



Universidad Nacional Autónoma De México

Facultad De Estudios Superiores Iztacala

Laboratorio de Microbiología Ambiental CyMA

**“DETERMINACIÓN DE AMIBAS DE VIDA LIBRE EN
RÍOS DE LA CUENCA DE MÉXICO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

MIGUEL ÁNGEL ANDRADE SÁNCHEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA BONILLA LEMUS

Los Reyes Iztacala, Estado de México. 2015.





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

Con todo mi amor y mi cariño

Dedicada para mis maravillosos Padres

Y mis hermosas Hermanas

Son lo más

Importante que tengo

En este mundo

Los amo inmensamente.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por permitirme llegar a este momento en mi vida y ponerme en el camino de personas maravillosas que fueron parte de este viaje.

Gracias a mis padres por todo su apoyo e incondicionalidad, Mama: no sabes cuánto te admiro, gracias por ser la mejor!! Papa: eres mi ejemplo a seguir, gracias por estar siempre conmigo y nunca dejarme caer, Nallita gracias por estar siempre pendiente y por ser una maravillosa hermana, Liri admiro lo fuerte que eres, gracias por ser mi ejemplo.

Dra. Paty agradezco a Dios por haberla tenido de Asesora! Infinitas gracias por todo el apoyo brindado, gracias por compartir conmigo parte de su experiencia y conocimiento, gracias por confiar en mí y en especial gracias por su valiosa amistad.

Proyecto CyMA: Bióloga Roció Ibarra: Chio gracias por toda tu asesoría, por todos tus consejos, por tu amistad y gracias por hacer mas amenas las tardes en el lab, Don Luis infinitas gracias por todo su apoyo, Dra. Maricela Carrasco: Mari, un gusto haberte conocido, gracias por tu amistad, por tus consejos, y por tu valiosa asesoría, Dr. Ricardo Ortíz: muchísimas gracias por todo su apoyo a la realización de este trabajo, gracias por su asesoría en las pruebas

moleculares y en las pruebas de patogenicidad, Dr. Alfonso Lugo: muchas gracias por sus consejos por su apoyo y por su asesoría en las pruebas estadísticas.

Gracias a los revisores de este trabajo, gracias por sus recomendaciones, por su asesoría y por su valioso tiempo: Maestra Elizabeth Ramírez y Dr. Víctor Manuel Rivera.

Gracias al Dr. Javier Carmona Jiménez y a su proyecto PAPIIT por todo su apoyo brindado a esta investigación.

Gracias a la Jefatura de Biología por permitirme compartir con ustedes parte de este sueño y gracias por brindarme su valiosa amistad: Tere =) July, Dra. Tzasna, Lau, Eli y Eri. Muchas gracias!!!

Y gracias a todas las personas que en mi paso por la Facultad se cruzaron en mi camino, espero haber dejado algo bueno de mí en ustedes, ya que durante estos años me he llevado grandes y valiosas amistades.

ÍNDICE

I.	RESUMEN	7
II.	INTRODUCCIÓN	8
III.	MARCO TEÓRICO	9
	A. Amibas de Vida Libre.....	9
	B. Ecología.....	10
	C. Ciclo de vida.....	11
	1. <i>Acanthamoeba</i> spp.	12
	2. <i>Naegleria</i> spp.....	14
	D. Importancia Médica.....	15
	E. Enfermedades.....	16
	F. Ubicación taxonómica.....	19
IV.	JUSTIFICACIÓN	21
V.	ANTECEDENTES	22
VI.	ÁREA DE ESTUDIO	24
	A. Clima.....	24
	B. Vegetación y Geología.....	24
VII.	OBJETIVOS:.....	26
	A. General.	26
	B. Particulares.....	26
VIII.	METODOLOGÍA.....	27
	A. Trabajo de Campo.....	27
	B. Trabajo de laboratorio.....	27
	1. Cultivo monoxénico.....	27
	2. Identificación por morfología.....	28
	3. Cultivo axénico	28
	4. Prueba de temperatura.....	28
	5. Prueba de patogenicidad	28
	6. Prueba de flagelación.....	29
	7. Identificación molecular.....	29
IX.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32

A.	Presencia de AVL.....	32
B.	Riqueza específica.....	34
C.	Aislamientos y tolerancia a la temperatura.....	37
D.	Parámetros Físicoquímicos.....	39
1.	Temperatura.....	40
2.	pH	41
3.	Oxígeno disuelto.....	41
4.	% Saturación de oxígeno	42
5.	Alcalinidad	43
6.	Conductividad.....	44
E.	Prueba de temperatura.....	45
F.	Prueba de patogenicidad.....	45
G.	Prueba de flagelación	46
H.	Pruebas Moleculares.....	46
I.	Análisis estadístico.....	50
X.	CONCLUSIONES	52
XI.	LITERATURA CITADA	53
	ANEXOS	59

I. RESUMEN

El agua es esencial para la vida, juega un papel destacado en casi todas las actividades de los seres humanos, procede tanto de fuentes superficiales como de subterráneas, las superficiales son las que el hombre utiliza para desarrollar sus funciones básicas, desafortunadamente estas aguas son las que se encuentran más contaminadas debido a que reciben directamente las descargas de aguas residuales generalmente sin ningún tratamiento. El agua se caracteriza por sus componentes físicos, químicos y biológicos, entre los biológicos se encuentran las amibas de vida libre (AVL). La mayoría de las especies de AVL son inocuas, pero se han descrito 3 especies patógenas para el hombre: *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia pedata* y además varias especies del género *Acanthamoeba*. Por lo que esta investigación tuvo como principal objetivo aislar e identificar amibas de vida libre obtenidas de ríos de la cuenca de México y relacionarlas con algunos parámetros fisicoquímicos. Se realizaron 10 muestreos puntuales en ríos de la Cuenca de México, y se determinaron: oxígeno disuelto, % de saturación de oxígeno, conductividad, pH, alcalinidad y temperatura, las muestras se procesaron en el laboratorio y las amibas se identificaron morfológicamente usando claves taxonómicas. Se aislaron un total de 38 cepas de amibas de vida libre, que pertenecieron a 12 especies correspondientes a 11 géneros. *Rosculus ithacus* y *Vannella platypodia* fueron las especies más frecuentes. Se aislaron 3 especies potencialmente patógenas: *Acanthamoeba triangularis*, *A. polyphaga* y *Naegleria sp.* a las que se les realizó la prueba de patogenicidad la cual resultó negativa. La identificación a nivel de género de las 2 *Acanthamoebas* y la *Naegleria*, se confirmó por la técnica de Biología molecular RT-PCR. Para el género *Acanthamoeba* se utilizó el primer JDP1, y para *Naegleria*, los primers Nae y Nf1. Los parámetros fisicoquímicos se encontraron dentro de los valores reportados como adecuados para la presencia de amibas de vida libre. El río Miraflores fue el que presentó la mayor riqueza específica esto probablemente debido a que tuvo el valor más alto de temperatura. Mediante un análisis estadístico se comprobó que la conductividad tiene una correlación positiva significativa con las AVL y la altitud una correlación negativa con las AVL.

II. INTRODUCCIÓN

El agua es esencial para la vida. Constituye el principal componente del protoplasma celular y representa dos tercios del peso total del hombre y hasta nueve décimas partes del peso de los vegetales (Adame y Salin, 1993). Juega un papel destacado en casi todas las actividades propias de los seres humanos, desde la agricultura hasta la industria y como abastecimiento de agua potable y con usos recreativos (Llamas *et al.*, 2000).

De los 1350 millones de km² de agua que hay en la Tierra, la gran mayoría se encuentra en los océanos. Otro porcentaje importante son las cimas nevadas y los glaciares, por lo que solo una mínima cantidad de este volumen tiene uso real inmediato en los procesos biológicos de la naturaleza (Adame y Salin, 1993).

El agua procede tanto de fuentes superficiales como de subterráneas (CNA, 2002). Las aguas superficiales (lagos de agua dulce, ríos, lagunas, ciénagas) son las que el hombre utiliza para desarrollar sus funciones básicas (abastecimiento de agua potable, navegación, recreación etc.) (Sierra, 2005).

Los ambientes de agua dulce se pueden clasificar en aguas corrientes (ríos y arroyos) y aguas quietas (lagos y estanques). Los ríos se caracterizan por el agua en continuo movimiento, pueden comenzar como descargas de estanques o lagos, como escurrimientos de las aguas de deshielo, como drenaje de montañas o pueden surgir de manantiales (Curtis y Barnes 2000).

Los ríos y arroyos de México constituyen una red hidrográfica de 633 mil kilómetros de longitud. Por los cauces de los 50 ríos principales fluye el 87% del escurrimiento superficial de la república y sus cuencas cubren el 65% de la superficie territorial continental del país (CNA, 2012). Desafortunadamente estas aguas son las que se encuentran más contaminadas debido a que reciben directamente las descargas de aguas residuales generalmente sin ningún tratamiento (Sierra, 2005).

El agua se considera contaminada cuando su composición o su estado natural son afectados. Con el aumento de la población y el surgimiento de la actividad industrial, la

contaminación de los ríos, lagos y aguas subterráneas crece constantemente (Adame y Salin, 1993).

El agua se caracteriza por sus componentes físicos, químicos y biológicos. Entre los biológicos se encuentran bacterias, hongos y protozoos y entre éstos, las amibas de vida libre. En los cuerpos de agua naturales se acumula materia orgánica hidrofóbica en la interfase agua - aire formando un microhábitat dinámico donde bacterias y protozoos, entre éstos las amibas, proliferan en mayor cantidad que en la fase líquida del cuerpo de agua; la interfase agua - aire proporciona a las amibas un sustrato adecuado para la locomoción al igual que fuentes de alimento (Preston, 2003; Preston *et al.*, 2001).

A mediados del siglo XX se descubrió que algunas amibas pequeñas del suelo y del agua, que hasta entonces se consideraban inocuas, podían invadir a los seres humanos así como a otros animales, pudiendo causarles la muerte o un daño cerebral irreversible (Bonilla *et al.*, 2004).

III. MARCO TEÓRICO

A. Amibas de Vida Libre

Las amibas de vida libre (AVL) son protozoos eucariontes, unicelulares generalmente sin color. Estos organismos presentan diferentes formas: alargadas, reniformes, piriformes, estrelladas u otras más. En general presentan mitocondrias tubulares, aparato de Golgi y peroxisomas. Su movimiento es por medio de flagelos o pseudópodos (Sigala, 2008).

El tamaño de las amibas varía en gran medida, pero su naturaleza unicelular limita la talla que llegan a alcanzar. La mayoría de las especies en su fase trófica tienen tamaños en el intervalo de 6 a 30µm y en su fase quística de 6 a 20µm, aproximadamente. Sin embargo, existen excepciones que pueden llegar a medir hasta cerca de 1mm de longitud e incluso ser visibles a simple vista. Se han observado algunas variaciones en la

talla de una misma especie entre aquellas amibas que se encuentran en un cultivo por algún tiempo con respecto a las que se encuentran en el hábitat natural, lo que se atribuye a que la presencia de alimento, y ciertas condiciones ambientales, favorecen un aumento en la talla (Page, 1988).

B. Ecología:

Las AVL son cosmopolitas que habitan en ambientes húmedos como el suelo y el agua, aunque también se pueden encontrar en el aire, vehículo que utilizan como medio de dispersión. Se postula que las amibas llamadas del “suelo”, son especies acuáticas que han invadido hábitats terrestres (Smirnov y Goodkov, 1999; Smirnov y Brown, 2004). Page (1988) mencionó que no hay diferencias entre las amibas terrestres y las acuáticas. Debido a su habilidad para vivir como organismos de vida libre y como endoparásitos, a las amibas se les conoce también como organismos anfizoicos (Bonilla *et al.*, 2004).

Se les ha encontrado como habitantes de: estanques, ríos, arroyos, lagos, lagos hipersalinos, piscinas, sistemas de tratamiento de agua residual, cuevas, musgo, rizósfera, corrientes subterráneas, sistemas de ventilación, composta, estuarios, pantanos, musgos e incluso en agua entubada y embotellada. También han sido aisladas de la atmósfera, aunque seguramente en este caso se trató de aislamientos realizados a partir de quistes (Gallegos *et al.*, 2014).

Puesto que las AVL son habitantes comunes del suelo, juegan un papel dentro del ciclo de los nutrientes, porque estimulan la tasa de transformación bacteriana del fósforo y del nitrógeno a formas aprovechables para las plantas, lo que produce una mayor producción de biomasa vegetal (Fenchel, 1987; Tyndall *et al.*, 1989).

Las amibas de vida libre tienen gran importancia ecológica. Ocupan un lugar esencial en el circuito microbiano de las comunidades naturales acuáticas. Desempeñan un papel importante en el mantenimiento del flujo de energía y el reciclado de los nutrientes. Su eficiencia en el uso de los recursos los convierte en un enlace fundamental entre los organismos desintegradores y aquellos que pertenecen a niveles tróficos superiores. Se

alimentan y están asociadas con bacterias, cianobacterias, diatomeas, otros protozoos y hongos (Bonilla *et al.*, 2004; Gallegos *et al.*, 2014).

Las AVL se encuentran en mayor proporción en la microcapa superficial del agua, debido a la abundancia de nutrientes y al establecimiento de quistes aéreos (Bonilla *et al.*, 2004).

Son heterótrofos y tienen la capacidad de alimentarse tanto de forma osmótrofa (consumen materia orgánica disuelta), como holozóica (ingieren bacterias, materia particulada y otros organismos) por fagocitosis, de esta forma controlan a las poblaciones de bacterias; son reconocidas como las más importantes depredadoras de bacterias ya que llegan a consumir casi un 50% de la biomasa bacteriana y de la materia orgánica particulada en suspensión (Marciano- Cabral, 1988; Bitton, 1999).

Las AVL son ubicuas en la naturaleza. Las especies patógenas son termotolerantes, aunque no todas las termotolerantes son patógenas (Martínez y Janitsschke, 1985). Como ya se ha hecho mención, su hábitat principal es el suelo y desde ahí pueden llegar a los cuerpos de agua arrastrados por escurrimientos o a través del aire (Rivera *et al.*, 1994; Bonilla, 2000).

Las AVL son más frecuentes en cuerpos de agua con temperatura por arriba de los 25°C y en aguas naturales de los trópicos y subtropicos, con niveles óptimos de oxígeno, pH cercano a la neutralidad, alimento suficiente (bacterias y materia orgánica) y humedad; sin embargo pueden soportar variaciones amplias en cualquiera de los parámetros anteriormente mencionados (Bonilla *et al.*, 2004).

C. Ciclo de vida

Básicamente en la naturaleza comprende 2 estadios de viabilidad biológica: una forma activa que se alimenta y reproduce, llamada “trofozoíto” y una forma de resistencia que es inactiva, llamada “quiste”. Para muchas especies no se conocen los quistes, por lo que el trofozoíto es la única forma del ciclo de vida (Gallegos *et al.*, 2014). La formación de quistes es el mecanismo de protección que presentan la mayoría de los protozoos,

incluidos las AVL, para protegerse de los cambios ambientales. De esta manera pueden sobrevivir a la ausencia de humedad, cambios extremos de temperatura, presión, pH, falta de oxígeno, acumulación de desechos metabólicos, escasez de alimento o algún otro factor adverso (Schuster, 1979; Marciano-Cabral, 1988).

En el ciclo más sencillo, el trofozoíto se reproduce asexualmente por fisión binaria, dando lugar a 2 células hijas. En el caso de *Naegleria* se presenta un estadio “ameboflagelar” temporal en el que el organismo no se alimenta ni se reproduce, sólo le sirve para desplazarse a un mejor microambiente. Las amibas en cualquiera de estas fases en que se encuentren se pueden revertir de una a otra forma dependiendo de los cambios ambientales a los que estén sometidas (Gallegos *et al.*, 2014).

1. *Acanthamoeba* spp.

Acanthamoeba (Fig. 1) es el género de AVL que más ampliamente está representado en nuestro planeta. Se ha aislado de una gran variedad de hábitats: el agua de mar, las aguas dulces de ríos, aguas estancadas, de albercas, aguas de redes de abastecimientos, de agua embotellada, de sistemas de aire acondicionado, de plantas, del suelo, del aire, enfriadores de agua, aguas residuales, lagunas, polvo, estaciones de lavado ocular, incluso de la boca y de la nariz de los individuos asintomáticos (Oddó, 2006; Yera *et al.*, 2012).

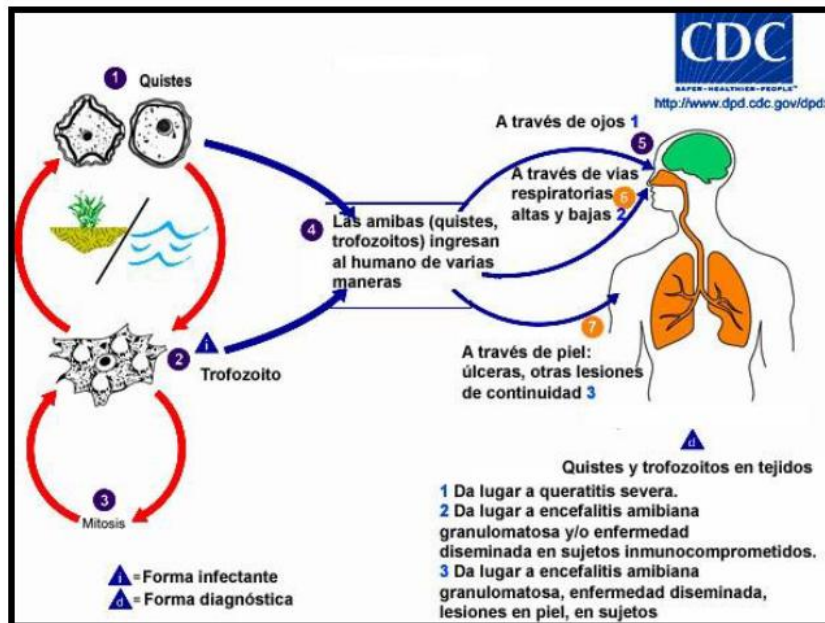
Con base en criterios morfológicos se han descrito más de 24 especies pertenecientes a este género, aunque solo algunas son patógenas. En su ciclo de vida presenta dos estadios: trofozoíto y quiste. El trofozoíto mide entre 20 y 56 μm y se caracteriza por la presencia de seudópodos finos que se denominan acantópodos, usados para la locomoción (Bonilla y Ramírez, 2014).

La forma activa o trofozoíto de *Acanthamoeba* tiene un abundante citoplasma, con múltiples mitocondrias, lisosomas, rizomas y vacuolas; estas amibas tienen un núcleo redondeado colocado en posición central con un prominente nucléolo (Martínez y Visvesvara, 1997).

El quiste mide entre 11 y 25 μm de diámetro, presenta una pared doble, entre cuyos componentes se encuentra celulosa. La pared externa o ectoquiste es ondulada o arrugada en tanto que la pared interna o endoquiste puede ser estrellada, poligonal, esférica u oval. Los poros se forman en la unión del ectoquiste y el endoquiste y están cubiertos por un opérculo. Los quistes se forman como reacción a condiciones ambientales adversas, como desecación, falta de alimento, presencia de agentes químicos (desinfectantes y antimicrobianos) y agentes físicos (calor, congelamiento y radiación ultravioleta) (Bonilla y Ramírez, 2014).

Los quistes son resistentes a numerosos biocidas, a la cloración del agua potable, radiación ultravioleta, a ciertos antibióticos y antisépticos. Pueden resistir durante 20 años la desecación (Yera *et al.*, 2012).

Fig. 1 Ciclo de Vida *Acanthamoeba* spp. (CDC 2012).



2. *Naegleria spp.*

N. fowleri (Fig. 2) es un ameboflagelado de la familia Vahlkampfiidae, que ha sido aislado de muestras de albercas con agua clorada, lagos, aguas termales, depósitos de agua doméstica, aguas contaminadas térmicamente, aguas residuales, suelo, aire, sistemas de humidificación, cultivos celulares y de las cavidades nasales y garganta de humanos (Hannisch, 1997; Marciano-Cabral, 1988).

Más de 30 especies de *Naegleria* han sido identificadas con base a su secuencia molecular (De Jonckheere, 2002). Solo una especie *N. fowleri*, ha sido aislada de infecciones en humanos, aunque hay otras especies que son patógenas en modelos de ratón (Schuster, 2002).

Los trofozoítos de *Naegleria* tiene la particularidad de ser termotolerantes, soportando temperaturas de hasta de 50°C, con una temperatura óptima de 37°C. *N. fowleri* se desarrolla preferentemente en las aguas calientes ricas en bacterias, en los lagos y los ríos especialmente en verano, en los canales de riego, en las descargas de agua refrigerante de reactores nucleares y en las piscinas donde el agua no es tratada lo suficientemente (Yera et., al 2012).

N. fowleri tiene tres etapas en su ciclo de vida: el trofozoíto, la forma flagelada y el quiste. La forma vegetativa o trofozoíto mide aproximadamente de 15 a 25 µm, en cultivo. Están en constante cambio de tamaño y forma, el citoplasma es finamente granular con múltiples mitocondrias, lisosomas, y vacuolas y rodeada de pseudópodos los cuales están relacionados con la movilidad de la forma activa. El núcleo está usualmente en el centro, conteniendo cromatina densa y esféricos nucléolos. La forma flagelar es usualmente en forma de pera y biflagelada, sin embargo se han observado con múltiples flagelos (más de 10) (Martínez y Visvesvara, 1997).

Esta forma flagelar ocurre cuando la amiba se encuentra en condiciones ambientales no favorables como: falta de nutrientes, cambios de temperatura y pH, entre otros. Esta forma es transitoria ya que el organismo no se alimenta ni se divide y después de un tiempo, cuando la amiba encuentra nuevamente un ambiente adecuado, regresa a su

forma amibiana; en algunos casos, el proceso se realiza en cuestión de minutos (John, 1993).

Los quistes son estructuras de resistencia que se forman en respuesta a condiciones ambientales adversas, son esféricos (8 a 15 μm de diámetro) y poseen una doble pared con uno o dos poros (Bonilla y Ramírez, 2014).

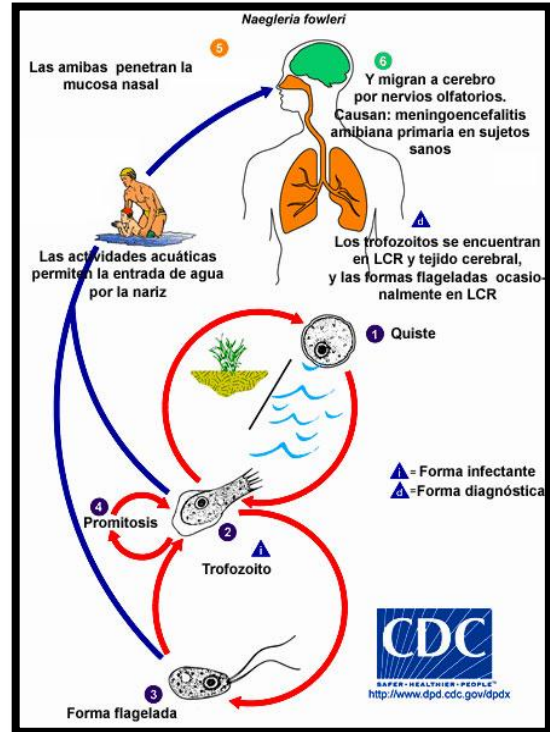
D. Importancia Médica

El estudio de las amibas anfizoicas (vida libre y parásitas) se inició a finales del siglo XIX y en los inicios del siglo XX. Jahnes, Fullmer y Li en 1957 reportaron una contaminación espontánea por amibas de vida libre en un cultivo de células de riñón de mono (Martínez y Visvesvara, 1997).

Clyde G. Culbertson en 1958 describió una encefalitis en ratones producida por *Acanthamoeba* que contaminó un cultivo de células durante el desarrollo de la vacuna de la polio (Martínez y Visvesvara, 1997).

La mayoría de las especies de AVL son inocuas, pero se han descrito 4 géneros que contienen especies patógenas para el hombre y animales. A la fecha se han descrito las especies *N. fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, algunas del género *Acanthamoeba* y *Sappinia pedata*. En comparación con otras enfermedades causadas por protozoos, las infecciones causadas por AVL destacan por su amplia distribución, extrema virulencia y falta de tratamiento efectivo (Martínez y Visvesvara, 1997).

Fig.2 Ciclo de Vida de *Naegleria fowleri* (CDC, 2012).



E. Enfermedades

a) *Meningoencefalitis amibiana primaria*

N. fowleri es causante de la meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP), enfermedad fulminante que ocurre en personas sanas que han tenido contacto con agua contaminada con esas amibas, que presenta como característica temperatura elevada y concentraciones insuficientes de cloro libre residual. (Bonilla *et al.*, 2004; Schuster y Visvesvara, 2004).

El mayor número de casos se ha presentado en niños y jóvenes previamente sanos con antecedente de haber nadado durante el verano en cuerpos de aguas naturales contaminados o artificiales inadecuadamente clorados (Lasake *et al.*, 2009; Goudot *et al.*, 2012).

Los trofozoítos presentes en el agua, entran a las fosas nasales, penetran el epitelio nasal y migran a través de los nervios olfatorios al cerebro (Schuster y Visvesvara, 2004). El curso clínico se caracteriza por confusión mental, en algunos casos crisis convulsivas; pérdida del apetito, visión doble y borrosa, alucinaciones, coma profundo y finalmente la muerte. La mayoría de los pacientes muere dentro de la primera o segunda semana después de la aparición de los primeros síntomas, dependiendo del manejo y resistencia del paciente, así como la virulencia de las amibas (Martínez y Visvesvara, 1997).

b) *Encefalitis amibiana granulomatosa*

La encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) o acantamoebosis, una enfermedad subaguda o crónica causada por varias especies del género *Acanthamoeba*. Se presenta en individuos inmunodeprimidos o inmunodeficientes como alcohólicos crónicos, embarazadas, VIH positivos, enfermos con SIDA, con lupus eritematoso sistemático o cáncer (Martínez y Vivesvara, 1997).

La puerta de entrada es el tracto respiratorio o la piel, desde donde y siguiendo la vía hematogena o una progresión local siguiendo vías nerviosas, las amibas llegan al

sistema nervioso central (Oddó, 2006). El período de incubación varía de semanas a meses con un diagnóstico fatal en la mayoría de los casos. Hasta el año 2004 se habían detectado alrededor de 200 casos de EAG a nivel mundial, ocasionados por *Acanthamoeba* (Schuster y Visvesvara, 2004).

c) Queratitis Amibiana

La Queratitis Amibiana (QA) es otra enfermedad causada por *Acanthamoeba* la cual es más frecuente en individuos sanos que utilizan algún tipo de lente de contacto o en pacientes inmunosuprimidos. Esta es una inflamación crónica en la córnea que puede causar la pérdida del ojo (Martínez y Visvesvara, 1997).

d) Otras infecciones

Acanthamoeba también puede causar infecciones nasofaríngeas y cutáneas, estas se desarrollan cuando las amibas, ya sea en forma de trofozoíto o de quiste, se introducen por una lesión en la piel o por las fosas nasales. Pueden permanecer localizadas, pero en general las amibas se diseminan a otras partes del cuerpo, en particular al sistema nervioso central y no hay delimitación definida entre estas infecciones y la encefalitis (Bonilla y Ramírez, 2014).

Por otro lado, se ha demostrado que las AVL, participan como vectores de diferentes especies de bacterias actuando como endosimbiontes de las AVL (Barker *et al.*, 1992). Una de estas bacterias es *Legionella pneumophila*, capaz de multiplicarse dentro de la célula amibiana, causar lisis y liberarse nuevamente en el ambiente. Las AVL ayudan a mantener a *V. cholerae* en aguas naturales en algunas partes del mundo donde no hay una asociación evidente de casos reportados por cólera clínica. También, algunas bacterias coliformes y *Mycobacterium avium* sobreviven dentro de las amibas aunque sin multiplicarse. De esta manera, el quiste amebiano no solo ofrece a las bacterias un mecanismo de protección para evadir ambientes hostiles, sino también les provee un medio para transporte y colonización de nuevos hábitats aprovechando los mecanismos de dispersión de las AVL (Greub y Raoult 2004; Hsu *et al.*, 2011).

Tabla 1: Comparación de características clínicas y patológicas entre MEAP, EAG y QA (Martínez y Visvesvara 1997; Bonilla y Ramírez, 2014).

Agente biológico/ Enfermedad	<i>Naegleria fowleri</i> : Meningoencefalitis Amibiana Primaria (MEAP).	<i>Acanthamoeba</i> spp: Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG).	<i>Acanthamoeba</i> spp: Queratitis Amibiana (QA).
Factores de riesgo	Actividades relacionadas con aguas termales o calentadas artificialmente/ Buen estado de salud/ exposición a aguas contaminadas.	Inmunosupresión/ Enfermedades crónicas degenerativas.	Uso de lentes de contactos suaves/ trauma corneal/ contacto con agua contaminada usando lentes de contacto.
Epidemiología	Cosmopolita/ verano.	Cosmopolita/ cualquier día del año.	Cosmopolita/ cualquier día del año.
Portales de Entrada	Neuroepitelio olfatorio.	Pulmones, piel, neuroepitelio olfatorio.	Traumatismo corneal.
Período de incubación	1 a 15 días.	Semanas a meses	Días
Síntomas	Dolor de cabeza intenso, fiebre, vómito, rigidez de nuca, cambios de personalidad y coma.	Dolor de cabeza, fiebre, náusea, vómito, confusión, somnia, irritabilidad, cambios de personalidad, hemiparesia, letargo, afasia y ataxia.	Dolor ocular intenso, lagrimeo, fotofobia, visión borrosa y enrojecimiento.
Diagnóstico	Examen de LCR en búsqueda de trofozoítos, tinción con H & E en vivo y tejido <i>post mortem</i>	Biopsia de lesiones, neuroimagen, tinciones H & E, IFA, IIF de tejido.	Raspado de la córnea y cultivo, tinciones: blanco de calcoflúor, Wright, Giemsa, azul de Evans. Técnica de PCR. Microscopía confocal.
Tratamiento	Anfotericina B, intratecal, miconazol, rifampicina	Combinación de compuestos del grupo de los azoles, isotianato de pentamidina, flucosina, azitromicina y sulfadiazina.	Polihexametilen biguanida junto con propamidina o hexamidina, isotianato de propamidina (Brolene).
Recuperación	Pobre	Pobre	Excelente

Abreviaturas: H & E, hematoxilina y eosina; IFA, anticuerpos inmunofluorescentes; IIF, inmunofluorescencia indirecta.

F. Ubicación taxonómica

La clasificación de los protozoos y de otros microorganismos por encima del nivel de organización de las bacterias siempre ha sido dependiente de la microscopía, por el tamaño de los organismos: las estructuras de estas especies son útiles en los estudios comparativos de su morfología y por lo tanto de su taxonomía y sistemática. Las propiedades fisiológicas han desempeñado un papel importante en la clasificación de estos microorganismos eucariotas (Aladro, 2006).

Evidencias moleculares y una reevaluación asociada a la morfología han considerado recientemente nuevas actualizaciones sobre las relaciones entre el nivel superior de grupos de amibas. En primer lugar se establece el *Phylum Amoebozoa* que agrupa todos los protistas amebidos loboseos, ya sean desnudos o testados, aerobios o anaerobios con *Mycetozoa* y *Archamoeba* (Cavalier-Smith, 1998), separándolos de las amibas Heteroloboseas, que pertenecen ahora al *Phylum Percolozoa* (Cavalier-Smith y Nikolaev 2008).

El phylum *Percolozoa* agrupa organismos primitivos, algunos de los cuales pueden ser ameboflagelados con un flagelo transitorio, no tienen aparato de Golgi, pero poseen mitocondrias o hidrogenosomas y peroxisomas. El phylum incluye la clase Heterolobosea, el orden Schyzopyrenida, la familia Vahlkampfiidae; y los géneros *Naegleria* y *Vahlkampfia* (Oddo, 2006).

Se ha establecido un nuevo género *Vermamoeba* y nueva familia Vermamoebidae dentro del nuevo orden Echinamoebida, cambiando de grupo y nombre a *Hartmannella vermiformis* llamada ahora *Vermamoeba vermiformis* (Dyková et al., 2008).

Tabla 2: Clasificación de los eucariontes desde los rangos más altos de acuerdo con Adl *et al.*, (2012).

	Super-groups	Examples	
Eukaryota	Amorphea	Amoebozoa	Tubulinea Mycetozoa
		Opisthokonta	Fungi
			Choanomonada
			Metazoa
			Apusomonada Breviata
	Excavata	Metamonada Malawimonas Discoba	
	Diaphoretickes	Cryptophyceae	
		Centrohelida	
		Telonemia	
	Sar	Haptophyta	
		Cercozoa	
		Foraminifera "Radiolaria"	
Archaeplastida	Alveolata		
	Stramenopiles		
	Glaucophyta Rhodophyceae Chloroplastida		
Incertae sedis Eukaryota	Incertae sedis, and table 3		

IV. JUSTIFICACIÓN

El agua es el líquido esencial para toda clase de seres vivos y su calidad es de suma importancia para el desarrollo del hombre desde su uso como agua potable hasta su uso industrial.

En los últimos años se han realizado diferentes estudios con amibas de vida libre, habiendo un gran campo a la investigación de estos organismos y su relación con parámetros ambientales que ayuden a entender mejor su ecología. Por otro lado, con el propósito de realizar una identificación más precisa, especialmente de las AVL potencialmente patógenas, en este tipo de estudios a nivel mundial se considera como elemento cada vez más importante el uso de técnicas de biología molecular con lo cual, adicionalmente se pretende evitar el uso de animales de laboratorio para probar la patogenicidad de las amibas.

En México y en el mundo hay pocas investigaciones que involucren a las AVL y a cuerpos de agua superficiales ya sea ríos, lagos, lagunas etc. las investigaciones se han enfocado a la patología y virulencia de estos organismos de ahí la importancia de realizar este tipo de estudios en aguas superficiales ya que son con las cuales el hombre tiene más contacto y uno de los ambientes donde se ha demostrado su presencia.

Es por esto que este estudio incluyó criterios morfológicos para identificarlas de ser posible hasta nivel de especie y en el caso de las amibas potencialmente patógenas pertenecientes a los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*, se utilizaron herramientas moleculares contribuyendo así, al conocimiento de las amibas de vida libre presentes en ríos de nuestro país.

V. ANTECEDENTES

- ▶ Bonilla y colaboradores (2014) realizaron un estudio en varios ríos de la cuenca de México para determinar la presencia y distribución de amibas de vida libre y su relación con parámetros fisicoquímicos, identificando 18 géneros y aislando especies potencialmente patógenas, reportando que los géneros *Vannella*, *Rosculus* y *Acanthamoeba* fueron los más frecuentes.
- ▶ Uribe en el 2014 realizó una investigación en la Subcuenca de Valle de Bravo, Estado de México, muestreando 6 ríos e identificando 28 especies pertenecientes a 15 géneros, los géneros con mayor presencia fueron *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia* y *Platyamoeba*, reportando que solamente un aislamiento del género *Acanthamoeba* resultó con baja virulencia, de igual modo tomaron en cuenta algunos parámetros fisicoquímicos.
- ▶ Bonilla *et al.*, en el 2000 realizaron un estudio en 12 cuerpos de agua (cascadas, lagos y albercas) de la Huasteca Potosina, México: encontrando que durante la temporada de secas hubo mayor presencia de amibas, reportaron un total de 54 aislamientos, de los cuales *Acanthamoeba* y *Naegleria* fueron los géneros más frecuentes y que varios de estos aislamientos fueron patógenos en ratones.
- ▶ Lares y Lares en el 2009 estudiaron y aislaron amibas de vida libre en aguas superficiales en Sonora, identificando morfológicamente a 11 géneros de AVL, aislando 91 cepas y encontrando 5 cepas de *Naegleria* termófilas pero las pruebas moleculares revelaron que no correspondían a *N. fowleri*.
- ▶ Ettinger y colaboradores en el 2002 realizaron un estudio en el río James en Virginia, USA, a lo largo de 58 km incluyendo varios sitios de muestreo como

agua dulce, salidas de alcantarillado, salidas de planta de tratamiento, encontrando la presencia de amibas en todos los sitios muestreados, reportando cinco géneros, *Naegleria*, *Vannella*, *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia* y *Hartmannella* que estuvieron presentes en la columna de agua y sedimentos. Los géneros más comunes aislados de la columna de agua fueron *Naegleria* y *Vannella*

- ▶ Kyle y Noblet en 1985 realizaron un estudio sobre la distribución vertical de amibas de vida libre con potencial patógeno en lagos de agua dulce, muestreando 2 lagos templados de Carolina del Sur, aislando 13 cepas de *Naegleria fowleri* y encontrando que la distribución de amibas termotolerantes está en relación con el inicio de la estratificación térmica del lago.

VI. ÁREA DE ESTUDIO

Los ríos estudiados se encuentran localizados en la cuenca de México que esta localiza al sur de la Altiplanicie Mexicana ($80^{\circ} 28'$ y $99^{\circ} 32'$ LW y $19^{\circ} 02'$ y $20^{\circ} 12'$ LN) rodeada de la Franja Volcánica Transmexicana, que comprende el Popocatepetl, Iztaccíhuatl, Ajusco y una cadena de sierras de las cuales descienden 45 ríos que aún existen. Tiene una superficie aproximada de 9,600 km². Su longitud máxima es de 110 km, de norte a sur y la mínima de 80 km, de este a oeste. Sus altitudes oscilan entre los 2,230 y 5,450 metros sobre el nivel del mar (Legorreta 2009). Es una cuenca de tipo endorreica y lacustre, en la actualidad drena artificialmente hacia otras cuencas adyacentes. La cuenca incluye cinco entidades federativas: Estado de México, Distrito Federal, Hidalgo, Tlaxcala y una pequeña zona en el estado de Puebla.

A. Clima

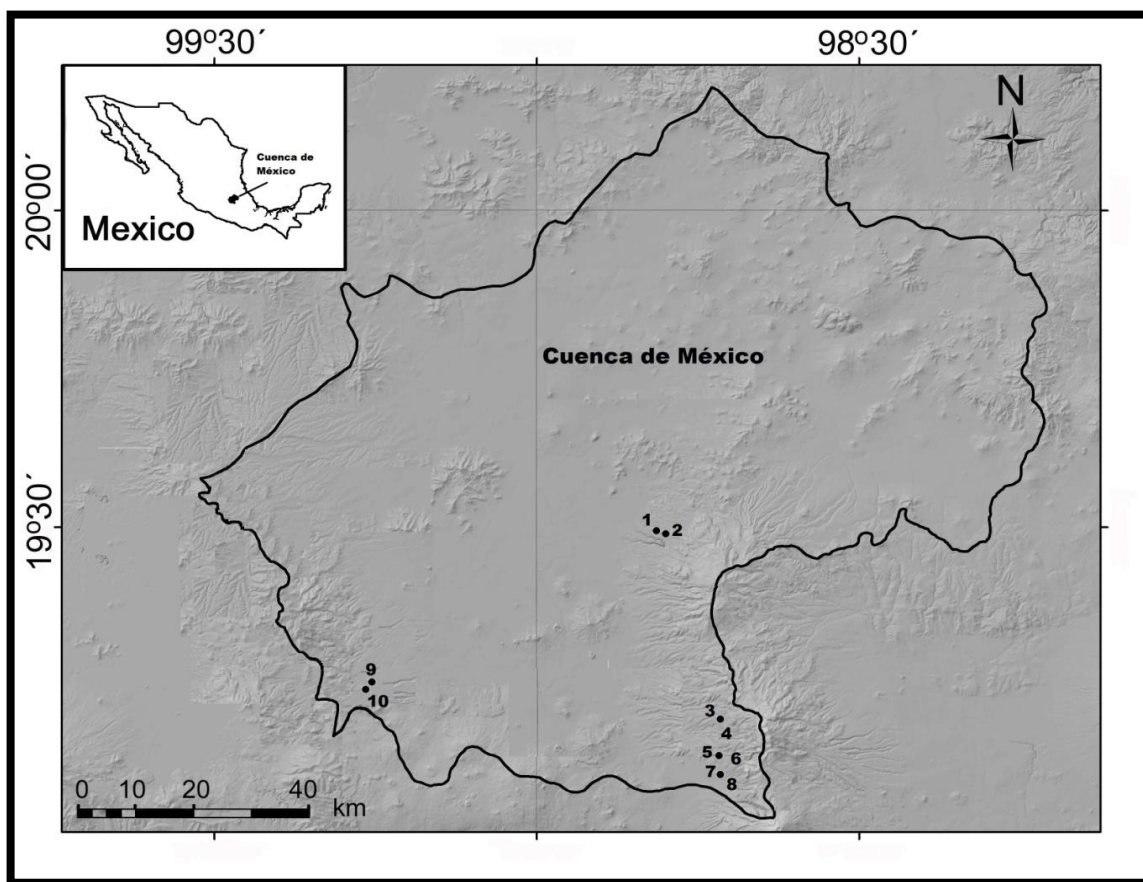
El clima predominante es el templado subhúmedo C(E) (W_2) (García, 2004) con una temperatura media anual entre 12 y 18°C. En la parte norte y central existen climas semisecos, que según el sistema de clasificación de Köppen modificado por García (2004), son los siguientes: BS, kw (w)(i') y BS k'w(w)(i'), correspondientes al clima templado semiárido con régimen pluvial máximo en verano. En el resto de la cuenca existen dos tipos climáticos: E(T) CH (frío) y EFHi (muy frío). La época de lluvias abarca de junio a octubre con precipitaciones medias anuales promedio del orden de 760mm, las más altas precipitaciones corresponden a la región montañosa del sur de la cuenca, sobre las sierras de las Cruces, Ajusco y Chichinautzin (Legorreta, 2009).

B. Vegetación y Geología

En sus partes más elevadas, la cuenca de México, presenta los siguientes tipos de vegetación: bosque de *Abies* y bosque de *Pinus* (Espinosa y Sarukhán, 1997). Las

unidades edafológicas predominantes son Feozems, Litosoles y Vertisoles. Una de las principales características de esta cuenca es una pendiente menor al 15% y que abarca un área de 5,136 km², 53.5 % de la superficie total de la cuenca, lo que resulta favorable para los usos de suelo urbano (asentamientos humanos) y actividades agrícolas de temporal. Los 4,464 km² restantes (46.5% total de la superficie de la cuenca) son terrenos montañosos y con pendientes mayores al 15%, y forman serranías principalmente en la zona poniente y al sureste del estado de México, así como en el sur del Distrito Federal (Legorreta, 2009).

Figura 3: Ubicación geográfica de la cuenca de México (Tomado de Rodríguez, 2014 y Bonilla *et al.*, 2014). Se señalan los sitios muestreados.



1: Miraflores (Texcoco, Edo. de México), 2: Santa Catarina (Texcoco, Edo. de México), 3: La Castañeda, 4: La Castañeda II, (Amecameca, Edo. de México), 5: La Compañía, 6: La Compañía II (Tlalmanalco, Edo. de México), 7: San Rafael, 8: San Rafael II (Tlalmanalco, Edo. de México), 9: Santa Rosa y 10: Desierto de los Leones (Cuajimalpa, Ciudad de México).

VII. OBJETIVOS:

A. General:

Aislar e identificar amibas de vida libre obtenidas de ríos de la cuenca de México y relacionarlos con algunas condiciones ambientales.

B. Particulares:

- ▶ Aislar e identificar morfológicamente amibas de vida libre de ríos de la Cuenca de México.
- ▶ Determinar los parámetros fisicoquímicos: oxígeno disuelto, % de saturación de oxígeno, conductividad, pH, alcalinidad y temperatura.
- ▶ Realizar la prueba de patogenicidad de los aislamientos pertenecientes a los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*.
- ▶ Confirmar los aislamientos de *Acanthamoeba* y *Naegleria* mediante el uso de Biología molecular (RT-PCR).
- ▶ Realizar un análisis estadístico para relacionar los parámetros fisicoquímicos y las AVL.

VIII. METODOLOGÍA

A. Trabajo de Campo

Se realizaron muestreos puntuales en 10 ríos de la cuenca de México. Se tomaron muestras de 100 ml cada una, en bolsas estériles. Se registraron *in situ* los parámetros fisicoquímicos: temperatura del agua y pH fueron medidos con un potenciómetro marca Conductronic PC18; porcentaje de saturación de oxígeno con un Oxímetro YSI-85 y conductividad específica (K_{25}), con un medidor de conductividad marca Hanna.

Las muestras se transportaron a temperatura ambiente al laboratorio de Microbiología Ambiental-Proyecto CyMA-FES-Iztacala.

B. Trabajo de laboratorio:

La alcalinidad se determinó por el método volumétrico utilizando H_2SO_4 como titulador y fenolftaleína y anaranjado de metilo como indicadores (APHA, 1995).

1. Cultivo monoxénico

Se agitaron las muestras de cada sitio de muestreo y se tomaron alícuotas de 50 ml por duplicado y se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min, se desechó el sobrenadante y el sedimento se inoculó en cajas de Petri con el medio agar no nutritivo adicionado con *Enterobacter aerogenes* (NNE). Una de las cajas Petri se incubó a 25°C y la otra a 37°C. Después de 48 hrs las placas se revisaron con un microscopio invertido para verificar el crecimiento amibiano.

2. Identificación por morfología

Se observaron preparaciones en fresco en un microscopio óptico (contraste de fases Zeiss K7 con contraste de fases) a 40× y por medio de las claves dicotómicas de Page (1988) y Pussard y Pons (1977), se identificaron las amibas, para lo cual se observaron trofozoítos y se midieron 100 quistes.

3. Cultivo axénico

Una vez que se obtuvieron los cultivos amibianos de *Naegleria* y *Acanthamoeba* libres de otros microorganismos, se seleccionó un área del medio NNE con abundante crecimiento de amibas y se colocó en medios líquidos (Bactocasitona y Ringer), con 10% de suero de ternera y se incubaron a temperatura ambiente.

4. Prueba de temperatura

Los aislamientos pertenecientes a los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria* se resembraron y se incubaron a 37°C y 45°C por separado para registrar el intervalo de tolerancia a la temperatura de cada cepa. Se observaron durante una semana.

5. Prueba de patogenicidad

Como se menciona anteriormente existen géneros potencialmente patógenos, es por esto que esta prueba se realizó únicamente a las amibas pertenecientes a los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*; utilizando el cultivo axénico, se concentró y centrifugó a 3000 rpm durante 10 min, ajustándose a una cuenta de 5×10^6 células. De este concentrado se inoculó 0.02 ml por vía intranasal a 5 ratones (cepa Balb/c), machos de 3 semanas de edad. Los ratones inoculados se observaron durante 21 días y se registraron los cambios físicos o de comportamiento. Los que sobrevivieron se sacrificaron y se les extirparon cerebro, pulmón, hígado y riñón y se colocaron en placas

con medio NNE incubándose a temperatura ambiente, para observar el crecimiento (De Jonckheere, 1980).

6. Prueba de flagelación

Esta prueba se realiza a las amibas pertenecientes al género *Naegleria*. A las amibas en cultivo axénico se le agregó aproximadamente 1.0 ml de agua destilada estéril y posteriormente se observó con el microscopio invertido cada 20 minutos hasta 4 horas si fuera necesario (Page, 1988).

7. Identificación molecular

a) Preparación de las muestras para RT-PCR

Se cultivaron los trofozoítos en medio axénico a 25°C en botellas de cultivo por aproximadamente cinco días, las amibas se cosecharon y después se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 min obteniendo la pastilla celular. La pastilla celular se usó para la extracción del ARN total.

El ARN total se extrajo mediante el uso de trizol (Invitrogen Life Technologies).

Al concentrado celular, se le agregó 1 ml de trizol y se homogenizó; posteriormente se le agregaron 200 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se centrifugó en tubos Eppendorf de 1.5 ml a 10,000 rpm por 10 minutos; la fase acuosa se recuperó en otro tubo, y se le agregaron 0.5 ml de isopropanol para ser centrifugado nuevamente a 10,000 rpm por 10 minutos. La pastilla resultante se lavó con 500 µl de etanol al 75%, se dejó secar y fue resuspendida en 30 µl de H₂O bidestilada conteniendo 0.1% de dietilpirocarbonato, DEPC (10813-012, Invitrogen, Carlsbad, CA).

Mediante una electroforesis se determinó la integridad del ARN total usando una alícuota de 3 µl en un gel de agarosa al 0.8% preparado con TE (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0).

b) RT-PCR

Confirmada la integridad del ARN, se continuo con la transcripción reversa (RT), para la cual se usó el kit: SuperScript II one step (18064-014, Invitrogen, Carlsbad, CA). 3 µg total de RNA será transcrito en un volumen total de 50 µl conteniendo:

- 25µl de 2x Reaction Mix
- 3 µl de la muestra de ARN
- 1 µl del Primer Forward
- 1 µl del Primer Reverse
- 1 µl RT/Platinum *Taq* Mix
- 19 µl de agua Inyectable

Teniendo el mix listo en tubos para PCR, se colocaron en un termociclador automatizado (Quanta Biotech s24) siguiendo las siguientes condiciones para los 45 ciclos.

Inicio/Fin	Proceso	Temperatura	Tiempo
	Alineamiento	50°C	30 min.
	Alineamiento	94°C	2 min.
Comienza el ciclo	Desnaturalización	94°C	15 seg.
	Alineación	55°C	30 seg.
Fin del ciclo	Elongación	72°C	1 min.
	Elongación Final	72°C	5 min.
	Almacenamiento	10 °C	-

Para el género *Acanthamoeba* se utilizaron los siguientes primers:

- JDP1 For (5' -GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA-3')
- JDP2 Rev (5' -TCT CACAAGCTGCTAGGGGAGTCA-3') (Schroeder *et al.*, 2001).

Amplifican una región del ADN ribosomal (18S rDNA) específica para este género, el producto de la PCR, presenta un tamaño que oscila entre 423 a 551 dependiendo del genotipo (Schroeder *et al.*, 2001).

Para el género *Naegleria* se utilizó el primer Nae específico el cual está diseñado a partir del 18(S) rDNA de diferentes especies de *Naegleria*. Con estos primers se espera un producto de 183 pb. (Schild *et al.*, 2007).

- Nae 3- For (5'-CAAACACCGTTATGACAGGG-3')
- Nae 3-Rev (5'CTGGTTTCCCTCACCTTACG-3') (Schild *et al.*, 2007).

Se usó otro primer que amplifica el gen 18S *Naegleria fowleri* el cual es un gen que codifica una proteína antigénica 13.1kDa localizada en los pseudópodos de los trofozoítos, con este primer se espera un producto de 360 pb (Shin *et al.*, 2001; Jeong, *et al.*, 2005).

- Nfa1 Fwd (5'-TGG CCA CTA CTA TTC CAT C -3')
- Nfa1 Rev (5'- AGC ACT CCC TTG TAC TTC -3')

c) Electroforesis del ADNc amplificado en geles de agarosa

Se preparó un gel agarosa al 2%, se vació en un molde para gel junto con el peine formador de pozos adecuado y se dejó madurar por 30 minutos, cuando estuvo listo se retiró el peine y se colocó en la cámara de electroforesis y se cubrió con amortiguador (TAE al 1%) hasta que el gel quedara sumergido. En el primer pozo se pusieron 2 µl de marcador de peso molecular y en los siguientes pozos se pusieron 5 µl del RNA amplificado por RT-PCR, más 2 µl de solución colorante de carga. La electroforesis se corrió a 80V por aproximadamente 40 min. Terminada la electroforesis se sumergió el gel en una solución de Bromuro de etilo por 10 min. aproximadamente y se observó el gel en un transiluminador con luz ultravioleta.

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Presencia de AVL

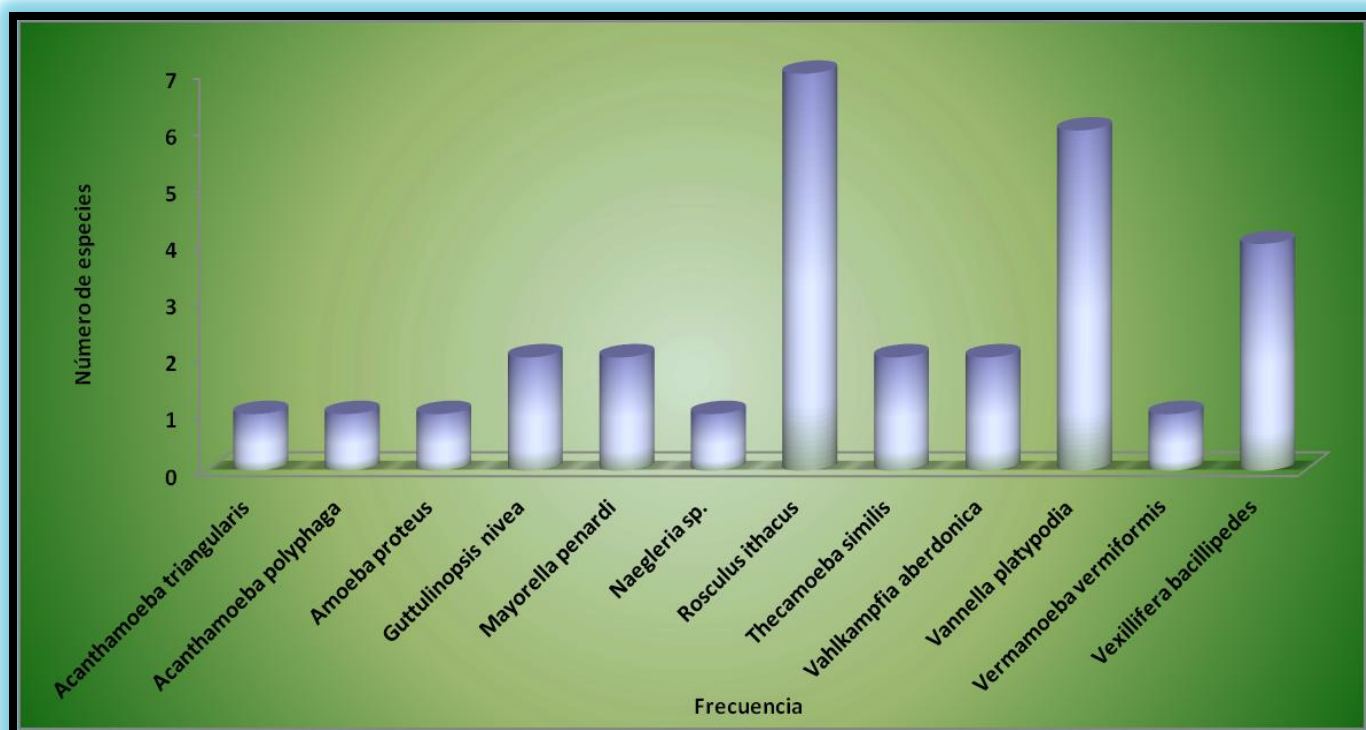
Se obtuvieron en total 38 aislamientos de amibas de vida libre, se identificaron 12 especies pertenecientes a 11 géneros. De los géneros potencialmente patógenos se identificaron 3 especies: 2 aislamientos de *Acanthamoeba* (*A. triangularis* y *A. polyphaga*) en ríos diferentes y solo 1 del género *Naegleria* el cual probablemente se trate de *Naegleria gruberi* o algún nuevo registro. Tabla 4 y (Fig. 6, a-g). Las especies más frecuentes fueron; *Rosculus ithacus* (Fig. 6 – h) al encontrarse en 7 de los 10 ríos, seguida de *Vannella platypodia* (Fig. 6 – j) que se registró en 6, lo cual concuerda con lo reportado por Bonilla y colaboradores en su investigación del 2014 en ríos ubicados también en la cuenca de México, ya que mencionan a *Vannella platypodia* y a *Rosculus ithacus* como las especies más frecuentes, de igual modo Ettinger y colaboradores en el 2002 reportaron a *Vannella* como el segundo género más aislado. *Vannella* presenta un estadio especializado para mantenerse flotando dentro del agua (forma flotante) (Fig. 6 –i) la cual le puede ayudar a tener cierta movilidad en la columna de agua, esta capacidad probablemente fue un factor importante para la frecuencia de este género en los ríos estudiados (Ettinger *et al*, 2002). En la presente investigación se identificaron 11 géneros (Fig. 4) los cuales coinciden con 11 de los 18 reportados por Bonilla y cols. (2014).

En cuanto a *Rosculus ithacus* se conoce muy poco sobre su ecología, Hawes en 1963 la describió por primera vez y reportó que aisló quistes del recto de una serpiente (Page, 1974), por lo cual probablemente el quiste sea muy resistente; de igual modo Page (1988) la describe como un consumidor de bacterias rápido y voraz, por lo cual muy probablemente estas fueron algunas de las razones para que estuviera presente en 7 de los 10 ríos muestreados.

Las especies *Acanthamoeba spp.*, *Mayorella penardi*, *Thecamoeba similis*, *Vahlkampfia aberdonica* y *Guttulinopsis nivea* estuvieron solamente en 2 de los 10 ríos y *Amoeba*

proteus, *Vermamoeba vermiformis* y *Naegleria sp.*, solamente se registraron en un río (Fig. 4).

Figura 4: Frecuencia de especies identificadas.



De los otros géneros aislados, *Vermamoeba* se ha encontrado asociada a casos de encefalitis y *Vahlkampfia* a casos de queratitis en humanos, pero no se ha comprobado su papel como agentes patógenos causantes de dichas enfermedades (Aitken *et al.* 1996, Centeno *et al.* 1996, Dua *et al.*, 1998, Inoue *et al.*, 1998, Michel *et al.*, 2000, Lorenzo *et al.*, 2007, Scheid, 2007).

B. Riqueza específica

En la figura 5 y tabla 3 se observa que en 9 de los 10 ríos se encontraron amibas, la mayor riqueza de especies se registró en el río Miraflores con 6 especies registrando el valor más alto de temperatura (16°C), seguido de los ríos La Compañía, La Castañeda y La compañía II con 4 especies registradas. En 5 de los 10 ríos se detectó una riqueza específica baja (2 a 3 especies). En el río Santa Rosa no se registró ninguna especie, esto probablemente debido a que fue uno de los ríos con la temperatura más baja registrada (7°C) (Tabla 5).

Figura 5: Riqueza específica por Río

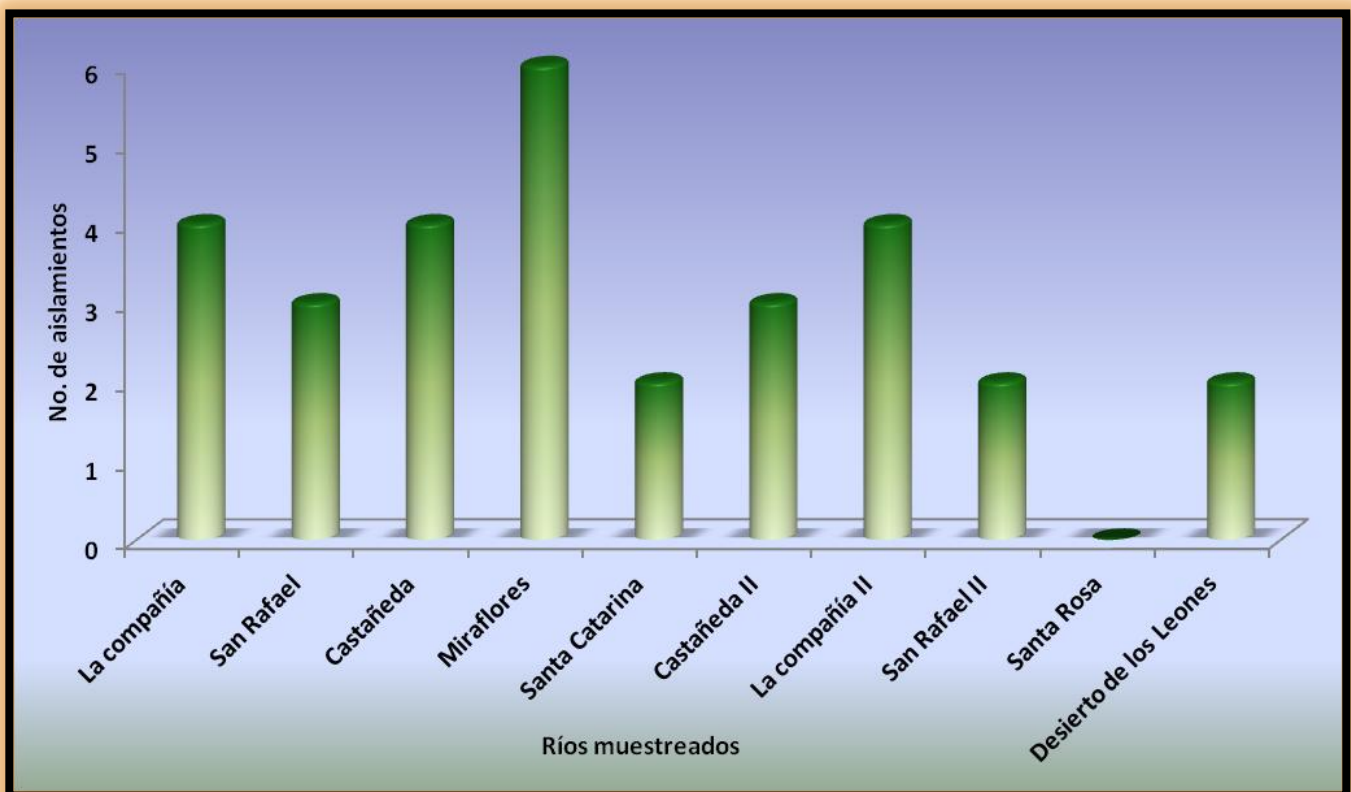


Tabla 3. Riqueza específica en cada sitio de muestreo

Río	Especies	Río	Especies
Río La compañía	<i>Guttulinopsis nivea</i>	Santa Catarina	<i>Acanthamoeba triangularis</i>
	<i>Vahlkampfia aberdonica</i>		<i>Rosculus ithacus</i>
	<i>Vannella platypodia</i>	Castañeda II	<i>Rosculus ithacus</i>
	<i>Vexillifera bacillipedes</i>		<i>Vexillifera bacillipedes</i>
San Rafael	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>		<i>Vannella platypodia</i>
	<i>Mayorella penardi</i>	La compañía II	<i>Guttulinopsis nivea</i>
	<i>Rosculus ithacus</i>		<i>Rosculus ithacus</i>
Castañeda	<i>Mayorella penardi</i>		<i>Vexillifera bacillipedes</i>
	<i>Rosculus ithacus</i>		<i>Vannella platypodia</i>
	<i>Thecamoeba similis</i>	San Rafael II	<i>Rosculus ithacus</i>
	<i>Vexillifera bacillipedes</i>		<i>Vannella platypodia</i>
Miraflores	<i>Amoeba proteus</i>	Santa Rosa	Ausencia
	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	Desierto de los Leones	<i>Vahlkampfia aberdonica</i>
	<i>Naegleria</i> sp.		<i>Vannella platypodia</i>
	<i>Rosculus ithacus</i>		
	<i>Thecamoeba similis</i>		
	<i>Vexillifera bacillipedes</i>		

Tabla 4: Clasificación de amibas de vida libre aisladas de los ríos de acuerdo con (Smirnov *et al.*, 2011; Adl *et al.*, 2012).

Supergrupo	Clase	Orden	Familia	Género
Amoebozoa	Tubulinea	Echinamoebida	Vermamoebidae	<i>Vermamoeba</i>
		Discosea	Dactylopodida	<i>Vexillifera</i>
		Vannellida	Vannellidae	<i>Vannella</i>
		Dermamoebida	Mayorellidae	<i>Mayorella</i>
		Thecamoebida	Thecamoebidae	<i>Thecamoeba</i>
		Centramoebida	Acanthamoebida	<i>Acanthamoeba</i>
			Amoebidae	<i>Amoeba</i>
Excavata	Discoba	Discicristata	Vahlkampfiidae	<i>Naegleria</i>
			Vahlkampfiidae	<i>Vahlkampfia</i>
		Discicristata	Guttulinopsidae	<i>Guttulinopsis</i>
		Discicristata	Guttulinopsidae	<i>Rosculus</i>

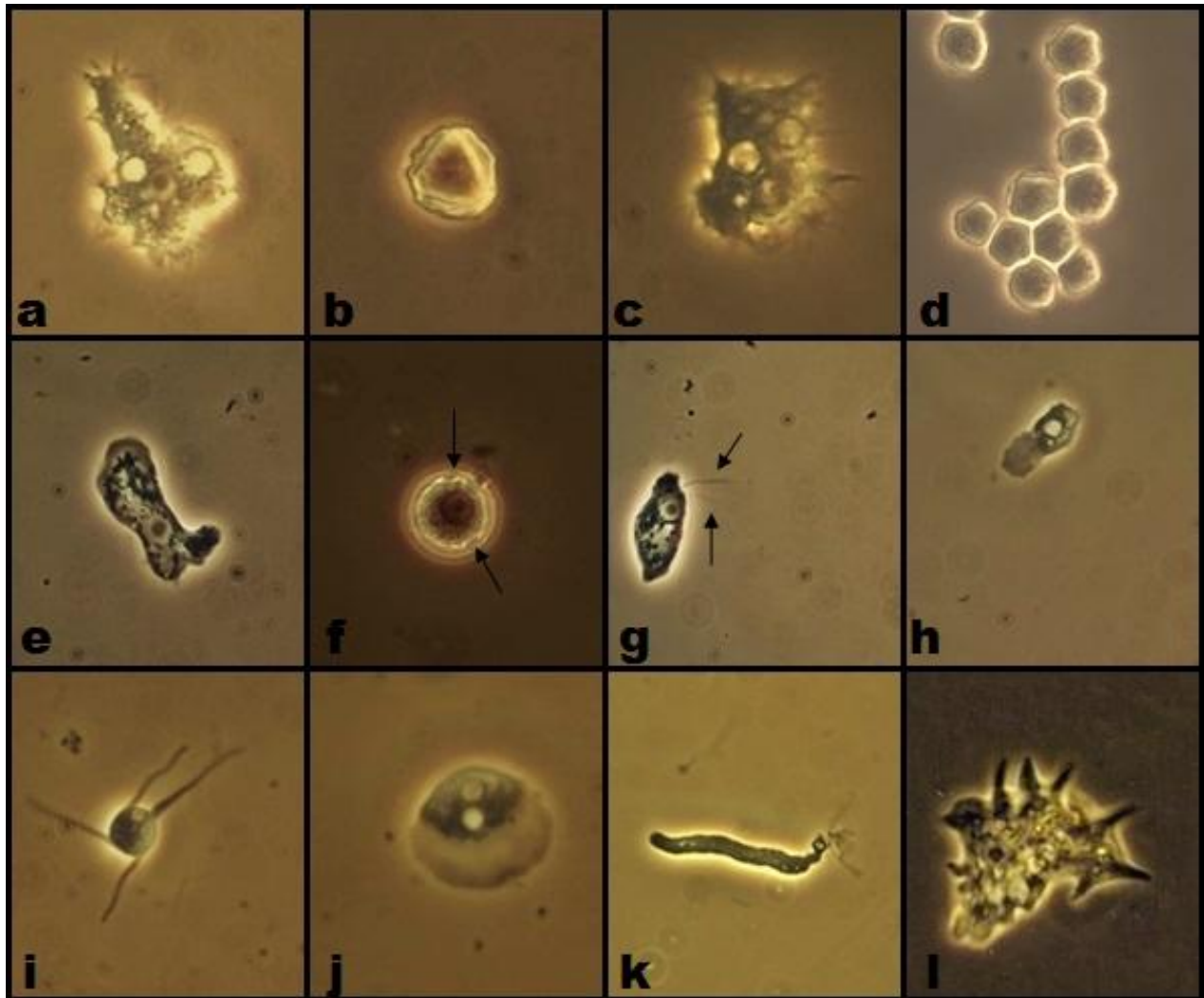
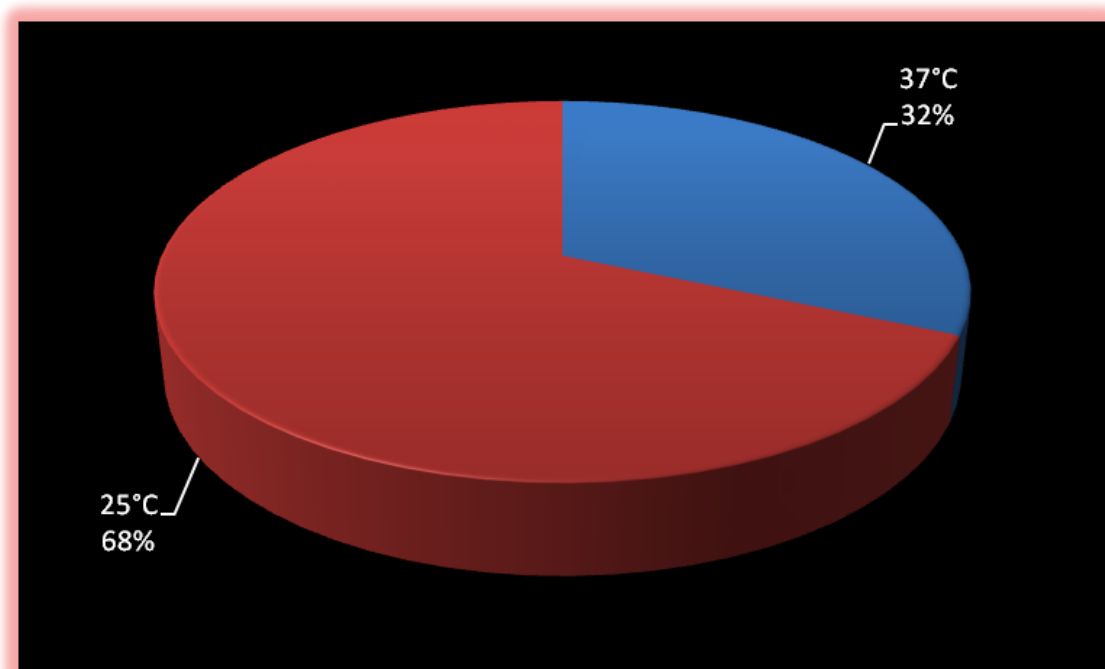


Figura 6: fotografías en contraste de fases 40 × de las amibas aisladas de los diferentes ríos, a: trofozoíto de *Acanthamoeba triangularis*, b: quiste de *Acanthamoeba triangularis*, c: trofozoíto de *A. polyphaga*, d: quistes de *A. polyphaga*, e: trofozoíto de *Naegleria sp.*, f: quiste de *Naegleria sp.* (se visualizan los poros), g: estado flagelar de *Naegleria sp.* h: trofozoíto de *Rosculus ithacus*, i: forma flotante de *Vannella platypodia*, j: trofozoíto de *V. platypodia*, k: trofozoíto de *Vermamoeba vermiformis* y l: trofozoíto de *Mayorella penardi*.

C. Aislamientos y tolerancia a la temperatura

De los 38 aislamientos de amibas de vida libre, 12 mostraron crecimiento a 37°C (31.57%) (Fig. 7 y 8) y 26 a 25°C (68.42%) (fig. 7 y 9). Hubo mayor crecimiento amibiano a 25°C lo cual era de esperarse ya que la temperatura promedio de los ríos fue de 10.3°C, por lo cual, probablemente las AVL están mejor adaptadas a bajas temperaturas. Lares y Lares en el 2009 reportan que de las 91 cepas encontradas, 22 se aislaron a 45°C (24%), 46 a 37°C (50%) y 23 a 20°C (25%), el mayor porcentaje lo obtuvieron a 37°C muy probablemente porque la temperatura del agua en los ríos estuvo en un promedio de 28°C. A diferencia, en esta investigación el porcentaje más alto de aislamientos fue a 25°C posiblemente porque la temperatura de los ríos tuvo un promedio de 10.2°C (Tabla 5).

Figura 7: Porcentaje de aislamientos a 25°C y a 37°C



Las especies *Acanthamoeba triangularis*, *Vexillifera bacillipedes*, *Vannella platypodia*, *Vahlkampfia aberdonica*, *Rosculus ithacus* y *Naegleria sp.* mostraron crecimiento a 25°C y a 37°C. Estos aislamientos amibianos al provenir de ríos con temperaturas menores a 17°C y mostrar crecimiento a 37°C significa que son termotolerantes. Las especies *Amoeba proteus*, *Guttulinopsis nivea*, *Mayorella penardi* y *Thecamoeba similis* solamente mostraron crecimiento a 25°C, no cumpliendo con la primera característica de las amibas patógenas, que son termófilas (Lares y Lares, 2009).

Figura 8: Frecuencia de aislamientos a 37°C

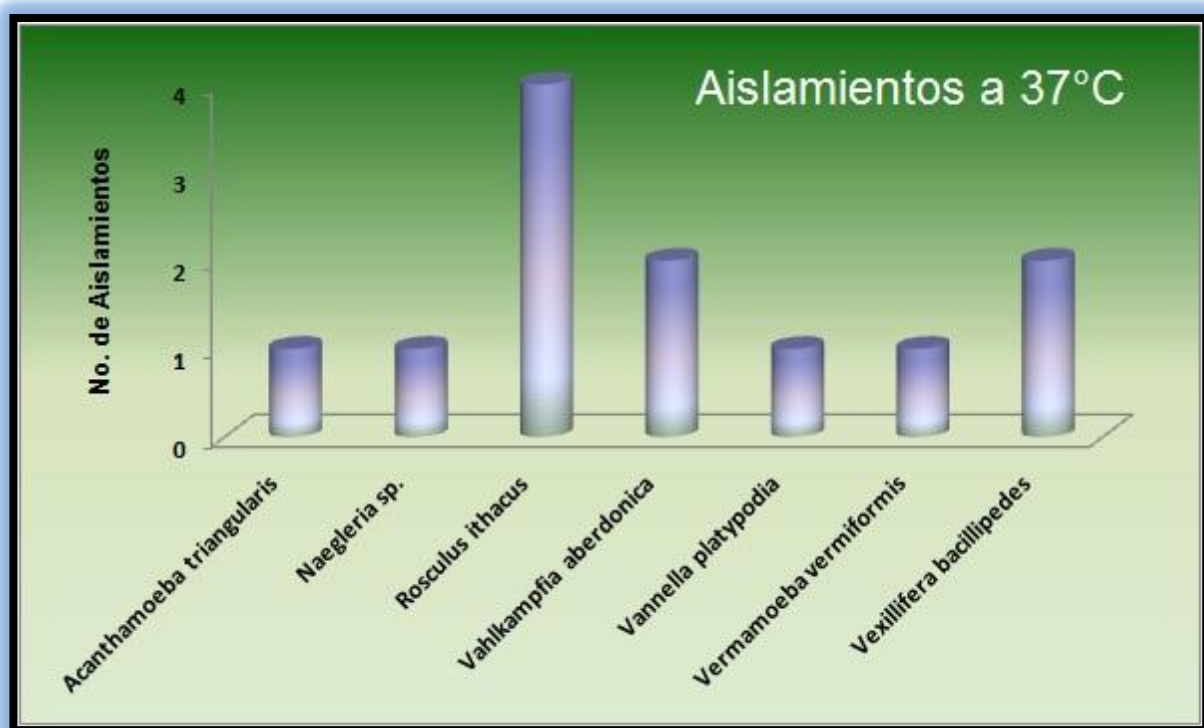
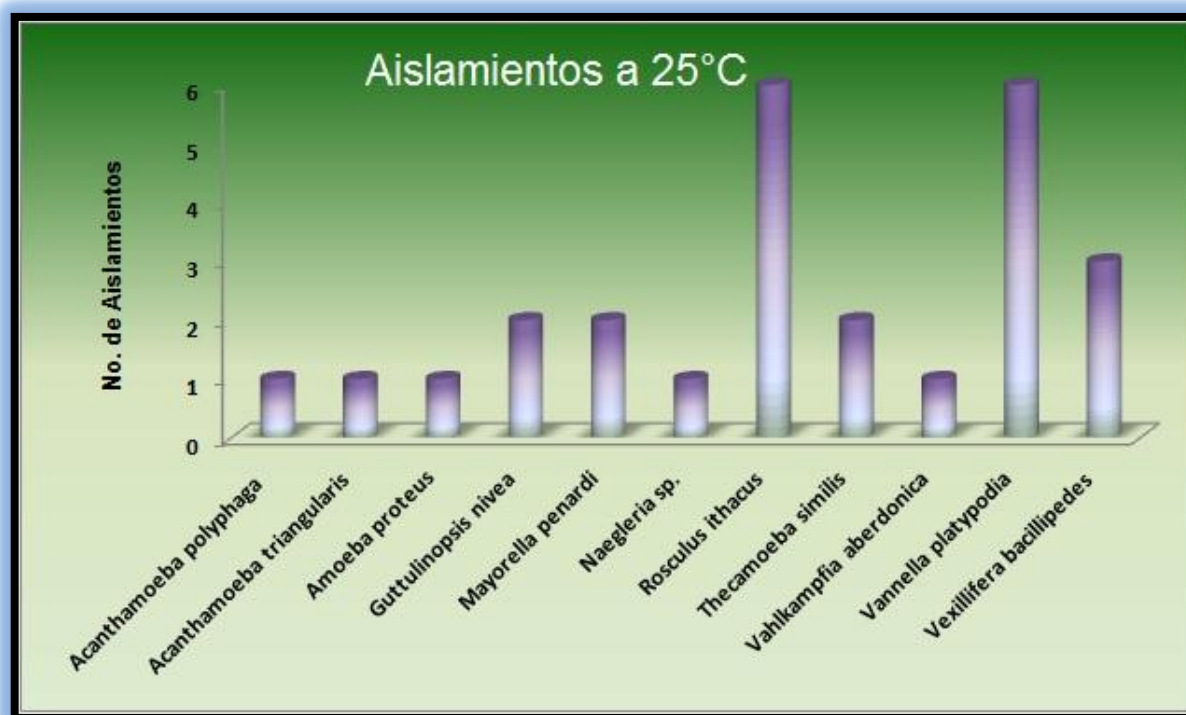


Figura 9: Frecuencia de Aislamientos a 25°C



D. Parámetros Fisicoquímicos

Tabla 5: Valores fisicoquímicos por río y por sitio de muestreo.

Río	K ₂₅ μS cm ⁻¹	T °C	SO %	OD mg L ⁻¹	pH	Alcalinidad mg L ⁻¹	Altitud msnm
La compañía	120	11.7	108	8.73	7.5	35.8	2847
San Rafael	140	10.6	100	9	7.7	32	2895
Castañeda	175	9.3	107	9.1	7	30.2	2625
Miraflores	441	16.7	76	5.73	7.7	119	2345
Santa Catarina	92	12.3	100	9.85	7.5	29	2855
Castañeda II	178	6.6	111.3	9.9	7.1	33	2625
La compañía II	187	9.6	97	8	6.8	24.2	2847
San Rafael II	135	9.1	100	8.36	7.7	37	2895
Santa Rosa	79	7.5	93	8	7	28	3015
Desierto de los Leones	77	9.4	88	7.8	6.6	42	2925
Promedio	162.4	10.28	90.01	8.447	7.262	41.02	2795

SO%: saturación de oxígeno, OD: oxígeno disuelto, T °C: temperatura. K₂₅: Conductividad

En la tabla 5 se pueden observar los valores registrados de los diferentes parámetros fisicoquímicos.

1. Temperatura

La temperatura del agua fue variable en los diferentes ríos muestreados, fluctuó de 6.6°C a 16.7°C con un promedio de 10.3°C (Figura 10). Los ríos con la temperatura más alta fueron el Miraflores (16.7°C) y el Santa Catarina (12.3°C) muestreados ambos en el mes de septiembre. En el río Miraflores se registró el valor de temperatura más alto 16.7°C y el mayor número de aislamientos, de igual modo Lares y Lares en el 2009 reportan que el número de aislamientos fue mayor en la muestra que tuvo la mayor temperatura del agua.

Los ríos con la temperatura más baja fueron Castañeda II con 6.6°C y Santa Rosa con 7.5°C, ambos muestreados en el mes de Noviembre. Las temperaturas se encontraron por debajo del valor óptimo para el desarrollo de las AVL patógenas (arriba de los 30°C) (Bonilla *et al.*, 2000), lo cual además, puede ser un factor que limita el desarrollo de un mayor número y variedad de AVL.

En el estudio realizado en Sonora, por Lares y Lares en el 2009 registraron temperaturas que oscilaron entre 25°C y 32°C, y reportaron un total de 91 cepas aisladas. En este estudio las temperaturas de los cuerpos de agua (promedio de 10.3°C), estuvieron mucho más bajas de lo reportado por Lares al igual que el número de cepas aisladas. En ese mismo estudio obtuvieron 14 cepas positivas a la prueba de flagelación y en esta investigación solamente una cepa, lo cual se podría deber a que algunas especies del género *Naegleria* potencialmente patógenas son termotolerantes por lo que se desarrollan mejor en cuerpos de agua a mayor temperatura, lo que al mismo tiempo lleva a la disminución o desaparición de especies no termotolerantes, disminuyendo así la competencia.

2. pH

El pH fue el parámetro que presentó más homogeneidad en todos los ríos, pues varió alrededor de la neutralidad (figura 10). Con un promedio de 7.2, un valor mínimo de 6.6 en el Río Desierto de los Leones y un valor máximo de 7.7 registrado en 3 ríos. Los intervalos de tolerancia de pH para las AVL fluctúan de 4.6 a 9.5 (Bonilla y Ramírez, 1993; Bonilla *et al.*, 2000), por lo que este parámetro no fue un factor limitante para el desarrollo de las AVL. Uribe en el 2014 reportó un amplio intervalo de pH con valores ácidos desde 4.26 hasta ligeramente alcalinos, registrando amibas en todos los sitios de muestreo; en otro estudio realizado en ríos de la cuenca de México, Bonilla y colaboradores en el 2014 reportan valores prácticamente neutros lo cual concuerda con esta investigación.

3. Oxígeno disuelto

Su incorporación al agua se da a partir del intercambio con la atmósfera o de la fotosíntesis de plantas y algas (Wetzel, 2001). Los niveles de oxígeno varían con la temperatura y la altitud, las aguas frías contienen mayor concentración de oxígeno disuelto que las cálidas (Spellman, 2004). El río Miraflores tuvo la concentración más baja de OD, esto probablemente debido a que fue el río con la mayor temperatura, en los otros ríos las concentraciones variaron de 5.7 mg L⁻¹ a 9.9 mg L⁻¹, con un promedio de 8.4 mg L⁻¹ (Figura 10). Debido que las AVL son aerobias, la presencia de oxígeno, es de importancia fundamental en su presencia y distribución. Los valores mínimos necesarios de OD que se reportan para la presencia de AVL son concentraciones de 1.0 mg L⁻¹. En este estudio las concentraciones de OD estuvieron por arriba de ese valor (tabla 5) por lo que no fue impedimento para la presencia de estas amibas (Bonilla *et al.*, 2004). Uribe en el 2014 reportó valores de OD en un rango de 7.2 a 7.6 mg L⁻¹, que son valores muy cercanos a los encontrados en esta investigación. Esto era de esperarse ya que su zona de estudio pertenece a la Cuenca de México y también son cuerpos de agua superficiales.

Los niveles de OD pueden usarse para conocer el nivel de contaminación de las aguas superficiales, las concentraciones bajas se asocian a mala calidad del agua, mientras que las altas con una buena calidad, los niveles óptimos para aguas superficiales varían entre 3 y 12 mg L⁻¹ (Robles *et al.*, 2004). En este estudio todos los ríos estuvieron por arriba de los 5 mg L⁻¹, por lo cual se considera que son ríos no contaminados con materia orgánica.

4. % Saturación de oxígeno

El oxígeno es un gas muy relevante en la dinámica del agua, su solubilidad está en función de varios factores, además, el porcentaje de saturación de oxígeno depende de la turbulencia, presión y de la superficie de contacto entre el gas y el agua (Marín, 2003). En este estudio estuvo constante en los 10 ríos teniendo un promedio de 90.1%, los valores fluctuaron entre 76% y 113% siendo valores altos conforme a lo que reporta Bonilla y colaboradores en el 2014 ya que ellos reportan que tuvieron valores altos de saturación teniendo de 80% a 127%.

Figura 10: Parámetros fisicoquímicos (OD, T y pH)

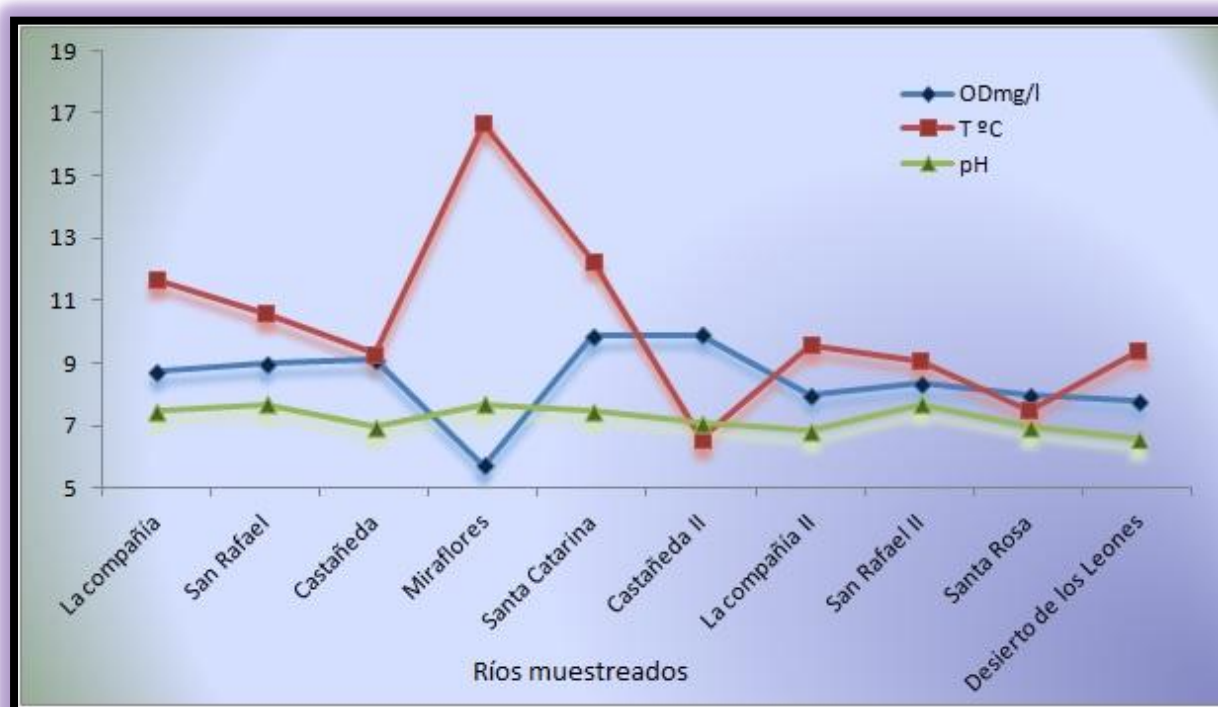
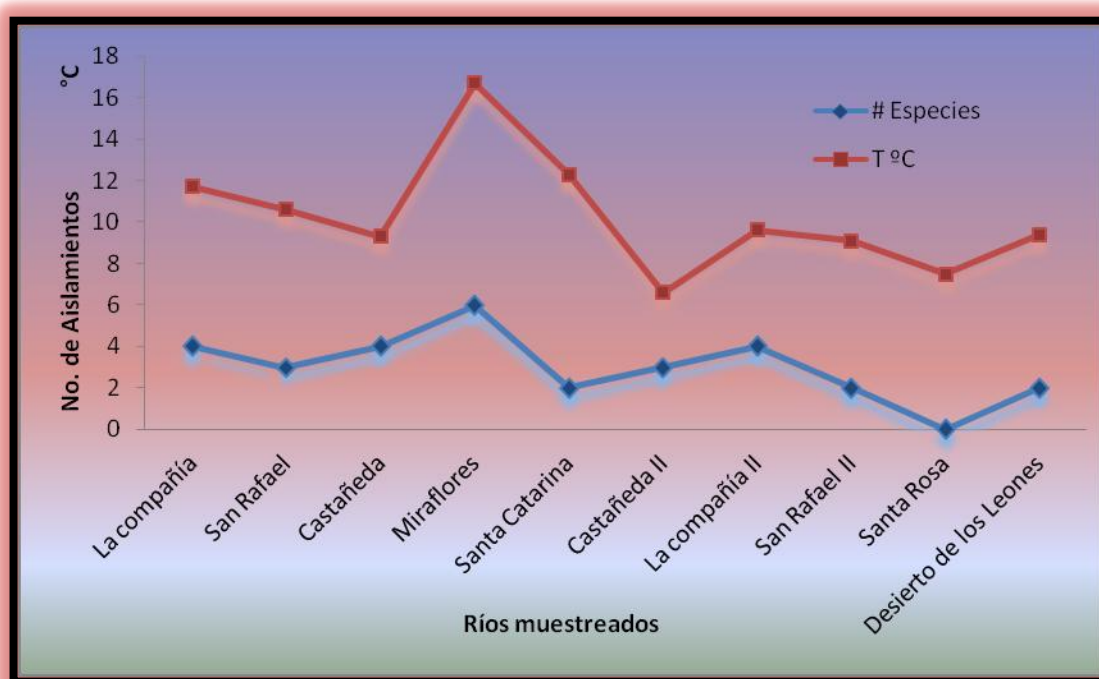


Figura 11: Especies registradas y temperatura



5. Alcalinidad

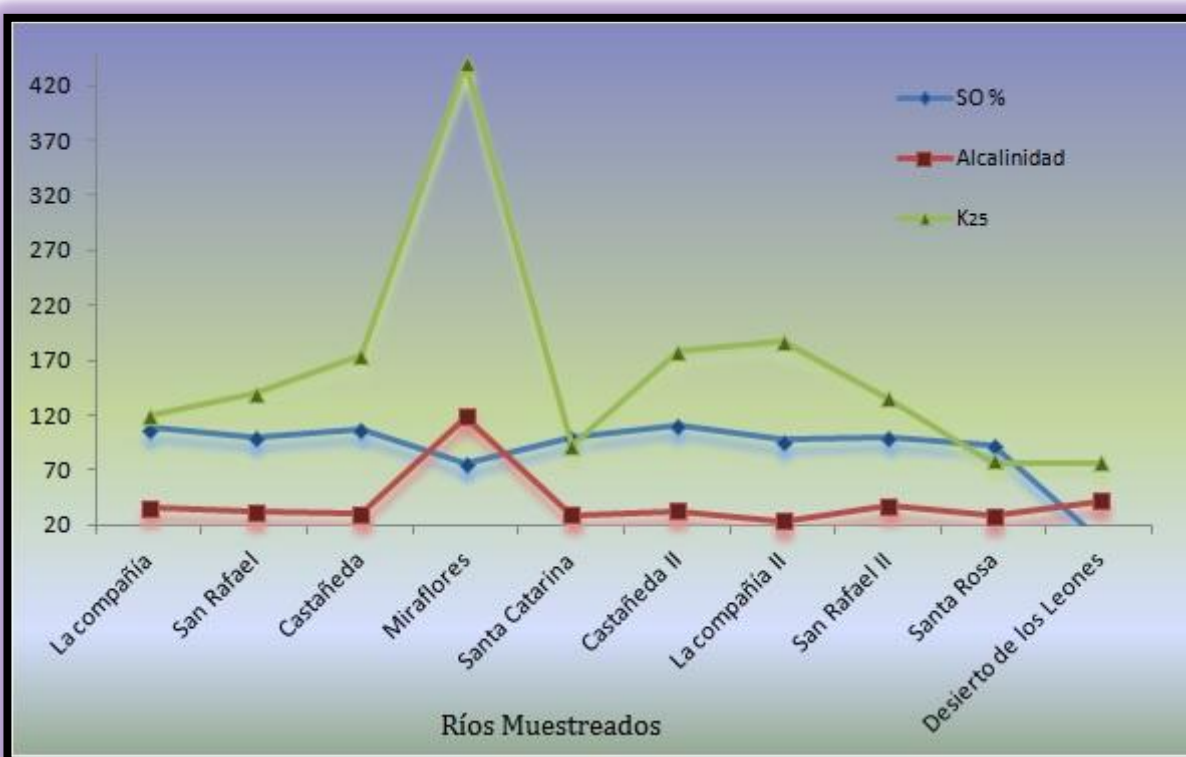
La alcalinidad en aguas naturales es debida generalmente a la presencia de tres clases de iones: bicarbonatos, carbonatos e hidroxilos, (Spellman, 2004). En este estudio a excepción del río Miraflores que tuvo un valor de 119 mg L^{-1} , se mantuvo constante, en los otros ríos se registró un valor mínimo de 24.2 mg L^{-1} en La Compañía II y un máximo de 42 mg L^{-1} en el Desierto de los Leones (Figura 12). Los elementos que lleva el agua en disolución proceden de la descomposición de las rocas, del lavado e intercambio de los iones con el suelo y la precipitación, este conjunto de factores determinan marcadas diferencias en el grado de mineralización del agua. La alcalinidad y la conductividad han sido frecuentemente utilizadas como medida directa de la mineralización del agua. (Margaleff, 1995; Wetzel, 1975). En un estudio realizado en ríos de la Cuenca de México (Rodríguez. 2014), registraron valores de alcalinidad con un promedio de 19.7 mg L^{-1} reportando como poco mineralizada el agua por lo cual los ríos de este estudio a excepción del río Miraflores se consideran poco mineralizados. El río Miraflores tuvo el

valor más alto de alcalinidad, muy probablemente debido a que el suelo y rocas cercanas a este río sean ricas en piedras calizas, de igual modo es importante resaltar que este río tuvo también el valor más alto de Conductividad.

6. Conductividad

La conductividad (K_{25}) es una medida de la capacidad que tiene el agua para conducir una corriente eléctrica, esta establece el grado de mineralización de un cuerpo de agua (Aguilar, 2002). En los ríos estudiados se registró un promedio de $162 \mu\text{S cm}^{-1}$, presentando de nuevo el río Miraflores el valor más alto con $441 \mu\text{S cm}^{-1}$ y el río Desierto de los Leones el valor más bajo con $77 \mu\text{S cm}^{-1}$ (Figura 12). En otras investigaciones se han logrado aislar amibas de vida libre en cuerpos de agua con valores muy variados de conductividad (de $920 \mu\text{S cm}^{-1}$ a $1682 \mu\text{S cm}^{-1}$) (Calderón, 2008) y con valores bajos como lo reportado por Bonilla y colaboradores en el 2014 donde sus valores de conductividad fueron de $75 \mu\text{S cm}^{-1}$ en secas y $76 \mu\text{S cm}^{-1}$ en lluvias, por lo que se considera que este factor no es limitante en la presencia o ausencia de las AVL, por lo menos dentro de los valores señalados antes mencionados.

Figura 12: Parámetros fisicoquímicos (% SO, Alcalinidad y K_{25})



E. Prueba de temperatura

Las claves para la identificación taxonómica de las AVL (Page, 1988; Pussard – Pons, 1977) incluyen además de la morfología de quistes y trofozoítos, criterios como la tolerancia a la temperatura y la prueba de patogenicidad en ratones a las amibas pertenecientes a los géneros con especies potencialmente patógenos (*Naegleria* y *Acanthamoeba*). Estas pruebas se realizaron para ser mas certeros en la determinación de los aislamientos.

Aislamientos	25°C	37°C	45°C
M1Aca	+	-	-
M2Aca	+	+	-
M1Nae	+	+	-

En la tabla 7 se observan los resultados de la prueba de temperatura que se realizó a las amibas pertenecientes a los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*: los aislamientos M2Aca y M1Nae mostraron crecimiento a 25°C y 37°C y ninguno a 45°C, lo cual indica que probablemente no sean cepas patógenas, como ya se ha mencionado antes las especies patógenas son termotolerantes, aunque no todas las termotolerantes son patógenas (Martínez y Janitsschke, 1985). (M1Aca: *A. polyphaga*, M2Aca: *A. triangularis* y M1Nae; *Naegleria sp.*).

F. Prueba de patogenicidad

Al concluir la prueba de patogenicidad ningún ratón presentó signos de enfermedad y ningún órgano presentó invasión o crecimiento amibiano. De acuerdo con Pussard y Pons (1977) la especie *Acanthamoeba polyphaga* es patógena en ratones, lo cual no se pudo comprobar en esta prueba, esto probablemente a que la virulencia de las cepas es determinada por diferentes factores y de acuerdo con De Jonckheere, (1980), al permanecer en cultivo axénico prolongado, la virulencia amibiana se va perdiendo.

Figura 13: Prueba de patogenicidad**Figura 14: Inoculación**

G. Prueba de flagelación para *Naegleria sp.* (M1Nae).

Page (1980) menciona que solamente algunas especies de la familia Vahlkampfiidae tienen un estadio flagelar, es por esto que esta prueba se realizó solamente para el aislamiento del género *Naegleria*.

El resultado de esta prueba fue Positivo, ya que la amiba flageló de manera espontánea al agregarse agua destilada a un cultivo axénico (fig. 6 -h), con lo cual se comprobó que la amiba pertenece al género *Naegleria*.

H. Pruebas Moleculares

Con el propósito de confirmar la identificación por criterios morfológicos, de las amibas pertenecientes a los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* se continuó con la identificación molecular. Se ha demostrado previamente la utilidad y confiabilidad de los métodos de

PCR para la detección de *Acanthamoeba* y *Naegleria* a nivel de género (Schroeder *et al.*, 2001).

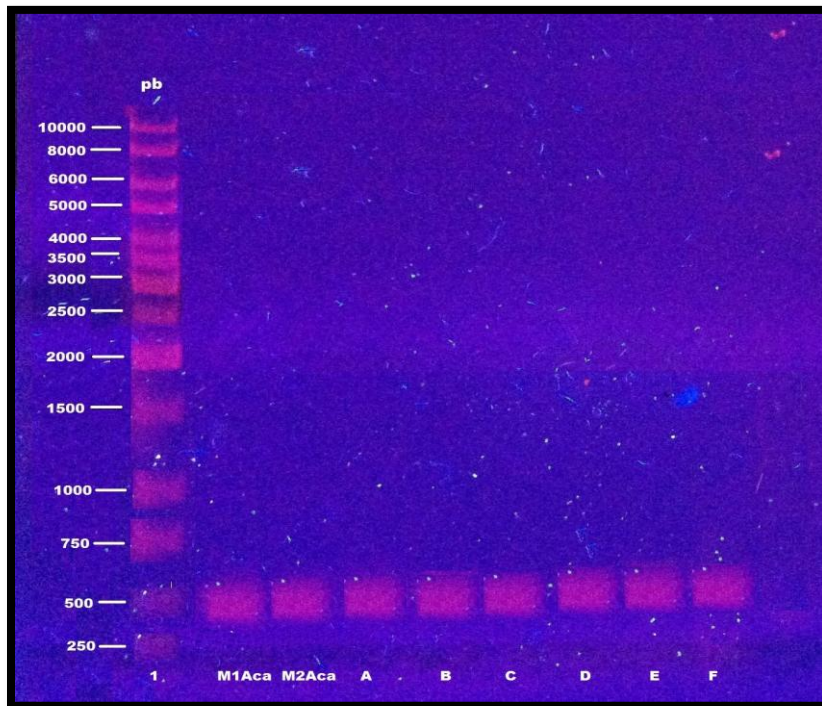
a) Extracción e integridad del ADN y RNA

Se extrajo el ADN y RNA de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria* de manera exitosa y se pudo comprobar su presencia e integridad en el gel de agarosa con lo cual se continuo con la RT- PCR.

b) RT- PCR: *Acanthamoeba*.

Se utilizó el primer: JDP1-Forward y JDP2-Reward, específico para el género *Acanthamoeba*. Los productos de RT-PCR se visualizaron en geles de agarosa, teñidos con bromuro de etilo donde se observaron los amplicones correspondientes al gen específico para el género *Acanthamoeba* (producto final de aproximadamente 500 pb) con lo cual se confirma molecularmente que las cepas M1Aca y M2Aca son amibas pertenecientes al género *Acanthamoeba* (Figura 15):

- Carril 1: marcador de tamaño molecular.
- M1Aca y M2Aca son los aislamientos de este estudio
- A: es un aislamiento de *Acanthamoeba* sp. de otra investigación,
- B, C, D, E y F son cepas de referencia (ATCC), excepto la EF2:
 - B: *Acanthamoeba culbertsoni* (A1)
 - C. *Acanthamoeba lenticulata* (PD2)
 - D: *Acanthamoeba* sp. (EF2)
 - E: *Acanthamoeba castellanii* (NEFF)
 - F: *Acanthamoeba quina* (L1A)

Figura 15: Revelado del RT- PCR para género *Acanthamoeba*

c) **RT-PCR: *Naegleria*:**

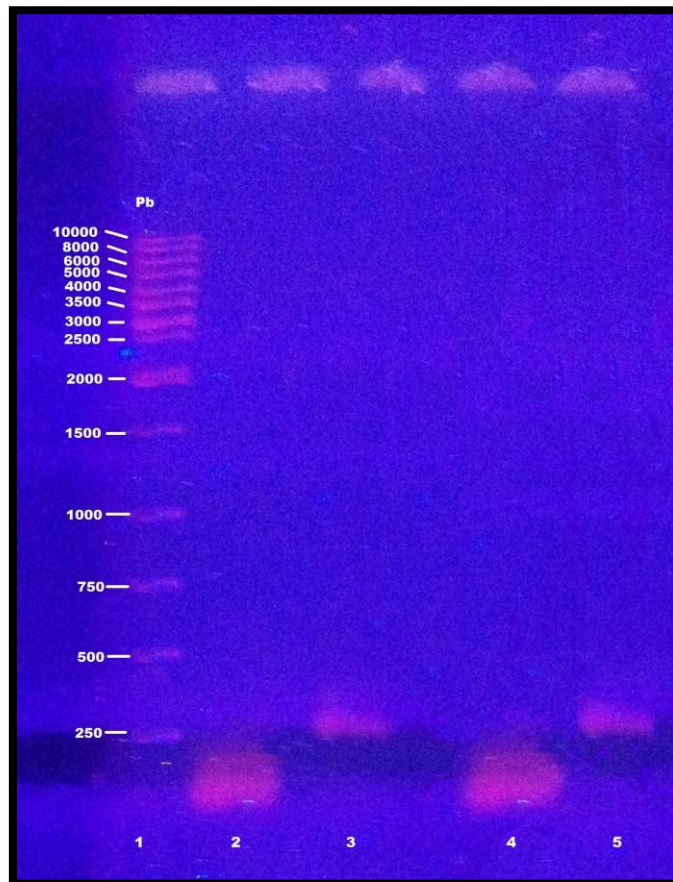
Se observa el producto (183 pb) de la RT- PCR correspondiente a los primers: Nae-Forward y Nae-Reward que amplifican un gen específico para *Naegleria*, el cual es evidenciado en la figura 16 con lo cual se confirma que el aislamiento M1Nae corresponde al género *Naegleria*, de igual modo el producto del RT-PCR para el primer: Nfa1-Forward y Nfa1-Reverse amplificó (Fig. 16): este primer ha sido reportado como un gen de virulencia específico para *Naegleria fowleri*, lo cual no se pudo demostrar en la prueba de patogenicidad ya que ningún ratón mostro algún síntoma o invasión, actualmente se sabe que la virulencia es multifactorial y Page (1988) menciona que algunas características o habilidades se van perdiendo o reduciendo después de varios meses en cultivos de laboratorio de igual modo, menciona que *N. fowleri* tiene capacidad para crecer en temperaturas desde los 20°C hasta los 45°C y en la prueba de temperatura el aislamiento M1Nae solo mostró crecimiento a 20°C y 37°C. Morfológicamente Page (1988), menciona la ausencia de poros en el quiste de *N. fowleri* y este aislamiento tiene aproximadamente de 2 a 3 poros, por lo cual muy

probablemente el gen Nfa1 que es reportado específico para *N. fowleri* (Shin *et al.*, 2001), es compartido por otras naeglerias que no necesariamente tienen la misma virulencia o no son *N. fowleri*.

Figura 15: Carriles:

- 1: Marcador de peso molecular
- 2: M1Nae: amplificado con el primer Nae
- 3: M1Nae: amplificado con el primer Nf1
- 4: Cepa de referencia: *Naegleria lovaniensis* (ATCC-30569) amplificado con el primer Nae
- 5: Cepa de referencia: *N. fowleri*. (ATCC-30808) amplificado con el primer Nf1.

Figura 16: Revelado del PCR para género *Naegleria*.



Como se mencionó anteriormente el aislamiento de *Naegleria* solamente se pudo identificar hasta género, tanto por la prueba de biología molecular, como por la morfología del quiste y su crecimiento a temperatura máxima de 37°C. Es probable que se trate de la especie no patógena *Naegleria gruberi*. Se propone para futuras investigaciones el uso de primers específicos a nivel de especie, o de una secuenciación específica. Varios autores proponen la secuenciación de la subunidad pequeña del ADN núcleo ribosomal (SSU rDNA) y de las regiones espaciadoras (ITS) comparando los resultados de estas pruebas con bases de datos específicas en línea, al igual que realizar cladogramas para así ser más certeros en la identificación de una especie tanto del género *Naegleria* como *Acanthamoeba* (Dyková *et al*, 2006).

I. Análisis estadístico

Para analizar la relación de los parámetros fisicoquímicos con las amibas, se realizó una correlación no paramétrica de Spearman. El análisis muestra que existe una correlación significativa entre las amibas con: la conductividad (Tabla 6), esto quiere decir que a mayor conductividad habrá mayor presencia de amibas, actualmente se sabe que las amibas pueden alimentarse de manera osmótrofa como holozoica, probablemente algunos de los iones disueltos tenga alguna relación para facilitar estos procesos. (Gallegos *et al.*, 2014).

Otra correlación significativa fue la Altitud con las amibas (Tabla 6). Esta correlación es negativa lo cual significa que a mayor altitud la cantidad de amibas será menor. El mismo análisis estadístico muestra que hay una correlación negativa de la altitud con la conductividad, lo cual indica que a mayor altitud la cantidad de iones disueltos es menor. Esto puede deberse a que a mayor altitud generalmente los ríos están más cerca del manantial donde surgen por lo cual, la cantidad de material suspendido y disuelto es menor. Por otro lado, al aumentar la altura, la temperatura disminuye (Tulot, 2000).

Estos ríos están a altitudes de los 2,345 msnm a 3,015 msnm por lo cual son zonas de templadas a frías. En el río Miraflores, ubicado a la menor altitud y con el valor de temperatura más alto, se obtuvo el mayor número de amibas. En la figura 11 se observa que hay una relación de la temperatura con el número de aislamientos por río, lo cual no pudo ser confirmado en el análisis estadístico, pero tomando en cuenta que la altitud influye de manera directa sobre la temperatura de los ríos se puede decir que la temperatura es un factor importante que influye sobre las amibas.

Tabla 6: Correlación de Spearman

		Altitud	Solidos D.	SO %	ODmg/l	T °C	pH	Conductividad	Alcalinidad
Amibas de Vida Libre	Coefficiente de correlación	-.855**	.747*	.196	-.094	.480	.171	.792**	.199
	Sig. (bilateral)	.002	.013	.588	.797	.160	.636	.006	.581
Altitud	Coefficiente de correlación	1.000	-.865**	-.396	-.206	-.281	-.199	-.820**	-.183
	Sig. (bilateral)	.	.001	.257	.569	.431	.581	.004	.612

*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).**. La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

X. CONCLUSIONES

Mediante criterios morfológicos y moleculares se identificaron 12 especies pertenecientes a 11 géneros.

En 9 de los 10 ríos estudiados hubo presencia de Amibas de vida libre.

Se aislaron un total de 38 cepas de amibas de vida libre, de las cuales 3 pertenecen a géneros potencialmente patógenos, sin embargo no resultaron patógenos.

La especie *Rosculus ithacus* fue la más frecuente al estar presente en 7 de los 10 ríos.

En el río Miraflores se aisló e identificó el mayor número de AVL esto probablemente a que fue el río que tuvo el valor más alto de conductividad y de temperatura.

Los parámetros fisicoquímicos (oxígeno disuelto, saturación de oxígeno, conductividad, pH, alcalinidad y temperatura) se encontraron dentro de los valores reportados como adecuados para la presencia de amibas de vida libre.

Mediante el análisis estadístico se comprobó que existe una correlación significativa entre las amibas y la conductividad, al igual que una correlación negativa entre las amibas y la altitud.

Se confirmó por medio de la RT- PCR que las cepas M1Aca y M2Aca corresponden al género *Acanthamoeba* y M1Nae corresponde al género *Naegleria*.

El producto de RT-PCR para el gen Nfa1 que es reportado específico para *N. fowleri* fue amplificado por el aislamiento M1Nae, pero tomando en cuenta la prueba de temperatura, prueba de patogenicidad y morfología se trata de otra especie no patógena de *Naegleria* que comparte ese gen.

XI. LITERATURA CITADA

- Adame, A., y Salin, D. 1993. Contaminación Ambiental. Editorial Trillas, 2da edición, México. 70pp.
- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Lane, C., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppentrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A.D., Mozley-Stranridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, J., Shadwick, L., Schoch, C.L., Smirnov, A.V., Spiegel, F.W. 2012. The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 429–493.
- Aguilar, I. 2002. Estudio bacteriológico y fisicoquímico de la calidad del agua de la Laguna de Mecocan, Tabasco, México. Licenciatura. ENEP Iztacala. UNAM. pp87.
- Aitken D., Hay J., Kinnear F.B., Kirkness C.M., Lee W.R. y Seal D.V. 1996. Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hartmannella* infection. *J Ophthalmol.* 103, 485–494.
- Aladro, L. M. 2006. Principales clasificaciones de los protozoos. Las prensas de Ciencias. UNAM. Facultad de Ciencias. Primera edición. México. 90p.
- APHA, 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th ed. Washington. Ame Public H Asso. 110p.
- Barker, J., Brown, M., Collier, P., Farrell, I., y Gilbert. 1992. Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *App Enviro. Microbiol.* 58(8), 2420-2425.
- Bitton, G. 1999. Wastewater Microbiol. 2a edición. Wiley. Canada. 26 p.
- Bonilla, P. 2000. Heterogeneidad de las Amibas de Vida Libre con potencial Patógeno Aisladas de la Atmósfera de la Ciudad de México. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Bonilla, P., Caballero, A., Carmona, J. y Lugo, A. 2014. Occurrence of free-living amoebae in streams of the Mexico Basin. *Exp. Parasitol.* 145: S28-S33.
- Bonilla, P., Ramírez, E., Ortiz, R., y Eslava, C. 2004. “La Ecología de las Amibas Patógenas de Vida Libre en Ambientes Acuáticos”. En: Rosas, Cravioto y Ecurra (Eds.). *Microbiología Ambiental*. PUMA-UNAM e Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT. 67 - 81. ISBN 968-817-707-5.

- Bonilla, P. y Ramírez, E. 2014. Amibas de vida libre patógenas y oportunistas. En: Becerril M.A. Parasitología Médica. Mc Graw-Hill Interamericana Editores S.A de C.V. Capítulo 5: 37-50.
- Bonilla, P., Ramírez, E., Ortiz, R., Calderón, A., Gallegos, E. y Hernández, D. 2000. Occurrence of free-living amoebae in aquatic systems of Huasteca Potosina, México. En: Munawar, M., Lawrence, S y Malley, D. (eds). Aquatic Ecosystems of Mexico: Status and Scope. Ecovision World Monograph Series. Backhuys Publishers (Ed.), Holanda. Pp. 37-44.
- Bonilla, P. y Ramírez, E. (1993). Sistema de tratamiento de lecho de raíces: Las amebas de vida libre. Rev. Inf. Cien. Tec. 15, 22-25.
- Calderón, A. V. 2008. Aislamiento de la ameba patógena *Naegleria fowleri* del agua de los canales de riego de Mexicali, Baja California, Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias-UNAM. 84pp.
- Cavalier, T. 1998. A revised six-kingdom system of life. Biol. Rev. 73:203–266.
- Cavalier, T. y Nikolaev S. 2008. The zooflagellates *Stephanopogon* and *Percolomonas* are a clade (Percolatea: Percolozoa). J Eukaryot Microbiol. 55:501–509.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2009. Free-living Amebic Infections. <http://www.cdc.gov/dpdx/freeLivingAmebic/>. (Consultada en Noviembre de 2014).
- Centeno, M., Rivera, F., Cerva, L., Tsutsumi V., Gallegos E., Calderón, A., Ortiz, R., Bonilla, P., Ramírez, E. y Suárez, G. 1996. *Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient with meningoencephalitis and bronchopneumonia. Arch. Med. Res. 27, 579–586.
- Cervantes, I., Serrano, J., García, E., Tsutsumi, V., Shibayama M. 2008. Characterization of brain inflammation during primary amoebic meningoencephalitis. Parasitol. Intern. 57; 307-313.
- Comisión Nacional del Agua, 2012. <http://www.conagua.gob.mx/atlas/ciclo20.html> (Consultada noviembre de 2014).
- Comisión Nacional del Agua. 2002. Determinación de la disponibilidad de agua en el acuífero Cuernavaca, Morelos.
- Curtis, H. y Barnes, N. 2000. Biología. 6ª Edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- De Jonckheere, J.F. 2002. A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. Acta Protozool. 41: 309-342.

- De Jonckheere, J.F. 1980. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. *Applied and Env Microbiol.* 39, 681-685.
- Dua, H., Azuara-Blanco, A., Hossain, M. y Lloyd, J. 1998. Non-*Acanthamoeba* amebic keratitis. *Cornea.* 17, 675-677.
- Dyková, I., Kostka, M. and Pecková, H. 2008. Morphology and SSU rDNA-based phylogeny of a new strain of *Saccamoeba* sp. (*Saccamoeba* Frenzel, 1892, *Amoebozoa*). *Acta Protozool.* 47:397-405.
- Dyková, I., Pecková, H., Fiala, I., & Dvoráková, H. 2006. Fish-isolated *Naegleria* strains and their phylogeny inferred from ITS and SSU rDNA sequences. *F. Parasitol.* 53(3), 172-180.
- Espinoza, F., y Sarukhán, J. 1997. *Manual de malezas del Valle de México.* Fondo de Cultura Económica. 403p.
- Ettinger, M., Webb, S., Harris, S., McIninch, S., Garman, G. y Brown, B. 2002. Distribution of free-living amoebae in James River, Virginia, USA. *Parasitol Res.* 89:6-15.
- Fenchel, T. 1987. *Ecology of Protozoa: The biology of free living phagotrophic protists.* Springer Verlag, Wisconsin. 197p.
- Ferrante, A. 1991. Free living amoebae: pathogenicity and immunity. *Parasitic Immunol.* 13: 31-47.
- Gallegos, E., Lugo, A., Calderón, A., Sánchez, M. y Mayen, R. 2014. Biodiversidad de protistas amébidos de vida libre en México. *R Mex. Bio.* 85.
- García, E. 2004. *Modificaciones al sistema de clasificación de Köppen.* Instituto de Geografía, UNAM. 90.
- Goudot, S., Herbelin, P., Mathieu, L., Banas, S. y Jorand, F. 2012. Growth dynamic of *Naegleria Fowleri* in microbial freshwater biofilm. *Water Res.* 46:39583966.
- Greub, G., & Raoult, D. 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinic microbiol rev.* 17(2), 413-433.
- Hannisch, W. H. 1997. Primary amebic meningoencephalitis: a review of the clinical literature. *Wild Enviro Medic.* 8:211-213.
- Hsu, B., Huang, C., Chen, J. y Huang, J. 2011. Comparison of potentially pathogenic free-living amoeba hosts by *Legionella* spp. In substrate-associated biofilms and floating biofilms from spring environments. *Water Res.* 45: 5171-5183.

- Inoue, T., Asari, S., Tahara, K., Hayashi, K., Kiritoshi, A. y Shimomura, Y. 1998. *Acanthamoeba* keratitis with symbiosis of *Hartmannella* ameba. Am. J. Ophthalmol. 125, 721-723.
- Jeong, S. R., Lee, S. C., Song, K. J., Park, S., Kim, K., Kwon, M. H. & Shin, H. J. 2005. Expression of the nfa1 gene cloned from pathogenic *Naegleria fowleri* in nonpathogenic *N. gruberi* enhances cytotoxicity against CHO target cells in vitro. Infect Immun. 73(7), 4098-4105.
- John, D. T. 1993. Opportunistically pathogenic free-living amobae, En: Kreier, J. P. y Baker, J. R. Parasitic Protozoa. Academic Press, San Diego California, U.S.A. 2 (3): 143-246.
- Kyle, D., Noblet, G.P. 1985. Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in freshwater lakes. J Protozool. Feb;32(1):99-105.
- Lares-Jiménez, L. F. y F. Lares-Villa. 2009. Aislamiento de amebas de vida libre en aguas superficiales del Valle del Mayo, Sonora. Rev Latin Rec Nat. 5:159-165.
- Lasake, I., Korte, J., Kaneshiro, E., Marciano-Cabral, F. y Oerther, D. 2009. Identification of *Naegleria fowleri* in warm ground water aquifers. J. Environ. Qual. 39: 147-153.
- Legorreta, J. 2009. Ríos, Lagos y manantiales del Valle de México. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 365p.
- Llamas, M., Hernández-Mora, N. y Martínez, C. 2000. Uso intensivo de las aguas subterráneas. Aspectos éticos, tecnológicos y económicos. Serie A. N 1.
- Lorenzo, J., Martínez, E., Batista, N., Álvarez, 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.
- Marciano-Cabral, F. 1988. Biology of *Naegleria* spp. Clinic Microbiol Rev. 52:114.
- Margalef, R. 1955. Los organismos indicadores en la limnología. Biología de las aguas continentales. XII. Min de Agricult. Inst. Forest. Invest. Exp Madrid. 300 pp.
- Marín-G, R. 2003. Físicoquímica y microbiología de los medios acuáticos tratamiento y control de calidad de aguas. Editorial Díaz de Santos. Universidad Politécnica de Cartagena. Cartagena. España.
- Martinez, A. J. y Janitsschke, J. 1985. *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism; A review. Infect. 13: 251-256.
- Martinez, A.J. y Visvesvara, G. 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. Brain Pathol. 7:583-598. Madrid. 54pp.

- Michel R., Schmid E.N., Böker T., Hager D.G., Müller K.D., Hoffmann R. y Seitz H.M. 2000. *Vannella* sp. harboring Microsporidia-like organisms isolated from the contact lens and inflamed eye of a female keratitis patient. *Parasitol. Res.* 86, 514–520.
- Oddó, B.D. 2006. Infecciones por Amibas de Vida Libre. Comentarios históricos, taxonómicos y nomenclatura, Protozoología y cuadros anátomos - clínicos. *Rev. Chil. Infect.* 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.* Bio Asso Scien Pub, Londres. 122 p.
- Page, F. C. 1974. *Rosculus ithacus* Hawes, 1963 (Amoebida, Flabelluidae) and the amphizoic tendency in amoebae. *Acta Protozol.* 13(12), 143-156.
- Preston, T. M. 2003. The water-air interface: a microhabitat for amoebae. *European J. Protist.* 39(4), 385-389.
- Preston, T., Richards, H. y Wotton, R. 2001. Locomotion and feeding of *Acanthamoeba* at the water-air interface of ponds. *FEMS Microbiol Let.* 194, 143–147.
- Pussard, M. y Pons, R. 1977. Morphologie de la paroi Kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba*. *Protistol.* 13(4):557-598.
- Rivera, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Ortiz, R., Hernández, D. y Rivera, V. 1994. Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in Mexico City and its suburbs. *Wat Air Soil Pollut.* 74:65-87.
- Robles, E., González, M. E. and Castillo, P. 2004. Contaminantes Físicos y Químicos del Agua y sus Efectos en el Hombre y el Medio Ambiente. UNAM, FES Iztacala, México.
- Rodríguez, R. 2014. Diversidad y distribución de algas macroscópicas en ríos de alta montaña de la cuenca de México, Tesis de Licenciatura (Biología), UNAM, México.
- Scheid, P. 2007. Mechanism of intrusion of a microspordian-like organism into the nucleus of host amoebae (*Vannella* sp.) isolated from a keratitis patient. *Parasitol. Res.* 101, 1097–1102.
- Schild, M., Gianinazzi, C., Gottstein, B., y Muller, N. 2007. PCR-based diagnosis of *Naegleria* spp. infection in formalin-fixed and paraffin-embedded brain sections. *J Clin Microbiol.* 45: 564–567.
- Schroeder, J., Booton, G., Hay, J., Niszl, I., Seal, D., Markus, M., Fuerst, P. y Byers, T. 2001. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1903–1911.

- Schuster, F.L. 2002. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:342-354.
- Schuster, F. L. 1979. Small amoebae and amoebiflagellates. En: Levandowsky M. y Hunter SH (eds) *Bio Phy of Protozol.* 1(2):215.
- Schuster, F., y Visvesvara, G. 2004. Free-living amoebae as Opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol.* 34(9): 1001-1027.
- Shin, H., Cho, M., Jung, S., Kim, H., Park, S., Kim, H., Im, K. 2001. *Molecular cloning and characterization of a gene encoding a 13.1 kDa antigenic protein of Naegleria fowleri.* *J. Eukaryot. Microbiol.* 48:713-717.
- Sierra, C. A., 2005. Calidad del agua. Diagnóstico y evaluación. Medellín.
- Sigala, R.I. 2008. Registro Protozoológico en Cinco Biotopos de los Riscos de Querétaro, México. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. México. UNAM. 110 P.
- Smirnov, A. y Brown, S. 2004. Guide to the methods of study and identification of soil gymnamoebae. *J. Protist.* 3:148-190.
- Smirnov, A., Chao, E., Nassonovac, E. y Cavalier-Smith, T., 2011. A revised classification of naked lobose amoebae (Amoebozoa: lobosa). *Protist.* 162, 545-570.
- Smirnov, A. y A. Goodkov. 1999. An illustrate list of basic morphotypes of Gymnamoeba (Rhizopoda, Lobosea). *J Protist.* 1:20-29.
- Spellman, F. R. 2004. Manual del Agua Potable. España. Ed. Acribia. 255p.
- Tullot, I. F. 2000. Climatología de España y Portugal (Vol. 76). Universidad de Salamanca.
- Tyndall, R., Ironside, P., Metler, E., Tan, T., y Fliermans, C. 1989. Effect of thermal additions on the density and distribution of thermophilic amoebae and pathogenic *Naegleria fowleri* in a newly created cooling lake. *Enviro Microbiol.* 55:722-732.
- Uribe, E. 2014. Presencia de Amibas de vida libre en la Sub Cuenca Valle de Bravo-Amanalco y su relación con algunos parámetros fisicoquímicos. Tesis de licenciatura (Biología). UNAM. México.
- Wetzel, R. G. 2001. *Limnology. Lake and River Ecosystems.* 3rd Ed. Academic Press, p. 1006.
- Wetzel, R. G. 1975. *Limnology.* Saunders. Philadelphia. Pa. 743.
- Yera, H., Goldschmidt, P. y Chaumeil, C. 2012. Amibes libres: *Acanthamoeba, Naegleria, Balamuthia.* *EMC. Biol. Medic.* 7:4

ANEXOS**➤ Agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes* (NNE)**

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

Mezclar en seco todos los ingredientes, agregar 500 ml de agua destilada y disolver, completar el volumen de 1000 ml y hervir hasta que se disuelva el agar completamente.

Esterilizar a 121°C durante 20 minutos. Se vierten 20 ml en cajas Petri. Cuando el agar se ha solidificado se vierten 5 gotas de una suspensión concentrada de bacteria *E. aerogenes* inactivada 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 hasta su uso.

➤ Medio Ringer

NaCl :	6.0 g
KCl :	0.075 g
CaCl ₂ :	0.1 g
NaHCO ₃ :	0.1 g
Agua destilada :	1000 ml
pH :	7 - 7.4

Esterilizar a 121°C de 15 a 20 minutos, dejarse enfriar y agregar suero de ternera con antibiótico al 10 % *Enterobacter aerogenes* inactivada, y almacenar en refrigeración hasta su uso.

➤ **Medio Bactocasitona**

Bactocasitona:	20g
Agua destilada:	1000ml

Mezclar los ingredientes. Se envasa 2.7 ml del medio en tubos con tapón de rosca y se esteriliza a 121°C durante 15 min, se deja enfriar y se guardan en el refrigerador, hasta su uso.

Cuando se utilice el medio, se sacan los tubos del refrigerador, se ponen a temperatura ambiente y se les agrega 0.3ml de suero bovino con antibiótico.