

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

Escuela Nacional de Estudios Profesionales

I z t a c a l a

BO 1257/96
g. 2

**Estudio Amebológico de la Atmósfera
de la Ciudad de San Luis Potosí.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

ALEJANDRO MAGAÑA BECERRA

400282



61060



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.

Con agradecimiento y cariño para mis padres y hermanos

Un Especial Agradecimiento

A un Amigo, mi Director de tesis.

M. en C. Salvador Rodríguez Zaragoza.

Gracias por tu apoyo, comprensión y paciencia.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer al equipo de trabajo del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA) el apoyo y colaboración recibidos en el trabajo experimental.

A mis sinodales

A la Dra. Rosario Sanchez Rodríguez.

Dr. Victor Rivera Aguilar.

M. en C. Elizabeth Ramirez Flores.

M. en C. Sergio Vaca Pacheco.

por sus sugerencias e ideas aportadas para mejorar la calidad del presente trabajo.

Al C.C.H. Azcapotzalco por apoyarme en la impresión de esta tesis.

Al SR. Jorge López Yáñez jefe del departamento de impresiones por su apoyo en la impresión final de este trabajo.

Y en general a todos aquellos que indirectamente colaboraron en la realización del presente trabajo.

I N D I C E

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	10
OBJETIVOS	13
MATERIAL Y MÉTODO	14
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFIA	36

RESUMEN

Se aislaron amebas de vida libre (AVL) de la atmósfera de la Ciudad de San Luis Potosí en cuatro estaciones de estudio, para establecer la diversidad, la proporción de amebas patógenas y su correlación con los parámetros meteorológicos.

Las muestras se tomaron con periodicidad mensual, a 2 metros sobre el nivel del suelo con el método "Impinger", de octubre de 1990 a septiembre de 1991. Las cepas se cultivaron en medio Agar no nutritivo con *E. aerogenes* muertas por calor. Las amebas se identificaron por caracteres morfológicos de acuerdo con la clave de Page. Las cepas del género *Acanthamoeba* se cultivaron en medio axénico para realizar las pruebas de patogenicidad por vía intracerebral e intranasal en ratones.

Las cepas obtenidas sumaron 53 en total, las cuales se encuentran distribuidas en 10 géneros. De estos *Acanthamoeba* presentó la mayor diversidad con 13 especies, las cuales aparecieron en cada una de las estaciones muestreadas predominado en la época de sequía. Le siguieron en número los géneros *Hartmannella* y *Vahlkampfia* con 4 y 3 especies respectivamente, sin preferencia de aparición por una época del año en particular.

La zona urbana tuvo el mayor número de aislamientos con 23 cepas, de las cuales *A. griffini* fue la única especie patógena. La zona suburbana con 17 aislamientos presentó 3 cepas no patógenas con capacidad invasiva, en la zona centro-urbana resultó sólo una cepa con capacidad invasiva de las 9 aisladas, lo mismo que en la zona rural donde hubo 4 aislamientos.

La velocidad del viento y la evaporación correlacionaron positivamente con la presencia de amebas en el aire.

La abundancia y diversidad de amebas de la atmósfera de la Ciudad de San Luis Potosí, son el resultado de factores favorables en la resuspensión y condiciones ambientales específicos de cada zona de estudio.

INTRODUCCION

En el pasado, la observación de los microorganismos en la atmósfera fueron motivados por curiosidad, relacionados con la manera como se transmiten las enfermedades por el aire y el ciclo de vida en el planeta. Actualmente se conocen otros aspectos de gran importancia como la dinámica de las enfermedades en plantas y animales, en el presente se evalúan las cargas microbianas atmosféricas que puedan determinar los niveles de contaminación microbiana en el aire, por lo que se han desarrollado instrumentos que detectan los microbios de la atmósfera. Las fuentes de los microorganismos pueden ser de origen natural ó agentes antropogénicos. Estos estudios han permitido el control de los agentes de la peste microbiológica y la guerra de los agentes biológicos (Lighthart y Shaffer, 1995).

Los aerosoles biológicos se dispersan naturalmente por la tos, el estornudo, el aire y la acción agitada del viento sobre la superficie del agua donde la materia microbiológica está presente. Los aerosoles también se producen por medios antropogénicos, incluyendo el reciclado de aguas residuales por irrigación en aerosol (Moore *et al.*, 1979), torres de enfriamiento y procesos de tratamiento que incluyen sistemas por filtros percoladores y los lodos activados (Adams *et al.*, 1979; Fannin *et al.*, 1976). Los aerosoles microbianos estan siendo generados por el hombre para controlar insectos y microorganismos, el daño por heladas a las plantas y el clima (las bacterias suelen incrementar la producción de nieve) (Mohr, 1991). La distribución espacial de bacterias en el aire esta relacionada con las masas de aire frontal, la actividad urbana y la altitud. Imshenetsky *et al.*, (1978) aislaron varios miles de bacterias por m³ de 60 a 70 km sobre la superficie de la tierra. También se ha calculado que un individuo puede inhalar alrededor de 50 µg de microorganismos cada 24 horas (Gregory, 1971 citado por Nicholson, 1988).

La infección por aerosoles representa potencialmente un peligro para un sinnúmero de individuos, así como para productos de importancia agrícola, plantas y animales (Edmonds, 1979). Representantes de diferentes clases de virus, bacterias, rickettsias, mohos y hongos son capaces de iniciar una enfermedad de consecuencias de gran impacto para la población. La epidemia de la plaga del maíz causada por esporas aerotransportadas de *Helminthosporim maydis* en los Estados Unidos en 1970, fué la causa del 15% de las perdidas (Edmonds, 1979). De la epidemia de la influenza de

1918 - 1919 resultaron 550,000 muertes tan solo en los Estados Unidos y 20 millones de muertes ocurridas en total. Los estreptococos de la infección son dispersados por el viento hasta varios cientos de kilómetros bajo ciertas condiciones (Edmonds, 1979).

Muchas infecciones de microorganismos resultan poco interesantes para los aerobiólogos debido a la pobre estabilidad del aerosol y consecuentemente su rápido proceso de extinción. Cuando se están evaluando los posibles efectos de las infecciones de los microorganismos aerosolizados sobre la salud, es sumamente importante determinar las características de sobrevivencia bajo diferentes condiciones ambientales (Mohr, 1991).

Las partículas viables importantes en aerobiología incluyen a los granos de polen, esporas de hongos, las células de algas microscópicas, las células bacterianas suspendidas, los virus y los protozoos (Smith, 1976; Schlichting, 1986). Todos ellos en sus formas de resistencia debido a los bajos niveles de agua y de nutrientes que hay en la atmósfera, aunque rara vez se encuentran en su forma activa pues mueren en poco tiempo, a menos que estén protegidos de las radiaciones U.V. y de la desecación (Campbell, 1987).

Por lo general, los microorganismos se encuentran en el aire en cantidades pequeñas en comparación con el suelo o el agua.

Por cada gramo de suelo agrícola (en peso seco), existen millones de bacterias, cientos de miles de propágulos de hongos, y decenas de miles de protozoos y algas (Campbell, 1987). Las amebas de vida libre (AVL) por sus características son consideradas como los más importantes depredadores de bacterias en el suelo (Singh, 1975). Se ha calculado que los protozoos consumen de 150 a 190 gramos de bacterias por metro cuadrado y por año (Stout y Heal, 1976), lo que pone de manifiesto la importancia de la depredación hecha por los protozoos como un mecanismo de liberación de nutrientes (Stout, 1973). La densidad de las presas limita el crecimiento constante de las amebas. Estas responden a los descensos en el número de sus presas enquistándose, lo que les permite sobrevivir a la falta de alimento, a las sequías y a los cambios bruscos en las condiciones del suelo (Anderson, 1988). Se ha hecho la estimación de que las gimnamebas (amebas desnudas) comprenden del 50 al 90% de los protozoos de la hojarasca y del volumen del suelo (Bamforth, 1980). Las amebas del género *Acanthamoeba* son las de mayor abundancia en este medio (Singh, 1975) y en el aire (Rivera *et al.*, 1991a). Lo anterior tiene importancia porque a este género

pertenecen el mayor número de cepas patógenas oportunistas, algunas de las cuales se han aislado incluso del aire de la Ciudad de México (Rivera *et al.*, 1988, 1991a; Martínez, 1991).

El hecho de que existan tantas especies patógenas de este género podría explicarse por su gran resistencia a los factores adversos que aniquilan a las demás. Estas amebas sólo invaden a un organismo cuando éste está inmunodeprimido, es decir indefenso o debilitado. De hecho, para que se desarrolle un caso de encefalitis amibiana granulomatosa (**EAG**), es necesario que el hospedero tenga sus defensas muy bajas (Martínez, 1991).

Cualesquiera que sean los factores que definen la ecología de las amebas de vida libre patógenas y la epidemiología de la **MEAP**, éstos incluyen la tolerancia a las temperaturas altas, (mayores de 37°C) a las variaciones de pH, a los niveles de O₂ disponible, a la competencia con otras amebas y con los hongos, así como con otros factores orgánicos e inorgánicos que constituyen su hábitat (Schuster, 1979).

En general, las especies patógenas de *Naegleria* y *Acanthamoeba* son tolerantes a temperaturas mayores de 37°C y menores de 50 C, aunque no todas las termotolerantes son patógenas. Las Naeglerias patógenas se han aislado de aguas térmicamente contaminadas por industrias o por actividades geotérmicas. *N. fowleri* es causante de la meningoencefalitis en humanos. La mayoría de los casos están asociados con nadadores y la infección ocurre cuando la mucosa nasal se expone a agua contaminada por trofozoitos de esta especie. Un punto determinante en las invasiones de las especies de *Naegleria* es su habilidad en la locomoción (Thong y Ferrante, 1986).

El aire es el medio de transporte más importante para los microbios, a través de él se contaminan los depósitos de agua (Rivera *et al.*, 1986b, 1988, 1989), los alimentos, e incluso los mismos seres humanos pueden ser colonizados por amebas transportadas por el aire y en tolveneras (Rivera *et al.*, 1989, 1991a; Mergeryan, 1989). Las amebas de vida libre se distribuyen por todo el mundo, se encuentran en las más diversas regiones y en multitud de microhábitats. Entre los más comunes están la atmósfera, la región de la rizosfera, la filosfera, el suelo, las partículas suspendidas en el agua, sobre los hongos, en las cavidades de animales superiores e incluso en la región nasobucofaringea de los seres humanos (Rodríguez, 1994).

Muchos microorganismos no tienen medios propios para incorporarse al aire, los del suelo

llegan a la atmósfera adheridos a partículas de polvo, el aerosol marino contiene muchos microorganismos y las actividades humanas acentúan los mecanismos pasivos de inyección a la atmósfera porque crean turbulencias, perturban el suelo y destruyen la vegetación.

Los lagos y los océanos son fuentes generadoras de aerosoles, tanto viables como no viables. Los fenómenos que los producen son la impactación del agua sobre un cuerpo sólido, el rompimiento de las burbujas y el choque entre el agua y el aire cuando este último está en movimiento. El fenómeno de rompimiento de las olas del océano es uno de los principales métodos de formación de los aerosoles (Nicholson, 1988).

En el caso del suelo existen tres mecanismos reconocidos de suspensión de partículas, la suspensión, la formación de crestas y el salto. La suspensión es el proceso que arrastra a las partículas de tamaños menores de 10 μm hacia la atmósfera. La formación de crestas ocurre cuando las partículas ruedan o se arrastran por la superficie y su tamaño se asocia al intervalo de 500 a 1000 μm . Las partículas menores de 100 μm son suspendidas por el viento y las más pequeñas (< 10) pueden suspenderse por un tiempo considerable. El tercer fenómeno se refiere a los saltos de las partículas suspendidas de 100 a 500 μm , las que son arrojadas casi verticalmente dentro del aire (Nicholson, 1988).

La agitación mecánica también induce a la resuspensión y se puede explicar por el impulso impartido sobre el material depositado. Por otra parte, las gotas de lluvia también provocan la resuspensión de las partículas y la formación de aerosoles del suelo y de la vegetación (Nicholson, 1988).

El paso de vehículos por un camino puede hacer que el material superficial se resuspenda debido a la turbulencia inducida o por compartir la tensión. Un mecanismo adicional que puede ser importante en condiciones de sequía es la eyección de gotitas de aerosol (Jones *et al.*, 1982 ; Nicholson 1988).

La estancia de las amebas en el aire depende por entero del movimiento de la atmósfera, de su tamaño, de su densidad, de su forma y de la altura a la que haya llegado. Por eso, la incorporación de las amebas al aire, su transporte y hasta su retiro no depende de ellas, sino de la dinámica atmosférica (Rodríguez, 1994).

En su forma de quiste, las AVL pueden ser acarreadas hacia el aire mediante corrientes de

convección, sistemas frontales, turbulencias o burbujas adiabáticas de aire. El tiempo y la distancia a la que pueden transportarse depende de la altura a la que haya llegado y del tamaño que posean. En general, las partículas de un diámetro mayor de 20 μm sedimentan casi de inmediato y su área de distribución es aproximadamente de 100 m, mientras que las partículas de 10 a 20 μm pueden permanecer por un tiempo mayor y dispersarse más ampliamente. Esto depende de las condiciones atmosféricas presentes en el momento en que los quistes ingresan al aire, así como el tiempo de permanencia de la partícula. Lo anterior tiene importancia porque la mayoría de las especies de AVL tienen tamaños que se distribuyen en el intervalo de 6 μm a 15 μm . Se ha calculado que la residencia promedio de estas partículas en la tropósfera baja (de 5 a 100) es de 4 horas a 2 días, en la tropósfera alta es de una semana a un mes, en la estratósfera baja es de uno a cuatro meses y en la estratósfera alta es de 6 meses a un año. Por lo cual, la distancia a la que se dispersen dependerá de la altitud a la que hayan llegado y de la dinámica atmosférica que se desarrolle en tales estratos (Schlesinger, 1979).

Los fenómenos que intervienen en el retiro de las partículas viables del aire son la sedimentación, la impactación en superficies duras y blandas, la formación de burbujas de aire en calma (deposición seca), la precipitación pluvial (deposición húmeda) y la interceptación (Overrein, *et al.*, 1981). La lluvia puede lavar las partículas viables de la atmósfera, pero también puede resuspenderlas en los primeros 4 - 5 m sobre el nivel del suelo, por lo que no es un mecanismo muy eficiente de retiro, sobre todo si se trata de una lluvia torrencial. La impactación en superficies duras y lisas (como los vidrios, los metales etc.) trae como consecuencia la probable destrucción de los organismos por el efecto del impacto. Las superficies blandas proveen un soporte de amortiguamiento que permite la sobrevivencia y la posterior reactivación fisiológica (como sería en el caso del choque con el agua, con la piel de algunos vertebrados, con superficies vegetales, etc). La sedimentación es un proceso que tiene que ver con la fuerza del movimiento del aire, el tamaño y la densidad del organismo, pues cuando el aire pierde fuerza, las partículas de mayor peso bajan inmediatamente y las otras lo van haciendo a una velocidad que va de acuerdo a su tamaño, su forma y su densidad, hasta quedar depositadas en alguna superficie. La interceptación es un proceso similar a la impactación, pero la diferencia está en que en la primera el objeto que recibe a la partícula está en movimiento, por lo que la intercepta, mientras que en la impactación el objeto está

estacionado (Overrein *et al.*, 1981).

Generalmente los factores que están influyendo en la estabilidad del aerosol incluyen propiedades físicas y químicas del aerosol, las condiciones del medio donde está expuesto el aerosol y la composición biológica de los microorganismos (Mohr, 1991).

Al incorporarse al aire, las amebas interactúan con los componentes de éste como cualquier otra partícula suspendida. El deterioro o reforzamiento de la sobrevivencia en el aire, depende del tipo y de las mezclas de fluidos suspendidos (Webb, 1965 citado por Edmonds, 1979).

Los hidrocarburos y los compuestos orgánicos en general son los contaminantes más peligrosos para la salud humana, al mismo tiempo son los que revisten la mayor importancia para el estudio de los microorganismos transportados por el aire. Los principales contaminantes que afectan a los microbios son variados y se presentan en forma de gases y de aerosoles.

Cox (1987), Strange y Cox (1976), y Spendlove y Fannin (1982) han escrito en diferentes artículos sobre la influencia de los contaminantes, las variaciones de presión y la proporción de aerosoles microbianos inactivados que se pueden presentar por estación. Entre los contaminantes atmosféricos que más han sido estudiados sobre la estabilidad de los microorganismos se encuentran el dióxido de nitrógeno (NO_2), el dióxido de azufre (SO_2), y el ozono (O_3). Las respuestas de los microorganismos a los contaminantes de la atmósfera están regulados por factores externos a ellos como la luz, la temperatura, la humedad, el viento, la precipitación, la edad y la condición de los hospederos, la infección y la depredación (Smith 1976). Los efectos causados por los contaminantes están enormemente influidos por la humedad relativa. La viabilidad de algunos microorganismos se ve sumamente afectada por un alto nivel de humedad relativa, mientras que en otros la viabilidad se ve favorecida. Cox (1968) mostró que la estabilidad de *E. coli* B aerosolizada en la atmósfera que contiene gases inertes está en función de la humedad relativa. Algunos contaminantes reaccionan con el agua para formar ácidos (Ehrlich y Miller, 1971), y el pH del medio ambiente juega un papel en la producción de ácidos y por lo tanto en la inactivación de los microorganismos aerosolizados.

Entre los parámetros meteorológicos importantes en la determinación de la sobrevivencia de los organismos del aerosol, en orden decreciente de importancia se encuentran: la humedad relativa, la temperatura, la concentración de oxígeno y de radicales libres, la radiación

electromagnética y el factor del aire libre.

Humedad Relativa

Los efectos de la HR pueden ser influenciados por el contenido de los fluidos suspendidos usados para la aerosolización (Barlow, 1972 citado por Morh 1991), el contenido de fluidos colectados y la prehumidificación (Warren *et al.*, 1969 citado por Morh 1991). Para algunos organismos aerosolizados las variaciones en la HR producen efectos más profundos en la estabilidad del aerosol que cuando la HR es constante.

Temperatura

Los estudios realizados sobre los efectos de la temperatura sobre la estabilidad del aerosol, han mostrado que al incrementarse ésta, tiende a disminuir la viabilidad de los microorganismos aerotransportados.

Concentración de Oxígeno

El oxígeno tiene efectos en la estabilidad del aerosol y en la capacidad de infección de algunas bacterias (Cox *et al.*, 1973). Los radicales libres del oxígeno han sido sugeridos como la causa de esta inactivación (Cox, 1987).

Radiación Electromagnética

Se ha demostrado que la inactivación de los aerosoles por la Radiación Electromagnética depende de la longitud de onda y por lo tanto de la intensidad de la radiación. Las longitudes de onda más cortas contienen más energía y generalmente son mayores los efectos en los microorganismos aerosolizados (Cox, 1987).

Factor del Aire Libre

El "Factor del Aire Libre" está compuesto, muy probablemente, por los contaminantes químicos de la atmósfera como HCOH, CO, HCL, HF, C₂H₂, C₂H₄ y C₂H₆. A este fenómeno se le atribuye la pérdida nocturna de la viabilidad de los organismos del aire (Cox, 1987).

Aparte de los efectos de los compuestos químicos de la atmósfera, los organismos aerotransportados están expuestos a otros peligros de carácter físico como la luz, la desecación y la destrucción por impacto. La luz tiene un efecto directo sobre el incremento de la temperatura, pero éste no es el principal peligro, sino el que representa la exposición de los organismos a los

rayos ultravioleta (Schlichting, 1964).

El enquistamiento es la manera como las amebas responden a cualquier variación ambiental que amenace su existencia. De esta forma, pueden sobrevivir a las sequías, a los cambios de pH, a la falta casi total de oxígeno y a la escasez de alimento. En su forma de quiste, las AVL pueden ser acarreadas hacia el aire y de ahí pueden entrar fácilmente al sistema respiratorio.

Debido a la diversidad de enfermedades que son el producto de los organismos aerotransportados y al poco conocimiento que se tiene sobre su dinámica infecciosa, resulta importante definir y explicar los distintos parámetros que influyen en la estabilidad y sobrevivencia de los microorganismos aerolizados.

San Luis Potosí es una ciudad con un importante desarrollo urbano, un rápido crecimiento demográfico y con problemas de contaminación parecidos a los de la ciudad de México, lo cual nos podría servir para comparar los resultados de los dos estudios y establecer las similitudes, así como las diferencias con respecto a la diversidad y número de amebas en la atmósfera, con especial atención en las amebas patógenas o con capacidad invasiva.

ANTECEDENTES

El estudio sobre las poblaciones microbianas que se encuentran en el aire cobró auge a mediados del siglo XIX durante la controversia acerca de la generación espontánea y la manera como se transmiten las enfermedades contagiosas. Durante esta época se realizaron varias investigaciones que pueden considerarse como fundamentales en el desarrollo de la microbiología y fueron pioneras en el campo de la aerobiología, como las llevadas a cabo por Spallanzani (1776), Pasteur (1860), Pouchet (1860) y Maddox (1870), (citados por Edmonds, 1979) y Koch, 1876 (citado por Brock 1978).

El químico francés Louis Pasteur, el oponente más poderoso de la generación espontánea, mostró primero que en el aire estaban presentes estructuras que se parecían mucho a los microorganismos vistos en materiales en putrefacción. Para ello hizo pasar aire a través de filtros de algodón, cuyas fibras detienen las partículas sólidas. Después de que el algodón se disolvía en una mezcla de alcohol y éter, las partículas que había atrapado caían en el fondo del líquido y eran examinados con el microscopio. Pasteur encontró que en el aire ordinario existen siempre diversas estructuras sólidas de tamaños microscópicos y que se depositan constantemente sobre todos los objetos (Brock, 1978).

Koch en 1876 observó que cuando una superficie nutritiva sólida tal como una rodaja de patata es expuesta al aire y después incubada, se desarrollan sobre ella colonias bacterianas que tienen, cada una, forma y color característicos. Koch infirió que cada colonia se había originado a partir de una sola célula bacteriana que había caído sobre la superficie, encontrado nutrientes adecuados y comenzado a multiplicarse. A pesar de que han transcurrido muchos años desde estos primeros trabajos, las investigaciones acerca de la dinámica de transporte y sobrevivencia de los microorganismos del aire y en especial de los protozoarios y sus posibles efectos sobre otros seres vivos continúan siendo limitados (Brock, 1978).

En 1837 se mostró por primera vez la presencia de microorganismos en la atmósfera, al encontrarse como la causa de la fermentación y putrefacción de materiales estériles (Schwann, 1837 citado por Lighthart, 1995). Otras investigaciones han mostrado la universalidad de los microorganismos en la atmósfera (Tindall, 1876 citado por Lighthart, 1995). Charles Lindbergh, (1933 citado por Lighthart, 1995) descubrió microorganismos en el aire lejos de la superficie del

mar, al tomar muestras desde un avión al pasar sobre el Océano Atlántico y el mar Caribe..

La aerobiología es una disciplina relativamente nueva que incorpora los campos de la microbiología, la meteorología, la ingeniería y la física de los aerosoles. Los aerosoles biológicos no fueron reconocidos como fuentes de enfermedades hasta principios de los años 30 y no fue sino hasta el desarrollo de la generación militar y los métodos de muestreo de la segunda Guerra Mundial que la naturaleza de la expansión de los aerosoles de infección comenzó a ser comprendida (Mohr, 1991). No se conocía la expansión por aerosoles del virus de la rabia hasta finales de los años 60's. Sólo recientemente se ha determinado que la concentración de oxígeno y la prehumidificación del muestreo pueden tener un impacto significativo sobre la estabilidad total de los aerosoles microbianos (Cox, 1966; Hatch y Warren, 1969). La aerobiología fue considerada como una disciplina científica en 1930, los trabajos se enfocaron sobre los procesos de suspensión, distribución e inactivación de los aerosoles. Beebe, (1959 citado por Mohr, 1991) presentó datos que muestran que *Francisella tularensis* es inactivada por la radiación U.V. dependiendo de la longitud de onda (intensidad) y la humedad relativa. Hemmes *et al.*, (1960 citado por Mohr 1991) reportaron que la humedad relativa baja en invierno favorece la permanencia de los virus de la influenza, mientras que en el virus de la polio la sobrevivencia se realiza en el verano cuando la humedad relativa es mayor. Se estudiaron los efectos de los iones en el aire sobre la estabilidad del aerosol para *Staphylococcus aureus* y se observó que la estabilidad aumenta al doble con iones positivos en el aire, y alrededor de tres veces con iones negativos. Así Buckland y Tyrrel, en 1964 especularon que la sobrevivencia de los virus en aerosoles está fuertemente relacionada con el aumento de lípidos en la cápsula. Cox *et al.* (1974) determinaron que la inactivación de *Serratia marcescens* por oxígeno es proporcional a la concentración de éste elemento y al tiempo de exposición. Druett, (1973 citado por Mohr, 1991) establece que *Staphylococcus aureus* muy sensible a las pequeñas variaciones de presión del aire. Romney y Wallace, (1977 citado por Nicholson, 1988) concluyeron que la contaminación foliar se debe a la depositación de partículas resuspendidas. Lassey, (1980 citado por Nicholson, 1988) sugiere que la inhalación de partículas resuspendidas en las primeras semanas posteriores a un evento contaminante, podría ser al menos tan importante como la inhalación directa de la nube de contaminantes.

Durante mucho tiempo se pensó en el estudio de las amebas de vida libre como una

curiosidad científica, hasta que se corroboró su capacidad de desarrollar enfermedades en los seres humanos (Martínez, 1991). Algunas amebas de vida libre son agentes patógenos que pueden causar enfermedades en el ser humano tales como queratitis amebiana (Kilvington *et al.*, 1990), meningoencefalitis amebiana primaria (**MAP**) o la encefalitis amebiana granulomatosa (**EAG**) (Martínez, 1985), e inclusive instalarse en quemaduras infectadas y en la nariz (Rivera *et al.*, 1989). Martínez y De Jonckheere (1981), discutieron en especial el caso de la posible infección aérea por *Naegleria fowleri* en un joven nigeriano, al que le produjo la muerte por meningoencefalitis amebiana primaria (**MAP**). Entre los trabajos más importantes sobre las amebas de vida libre (AVL) pueden citarse los de Pushkarew, (1913 citado en Rodríguez 1994), Stevenson y Collier, (1962 citado por Edmonds 1979). Miquel en 1883, encontró un quiste de protozoarios por cada 10m³ de aire muestreado; Puschkarew en 1913, Hyman (1940) y Maguire, (1963) (citados por Edmonds 1979), reportaron protozoarios de la atmósfera y de agua de lluvia. Schlichting (1961, 1964 y 1969) realizó diversos trabajos, todos ellos relacionados con la presencia, dispersión, viabilidad y sedimentación de los protozoarios de la atmósfera; así como la implementación de muestreadores y técnicas de muestreo. Smith (1973) observó que la velocidad y la dirección del viento, la precipitación pluvial y el punto de condensación del rocío son los parámetros que afectan el número de protozoarios aislados del aire.

Rivera *et al.*, (1986) realizaron un análisis de las amebas de vida libre (AVL) aislada del sur de la Ciudad de México. Estableciendo que el género *Acanthamoeba* es el más abundante en el aire, seguido de *Vahlkampfia*, *Harmannella* y *Naegleria* en orden descendente. A partir de este trabajo se ve la necesidad de realizar más estudios que determinen la capacidad de sobrevivencia de amebas de vida libre patógenas acrotransportadas en ambientes contaminados.

El estudio más reciente sobre las amebas de vida libre de la atmósfera de la Ciudad de México es una tesis de licenciatura (Hernández, 1991), realizada en el Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA) de la ENEP-Iztacala.

Entre las conclusiones obtenidas, se menciona al género *Acanthamoeba* como el más representativo de las zonas estudiadas, la presencia de amebas patógenas en cada una de las zonas muestreadas y a la especie *Acanthamoeba polyphaga* como la de mayor número de cepas patógenas o con capacidad invasiva.

OBJETIVOS

- 1) Determinar las especies presentes en cada una de las zonas de muestreo de la atmósfera de la Ciudad de San Luis Potosí.
- 2) Determinar la diversidad y proporción de especies de *Acanthamoeba* patógenas de cada zona de estudio.
- 3) Correlacionar el número de especies encontradas con los parámetros meteorológicos.
- 4) Establecer el grado de similitud entre las estaciones muestreadas.

M A T E R I A L Y M E T O D O

A).Ubicación geográfica del área de estudio.Geograficamente el estado de San Luis Potosí se encuentra al norte a 24°32', al sur a 21°10' de latitud norte; al este a 98°20', y al oeste 102°18' de longitud oeste.

El Estado de San Luis Potosí representa el 3.2% de la superficie del país, se sitúa en la zona norte de la República Mexicana, colinda al norte y al noreste con Nuevo León, al sur con Guanajuato y Querétaro, al sureste con Hidalgo, al este con Tamaulipas y Veracruz y al noroeste con Zacatecas.

El área de estudio pertenece al municipio y cabecera municipal de San Luis Potosí, ubicada a 22°09' latitud norte y 100°59'longitud oeste, su altitud es de 1860 msnm, presenta un clima seco templado (BSk) que ocupa en general el 28.59% de la superficie estatal. Su temperatura media anual es de 18.0°C y su precipitación media anual es de 337.5 mm.

B):Ubicación de las estaciones de muestreo.1)Zona Urbana - Localizada al sur de la ciudad (Colegio Cervantes) se ubica a 22°08'17"latitud norte y 100°58'38" longitud oeste, su altitud es de 1870 msnm.

2)Zona Suburbana - Localizada al oeste de la ciudad (Parque de la Minera Morales) se ubica a 22°09'56" latitud norte y 10°59'42"longitud oeste, su altitud es de 1870 msnm.

3)Zona Urbana - Localizada en el centro de la ciudad (Plaza el Carmen) se ubica a 22°09'latitud norte y 100°58'22" longitud oeste, su altitud es de 1860 msnm.

4)Zona Rural - Localizada a 9 km al noreste de la ciudad (Escuela de Agricultura) se ubica a 22°10'16" latitud norte y 100°57'45"longitud oeste, su altitud es de 1860 msnm (Mapa 1).

C):Recolección de muestras. La recolección de las muestras se realizó en la atmósfera de la ciudad de San Luis Potosí en cuatro estaciones diferentes: (fig.1)

1) Zona Rural - Localizada a 9 km al noroeste de la ciudad (Escuela de Agricultura).

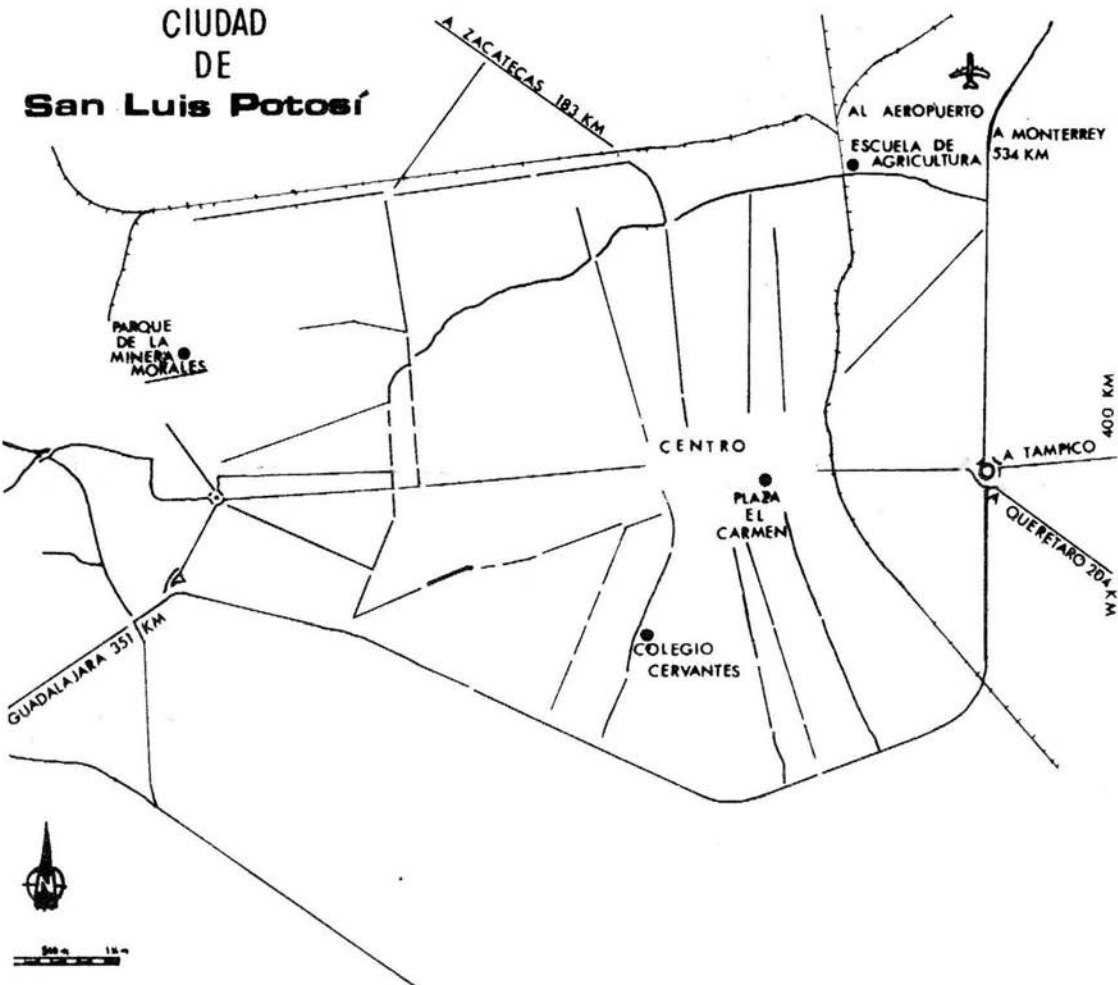
2) Zona Suburbana - Localizada al oeste de la ciudad (Parque de la Minera Morales).

3) Zona Urbana - Localizada al sur de la ciudad (Colegio Cervantes).

4) Zona Urbana - Localizada en el centro de la ciudad (Plaza el Carmen).

Las dos estaciones urbanas presentaron un plano de urbanización diferente, en la plaza El

CIUDAD DE San Luis Potosí



MAPA.1 Ubicación de las Estaciones de Muestreo

Carmen existe pavimentación, jardines, drenaje, amplio tránsito vehicular y peatonal, sin basura en los alrededores. En el Colegio Cervantes el panorama es muy similar dentro de la escuela, pero ésta carece de pavimentación a menos de 100 m de la estación de muestreo y en las calles aledañas hubo encharcamientos y basura.

La zona suburbana (Mínera Morales) contaba con drenaje pero carecía de pavimentación, jardines cercanos y recolector de basura. La zona rural (Escuela de Agricultura) se encontraba en medio de una estación meteorológica a 9 km de la ciudad, donde no hubo pavimentación, pero tampoco hubo basura.

Las muestras se recolectaron cada mes durante un año de muestreo, el cual comprendió de octubre de 1990 a septiembre de 1991. Los muestreos se llevaron a cabo a 2 m sobre el nivel del suelo, se burbujearon 1070 l de aire en un matraz con 50 ml de solución salina isotónica esterilizada de Bold durante 1 hora. Esta solución sirve como medio de transporte de las amebas (Rivera *et al.*, 1991b). Se utilizó una bomba de succión en vacío de 1/2 caballo (HP) conectada a un rotámetro para controlar el flujo, y a un matraz trampa de 250 ml, previamente esterilizado y tapado con aluminio (fig 2). El muestreo se realizó en todas las ocasiones alrededor de las 9 am en las cuatro estaciones. Después las muestras se dejaron reposar durante 7 días a temperatura ambiente para favorecer la rehidratación de los quistes (Rivera *et al.*, 1987, 1991b).

D):Cultivo de recuperación. Transcurrido el tiempo mencionado, las muestras se concentraron por centrifugación a 2,500 r.p.m. durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 2ml, de los cuales se sembró 1 ml en placas de agar no nutritivo con *E.aerogenes*, muertas por calor (NNE) para determinar la presencia de AVL. Estas placas se incubaron a 37°C, durante 15 ó 20 días y se revisaron con el microscopio invertido cada 24 horas para detectar el inicio del crecimiento de las colonias amebianas.

E):Cultivo monoxénico. La propagación de las amebas se realizó en cultivo monoxénico, en agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes* muertas por calor (NNE). En condiciones de esterilidad, se tomaron bloques de aproximadamente 1 cm² de los cultivos con colonias bien desarrolladas para transferirlas a nuevas cajas con (NNE) o a medio PBSGyE para axenizar las cepas. Cada caja o tubo se rotuló con la nomenclatura correspondiente, anotando claramente la fecha de resiembra. Las cajas nuevas se colocaron en forma invertida en bolsas de plástico y se

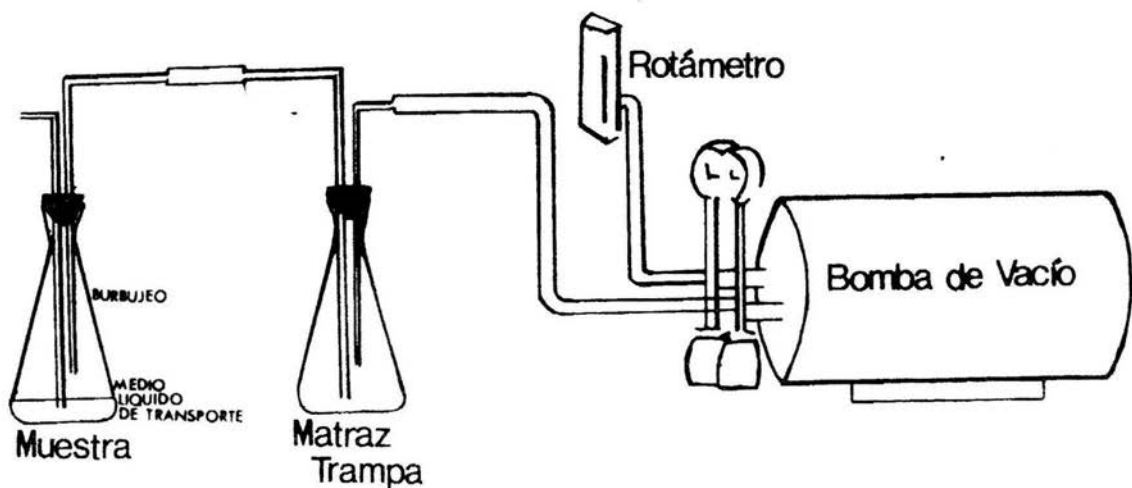


Diagrama 1. Esquema del Impinger para muestreo de protozoos de la Atmósfera (Rivera et al., 1991)

mantuvieron en la estufa bacteriológica a 37°C, observándolas durante los siguientes 4 días para corroborar que estaban creciendo bien y que no se habían contaminado por hongos. Mientras el cultivo duro viable (un mes aproximadamente) se usaron las resiembras para el diagnóstico morfológico, las pruebas de flagelación, las pruebas de crecimiento a distintas temperaturas 30,37,42 y 45°C; así como para las pruebas de axenización.

Para las pruebas de flagelación, se colocaron bloques de 1cm² de agar con trofozoitos en tubos con agua destilada, estos se incubaron por varias horas a 37°C. Cada hora se observó al microscopio invertido para verificar la transformación ameboflagelar.

F): Cultivo axénico. Las cepas con un buen crecimiento se mantuvieron en medio axénico. La axenización consiste en hacer crecer las cepas amebianas en un medio sin la presencia de algún otro microorganismo (bacterias o levaduras), hasta obtener la cantidad suficiente para realizar las pruebas de patogenicidad en ratones (Rivera *et al.*, 1991b).

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento axénico de las amebas de vida libre fueron el PBGSGYE (BIOXON), que contiene Peptona-Biotriptasa, glucosa, suero bovino y extracto de levadura (Rivera *et al.*, 1987), la Bactocasitona (BCS) al 2%; el medio de infusión cerebro-corazón y el de extracto de hígado. En terminos generales, estos medios consisten de una fuente de carbono, péptida, sales minerales que regulan el pH y micronutrientes esenciales. Se vaciaron 2.7 ml del medio en tubos con tapon de rosca y se esterilizaron a 121°C y 15 lb. de presión durante 15 min. Cuando estuvieron a temperatura ambiente se inocularon con amibas y se les agregaron antibióticos para evitar la contaminación bacteriana. El periodo de resiembra se realizó una semana después o más, dependiendo del desarrollo de las cepas. Así, en la primer prueba, la resiembra se hizo a los siete días con un buen desarrollo de trofozoito y antes de que se comenzaran a enquistar.

G): Pruebas de patogenicidad. La patogenicidad de las cepas del género *Acanthamoeba* se probó primero por inoculación intracerebral, en un lote de 5 ratones de tres semanas de edad, con 0.02 ml. de medio (solución page o medio de cultivo) con un mínimo de 10⁴ amebas, contadas con la Cámara de Neubauer, los ratones se observarán diariamente durante 3 semanas para determinar los síntomas y su posible muerte. Las amebas se recuperaron de los ratones muertos o sacrificados las amebas por cultivo del cerebro en medio (NNE). Los ratones que sobrevivieron después de los 21 días de inoculados se sacrificaron para tratar de recuperar las amebas (Martínez, 1985).

Las cepas consideradas como patógenas por inoculación intracerebral, se probaron por vía intranasal, utilizando el mismo procedimiento mencionado anteriormente. Se buscó recuperar las amebas de los ratones que murieron después de la inoculación intranasal mediante el sembrado de porciones de cerebro, pulmón, hígado y riñón en medio NNE. Los ratones que sobrevivieron más de tres semanas se sacrificaron para recuperar las amebas (Martínez, 1985).

H): Identificación. Las amebas se identificaron por caracteres morfológicos, midiéndose la longitud y la anchura de 50 quistes y 50 trofozoitos de cada cepa, así como el núcleo y el nucléolo. La identificación se realizó con el microscopio de contraste de fases y se utilizaron las claves taxonómicas de Pussard y Pons (1977), y Page, (1988).

I): Estadística. Los datos meteorológicos fueron proporcionados por SEDUE de San Luis Potosí, la estación meteorológica de la facultad de Agricultura (UASLP), la facultad de Ingeniería de la UASLP y estación de monitoreo de la empresa Minera Morales.

La composición de especies se trató estadísticamente a través de una prueba de "u" de Mann-Witney de las cuatro estaciones muestreadas (Said y Zarate, 1984). Se buscó correlación estadística entre los parámetros meteorológicos con las amebas aisladas y cada una de las estaciones muestreadas.

Se utilizó el índice de similitud de Sørensen para comparar las diferentes estaciones

$$S = 2a / a + D \text{ (Southwood, 1966).}$$

RESULTADOS

De las cuatro estaciones muestreadas entre octubre de 1990 y septiembre de 1991, se obtuvieron en total 53 cepas de amebas de la atmósfera de la ciudad de San Luis Potosí, distribuidas en 5 familias y 10 géneros. El mejor representado fue el género *Acanthamoeba* con 13 especies (la mayoría son del grupo II, 53.8%). *Hartmannella*, que le sigue en número, sólo presentó 4 especies, *Vahlkampfia* solo tuvo tres y los géneros restantes tienen entre una y dos especies en total (Tabla 1).

TABLA 1. LISTA DE ESPECIES

FAMILIA	GENERO	ESPECIE
<i>Hartmannellidae</i>	<i>Hartmannella</i>	<i>cantabrigiensis</i>
		sp
		<i>vermiformis</i>
		sp
	<i>Glaeseria</i>	<i>mira</i>
<i>Acanthamoebidae</i>		<i>rhyssodes</i>
		sp
		<i>polyphaga</i>
		<i>triangularis</i>
		<i>lenticulata</i>
	<i>Acanthamoeba</i>	<i>palestinensis</i>
		<i>culbertsoni</i>
		<i>hugdanensis</i>
		<i>griffini</i>
		<i>astronixis</i>
		<i>comandoni</i>
		sp
		<i>mauritanensis</i>
<i>Vahlkampfiidae</i>	<i>Vahlkampfia</i>	<i>debilis</i>
		<i>lacustris</i>
		sp
	<i>Adelphamoeba</i>	sp
		<i>galeacystis</i>
	<i>Naegleria</i>	sp
		<i>gruberi</i>
<i>Paratetramitus</i>		<i>jugosus</i>
		sp
<i>Echinamoebidae</i>	<i>Echinamoeba</i>	<i>exundans</i>
		<i>silvestris</i>
<i>Vannellidae</i>	<i>Platyamoeba</i>	<i>stenopodia</i>
	<i>Vannella</i>	<i>mira</i>

De las cuatro estaciones de estudio. Se aislaron 23 cepas de la zona urbana y 17 de la zona suburbana. Estas estaciones son las que presentaron mayor diversidad y número de especies comparadas con la zona centro-urbana y la zona rural donde solamente se obtuvieron 9 y 4 aislamientos respectivamente (Tabla 2).

TABLA 2. LISTA DE ESPECIES POR ESTACION

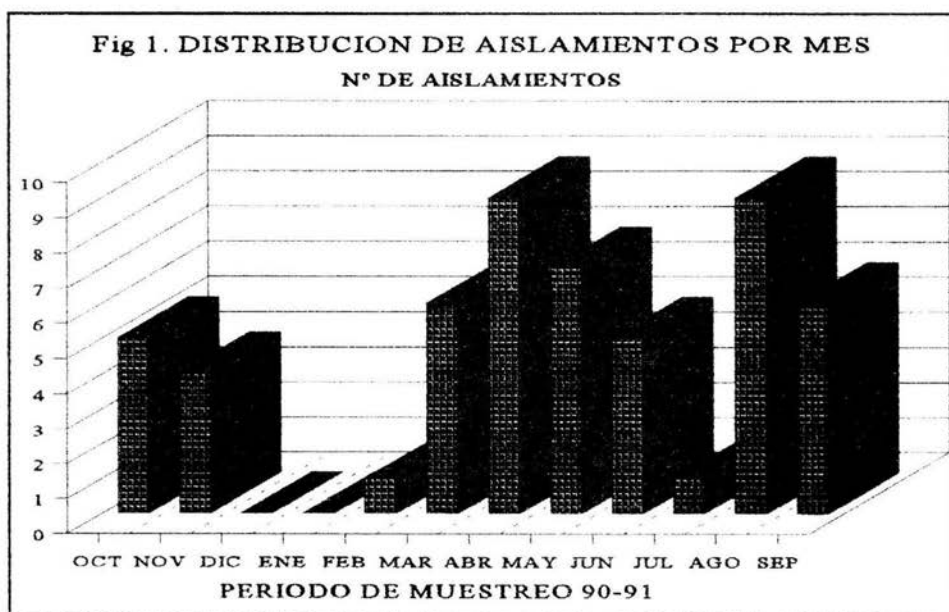
Estacion Sur (zona urbana)	Estacion Oeste (zona suburbana)	Estacion Centro (zona urbana)	Estacion Noreste (zona rural)
<i>A.lugdunensis</i>	<i>A.rhysodes</i>	<i>A.polyphaga</i>	<i>A.lenticulata</i>
<i>A.griffini</i>	<i>Acanthamoeba sp</i>	<i>A.lenticulata</i>	<i>Hartmannella sp</i>
<i>A.polyphaga</i>	<i>A.triangularis</i>	<i>A.culbertsoni</i>	<i>H.vermiformis</i>
<i>A.griffini</i>	<i>A.triangularis</i>	<i>A.polyphaga</i>	<i>H.cantabrigiensis</i>
<i>A.mauritaniensis</i>	<i>A.palestinensis</i>	<i>A.astronixis</i>	
<i>A.polyphaga</i>	<i>A.culbertsoni</i>	<i>Acanthamoeba sp</i>	
<i>A.comandoni</i>	<i>A.astronixis</i>	<i>Vahlkampfiidae</i>	
<i>Vahlkampfiidae</i>	<i>A.polyphaga</i>	<i>H.cantabrigiensis</i>	
<i>Vahlkampfiidae</i>	<i>Vahlkampfiidae</i>	<i>Hcantabrigiensis</i>	
<i>V.debilis</i>	<i>V.debilis</i>		
<i>Vahlkampfia sp</i>	<i>H.vermiformis</i>		
<i>H.cantabrigiensis</i>	<i>H.vermiformis</i>		
<i>H.cantabrigiensis</i>	<i>Hartmannella sp</i>		
<i>H.vermiformis</i>	<i>A.- galeacystis</i>		
<i>E.exudans</i>	<i>Naegleria sp</i>		
<i>E.silvestri</i>	<i>P.- stenopodia</i>		
<i>Echinamoeba sp</i>	<i>Vannella mira</i>		
<i>P.jugosus</i>			
<i>Paratetramitus sp</i>			
<i>A.- galeacystis</i>			
<i>Naegleria gruberi</i>			
<i>Glaeseria mira</i>			
<i>A. culbertsoni*</i>			

Ordenados por estación y generos de mayor importancia. Periodo de muestreo octubre de 1990 a septiembre de 1991.

A.= *Acanthamoeba*. V.= *Vahlkampfia*. H.= *Hartmannella*. A.- = *Adelphamoeba galeacystis*
P.= *Paratetramitus*. P.- = *Platiamoeba stenopodia*. E.= *Echinamoeba*. *Cepa extraviada.

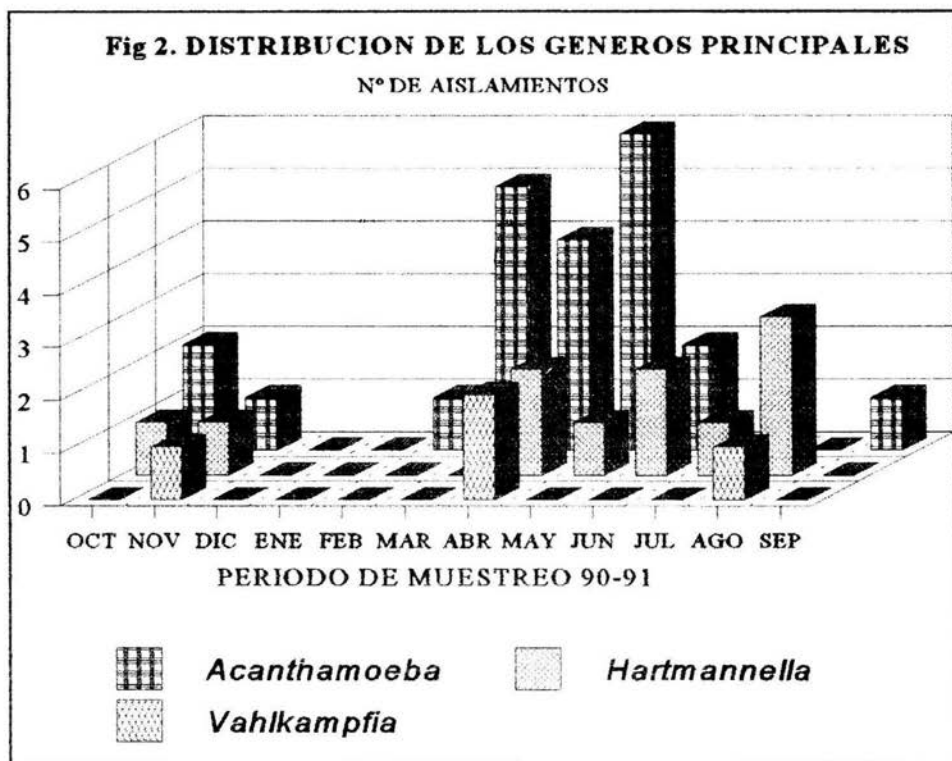
En la estación sur (zona urbana) existía pavimentación, sin embargo a cien metros de la zona de muestreo ya no estaba pavimentado y se podían apreciar cúmulos de basura en las calles,

encharcamiento, así como heces fecales. La estación centro (zona urbana) presentaba un panorama diferente, pues la zona está pavimentada, con jardines alrededor, recolector de basura, drenaje y también heces de palomas alrededor de la plaza. La estación oeste (zona suburbana) contaba con drenaje pero carecía de pavimentación, cobertura vegetal, existía basura en las calles y heces de animales y de humanos. La estación noreste (zona rural) que se encontraba a 9km de la ciudad, sin pavimentación, con poca cubierta vegetal pero sin la presencia de basura ni heces fecales. Aún cuando se obtuvieron aislamientos a lo largo de casi todo el año, la mayor proporción de ellos se presentó en los meses de marzo a junio, disminuyendo en julio y aumentando nuevamente en agosto, hasta decaer completamente en los meses de diciembre y enero. El mes de abril y agosto fueron los meses con mayor incidencia de amebas, en cada uno de ellos se obtuvieron 9 aislamientos, le siguieron mayo, marzo y septiembre con 7, 6 y 6 aislamientos respectivamente. (Figura 1).



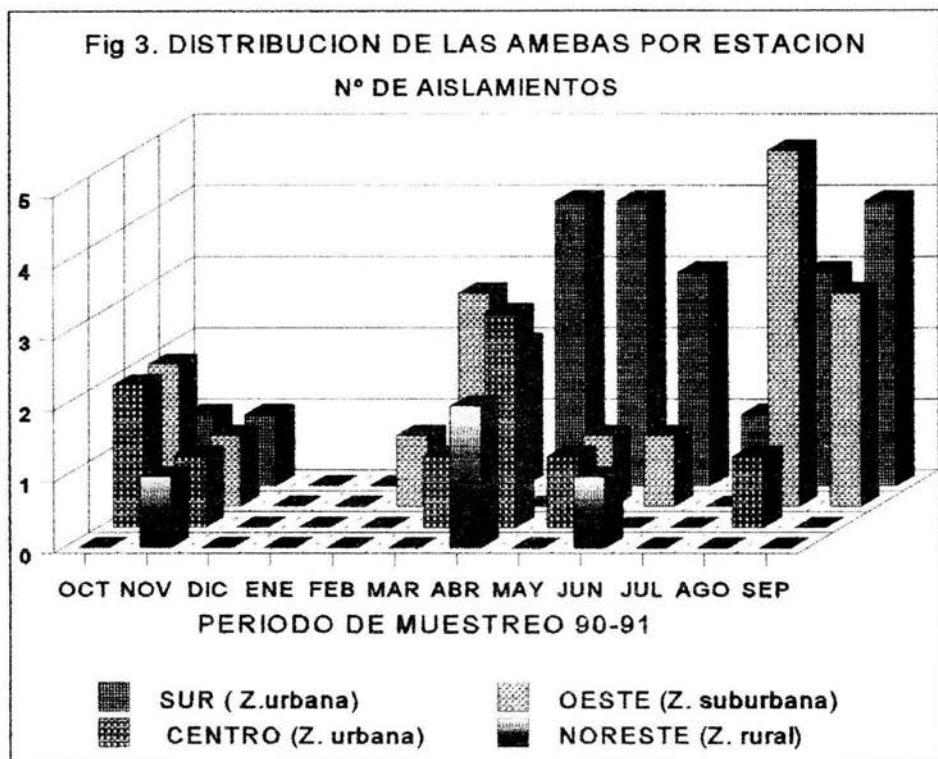
Por otro lado el género *Acanthamoeba* se presentó con mayor frecuencia en los meses más secos del año, es decir, marzo, abril y mayo. *Hartmannella* aparece en abril y junio con la misma

proporción de dos aislamientos cada mes. Sin embargo el mes con mayor tendencia de aparición de dicho género es agosto, en la época de lluvia. El género *Vahlkampfia* se distribuye de manera indistinta a lo largo del año, pues aparece en el mes de noviembre, luego hasta abril y por último agosto, es decir, en las épocas fría, seca y lluviosa (Figura 2).

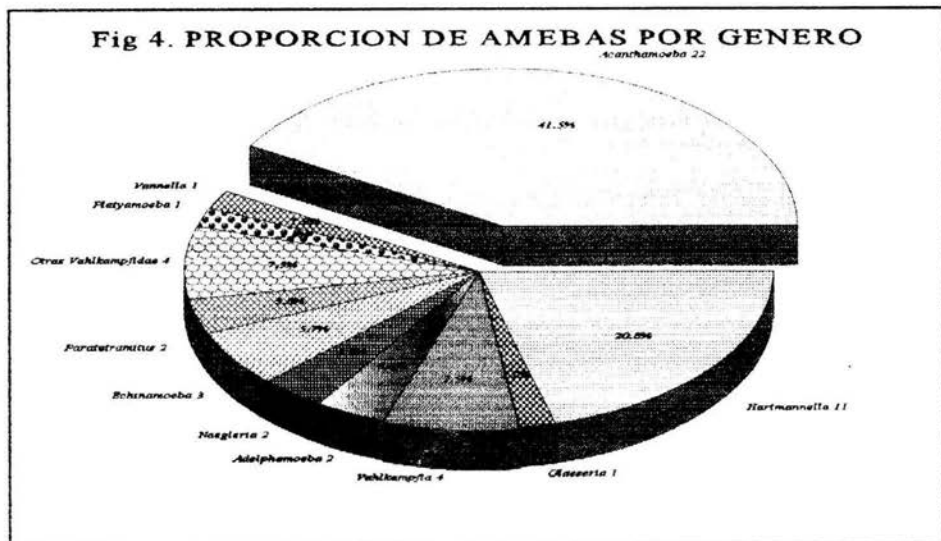


En cuanto a las estaciones de muestreo, como mencionamos anteriormente, la de mayor número de aislamientos fue la estación sur (zona urbana), con mayor número de amebas en los meses más calurosos (abril, mayo y junio) en julio decreció el número de aislamientos, y nuevamente se incrementó en los meses lluviosos, agosto y septiembre. La zona suburbana que tiene el segundo lugar en número de aislamientos, presenta su máxima frecuencia en los meses de agosto, septiembre y marzo. Las amebas aisladas de la zona centro se distribuyeron de manera general a lo

largo de todo el año, aunque el mes con mayor frecuencia es abril con 3 aislamientos. Por último está la zona rural, con tan solo cuatro aislamientos distribuidos en los meses de noviembre, abril y junio (Figura 3).



De los diez géneros encontrados a lo largo del periodo de un año, más de la mitad del total de amebas aisladas está agrupado en los géneros, *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia* y *Echinamoeba*, las que en conjunto hacen el 77% del total de aislamientos. Los géneros restantes fluctúan entre el 4% y el 2% del total de amebas muestreadas (Figura 4).



De las 22 cepas aisladas del género *Acanthamoeba* sólo a 18 de ellas se les realizó las pruebas de patogenicidad, por haberse perdido en cultivo las cuatro restantes. De las cepas inoculadas por vía intracerebral (IC), solamente las especies *A. triangularis* y *A. lenticulata*, resultaron capaces de matar a los cinco ratones durante los 21 días de incubación que dura la prueba. Cinco especies más (*A. lenticulata* con 2 cepas, *A. palestinensis* con una cepa, *A. griffini* con 3 cepas, *A. polyphaga* con 4 cepas, *A. astronixis* con una cepa), mataron sólo 4 de los 5 ratones, y el resto de especies mató de uno a dos ratones a lo largo de los 21 días de incubación. Del total de especies sometidas a la prueba de patogenicidad intracerebral solamente cinco de ellas se recuperaron del cerebro, entre éstas estaban aquellas que habían matado cinco y cuatro ratones.

Con respecto a las pruebas por vía intranasal (IN), solamente 4 especies mataron ratones (*A. triangularis*, *A. griffini*, *A. lenticulata* y *A. polyphaga*) entre ellas, sólo *A. griffini* resultó ser patógena, ya que en ambas pruebas mató a 4 de 5 ratones. Las cepas de amebas de la prueba intranasal (IN), una se recuperó de los pulmones, otras dos tanto del pulmón como del riñón y una no se recuperó de ningún órgano.

Al comparar los resultados de las pruebas de patogenicidad practicadas en los ratones

podemos ver que existen diferencias, pues aquellas especies que habían matado ratones por vía (IC), no todas lo hicieron por vía (IN); incluso podemos notar que diferentes cepas de la misma especie se comportaron de manera distinta tanto por vía intranasal (IN) como por vía intracerebral (IC). De las cepas de *Acanthamoeba* aisladas en éste estudio, sólo una fue patógena (*A.griffini*), seis resultaron con capacidad invasiva y el resto no fueron patógenas (Tabla 3).

TABLA 3. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD DEL GENERO ACANTHAMOEBA

GRO	ESPECIE	PRUEBA (IC)	RECUPERACION (CEREBRO)	PRUEBA (IN)	RECUPERACION P - R - C - N	PATOGENICIDAD	
II	<i>A. rhyodes</i>	1/5	-	0/5	- - - -	No patógena	
II	<i>A. polyphaga</i>	0/5	-	0/5	- - - -	No patógena	
II	<i>A. triangularis</i>	0/5	-	0/5	- - - -	No patógena	
III	<i>A. lenticulata</i>	4/5	-	0/5	- - - -	No patógena*	
II	<i>A. triangularis</i>	5/5	-	2/5	+ - - -	No patógena*	
II	<i>A. palestinesis</i>	4/5	+	0/5	- - - -	No patógena*	
III	<i>A. culbertsoni</i>		C e p a e x t r a v i a d a				
II	<i>A. lugdunensis</i>	2/5	+	0/5	- - - -	No patógena	
II	<i>A. polyphaga</i>	0/5	-	0/5	- - - -	No patógena	
II	<i>A. griffini</i>	4/5	-	4/5	+ + - -	Patógena	
III	<i>A. lenticulata</i>	5/5	+	1/5	+ + - -	No patógena*	
II	<i>A. polyphaga</i>	4/5	+	0/5	- - - -	No patógena*	
II	<i>A. griffini</i>	0/5	-	0/5	- - - -	No patógena	
II	<i>A. mauritaniensis</i>	2/5	-	0/5	- - - -	No patógena	
II	<i>A. lugdunensis</i>	0/5	-	0/5	- - - -	No patógena	
I	<i>A. astronixis</i>	4/5	+	0/5	- - - -	No patógena*	
II	<i>A. polyphaga</i>	0/5	-	1/5	- - - -	No patógena	
I	<i>A. comandoni</i>	0/5	-	0/5	- - - -	No patógena	
II	<i>A. griffini</i>	0/5	-	0/5	- - - -	No patógena	

*Cepas No patógenas con capacidad invasiva

El 53.8% de las especies de amebas del género *Acanthamoeba* muestreadas pertenecen al grupo II, el 46.1% restante esta distribuido de manera proporcional en los grupos III y I. *A.griffini* que resulto ser la única especie patógena pertenece al grupo II, las seis cepas no patógenas con capacidad invasiva están distribuidas de manera indistinta en los grupos II y III.

La única especie que resultó ser patógena *A.griffini* y una no patógena con capacidad invasiva fueron aisladas de la estación Sur (**Z.urbana**) en el mes de abril y mayo respectivamente, tres especies no patógenas con capacidad invasiva se aislaron de la estación Oeste (**Z.suburbana**), dos en el mes de marzo y una en el mes de mayo, las otras dos se aislaron de la zona Centro-urbana y Noroeste (**Z.rural**) en marzo y abril respectivamente (**Tabla 4**).

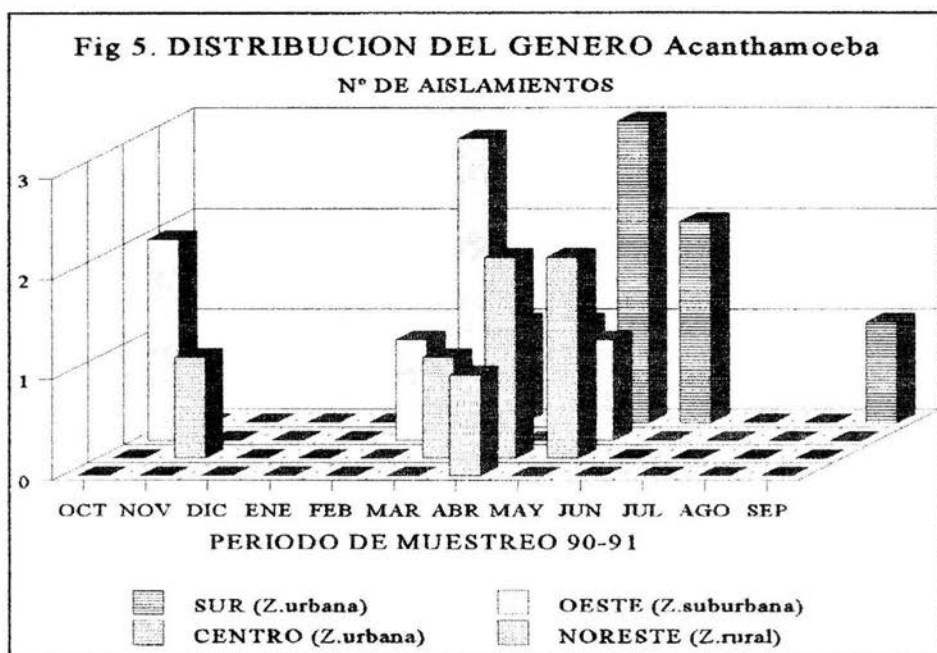
TABLA 4. PROCEDENCIA DE LAS ACANTHAMOEBAS PATOGENAS

GPO	ESPECIE	PATOGENICIDAD	ESTACION	PERIODO 90-91
				MES DEL AÑO
II	<i>A. rhysodes</i>	No patógena	Oeste (Z.suburbana)	Octubre
II	<i>A. polyphaga</i>	No patógena	Centro (Z.urbana)	Noviembre
II	<i>A. triangularis</i>	No patógena	Oeste (Z.suburbana)	Febrero
III	<i>A. lenticulata</i>	No patógena*	Centro (Z.urbana)	Marzo
II	<i>A. triangularis</i>	No patógena*	Oeste (Z.suburbana)	Marzo
II	<i>A. palestinensis</i>	No patógena*	Oeste (Z.suburbana)	Marzo
III	<i>A. culbertsoni</i>	C e p a e x t r a v i a d a		
II	<i>A. lugdunensis</i>	No patógena	Sur (Z.urbana)	Marzo
II	<i>A. polyphaga</i>	No patógena	Centro (Z.urbana)	Abril
II	<i>A. griffini</i>	Patógena	Sur (Z.urbana)	Abril
III	<i>A. lenticulata</i>	No patógena*	Noreste (Z.rural)	Abril
II	<i>A. polyphaga</i>	No patógena*	Sur (Z.urbana)	Mayo
II	<i>A. griffini</i>	No patógena	Sur (Z.Urbana)	Mayo
II	<i>A. mauritanensis</i>	No patógena	Sur (Z.urbana)	Mayo
II	<i>A. lugdunensis</i>	No patógena	Centro (Z.urbana)	Mayo
I	<i>A. astronixis</i>	No patógena*	Oeste (Z.suburbana)	Mayo
II	<i>A. polyphaga</i>	No patógena	Sur (Z.urbana)	junio
II	<i>A. comandoni</i>	No patógena	Sur (Z.urbana)	junio
II	<i>A. griffini</i>	No patógena	Sur (Z.urbana)	Septiembre

*Cepas no patógenas con capacidad invasiva

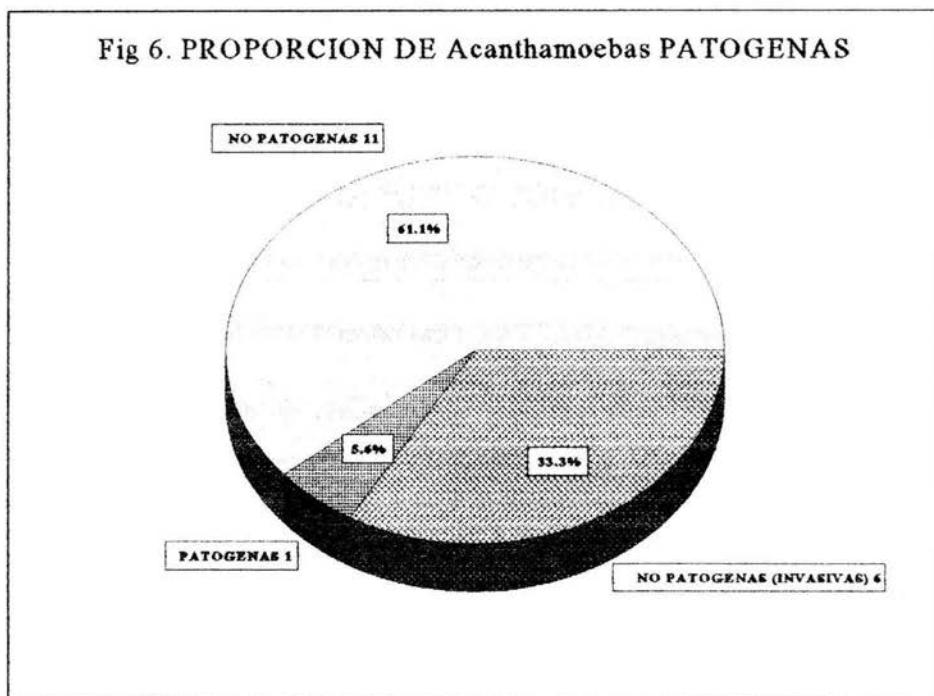
Las *Acanthamoebas* patógenas y con capacidad invasiva se encontraron distribuidas de manera general en las cuatro estaciones muestreadas, sin ninguna tendencia en particular por alguna estación de estudio.

Las cepas aisladas del género *Acanthamoeba* se encontraron distribuidas de manera aleatoria en las cuatro estaciones muestreadas. Más del 60% de las cepas de este género se obtuvieron de los meses más calidos del año, marzo, abril y mayo; con aportaciones específicas de cada una de las estaciones estudiadas (Figura 5).



Del total de cepas de amebas del género *Acanthamoeba* a las cuales se les realizó la prueba de patogenicidad, el 61% de ellas resultaron no patógenas, el 33% fueron no patógenas con capacidad invasiva y solamente una de las 18 probadas resultó ser patógena (Figura 6).

Fig 6. PROPORCION DE Acanthamoebas PATOGENAS

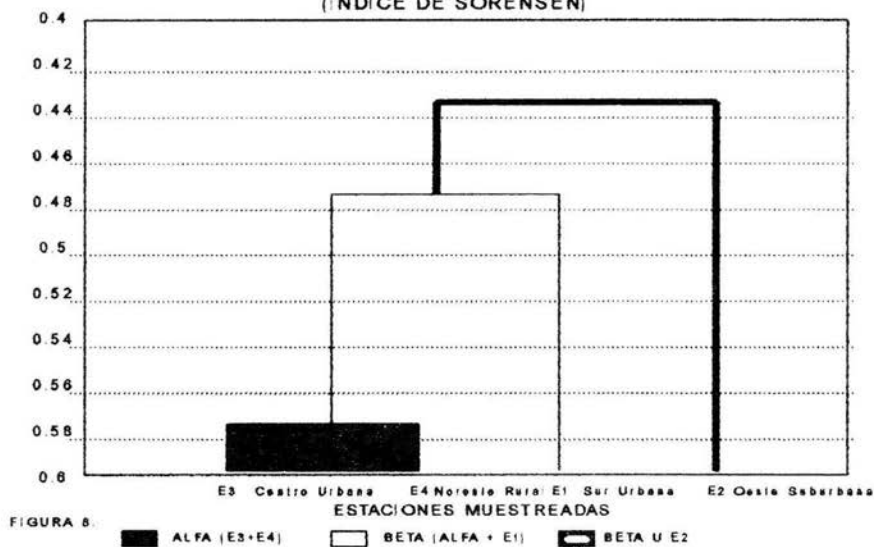


Cabe mencionar que para considerar una especie patógena, esta deberá matar a 3 o más ratones de los cinco utilizados durante los 21 días de incubación, tanto en la prueba intracebral (IC) como en la intranasal (IN). Aquellas que son consideradas no patógenas pero con capacidad invasiva, es porque en cualquiera de las dos pruebas antes mencionadas lograron matar a 3 de los cinco ratones utilizados.

Al comparar las estaciones de estudio a través del índice de similitud de Sorensen, podemos decir que las cuatro estaciones muestreadas son disimiles entre sí, pues los valores de similitud obtenidos entre las zonas de trabajo son muy bajos (Figura 7).

En forma ascendente los valores se presentaron de la siguiente manera: la estación suburbana con la estación rural presentaron el valor más bajo de 0.15, la estación Sur-urbana y la rural obtuvieron un valor de 0.26, la estación Centro-urbana y la suburbana tuvieron un valor de 0.26, la

COMPARACION DE LAS CUATRO ZONAS DE ESTUDIO
(INDICE DE SORENSEN)



estación Centro-urbana y la Sur-urbana presentaron un valor de 0.35, y por último la estación Sur-urbana y la suburbana obtuvieron un valor de 0.38. De hecho, 0.57 fue el valor más alto de similitud y se presentó entre las zonas con menor número de cepas aisladas (Centro-urbana y Noroeste-suburbana); cuando comparamos estas dos zonas con las de mayor número de aislamientos podemos notar que las diferencias se incrementan especificando características particulares de cada una de las zonas de muestreo.

En la correlación estadística (Prueba de "u" de Mann y Whitney) entre el número de aislamientos registrados por zona de muestreo y los parámetros meteorológicos, solamente la Evaporación con un valor de $r = 0.99$ y la Velocidad del viento con $r = 0.77$ resultaron tener una correlación significativa con la presencia de amebas. En contraste, los otros tres parámetros contemplados como: Temperatura, Humedad relativa y Presión barométrica que presentaron valores bajos de asociación, $r = -0.09$, $r = -0.46$, $r = -0.09$ respectivamente, lo que indica que las variables no tienen correlación con la presencia o ausencia de amebas en la atmósfera.

DISCUSION

Las amebas del género *Acanthamoeba* resultaron ser las especies más frecuentes en la atmósfera de las cuatro estaciones muestreadas. Otros géneros menos frecuentes o con densidades bajas fueron: *Hartmannella*, *Vahlkampfia*, *Naegleria*, *Echinamoeba*, *Paratetramitus* y *Adelphamoeba*. Las *Acanthamoebas* son las amebas más comunes en el medio edáfico y por eso son comunes también en la atmósfera, aún cuando las cantidades no sean proporcionales (Singh, 1975; Page, 1988; Rivera *et al.*, 1991). La abundancia en la atmósfera no depende únicamente de la fuente de origen, sino de otros factores como las condiciones micrometeorológicas, la capacidad de sobrevivencia bajo diferentes condiciones ambientales, la resistencia de cada microorganismo aerolizado, su morfología, su tamaño y el desarrollo de estructuras de resistencia; de tal manera que algunas de las especies de cualquier género pudieron verse favorecidas en su distribución en el aire, ya que este proceso resulta ser un evento azaroso.

Las especies del género *Acanthamoeba* presentan quistes de resistencia que les permite soportar factores ambientales como la desecación que para otras amebas aerolizadas representa un peligro latente. Lo anterior les permite colonizar y mantenerse en las regiones más variadas, aumentando sus posibilidades de sobrevivencia y viabilidad en la atmósfera.

Hartmannella y *Vahlkampfia* que siguen en número de aislamientos, también presentan quistes de resistencia que les protege contra la desecación de la atmósfera. Las especies del género *Vahlkampfia* presentan un quiste con una capa gelatinosa (Page, 1988), la cual puede disminuir la velocidad de desecación, permitiéndoles una viabilidad mayor durante el transporte aéreo.

Entre los géneros con menor frecuencia de especies en el aire se encuentra *Naegleria* con solo dos aislamientos. Estas amebas son más comunes en el medio acuático y edáfico que el género *Vahlkampfia*, sin embargo presentan quistes de baja resistencia a la desecación, por lo que su sobrevivencia en la atmósfera debe estar relacionada con una humedad relativa favorable.

De las cuatro estaciones muestreadas, en la zona rural es donde se esperaba el mayor número de aislamientos por ser el suelo el hábitat natural que han dominado con gran éxito las amebas. Sin embargo, la mayor ocurrencia se dió en las estaciones de la zona urbana (sur) y suburbana (Cervantes y Morales), las cuales en general comparten características semejantes como la falta de pavimentación, basura en los alrededores y la presencia de heces fecales. Estas particularidades

ambientales permiten explicar la similitud en los patrones de aislamiento de las dos estaciones, por ejemplo, un suelo descubierto representa una fuente importante de formas biológicas de diferentes tamaños como quistes o trofozoítos en posibilidades de ser resuspendidas, ofrecen microrrefugios que los protegen de la desecación y confieren condiciones favorables de humedad y alimento que mantienen un crecimiento máximo de amebas. Además, en estas zonas existen fuentes locales de microorganismos como son la basura, las heces y los encharcamientos que se encargan del refugio y producción de amebas. Por el contrario, en la zona centro urbana con pavimentación, jardines y sin basura, la frecuencia y cantidad de partículas viables en posibilidades de resuspenderse es mucho menor, pues la humedad es un factor determinante en este proceso (Nicholson, 1988), lo cual explica por qué hubo menos aislamientos en esta zona. Por último la zona rural sin pavimentación, sin heces y sin basura, presentó la menor frecuencia de aislamientos, debido a la falta de fuentes alternas de producción de amebas como la presencia de cúmulos de basura, heces fecales y/o encharcamientos. El aporte principal de amebas a la atmósfera está determinado por el suelo desnudo de la zona, cuyo proceso de resuspensión no cuenta con la participación vehicular como en las otras zonas, reduciendo la liberación y distribución de amebas en la atmósfera.

El patrón de aislamientos fue poco claro, su distribución es irregular con cierta tendencia a obtener más amebas en la época de sequía. En el verano, debido a las condiciones del tiempo, caluroso, seco y polvoriento, las amebas son fácilmente resuspendidas por la acción del viento sobre las superficies secas e incluso por tolvaneras (Lighthart y Shaffer 1995). Las variaciones encontradas en los meses lluviosos se pueden explicar por la función que juega la lluvia en los procesos de incorporación y retiro de las partículas. La lluvia provoca la resuspensión de las partículas y la formación de aerosoles del suelo y de la vegetación, pero a su vez ésta puede lavar las partículas viables de la atmósfera. Lo anterior depende de la fuerza de la lluvia, pues una llovizna limpia más efectivamente la atmósfera que una lluvia torrencial de la misma duración. Al término del segundo evento citado se puede encontrar una mayor cantidad de aerosoles que antes de presentarse éste (Rodríguez, 1994).

Sin embargo, la distribución irregular en los aislamientos a lo largo del año, nos indica una mayor influencia de las condiciones locales que de las condiciones generales del clima en las zonas de estudio, lo cual hace pensar que los aislamientos de las amebas responden a factores

microambientales y a la sobrevivencia de las amebas al transporte aéreo de largo plazo.

El género *Acanthamoeba* se presenta con mayor frecuencia en los meses más secos del año, se debe principalmente a la capacidad que sus especies tienen de soportar los bajos niveles de humedad relativa en la atmósfera, ya que el contenido de celulosa en las paredes de sus quistes les permite soportar la desecación. *Hartmannella* y *Vahlkampfia* también presentan quistes de resistencia, sin embargo, su distribución se presenta de manera indistinta a lo largo de todo el año, sin una tendencia clara sobre una u otra época del año. Como se mencionó anteriormente es probable que su distribución dependa más de las condiciones particulares de cada zona (como las fuentes locales de producción de amebas y las actividades humanas que intervienen en la resuspensión de particulares viables) que de las condiciones meteorológicas generales.

Los microorganismos aerolizados importantes como agentes infecciosos, son aquellos que presentan una gran estabilidad y capacidad de sobrevivencia bajo diferentes condiciones ambientales. En éste estudio únicamente se probó la capacidad infecciosa del género *Acanthamoeba*, por qué a él pertenece el mayor número de cepas patógenas oportunistas, presenta la mayor frecuencia de especies aisladas y una gran resistencia a las condiciones anóxicas.

La presencia de AVL patógenas en la atmósfera es de especial importancia, pues a través del aire pueden llegar a depositarse en la piel y las mucosas del cuerpo, a contaminar agua de todo tipo de usos y, en general, colonizar casi cualquier tipo de hábitat, pudiendo de esta manera llegar a producir meningoencefalitis amebiana primaria (MAP) o encefalitis amebiana granulomatosa (EAG), entre otras enfermedades.

Las variaciones mostradas en los resultados obtenidos de las pruebas de patogenicidad, se pueden explicar por las diferencias en las vías de inoculación. En la prueba intracerebral, las amebas se inoculan directamente en el cerebro, logrando su crecimiento máximo, pues en este ambiente con una temperatura estable (caliente), con alimento y sin competidores, aumenta la capacidad infecciosa de aquellas que son patógenas u oportunistas. Sin embargo, debido a que el inoculador puede lesionar el cerebro de los ratones con la aguja de la jeringa no se debe descartar la posibilidad de muerte por un procedimiento inadecuado en la inoculación.

En la prueba intranasal, la ameba se instala primero en la mucosa nasal y posteriormente migra hasta el encéfalo a través del nervio olfatorio, por lo que esta técnica se utiliza generalmente

para confirmar los resultados de la prueba intracerebral.

Entre los factores que pueden estar influyendo en la naturaleza infecciosa de las AVL, están su origen y concentración, las condiciones meteorológicas a las cuales están sujetas y las propiedades físicas de las partículas como el tamaño y composición. Por ejemplo, las partículas con tamaños menores a 10 μm como es el caso de las AVL (cuyos quistes están en el rango de 2 a 5 μm de diámetro y además con volúmenes de 4 a 65000 μm^3 ; Schlichting, 1969), son de gran importancia porque fácilmente pueden llegar al tracto respiratorio. Por otro lado, la concentración de contaminantes en el medio puede aumentar o disminuir en las especies patógenas la capacidad de producir enfermedades, según el estado del hospedero y el del huésped.

De acuerdo con nuestros datos la única especie que resultó patógena fue *A.griffini* (comprobada por ambas pruebas), lo que indica que es una especie potencialmente patógena para el hombre.

Por el contrario, las cepas no patógenas con capacidad invasiva sólo mataron a tres de los cinco ratones en cualquiera de las dos pruebas, y se lograron recuperar de pulmón y/o riñón, lo cual manifiesta su capacidad de producir enfermedades en aquellos individuos inmunodeprimidos. De hecho, para que se desarrolle un caso de encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), es necesario que el hospedero tenga sus defensas muy bajas, de lo contrario la infección por *Acanthamoeba* no se llevará a cabo, pues en la sangre de los seres humanos se han encontrado anticuerpos contra estas amebas (citado en Rodríguez, 1994).

En las cuatro estaciones muestreadas se encontró por lo menos una especie patógena o con capacidad invasiva estuvo presente, lo cual resulta de sumo interés, pues indica por un lado su capacidad de distribución y por otro su importancia como agentes infecciosos, y más aún si se toma en cuenta que la hora y la altura a la que fueron aisladas es la de mayor actividad humana.

El hecho de que las cepas aisladas pertenecientes al género *Acanthamoeba* se encontrasen distribuidas de manera aleatoria en cada una de las zonas muestreadas, principalmente en los meses más secos del año, indica la gran capacidad de resistencia a las condiciones de cambios extremos y desfavorables como temperaturas altas, bajas concentraciones de oxígeno y variaciones de pH, que presentan las especies de este género. Esto, aunado con su gran estabilidad en la atmósfera y capacidad de producir enfermedades, resalta la importancia de su estudio principalmente en las

zonas de gran actividad urbana.

El índice de similitud de Sorensen, nos reafirma que la diversidad y número de especies obtenidos por estación muestreada es el resultado de condiciones ambientales específicas de cada zona de estudio, es decir, el éxito de una especie para colonizar y establecerse en un hábitat está en función de los factores ambientales presentes, como la disponibilidad de alimento o la temperatura del lugar. Así, en la zona urbana y suburbana, aparte del suelo desnudo como medio natural, existen depósitos de basura y encharcamientos importantes en la producción de AVL. Otro factor importante de cada zona son sus particularidades de urbanización, pues las actividades humanas acentúan los mecanismos de incorporación de partículas a la atmósfera. Por ejemplo, el paso de vehículos por un camino puede hacer que el material superficial se resuspenda debido a la turbulencia inducida.

La zona centro por un lado presenta gran actividad urbana, pero por otro tiene pocas fuentes descubiertas de producción amebiana. En cambio en la estación rural cuenta con una fuente importante de amebas como es el suelo desnudo, pero con una actividad urbana prácticamente nula. Por lo que en esta zona predomina la suspensión de partículas por vientos fuertes que las transportan a grandes distancias.

La evaporación y la velocidad del viento fueron los únicos parámetros con correlación positiva sobre la presencia de amebas en la atmósfera.

La velocidad del viento tiene diferentes implicaciones en el retiro y entrada de microorganismos a la atmósfera. El tiempo de permanencia y la distancia que alcancen depende de la altura a la que hayan llegado, del tamaño que posean y de las condiciones atmosféricas presentes en el momento en que los quistes ingresan al aire. Si solamente llegan a la turbulencia cercana al suelo, lo cual estaría relacionado con el movimiento de carros, la lluvia e incluso el trajín de la gente, serán acarreados dentro de los primeros 100 m de distancia de la fuente. Esto implica que las amebas obtenidas de los muestreos realizados, son en gran medida el resultado de la dinámica atmosférica presente en cada zona de estudio. Si las partículas son arrastradas por corrientes de convección, o por condiciones del tiempo que involucren sistemas frontales, se pueden dispersar entonces sobre decenas e incluso cientos de kilómetros. Desde la zona rural que se encuentra a 9 km al noroeste de la ciudad y de donde se mueven las masas de aire hacia las demás estaciones de

muestreo, pudieron haberse distribuido varias amebas en su forma de quiste, y haberse sedimentado en la zona cuando el aire perdiera su fuerza o cuando las partículas se impactaran sobre una superficie blanda o dura. En la sedimentación las partículas de mayor peso bajan inmediatamente y las otras lo van haciendo a una velocidad que va de acuerdo con su tamaño, su forma y su densidad, hasta quedar depositadas sobre alguna superficie.

En el transporte a largo plazo, los principales factores que afectan la sobrevivencia de las AVL son la exposición a los rayos ultravioleta y la sequía, los que en conjunto son responsables de la eliminación de la mayoría de los microbios que ingresan a la atmósfera (Schlesinger, 1979).

La importancia de la evaporación para la sobrevivencia de los microorganismos aerolizados se debe principalmente a que la humedad en la atmósfera reduce los efectos de la desecación en los organismos aerotransportados, al mantener rehidratadas a las partículas de los aerosoles previas al muestreo. Lo anterior resulta importante principalmente para aquellas amebas que no presentan quistes de resistencia a la sequía, como en el caso de las especies del género *Naegleria* (Schlesinger, 1979).

De igual manera, la presencia de una microcapa de agua en el aerosol que contiene a los microorganismos, les sirve como un filtro de protección contra los rayos ultravioleta.

Sobre los efectos de la humedad relativa en la sobrevivencia de los microorganismos aerolizados, juegan un papel importante el contenido de fluidos colectados y la prehumidificación (Warren, *et al.*, 1969 citado por Kyle, 1985). Para algunos organismos aerosolizados las variaciones en la HR producen efectos más profundos en la estabilidad del aerosol que cuando la HR es constante. Por último, los estudios hechos para determinar los efectos de la temperatura sobre la estabilidad del aerosol han demostrado que los incrementos en la temperatura, tienden a disminuir la viabilidad de los microorganismos aerotransportados (Dimmock, 1967 citado por Edmonds, 1979).

CONCLUSIONES

** El método de muestreo de Impinger, utilizado para el aislamiento de las amebas de vida libre demostró su utilidad y confiabilidad en el transporte y conservación de las (AVL).

** La abundancia y diversidad de las amebas encontradas en la atmósfera de la Ciudad de San Luis Potosí son el resultado de factores favorables en el proceso de suspensión y de condiciones ambientales específicas de cada zona de estudio.

** El género *Acanthamoeba* fue el más abundante en diversidad y número de especies por cada zona de estudio, con excepción de la estación rural.

** El número de cepas patógenas y no patógenas con capacidad invasiva del género *Acanthamoeba* fue bajo en comparación con los resultados obtenidos en la atmósfera de la ciudad de México, lo que podría explicarse por la densidad y tipo de contaminantes existentes en cada atmósfera, para lo cual es necesario un estudio más extenso con objetivos específicos sobre la relación de contaminantes y la presencia de amebas patógenas en el aire.

** La presencia de por lo menos una especie con capacidad invasiva del género *Acanthamoeba* en cada estación muestreada confirma su importancia en la salud de los seres humanos.

** La sobrevivencia de los microorganismos al transporte en el aire está en función de aquellos factores que reducen los efectos de la radiación ultravioleta y la desecación.

** En la estación urbana, la suspensión de partículas en los primeros 6 m depende en gran medida del movimiento vehicular, la lluvia y las actividades cotidianas.

** El mayor número de aislamientos se presentó en las zonas con depósitos de basura y encharcamientos donde la producción de amebas se ve incrementada por la abundancia de materia orgánica y bacterias.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, A.P. y J.C. Spendlove. (1970). Coliform Aerosol Emitted by Sewage Treatment Plants. **Science**. 169: 1218-1220.
- Anderson, O.R. (1988). **Comparative Protozoology. Ecology, physiology, Lyfe History**. Springer Verlag. New York. p.p. 75-88, 130-149.
- Bamforth, S. (1980). Terrestrial Protozoa. **J. Protozool.** 27: 33-36.
- Brock, T.D. (1978). **Biología de los Microorganismos**. Ediciones Omega. 2, Ed. México. pp. 1-14.
- Buckland, F.E., y D.A.J. Tyrrel. (1964). Loss of Infectivity on drying various viruses. **Nature** (London) 195: 1063-1064.
- Campbell, R. (1987). **Ecología Microbiana**. Limusa, S.A. de C.V. México. pp. 109-229
- Caren, D.L. (1981). Environmental Pollutants. Effects on the Immune System and Resistance to Infectious Disease. **BioScience**. 31: 582-586.
- Cox, C.S. (1966). The Survival of *Escherichia coli* Atomized into Air and into Nitrogen from Distilled Water and from Solution of Protecting Agents as a Function of Relative Humidity. **J. Gen. Microbiol.** 43: 383-399.
- Cox, C.S. (1968). The Aerosol Survival of *Escherichia coli B* in Nitrogen, Argon, and Helium Atmospheres and the Influence of Relative Humidity. **J.Gen.Microbiol.** 50: 139-147.
- Cox, C.S., S.J. Gragen, y J. Baxter. (1974). Aerosol Survival of *Serratia marcescens* as a Function of Oxygen Concentration, Relative Humidity and Time. **Can. J. Microbiol.** 20: 1529-1534.
- Cox, C.S. (1987). **The Aerobiológico Pathway of Microorganisms**. John Willey y Sons. Chichester, U.K. pp. 143-154.
- Edmonds, R.L. (1979). **Aerobiology**. The Ecological Systems Approach. Dowden, Hutchinson y Ross. Stroudsburg Pennsylvania. pp. 1-25
- Ehrlich, R., y S. Miller (1971). Effect of Relative Humidity and Temperature on Airborne Venezuelan Equine Encephalitis Virus. **J. Appl. Environ. Microbiol.** 22: 194-200.
- Fannin, K.F., J.C. Spendlove, K.W. Cochran, y J.J. Gannon. (1976). Airborne *Coliphages* from Wastewater Treatment Facilities. **Appl. Environ. Microbiol.** 31: 705-710.

- García, M.E. (1980). **Apuntes de Climatología**. U.N.A.M. México, D.F. pp. 49-75.
- Griffiths, J.F. (1985). **Climatología Aplicada**. Publicaciones Cultural S.A. de C.V. México. pp. 121-125.
- Hernández, M.D. (1991). Aislamiento de Amebas de Vida Libre, a partir de la Atmósfera de la Ciudad de México y su área Metropolitana. Tesis de Licenciatura. ENEP-Iztacala.
- Imshenetsky, A.A., S.V. Lysenko y G.A.Kazakov (1978). Upper Boundary of the Biosphere. **Appl. Environ. Microbiol** 35: 1-5.
- Jones, B.L. y J.T. Cookson. (1983). Natural Atmospheric Microbial Conditions in a Typical Suburban Area. **Appl. Environ. Microbiol.** 45: 919-934.
- Kilvington, S., D.F.P. Larkin., D.G. White., y J.R. Beeching (1990). Laboratory Investigation of Acanthamoeba Keratitis **J. Clinical Microbiol.** 28: 2722-2725.
- Kyle, D.E. y G.P. Noblet. (1985). Vertical Distribution of Potentially Pathogenic. Free Living Amoebae in Freshwater Lakes. **J. Protozool.** 32: 99-105.
- Lighthart, B. y B. T. Shaffer (1995). Airborne Bacteria the Atmospheric Surface Layer: Temporal Distribution above a Grass Seed Field. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 1492-1496.
- Martínez, J. y J. De Jonkheere (1981). Les Infection per les Amibes Libres. **Bull. Inst. Pasteur.** 79: 171-205.
- Martínez, J. (1985). **Free Living Amebas. Natural History**. Prevention, Diagnosis, Pathology and Treatment of Disease. CRC Press. Inc. Florida. USA. 156 pp.
- Martínez, J. (1991). Infection of the Central Nervios System Due to *Acanthamoeba*. **Rev. of Infectious Diseases.** 13: S399-S402.
- Martínez, J. (1993). Free Living Amebas. Infection of the Central Nervous System. **J. Medicine** 60: 271-278.
- Mergerian, H. (1991). The Prevalence of *Acanthamoeba* in the Human Environment. **Rev. of Infectious Diseases.** 13: S390-S392.
- Mohr, A.J. (1991). Development of Models To Explain the Survival of Viruses and Bacteria in Aerosols. En "**Modeling the environmental fate of microorganisms**" (ed.) Chiston J. Hurst, ASM Press, Washington D.C. p.p. 160-190.
- Moore, B.E., B.P. Sagik, y C.A. Sorber (1979). Procedure for the recovery of airborne human enteric

- viruses during spray irrigation of treated wastewater. **Appl. Environ. Microbiol.** 38: 688-693.
- Nicholson, K.W. (1988). A Review of Particle Resuspension. **Atmos. Environ.** 22: 2639-2651.
- Overrein, Lans N., Hans Martin y Arne Tollan (1981). **Acid Precipitation Effects on Forest and Fish.** SNSF Project Reclamo, Oslo A S. p.p. 20-21.
- Page, F.C. (1988). **A new Key to Freshwater and Soil Gymnamoeba with Instructions for Culture.** Freshwater Biological Association, Natural Environment Research Council. London. p.p. 92-97.
- Pussard, M. y Pons, R. (1977). Morphologie de la paroi Kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba*. **Protistologica.** XIII: 557-598.
- Rivera, F., A. Ortega, E. Lopez-Ochoterena y M.E. Paz (1979). A Quantitative Morphological and Ecological Study of Protozoa Polluting Tap Water in Mexico City. **Trans. Amer. Micros.Soc.** 98: 465-469.
- Rivera, F., M. Galvan, E. Robles., P. Leal, L. González y A.M. Lacy (1981). Bottled Mineral Waters Polluted by Protozoa in Mexico. **J. Protozool.** 28: 54-56.
- Rivera, F., I. Rosas, M. Castillo, M. Chavez, R. Gomez, R. E. Chio y J. Islas. (1986 a). Pathogenic and Free-Living Protozoa Cultured from the Nasopharyngeal and Oral Regions of Dental Patients II. **Environ. Res.** 39: 364-371.
- Rivera, F., G. García, A. Lugo, E. Zicroid, J. Islas, E. Ramirez y P. Bonilla (1986 b). Amoebae in Waste Stabilization Pond System in Mexico. **Water, Air and Soil Pollution** 28: 185-198.
- Rivera, F., Roy-Ocotla, G. I. Rosas, E. Ramirez, P. Bonilla y F. Lares. (1987). Amoebae isolated from the atmosphere of City and Environs. **Environ. Res.** 42: 149-154.
- Rivera, F., Lares, E. Ramirez, P. Bonilla y A. Paulin (1988). Pathogenic Amoebae Isolated from the Atmosphere of Mexico City and Environs. En: Hazardous Waste: Detection, Control, Treatment. Editado por R. Abbou, Elsevier Science Publishers, B.V. Amsterdam, Holanda. p.p. 1175-1179.
- Rivera, F., F. Lares, E. Ramirez, P. Bonilla, A. Calderon, S. Rodríguez, J. Ramirez, L. Xochihua y H. Guzmán. (1989). *Acanthamoeba spp.* en Quemaduras Infeccionadas y Rinitis. **Rev.Lat-amer. Microbiol.** 1: 137-140.
- Rivera F., F. Lares, E. Ramirez, P. Bonilla, S. Rodríguez, A. Labastida, R. Ortiz y D. Hernández. (1991a). Pathogenic *Acanthamoeba* Isolated During an Atmospheric Survey in Mexico City.

Reviews of Infectious Diseases 13: S388-S389.

Rivera F., F. Lares, E. Ramírez, P. Bonilla, S. Rodríguez, A. Labastida, R. Ortiz, y D. Hernández. (1991b). Microbiology of *Acanthamoeba*: Extended Abstracts. **Reviews of Infectious Diseases**. 13: S388-S389.

Rodríguez-Zaragoza, S. (1994). Ecology of Free Living Amoebae. **Crit. Rev. Microbiol.** 20: 225-241.

Said, I.G. y G.L. Zarate. (1884). **Métodos Estadísticos un enfoque interdisciplinario**. Trillas. México. p.p. 537-550.

Schlesinger, Richard B. (1979). Natural Removal Mechanisms for Chemical Pollutants in the Environment. **BioScience** 29: 95-101.

Schlichting, H.E. (1961). Viable Species of Algae and Protozoa in the Atmosphere. **Lloydia**. 24: 81-88.

Schlichting, H.E. Jr. (1964). Meteorological Conditions Affecting the Dispersal of Airborne Algae and Protozoa. **Lloydia**. 27: 64-78.

Schlichting, H.E. Jr. (1969). The Importance of Airborne Algae and Protozoa. **J. of Air Pollut. Contr. Ass.** 19: 946-951.

Schlichting, H.E. Jr. (1986). Airborne Algae. Memorias del IV Curso y Simposio Internacional sobre Biología de la Contaminación. México. 177-187.

Schuster, F.L. (1979). Small Amoebas and Ameboflagellates. En: **Biochemistry and Physiology of Protozoa**, En: Levandowski, M. y S.H. Hutner, 2^o (eds). vol. 1, A.P. New York. p.p. 216-287.

Singh, B.N. (1975). Pathogenic and Non Pathogenic Amoebae. Mc Millan Press Ltd. London. pp. 1-32.

Sleigh, M.A. (1979). **Biología de los Protozoos**. H. Blume Ediciones. España. pp.307-342.

Smith, P.E. (1973). The Effects of Some Air Pollutants and Meteorological Conditions on Airborne Algae and Protozoa. **J. Air Poll. Cont. Assoc.** 23: 876-888.

Smith, H. William (1976). Air Pollution-Effects on the Structure and Function of Plant Surface Microbial Ecosystems. En: Dickinson y Price, (eds). **Microbiology of Aerial Plant Surface**. A.P. London, p.p. 75-105.

Southwood, D.S. (1966). **Ecological Methods**. Chapman and Hall. London and New York. p.p. 432-435.

- Spendlove, J.C., y K.F. Fannin (1982). Methods of Characterization of Virus Aerosol, In C.P. Gerba y S.M. Goyal (eds), **Methods in Environmental Virology**. Marcel Dekker, Inc., New York. P.261-329.
- Stout, J.D. (1973). The Relationship Between Protozoan Populations and I Activity in Soils. **Am. Zool.** 13:193-201.
- Stout, J.D. y O.W. Heal (1976). Protozoa. En: **Soil Biology**. Editado por A. Burgers y F. Raw, Academic Press, New York, pp. 149-195.
- Strange, R.E., y C.S. Cox (1976). Survival of Dried and Airborne Bacteria. Symp. Soc.Gen. Microbiol. 26: 111-154.
- Strauss, W. y S.J. Mainwaring (1990). **Contaminación del Aire: causas, efectos y soluciones**. Trillas, S.A. de C.V. México. pp. 9-21, 47-85.
- Thong, Y.H. y A. Ferrante (1986). Migration Patterns of Pathogenic and Nonpathogenic *Naegleria* spp. **Infection and Immunity**. 51: 177-180.
- Visvesvara, G. y J.K. Stehr-Green. (1990). Epidemiology of Free Living Ameba Infections. **J. Protozool.** 37: S25-S33.
- Warren, J.C., T.G. Akers, y E.J. Dubori. (1969). Effect of Prehumidification on Sampling of Selected Airborne Viruses. **Appl. Microbiol.** 18: 893-896.
- Yun-Fen, S., A.L. Buikema., W.H. Yongue, J.R. Pratt y J. Cairns.(1986).Use of Protozoan Communities to Predict Enviromental Effects of Pollutants. **J. Protozool.** 32: 1946-151.