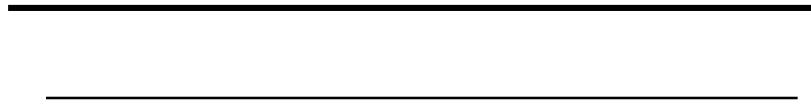




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Laboratorio de Microbiología Ambiental (GICyMA)

“Amebas de vida libre de tres canales de riego del Valle
de Mexicali, Baja California México”.

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:

ANTONIO MISAEAL RODRÍGUEZ VARGAS



DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA BONILLA LEMUS

Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a mis padres, Antonio y Natalia quienes siempre me apoyaron en todo momento, en las situaciones complejas y agradables. Por siempre confiar en mí y guiarme en toda decisión, por aconsejarme e incitarme a estudiar una carrera, la cual resultó ser una experiencia grata e inolvidable, jamás creí que esta carrera me llenara como lo hizo, y todo esto se lo debo principalmente a ellos.

A mi hijo Dharon por incitarme de manera indirecta a concluir una licenciatura, ya que sin él (mi inspiración y motivación) no hubiera hecho este logro, a su madre Jared por apoyarme y soportarme de igual manera en las buenas y malas.

De igual forma a mi hermano Javier, a mis hermanas Jazmín y Marlene por apoyarme y hacer agradables aquellos momentos poco gratos.

También quiero agradecer a mis amigos que me han acompañado en este proceso desde temprana edad, a Eleazar, Daniel, Iván, Israel y Aldo con quienes siempre cuento y aprecio de igual manera. A mis amigos y amigas de CCH y de licenciatura quienes han estado conmigo y han hecho este proceso uno de los más bonitos que he vivido.

Sin olvidar a mis profesores y profesoras quienes con su dedicación y capacidades para estimular el progreso académico me han influenciado en ser una persona pensante y crítica. Además quiero dar gracias al DGAPA-PAPIIT IN 225719.

Por último, quiero agradecer a mi amada FES Iztacala... por los bellos momentos, experiencias, personas y conocimientos que me brindó. Muchas gracias...

“Nunca consideres el estudio como un obligación. Sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”... Albert Einstein.

CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. GENERALIDADES	4
3.1 Hábitats y clasificación.....	4
3.2 Ciclo de vida.....	5
3.3 Importancia médica y ecológica.....	6
4. ANTECEDENTES	8
5. OBJETIVOS	10
6. ÁREA DE ESTUDIO	11
6.4 Municipio de Mexicali.....	12
6.5 Clima.....	12
7. MATERIALES Y MÉTODOS	14
7.1 Muestreo.....	14
7.2 Cultivo monoaxénico.....	16
7.3 Identificación morfológica.....	16
7.4 Cultivo axénico.....	17
7.5 Prueba de flagelación.....	17
7.6 Prueba de temperatura.....	17
7.8 Prueba de patogenicidad.....	18

7.9 Identificación molecular	19
7.9.1 Extracción de ADN genómico	19
7.9.2 Técnica de PCR.....	19
7.9.3 Electroforesis	21
7.9.4 Secuenciación	21
7.9.5 Análisis comparativo Bioinformático	21
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
8.1 Riqueza específica, frecuencia relativa e identificación de amebas de vida libre	22
8.2 Prueba de temperatura	28
8.3 Prueba de patogenicidad	28
8.4 Prueba de flagelación	29
8.5 Pruebas moleculares	30
8.6 Parámetros fisicoquímicos	31
8.6.1 Temperatura de agua en los tres canales de riego.....	31
8.6.2 Oxígeno disuelto (OD)	32
8.6.3 Conductividad	32
9. CONCLUSIONES	34
10. BIBLIOGRAFÍA	35

RESUMEN

Las amebas de vida libre (AVL) son protistas cosmopolitas que se encuentran distribuidos en diversos medios como aire, agua y suelo, siendo este último el que contiene la mayor abundancia de estos organismos. Los géneros *Acanthamoeba*, *Sappinia Balamuthia* y *Naegleria* poseen especies que pueden llegar a ser patógenas para el hombre y otros animales, causando lesiones en Sistema Nervioso Central, hígado, pulmones, riñones y otros tejidos, provocando en ocasiones graves daños e incluso la muerte.

El objetivo del presente trabajo fue identificar amebas de vida libre aisladas de agua de tres canales de riego en Mexicali, Baja California. Las muestras se centrifugaron para obtener un concentrado celular el cual fue sembrado en medio NNE y cultivado a temperatura de 25 y 30°C. Posterior a esto, las formas tróficas fueron sembradas en medios axénicos y se llevó a cabo la identificación morfológica, así como la realización de pruebas de temperatura, patogenicidad y flagelación (este último exclusivo para el género *Naegleria*). Se identificaron 13 géneros de AVL. Los géneros más frecuentes en los tres canales muestreados fueron *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Rosculus* y *Vermamoeba*.

De los 13 géneros identificados solo los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria* tienen especies patógenas. Se obtuvieron 4 aislamientos del género *Acanthamoeba* y 2 de *Naegleria*. Se identificó morfológicamente la especie *Acanthamoeba rhysodes* la cual fue recuperada de cerebro de un ratón sacrificado después de realizar la prueba de patogenicidad, mientras que un aislamiento del género *Naegleria* se recuperó del pulmón de dos ratones sacrificados. Usando métodos de biología molecular se identificaron dos especies de *Naegleria*: *Naegleria clarki* y *Naegleria australiensis*.

Los parámetros fisicoquímicos medidos en el agua de los canales fueron adecuados para la presencia y proliferación amebiana. La presencia de amebas del género *Acanthamoeba* y *Naegleria* tiene importancia médica para la población aledaña debido al riesgo potencial de adquirir alguna enfermedad relacionada con estos organismos, inclusive en meses fríos.

INTRODUCCIÓN

Las amebas de vida libre (AVL) son protistas que se mueven y alimentan utilizando estructuras llamadas pseudópodos (Fernández, 2014). Son organismos cosmopolitas que se encuentran distribuidos en diversos medios como es el aire, agua y suelo, siendo este último el que contiene la mayor abundancia de estos organismos (Coronado & López, 1980; Rivera *et al.*, 1987; Page, 1988). También son denominados organismos anfizóicos, lo cual se refiere a que tienen la capacidad de comportarse como organismos de vida libre y también como parásitos (Oddó, 2006).

Algunas especies de los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Sappinia* y *Balamuthia* destacan por tener un efecto patógeno en el humano causando infecciones del sistema nervioso central, oculares y lesiones en la piel (Coronado & López, 1980; Bonilla & Ramírez, 2014).

Naegleria fowleri es una ameba de vida libre patógena que causa meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP), enfermedad que produce graves lesiones cerebrales irreversibles e incluso la muerte en el humano y otros animales. La especie *Naegleria australiensis*, variedad italiana ha sido reportada como patógena para animales de laboratorio (Guzmán-Fierros *et al.*, 2008; De Jonckheere, 2012).

Muchos casos clínicos de MEAP en los diversos continentes pasan inadvertidos ante el diagnóstico clínico y de laboratorio (Ávila *et al.*, 2006). La mayoría de los casos se han dado en jóvenes sanos los cuales practican alguna actividad acuática como es la natación en aguas cálidas (Vargas-Zepeda *et al.*, 2005; Visvesvara *et al.*, 2010).

Por otro lado, algunas especies de *Acanthamoeba* son potencialmente patógenas para el humano (Visvesvara *et al.*, 2007) provocando graves problemas en pulmones, oídos y otros tejidos, como Queratitis Amebiana (QA) y Encefalitis Amebiana Granulomatosa (EAG), enfermedad que afecta al sistema nervioso

central de personas inmunodeprimidas (Visvesvara *et al.*, 2007; Bonilla-Lemus *et al.*, 2014).

Balamuthia es una ameba que causa (EAG) e infecciones en la piel (Visvesvara *et al.*, 2007). Mientras que *Sappinia pedata* es una ameba que causa encefalitis amebiana (EA) en humanos (Gelman *et al.*, 2001; Bonilla & Ramírez, 20014).

Debido a que se han encontrado estos grupos de amebas con importancia médica en medios acuáticos como piscinas, limpiadores de lentes de contacto, aguas dulces e incluso en agua embotellada entre otros (Ramírez, 1993; Fernández, 2014), es de gran importancia realizar estudios sobre estos organismos y los ambientes donde se encuentran.

Se han reportado casos de MEAP en la zona norte de nuestro país como sucedió en Mexicali Baja California. El primer caso registrado sucedió a un joven de 16 años en 1978 que falleció al tercer día de haber comenzado los síntomas. Exámenes *post-mortem* revelaron la presencia de *Naegleria fowleri* (Valenzuela *et al.*, 1984).

En 1993 se aislaron 6 cepas del género *Naegleria* de las cuales 5 fueron aisladas de pacientes diagnosticados con MEAP y una más de un canal de riego donde estas personas tenían antecedentes de nadar antes de contraer dicha infección (Lares-Villa *et al.*, 1993). Mientras que dos cepas más de *N. fowleri* se aislaron del líquido cefalorraquídeo de dos personas al Noreste del país (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2007). He ahí la importancia de estudios sobre AVL en esa zona.

GENERALIDADES

Hábitats y clasificación

Las amebas de vida libre se han encontrado en diferentes medios como en aire acondicionado, piscinas, agua embotellada, suelo, polvo, incluso en aguas termales ya que las especies patógenas tienen afinidad a las altas temperaturas, lo que resulta en una proliferación óptima cuando están en aguas cálidas (Vargas-Zepeda *et al.*, 2005).

La clasificación de estos organismos ha ido cambiando con el tiempo debido a las pruebas moleculares modernas, sin embargo, para este estudio se tomó la clasificación de Adl y colaboradores (2019) específicamente para las AVL potencialmente patógenas para el hombre y otros organismos (Figura 1).

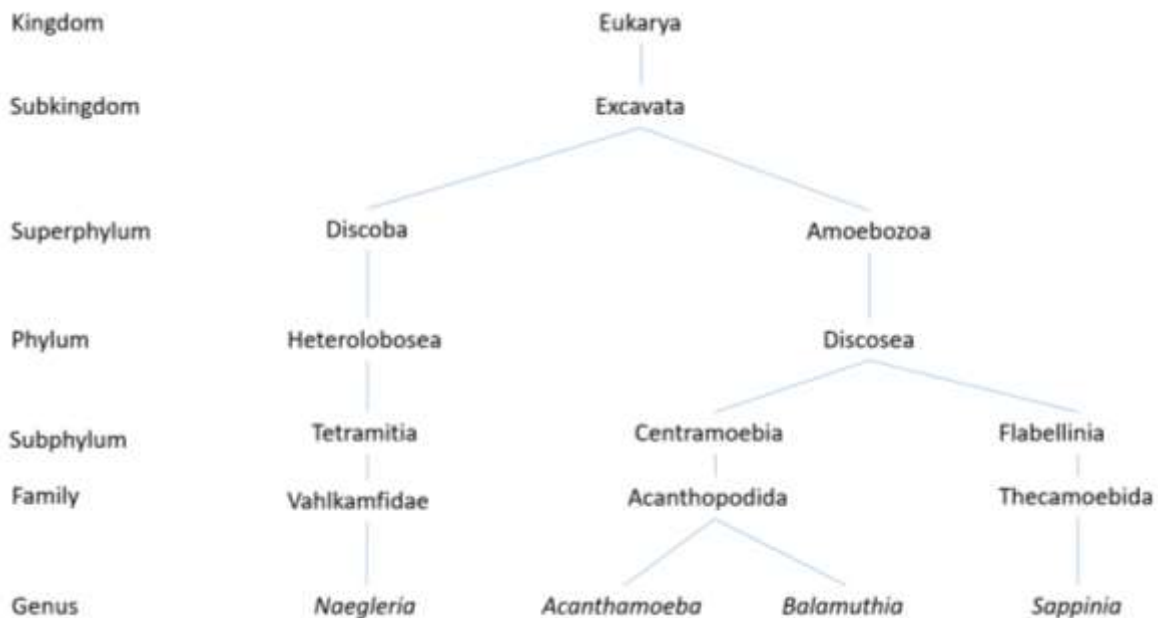


Figura 1. Clasificación de AVL potencialmente patógenas (Adl *et al.*, 2019)

Ciclo de vida

El ciclo de vida de las AVL (Figura 2) generalmente consta de dos estadios, uno es el trofozoíto que es la forma metabólicamente activa, se alimenta de bacterias, microalgas, hongos y otros protozoos (Rodríguez-Zaragoza *et al.*, 2005) y se reproduce asexualmente por fisión binaria, la otra fase es el estado de quiste el cual es una estructura de resistencia, además de que en esta fase se puede dispersar con ayuda del viento. *Naegleria* tienen un tercer estadio (flagelado) el cual es móvil y transitorio, se presenta cuando los nutrientes en el medio son escasos y cuando las condiciones son ideales, esta ameba regresa a su forma ameboide (Fernández, 2014).

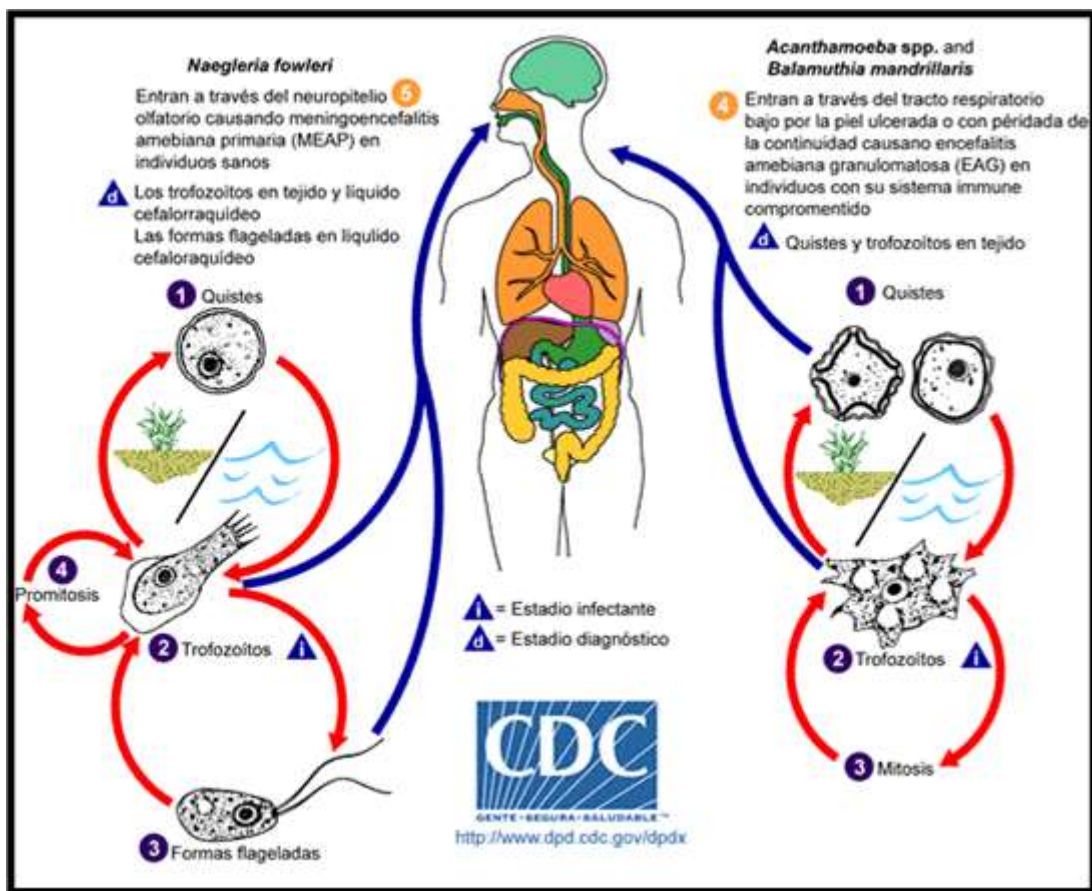


Figura. 2 Ciclo de vida de *Naegleria* y *Acanthamoeba*

Importancia médica y ecológica

La especie *Naegleria fowleri* es causante de la meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP), enfermedad que ataca el Sistema Nervioso Central (SNC), se presenta en jóvenes con historial de practicar actividades acuáticas en aguas cálidas, calentadas ya sea natural o artificialmente. Esta enfermedad es fatal en la mayoría de los casos (Vargas-Zepeda *et al.*, 2005).

Encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) es una enfermedad mortal que afecta el sistema nervioso central y es provocada por las amebas de *Acanthamoeba* spp, y *Balamuthia mandrillaris*, afectan principalmente a personas inmunodeprimidas como son gente con SIDA, diabetes, individuos con algún trasplante, etc. (Seas & Bravo, 2006, Visvesvara *et al.*, 2007).

Además de esta enfermedad *Acanthamoeba* también es responsable de causar queratitis amebiana (QA) y queratoconjuntivitis, enfermedad que causa inflamación y ulceración en la córnea. Esta enfermedad se asocia frecuentemente con personas que usan lentes de contacto que estén expuestos a contaminación por este organismo (Fernández, 2014). *Balamuthia* y *Acanthamoeba* también son responsables de provocar infecciones cutáneas, sin mencionar los daños a órganos como pulmón, hígado y riñón que ocasiona *Acanthamoeba* (Bonilla-Lemus *et al.* 2014).

El género *Sappinia* es responsable de generar Encefalitis Amebiana (EA), enfermedad reportada en un adulto masculino sin inmunodepresión aparente, generando un tumor cerebral sin respuesta granulomatosa (Bonilla & Ramírez, 2014).

Amebas de vida libre patógenas y no patógenas, juegan un papel importante como reservorios y vectores de organismos (virus, hongos y bacterias) que pueden llegar a ocasionar enfermedades en el humano y otros animales. Bacterias como *Legionella pneumophila*, *Chlamydia* sp., *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium avium*, (Bonilla-Lemus *et al.*, 2014; Bonilla & Ramírez, 2014) y virus como *enterovirus*, *adenovirus* y *mimivirus* pueden llegar a

ser organismos endosimbióticos de AVL (*Acanthamoeba* spp. *V. vermiformis* y *Amoeba* sp.) las cuales las usan para protegerse de los factores bióticos y abióticos del ambiente, así mismo utilizan a las amebas como un vector para distribuirse y colonizar nuevos hábitats (Bonilla-Lemus *et al.*, 2014; Samba-Louaka *et al.*, 2019).

Además de la importancia médica, las AVL tienen importancia ecológica en la regulación de poblaciones bacterianas, de levaduras, microalgas, algunos organismos multicelulares como nemátodos y rotíferos y de la degradación de materia orgánica, incorporando así, elementos al ciclo global de nutrientes (Rodríguez-Zaragoza *et al.*, 2005; Adl & Gupta, 2006). Además de lo anterior, son organismos que sirven de alimento para organismos de niveles tróficos superiores (Fenchel, 1987; Bonilla *et al.*, 2004).

ANTECEDENTES

- ♣ Al noreste de México, en Mexicali Baja California Valenzuela y colegas (1984) registraron en un joven de 16 años el primer caso reportado de MEAP causada por *Naegleria fowleri*. Después de los 3 días de presentar los síntomas y ser hospitalizado el joven murió y fueron observados las formas tróficas de *N. fowleri* en fluido de líquido cefalorraquídeo.
- ♣ Ramírez (2019) realizó un muestreo en un canal de riego en Mexicali, Baja California, México. Reportando 18 especies pertenecientes a 8 géneros, de los cuales, cinco cepas de *Naegleria* fueron patógenas y tres cepas de *Acanthamoeba* resultaron invasivas.
- ♣ En Monterrey, Nuevo León, México, Rodríguez (1984) reportó el primer caso de MEAP por *Naegleria fowleri* en esta región. Un paciente sobrevivió a la infección amebiana debido a un tratamiento con anfotericina B.
- ♣ López-Corella y colegas (1989) reportaron un caso de MEAP en un joven varón de 13 años, con historial de haber trabajado en un estanque un día antes de presentar el cuadro clínico y de haber nadado en piscinas locales. El joven murió por MEAP con necrosis parenquimatosa de estructuras basales y de fosa posterior en Huetamo, Michoacán, México. La toma de líquido cefalorraquídeo tomado *post-mortem* reveló la presencia de trofozoítos de *Naegleria fowleri*.
- ♣ En 1993 Lares-Villa y colegas aislaron 6 cepas del género *Naegleria* de casos clínicos en Mexicali, México, los cuales 5 fueron aisladas de pacientes diagnosticados con MEAP y una más de un canal de riego donde estas personas tenían antecedentes de nadar antes de contraer dicha infección.
- ♣ Guzmán-Fierros y colaboradores (2008) muestrearon en cuerpos de agua recreativos de Hornos, Sonora donde muestrearon 9 sitios durante los meses de junio a septiembre. Se identificaron genéticamente especies del género *Naegleria*, reportando *N. lovaniensis*, *N. tihangensis* y *N. americana*.

- ♣ En Morelos, Ramírez y colegas (2009) evaluaron durante un año la calidad de agua de diferentes pozos del acuífero de Zacatepec, donde se midieron parámetros fisicoquímicos y factores bióticos (coliformes totales, coliformes fecales y AVL). Encontrando crecimiento amebiano en todos los pozos. Así mismo se reportó la presencia de *Acanthamoeba* aunque con una baja frecuencia.
- ♣ Lares-Jiménez y Lares-Villa, en 2009 hicieron un estudio de AVL en aguas superficiales de Sonora, donde la temperatura del agua durante los muestreos osciló entre 25°C y 32°C. Se aislaron un total de 91 cepas de amebas de vida libre e identificaron 5 aislamientos sospechosos para *Naegleria fowleri*, 4 aisladas a 45°C y 1 a 37°C. Las pruebas de flagelación y temperatura salieron positivas, pero la prueba de ADN fue negativa para *Naegleria fowleri*, por lo que resultaron ser otras especies de *Naegleria*.
- ♣ Cervantes-Sandoval *et al.* (2007) identificaron *N. fowleri* extraídas de líquido cefalorraquídeo de 2 casos de MEAP en la parte noroeste de México, en donde un caso fue en Mexicali, Baja California y el otro fue en Lagunitas, Sonora. En ambos casos se hicieron pruebas de flagelación, identificación morfológica, ultraestructura, patrones proteicos y de proteasas, así como el PCR que funcionaron como pruebas confirmativas de *N. fowleri*.
- ♣ Bonilla y colaboradores (2014) llevaron a cabo un estudio en treinta y dos sitios tomando muestra de 18 arroyos de la cuenca de México, identificando 130 AVL distribuidas en 18 géneros. Los géneros más frecuentes fueron *Vannella*, *Rosculus* y *Acanthamoeba*, las cepas de este último género fueron sometidas a pruebas de patogenicidad, solo tres cepas de *Acanthamoeba* fueron invasivas en ratón.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Identificar amebas de vida libre aisladas de los canales de riego “Delta”, “4 abril” y “Canal Revolución” en Mexicali, Baja California.

Objetivos particulares

- Identificar mediante criterios morfológicos a las amebas de vida libre
- Determinar la riqueza específica de amebas de vida libre en los tres canales de riego
- Hacer pruebas de flagelación para las amebas sospechosas del género *Naegleria*
- Llevar a cabo pruebas de temperatura y patogenicidad
- Realizar prueba de biología molecular para las amebas del género *Naegleria*
- Comparar los parámetros fisicoquímicos analizados con la incidencia de amebas

ÁREA DE ESTUDIO

Baja California Norte es un estado al noroeste de la República Mexicana, limita al norte con los Estados Unidos de América, con el mar de Cortés al este, al sur con Baja California Sur y al oeste por el océano Pacífico. Este estado está conformado por 5 municipios, Tijuana, Tecate, Ensenada, Playas de Rosarito y Mexicali, este último constituye la Capital del estado (Figura 3) (SIM *et al.*, 2015; SPF, 2015).



Figura 3. República Mexicana, municipio de Mexicali, Baja California Norte. Mapa elaborado con Sistema de Información Geográfica (QGIS), con base de datos INEGI, 2019; Rodríguez, 2020.

Municipio de Mexicali

Mexicali es un municipio que cuenta con una extensión territorial de 13,700 km² aproximadamente, abarcando el 18 % del territorio del estado, al noroeste de este municipio se localiza el Valle de Mexicali, zona atravesada por la Falla de San Andrés, por lo que es una de las zonas sísmicamente más activas del país (INEGI, 2003).

Clima

El clima predominante (Figura 4) de acuerdo con la clasificación de Köppen es del tipo BW seco desértico, eso quiere decir que es cálido y seco la mayor parte del año, con temperaturas anuales que van de 21 a 23 °C en promedio, aunque en los meses más cálidos como junio, pueden llegar a rondar los 43°C. En enero se puede alcanzar una temperatura de 11 a 14°C, siendo este el mes más frío. También se pueden presentar condiciones extremas en Mexicali, donde ha habido temperaturas altas de 54.3°C, y tan bajas como -7.0°C (SEMARNAT, 2011).

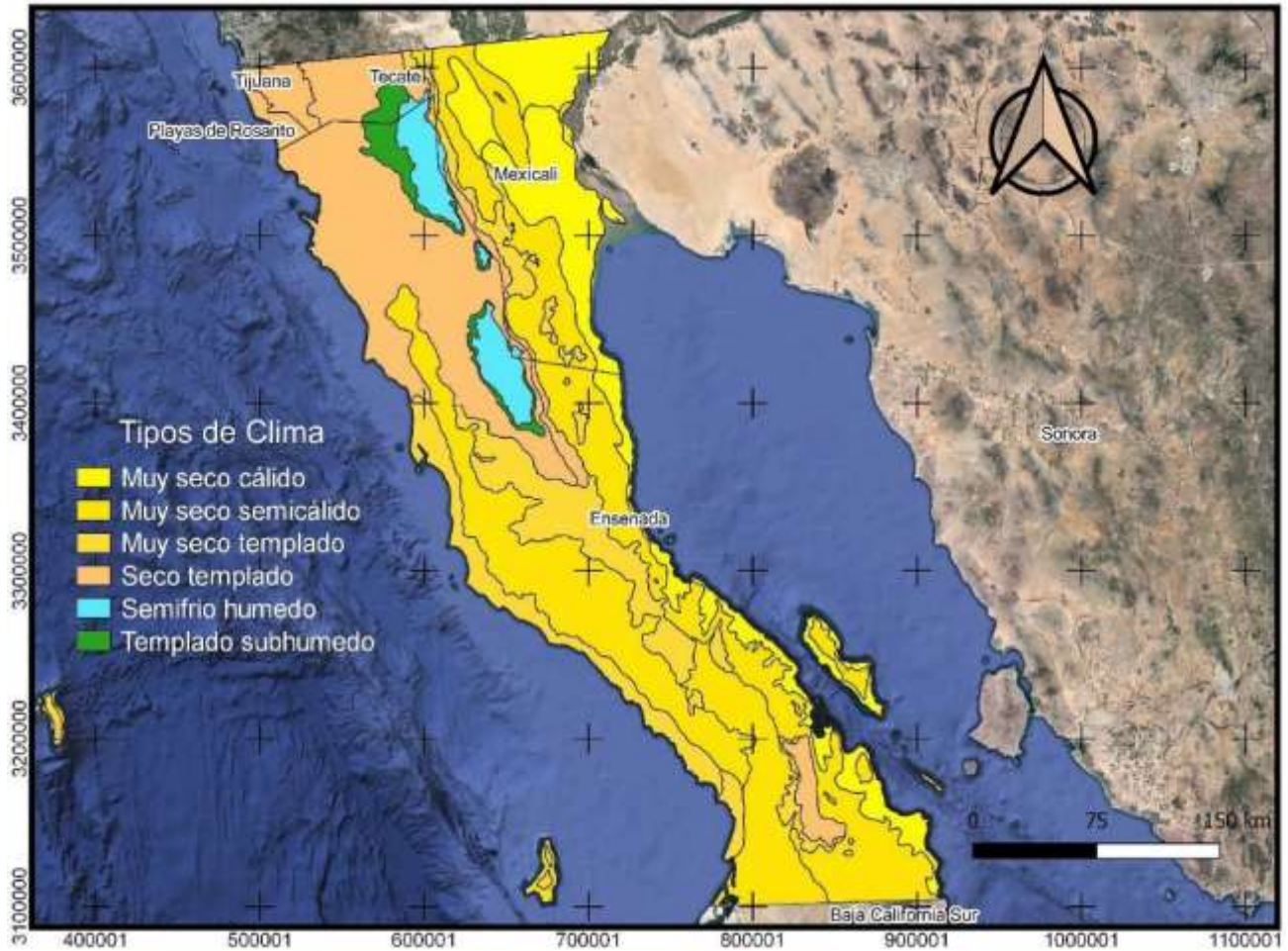


Figura 4. Tipos de climas de Baja California donde predomina el tipo de clima seco cálido. Mapa elaborado con Sistema de Información Geográfica (QGIS), con base de datos INEGI, 2019; Rodríguez, 2020.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

El muestreo se realizó en noviembre de 2016 en el Valle de Mexicali en Baja California, México en los canales de riego (Figura 5):

“Delta” Ejido Nuevo León

“4 de abril” Ejido Nuevo león

“Revolución” Ejido Querétaro Tlaxcala

Se midieron *in situ* la temperatura del agua, pH y conductividad con un potenciómetro conductronic PC18 (Conductronic Instruments) y el oxígeno disuelto con un oxímetro YSI modelo 51B. Se tomaron 250 ml de agua en cada sitio. Las muestras se colectaron en recipientes estériles y se transportaron a temperatura ambiente al laboratorio de Microbiología Ambiental del Grupo de Investigación en Conservación y Mejoramiento de Ambiente (GICyMA) de la FES-Iztacala-UNAM.

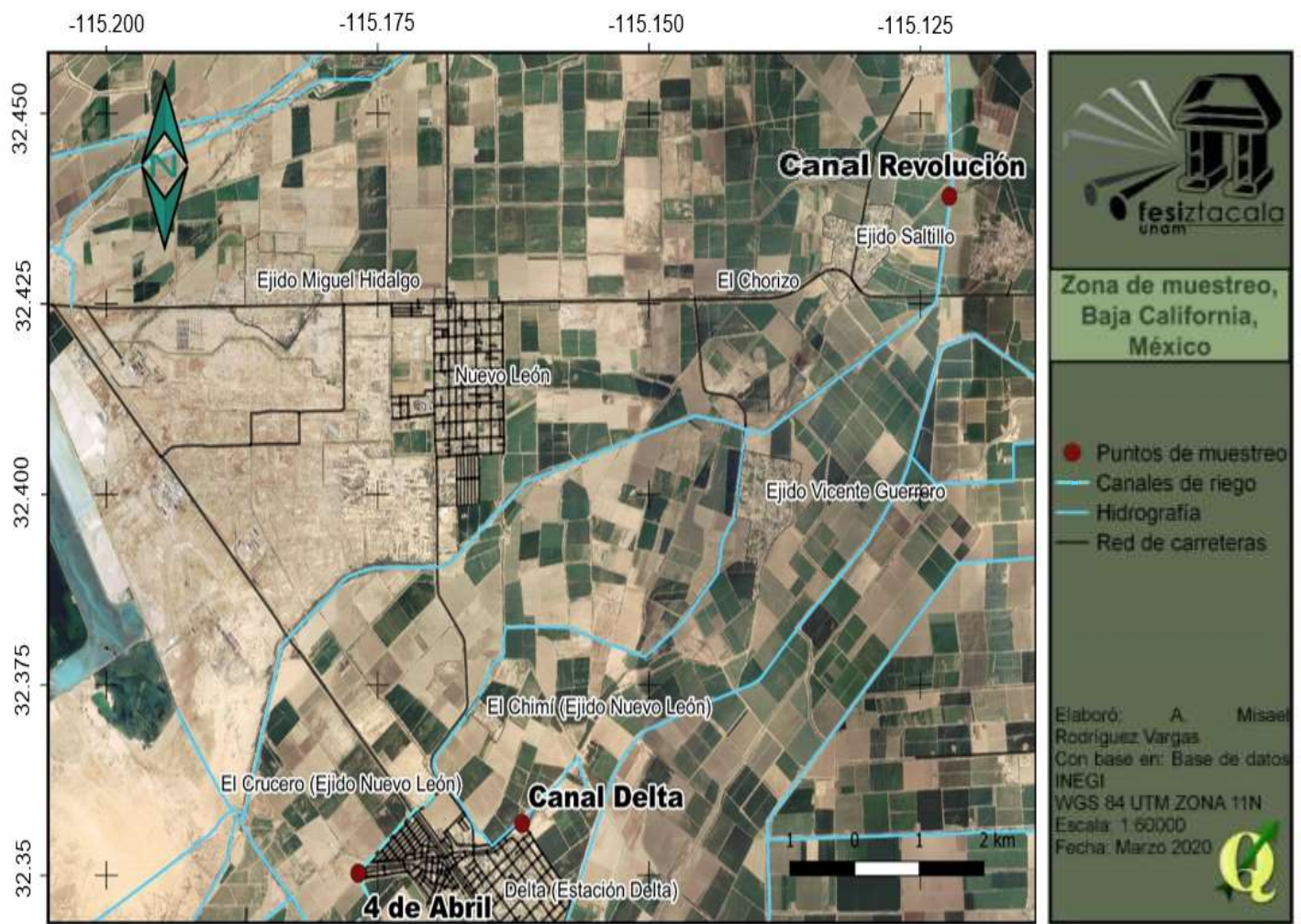


Figura 5. Ubicación geográfica de canales de riego "Delta, 4 de abril y Revolución". Mapa elaborado con Sistema de Información Geográfica (QGIS), con base de datos INEGI, 2019; Rodríguez, 2020.

Cultivo monoaxénico

De la muestra homogenizada se tomó una alícuota de 50 ml para su centrifugación a 3,500 rpm durante 15 minutos (centrífuga Boecco U-320). Posteriormente se tomó la pastilla con un poco de sobrenadante para inocular 5 gotas en cada una de dos cajas Petri con agar no nutritivo (NNE, Anexo 1), con *Enterobacter aerogenes*, bacteria inactivada previamente por calor a 68°C durante 60 minutos (Rivera *et al.*, 1987). Una caja se incubó a 25°C para el crecimiento de amebas en general y otra a 37°C para el crecimiento de amebas termófilas. Las cajas ya inoculadas se incubaron y después de 24 horas, se comenzaron a examinar con un microscopio invertido en búsqueda de trofozoítos y quistes característicos de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* con el fin de separarlos en medio NNE nuevo para continuar con su identificación (las amibas no patógenas se identificaron y desecharon posteriormente). Una vez localizados los trofozoítos se realizó una resiembra recortando un cuadro del medio con un asa bacteriológica estéril y se pasó a otra caja con medio de agar NNE, el pequeño cuadro de agar recortado se colocó en forma invertida con respecto a la superficie de la nueva caja de agar NNE (NORMA Oficial Mexicana, NOM, 2010).

Identificación morfológica

Las amebas se identificaron tomando en cuenta su forma trófica y quística usando las claves taxonómicas de Page (1988) y de Pussard y Pons (1977) haciendo una preparación de la zona de la caja con presencia de trofozoítos y quistes. La preparación se realizó haciendo un barrido de dicha zona con un asa de siembra y agua destilada. Con una pipeta Pasteur se extrae el líquido con amebas y se colocó en un portaobjetos y cubreobjetos para su observación con un microscopio óptico Zeiss equipado con contraste de fases y observando con el objetivo de 40x, midiendo 50 trofozoítos y 50 quistes generando un promedio para su identificación con apoyo de las claves arriba mencionadas.

Cultivo axénico

Las amebas aisladas e identificadas morfológicamente como *Acanthamoeba* y *Naegleria* se pasaron a los medios líquidos axénicos: bactocasitona (2%, Anexo 2) y medio Chang modificado (Anexo 3), ambos con 10% suero fetal o de ternera (Rivera *et al.*, 1987) para la obtención axénica de las amebas potencialmente patógenas.

Prueba de flagelación

En un tubo de ensayo con tapa de rosca se agregó aproximadamente 1 ml de medio de cultivo conteniendo las amebas en forma de trofozoíto y 1 ml de agua destilada estéril para bajar la concentración de nutrientes y facilitar un medio para la motilidad, se incubaron durante 4 horas a la temperatura de aislamiento, y durante ese lapso se revisaron cada hora en el invertoscopio, en busca de presencia organismos flagelados (Page, 1988). Aunque no es una prueba confirmativa, es útil para diferenciar a *Naegleria* de las amebas que no forman flagelos.

Prueba de temperatura

Esta prueba se realiza para determinar la termotolerancia de las amebas potencialmente patógenas (*Acanthamoeba-Naegleria*). Las cepas en medio axénico se incubaron a 37, 42 y 45° C y se observaron diariamente durante diez días en busca de proliferación amebiana, enquistamiento y/o muerte de éstas (Lares-Jiménez & Lares-Villa, 2009; Fernández, 2014; Bonilla *et al.*, 2014).

Prueba de patogenicidad

Las amebas de los géneros potencialmente patógenos (*Acanthamoeba-Naegleria*) se cultivaron de forma masiva durante 5 días, pasado este tiempo se hizo un conteo celular en cámara de Neubauer y se centrifugó a 3,500 rpm durante 15 minutos (centrífuga Boecco U-320), obteniendo una concentración celular entre 10^4 - 10^6 . Del concentrado celular se tomaron 200 μ l para inocular a cinco ratones CD-1 (20 μ l por ratón) los cuales fueron monitoreados diariamente por un periodo de 21 días en busca de irregularidades en su comportamiento o mortalidad (De Jonckheere, 1980). Los organismos que sobrevivieron a este periodo fueron sacrificados para la extracción de cerebro, pulmón, hígado y riñón (Figura 6). Posteriormente se inocularon en medio no nutritivo con *Enterobacter aerogenes* (NNE) a la temperatura de crecimiento para registrar la presencia o ausencia de amebas (Culbertson *et al.*, 1959; De Jonckheere, 1980; Bonilla *et al.*, 2014).



Figura 6. Prueba de patogenicidad. 1) Ratones macho de la cepa CD/1. 2) Inoculación intranasal. 3) Revisión de ratones durante 21 días. 4-5) Sacrificio y extracción de órganos. 6) Colocación de cerebro, pulmón, hígado y riñón en la caja con medio NNE.

Identificación molecular

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es una herramienta sencilla, rápida, precisa y útil para la identificación de organismos a nivel de especies utilizando una región específica de un gen previamente secuenciado. En este caso se usa para la identificación de las amibas pertenecientes al género *Naegleria* y fue realizado con el apoyo de la licenciada en enfermería Karla Barrón y la doctora Maricela Carrasco Yépez.

Extracción de ADN genómico

Se hizo un cultivo masivo en medio axénico de trofozoítos del género *Naegleria*, el cual se cosechó y centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos (centrífuga Boecco U-320) para obtener una pastilla con el concentrado amebiano. En la cámara de Neubauer se cuantificaron 1×10^6 de trofozoítos para la obtención de ADN genómico. Posteriormente se siguieron los pasos descritos en el manual del Kit ZYMO RESEARCH, Quick-g DNA™ MicroPrep.

Una vez obtenido el ADN genómico se corrió una alícuota de 5 μ l en el gel agarosa con TE (Tis-HCL 50Mm, EDTA 10Mm, pH 8.0) como disolvente, y se corrió por espectrofotometría a una longitud de onda de 260nm para asegurar la integridad de los ácidos nucleicos.

Técnica de PCR

Posterior a la extracción de ácidos nucleicos, se siguieron los pasos del Kit Platinum Hot Start PCR 2x Master MIX (Tabla 1). Para cada reacción se utilizaron 250ng de ADNg, realizando un total de dos PCR (abril-56 y CRCS-57) aplicado en amebas del género *Naegleria*, amplificando la región 18S ARNr (Samba-Louaka, 2019).

Tabla 1. Preparación de PCR (Platinum Hot Start PCR 2x Master MIX).

	Volumen
Agua libre de Nucleasa	9.5 µl
Platinum™ Hot Start PCR 2X Master Mix	12.5 µl
Primer Sentido (µM)	0.5 µl
Primer Anti Sentido	0.5 µl
Muestra de ADN	250 ng/2 µl
Platinum™ GC Enhancer (opcional)	5 µl

Una vez preparado el mix se usó un termociclador Quanta Biotech S-24, en el programa “My Cube” a 30 ciclos bajo las condiciones señaladas en la tabla 2.

Tabla 2. Proceso a 30 ciclos en termociclador.

Inicio/Fin	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
	Alineamiento	95	2 min
Comienza el ciclo	Desnaturalización	95	30 seg
	Alineación	50	1 min
Fin del ciclo	Elongación	72	2 min
	Elongación final	72	10 min

Los primers utilizados fueron los siguientes:

- > Para la amplificación del gen 18S ARNr para *Naegleria fowleri* (Tsvetkova et al., 2004).

FLA Fwd 5´- CGC GGT AAT TCC AGC TCC AAT AGC 3´

FLA Rev 5´- CAG GTT AAG GTC TCG TTC GTT AAC 3´

Estos primers fueron cuantificados y ajustados a una concentración de 20 pmol.

Electroforesis

Para poder revelar los resultados obtenidos de la PCR se mide la concentración de ácidos nucleicos obtenidos con la ayuda de un espectrómetro para proceder a visualizarlos en un gel de agarosa al 1.2% tiñéndolo con Midori Green Advanced. En dicho gel se carga la muestra mezclando 2µl de tinte de carga con una concentración de 5 µl de producto obtenido del PCR. El gel se corre con buffer TAE al 1% con 80mV por 30 a 40 min (Castillo, 2015; Lares-Jiménez & Lares-Villa, 2009). Al término, el gel fue visualizado en un transiluminador de luz UV.

Secuenciación

Una vez obtenidos los productos de la PCR, se realizó una secuenciación utilizando un secuenciador marca HITACHI ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer la cual se llevó a cabo en el laboratorio de Bioquímica Molecular ubicado en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO, en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Análisis comparativo bioinformático

Los datos de la secuenciación obtenidos se analizaron y editaron con ayuda del programa BioEdit v7.2.5, utilizando los electroferogramas de las secuencias FWD y RV como base para editar posibles errores o artefactos y obtener una secuencia consenso a partir de ambas secuencias, tratando así de tener una secuencia más confiable y certera. Una vez editadas las secuencias se utilizó el programa ClustalW para hacer el alineamiento múltiple de secuencias y la comparación de las secuencias obtenidas con secuencias reportadas en el GenBank mediante una BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Riqueza específica y frecuencia relativa.

Se identificaron morfológicamente 13 géneros de AVL: *Acanthamoeba*, *Amoeba*, *Mayorella*, *Naegleria*, *Paraflabellula*, *Platyamoeba*, *Rosculus*, *Saccamoeba*, *Thecamoeba*, *Vahlkampfia*, *Vannella*, *Vermamoeba* y *Vexillifera* (Tabla 3), de los cuales solo los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria* contienen especies patógenas, mientras que las amebas de los otros géneros no han sido reportadas como patógenas. Sin embargo, juegan un papel importante en el aspecto ecológico, alimentándose o asociándose con otros protozoos, bacterias, cianobacterias, microalgas y otras comunidades acuáticas, además de ser vectores de virus y bacterias (Porter *et al.*, 1985).

Tabla 3. Riqueza específica de amebas de vida libre de los canales.

CANAL-EJIDO	GÉNERO	ESPECIE
Delta - Nuevo León (CD)	<i>Acanthamoeba</i> (Volkonsky, 1931)	<i>polyphaga</i> (Puschkarew, 1913)
		<i>rhyssodes</i> (Singh, 1952)
	<i>Amoeba</i> (Bory de St. 1822)	<i>proteus</i> (Leidy, 1878)
	<i>Mayorella</i> (Schaeffer, 1926)	<i>cultura</i> (Bovee, 1961)
		<i>microeruca</i> (Bovee, 1970)
		<i>spatula</i> , (Bovee, 1970)
	<i>Naegleria</i> (Alexieff, 1912, emend. Calkins, 1913)	
	<i>Paraflabellula</i> (Page & Willumsen, 1983)	
	<i>Platyamoeba</i> (Page, 1969)	<i>placida</i> (Page, 1968)
	<i>Rosculus</i> (Hawes, 1963)	<i>Ithacus</i> (Hawes, 1963)
	<i>Thecamoeba</i> (Fromentel, 1874)	<i>quadrilineata</i> (Carter, 1856)
	<i>Vannella</i> (Bovee, 1965)	<i>platypodia</i> (Gläser, 1912)
		<i>simplex</i> (Wohlfarth-Bottermann, 1960)
<i>Vermamoeba</i> (Cavalier-Smith & Smirnov, 2005)	<i>vermiformis</i> (Page, 1967)	
4 Abril - N. León (4abril)	<i>Acanthamoeba</i> (Volkonsky, 1931)	<i>polyphaga</i> (Puschkarew, 1913)
		<i>astronyxis</i> (Ray & Hayes, 1954)
	<i>Naegleria</i> (Alexieff, 1912, emend. Calkins, 1913)	

	<i>Rosculus</i> (Hawes, 1963)	<i>Ithacus</i> (Hawes, 1963)
	<i>Saccamoeba</i> (Frenzel, 1892, emend. Bovee, 1972)	<i>stagnicola</i> (Page, 1974)
	<i>Thecamoeba</i> (Fromentel, 1874)	<i>quadrilineata</i> (Carter, 1856)
	<i>Vahlkampfia</i> (Chatton & Lalung-Bonnaire, 1912)	<i>avara</i> (Page, 1967)
		<i>ustiana</i> (Page, 1974)
	<i>Vannella</i> (Bovee, 1965)	<i>platypodia</i> (Gläser, 1912)
	<i>Vermamoeba</i> (Cavalier-Smith & Smirnov, 2005)	<i>vermiformis</i> (Page, 1967)
Revolución – Querétaro Tlaxcala (CRCS2)	<i>Acanthamoeba</i> (Volkonsky, 1931)	<i>triangularis</i> (Pussard & Pons, 1977)
	<i>Naegleria</i> (Alexieff, 1912, emend. Calkins, 1913)	
	<i>Rosculus</i> (Hawes, 1963)	<i>Ithacus</i> (Hawes, 1963)
	<i>Saccamoeba</i> (Frenzel, 1892, emend. Bovee, 1972)	<i>stagnicola</i> (Page, 1974)
	<i>Vermamoeba</i> (Cavalier-Smith & Smirnov, 2005)	<i>vermiformis</i> (Page, 1967)
	<i>Vexillifera</i> (Schaeffer, 1926)	<i>bacillipedes</i> (Page, 1969)

En la tabla 3 se puede observar que el mayor número de géneros se identificó en el canal Delta con 10, seguido de 4 de abril con 8, y en el Canal Revolución solamente 6. *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Rosculus* y *Vermamoeba* se encontraron en tres canales de riego, *Saccamoeba*, *Thecamoeba* y *Vannella* se hallaron en dos de tres canales, mientras que el resto de los géneros solo se encontraron en uno de los tres canales muestreados (Tabla 3).

Los géneros más frecuentes en los canales de riego fueron *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Rosculus* y *Vermamoeba* con 12.5% cada uno (Figura 7).

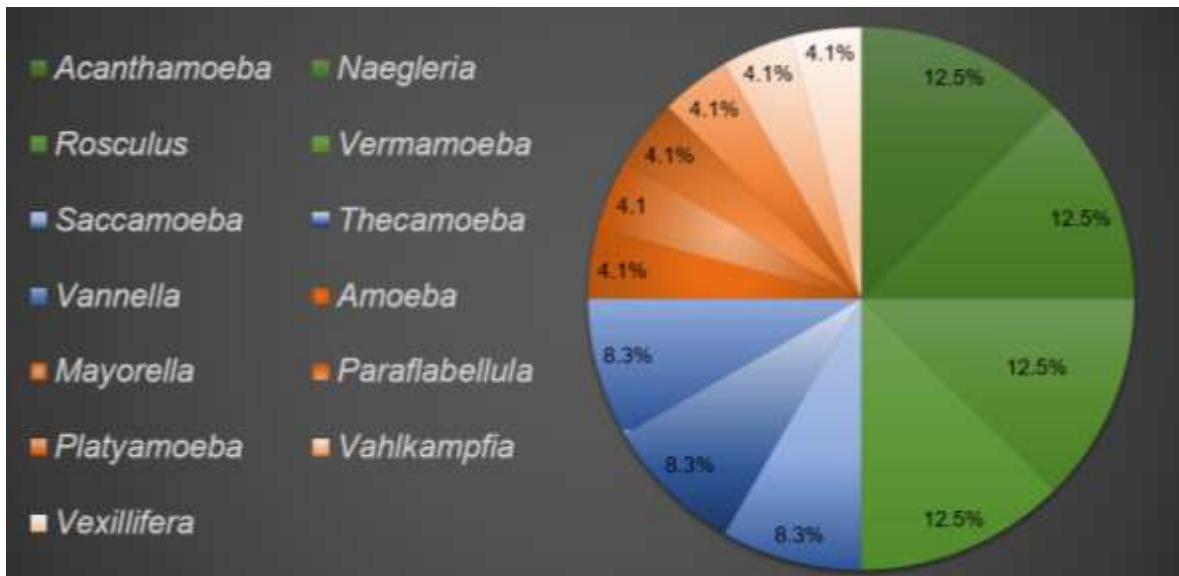


Figura 7. Frecuencia relativa de géneros amebianos en los canales de muestreo.

No es extraño encontrar el género *Acanthamoeba* en el agua de los canales de riego estudiados, ya que de acuerdo con Page (1983) es el género que se encuentra con mayor frecuencia en el ambiente donde participa activamente como regulador de poblaciones bacterianas y como vector de otros microorganismos (Bonilla-Lemus *et al.*, 2014, Bonilla y Ramírez, 2014; Samba-Louaka *et al.*, 2019). Otro aspecto importante de encontrar este género radica en que tiene especies potencialmente patógenas para el hombre y otros organismos, hecho que se ve reflejado en este trabajo, ya que una especie de este género fue invasiva en cerebro de ratón.

El género *Naegleria* ya había sido reportado con anterioridad en la zona norte del país (Cervantes *et al.*, 2007). Este género puede estar presente aquí debido a la estructura del quiste que le permite resistir condiciones diversas (Larez-Villa *et al.*, 1993). Por otra parte, los géneros *Rosculus* y *Vermamoeba* ya habían sido reportadas igualmente en esta zona (Ramírez, 2019; Vargas, 2005) por lo que no es raro encontrarlas en presente trabajo.

Amibas de los géneros identificados como no potencialmente patógenos han sido reportados en otros cuerpos de agua de la zona norte como Mexicali, Baja California; Hornos, Sonora y Monterrey, Nuevo León (Guzmán-Fierros *et al.*, 2008; Lares-Jiménez & Lares-Villa, 2009) y en la Cuenca de México y zona centro del país (Ramírez *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2015).

Se obtuvieron los siguientes aislamientos de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* (Tabla 4).

Tabla 4. Amebas de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria* obtenidos en los canales muestreados.

Cepa y Clave	Localidad	Género
CD-76	Canal Delta. Ejido Nuevo León	<i>Acanthamoeba</i>
CD-11	Canal Delta. Ejido Nuevo León	<i>Acanthamoeba</i>
4abril-22	4 Abril. Ejido Nuevo León	<i>Acanthamoeba</i>
4abril-24	4 Abril. Ejido Nuevo León	<i>Acanthamoeba</i>
4abril-56	4 Abril. Ejido Nuevo León	<i>Naegleria</i>
CRCS2-57	Canal Revolución. Ejido Querétaro Tlaxcala	<i>Naegleria</i>

Las cepas amebianas pertenecientes a los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* se identificaron morfológicamente (Figura 8) y se les realizó las pruebas de: temperatura, patogenicidad y de flagelación (este último solo a las amebas del género *Naegleria*) (Tabla 5).

Tabla 5. Características de las cepas aisladas de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* aisladas. * Temperatura óptima de crecimiento.

Cepa	Prueba de Temperatura (°C) 25, 37 ,42, 45	Prueba de Patogenicidad (-) (+) (intranasal)	Prueba de Flagelación	Diagnóstico morfológico
CD-76	(+)* (+) (-) (-)	-		<i>A. polyphaga</i>
CD-11	(+)* (+) (+) (-)	Invasiva en cerebro		<i>A. rhysodes</i>
4 abril-22	(+)* (+) (-) (-)	-		<i>A. polyphaga</i>
4 abril- 24	(+)* (+) (-) (-)	-		<i>A. astronyxis</i>
4 abril-56	(+) (+)* (-) (-)	invasiva en pulmón	+	<i>Naegleria sp.</i>
CRCS-57	(+) (+)* (-) (-)	-	+	<i>Naegleria sp.</i>

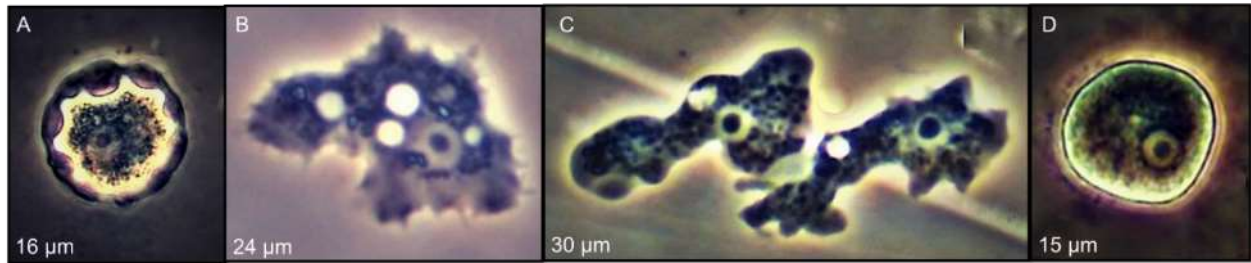


Figura 8. (A), Quiste de *Acanthamoeba rhyssodes*. (B), Trofozoíto de *A. astronyxis*. (C) y (D), Trofozoíto y quiste de *Naegleria sp.* Fotografías tomadas en contraste de fases a 40x.

Prueba de temperatura

La prueba de temperatura revela la tolerancia de los aislamientos amebianos a diferentes temperaturas. Martínez y Janitsschke, (1985) mencionan que “las amebas patógenas son termófilas, pero no todas las amebas termófilas son patógenas”. De las amebas sometidas a diferentes temperaturas, solamente la cepa de *Acanthamoeba* (CD-11) creció a 37°C y a 42°C (Tabla 5). La cepa “4 abril-56” no creció a temperaturas mayores a 37°C. Esto puede deberse a que la cepa estuvo en cultivo varios meses y quizás perdió la capacidad de crecer a esa temperatura, como lo ha propuesto De Jonckheere (1980).

Prueba de patogenicidad

Se aplicó la prueba de patogenicidad a todas las cepas del grupo *Acanthamoeba-Naegleria*, observando y recuperando formas tróficas en cerebro y pulmón de las cepas CD-11 y 4 abril-56 respectivamente después del sacrificio a los 21 días de inoculación, pero no mato a los ratones, sin embargo las cepas son invasivas al ser recuperadas de órganos infectados con estas amebas (Tabla 5).

La cepa CD-11 identificada morfológicamente como *A. rhyssodes* es descrita por Martínez *et al.* (1994) y Page (1988) como una especie que causa EAG en especial en pacientes inmunodeprimidos (Visvesvara *et al*, 2007), fue invasiva en cerebro de un ratón. La cepa 4 abril-56 perteneciente al género *Naegleria* fue invasiva en el pulmón de dos ratones, órgano que puede ser blanco de algunas especies amebianas. Sobre la capacidad de invasividad de las amebas, de acuerdo con Shibayama & Tsutsumi (2013), la invasividad de la amiba *Entamoeba histolytica*

puede deberse a factores como la interacción huésped-hospedero, la capacidad de adherencia del parásito, actividad proteolítica y fagocitosis entre otros factores. Por lo que es posible que algunos de esos factores también ocurran con las amebas de vida libre. Así mismo De Jonckheere (1980) menciona que las cepas tienden a perder virulencia cuando se les mantiene en cultivo axénico durante largo tiempo.

La mayoría de los casos clínicos causados por *N. fowleri* reportados alrededor del mundo, han ocurrido durante el verano, cuando las temperaturas altas favorecen la proliferación y abundancia de las amibas patógenas (Bonilla *et al.*, 2004; De Jonckheere, 2012), mientras que en épocas con menor temperatura como en otoño o invierno, o en cuerpos de agua con temperaturas por abajo de 20°C, los géneros con especies patógenas pueden ser desplazados por otros géneros amebianos que proliferan a estas temperaturas (Bonilla *et al.*, 2014), así mismo pueden estar en estado de enquistamiento para soportar dichas condiciones. Aunque es oportuno mencionar que existen estudios previos que mencionan el aislamiento de *N. fowleri* y otras amibas termófilas en las épocas del año más frías (otoño-invierno) (Sifuentes *et al.*, 2014).

Por otro lado, se obtuvo *A. polyphaga* la cual es una ameba oportunista que puede producir EAG y QA (Martínez & Visvesvara, 1997). Sin embargo, esta cepa resultó ser negativa en la prueba de patogenicidad. Esto puede atribuirse a que con frecuencia las amebas pierden virulencia gradualmente mientras se mantienen en medio axénico (De Jonckheere, 1980). Así mismo, la virulencia de la especie de ameba, dosis infectiva y la respuesta inmune son factores que juegan un papel importante para que haya una invasión infecciosa amebiana (Visvesvara *et al.*, 2007).

Prueba de flagelación

La prueba de flagelación resultó positiva para las cepas 4 abril-56 y CRCS-57, a las cuales se les bajo el nivel de nutrientes, resultando en la presencia de organismos amebo-flagelados alrededor de la media hora posterior al inóculo.

Pruebas moleculares

Las cepas 4 abril-56 y CRCS-57 identificadas morfológicamente como pertenecientes al género *Naegleria*, fueron sometidas a prueba molecular a nivel de género, obteniendo un producto esperado de 410 pb (Figura 9) el cual es característico del género *Naegleria* (Ling-ling *et al.*, 2018), por lo que se confirma la pertenencia de ambos aislamientos al género *Naegleria*.

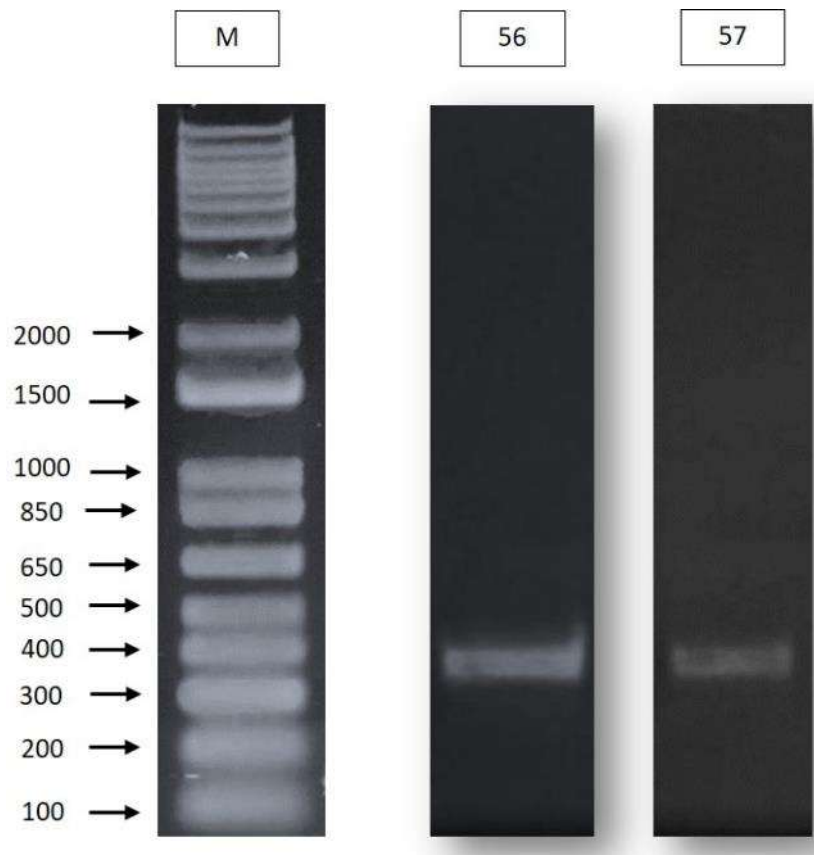


Figura 9. Electroforesis de gel agarosa al 2% de dos productos de PCR para el género *Naegleria*, amplificación de gen 18S ARNr con tiempo de corrimiento de 40 min a 80 mV. Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder.

Los resultados de la secuenciación revelaron que la cepa “CRCS-57” pertenece a la especie *Naegleria clarki* con un 98% de similitud con la especie de referencia. La cepa “4 abril-56” (96%) pertenece a *Naegleria australiensis* la cual es descrita como una especie patógena en ratón (Page, 1988; De Jonckheere, 2012).

Lo que lleva a pensar que el riesgo de contraer MEAP no solo existe durante el verano, que es cuando se registran las temperaturas óptimas para las AVL patógenas, sino también durante las épocas de menor temperatura, ya que como se demuestra con este trabajo, las AVL persisten durante el mes de noviembre a temperaturas más bajas.

Parámetros fisicoquímicos

En la tabla 6 se observan los valores de las pruebas fisicoquímicas, donde el valor promedio de pH fue de 7.5, un valor casi neutro, el cual es un valor adecuado para la proliferación y crecimiento amebiano (Bonilla *et al.*, 2004).

Tabla 6. Valores Fisicoquímicos del agua de los sitios de muestreo.

Zonas de muestreo	pH	Temperatura del agua °C	OD (mg/L)	Conductividad μ S/cm
Canal Delta	7.5	17.0	4.0	1,400
4 de abril	7.5	17.0	4.2	1,500
CRCS2	7.6	17.0	3.8	1,400
PROMEDIO	7.5	17.0	4.0	1,433

Temperatura de agua en los tres canales de riego

Las muestras se tomaron durante el mes de noviembre, es decir, en la temporada fría por lo que la temperatura del agua en promedio fue de 17.0°C, y como está documentado, las amebas patógenas proliferan mejor a temperaturas arriba de 30°C (Rodríguez-Zaragoza *et al.*, 1994; Visvesvara *et al.*, 2007). Probablemente esta es la razón por la que no se identificaron más AVL del grupo potencialmente patógeno. A pesar de esto, se aislaron algunas amebas potencialmente patógenas. Esto puede deberse a la composición de la pared del quiste, el cual contiene carbohidratos como la celulosa. Tales componentes les confieren resistencia ante factores abióticos extremos (Page, 1988; Armstrong, 2000; Bonilla *et al.*, 2004; Castrillón & Orozco, 2013; Samba-Louaka *et al.*, 2019).

Oxígeno disuelto (OD)

Las amebas de vida libre son aerobias, por lo que el OD registrado en los sitios de muestreo es óptimo para el crecimiento amebiano, ya que se registró un valor mayor a 1.0 mg/L (Tabla 6) el cual es suficiente para que puedan proliferar estos organismos (Bonilla *et al.*, 2004).

Conductividad

En México se usa “Solidos Totales Disueltos” como uno de los parámetros para evaluar la calidad del agua potable, la cual permite un valor igual o por debajo de 1000 mg/L (NORMA Mexicana, NMX, 2015, Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-2002). En el presente trabajo se midió “conductividad” para estimar la cantidad de sales disueltas en el agua, el cual tuvo un valor promedio de 1,433 $\mu\text{S/cm}$ (aprox. 860 mg/L de sales disueltas) (Tabla 6). El valor de conductividad obtenido está por encima del rango del agua potable en otros lugares (500 a 800 $\mu\text{S/cm}$,) (Tabla 7) pero ubicándose lejos del valor de conductividad del agua marina que es 56,000 $\mu\text{S/cm}$ (López & Estela, 2011).

Tabla 7. Parámetros de conductividad en diferentes tipos de agua. Tomada de López & Estela, 2011.

TIPO DE AGUA	CONDUCTIVIDAD
Agua ultrapura	0,055 $\mu\text{S/cm}$
Agua destilada	0,5 $\mu\text{S/cm}$
Agua de montaña	1,0 $\mu\text{S/cm}$
Agua potable	500 a 800 $\mu\text{S/cm}$
Agua de mar	56 mS/cm
Agua salobre	100 mS/cm

Sin embargo, estos valores no limitaron la presencia de las amibas potencialmente patógenas ni de los géneros identificados en este trabajo. Así mismo, la salinidad está relacionada con la conductividad debido a que el aumento de iones disueltos en el agua afecta de manera proporcional ambos parámetros. El promedio de salinidad de los canales muestreados, transformados a un valor de porcentaje fue

de 0.0917% (Anexo 4). Lam y colegas en el 2019 mencionaron los valores de salinidad ideales para el crecimiento amebiano y el valor encontrado en los canales se encuentra entre los parámetros adecuados de salinidad para el crecimiento de las amebas (Anexo 5).

CONCLUSIONES

- ◆ Se aislaron e identificaron por métodos morfológicos 13 géneros de amebas de vida libre de tres canales de riego del Valle de Mexicali.
- ◆ Los géneros más frecuentes fueron *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Rosculus* y *Vermamoeba* encontrándose en los tres canales muestreados.
- ◆ La mayor riqueza específica se encontró en el canal Delta – Nuevo León(CD)
- ◆ Los parámetros fisicoquímicos fueron adecuados para el crecimiento de las amebas identificadas.
- ◆ Aunque la temperatura del agua de los canales fue algo baja (17.0°C) se encontró la presencia de amebas del género *Acanthamoeba* y *Naegleria*.
- ◆ De las amibas aisladas de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*, solamente las cepas *Naegleria* (CRCS-57) y *Acanthamoeba* (CD-11) fueron invasivas.
- ◆ Se identificaron las especies *N. clarki* (CRCS-57) y *N. australiensis* (4 abril-56) mediante la prueba molecular de PCR y secuenciación.
- ◆ La presencia de amebas del género *Acanthamoeba* y *Naegleria* tiene importancia médica para la población aledaña debido al riesgo potencial de adquirir alguna enfermedad relacionada con estos organismos, incluso en los meses del año más fríos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adl, S., Bass, D., Lane, E., Lukes, J., Schoch, L., Simimov, A., Sabine, A., Berry, C., Brown, W., Burki, F., Cárgenas, P., Čepička, I., Chistyakova, L., Del Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., James, Y., Karnkowska, A., Karpov, S., Kim, E., Kolisko, M., Kudryavtsev, A., Lahr, D., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D., Mann, D., Massana, R., Mitchell, E., Morrow, C., Park, J., Pawlowski, J., Powell, M., Richter, D., Rueckert, S., Shadwick, L., Shimano, S., Spiegel, F., Torruella, G., Youssef, N., Zlatogursky, V., & Zhang, Q. . (2019). Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(1), 4–119pp.
2. Adl, M., & Gupta, V. (2006). Protists in soil ecology and forest nutrient cycling. *Canadian Journal of Forest Research* 36(7): 1805-1817pp.
3. Andrade, M., Carrasco, M., Ortiz, R., Ibarra, M., Carmona, J., & Bonilla, P. (2015). Amibas de vida libre y potencialmente patógenas de ríos de la Cuenca de México. *Tendencias de investigación en Limnología Tropical*. Págs. 115-122pp.
4. Armstrong, M. (2000). The pathogenesis of human *Acanthamoeba* infection. *Infectious Disease Review* 2:65-73pp.
5. Ávila, I., Rodríguez, M., Infante, D., Llovera, V., Álvarez, O., & Briceño, M. (2006). Amibas de vida libre potencialmente patógenas en aguas del parque “Las Cocuizas”, Maracay, Venezuela. *Revista Cubana Medicina Tropical*, 58(1): 19-24pp.
6. Bonilla-Lemus, P., Caballero, A., Carmona., J., & Lugo, A. (2014). Occurrence of free-living amoebae in streams of the Mexico Basin. *Experimental Parasitology*. 145: S28-S33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.07.001>

7. Bonilla, P., & Ramírez E. (2014). Amibas de vida libre patógenas y oportunistas. En: Parasitología Médica. Becerril M.A. (ed). 4° Edición. McGraw-Hill Interamericana. México. Págs. 31-41pp.
8. Bonilla. P., Ramírez E., Ortíz R., & Eslava C. (2004). La ecología de las amibas de vida libre en ambientes acuáticos. En: Microbiología Ambiental (I. Rosas, A. Cravioto, E. Ezcurra, Eds.). SEMARNAT, INE, PUMA-UNAM, Ciudad de México, pp. 67-81pp.
9. Castillo, D. (2015). Identificación de *Naegleria* sp. de una piscina de aguas termales de Hidalgo. Tesis de licenciatura (Biología). Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.
10. Castrillón, C., & Orozco, P. (2013). *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. Revista Chilena Infectología, 30 (2): 147-155pp.
11. Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J., Tapia-Malagón, J., Pacheco-Yépez, J., Silva-Olivares, A., Galindo-Gómez, S., Tsutsumi, V., & Shibayama, M. (2007). Characterization of *Naegleria fowleri* strains isolated from human cases of primary amoebic meningoencephalitis in México. Revista de Investigación Clínica. 59 (5): 342–347pp.
12. Coronado, G., & López, O. (1980). Análisis Protozoológico de Diez Piscinas localizadas en el Distrito Federal y en el Estado de Morelos México. Revisión Latinoamericana y Microbiología. 22: 157-60pp.
13. Culbertson, C., Smith, J., & Miner, J. (1959). Experimental infection of mice and monkey by *Acanthamoeba*. The American Journal of Pathology 35 (1): 185-197pp.
14. De Jonckheere, J.F. (2012). The impact of man on the occurrence of the pathogenic free-living amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. Future Microbiol. 7 (1), 5-7pp.

15. 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 Environmental Microbiology*. 681-685pp.
16. Fenchel, T. (1987). *Ecology of Protozoa: The biology of free-living phagotrophic protist*. Springer Verlag, Wisconsin. 197p.
17. Fernández, M. (2014). Caracterización molecular de amebas de vida libre e identificación de otros parásitos en aguas de red de la provincia de Zaragoza: asociación con otros microorganismos y riesgos para la salud pública (tesis de doctorado). Universidad de Zaragoza. España.
18. Gelman, B., Rauf, J., Nader, R., Popov, V., Bokowski, J., Chaljub, G., Nauta, H., & Visvesvara, G. (2001). Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *American Medical Association*, 285 (19): 2450 – 2451pp.
19. Guzmán-Fierros, E., De Jonckheere, J., & Lares-Villa, F. (2008). Identificación de especies de *Naegleria* en sitios recreativos de Hornos, Sonora. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 79:1-5pp.
20. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). (2003). Cuaderno estadístico Municipal, México: INEGI.
21. Lam, C., He, L., & Marciano-Cabral, F. (2019). The Effect of Different Environmental Conditions on the Viability of *Naegleria fowleri* Amoebae. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66, 752-756pp.
22. Lares-Jiménez, F., & Lares-Villa, F. (2009). Aislamiento de amebas de vida libre en aguas superficiales del Valle del Mayo, Sonora. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 5 (2): 161-167pp.
23. Lares-Villa, F., De Jonckheere, F., De Moura, H., Rechi-Iruretagoyena, A., Ferreira-Guerrero, E., Fernández-Quintanilla, G., Ruiz-Matus, C., & Visvesvara, S. (1993). Five cases of primary amoebic meningoencephalitis in Mexicali, México: study of the isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 31(3): 685-688pp.

24. Ling-ling, Z., Mao, W., Bang-chuan, H., Hua-liang, C., Jin-Ren, P., Wei, R., & Li-nong, Y. (2018). Identification and Molecular Typing of *Naegleria fowleri* from a Patient of Primary Amebic Meningoencephalitis (PAM) in China. *International Journal of Infectious Diseases*. (72): 28-33 pp.
25. López-Corella, E., De León, B., & De Jonckheere, J.F. (1989). Meningoencefalitis amebiana primaria por *Naegleria fowleri* en un adolescente de Huetamo, Michoacán, México. *Departamento de Patología*. (46) 9: 619-622 pp.
26. López, S., & Estela, M. (2011). Calidad del agua domiciliaria. Experiencia de aprendizaje en el transcurso de un proyecto de investigación: aplicación del método científico. Grupo de Investigación en Ingeniería Sustentable (GIIS). Facultad de Ingeniería. Universidad de Palermo, Buenos Aires, Argentina. p 2.
27. Martínez, A., Guerra, A., García-Tamayo, J., Céspedes, G., Gonzáles-Alfonzo, J., & Visvesvara, G. (1994). Granulomatous amebic encephalitis: A review and report of spontaneous case from Venezuela. *Acta Neuropathologica*. 87: 430-434pp.
28. Martínez, J., & Janitsschke, J. (1985). *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism; a review. *Infection*. 13: 251-256pp.
29. Martínez, A., & Visvesvara, G. (1997). Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathology* 7:583-598pp.
30. NORMA MEXICANA NMX-AA-034-SCFI-2015, Análisis de agua - medición de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas – método de prueba (cancela a la NMX-AA-034-SCFI-2001).
31. NORMA Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010, Requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las albercas, 26 de junio del 2010.
32. Oddó, D. (2006). Infecciones por amebas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, Protozoología y cuadros anátomos-clínicos. *Revista Chilena de Infectología*. 23(3): 200-214pp.

33. Page, F. (1988). A New Key to Freshwater and Soil *Gymnamoebae*. Freshwater Biological Association, Ambleside, UK. 24-120pp.
34. Page, F. (1983). *Marine gymnamoebae*. Cambridge. Institute of Terrestrial Ecology.
35. Page, F., & Willumsen, N. (1983). A light and electron-microscopical study of *Paraflabellula reniformis*, type species of a genus of amoebae (*Amoebida*, *Flabellulidae*) with subpseudopodia. *Protistologica*, 19: 567-575pp.
36. Page, F. (1974). *Rosculus ithacus* Hawes, 1963 (*Amoebida*, *Flabellulidae*), and the amphizoic tendency in amoebae. *Acta Protozool.* 13: 143pp.
37. Page, F. (1969). *Platyamoeba stenopodia* n. g., n, sp., a freshwater Amoeba. *J. Protozool.*, 16: 437-441pp.
38. Page, F. (1967). Taxonomic criteria for limax amoebae, with descriptions of new species of *Hartmannella* and 3 of *Vahlkampfia*. *J. Protozool.*, 14, 499-521pp.
39. Porter, K., Sherr, B., Sherr, M., & Sanders. R. (1985). Protozoa in planktonic food webs. *Journal of Protozoology* 32:409-415pp.
40. Pussard, M. & Pons, R. (1977). Morphologie de la paroi kistique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologia*, 13, 557-598pp.
41. Ramírez, M. (2019). Amebas de vida libre en el canal de riego Revolución en el Ejido Saltillo Mexicali, Baja California Norte (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, FES Iztacala, México.
42. Ramírez, E., Robles, E., Sainz, G., Ayala, R., & Campoy, E. (2009). Calidad microbiológica del acuífero de Zacatepec, Morelos, México. *Revista internacional de Contaminacion Ambiental.* 25 (4):247-255pp.
43. Ramírez, E., Warren, A., Rivera, F., Bonilla, P., Rodríguez, S., Calderón, A., Ortiz, R & Gallegos, E. (1993). An investigation of the pathogenic and non-pathogenic free-living amoebae in an activated sludge plant. *Water, Air, Soil, Poll.* 69: 135-139pp.

44. Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, I., Ramirez, E., Bonilla, P., & Lares, F. (1987). *Amoebae* Isolated from the Atmosphere of México City and Environs. *Environmental Research*. 42: 149-154pp.
45. Rodríguez, E. (1984). Meningoencefalitis por *Naegleria fowleri*. Informe de un caso. Facultad de Medicina, UANL. 263-266pp.
46. Rodríguez, M. 2020. Mapa elaborado con Sistema de Información Geográfica (QGIS), con base de datos INEGI.
47. Rodríguez-Zaragoza, S., Mayzlish, E., & Steinberger, Y. (2005). Seasonal Changes in free-living amoebae species in the root canopy of *Zygophyllum dumosum* in the Negev Desert, Israel. *Microbial Ecology*, 49 (1): 134-141pp.
48. Rodríguez-Zaragoza, S. (1994). Ecology of Free-Living Amoebae. *Crit. Rev. Microbiol.*, 20: 225 -241pp.
49. Samba-Louaka, A., Delafont, V., Rodier, M., Cateau, E & Héchard, Y. (2019). Free-living amoebae and squatters in the wild: ecological and molecular features, *FEMS Microbiology Reviews*. 43 (4): 415–434pp.
50. Seas, C., & Bravo, F. (2006). Encefalitis amebiana granulomatosa por *Balamuthia mandrillaris*: una enfermedad fatal reconocida cada vez más frecuentemente en América Latina. *revista chilena de Infectología*, 23 (3), 197-199pp.
51. Secretaría de Salud. (2002). Salud ambiental. Agua para uso y consume humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo. NOM-230-SSA1-2002. Diario Oficial de la Federación, México. pp. 70-81pp.
52. SEMARNAT., SPA., & UABC. (2011). Programa para mejorar la calidad del aire en Mexicali 2011–2020pp.

53. Sifuentes, L., Choate, B., Gerba, C., & Bright, K. (2014). The occurrence of *Naegleria fowleri* in recreational waters in Arizona. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 49: 1322-1330pp.
54. Shibayama, M., & Tsutsumi. (2013). Patología de la amibiasis: factores y causas. *Revista Ciencia*. Págs. 34-41pp.
55. Singh, B. (1952). Nuclear division in nine species of small free-living amoebae and its bearing on the classification of the order *Amoebida*. *Phil. Trans. R. SOC. (B)*, 236: 405-461pp.
56. Tsvetkova, N., Schild, M., & Panaiotov, S. (2004). The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. 405–413pp.
57. Valenzuela, A., López-Corella, E, & De Jonckheere, J.F. (1984). Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from northwestern México. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 78: 558-559pp.
58. Vargas, A. (2005). Amibas de vida libre patógenas en canales de riego del Valle de Mexicali, Baja California (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, FES Iztacala, México.
59. Vargas-Zepeda, J., Gómez-Alcalá, A., Vásquez-Morales, J., Licea-Amaya, L., De Jonckheere, J., & Lares-Villa, F. (2005). Successful Treatment of *Naegleria fowleri* Meningoencephalitis by Using Intravenous Amphotericin B, Fluconazole and Rifampicin. *Archives of Medical Research*, 36 (1): 83–86pp.
60. Visvesvara, G. (2010). Amebic meningoencephalitides and keratitis: challenges in diagnosis and treatment. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 23 (6), 590 – 594pp.
61. Visvesvara, G., Moura, H., & Schuster, F. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba spp.*, *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria*

fowleri and *Sappinia diploidea*, De Federation of European Microbiological Societies. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 50 (1); 1 – 26pp.

62. ZYMO RESEARCH. INSTRUCTION MANUAL. Quick-g DNA™ MoctoPrep. Catalog Nos. D3020 & D3021.

Páginas web

63. Subsecretaría de Innovación y Modernización de la SPF (2015). Sitio web: http://www.bajacalifornia.gob.mx/portal/nuestro_estado/ubica_geografica.jsp

64. <https://www.lenntech.es/calculadoras/conductividad/conductividad.htm>

ANEXOS

Mezclar todos los ingredientes en seco, agregar 500ml de agua destilada para disolver, agregar agua destilada para completar 1000ml y hervir hasta que todos los componentes estén disueltos en el medio. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente aun estando caliente el medio, se vierten aproximadamente 20 ml de medio en cajas Petri. Una vez que el medio haya solidificado, se vierten 5 gotas de una suspensión concentrada de *Enterobacter aerogenes* previamente inactivada a 68°C durante 60 minutos, distribuyendo homogéneamente la suspensión en la superficie del medio con la ayuda de una varilla en "L" o un asa de siembra. Las cajas se empaquetan y se guardan en refrigeración hasta su uso.

Anexo 1. Agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes* (NNE)

NaCl	0.12 g
MgSO₄-7H₂O	0.004 g
CaCl₂-2H₂O	0.004 g
NaHPO₄	0.142 g
KH₂PO₄	0.136 g
Bactoagar	15.0 g
Agua destilada	1000 ml

En un matraz de 2000 ml se disuelven 20 g de medio bactocasitona en 1000 ml de agua, asegurándose de mezclar los elementos en una solución homogénea. Con la ayuda de un dispensador se reparte la solución agregando 3 ml en tubos de ensayo con tapa rosca. Esterilizar tubos a 121°C durante 15 minutos, dejar enfriar y se guardan en refrigeración hasta su uso.

Anexo 2. Medio de cultivo Bactocasitona (2%)

Bactocasitona	20 g
Agua destilada	1000 ml

En un matraz de 2000 ml mezclar todos los elementos en seco y agregar 1000 ml de agua destilada para disolver por completo todos los elementos en el medio. Verter 3 ml de medio en tubos con tapón rosca y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar y guardar en refrigeración hasta su uso.

Anexo 3. Medio de cultivo Chang.

Peptona Biotriptasa	16.6 g
Dextrosa	2.7 g
Na₂HPO₄	1.5 g
KH₂PO₄	0.9 g
Agua destilada	1000 ml

- $\bar{x} = 1433\mu\text{S/cm}$

- $10000\text{ppm} = 1\% \text{ salinidad}$

- $1\mu\text{S/cm} = .640\text{ppm}$

$$x = \frac{(\mu\text{S/cm}) (\text{ppm})}{\mu\text{S/cm}} \longrightarrow x = \frac{(1,433\mu\text{S/cm}) (.640\text{ppm})}{1\mu\text{S/cm}} = \mathbf{917.12\text{ppm}}$$

$$x = \frac{(\text{ppm})(\% \text{ salinidad})}{\text{ppm}} \longrightarrow x = \frac{(10,000\text{ppm})(1\% \text{ salinidad})}{917.12\text{ppm}} = \mathbf{0.091\% \text{ salinidad}}$$

Anexo 4. Procedimiento para calcular el nivel en promedio de la salinidad en los tres canales de riego, para su comparación con los parámetros de Lam et al., (2019).

El promedio de salinidad (1,433 $\mu\text{S/cm}$) se mide en " $\mu\text{S/cm}$ ". Para pasarlos a la unidad "ppm" se usó el conversor en línea (Lenntech), donde $1\mu\text{S/cm}$ es igual a 0.640ppm. Ya teniendo la equivalencia entre " $\mu\text{S/cm}$ " y "ppm" se calcula cuantas ppm tiene 1,433 $\mu\text{S/cm}$ (promedio obtenido de los tres canales de muestreo) obteniendo un valor de 917.12 ppm, mismo al que se aplica la equivalencia de Lam y colegas (2019) donde 10,000 ppm es igual a 1%salinidad resultando el valor %salinidad.

Anexo 5. ^a Mostly cysts. ^b Mostly nonviable. Tabla de parámetros de salinidad para crecimiento amebiano (Lam *et al.*, 2019). El valor obtenido en este estudio se localiza entre los valores en negritas.

The effect of salinity on survival of <i>Naegleria fowleri</i>				
%	24h	48h	72h	96h
0	Viable	Nonviable	Viable	Viable
0.208	Viable	Nonviable	Viable	Viable
0.307	Viable	Nonviable	Viable ^a	Viable ^a
0.387	Viable	Nonviable ^a	Viable ^a	Viable ^a
0.5	Viable	Nonviable ^a	Viable ^a	Viable ^a
0.585	Viable	Nonviable ^a	Viable ^a	Viable ^a
0.707	Viable	Nonviable ^b	Viable ^b	Viable ^b
0.8	Viable	Nonviable ^b	Nonviable	
1.0	Viable ^b	Nonviable ^b	Nonviable	
1.2	Viable ^b	Nonviable ^b	Nonviable	
1.4	Viable ^b	Nonviable ^b	Nonviable	
1.6	Cysts	Cysts	Nonviable	
1.8	Cysts	Cysts	Nonviable	
2.0	Cysts	Nonviable		
2.2	Cysts	Nonviable		
2.4	Cysts	Nonviable		
2.6	Cysts	Nonviable		
3.0	Nonviable			
3.2	Nonviable			
3.4	Nonviable			
3.6	Nonviable			