



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**Amebas de vida libre en el canal de riego Revolución en  
el Ejido Saltillo Mexicali, Baja California Norte.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A:**

**Miguel Angel Ramírez Flores**



**DIRECTORA DE TESIS:  
M. en C. Elizabeth Ramírez Flores**

**Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 2019**



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.

***A mi ma'. Me guiaste y enseñaste.  
Aquí un pequeño resultado de tus  
grandes esfuerzos.***

***A mi tía. Mi familia y mi maestra.  
Compartiste tu amor y conocimiento,  
siempre has estado ahí.***

***A mi cielito. Llegaste  
inesperadamente y ahora contemplo en ti  
la costa a donde voy.***

***Gracias por todo.***

## **Agradecimientos**

Agradezco a la UNAM que me brindo un lugar en sus escuelas y me dio la oportunidad de aprender de la ciencia y la vida.

Agradezco a la FES Iztacala y a todos los profesores que me enseñaron y guiaron en este periodo, por brindarme la oportunidad de conocer y formarme en la biología.

A mis sinodales; Dra. Patricia Bonilla Lemus, Dr. Víctor Manuel Rivera Aguilar, Mtra. Esperanza del Socorro Robles Valderrama y Biol. Blanca Nieves Martínez Rodríguez. Gracias por su tiempo, su paciencia, por sus consejos y observaciones.

A mis padres. Gracias ma' por cuidarme, enseñarme, guiarme y regañarme. Por ti soy la persona que soy y espero siempre enorgullecerte, porque yo siempre lo estoy de ti. Gracias Salva por cuidarnos, guiarme y enseñarme, has sido un gran apoyo y complemento para nosotros.

Le agradezco a mi tía, no solo me apoyo como familia, también como profesora y directora de tesis. Me guiaste y aguantaste este camino, me enseñaste a fascinarme por este mundo tan interesante de las amebas y no me soltaste.

Gracias, cielito, por estar para mí siempre, por aguantarme. Agradezco que hayas llegado justo como meteorito a alinear mi vida y enseñarme un camino más interesante, divertido. Por no dejar que me rindiera cuando estuve a punto de tirar la toalla.

Gracias en especial a unos cuantos profesores que creyeron en mí y me apoyaron en mi camino, vieron en mí algo, me apoyaron para llegar hasta acá y espero no decepcionarlos.

Finalmente le agradezco a Isma y a todos mis amigos que estuvieron ahí cuando los necesité. Gracias por esos excelentes momentos y anécdotas tan divertidas.

## Tabla de contenido

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>3</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>5</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>6</b>
<b>Marco Teórico</b> .....	<b>7</b>
Amebas de Vida Libre .....	7
<b>Marco de referencia</b> .....	<b>9</b>
<b>Zona de estudio</b> .....	<b>11</b>
<b>Justificación</b> .....	<b>13</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>13</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>14</b>
Toma de muestra .....	14
Aislamiento e identificación .....	15
Prueba de flagelación .....	15
Tolerancia de temperatura .....	15
Prueba de patogenicidad .....	15
Biología molecular.....	16
Análisis estadísticos.....	18
<b>Resultados y discusión</b> .....	<b>19</b>
Riqueza específica general.....	19
Diagnóstico por biología molecular de las cepas aisladas de <i>Naegleria</i> .....	20
Distribución de las especies de AVL en el canal Revolución. ....	21
Frecuencia de las especies de AVL .....	22
Prueba de tolerancia a la temperatura. ....	25
Prueba de patogenicidad .....	27
Parámetros físicos y químicos .....	29
Distribución espacial de las especies de AVL y su correlación con los datos físicos y químicos.....	31
<b>Conclusiones</b> .....	<b>35</b>
<b>Literatura citada</b> .....	<b>36</b>

## Resumen

Las amebas de vida libre (AVL) son organismos cosmopolitas y se encuentran en todo tipo de hábitat. Al ser de una amplia distribución, las AVL tienen un papel ecológico muy importante; sin embargo, no debe dejarse a un lado el aspecto médico, ya que existen géneros con especies potencialmente patógenos para el ser humano, pudiendo causar enfermedades severas. Las amebas patógenas comparten en su mayoría ser termófilas, por lo que es común encontrarlas en cuerpos de agua calentados natural o artificialmente, y en regiones de altas temperaturas como la zona norte de México donde los cuerpos de agua naturales son calentados por arriba de 30°C en su parte superficial, se tiene una mayor probabilidad de encontrar estas amebas; como en el Valle de Mexicali, donde sus canales de riego cumplen la característica anterior. Esta es una zona donde existen diversos reportes de muertes causadas por estas amebas; por lo que es importante profundizar el conocimiento de las AVL en el ambiente. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar la presencia de amebas de vida libre en el canal de riego Revolución en el Ejido Saltillo del Valle de Mexicali, Baja California Norte.

Se realizó un muestreo en cuatro diferentes sitios, en el mes de noviembre del 2016, tomando 250 mL de agua en recipientes estériles y midiendo *in situ* la temperatura, el pH, la conductividad y el oxígeno disuelto. En el laboratorio las muestras se procesaron e incubaron a 30°C y 37°C, para su posterior identificación morfológica, pruebas de temperatura y patogenicidad. Para algunas de las cepas aisladas de *Naegleria* se confirmó el diagnóstico a nivel de especie por métodos de biología molecular.

Se identificaron 18 especies, incluyendo los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*, donde cinco cepas de *Naegleria* resultaron patógenas y dos de *Acanthamoeba* fueron solamente invasivas. La especie más frecuente en los sitios de muestreo fue *Vermamoeba vermiformis*.

En cuanto a los parámetros físicos y químicos, se encontraron dentro de los rangos reportados para la proliferación de AVL y no se encontró una correlación entre estos y la presencia de amebas. Sin embargo, la temperatura del agua no pasó de 17°C, la cual podría considerarse baja para que se pudieran encontrar tantas cepas patógenas en los sitios. Por

otro lado, la conductividad, un parámetro no muy frecuentemente medido en estudios ecológicos de AVL, resulto elevada en comparación a los estudios donde se ha medido.

## **Introducción**

Las amebas de vida libre (AVL) son organismos cosmopolitas y ubicuas, es decir, se encuentran en todo tipo de hábitat; agua, aire, suelo e inclusive algunos géneros dentro del cuerpo de vertebrado. El suelo es su hábitat principal, desde el cual pueden llegar a cuerpos de agua o ser arrastradas por corrientes de aire; siendo estas dos los principales medios de dispersión de las amebas (Bonilla & Ramírez, 2014).

Al ser de una amplia distribución, las AVL tienen un papel reconocido en las redes tróficas, fungiendo como predadoras de microorganismos, principalmente de bacterias, ayudando a mantener el flujo de energía y el reciclado de materia de manera más efectiva (Rodríguez-Zaragoza, 1994). Sin embargo, no debe dejarse a un lado el aspecto médico, ya que existen especies de algunos géneros que pueden pasar a un ciclo de vida parasitario; por tanto, estos son considerados potencialmente patógenos al ser humano, causando enfermedades severas (Schuster & Visvesvara, 2004; Bonilla & Ramírez, 2014; Visvesvara, 2014).

No se tiene un conocimiento exacto de cómo afectan los parámetros físicos y químicos a estas amebas (Rodríguez-Zaragoza, 1994); sin embargo, las amebas patógenas comparten en su mayoría ser termófilas, por lo que es común encontrarlas en cuerpos de agua calentados natural o artificialmente (Rivera *et al.*, 1989; Bonilla *et al.*, 2000; Sifuentes *et al.*, 2014).

En regiones de altas temperaturas, como la zona norte de México donde alcanzan hasta los 50°C (Camargo-Bravo & García-Cueto, 2012) y los cuerpos de agua naturales son calentados por arriba de 30°C en su parte superficial (García-Cueto *et al.*, 2013), se tiene una mayor probabilidad de encontrar estas amebas termófilas (Rivera *et al.*, 1989; Rohr *et al.*, 1998). Mexicali se encuentra al norte de México con un clima que García (1973) denomina como cálido seco, muy extremo con gran oscilación anual de temperatura y precipitación escasa de régimen intermedio entre

verano e invierno. En este valle se ubica la región agrícola formada por la zona de Baja California; por lo que se han desarrollado una gran red de canales de riego, cuyas aguas provienen del río Colorado (INEGI, 2003).

## **Marco Teórico**

### Amebas de Vida Libre

- Generalidades

Estos organismos formados por una sola célula se encuentran dentro de los sarcodinos, los cuales se caracterizan por emitir pseudópodos para su locomoción, lo que le da a su cuerpo una forma ameboidea, y puede estar protegida por conchas externas o internas. Algunos grupos pueden presentar forma flagelada por ciertos estadios. El citoplasma se divide en ectoplasma (forma pseudópodos) y endoplasma (contiene los organelos) (Anderson, 2010; Anderson & Rogerson, 2011).

- Ciclo de vida

Dentro de las AVL se pueden distinguir dos estadios: un estado activo de alimentación y reproducción (dada por fisión binaria) llamado trofozoíto, y otro estado de latencia para resistir condiciones adversas llamado quiste. Aunque como se mencionó anteriormente, existe otro estadio llamado flagelar el cual sólo sirve para una locomoción hacia otro ambiente (John, 1993; Bonilla *et al.*, 2004). De acuerdo a los cambios ambientales en que se sometan estas amebas pueden cambiar de una forma a otra hasta encontrar el estadio mejor conveniente al medio en que se encuentren (John, 1993).

- Aspectos ecológicos

Las AVL son cosmopolitas y se encuentran en todo tipo de hábitat; marino, dulceacuícola, aire, suelo e inclusive dentro de vertebrados. El suelo es su hábitat principal, desde el cual pueden llegar a cuerpos de agua o ser arrastradas por corrientes de aire; siendo el agua y aire su principal medio de dispersión (Bonilla *et al.*, 2004).

Se han aislado de cuerpos de agua naturales como lagos, acuíferos, pozos y ríos (Kyle & Noblet, 1985, 1986; John & Howard, 1995; Ettinger *et al.*, 2003; Garaycochea *et al.*, 2008; Ramírez *et al.*, 2009, 2012; Bonilla *et al.*, 2014); agua de uso recreativo, sistemas de tratamiento de agua residual, agua potable, albercas, entre otros (Ramírez *et al.*, 1993; Rivera *et al.*, 1993; Vesaluoma *et al.*, 1995; Rohr *et al.*, 1998; Ramírez *et al.*, 2005; Ramírez *et al.*, 2014; Todd *et al.*, 2015; Ramírez *et al.*, 2016); suelo (Lorenzo-Morales *et al.*, 2005; Rodríguez-Zaragoza *et al.*, 2005; Geisen *et al.*, 2014) e inclusive aire (Rivera *et al.*, 1993).

Las amebas tienen un papel reconocido en las redes tróficas, principalmente en los ecosistemas acuáticos, fungiendo como predadoras de microorganismos, principalmente de bacterias, ayudando a mantener el flujo de energía y el reciclado de materia de manera más efectiva (Rodríguez-Zaragoza, 1994). Lo anterior es debido principalmente a tres razones; las amebas y los protistas en general, son excelentes recicladores de carbono evitando que se pierda esa materia como detritus, manteniendo así un alto nivel de mineralización de la materia orgánica; las amebas poseen ventaja sobre otros organismos por tener un ciclo de vida reactivamente corto y tamaño pequeño, lo que les confiere un uso más eficiente de los recursos disponibles y una reacción más rápida al incremento de masa bacteriana. Por último, su característica de ubicuidad les provee una gran diversidad de depredadores, principalmente invertebrados, como algunos artrópodos, nematodos, etc., asegurando la interacción entre descomponedores y niveles tróficos superiores (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Sherr & Sherr, 2002).

Las relaciones entre amebas y bacterias se consideran muy ligadas no solo por las redes tróficas, sino también por las relaciones simbióticas que pueden tener entre sí, fungiendo las amebas como vectores para otros microorganismos como bacterias, virus, hongos, entre otros (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Bonilla *et al.*, 2004).

Como se ha mencionado, algunas amebas de vida libre pueden encontrarse dentro de vertebrados, siendo endoparásitos de estos, así como a su vez, ser de vida libre, por lo que se les denominan organismos anfizoicos. Esto junto con su capacidad de

ser vectores de otros microorganismos les atribuye a algunas especies, la característica de ser patógenos a los animales, entre ellos al humano (Schuster & Visvesvara, 2004).

- Relevancia médica

Las amebas reconocidas como potencialmente patógenas son de los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Sappinia*. Algunas especies de estos géneros pueden causar graves enfermedades al humano, afectando principalmente al cerebro, ojos, piel y pulmones (Schuster & Visvesvara, 2004).

Las enfermedades causadas por estas amebas son difícilmente detectadas, ya que generalmente se confunden con otras enfermedades más comunes, dando por consecuente un tardío diagnóstico. Sumándose a esto, el tratamiento para las dos principales enfermedades, que son generalmente mortales; la meningoencefalitis amebiana primaria (MAP), causada por *Naegleria fowleri* y la encefalitis amebiana granulomatosa (EAG), causada por *Acanthamoeba* spp., es peligroso en sí mismo, y efectivo sólo si se aplica en las primeras etapas de la infección (Bonilla *et al.*, 2004; Schuster & Visvesvara, 2004).

Es importante aclarar que son amebas patógenas aquellas que causan alguna enfermedad sintomática en el hospedero; sin embargo, cuando las amebas se esparcen dentro del mismo sin causarle una sintomatología, se les denomina que sólo fueron invasivas.

## **Marco de referencia**

- Valenzuela *et al.* (1984) reportaron un caso de Meningoencefalitis en un joven de 16 años oriundo de Mexicali, México. En agosto de 1978, una semana después de haber nadado en un canal de riego del Valle Mexicali, el joven ingresó al hospital con fuertes dolores de cabeza, náusea y vómito; en los siguientes días se añadieron a los síntomas falta de coordinación y convulsiones; se encontró la presencia de trofozoítos en el líquido cefalorraquídeo. El paciente murió a los tres días. La autopsia reveló tejido

cerebral necrótico y hemorrágico con múltiples edemas cerebrales; los pulmones estaban congestionados y edematosos. Se aislaron trofozoítos de las meninges que posteriormente se identificaron como *Naegleria fowleri* con la prueba de inmunoperoxidasa.

- Lares *et al.* (1993) aislaron e identificaron *Naegleria fowleri* de cinco casos clínicos de MAP en Mexicali, México, en 1990. Las cepas se aislaron de líquido cefalorraquídeo de pacientes con sintomatología de MAP y que tuvieron el antecedente de haber nadado o bañado en un canal de riego; por lo que muestrearon el canal de riego para buscar la ameba. Las seis cepas aisladas se identificaron a través de pruebas serológicas y patrones de isoenzimas, perteneciendo a la especie *N. fowleri*. Posteriormente realizaron pruebas de patogenicidad en ratones, donde resultaron patógenas las seis cepas aisladas, matando a la mayoría de los ratones a los siete días.
- Cervantes-Sandoval *et al.* (2007) caracterizaron e identificaron dos cepas de amebas aisladas de dos casos de MAP. Un caso fue en Mexicali, México; donde un niño de nueve años ingresó con cuadro clínico de náuseas, vómito, fotofobia y dolor de cabeza intenso, que siete días antes había nadado en un canal. El segundo caso fue en Lagunilla, Sonora, México; un joven de 20 años, ingresó con el mismo cuadro clínico al hospital, pero en este caso no se reportó un antecedente reciente de natación; sin embargo, se averiguó que solía nadar frecuentemente. Ambas cepas se aislaron de líquido cefalorraquídeo, se les realizó prueba de flagelación, análisis de ultraestructuras, proteína y proteasas electroforesis y PCR. Reportaron que las amebas pertenecían a la especie *Naegleria fowleri* y que fue el agente etiológico en ambos casos.
- En las localidades de Mexicali, B.C., Valle de Yaqui y Hornillos, Sonora, a partir del año 2008, durante los meses de junio y julio, diversos medios de

comunicación, locales y nacionales, tanto electrónicos como impresos emitieron boletines de alerta para prevenir a la gente de no bañarse en los canales de riego, esto con la finalidad de evitar la infección ocasionada por las AVL; a raíz de la muerte de un hombre de 59 años quien fue diagnosticado con MAP. De acuerdo con el diario Milenio Digital en el Valle del Yaqui, Sonora y Valle de Mexicali, B. C. en el 2008 se registraron casos de MAP, por contagio aparente en los canales de riego.

- Lares-Jiménez y Lares-Villa (2009) identificaron morfológica y fisiológicamente 11 géneros de AVL en aguas superficiales de la región del Valle del Mayo, Sonora. El número y frecuencia de cepas de los distintos géneros de AVL aislados variaron con respecto a la temperatura de aislamiento, predominando las amebas termófilas.
- En junio del presente año (2019) el diario El Imparcial informó en su formato digital, que se cerraron cuatro albercas en Obregón, Sonora, debido a la presencia de *N. fowleri* y otras AVL. Sumado a estos casos, el 22 de agosto del 2019 el mismo periódico informó que después diez años sin casos, se registró la muerte de una persona por MAP, la cual fue contraída en los canales de riego de la localidad (De León, 2019a; 2019b)

## **Zona de estudio**

Mexicali es la capital del estado de Baja California Norte, y cabecera del municipio del mismo nombre, se ubica al noreste del estado con las coordenadas al norte 32° 43', al sur 30° 52' de latitud norte; al este 114° 43', al oeste 115° 49' de longitud oeste. Colinda al norte con EUA; al este con EUA, el estado de Sonora y el Golfo de California; al sur con el Golfo de California y el municipio de Ensenada; al oeste con los municipios de Ensenada y Tecate (Figura 1) (INEGI, 2003).

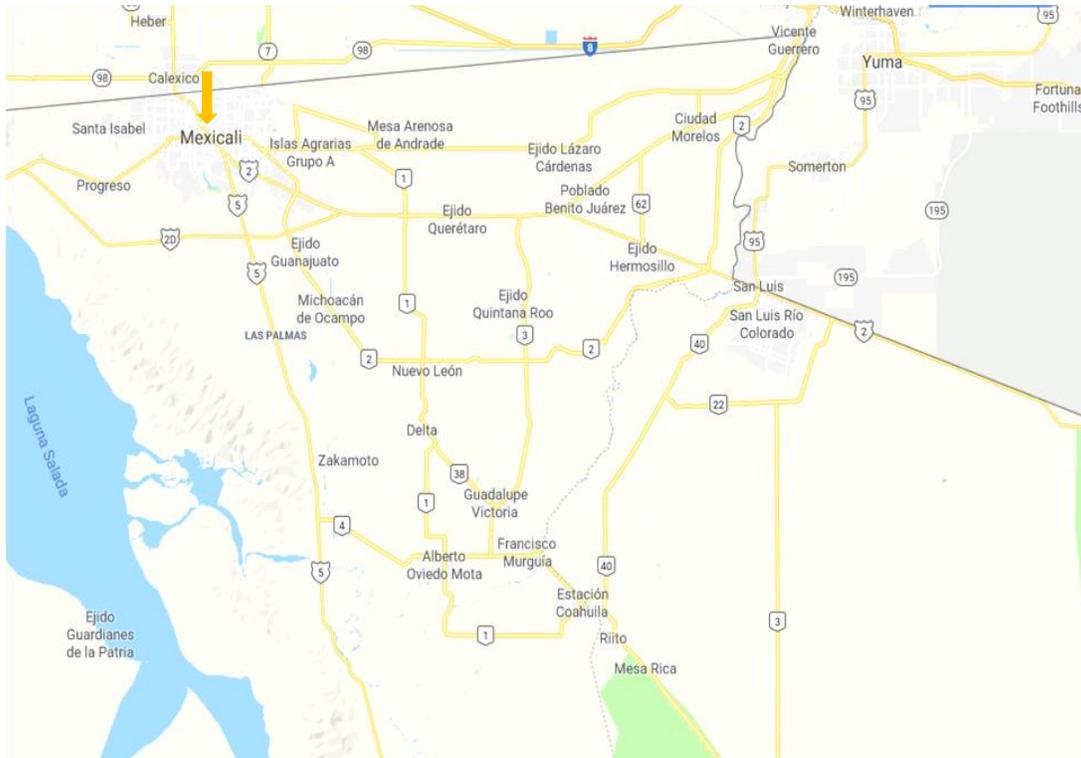


Figura 1. Vista general del Valle de Mexicali, Baja California Norte. Imagen tomada de Google Maps (2019).

El clima predominante de la zona es BW(h'), es decir muy seco y muy cálido, con ligeras lluvias predominantemente en invierno (con un promedio de 65.4 mm de precipitación anual); así mismo, el municipio tiene una temperatura promedio de 23.7 °C; sin embargo, en verano la temperatura puede llegar a los 50°C (García, 1973; INEGI, 2003; Camargo-Bravo & García-Cueto, 2012). A pesar del clima seco y la poca precipitación, el municipio tiene una importante actividad agrícola, a la cual se le dedica el 18.93% de la superficie municipal, cultivando Maíz, Trigo y Algodón. Esta intensa actividad agrícola se da gracias a la extensa red de canales artificiales, los cuales se abastecen del Río Colorado (INEGI, 2003).

## **Justificación**

Es importante profundizar el conocimiento de las AVL en el ambiente, ya que son clave en la cadena trófica al ser puentes en el ciclo de los nutrientes. Además, son organismos de relevancia médica y en los últimos años se han detectado más casos de enfermedades causadas por estos organismos. Por otro lado, a pesar de la difusión que se ha realizado del peligro que representa nadar o simplemente zambullirse en agua donde se han detectado AVL, todavía existe desconocimiento por parte de las comunidades que habitan en las cercanías de los canales de riego en el Valle de Mexicali. Por esto es importante contribuir con conocimiento acerca de la presencia y distribución de las AVL en los canales, poniendo especial atención a la presencia de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*.

## **Objetivos**

### **General**

Determinar la presencia de amebas de vida libre en el canal de riego Revolución en el Ejido Saltillo del Valle de Mexicali, Baja California.

### **Particulares**

Determinar la riqueza específica de las amebas de vida libre en el canal de riego.

Realizar pruebas de temperatura a 30°C, 37°C y 42 °C a las especies aisladas de *Naegleria* y *Acanthamoeba*.

Llevar a cabo las pruebas de patogenicidad a las especies aisladas de *Acanthamoeba* y *Naegleria*.

Medir en el agua los siguientes parámetros físicos y químicos: pH, temperatura, oxígeno disuelto y conductividad.

## Materiales y métodos

### Toma de muestra

Se realizó la toma de muestra en cuatro sitios del Canal Revolución localizado en el Ejido Saltillo en el mes de noviembre del 2016: CSES (Canal del Sur Ejido Saltillo), CQ ramal (Ramal del Canal Querétaro), CQ puente (Puente del Canal Querétaro) y CN compuerta (Compuerta del Canal Norte) (Figura 2). En cada sitio se tomaron 250 mL de agua en recipientes estériles, manteniéndolas a temperatura ambiente hasta su procesamiento en el laboratorio.

Los parámetros físicos y químicos del agua del canal se midieron *in situ*; la temperatura, el pH y la conductividad con un potenciómetro Conductronic PC18 y el oxígeno disuelto con un oxímetro YSI modelo 51.

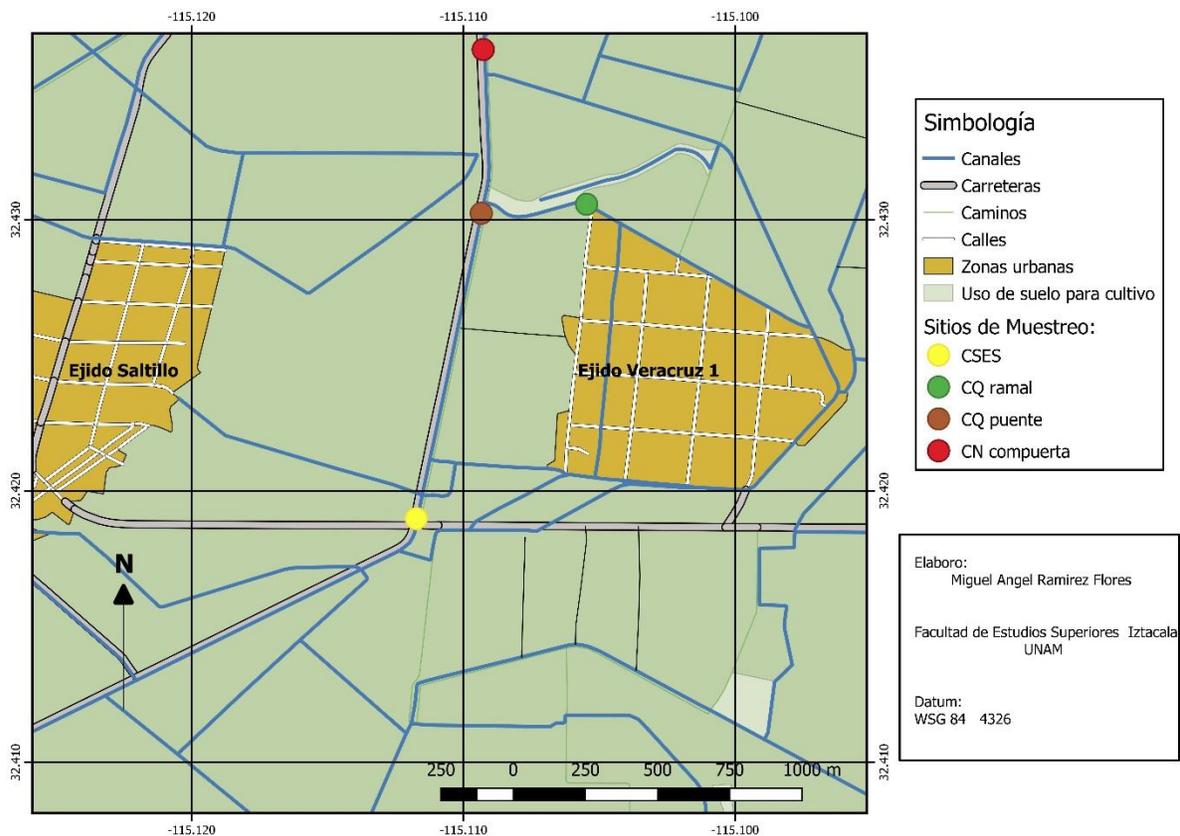


Figura 2. Localización de los sitios muestreados del canal Revolución.

### Aislamiento e identificación

Se tomó una alícuota de 50 mL de la muestra original traída del canal y se centrifugó a 3500 RPM por 15 minutos (Centrifuga Boecco U-32), posteriormente se quitó el sobrenadante, dejando cuatro mL, estos se agitaron y se colocó un mL en cajas Petri con medio agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes* (NNE) (Page, 1988). El procedimiento se realizó por duplicado, incubando una a 30 °C y la otra a 37 °C. Los cultivos se observaron con un microscopio invertido a partir de 24 horas de incubación para detectar el crecimiento amebiano.

La identificación morfológica se realizó tomando en cuenta las características de la fase de trofozoíto y/o de quiste; en el caso de *Naegleria* también se consideró la fase flagelada. Se observaron preparaciones *in vivo* con un microscopio de contraste de fases a 40x, siguiendo la clave taxonómica de Page (1988).

Las cepas aisladas pertenecientes a los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* se inocularon en medios axénicos de Chang o Bactocasitona y se incubaron a la temperatura de aislamiento (Rivera *et al.*, 1989).

### Prueba de flagelación

La prueba de flagelación se realizó agregando agua destilada estéril al cultivo de las cepas probables de pertenecer al género *Naegleria*. El cultivo se incubó a la temperatura de aislamiento y se observó con el microscopio invertido cada media hora, durante cuatro horas para detectar la fase flagelada.

### Tolerancia de temperatura

Las cepas aisladas de *Naegleria* y *Acanthamoeba* se resembraron por triplicado y se pusieron en crecimiento a temperaturas de 30°C, 37°C y 42°C para observar si presentan un comportamiento termófilo.

### Prueba de patogenicidad

La prueba de patogenicidad se realizó a las cepas aisladas de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*. A un grupo de cinco ratones macho de tres semanas de edad (Cepa CD1) se les inoculó un concentrado de los cultivos axénicos de las amebas.

Para preparar el cultivo, los trofozoítos se concentraron a 4500 RPM (Centrifuga Boecco U-32) durante 15 min y se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^6$  trofozoítos por mL. De ese concentrado se tomó un volumen de 0.02 mL, y se inoculó a través de los orificios nasales del ratón. Los ratones se observaron durante un período de 21 días. Los ratones que murieron, o se sacrificaron al término de la prueba se diseccionaron y se les extrajo el cerebro, hígado, pulmones y riñones, que se colocaron en placas con medio NNE, las cuales se incubaron a la temperatura de aislamiento. Los cultivos se observaron diariamente durante una semana para detectar desarrollo amebiano y recuperar la ameba (De Jonckheere, 1980).

### Biología molecular

A las cepas aisladas de *Naegleria* se les realizó identificación por biología molecular, la cual fue llevada a cabo por el laboratorio de Inmunología a cargo de la Dra. Maricela Carrasco. A continuación, describiré la metodología que utilizaron.

- Extracción de ARN y preparación para RT-PCR

Se cosecha un cultivo axénico de la cepa y posteriormente se centrifuga a 3500 RPM (Centrifuga Boecco U-32) durante 15 min para obtener la pastilla celular. Esta pastilla se homogeniza con un mL de trizol (Invitrogen Life Technologies). Posteriormente se le agregan 200  $\mu$ L de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se centrifuga a 10 mil RPM (Centrifuga K241 PrO-Research) por 10 minutos en tubos Eppendorf de 1.5 mL; la fase acuosa se recupera en otro tubo, y se le agrega 0.5 mL de isopropanol para posteriormente ser centrifugado nuevamente a 10 mil RPM (Centrifuga K241 PrO-Research) por 10 minutos. La pastilla resultante se lava con 500  $\mu$ L de etanol al 75%, se deja secar para ser resuspendida en 30  $\mu$ L de agua bidestilada, conteniendo 0.1% de dietilpirocarbonato, DEPC (10813-012, Invitrogen, Carlsbad, California).

Para determinar la integridad del ARN total, se corre una alícuota de cinco  $\mu$ L en un gel de agarosa al 2% preparado con TE (Tris-HCL 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0) como disolvente.

- RT-PCR

Ya que se confirma la integridad del ARN, se continua con la transcripción reversa (RT), para la cual se usa el kit: SuperScript II one step (18064-014. Invitrogen, Carlsbad, California). El ARN total se transcribe en un volumen total de 50  $\mu$ L conteniendo:

- 25  $\mu$ L de 2x Reaction Mix
- 3  $\mu$ L del ARN total
- 1  $\mu$ L del Primer Forward
- 1  $\mu$ L del Primer Reverse
- 1  $\mu$ L RT/Platinum *Taq* Mix

Una vez realizado el mix, se coloca en el termociclador (marca Quanta Biotech S-24) y se corre el siguiente programa por 45 ciclos:

Tabla 1. Proceso realizado en el termociclador.

Inicio/Fin	Proceso	Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Tiempo
	Alineamiento	50	30 min
	Alineamiento	94	2 min
Comienza el ciclo	Desnaturalización	94	15 seg
	Alineación	55	30 seg
Fin del ciclo	Elongación	72	1 min
	Elongación final	72	5 min
	Almacenamiento	10	

Los primers utilizados son los siguientes:

Específico para género *Naegleria* (Schild, 2006)

Nae3 Fwd 5'-CAA ACA CCG TTA TGA CAG GG-3'

Nae3 Rev 5'-CTG GTT TCC CTC ACC TTA CG-3'

Para la amplificación del gen 18S *Naegleria fowleri* (Shin, 2001)

Nfa1 Fwd 5'-TGG CCA CTA CTA TTC CAT C-3'

Nfa1 Rev 5'-AGC ACT CCC TTG TAC TTC-3'

Posteriormente se hace el corrimiento electroforético de los productos de RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, California) en un gel de agarosa al 1% (SIGMA). Para cargar las muestras en el gel, se mezclan dos  $\mu\text{L}$  de tinte de carga más cinco  $\mu\text{L}$  de producto de RT-PCR y dos  $\mu\text{L}$  del marcador de peso molecular (Fermentas). El gel se corre con buffer TAE al 1% con 80V por 40 min. Al término, el gel se visualiza en un transiluminador UV a 260 nm de longitud de onda.

- **Secuenciación**

La secuenciación se realiza a partir de los productos de RT-PCR, los datos que se obtienen de esta secuenciación se analizan, editan y alinean con el programa BioEdit v7.2.5, utilizando los electroferogramas de las secuencias Fwd y Rv como base para editar posibles errores y así obtener una secuencia consenso a partir de ambas secuencias, de esta manera obteniendo una secuencia más confiable y certera

Una vez editadas las secuencias, se utiliza el programa Geneious R7 para hacer la comparación de las secuencias obtenidas con secuencias reportadas en el GenBank mediante alineación múltiple de secuencias y obtener así parámetros como porcentaje de similitud entre pares de bases totales.

### Análisis estadísticos

Para comprobar si hay alguna diferencia significativa entre la riqueza específica de amebas entre cada punto de muestreo se realizó una prueba de ANOVA unifactorial. También se realizó un análisis de correlación lineal de Pearson para determinar la relación de los parámetros físicos y químicos con la presencia de AVL (Durán *et al.*, 2003).

## Resultados y discusión

### Riqueza específica general

Como se observa en la tabla 2, de los cuatro puntos de muestreo se identificaron en total 18 especies pertenecientes a ocho géneros diferentes.

Tabla 2. Riqueza específica de amebas de vida libre del canal Revolución.

Género	Especie
<i>Acanthamoeba</i> (Volkonsky, 1931)	<i>polyphaga</i> (Puschkarew, 1913)
	<i>castellanii</i> (Douglas, 1930)
	<i>astronyxis</i> (Ray & Hayes, 1954)
	<i>palestinensis</i> (Reich, 1933)
<i>Mayorella</i> (Schaeffer, 1926)	<i>oclawaba</i> (Boove, 1970)
	<i>spatula</i> (Boove, 1970)
	<i>cultura</i> (Boove, 1961)
<i>Naegleria</i> (Alexieff, 1912, emend. Calkins, 1913)	<i>gruberi</i> * (Schardinger, 1899)
	<i>fowleri</i> * (Carter, 1970)
	spp.
<i>Thecamoeba</i> (Fromentel, 1874)	<i>similis</i> (Greeff, 1891)
	<i>striata</i> (Penard, 1890)
<i>Vahlkampfia</i> (Chatton & Lalung-Bonnaire, 1912)	<i>ustiana</i> (Page, 1974)
	<i>aberdonica</i> (Page, 1974)
<i>Vannella</i> (Bovee, 1965)	<i>simplex</i> (Wohlfarth-Botterman, 1960)
	<i>cirrifera</i> (Frenzel, 1892)
	<i>platypodia</i> (Gläser, 1912)
<i>Vermamoeba</i> (Cavalier-Smith & Smirnov, 2005)	<i>vermiformis</i> (Page, 1967)
<i>Vexillifera</i> (Schaeffer, 1926)	<i>bacillipedes</i> (Page, 1969)

\*Determinado por biología molecular

Para identificar las cepas del género *Naegleria*, aparte de observar el trofozoíto y quiste, se realizó en ellas la prueba de flagelación; en la cual todas las cepas aisladas como posible *Naegleria* fueron positivas, corroborando así la identificación como tal.

La presencia de *Naegleria fowleri* en Mexicali ya se había reportado con anterioridad a través de aislamientos de pacientes con MAP que habían nadado previamente en los canales de riego, y de la misma agua del canal de riego (Lares *et al.*, 1993; Cervantes *et al.*, 2007). Aunque ya se habían tenido casos de MAP desde 1978 (Valenzuela *et al.*, 1984), por lo que la presencia de esta especie en los canales de riego ha perdurado por bastante tiempo, debiéndose probablemente a su estrategia de formación de quiste, o a que es constantemente llevado a los canales de alguna otra fuente externa, ya sea del suelo que los rodea, o la fuente de agua que surte a los canales.

Los otros géneros han sido reportados en cuerpos de agua naturales en la zona norte del país (Lares-Jiménez & Lares-Villa, 2009) a excepción de *Vexillifera*, la cual no había sido reportado en la zona mencionada, aunque sí en la zona centro (Bonilla *et al.*, 2014).

#### Diagnóstico por biología molecular de las cepas aisladas de *Naegleria*.

##### *Naegleria fowleri.*

La cepa de *Naegleria* aislada de CQ ramal fue diagnosticada a nivel de especie al comparar la secuencia de la cepa con las secuencias publicadas en el GenBank, dando como resultado un 98% de homologación con *Naegleria fowleri*.

##### *Naegleria gruberi.*

Las cepas de *Naegleria* aisladas de CSES y CN compuerta fueron diagnosticadas a nivel de especie al comparar las secuencias de las cepas con las secuencias publicadas en el GenBank, dando como resultado un 99% de homologación con *Naegleria gruberi*.

### Distribución de las especies de AVL en el canal Revolución.

En la tabla 3 se observa la distribución de las especies de amebas de vida libre en cada uno de los sitios muestreados.

Tabla 3. Especies de AVL en los sitios del canal Revolución. Donde 1 es presencia y 0 ausencia.

Especie	CN compuerta	CQ puente	CQ ramal	CSES	Total de registros
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	0	0	1	0	1
<i>Acanthamoeba astronyxis</i>	0	1	0	0	1
<i>Acanthamoeba palestinensis</i>	0	1	0	0	1
<i>Mayorella oclawaba</i>	1	0	0	0	1
<i>Mayorella spatula</i>	1	0	0	0	1
<i>Mayorella cultura</i>	0	0	1	0	1
<i>Thecamoeba similis</i>	0	0	0	1	1
<i>Thecamoeba striata</i>	1	0	0	0	1
<i>Vahlkampfia aberdonica</i>	0	1	0	0	1
<i>Vannella cirrifera</i>	0	0	1	0	1
<i>Vexillifera bacillipedes</i>	0	1	0	0	1
<i>Naegleria gruberi</i>	1	0	0	1	2
<i>Vannella platypodia</i>	0	1	1	0	2
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	0	1	1	1	3
<i>Naegleria fowleri</i>	1*	1*	1	0	3
<i>Vahlkampfia ustiana</i>	1	0	1	1	3
<i>Vannella simplex</i>	1	1	1	0	3
<i>Vermamoeba vermiformis</i>	1	1	1	1	4
<b>Total de especies</b>	8	9	9	5	

\*Se presume que la especie encontrada en estos dos sitios es *Naegleria fowleri*, porque fue patógena y creció a 42°C, falta la confirmación por biología molecular.

*Vermamoeba vermiformis* fue la única especie que se encontró en todos los sitios del canal, lo que indica que es una ameba habituada a las condiciones ambientales presentes en el agua del canal. La presencia constante de la ameba se ha reportado tanto en agua natural como en agua residual y aunque no se ha reportado como patógena, se ha encontrado asociada a un caso de encefalitis amebiana granulomatosa (Centeno *et al.*, 1996) y casos de queratitis amebiana (Lorenzo *et al.*, 2007; Cabello-Vílchez *et al.*, 2014; Scheid, 2019).

*Naegleria fowleri* se aisló en tres de los cuatros sitios muestreados, Esta especie había sido reportada en los canales de riego del Valle de Mexicali (Lares-Villa *et al.*, 1993), lo que indica que las condiciones ambientales del agua son adecuadas para la ameba. La presencia de *N. fowleri* se había reportado en la época de verano; sin embargo, este estudio se realizó en otoño, que no parecía una época favorable para la presencia de *N. fowleri*, porque la temperatura del agua estuvo alrededor de 17°C (Tabla 4) y se ha reportado que la presencia de las amebas patógenas se ve favorecida por temperaturas mayores a los 30°C (Rodríguez-Zaragoza, 1994; De Jonckheere, 2012). La presencia de *N. fowleri* en otoño concuerda con la información de reportes de MAP en diferentes épocas del año.

#### Frecuencia de las especies de AVL

Como se observa en la figura 3, la especie más frecuente fue *V. vermiformis* (13%) seguido por *V. simplex*, *V. ustiana*, *N. fowleri* y *A. polyphaga* (10%), posteriormente se encuentra *V. platypodia* y *N. gruberi* (6%). El resto de especies tuvo una frecuencia del 3% cada una.

*Vermamoeba vermiformis* se ha reportado ampliamente en diferentes cuerpos de agua natural y agua residual con una alta frecuencia, lo que concuerda con lo encontrado en este trabajo (Rivera *et al.*, 1993; Bonilla *et al.*, 2000; Ramírez *et al.*, 2005; Bonilla *et al.*, 2014; Ramírez *et al.*, 2016). Asimismo, es importante mencionar que a *V. vermiformis* se le ha atribuido una importancia médica relevante, al verse involucrada en diferentes casos de queratitis, aislarse de un caso de meningoencefalitis (aunque no se comprobó que fuese directamente responsable de la enfermedad) y encontrándose que es vector de otros organismos patógenos (Centeno *et al.*, 1996; Lorenzo *et al.*, 2007; Cabello-Vilchez *et al.*, 2014; Scheid, 2019).

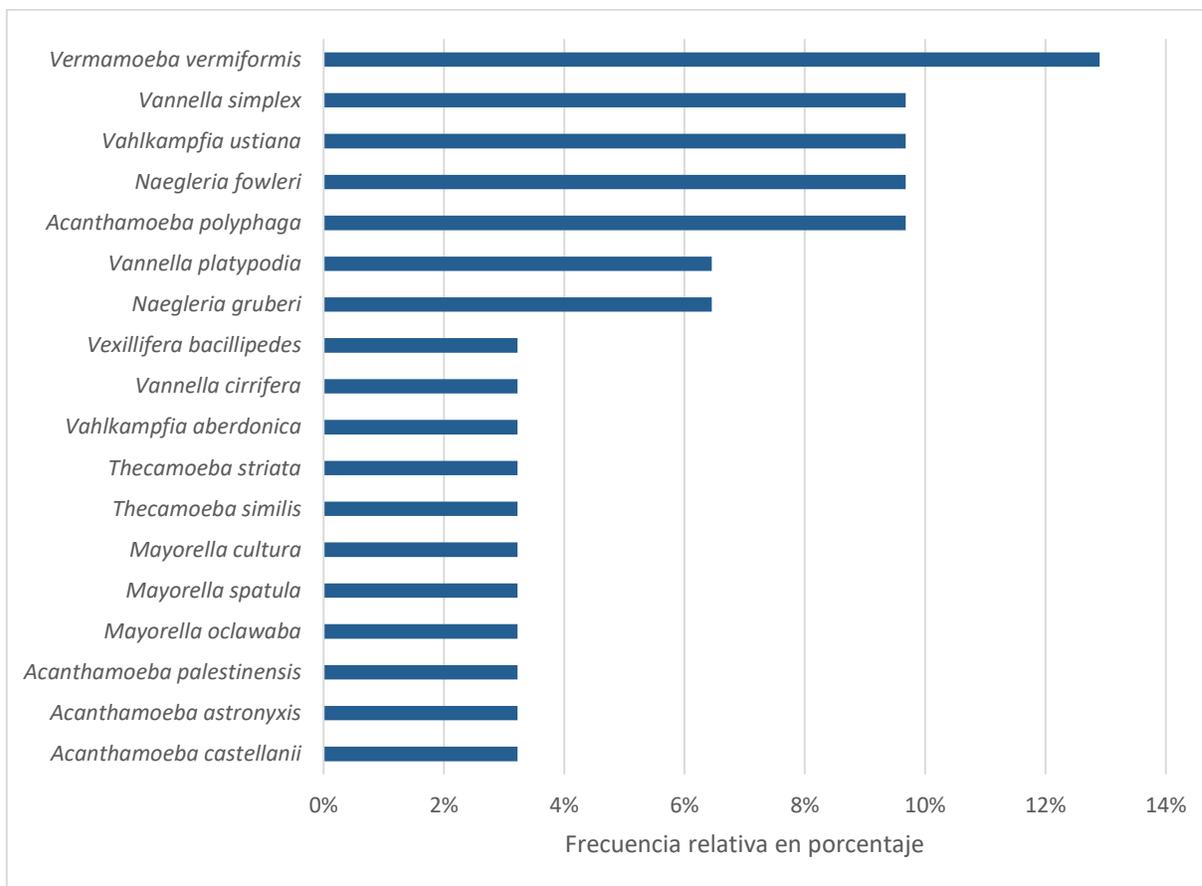


Figura 3. Frecuencia relativa de las especies de AVL

*Vannella* es un género con alta frecuencia, lo que concuerda con lo reportado por Ettinger *et al.* (2003) y Bonilla *et al.* (2014), donde fue también, uno de los géneros más frecuentes en diferentes ríos. Este género no posee la capacidad de formar quistes; sin embargo, posee otra forma denominada “forma flotante” (Page, 1988), la cual le permite la permanencia en la columna de agua y ser arrastrada por la corriente, resultando en una mayor distribución en el cuerpo de agua; por lo que esta forma puede ser parte de la explicación de la alta frecuencia de este género en cuerpos de agua.

Las amebas del género *Naegleria* tienen la facultad de cambiar a una forma capaz de moverse en la columna de agua, en este caso se trata de su forma flagelar (Page, 1988) lo que le confiere la ventaja para desplazarse en el medio acuático.

La especie *N. fowleri* fue más frecuente que *N. gruberi*, siendo contrario a lo expuesto por Rodríguez-Zaragoza (1994) y Griffin (1983), ya que ellos mencionan que las especies no patógenas de *Naegleria* son generalmente más abundantes que *N. fowleri*. Asimismo, esta especie fue más frecuente que las especies del género *Acanthamoeba*, lo que es de llamar la atención porque *N. fowleri* posee un quiste menos resistente a las condiciones ambientales que el de *Acanthamoeba* (Ramírez *et al.*, 2014).

De las dos especies del género *Vahlkampfia* encontradas, *V. ustiana* fue bastante frecuente, este género no posee una forma que le permita desplazarse en el agua, por lo que es restringida al sustrato, a la materia suspendida y a la interface agua-aire, por lo que se ha reportado su mayor frecuencia en el sedimento de los cuerpos de agua, o una mayor distribución después de alguna lluvia (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Anderson, 1997; Ettinger *et al.*, 2003); no obstante, Ettinger *et al.*, 2003 y Ramírez *et al.*, 2016 mencionan que la frecuencia de *Vahlkampfia* en sus estudios se vio relacionado con temperaturas de medias a bajas, las cuales concuerdan con el presente estudio, así pues, se puede decir que la baja temperatura del agua en los canales (Tabla 4) pudo ser un factor para la alta frecuencia de *V. ustiana*.

De las cuatro especies de *Acanthamoeba*, sólo *A. polyphaga* tuvo una frecuencia media, casi del 10%, pero no fue la más frecuente, lo cual es de llamar la atención ya que se sabe que *Acanthamoeba* es una de las AVL mejor distribuidas en el ambiente, su quiste es bastante resistente gracias a que tiene una capa interna compuesta de celulosa y una capa externa compuesta de fosfolípidos (Page, 1988; Bonilla *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2016). John & Howard (1995) y Bonilla *et al.* (2014) reportaron en sus estudios que *Acanthamoeba* era uno de los géneros más frecuentes, por otra parte, Ettinger *et al.* (2003) y Ramírez *et al.* (2016) reportaron que la frecuencia de este género fue baja. Por consiguiente, la frecuencia de este género podría deberse más a la disponibilidad de sustrato al cual pueda adherirse para alimentarse y la disponibilidad de alimento (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Bonilla *et al.*, 2009)

Los géneros restantes se han reportado en otros cuerpos de agua como lagos, ríos, acuíferos y manantiales, también con baja frecuencia (Kyle & Noblet, 1986; Anderson, 1997; Ettinger *et al.*, 2003; Bonilla *et al.*, 2009, 2014; Ramírez *et al.*, 2009, 2016).

#### Prueba de tolerancia a la temperatura.

Las pruebas de temperatura se realizaron para complementar la caracterización de las cepas aisladas de *Naegleria* y *Acanthamoeba* (Tabla 4).

Tabla 4 Prueba de termotolerancia de las cepas de *Acanthamoeba* y *Naegleria*.

	Especie	Temperatura		
		30°C	37°C	42°C
CN compuerta	<i>Naegleria gruberi</i> <sup>30*</sup>	+++	++	-
	<i>Naegleria sp</i> <sup>30</sup>	+++	++	-
	<i>Naegleria sp</i> <sup>37</sup>	++	+++	+
CQ puente	<i>Acanthamoeba polyphaga</i> <sup>30</sup>	+++	+++	+
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i> <sup>37</sup>	+++	+++	++
	<i>Naegleria sp</i> <sup>37</sup>	+++	+++	+++
	<i>Naegleria sp</i> <sup>30</sup>	++	++	+
CQ ramal	<i>Acanthamoeba polyphaga</i> <sup>30</sup>	+++	++	-
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i> <sup>37</sup>	++	+++	-
	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <sup>30</sup>	+++	++	-
	<i>Naegleria fowleri</i> <sup>37*</sup>	++	+++	++
CSES	<i>Acanthamoeba polyphaga</i> <sup>30</sup>	+++	+++	-
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i> <sup>37</sup>	++	++	-
	<i>Naegleria gruberi</i> <sup>30*</sup>	+++	++	-

Donde: +++ buen crecimiento; ++ regular crecimiento; + poco crecimiento; - no hubo crecimiento. Los superíndices indican la temperatura de aislamiento. \*La especie fue determinada por biología molecular.

En general las amebas aisladas a 30°C no crecieron a 42°C. De las catorce cepas aisladas de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* solo seis fueron termotolerantes a 42°C, de estas cepas una resultó ser *N. fowleri*, lo que concuerda con

lo reportado en la literatura (Schuster & Visvesvara, 2004; De Jonckheere, 2012). En CN compuerta sólo se realizó la prueba a especies de *Naegleria*, ya que no se obtuvieron aislamientos de *Acanthamoeba*; de las tres cepas de *Naegleria* aisladas en este sitio solo una creció a 42°C, pero tuvieron un buen crecimiento a 37°C. Entre las cepas aisladas en este sitio se encontró *N. gruberi* que no se ha reportado que crezca a 42°C.

Tabla 5. Resultados de las pruebas de patogenicidad realizadas a las cepas de *Acanthamoeba* y *Naegleria*.

Sito de muestreo	Especie	Temperatura de aislamiento (°C)	Patogenicidad	Días en matar a los 5 ratones	Órganos de donde se recuperó
<b>CN compuerta</b>	<i>Naegleria gruberi</i>	30	Negativa		
	<i>Naegleria</i> sp	30	Positiva	5	Cerebro
	<i>Naegleria</i> sp	37	Positiva	4	Cerebro y pulmón
<b>CQ puente</b>	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	30	Invasiva		Pulmón
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	37	Invasiva		Cerebro y pulmón
	<i>Naegleria</i> sp	30	Positiva	7	Cerebro y pulmón
	<i>Naegleria</i> sp	37	Positiva	6	Cerebro y pulmón
<b>CQ ramal</b>	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	30	Negativa		
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	37	Negativa		
	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30	Negativa		
	<i>Naegleria fowleri</i>	37	Positiva	8	Cerebro
<b>CSES</b>	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	30	Negativa		
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	37	Negativa		
	<i>Naegleria gruberi</i>	30	Negativa		

Prueba de patogenicidad

Como se puede observar en la tabla 5, se obtuvieron cinco cepas patógenas y dos invasivas, todas las cepas patógenas pertenecieron al género *Naegleria*, mientras que las invasivas al género *Acanthamoeba*.

Las cepas patógenas de *Naegleria* fueron muy virulentas, matando a los ratones entre cuatro y ocho días, que fue más rápido que lo reportado en promedio para *N. fowleri*, la cual mata al hospedero de 8 a 15 días (Schuster & Visvesvara, 2004; Visvesvara, 2014). Las otras dos cepas de *Naegleria* no fueron patógenas, las cuales se diagnosticaron molecular y morfológicamente como *N. gruberi*, esta especie no se ha reportado como patógena en la literatura lo que concuerda con lo encontrado en este trabajo (Visvesvara, 2014).

A causa de los múltiples reportes de MAP y de las descripciones de los casos de la misma enfermedad realizados en el Valle de Mexicali (Valenzuela *et al.*, 1984; Lares-Villa *et al.*, 1993; Cervantes *et al.*, 2007), era probable encontrar cepas patógenas de *Naegleria*. Sin embargo, es de llamar la atención haberlas encontrado en tres de los cuatro sitios de muestreo. Cabe mencionar que la temperatura del agua no pasaba de los 17°C (Tabla 6), ya que la estación del año en que se realizó el muestreo fue otoño, en esta época la temperatura del agua no es tan alta como en verano, donde incluso puede ser superior a 30°C en su parte superficial (García-Cueto *et al.*, 2013). Sin embargo, al realizar la prueba de termotolerancia, todas crecieron bien a 37°C y tres de ellas crecieron a 42°C (Tabla 4). Con esto se confirma lo que se ha reportado previamente, que las amebas patógenas son termófilas, es decir, proliferan mejor a temperatura elevada (Schuster & Visvesvara, 2004; De Jonckheere, 2012), pero no todas las amebas termófilas son patógenas (Martínez & Janitsschke, 1985).

De las siete cepas aisladas de *Acanthamoeba* solo dos fueron invasivas, es decir, que no mataron a los ratones en los 21 días que duró la prueba, pero cuando se sacrificaron y se sembraron los órganos (cerebro, pulmón, hígado y riñón) en NNE, se recuperó la ameba de alguno(s) de los órganos. Este hecho no deja de ser de cuidado ya que *Acanthamoeba* es una ameba oportunista que puede causar enfermedad en personas inmunosuprimidas o inmunocomprometidas (Visvesvara,

2014). Además, hay que recordar que algunas AVL, entre ellas *Acanthamoeba* pueden fungir como vector para otros organismos patógenos (Scheid *et al.*, 2010; Magnet *et al.*, 2015).

### Parámetros físicos y químicos

En la tabla 6 se puede observar los resultados de los parámetros físicos y químicos de los sitios muestreados. Los valores fueron muy similares en los lugares muestreados. Por lo que no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los diferentes sitios cuando se realizó la prueba de ANOVA (Durán *et al.*, 2003). Con esto se puede inferir que, en el Canal Revolución, o en la mayor parte del mismo, las condiciones físicas y químicas son similares.

Tabla 6. Valores de los parámetros físicos y químicos medidos en cada sitio de muestreo.

<b>Clave</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura del agua °C</b>	<b>OD (mg/L)</b>	<b>Conductividad <math>\mu\text{S/cm}</math></b>
<b>CSES</b>	7.5	17	4	1600
<b>CN compuerta</b>	7.6	17	3.8	1400
<b>CQ ramal</b>	7.5	17	3.6	1500
<b>CQ puente</b>	7.5	16	4	1600

No se ha encontrado una relación específica entre los parámetros físicos y químicos con la riqueza específica, frecuencia y distribución de AVL (Rodríguez-Zaragoza, 1994). No obstante, se tiene el conocimiento general de los valores de temperatura, pH y oxígeno disuelto adecuados para la presencia de las AVL: pH alrededor de la neutralidad, concentraciones de oxígeno disuelto de 2 mg/L y un intervalo amplio de temperatura (Bonilla *et al.*, 2004).

Las condiciones ambientales no fueron un factor negativo para la presencia de las amebas de vida libre, ya que se encontraron dentro de los intervalos adecuados para su presencia. Sin embargo, la temperatura de 17 °C encontrada en el agua se puede considerar baja para la presencia de las amebas patógenas; ya que es más probable encontrarlas en cuerpos de agua con temperaturas mayores a 30°C (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Bonilla *et al.*, 2004; De Jonckheere, 2012). Por lo que fue sorprendente encontrar amebas patógenas en la mayoría de los sitios muestreados (Tabla 5).

En otros estudios, también se reportó la presencia de amebas de vida libre a temperaturas bajas (Bonilla *et al.*, 2014), e inclusive se reportó la presencia de amebas del género *Naegleria* a 3°C (John & Howard, 1995), pero en ninguno de esos estudios se reportó la presencia de amebas patógenas.

La conductividad nos permite darnos una idea de la cantidad de sales que está presente en el agua; aunque es importante remarcar que no toda la conductividad es dada por las sales. En este estudio se obtuvieron valores de conductividad en un intervalo de 1400  $\mu\text{S/cm}$  a 1600  $\mu\text{S/cm}$  (Tabla 6), que son valores más elevados que lo señalado para agua de riego (menor a 700  $\mu\text{S/cm}$ ) y de uso doméstico (800  $\mu\text{S/cm}$ ) (Cisneros & Saucedo, 2013). Este parámetro no es común que se determine en los estudios ambientales de las AVL; de los pocos realizados en ninguno se obtuvo valores de conductividad cercanos a los de este estudio, se reportaron intervalos más bajos (63 a 547  $\mu\text{S/cm}$ ) (Kyle & Noblet, 1985; Jamerson *et al.*, 2009; Laseke *et al.*, 2010; Bonilla *et al.*, 2014; Baquero *et al.*, 2014).

La presencia del género *Naegleria*, que sus quistes son sensibles a las condiciones ambientales extremas (Griffin, 1983; Rodríguez-Zaragoza, 1994); sugieren que las amebas pueden adaptarse a ambientes con salinidades elevadas. Esto se demostró en el estudio realizado por Hauer & Rogerson (2005), donde reportaron que algunas amebas pueden tolerar y adaptarse a altas concentraciones de sal.

*Acanthamoeba*, *Mayorella*, *Vexillifera* y *Vannella* también se han reportado en ambientes con salinidad elevada (Ettinger *et al.*, 2003; Hauer & Rogerson, 2005) e inclusive en el mar (Sawyer *et al.*, 1980; Rogerson & Hauer, 2002; Lorenzo-Morales

et al., 2005a; 2005b), por lo que no es de extrañar que se encontraran en el agua del canal.

### Distribución espacial de las especies de AVL y su correlación con los datos físicos y químicos

En la figura 4 se observa el número de aislamientos amebianos que se encontró en cada sitio de muestreo.

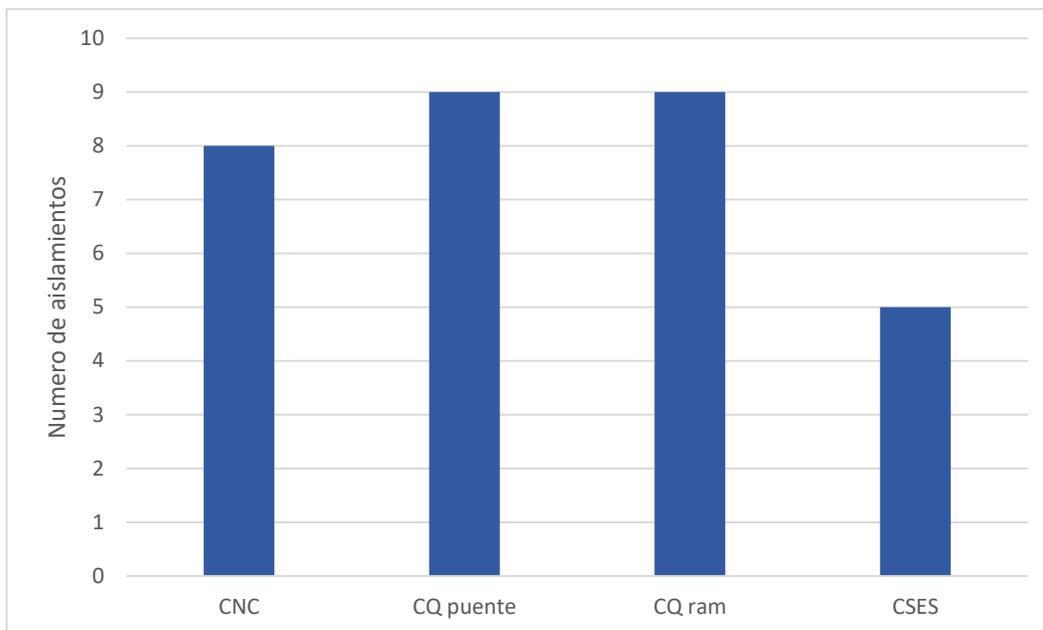


Figura 4. Distribución espacial de AVL.

Los sitios CQ puente y CQ ramal fueron los que presentaron el mayor e igual número de aislamientos amebianos, esto probablemente se debió a que estos lugares estaban muy cercanos entre sí. CSES fue el más alejado de los demás sitios y el que tuvo el menor número de aislamientos; aunque los valores de los parámetros físicos y químicos fueron bastante parecidos y en algunos casos iguales a los encontrados en los otros sitios del canal, por lo que podría existir algún otro factor que influyera en la menor presencia de las AVL en este lugar.

En la prueba de ANOVA se planteaba que la Ho dice que las medias de los aislamientos eran iguales para cada sitio de muestreo; al realizarla no se observaron diferencias estadísticas significativas ( $p>0.05$ ), por lo que la Ho se acepta y por consiguiente, no se realizó prueba de LSD (Durán *et al.*, 2003).

En las figuras 5 – 8 se observan los parámetros físicos y químicos y su correlación con los datos biológicos.

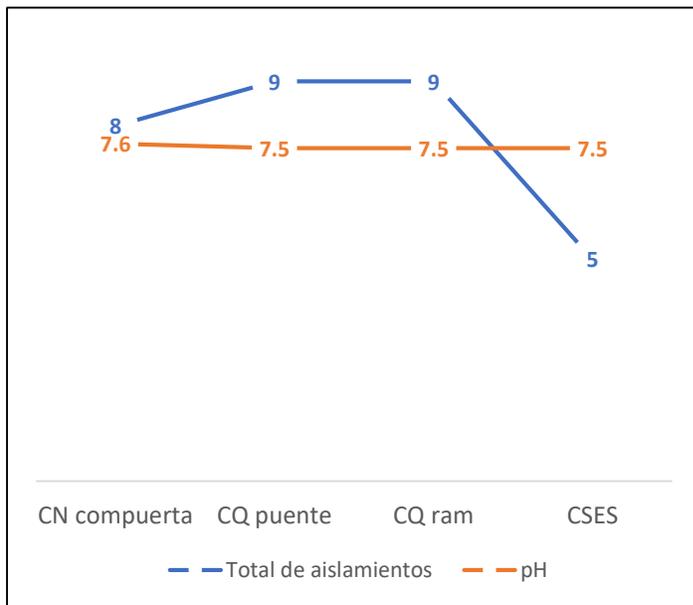


Figura 5. Tendencia del pH y numero de aislamientos por cada sitio de muestreo.

Con el análisis de Pearson, se determinó que el pH no mostró correlación con el número de aislamientos de AVL ( $r=0.088$ ) (Durán *et al.*, 2003), esto se puede entender, ya que los valores para pH no variaron más que en un sitio y fue por una décima (Figura 5). Asimismo, como se mencionó anteriormente, los valores de pH medidos están dentro del rango donde pueden proliferar las amebas, que va desde los 3.9

hasta los 9.7 (Bonilla & Ramírez, 1993; Rodríguez-Zaragoza, 1994).

Para la temperatura el análisis de Pearson mostró una correlación débil ( $r=-0.44$ ) (Durán *et al.*, 2003) con el número de aislamientos, que es una correlación muy baja, por lo que en este caso no se puede señalar a la temperatura como un factor determinante para la presencia de las AVL. El análisis de Pearson muestra una correlación negativa, esto se interpretaría que a una menor temperatura habría un

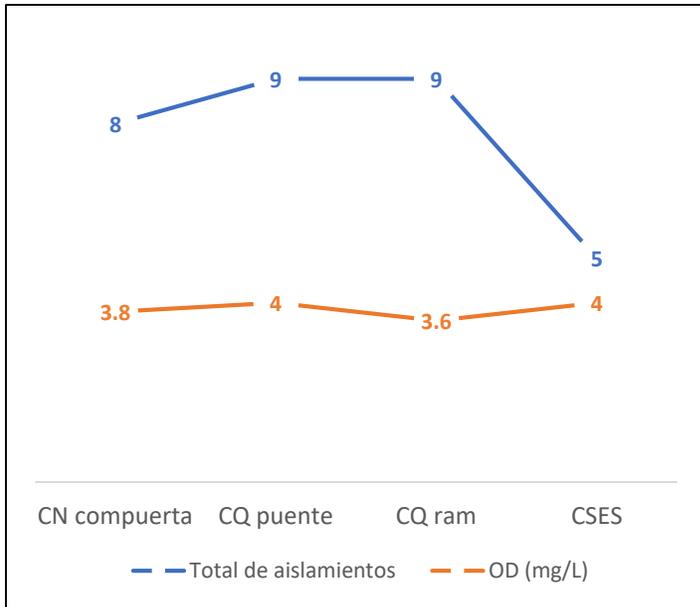


Figura 6. Tendencia de la temperatura y numero de aislamientos por cada sitio de muestreo.

mayor número de aislamientos y viceversa (Figura 6). Este comportamiento se podría observar para las AVL no patógenas, que proliferan mejor a temperaturas bajas. Esto concuerda con lo reportado por Bonilla *et al.* (2014) que encontró que a temperaturas templadas existía una mayor riqueza de especies amebianas. Pero sin llegar a temperaturas altas, ya que en ese caso se podrían encontrarse sólo

aquellas AVL que fuesen termófilas (Ramírez *et al.*, 2016).

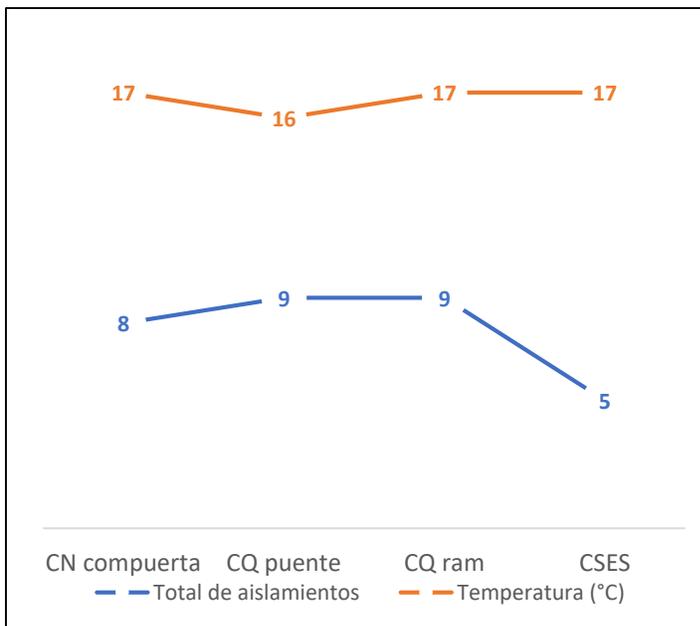


Figura 7. Tendencia del OD y el número de aislamientos por cada sitio de muestreo.

Por su parte, el OD mostro una correlación apenas moderada ( $r = -0.505$ ) con el número de aislamientos. Los valores del OD estuvieron en el intervalo reportado con anterioridad (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Ramírez *et al.*, 2014). Al igual que la temperatura, el OD muestra una correlación negativa, pero de igual manera, esto no quiere decir que las amebas proliferen más a una menor concentración de

oxígeno, sino que la baja concentración de oxígeno puede cambiar algún otro factor que sí sea determinante para la proliferación de AVL.

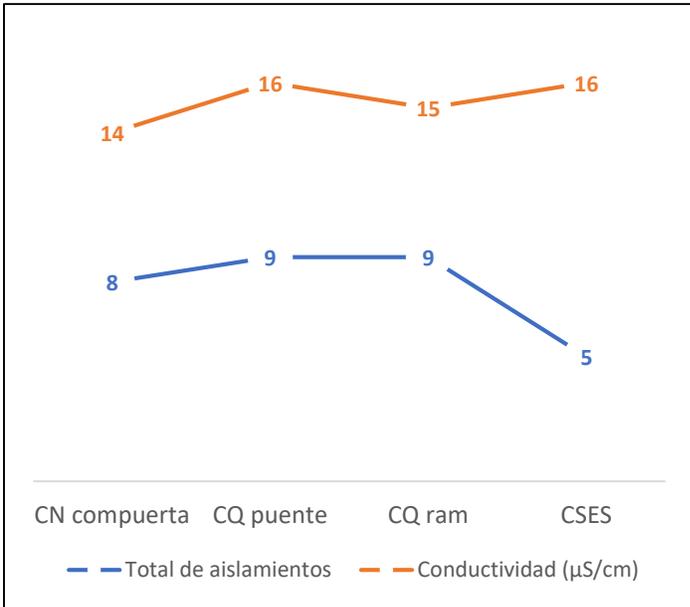


Figura 8. Tendencia de la conductividad y el número de aislamientos por cada sitio de muestreo. Para una mejor apreciación se tomaron sólo dos dígitos de cada valor de la conductividad; por lo que considerar valores como  $n \times 10^2$

El análisis de Pearson no mostró una correlación ( $r = -0.321$ ) entre la conductividad y el número de aislamientos en cada sitio de muestreo. Como se mencionó anteriormente, este parámetro se ha tomado poco en cuenta para la presencia de las AVL. Pero se han realizado algunos estudios acerca del efecto del aumento de sales en las AVL y se ha observado que algunas amebas pueden resistir un cierto grado de salinidad (Rogerson & Hauer, 2002).

## Conclusiones

- Se identificaron 18 especies de AVL en el canal Revolución, lo que representa una riqueza específica importante.
- Se encontraron amebas patógenas termotolerantes en casi todos los sitios muestreados, a pesar de que la temperatura del agua fue baja.
- Cinco cepas de *Naegleria* de las seis aisladas, fueron patógenas, aunque sólo cuatro fueron termotolerantes hasta 42°C
- Sólo dos cepas de *Acanthamoeba* fueron invasivas y ambas crecieron hasta 42°C
- Los puntos CQ puente, CQ ramal y CN compuerta están ubicados más hacia el norte; por lo que podrían encontrarse más amebas potencialmente patógenas hacia esa área.
- La presencia de cepas patógenas de *Naegleria* e invasivas de *Acanthamoeba* suponen un gran riesgo para la población del valle de Mexicali, ya que a pesar de los avisos y campañas de concientización que se han llevado a cabo en la zona, muchas personas, especialmente niños, siguen metiéndose a los canales en temporadas de calor.
- Los parámetros físicos y químicos del agua no presentaron correlación con el número de aislamientos amebianos, pero estuvieron en los intervalos adecuados para la presencia de las AVL.
- Los parámetros físicos y químicos no varían a lo largo del canal; pero se ha reportado que sí cambian a través de las diferentes épocas del año y estos cambios podrían ser responsables de la presencia de amebas patógenas.

## Literatura citada

- Anderson, O.R. 1997. Annual abundances, diversity and growth potential of gymnamoebae in shallow freshwater pond. *J. Eukaryot.* 44(5): 393-398.
- Anderson, O.R. 2010. *Protozoan ecology*. En: Encyclopaedia of Life Sciences (eLS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Anderson, O.R. & A. Rogerson. 2011. *Amoeba*. En: Encyclopaedia of Life Sciences (eLS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Baldock, B., J. Baker & M. Sleight. 1983. Abundance and productivity of protozoa in chalk streams. *Holarctic ecol.* 6: 238-246.
- Baquero, R., M. Reyes-Batlle, G. Nicola, C. Martín-Navarro, A. López-Arencibia, J. Esteban, B. Valladares, E. Martínez-Carretero, J. Piñero & J. Lorenzo-Morales. 2014. Presence of potentially pathogenic free-living amoebae strains from well water samples in Guiana-Bissau. *Pathogens and Global Health.* 108(4): 206-211.
- Bonilla P., E., Ramirez, R., Ortiz, A., Calderon, E., Gallegos & D., Hernandez. 2000. Occurrence of Pathogenic and Free-living Amoebae in Aquatic Systems of the Huasteca Potosina, Mexico. In: Munawar M, Lawrence SG, Munawar IF, Malley DF, eds. *Aquatic Ecosystems of Mexico: Status and Scope*. Leiden: Backhuys Publishers. 37-44 pp.
- Bonilla, P., E., Ramírez, R. Ortiz & C. Eslava. 2004. La ecología de las amibas patógenas de vida libre en ambientes acuáticos. En: Rosas, I., A. Cravioto & E. Ezcurra (Eds.). *Microbiología ambiental*. INE, pp. 67 – 81.
- Bonilla, P., G. Vilaclara, M. Merino, J. Carmona, M. Gaytán, S. Castillo, J. Ramírez-Zierold, E. Ramírez, M. Ibarra. 2009. Free-living amoebae in high-altitude streams from Valle de Bravo-Amanalco basin, central Mexico. In: *Proceedings of XIIIth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae FLAM 2009*. University of La Laguna, Tenerife, España.

- Bonilla, P. & E., Ramirez. 2014. Amibas de vida libre y oportunistas. En: Parasitología médica (pp. 37-39). México: Mc Graw Hill.
- Bonilla, P., A. Villegas, J. Jiménez & A. Vázquez. 2014. Occurrence of free-living amoebae in streams of the Mexico Basin. *Experimental parasitology*. 145: S28-S33.
- Brown, T., & R. Cursons. 1977. Pathogenic free-living amebae (PFLA) from frozen swimming areas in Oslo, Norway. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 9(3): 237-240.
- Camargo-Bravo, A., & O. García-Cueto. 2012. Evaluation of two Downscaling Models in the Generation of Climate Change Scenarios in Mexicali Valley in Mexico. *Información tecnológica*. 23(3): 11-20.
- Centeno, M., F. Rivera, L. Cerva, V. Tsutsumi, E. Gallegos, A. Calderón, R. Ortiz, P. Bonilla, E. Ramírez & G. Suarez. 1996. *Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient with meningoencephalitis and bronchopneumonia. *Arch Med Res*. 27: 579-586.
- Cervantes-Sandoval, I., J. de Serrano-Luna, J. Tapia-Malagon, J. Pacheco-Yopez, A. Silva-Olivares, S. Galindo-Gomez, V. Tsutsumi & M. Shibayama. 2007. Characterization of *Naegleria fowleri* strains isolated from human cases of primary amoebic meningoencephalitis in Mexico. *Revista de Investigación Clínica*. 59(5): 342-347.
- Cisneros, O. & H. Saucedo. 2013. Guía de Referencia para el reúso de las aguas residuales en riego agrícola. IMTA. México.
- De Jonckheere, J. 1980. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol*. 39(4): 681-685.
- De Jonckheere, J. 2012. The impact of man on the occurrence of the pathogenic free-living amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Future Microbiol*. 7(1): 5-7.

- De León, N. 2019a. Mata amiba de vida libre a un joven el Valle. *El Imparcial*. Disponible en: <https://www.elimparcial.com/mexicali/mexicali/Mata-amiba-de-vida-libre-a-un-joven-en-el-Valle-20190821-0016.html>
- De León, N. 2019b. Detectan amiba en 7 albercas en Baja California. *El Imparcial*. Disponible en: <https://www.elimparcial.com/mexicali/mexicali/Detectan-amiba-en-7-albercas-en-Baja-California-20190822-0001.html>
- Durán, A., A. Cisneros & A. Vargas. 2003. *Bioestadística*. UNAM FES Iztacala. 136-144 pp.
- Ettinger, M., S. Webb, S. Harris, S. Mc Inch, G. Garman, G. C., & Brown, B. L. (2003). Distribution of free-living amoebae in James River, Virginia, USA. *Parasitol Res.* 89(1): 6-15.
- Garaycochea, M., M. Beltrán & C. Morón. 2008. Patogenicidad de las amebas de vida libre aisladas de fuentes de agua en Lima. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica.* 25(2): 204-207.
- García, E. 1973. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. 2a edición. Instituto de Geografía, UNAM. México, D. F. pp 7-56.
- García-Cueto, O.R., N., Santillán-Soto, M., Quintero, S., Ojeda-Benítez, N., Velázquez-Limón. 2013. Extreme temperature scenarios in Mexicali, Mexico under climate change conditions. *Atmósfera.* 26(4): 509-520.
- Geisen, S., A. Fiore-Donno, J. Walochnik & M. Bonkowski. 2014. *Acanthamoeba* everywhere: high diversity of *Acanthamoeba* in soils. *Parasit Res.* 113(9): 3151-3158.
- Griffin, J. 1983. The pathogenic amoebflagellate *Naegleria fowleri*: enviromental isolations, competitors, ecological interactions and flagellate-empty-habitat hypothesis. *J. Protozool.* 30: 403.
- Hauer, G. & A. Rogerson. 2005. Remarkable salinity tolerance of seven species of naked amoebae (gymnamoebae). *Hydrobiologia.* 549(1): 33-42.

- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2003. *Cuaderno estadístico municipal*. México: INEGI.
- Jamerson, M., K. Remmers, G. Cabral & F. Marciano-Cabral. 2009. Survey for the presence of *Naegleria fowleri* amebae in lake water used to cool reactors at a nuclear power generating plant. *Parasitol Res.* 104: 969-978.
- John, D. 1993. Opportunistically pathogenic free-living amebae. En: J.P. Kreier & J.R. Baker (Eds.). *Parasitic protozoa*. Academic Press, pp. 143 – 246.
- John, D. & M. Howard. 1995. Seasonal distribution of pathogenic free-living amebae in Oklahoma waters. *Parasitol Res.* 81(3): 193-201.
- Kyle, D. & G. Noblet. 1985. Vertical Distribution of Potentially Pathogenic Free-Living Amoebae in Freshwater Lakes. *The Journal of protozoology.* 32(1): 99-105.
- Kyle, D. & G. Noblet. 1986. Seasonal Distribution of Thermotolerant Free-Living Amoebae. I. Willard's Pond. *The Journal of protozoology.* 33(3): 422-434.
- Lares-Villa, F., J., De Jonckheere, H., De Moura, A., Rechi-Iruretagoyena, E., Ferreira-Guerrero, G., Fernandez-Quintanilla, C., Ruiz-Matus & G., Visvesvara. 1993. Five cases of primary amoebic meningoencephalitis in Mexicali, Mexico: study of the isolates. *Journal Clinical Microbiology.* 31(3): 685-688.
- Lares-Jiménez, L. & F. Lares-Villa. 2009. Aislamiento de Amebas de vida libre en aguas superficiales del Valle del Mayo, Sonora. *RLRN.* 5 (2): 161-166.
- Laseke, I., J. Korte, R. Lamendella, E. Kaneshiro, F. Marciano-Cabral & D. Oerther. 2010. Identification of *Naegleria fowleri* in warm ground water aquifers. *Journal of Enviromental quality.* 39: 147-153.
- Lorenzo-Morales, J., C. Monteverde-Miranda, C. Jiménez, M. Tejedor, B. Valladares & A. Ortega-Rivas. 2005a. Evaluation of Acanthamoeba isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine.* 12(2): 233-236.

- Magnet, A., R. Peralta, T. Gomes, F. Izquierdo, C. Fernández-Vadillo, A. Galvan, M. Pozuelo, C. Pelaz, S. Fenoy & C. Del Aguila. 2015. Vectorial role of *Acanthamoeba* in *Legionella* propagation in water for human use. *Science of the Total Environment*. 505: 889-895.
- Page, F.C. 1988. *A new key to freshwater and soil Gymnamoebae with instructions for culture*. Culture Collection of Algae and Protozoa. Cumbria. 122p.
- Ramírez, E. A. Warren, F. Rivera, P. Bonilla, S. Rodríguez, A. Calderón, R. Ortiz & E. Gallegos. 1993. An investigation of the pathogenic and non-pathogenic free-living amoebae in an activated sludge plant. *Water, Air Soil Poll.* 69 : 135-139.
- Ramírez E., E. Robles, P. Bonilla, G. Sainz, M. López, J. De La Cerda & A. Warren. 2005. Occurrence of Pathogenic Free-Living Amoebae and Bacterial Indicators in a Constructed Wetland Treating Domestic Wastewater from a Single Household. *Eng. Life Sci.* 5(3):6.
- Ramírez E., E. Robles, G. Sainz, R. Ayala, & E. Campoy. 2009. Calidad Microbiológica del Acuífero de Zacatepec, Morelos, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25(4):247-255.
- Ramírez E., E. Robles, R. Ayala, & B. Martínez. 2012. Calidad amebológica del agua de pozos utilizados para suministro de agua potable en el Estado de Hidalgo. *Ingeniería* 16(3): 219-228.
- Ramírez, E., E. Robles, B. Martínez, R. Ayala, G. Sainz, M. E. Martinez & M.E. González. 2014. Distribution of free-living amoebae in a treatment system of textile industrial wastewater. *Experimental parasitology*. 145:35-s38.
- Ramírez, E., E. Robles, M. Martinez, M. Sainz, B. Martinez, B. Rivas & A. Rocha. 2016. Distribution of free-living amoebae in springs in Morelos, Mexico. *Global Advanced Research Journal of Microbiology*. 5(5): 57-67.

- Rivera F., F. Lares, E., Gallegos, E., Ramirez, P., Bonilla, A., Calderón, J.J., Martínez, S., Rodríguez & J., Alcocer. 1989. Pathogenic amoebae in natural thermal waters of three resorts of Hidalgo, Mexico. *Environ Res.* 50: 289-295.
- Rivera, F., E. Ramirez, P. Bonilla, A. Calderón, E. Gallegos, S. Rodríguez & A. Duran. 1993. Pathogenic and free-living amoebae isolated from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. *Environ Res.* 62(1): 43-52.
- Rivera, F., P. Bonilla, E. Ramírez, A. Calderón, E. Gallegos, S. Rodríguez, R. Ortiz, D. Hernández & V. Rivera. 1993. Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in Mexico City and its suburbs. *Water, Air, and Soil Pollution.* 74(1-2): 65-87.
- Rodríguez-Zaragoza, S. 1994. Ecology of free-living amoeba. *Critical Reviews in Microbiology.* 20(3): 225 – 241.
- Rodríguez-Zaragoza, S., G.L. Gaviria & A. Rivera. 2005. Riqueza de especies de amebas desnudas en la rizosfera de *Neobuxbaumia tetetzo* y *Prosopis laevigata* en el desierto del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural.* 11: 54-64.
- Rogerson, A. & G. Hauer. 2002. Naked amoebae (protozoa) of the Salton Sea, California. *The Salton Sea.* 473: 161-177.
- Rohr, U., S., Weber, R., Michel, F., Selenka & M., Wilhelm. 1998. Comparison of Free-Living Amoebae in Hot Water Systems of Hospitals with Isolates from Moist Sanitary Areas by Identifying Genera and Determining Temperature Tolerance. *Applied and Environmental Microbiology.* 64(5): 1822-1824.
- Scheid, P. 2019. *Vermamoeba vermiformis* – A Free-Living Amoeba with public health and environmental health significance. *The Open Parasitology Journal.* 7: 40-47.
- Schuster, F.L. & G.S. Visvesvara. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal of Parasitology.* 34: 1001 – 1027.

- Sherr, E. & B. Sherr. 2002. Significance of predation by protists in aquatic food webs. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81: 293-308.
- Sifuentes L.Y., B.L., Choate, C.P. Gerba & K.R., Bright. 2014. The occurrence of *Naegleria fowleri* in recreational waters in Arizona. *Journal Environmental Science Health, Part A*. 49: 1322-1330.
- Todd, C., M. Reyes-Batlle, J. Piñero, E. Martínez-Carretero, B. Valladares, D. Streete & J. Lindo. 2015. Isolation and molecular characterization of *Acanthamoeba* genotypes in recreational and domestic water sources from Jamaica, West Indies. *Journal of water and health*. 13(3): 909-919.
- Tyndall, R., K. Ironside, P. Metler, E. Tan, T. Hazen & C. Fliermans. 1989. Effect of thermal additions on the density and distribution of thermophilic amoebae and pathogenic *Naegleria fowleri* in a newly created cooling lake. *Appl Environ Microbiol*. 55: 722-732.
- Valenzuela, A., E. López-Corella & J. De Jonckheere. 1984. Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from northwestern Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 78(4): 558-559.
- Vesaluoma, M., S. Kalso, L. Jokipii, D. Warhurst, A. Pönkä, & T. Tervo 1995. Microbiological quality in Finnish public swimming pools and whirlpools with special reference to free living amoebae: a risk factor for contact lens wearers? *British journal of ophthalmology*. 79(2): 178-181.
- Visvesvara G. S. 2014. *Pathogenic and Opportunistic Free-living Amoebae: Agents of Human and Animal Disease*. In: Farrar J, White NJ, Hotez PJ, Junghans T, Lalloo, Kang G, (eds). *Manson's Tropical Infectious Diseases*. 23th ed. China. Elsevier Saunders. Pag. 683-691.