamiento similar entre los pozos y aunque el número de aislamientos amibianos que se encontró fue bajo (1 a 5), se presentaron amibas en todos los meses (Gráfico 2).

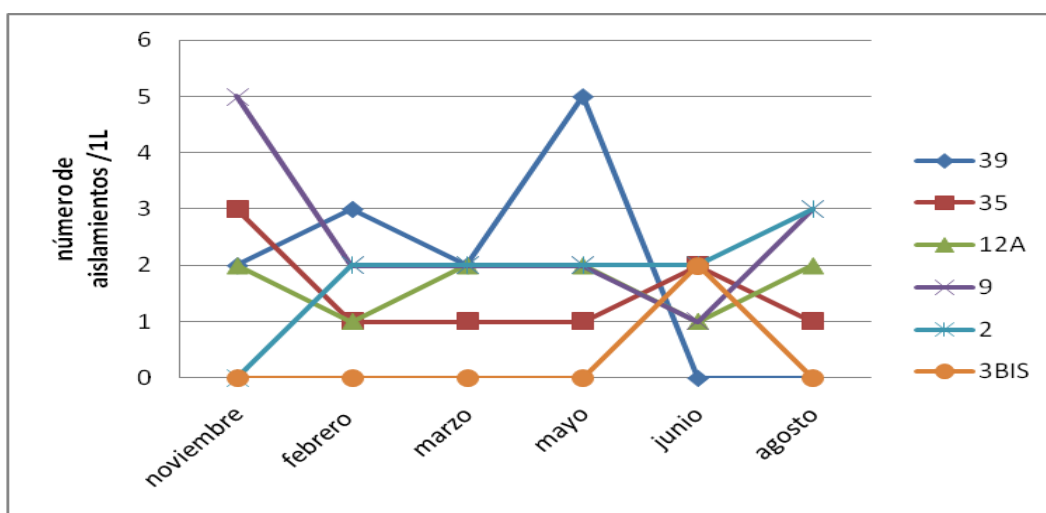


Gráfico 2. Distribución las amibas de vida libre en cada uno de los meses.

Cuando se observa la distribución temporal global, se aprecia que se presentaron dos picos (Gráfico 3), el primero en noviembre y el segundo en agosto. Noviembre también ha sido reportado como el mes de mayor número de aislamientos en los acuíferos de Morelos y del Valle del Mezquital (Ramírez *et al.*, 2006; Limón, 2007; Beltrán, 2008; Gómez, 2009; Vicente, 2009). Lo anterior llama la atención, porque se sabe que las amibas proliferan mejor en verano, cuando la temperatura ambiental es mayor; pero hay que recordar que el agua subterránea no está influenciada por la temperatura ambiente por lo que las

amibas se pueden presentar en cualquier temporada del año (Ramirez *et al.*, 2009).

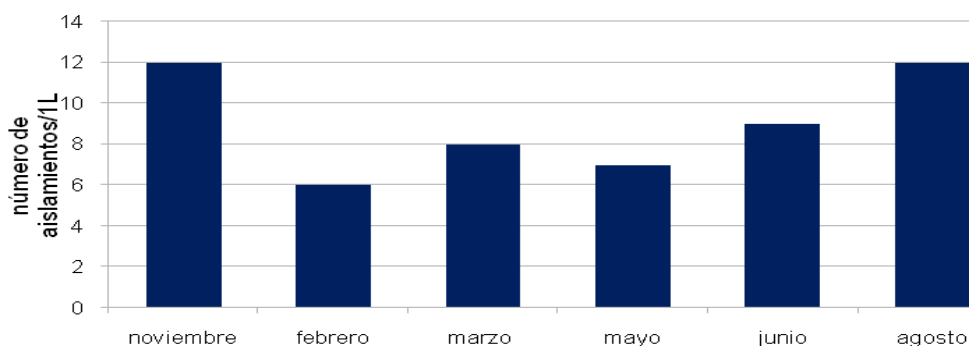


Gráfico 3: Distribución temporal global de las AVL en los pozos del municipio de Tizayuca, Hidalgo

Distribución Espacial.

Se aislaron amibas en todos los pozos estudiados, pero en números bajos e incluso en algunos no se encontraron amibas. Este fue el caso del pozo 3Bis, en donde solamente se aislaron amibas en el mes de junio (Gráfico 4). Esto se puede deber a que el acuífero donde se localizan los pozos no presenta fracturas en su formación, como en el caso de los acuíferos de Morelos, por lo que a pesar de que algunos pozos (39 y 35) se encontraban en zonas no pavimentadas (Tabla 1), el agua de escurrimiento que se infiltra no alcanza al acuífero y no hay un aporte importante de contaminación al agua subterránea (CNA, 2002; Ramírez *et al.*, 2006). Esto concuerda con lo observado por Bitton y Gerba (1984), en el sentido de que en acuíferos con agua relativamente limpia, el número de protozoos es bajo o aún cero, mientras que en acuíferos contaminados orgánicamente su abundancia puede ser alta.

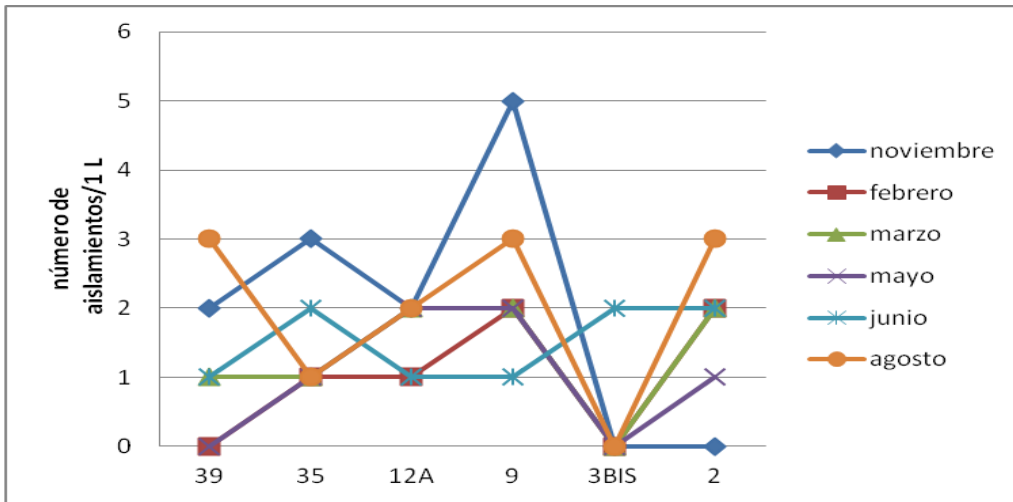


Gráfico 4. Distribución de las amibas de vida libre en cada uno de los pozos.

Con respecto a la distribución espacial global se observó que el pozo 9 presentó el mayor número de amibas de vida libre durante todo el período de muestreo y que fue el único en donde se aisló *Acanthamoeba polyphaga*, esto se pudo deber a que fue donde se detectó la temperatura promedio más alta (29.5°C) (Tabla 4).

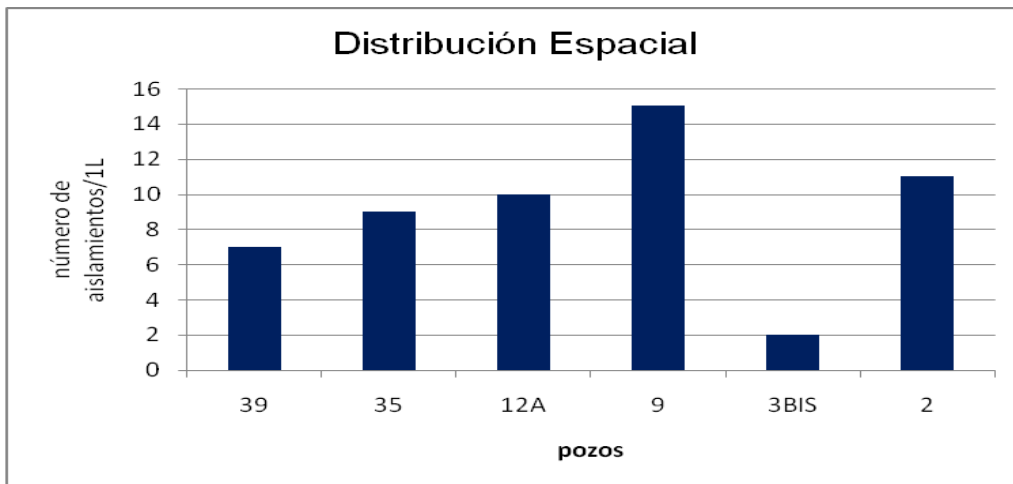


Gráfico 5: Distribución espacial de las AVL del Municipio de Tizayuca, Hidalgo

Parámetros fisicoquímicos

Los resultados de los parámetros fisicoquímicos pH, temperatura y oxígeno disuelto se pueden observar en la tabla 4.

Tabla 4: Parámetros fisicoquímicos de los pozos muestreados en el municipio de Tizayuca, Hidalgo

	Pozo 39 ZUM	Pozo 35 ZUM	Pozo 12A	Pozo 9	Pozo 3BIS	Pozo 2
pH	7.79	7.67	6.92	7.42	7.38	7.62
	7.68	7.64	7	7.18	7.17	7.37
	7.53	7.54	6.37	6.94	7.22	7.42
	8.09	7.91	6.54	7.33	7.4	7.59
	7.74	7.94	6.39	7.94	7.24	7.6
	8.27	8.03	6.92	7.69	7.65	7.82
promedio	7.85	7.78	6.69	7.41	7.34	7.57
T	25	25	29	30	24	24
	26	26	29	31	24	25
	26	27	28	27	25	24
	26	27	31	32	27	26
	26	29	27	25.5	25	26
	24	25	27	30	24	24
promedio	25.5	26.5	28.5	29.25	24.83	24.83
O.D	3.8	3	3.2	3.4	2.4	3.8
	4	4.7	4	5	3.8	4.2
	3.2	3.2	0.8	2.6	3	2.8
	5.2	4.8	2.2	5.4	4.8	4.4
	4.6	4.6	3.7	5.8	5	4.2
	5.2	3.6	3.4	4.4	3.8	3.5
promedio	4.33	3.983	2.8833	4.433	3.8	3.8166

El pH se mantuvo prácticamente constante en los pozos durante el periodo de estudio, el valor menor fue de 6.37 que se registró en el mes de marzo en el pozo 12 A y el valor máximo fue de 8.27, registrado en el mes de agosto en el pozo 39 ZUM (Tabla 4). (Gráfico 16). De forma general se puede decir que los valores detectados están cercanos a la neutralidad, que es lo reportado para la presencia de las amibas (Bonilla y cols., 2004).

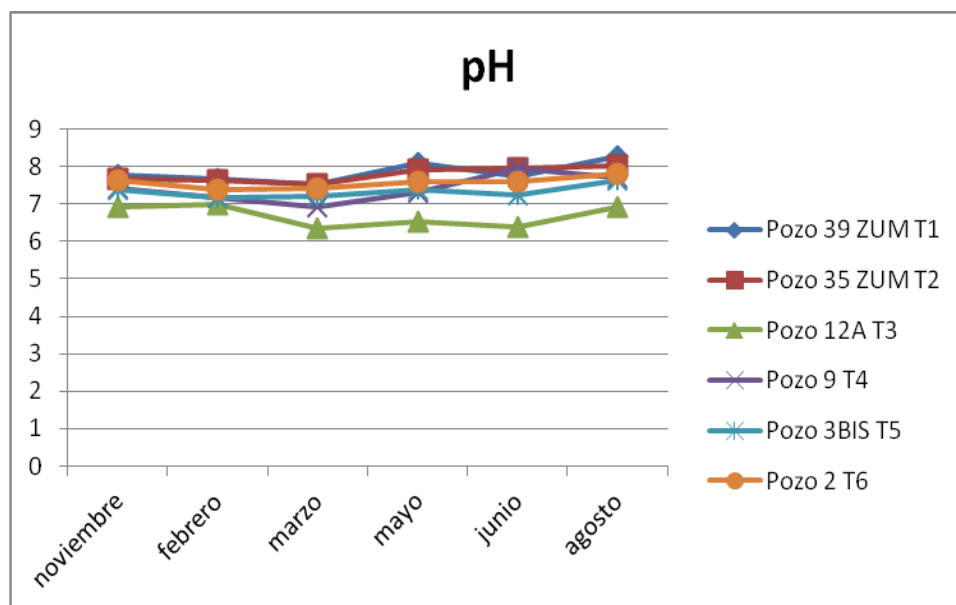
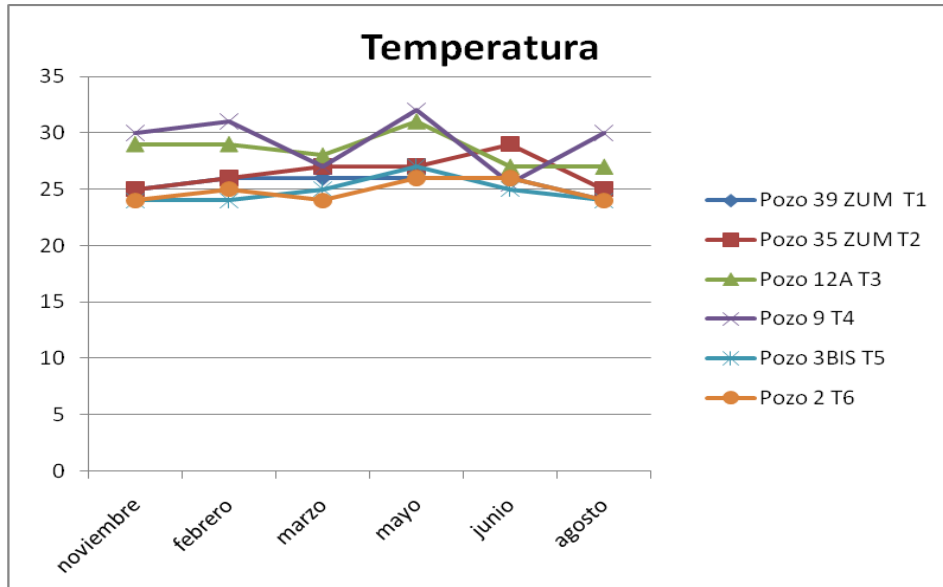


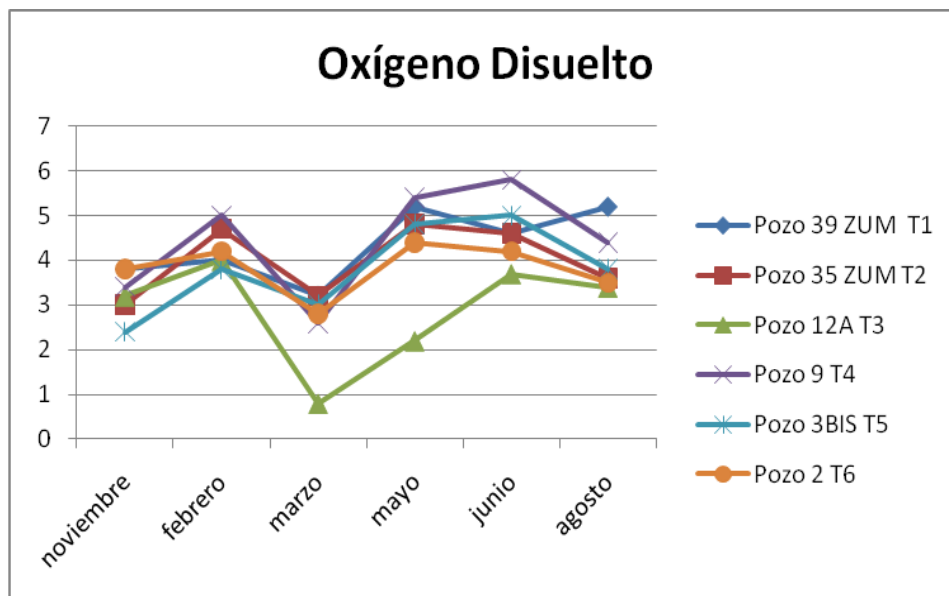
Gráfico 6: Valores de pH medidos en los pozos durante los seis muestreos

La temperatura osciló entre 24 y 32°C, el valor mínimo se detectó en varios meses (noviembre, febrero, marzo y agosto) mientras que el valor máximo se registró únicamente en el mes de mayo (Tabla 4). Los pozos que presentaron las temperaturas mayores fueron el 9 y el 12A (Gráfico 17). Debido a que en general la temperatura detectada en los pozos no superó los 30°C, se favoreció la predominancia de las AVL reportadas como no patógenas (Bonilla y cols., 2004).



Gráfico

7:



Valores de Temperatura medidos en los pozos durante los seis muestreos.

Respecto al Oxígeno disuelto, se presentó un valor mínimo extremo de 0.8 mg/l en marzo en el pozo 12A, pero fue la única vez que se detectó. Exceptuando ese caso, el oxígeno disuelto estuvo en un intervalo de 2.4 a 5.0 mg/l (Tabla 4). Al contrario que el pH y la temperatura este parámetro presentó mayor variación, pero hay que resaltar que el comportamiento fue muy similar en todos los pozos, presentando ascensos y descensos en los mismos períodos (Gráfico 18). Se

observó que la mayoría de pozos presentan un promedio de 4.65 mg/L, valor que se ha reportado como adecuado para la presencia de las AVL (Bonilla y Ramírez, 2008).

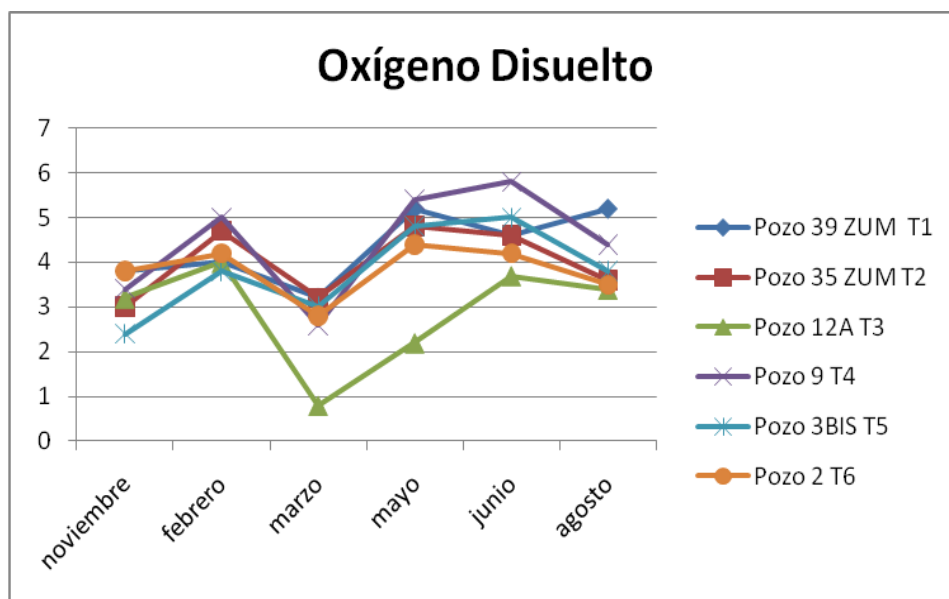


Gráfico 8: Valores de Oxígeno Disuelto medidos durante los seis muestreos.

En general, se observó que los valores de los parámetros fisicoquímicos estuvieron en los intervalos reportados como adecuados para las AVL, pero la temperatura no favoreció la presencia de amibas termófilas como *Naegleria* ya que la mayoría de los casos estuvo por debajo de los 30°C. En el caso de *Acanthamoeba polyphaga* se sabe que puede soportar variaciones amplias de pH, debido a la gran resistencia que presenta su quiste (Bonilla y cols., 2004).

Análisis Estadístico

El coeficiente de correlación proporciona una medida de la asociación lineal entre las variables, los valores de la correlación están entre -1 y +1. Si las variables están perfectamente asociadas, entonces el coeficiente de correlación será de 1 o -1, se considera que existe relación cuando el valor es superior a 0.811 ó - 0.811. Si por el contrario, las variables no están asociadas, entonces el coeficiente tendrá un valor cercano a cero (Durán y Vargas, 2003).

En la tabla 5, se muestran los valores de la correlación entre los parámetros fisicoquímicos realizados durante el estudio con la presencia de AVL.

Tabla 5: Correlación entre Temperatura, pH y Oxígeno Disuelto con la presencia de AVL

16/11/10	08/02/11	08/03/11	03/05/11	28/06/11	16/08/11
pH/AVL : -0.024	pH/AVL: -0.244	pH/AVL: -0.449	pH/AVL: -0.563	pH/AVL: 0.219	pH/AVL: 0.154
T/AVL : 0.758	T/AVL: 0.508	T/AVL: 0.277	T/AVL: 0.603	T/AVL: 0.191	T/AVL: 0.326
OD/AVL:0.158	OD/AVL: 0.670	OD/AVL: -0.537	OD/AVL:-0.431	OD/AVL: -0.076	OD/AVL: 0.432

Después de realizar el análisis de correlación, los valores encontrados no estuvieron por arriba de 0.811, por lo que se puede decir que no hubo relación estadísticamente significativa con los parámetros fisicoquímicos.

Conclusiones

La mayoría de las amibas aisladas no son patógenas, pero en el caso de la presencia de las amibas de los géneros *Hartmannella*, *Vahlkampfia* y *Vannella*, en donde existe sospecha que pueden causar enfermedades y sobre todo la de *A. polyphaga*, que se ha reportada como patógena, es una llamada de atención para tener precaución en el uso del agua y no descuidar su desinfección, para evitar un posible riesgo de salud a los usuarios.

Las amibas se presentaron durante todo el año en agua subterránea, esto se pudo deber a que no hay cambios bruscos de temperatura en este ambiente, al no estar influenciado directamente por la temperatura ambiente.

Aunque no se apreció un efecto de la temperatura del agua en la presencia de las amibas, si se observó efecto en el número de aislamientos encontrados en algunos de los pozos, como fue en el caso del pozo 9 y del 3BIS; el primero tuvo el mayor número de aislamiento y su temperatura promedio fue la más alta (29.2°C), mientras que el segundo fue el de menor número de aislamientos y su temperatura promedio fue la más baja (24.8°C).

Se tenía la idea de que el agua subterránea era esencialmente limpia por la acción filtrante del medio poroso por el cual pasa el agua. Sin embargo en las últimas décadas algunos estudios han reportado que los microorganismos pueden estar en el agua subterránea profunda. Como lo mostro los resultados de este estudio, en donde se encontraron amibas de vida libre en los pozos, aunque sea en números bajos. La presencia de las amibas en el agua de los pozos estudiados se puede atribuir a las actividades antropogénicas, como la agricultura, la ganadería y el establecimiento de asentamientos humanos carentes de adecuados servicios sanitarios y las condiciones deficientes de las tuberías del sistema de drenaje, ya sea por una instalación incorrecta, por deterioro o rupturas, que da lugar a fugas

de agua residual hacia el subsuelo, lo que convierte a los drenajes, en una fuente potencial de contaminación del agua subterránea.

Referencias Bibliográficas.

Aitken, D., Hay, J., Kinnear, F. B., Kirkness, C. M., Lee, W. R. and Seal, D. V., 1996. Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hartmannella* infection. *Ophthalmol.* 103:485-493.

Bonilla, L.P.; Ramírez, F.E.; Ortíz, R. y Eslava, C. 2004. La ecología de las Amibas Patógenas de Vida Libre en Ambientes Acuáticos. *En: Microbiología Ambiental.* (Rosas, I.; Cravioto, A. y Ezcurra, E., Eds.). INE-SEMARNAT. México. p. 67.

Bonilla, L. P. y Ramírez, F. E., 2008. Amibas de vida libre asociadas a patologías en seres humanos. En Becerril, M. A. *Parasitología Médica.* Editorial Mc Graw Hill. Segunda edición. pp22-29.

Beltrán, O. A., 2008. Determinación de las amibas de vida libre en pozos del acuífero de Cuernavaca, Morelos. Tesis de Licenciatura en Biología. FES-Iztacala. UNAM. México. pp 46

Campos L. 2007. Distribución Temporal de las Amibas de Vida Libre en dos manantiales del Acuífero del Valle de Cuernavaca, Morelos. FES Iztacala. UNAM. México.

CNA 2002. Determinación de la disponibilidad del agua en el acuífero zona metropolitana de la Ciudad de México. México.

Dua, H. S., Azuara-Blanco, A., Hossain, M. and Lloyd J., 1998. Non-*Acanthamoeba* amebic keratitis. *Cornea*. 18:499-501.

Dunnebacke, T.H., Schuster, F.L, Shigeo, Y., and Booton, G.C. 2003. Characterization of *Balamuthia* amebas isolated from the environment. In Proceedings of Xth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of free-living amoebae. F. Lares (ed). ITSON-DIEP. México. Pp 39-43.

Duran, D.A., Cisneros, C.A y Vargas, V.A. 2003. Bioestadística. FES Iztacala. UNAM, México. 56pp.

Ferreira G. E. E. 1994. Meningitis por amibas de vida libre. Manual para la vigilancia epidemiológica. México. México. p 2

Gómez Z. C. S. 2009. Caracterización de Amibas de Vida Libre presentes en agua subterránea del Acuífero de Cuautla, Morelos. México. Tesis de Licenciatura en Biología. FES-Iztacala. UNAM. México. p48.

Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. 2008. Agua Subterránea. Consultado el 10 agosto del 2010 en http://www.imta.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=181:agua-subterranea&catid=52:enciclopedia-del-agua&Itemid=106

Inoue, T., Asari, S., Tahara, K., Hayashi, K., Kiritoshi, A. and Shimomura, Y., 1998. *Acanthamoeba* keratitis with symbiosis of *Hartmannella* ameba. *Am. J. Ophthalmol.* 125:721-723.

Limón, T.J.L. 2007. Caracterización de amibas de vida libre presentes en agua subterránea del acuífero de Zacatepec, Morelos. Tesis de Licenciatura en Biología. FES-Iztacala. UNAM. México. pp. 71

Lorenzo-Morales, J., Martínez-Carretero, E., Batista, N., Álvarez-Marín, J., Bahaya, Y., Walochnik, J. y Valladares, B., 2007. Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *Parasitol. Res.* 102, 167-169.

Novarino, G.A.; Warren, H.; Butler, G. ; Lambourne, A.; Boxshall, J.; Bateman, N.E.; Kineer, R.W. Harvey, R.A.; Mosse, B.; Teltsch. 1997. Protistan communities in aquifers: A review, *Thems microbiology reviews* 20: 261-275.

Oddó B. D. 2006. Infecciones por amibas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anátomo-clínicos. *Infectología al día. Revista Chilena de Infectología.* 23(3):200-214.

Page, F. C., 1988. A new key to freshwater and soil gymnamoebae with instructions for culture. *Culture Collection of Algae and Protozoa.* Cumbria, England. p112

Price M. 2007. *Agua Subterránea.* Limusa. México. México. pp71-72.

Ramírez, F.E.; Campoy, E.; Matuz, D.; Robles, E. 2006. *Acanthamoeba* isolated from contaminated groundwater. *Journal Compilation by the International Society of Protistologist. Eukariot. Microbiol. ,* 53(S1), S10-S11.

Ramírez, F. E.; Robles E.; Sainz M. G.; Ayala R., y Campoy E. 2009. Calidad Microbiológica del Acuífero de Zacatepec, Morelos, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental,* 25(4):247-255.

Ramírez F. E.; Robles V. E.; Sainz M. M. G.; Ayala P. R.; y Campoy O. E. 2009. Coliformes y amibas de vida libre presentes en agua subterránea. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales,* 5 (2): 104-112.

Robles E.; Ramírez E.; Durán A.; Ayala R.; Sainz G.; González M.E. Calidad del agua subterránea en el estado de Morelos, México. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. En revisión.

Sánchez R. F. J. 2001. Conceptos Fundamentales: Tipos de Acuíferos. 2ª ed. México. México. pp 5-7.

Suárez R.; Espinoza Y.; Villanueva C.; Ramos J.; Huapaya P.; Marquina R. 2002. Aislamiento de Amibas de Vida Libre del género *Acanthamoeba* a Partir de Fuentes de Agua en la Ciudad de Ica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Anales de la Facultad de Medicina, 63(2):17-21

Viera T. C., y Gotuzzo E. 2001. Enfermedades Causadas por Amibas de Vida Libre. Lima. Perú. p35.

Vicente, P.B.P. 2009. Distribución temporal y espacial de Amibas de Vida Libre en pozos de la zona suroeste del acuífero de Zacatepec, Morelos. Tesis de Licenciatura. FES Iztacala. UNAM. México. 38 pp.

Visvesvara G.S., Moura H. y Schuster F.L. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. FEMS Immunol. Med. Microbial. 50, pp1-26.