

30377



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala
Posgrado en Ciencias Biológicas

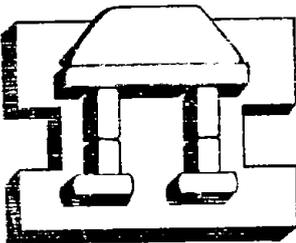
"PRESENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE AMIBAS
POTENCIALMENTE PATÓGENAS
EN EL VALLE DE MEXICALI,
BAJA CALIFORNIA, MÉXICO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA AMBIENTAL

P R E S E N T A:
GUILLERMO SUÁREZ HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ELVIA MANUELA GALLEGOS NEYRA



MÉXICO, D. F.
- NOVIEMBRE, 2005 -

5

COORDINACIÓN

m340067



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN

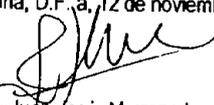
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 7 de junio del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Ambiental) del(a) alumno(a) Suárez Hernández Guillermo, con número de cuenta 79322722 con la tesis titulada: "Presencia y distribución de amibas potencialmente patógenas en el Valle de Mexicali, Baja California, México", bajo la dirección del(a) Dra. Elvia Manuela Gallegos Neyra .

Presidente:	Dra. Marisa Mazarí Hiriart
Vocal:	M. en C. Víctor Olvera Vascán
Secretario:	Dra. Elvia Manuela Gallegos Neyra
Suplente:	Dra. Irma Aurora Rosas Pérez
Suplente:	Dr. Alfonso Lugo Vázquez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 12 de noviembre del 2004


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Reconocimientos de los apoyos recibidos:

- Tesis realizada con el apoyo de recursos provenientes de la DGAPA UNAM con los proyectos IN-212502 e IN211300.
- Trabajo realizado con el apoyo de la FES Iztacala UNAM a través de financiamiento del Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera para la Formación de Grupos de Investigación (PAPCA), año 2002.

Miembros del Comité Tutorial:

Dra. Marisa Mazari Hiriart
Dra. Irma Aurora Rosas Pérez
Dra. Elvia Manuela Gallegos Neyra

INDICE

RESUMEN	4
1. INTRODUCCION.....	5
1.1 Antecedentes.....	5
1.2 Amebas de vida libre (AVL)	7
1.4 Ecología	6
1.5 Ciclos de vida.....	9
1.6 Taxonomía de las amebas de vida libre	9
1.3 Enfermedades por amebas de vida libre	11
1.7 Estado actual del problema.....	13
1.8 Justificación	14
2. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	15
2.1 El estado de Baja California	
2.2 Localización	16
2.3 Fisiografía	16
2.4 Geología	16
2.5 Clima.....	16
2.6 Vegetación.....	17
2.7 Hidrología.....	17
2.8 Agricultura.....	18
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo general.....	19
3.2 Objetivo particulares	19
4. MATERIAL Y MÉTODOS	20
4.1 Métodos de campo	20
4.2 Muestreo y procesamiento de las muestras.....	21
4.3 Medición de factores ambientales.....	21
4.4 Métodos experimentales.....	22
4.4.1 Aislamiento y cultivo de AVL.....	22
4.4.2 Identificación morfológica.....	23
4.4.3 Prueba de transformación ameboflagelar.....	23
4.4.4 Axenización	23
4.4.5 Análisis Estadístico	24
5. RESULTADOS	25
5.1 AVL en las muestras colectadas.....	25
5.2 Factores ambientales.....	30
5.2.1. Determinaciones en campo.....	30
5.2.2. Determinaciones de parámetros fisicoquímicos complementarios	41
5.2.3 Prueba estadístico.....	42
5.3 Identificación de los aislamientos.....	43
5.3.1 Morfología. Mediciones morfométricas.....	43
5.3.2 Pruebas de flagelación y temperatura	47
6. DISCUSION.....	49

7. CONCLUSIONES.....	57
LITERATURA CITADA.....	58
Apéndice I.....	66
Apéndice II.....	69

RESUMEN

Las amebas de vida libre (AVL) son importantes desde el punto de vista ecológico como depredadoras de bacterias y algunos géneros tienen importancia médica ya que pueden provocar enfermedades fatales en el hombre. En este estudio se determinó la presencia de AVL en los canales de riego en el Valle de Mexicali, Baja California. Se recolectaron muestras de agua en 16 canales de riego durante tres ocasiones, tomando muestras a varias profundidades. Las muestras de agua se concentraron por centrifugación y el sedimento se sembró en el medio específico agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes* (NNE), las amebas se identificaron morfológicamente, se realizaron pruebas de transformación ameboflagelar, tolerancia a la temperatura, y se analizó la relación de algunos parámetros fisicoquímicos como temperatura del agua, temperatura ambiental, pH, oxígeno disuelto, conductividad, sólidos suspendidos coliformes totales, y bacterias mesofílicas aerobias con la presencia de los aislados amebianos. Se aislaron 53 especímenes amebianos de los géneros *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Hartmannella*, *Acanthamoeba*, entre otros, predominando los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*, lo que posiblemente se explica por la resistencia de los quistes de estos organismos. Los géneros menos abundantes fueron: *Amoeba*, *Vanella* y *Platyamoeba*. La mayor abundancia y diversidad de organismos se obtuvo en el mes de octubre, con el mayor número de aislados en la superficie se considera que la presencia de amebas puede asociarse con las partículas suspendidas en la interfase agua-aire, donde tienen mayor probabilidad de sobrevivir debido a una concentración adecuada de oxígeno, puesto que son aerobias estrictas. En el último muestreo se aislaron amebas a dos terceras partes de la profundidad total y sedimento adherido a las paredes de los canales (perifiton), obteniendo 14 y 13 aislamientos respectivamente. Los mayores números de aislamientos por canal durante los tres muestreos se presentaron en el canal Coronita y Ladrillera II con 9 y 8 aislamientos respectivamente a nivel de superficie. El análisis estadístico de Pearson indica que no existe una correlación significativa entre los aislamientos obtenidos y los parámetros fisicoquímicos medidos en los cuerpos de agua.

ABSTRACT

Free living amoebae (FLA) are microorganisms ecologically important as bacteria predators even though some genera have medical importance because they can cause fatal illnesses in the man. In this study the presence of potentially pathogenic FLA was determined in irrigation canals in Mexicali Valley, Baja California. For one year samples of water in 16 irrigation canals were collected at several depths and concentrated by centrifugation, sediment was seeded in Petri dishes with specific non nutritive agar with a monolayer of *Enterobacter aerogenes* (NNE). FLA were identified by contrast phase microscopy, enflagellation test and it's tolerance to high temperature. Physicochemical parameters such as water and environmental temperature, pH, dissolved oxygen, conductivity, suspended solids, total coliforms, and mesophilic bacteria were not correlated when compared statistically with the presence of isolates. 53 amoebic isolated belonging to genera *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Hartmannella*, *Acanthamoeba*, were obtained. *Naegleria* and *Acanthamoeba*, were the most abundant genera which is possibly explained because the resistance of the cyst of these microorganisms to environmental factors. Smaller amounts of FLA belonging to *Amoeba*, *Vanella* and *Platyamoeba* were collected. The greater abundance and diversity of isolates were obtained in October, with the most important number of isolates in surface waters the presence of amebas at this level can be associated with the suspended particles in the phase water-air, where they have greater probability to survive due to an adequate concentration of oxygen since they are strictly aerobic. In the last sampling most amoebae were isolated at two thirds of the total depth and also in sediments adhered to the walls obtaining 14 and 13 isolates respectively.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Antonie van Leeuwenhoek fue la primera persona en observar protozoarios de vida libre en 1674 y Von Rossenhof fue el primero en observar AVL en 1775. Félix Dujardin en 1841 fue el primero en observar y reportar a las amebas de vida libre, agruparlas y nombrarlas *Amoeba limax* (Rivera et al., 1991). En 1905 en Alemania, Vahlkampf describió las amebas limax. En 1909, Nagler describió las características morfológicas de *A. hartmanni*. En este mismo año en Alemania Hartmann descubrió a una ameba parásita. En 1911, Alexeieff describió la mitosis de las amebas limax y estableció los géneros *Hartmannella* y *Naegleria*.

Los primeros años del siglo XX fueron de gran actividad para determinar qué organismos eran los causantes de las enfermedades y se acuñó el término "amebas coprozóicas", responsables de la disentería amebiana; durante este periodo se separaron los protozoarios parásitos de los de vida libre. Para 1930 el interés en estas amebas fue en descenso y el estudio de la bacteriología se incrementó en hospitales y laboratorios de investigación. En este año Castellani reportó amebas creciendo en cultivos de levadura, y en el mismo año, Douglas denominó a esta ameba *Hartmannella castellanii*. Un año más tarde Volkonsky describió varias amebas de vida libre y las agrupó dentro de tres géneros: *Hartmannella*, *Acanthamoeba* y *Glaeseria*.

Singh en 1952 separó a las entonces hartmanelas en dos grandes tipos de amebas, basándose en sus características de división nuclear y las incluyó en las familias Hartmannellidae y Vahlkampfiidae. En 1956, Jahnes notó contaminación amebiana espontánea en cultivo de tejidos debido a *Hartmannella* spp.

Hasta ese momento solo se les conocía como habitantes inocuos del ambiente. Sin embargo Culbertson, en 1958, encontró un efecto citopático de este tipo de amebas en cultivos celulares de riñón de mono y declaró que las amebas tienen un potencial patógeno. Los primeros casos en los que se determinó como agente infectante a *N. fowleri* se reportaron en Australia, donde se aisló y tipificó por Fowler (Fowler y Carter, 1965). Poco después, Butt reportó en Florida E. U., tres casos más donde también los afectados fallecieron (Butt, 1968). Aunque no era claro en esos momentos, la sintomatología de estos casos sentó las bases de las características clínicas y patológicas de la enfermedad y su agente causal. No obstante los primeros casos de meningoencefalitis en humanos debidamente comprobados provienen de hace apenas unas décadas, porque anteriormente, se creía que todos los casos comprobados de MEAP se debían a *N. fowleri* (Carter, 1970).

Posteriormente, se reconocieron casos por amebas del género *Acanthamoeba* (Jager y Stamm, 1972; Robert y Rorke, 1973). A medida que se fueron conociendo más los aspectos de las infecciones, se encontraron diferencias que llevaron a proponer el término de encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) provocada por las amebas del género *Acanthamoeba* (Martínez y Amado-Ledo, 1979). Page (1966) redefinió los géneros *Hartmannella* Alexeieff, 1912 y *Acanthamoeba* Volkonsky, 1931.

1.2 Amebas de vida libre

Las amebas de vida libre (AVL) son organismos unicelulares asexuales, eucariontes, de clasificación artificial cuyo tamaño oscila entre los 7 μm y 70 μm . Se denominan amebas anfizoicas, término que describe la capacidad de vivir con dos formas de vida: como organismos de vida libre y endoparásitos.

Las AVL forman un pequeño grupo de protozoos de importancia médica y ecológica, debido a que como no todas son oportunistas (i.e. *Naegleria*) son capaces de producir infecciones en el sistema nervioso central (SNC), en los ojos y en la piel entre otros. Las AVL son cosmopolitas y se les encuentra en suelo, agua y atmósfera.

Constituyen del 50 al 90% de los protozoos heterótrofos en el suelo y se encuentran entre los más importantes depredadores de bacterias en dicho hábitat (Weekers y Van Der Drift, 1993). Su hábitat natural es casi cualquier ambiente de la biosfera, en donde los medios contaminados con materia orgánica son la principal fuente de AVL, potencialmente patógenas (Sawyer, 1989).

Una característica importante de las AVL es que las temperaturas elevadas favorecen su proliferación por lo que se encuentran más comúnmente en aguas termales. Lo anterior demuestra la ubicuidad de las AVL, lo cual asociado a su potencial patógeno las hace posibles agentes causales para los humanos, de daños cerebrales, pulmonares, oculares e incluso de la muerte (Rivera *et al.*, 1992, 1994). En este sentido, el estudio de AVL ha demostrado que existe un grupo restringido de estos organismos que provocan infecciones severas en el hombre y que amerita mayor atención.

1.3 Ecología

Las AVL viven en una amplia diversidad de ambientes, desde un pequeño charco hasta en los sedimentos de agua de mar, lagos congelados de Noruega y de la Antártica; habitan en las interfases: agua-suelo, agua-animal, agua-planta, agua-aire, donde se alimentan de bacterias, hongos, levaduras, algas y protozoarios incluyendo amebas (Rivera *et al.*, 1987). Además de estar ampliamente dispersas en el suelo, estas amebas colonizan exitosamente el agua y el aire, desde donde pueden invadir a los individuos que tengan contacto con ellas. También se les halla en el tracto digestivo de aves, mamíferos (John y Hoppe, 1990), reptiles (Suster *et al.*, 2003), peces (Dykova *et al.*, 1999).

Estos organismos han sido aislados de una amplia variedad de fuentes: albercas (Preston *et al.*, 2001), de las aguas termales naturales (Rivera *et al.*, 1989), de descargas de aguas termales contaminadas (De Jonckheere y Van De Voorde, 1976), de lagos (John y De Jonckheere, 1985; Dettler y Wilhem, 1991), de ríos (Ettinger *et al.*, 2002), de plantas de tratamiento de aguas residuales (Rivera *et al.*, 1985); de sedimentos de estanques (Kyle y Noblet, 1986); de aguas embotelladas (Rivera *et al.*, 1981; Fluvia *et al.*, 1983a, b). También se han encontrado como "microbiota normal" de la mucosa nasal (Cerva *et al.*, 1973; Rivera *et al.*, 1983; De Jonckheere y Michel, 1988; Meyeryan, 1991), así como en suelos agrícolas fertilizados con agua residual y residuos orgánicos, y en la arena de las playas (Sawyer, 1989). Las AVL también pueden hallarse suspendidas en el aire y en las gotas de la lluvia, en su forma quística (Rivera *et al.*, 1987; 1988; 1992; 1994); en muestras de polvo provenientes de hospitales, recámaras, comedores, cuartos de descanso (Miller, 2000), heces fecales de humanos, perros y ganado, además de áreas recreativas y deportivas no forestadas (Meyeryan, 1991).

Como habitantes comunes del suelo, desempeñan un papel importante en los ecosistemas como depredadores de bacterias, esta interacción es relevante en la estabilidad y productividad de la comunidad microbiana, principalmente en el crecimiento de la raíz de las plantas, mineralización y ciclo de los nutrientes (Jjemba, 2001); la tasa de eficiencia de transformación de estos organismos es del 40%, además de representar una reserva de carbono y minerales cuando forman quistes (Anderson *et al.*, 1978).

Las temperaturas que normalmente toleran las AVL están entre los 10 y 30°C, por debajo de los 4°C, solamente especies resistentes al frío como *A. polyphaga* que ha sido aislada de la Antártica pueden sobrevivir. Especies termotolerantes como *N. fowleri* se desarrollan y sobreviven en cuerpos de agua por arriba de los 35°C; ciertas especies de *Hartmannella* pueden tolerar temperaturas por arriba de 48°C. Los factores que controlan la ecología de las AVL patógenas, incluyen la resistencia a altas temperaturas (mayores a 37°C), variaciones de pH,

oxígeno, competencia con otras amebas y hongos, así como la eficiencia en la transformación de la biomasa (Griffin, 1983). Es así como se establece una premisa: todas las especies patógenas son termotolerantes, pero no todas las termotolerantes son patógenas; este es un criterio para separar las posibles especies patógenas y de aquellas difícilmente patógenas para el hombre (Rivera *et al.*, 1993).

Amebas patógenas han sido aisladas de aguas contaminadas térmicamente por plantas generadoras de energía, las temperaturas de aislamiento oscilan entre los 10 a 37°C durante el invierno y 35 a 37°C durante el verano en regiones templadas (De Jonckheere, 1981). El enquistamiento es la manera como las amebas responden a condiciones ambientales adversas, los quistes pueden sobrevivir a condiciones adversas como sequías, cambios de pH, falta de alimento y oxígeno; el trofozoito puede tolerar la salinidad y la presión osmótica, así por ejemplo *Acanthamoeba* tolera condiciones extremas y ha sido aislada de sedimentos a 2,500 m de profundidad.

Las AVL son capaces de establecer relaciones simbióticas con otros microorganismos como bacterias, virus, viriones, micoplasmas y otros protozoos (Newsome *et al.*, 2001). Estas interacciones pueden conducir a las amebas a la muerte o sobrevivencia. Un ejemplo de esta relación es *Legionella pneumophila*. *Legionella* puede sobrevivir dentro de la células de *Acanthamoeba* (Cirillo *et al.*, 1999; Wineka-Krusnell *et al.* 2001; De Bucck *et al.*, 2004); otras ocasiones la endosimbiosis provoca que las amebas proliferen en medio axénicos (Old y Darbyshire, 1980). Otros reportes señalan un incremento en la virulencia de *Acanthamoeba* con endosimbiontes gramnegativos y *Chlamydia* (Fritsche *et al.*, 1998). También pueden establecer relaciones con casi todos los vertebrados (Visvesvara, 1990, 1991), se desconoce si algunas de estas infecciones en animales funcionan como portadores o reservorios de las infecciones humanas, pero el tipo de especies de amebas varía de acuerdo a las características de los animales, como temperatura del cuerpo, pelo, piel y dieta (Meyeryan, 1991). Algunas AVL pueden sobrevivir en el microambiente creado por el cuerpo como nasofaringe, cavidad nasal y oral (Skocil *et al.*, 1972; Rivera, 1984), también pueden proliferar en quemaduras o infecciones de la piel (Rivera *et al.*, 1989).

En la atmósfera, las AVL pueden encontrarse de manera individual, formando agregados o bien adherirse a partículas de polvo. Su sedimentación dependerá, además de su tamaño en el aire en calma, de los procesos atmosféricos, tales como la difusión turbulenta en el viento y la convección térmica. En la atmósfera la viabilidad de las células transportadas dependerá de la velocidad del viento, el tiempo de permanencia en el aire, la humedad relativa, la luz solar y las sustancias suspendidas en la atmósfera (Rodríguez-Zaragoza, 1994); además pueden estar

sujetas a ser retiradas de la atmósfera por la lluvia, la nieve y el granizo, así como por la depositación, en la que juegan un papel importante el tamaño y la forma del organismo (Rivera *et al.*, 1987, 1994).

1.4 Ciclos de vida

Los ciclos de vida de las AVL comprenden una etapa de trofozoito que se alimenta y reproduce y una fase quística, como una forma de sobrevivencia a condiciones adversas. Las características de los ciclos de vida, de las amebas patógenas se describen a continuación:

La ameba patógena *Naegleria* puede presentar formas ameboflageladas, una fase transitoria flagelada que no se alimenta ni se divide. Los trofozoitos se enquistan en condiciones adversas y sobreviven bajo estas condiciones adversas por meses o años. El trofozoito es la fase invasiva de *N. fowleri*, la infección se adquiere por la aspiración de agua que contenga amebas, por la cavidad nasal, atraviesan el neuroepitelio olfatorio, penetrando a la cavidad craneal, quistes y formas flageladas pueden llegar por este medio y entrar en contacto con el bulbo olfatorio, revertiendo a trofozoitos, para iniciar la invasión. Únicamente se encuentran trofozoitos y no quistes en las áreas más afectadas del huésped (John, 1993). A diferencia de *Naegleria*, *Acanthamoeba* no presenta una fase flagelar. La puerta de entrada puede ser a través de la piel o mucosas, así como la aspiración de agua o aire contaminados con trofozoitos o quistes y causar enfermedad fatal en el SNC, los ojos y otros órganos (Rivera *et al.*, 1984).

1.5 Taxonomía de las amebas de vida libre

El estudio de las AVL está basado en clasificaciones que contemplan criterios morfológicos del trofozoito y del quiste. Sin embargo, debido a que las características morfológicas son compartidas por varias amebas, se dificulta la identificación y es necesario considerar otros criterios como son: formas de crecimiento en cultivo, tolerancia a la temperatura, ultraestructura, requerimientos nutricionales y patogenicidad, entre otras. Page en 1966 contribuyó al estudio taxonómico de las AVL, cuya clasificación se apoya en características de ultraestructura, inmunológicas, estructuras nucleares, formas de locomoción y patrón de división durante la mitosis. Page (1988) continuó separando el género *Acanthamoeba* del género *Hartmannella* con base en su locomoción, formación de acantópodos y morfología del quiste. El sistema taxonómico que describe con precisión el lugar que ocupan las principales familias de amebas dentro del grupo de los protozoos, se debe a Page (1988) y se muestra la tabla 1.

Tabla 1. Ubicación taxonómica de las principales amebas de vida libre (Page, 1988).

Reino Protista	Haeckel, 1866
Subreino Protozoa	Goldfuss, 1818, emend. Von Siebold, 1846.
Phylum Sarcomastigophora	Honigberg y Balamuth, 1963.
Subphylum Sarcodina	Shmarda, 1871
Superclase Rhizopodea	Von Siebold, 1845
Clase Lobosea	Carpenter, 1861.
Subclase Gymnamoebia	Haeckel, 1862
Orden Euamoebida	Lepsi, 1960
Familia Hartmannellidae	Volkonsky, 1931; emend. Page, 1974
<i>Hartmannella</i> , <i>Saccamoeba</i> , <i>Glaeseria</i> , <i>Cashia</i>	
Familia Vahlkampfiidae	Jollos, 1917
<i>Vahlkampfi</i> , <i>Naegleria</i> , <i>Tetramitus</i>	
Orden Leptomyxida	Pussard y Pons, 1976; emend. Page, 1987
Familia Leptomyxidae	Pussard y Pons, 1976; emend. Page, 1987
<i>Leptomyxa</i>	
Orden Acanthopodina	Page, 1976
Familia Acanthamoebidae	Sawyer y Griffin, 1975
<i>Acanthamoeba</i> , <i>Protoacanthamoeba</i>	

Recientemente se han desarrollado nuevas metodologías diagnósticas como la evaluación electroforética de las proteínas y las enzimas; se emplea frecuentemente en la elucidación de los patrones de relación y diferenciación genética a nivel de especie en algunos protozoos de difícil clasificación, logrando así, caracterizar cepas que desde el punto de vista morfológico pueden resultar muy parecidas o a veces idénticas (De Jonckheere, 1984; Fields *et al.*, 1990; Khan *et al.*, 2002).

Las técnicas inmunológicas como la inmunofluorescencia indirecta, se basan en el uso de antisueros (De Jonckheere, 1984); la técnica de ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima) (Marciano-Cabral, 1987); otras pruebas se apoyan en la tinción de organelos que requieren alrededor de 20 segundos para realizarlo (Pirehma *et al.*, 1999).

El empleo de otras técnicas facilitan e incrementa el número de muestras que se pueden procesar al mismo tiempo, logrando identificar organismos a nivel de género en cuatros horas, que puede ser importante para determinar el éxito en el tratamiento de un paciente. Un ejemplo es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), la cual ha sido empleada para detectar y determinar AVL en tejidos como córnea (Howe *et al.*, 1997), cerebro y líquido cefalorraquídeo y en el ambiente (Brown y De Jonckheere, 1994; Marciano-Cabral *et al.* 2003; Shehan *et al.*, 2003); también ha comenzado a utilizarse sondas de ADN en la detección de AVL patógenas (Sparagano, 1993); patrones de bandeado de ADN mitocondrial con enzimas de restricción (Milligan y Band, 1988; Yagita *et al.*, 1999; Walochnik *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2004).

La prueba de PCR, es un método enzimático *in vitro* que efectúa miles de copias de un segmento de ADN preseleccionado. Para llevar a cabo esta técnica son necesarios dos oligodesoxinucleótidos sintéticos ("forward" y "reverse", que son los iniciadores o primers), la enzima ADN polimerasa termoestable y los cuatro desoxirribonucleosidos trifosfatados activos en un ADN templado y una solución amortiguadora (Sparagano, 1993; Johnson, 2000).

1.6 Enfermedades por amebas de vida libre

El estudio de estas amebas de vida libre señala que las enfermedades que afectan al ser humano incluyen a los géneros: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Hartmannella* (Shuster, 2002). Los signos y síntomas producidos por las AVL patógenas se agrupan en tres enfermedades bien definidas: la meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP), causada por *Naegleria fowleri*; la encefalitis amebiana granulomatosa (EAG), en ambas enfermedades se afecta el sistema nervioso central. La otra es la queratitis amebiana crónica, causada por *Acanthamoeba* spp.

En el caso del género *Acanthamoeba* son varias las especies que resultan patógenas para el humano (Tabla 2). Se comportan como organismos oportunistas, porque incluso habitan en las fosas nasales de humanos (Cerva *et al.*, 1973; Rivera *et al.*, 1986). Para que *Acanthamoeba* logre infectar se deben conjugar factores de predisposición como embarazo, alcoholismo, quimioterapia, radioterapia, diálisis, trasplantes, etc., y/o asociación con enfermedades como síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), diabetes, neumonías, otitis, faringitis, cirrosis, hepatitis, (Martínez, 1991; Gordon *et al.*, 1992; Weldon-Linne, 1992; Millar, 2000; Marciano-Cabral *et al.*, 2000, 2001; Seijo *et al.*, 2001).

Tabla 2. Infecciones humanas causadas por amebas de vida libre (John, 1993;).

Especies	Infección en el SNC	Infección ocular	Infección en otros tejidos
<i>Acanthamoeba astronyxis</i>	X		Nódulos linfáticos, adrenales y piel, (ulceraciones), tiroides y senos nasales
<i>A. castellanii</i>	X	X	Pulmón (neumonía) próstata, hueso, músculo y piel
<i>A. culbertsoni</i>	X	X	Hígado, bazo, útero y piel
<i>A. hatchetti</i>		X	
<i>A. palestinensis</i>	X		
<i>A. polyphaga</i>	X		
<i>A. rhyzodes</i>	X	X	
<i>Hartmannella vermiformis</i>	X		
<i>Balamuthia mandrillaris</i>	X		Pulmón
<i>Naegleria fowleri</i>	X		

SNC: Sistema Nervioso Central.

El principal padecimiento causado por este género es a nivel del SNC donde provoca la enfermedad llamada encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) o acantamebiosis; esta patología presenta un largo curso clínico con signos y síntomas neurológicos que dependen del sitio dañado; la vía de entrada de estos organismos puede ser a través de la piel o de las mucosas y por aspiración nasal de agua o aire contaminados con amebas o quistes, las lesiones se caracterizan por ser granulomatosas, encontrando en ellas tanto trofozoitos como quistes (García *et al.*, 1997; Miguelés y Kumar, 1998:).

La EAG también puede ser causada por otro tipo de amebas. Visvesvara y colaboradores (1990), aislaron una ameba leptomixida del cerebro de un mandril con encefalitis, que era considerada como un organismo inocuo del suelo, a la que denominaron más tarde *Balamuthia mandrillaris*, advirtiendo sobre el potencial peligro de esta ameba como agente etiológico de encefalitis en humanos. Recientemente, Gordon (*op. cit.*) señalaron que el curso prolongado de la enfermedad y la presencia de granulomas en el cerebro y la piel del paciente, producidos por *Balamuthia mandrillaris*, son muy parecidos a los de la infección clásica de EAG producida por *Acanthamoeba* spp. En México, Jaramillo y colaboradores (1989), informaron el primer caso de infección por *Balamuthia mandrillaris*, identificando lesiones necro-hemorrágicas en el encéfalo, el mesencéfalo, el puente y el bulbo. En Venezuela, Rodríguez y colaboradores (1998), reportaron dos casos de EAG por *B. mandrillaris* en individuos aparentemente inmunocompetentes. Esta especie ha sido identificada por pruebas de inmunofluorescencia en 35 casos *post mortem* de encefalitis amebiana en humanos y en tres casos en animales (Huang *et al.*, 1999). Sin embargo, *B. mandrillaris* crece en una gran variedad de cultivos celulares de mamíferos y mata a los ratones después de una inoculación intranasal o intraperitoneal, en un periodo de 8 a 10 días (Campos *et al.*, 1999; Pritzker *et al.*, 2004). Gelman y colaboradores (2001), reportaron el primer caso de infección por *Sappinia diploidea* en un individuo con sinusitis

Además, el género *Acanthamoeba* produce queratitis ocular en usuarios de lentes de contacto independientemente de su estado de salud (Kilvington *et al.*, 1991; Martínez, 1983, 1985; Nerad *et al.*, 1992). La invasión es directa en la córnea después de un traumatismo, también la queratitis amebiana ha sido relacionada con los portadores de lentes de contacto (Froumis *et al.*, 2001), el empleo de soluciones salinas de limpieza preparadas en casa y la desinfección poco frecuente o inadecuada de las lentillas (Niederkarn *et al.*, 1999; Tomlinson *et al.*, 2000:).

La mayoría de los casos de la MEAP ocurren principalmente en individuos jóvenes con una historia previa de haber estado practicando actividades relacionadas con el agua (Wiley *et al.*, 1987; Visvesvara *et al.*, 1990; Gordon *et al.*, 1992; Fiordalasis, 1992; Cabanes, 2001). El padecimiento es de desenlace rápido y fatal. La mayoría de los casos de MEAP ocurren durante

los meses de verano, cuando la temperatura ambiental es alta. Esta enfermedad ha sido reportada en países como Bélgica, República Checa, Gran Bretaña, Australia, Estados Unidos y México (Rivera *et al.*, 1984).

1.7 Estado actual del problema

En el mundo se han reportado 250 casos de meningoencefalitis por AVL hasta julio de 1989 (Ma *et al.*, 1990). A pesar de no conocerse la verdadera frecuencia de infecciones en humanos por las amebas de vida libre, se sabe con certeza de 340 casos de infecciones del SNC a nivel mundial causadas por dichos organismos (Rodríguez *et al.*, 1998). La mayoría de los casos se han debido a *N. fowleri*. Aproximadamente 56 casos han sido a causa de *Acanthamoeba* o de alguna otra AVL (Visvesvara y Stehr-Green, 1990).

Los estudios de AVL en México se iniciaron por Rivera y colaboradores (Rivera y Paz, 1978; Rivera *et al.*, 1984), quienes reportaron amebas del género *Naegleria* en reservorios naturales de agua dulce de la Ciudad de México y a *N. fowleri* de agua de piscinas de la misma ciudad (Rivera *et al.*, 1983). Se han reconocido hasta el momento en México 10 casos de MEAP *post mortem* (Valenzuela *et al.*, 1984; López-Corella *et al.*, 1989; Lares-Villa *et al.*, 1993) y dos más mientras los pacientes se encontraban vivos (Rodríguez-Pérez, 1984).

Algunos reportes señalan a *Naegleria lovaniensis* no patógena a pesar de haberse aislado del líquido cefalorraquídeo (Rivera *et al.*, 1989). *N. lovaniensis* es altamente virulenta en ratones, sin embargo no se han demostrado infecciones en el hombre (De Jonckheere, 1984)

En México existen las condiciones climáticas adecuadas para el desarrollo de AVL patógenas y los casos de EAG y MEAP representarían solo una pequeña parte de los que en realidad pueden existir. Es posible que algunos casos de EAG sean atribuidos a infecciones bacterianas o virales (Rivera *et al.*, 1989).

En la actualidad los métodos con los que contamos no reúnen los requerimientos de rapidez, especificidad, sensibilidad y confiabilidad para diagnosticar *Acanthamoeba*. Los criterios morfológicos no son todo lo adecuados que deseáramos, y deben combinarse con las características de termotolerancia, virulencia en animales de laboratorio y variabilidad genética de los aislados de *Acanthamoeba*, para tener un diagnóstico más preciso del organismo. Por ello

se pretende implantar el uso de la técnica del PCR con iniciadores específicos de las amebas aisladas para la diferenciación específica y rápida de acantamebas patógenas.

1.8 Justificación

En Mexicali, Baja California, desde 1990 se han reportado brotes y muerte anuales de encefalitis (de 5 a 13 casos en cada ocasión) sin precisar el origen de la infección. Los reportes clínicos señalan a los meses de agosto y septiembre, una época de calor extremo para ese estado del país (Ontiveros, 1995). Las autoridades del Instituto Mexicano del Seguro Social del estado de Baja California se interesaron en explorar los posibles agentes causales de los brotes y tipificar la infección con el objetivo de buscar bacterias y virus, la causa más común de este padecimiento. Los estudios no se enfocaron en la búsqueda de AVL, sin embargo, las pruebas resultaron negativas y la enfermedad incierta (Ruiz-Matus, com. pers.).

Los expedientes médicos de los pacientes que fallecieron en Mexicali indican un antecedente previo a la enfermedad, fue el hecho de haber nadado en los canales de riego en la zona. Dichos canales son utilizados por la gente, sobre todo en el verano, para nadar y mitigar el excesivo calor de la zona de Mexicali que en algunos lugares puede alcanzar más de 55°C, pudiendo llegar la temperatura del agua a 40°C; temperatura ideal para el desarrollo de amebas patógenas. Ante posibles nuevos brotes de encefalitis se presentó este trabajo para la búsqueda de amebas patógenas que pudiera estar implicada en el origen de la enfermedad reportada en esta zona geográfica. Los muestreos en la zona podrían demostrar la presencia de amebas que pudieran estar relacionadas con los casos de encefalitis mencionados. Lo anterior justifica el inicio de un estudio global, biomédico y ecológico, de los organismos aislados en Mexicali B. C. De aislarse amebas patógenas de esos canales de riego, se podría establecer la participación de las AVL como el posible agente causal de las infecciones y ello permitiría hacer el seguimiento ecológico y biomédico de esta ameba, y con ello aplicar el conocimiento generado para la prevención de más brotes de encefalitis causadas por amebas patógenas.

Algunos casos de encefalitis han sido reportados cerca de la frontera con México y han justificado la necesidad de cooperación entre México y los Estados Unidos para hacer estudios en nuestro territorio con el objeto de detectar los factores de riesgo que puedan ayudar a la prevención y control de la encefalitis amebiana en ambos países (De Napoli, 1996; Levy, 1998).

2. Descripción del área de estudio.

2.1. El estado de Baja California

La península de Baja California, esta situada en el noroeste de la República Mexicana, cuenta con una superficie de 70, 470 98 km² colinda al norte y al este con Estados Unidos de América, el estado de Sonora y el Golfo de California; al sur con el Golfo de California y el municipio de Ensenada; al oeste con los municipios de Ensenada, Tecate y Estados Unidos de América; y ocupa el doceavo lugar como entidad federativa en función de su extensión (3.76% del territorio nacional).



Figura 1. Ubicación geográfica de la península de Baja California, en donde se localiza la zona del valle de Mexicali.

*Población

2.2 Localización.

Mexicali nombre geográfico que identifica a la localidad (18% de la superficie del estado funge como cabecera del municipio del mismo nombre y ciudad capital del estado de Baja California está situada en la parte noroeste de la Península Baja Californiana, con coordenadas geográficas de 32° 39' 48" de latitud norte, 115° 28' 4" de longitud oeste y una altura de 3 metros respecto al nivel del mar (Figura 1).

El topónimo Mexicali, al igual que el de la vecina población de Caléxico, en Estados Unidos, surgió de la combinación de las palabras México y California, nombre dado por el coronel Agustín Sanginés, en marzo de 1902, al visitar el lugar con objeto de revisar las obras de irrigación que se estaban realizando (INEGI, 1993). Su población está constituida por 505 016 habitantes (INEGI, 2002), se dedica principalmente a la actividad agrícola; se cultiva trigo, cebada, algodón, alfalfa, avena, además de sandía, melón, maíz, vid y frijol. Importante también es la actividad industrial, sobre todo la relativa al procesamiento de alimentos y la maquila. En Mexicali se localiza la máxima concentración fabril del estado. Turísticamente la ciudad posee la infraestructura suficiente para recibir visitantes de todos los niveles, es decir, tiene hoteles, restaurantes y centros recreativos de diversos tipos.

2.3. Fisiografía

El área de estudio se encuentra dentro de las provincias de la llanura sonorensis, que comprende la subprovincia del Desierto de Altar. En esencia define un sistema de topofomas con una extensa llanura con desarrollo de lomerío con bajada, lomerío con llanura, y campo de dunas. Las elevaciones topográficas varían desde el nivel del mar hasta los 2,080 msnm, elevación máxima que corresponde a la Sierra La Laguna (CGSNEGI, 1995).

2.4 Geología.

De acuerdo a la carta geológica de la CGSNEGI (1995), se encuentran dos tipos de suelo: suelos cuaternarios y terciarios, conformados principalmente por roca sedimentaria, se presentan mezclas de arenisca-conglomerado, lutita-arenisca; y roca ígnea-intrusiva-ácida, metalvucánica, la edad geológica data del cretácico.

2.5 Clima

En el Valle de Mexicali, de acuerdo con la carta estatal de climas de CGSNEGI (1995), el área de estudio presenta un clima muy seco y cálido BW(h'), la precipitación más alta se da en los

meses de agosto a septiembre con medias de 45 a 49 mm, y las mínimas se registran en abril, mayo y junio; son inferiores a los 4 mm. la precipitación media anual es de 76.8 mm; la temperatura media anual es entre 22 a 24°C, la temperatura extrema máxima mensual corresponde a agosto con 45.9°C, la temperatura mínima mensual se registra en el mes de enero con 14°C (CNA, 1998).

2.6 Vegetación

De acuerdo a la carta de uso de suelo y vegetación (CGSNEGI, 1996), la vegetación de la zona se encuentra dominada por manchones de matorral sarcocaula, las especies más representativas son *Ambrosia dumosa* (hierba del burro), *Larrea tridentata* (gobernadora), *Fouquieria splendens* (ocotillo, palo adán), *Atriplex* sp. (chamizo), *Aloysia* sp. (vara dulce), *Clopidia suaedaefolia* (saladilla), así como escasa vegetación de bosque de encino-pino (1% de la superficie municipal).

Es importante resaltar que la vegetación ha sido fuertemente alterada principalmente por las actividades humanas, como son el crecimiento de la población, las actividades agrícolas e industriales, que han ocasionado que la vegetación original se esté perdiendo. Por otra parte, la población utiliza las plantas mencionadas en forma muy variada, ya sea como uso medicinal, ornamental y combustible, además de servir como material de construcción.

2.7 Hidrología

El Valle de Mexicali es una extensa región que esta muy cerca del Valle Imperial en el sudeste de California. Es un ambiente desértico donde existe un extenso sistema agrícola que depende de una compleja red de canales artificiales y cuerpos de agua para su irrigación, que se originan del Río Colorado, que inicia en las partes altas de las montañas Rocosas del Colorado. El agua proviene del deshielo y las lluvias de esa región y se complementa por los ríos Gunnison, Green, San Juan, Little Colorado, Virgin y Gila. La corriente principal la constituye el río Colorado, el cual es de carácter internacional. Al entrar en la República Mexicana cruza de norte a sur al Distrito de Riego 014, dividiéndose en dos regiones agrícolas, ubicadas en ambos márgenes del río, el Valle de Mexicali y el Valle de San Luis, formando la parte más baja de la cuenca. El recorrido total en nuestro país es de 183 km y aporta 2650 millones de m³ anuales de agua. Lo reducido de la cuenca del río Colorado y la escasa precipitación en territorio mexicano, traen como consecuencia que prácticamente no existan escurrimientos. Las dos regiones son regadas por gravedad, así como con pozos de bombeo; las aguas que se utilizan son diferentes en cuanto a su composición química, siendo de mayor salinidad las aplicadas en el Valle de San Luis por utilizar aguas de drenaje agrícola del Valle de Yuma, Arizona (CGSNEGI, 1996).

2.8 Agricultura

La agricultura que se efectúa es de riego con labranza mecanizada, se emplean fertilizantes y pesticidas. Las técnicas de riego utilizadas son por gravedad y goteo. Los cultivos principales son en general de ciclos anuales y perennes. Se cultiva haba, Sandía, melón, lechuga, repollo, algodón cebada, alfalfa, frijol entre otros. Se obtienen rendimientos medios o altos de los principales cultivos, por lo que la producción se destina al comercio nacional, internacional, regional y al autoconsumo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar la presencia y distribución de las AVL potencialmente patógenas en 16 canales de riego del Valle de Mexicali, Baja California.

3.2 Objetivos particulares

- . Aislar e Identificar las amebas de vida libre de los canales de riego del Valle de Mexicali.
- . Determinar la frecuencia de las amebas de vida libre en los canales de riego
- . Conocer la relación entre la presencia de estas amebas con la aparición de bacterias totales y coliformes fécales y los parámetros ambientales (temperatura ambiental y del agua, oxígeno disuelto, pH, conductividad, cloro libre residual y sólidos suspendidos).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Métodos de campo.

Se llevaron a cabo tres muestreos para este trabajo, comprendiendo aquellas épocas más calurosas del año con marcados cambios ambientales de temperatura, esto con el fin de evaluar si las temperaturas ambientales elevadas en Mexicali tienen influencia en la población de AVL y relacionar su presencia en el agua con los brotes de encefalitis que se dan anualmente en la región. Los meses considerados fueron marzo de 2002, septiembre de 2002 y octubre de 2003.

La selección de los canales de agua de riego en Mexicali, Baja California, se hizo con los criterios de cuáles eran los más populares para nadar y porque en la historia clínica de varios de los pacientes reportados con encefalitis se anotó que habían nadado en algunos de esos cuerpos de agua, una a dos semanas antes de haber adquirido la infección (Lares y Ontiveros, com. pers.) (Lares-Villa *et al*, 1993).

Los canales muestreados (primero y tercer muestreo realizados en marzo de 2002 y octubre de 2003) fueron los siguientes:

Independencia (Ley)

Abasolo

Tulicheck Ejido Xochimilco

Canal Irapuato

Ladrillera 1

Ladrillera 2

Alimentador del Norte (Chuma)

Represa Morelos

Coronita

Silva Sur

Nayarit

Oaxaca

Morelos (independencia)

Morelos (chapoteadero)

Silva Sur 2

Islas Agrarias B

Para el segundo muestreo (septiembre de 2002), por cuestiones técnicas se eligieron los siguientes siete canales:

Coronita
Nayarit
Oaxaca
Canal Irapuato
Islas agrarias B
Abasolo
Independencia (Ley)

4.2 Muestreo y procesamiento de las muestras

La toma de las muestras de agua para los análisis de laboratorio se efectuó de la siguiente manera:

Para la identificación y cultivo, se tomaron muestras de 1 L de agua, de cada uno de los canales, en frascos de polipropileno de boca ancha previamente esterilizados. En todos los casos las muestras de agua fueron transportadas al laboratorio a temperatura ambiente en 32 horas.

En el muestreo I y II se tomaron muestras a 10 cm por abajo de la superficie, sin embargo para el muestreo III se analizaron otras profundidades de los cuerpos de agua que originalmente no estaba contemplada en los objetivos del trabajo. Para determinar la presencia de estos organismos en otras zonas del cuerpo de agua, se tomaron muestras de agua a 10 cm. por debajo del espejo del agua (igual que en el muestreo I y II) Debido a que los canales son muy someros y su profundidad varía entre 0.30 m a 2.6 m se decidió tomar muestras a dos terceras partes de de la profundidad total (Tabla 18. Apéndice 2) y una tercera muestra que consistió tomar sedimento adherido a la pared del canal (perifiton).

4.3 Medición de factores ambientales.

Determinaciones en el campo. Las determinaciones de los factores fisicoquímicos se realizaron superficialmente con el fin de establecer su relación con los aislamientos amebianos obtenidos. Pruebas realizadas para el muestreo I, II y III:

Conductividad, con el conductímetro Walklab Trans Instruments LTD.

pH, con un potenciómetro pHTestr 2 Oakton Instruments.

Oxígeno disuelto (OD) con un oxímetro digital Hanna Instruments modelo HI 9143.

Temperaturas con un termómetro digital Hanna modelo HI9050.

Coliformes totales determinadas con un kit de muestreo Coli Count Water Tester Millipore Bedford MA.

Pruebas adicionales realizadas para el muestreo III.

Bacterias heterótrofas totales determinadas con un kit de muestreo Total Count Water Tester Millipore, Bedford MA.

Cloro libre residual determinado por el método colorimétrico ortotoluidina con el Kit para determinar cloro libre Hanna HI3831F.

Sólidos suspendidos, fijos y volátiles. Muestras por duplicado fueron enviadas en un lapso menor de 48 horas al laboratorio de Bioprocesos Ambientales del Instituto de Ingeniería Ambiental de la UNAM para ser determinadas de acuerdo al método 2540.D, según APHA, (1992).

4.4 Métodos Experimentales

4.4.1 Aislamiento y cultivo de AVL

Aislamiento de amebas de vida libre se realizó por concentración de las muestras por filtración y centrifugación. Las muestras se procesaron según el método descrito por De Jonckheere (1987) para aislar amebas de vida libre.

Volúmenes de agua de 50 mL se centrifugaron a 1500 x g durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el sedimento se inculó sobre placas con medio de agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes* (medio NNE) muerta por calor (65°C durante 30 minutos, Apéndice 1) la cepa bacteriana es empleada como fuente proteica para que las amebas se alimenten (Rivera *et al.*, 1981, De Jonckheere, 1987; Kalinina y Page, 1992).

Las placas de Petri inoculadas de esta manera se guardaron de forma invertida dentro de bolsas de plástico, para evitar su desecación (Delatre y Oger, 1981; Martinez, 1985; Rivera *et al.*, 1992, 1994).

Los cultivos en agar se incubaron a 37°C por 24 horas con el fin de obtener un crecimiento de todas las AVL. Transcurrido este tiempo las placas fueron observadas bajo el microscopio

invertido Nikon TS 100 y se separaron de cada placa de agar NNE todos aquellos organismos de forma y tamaño diferentes extrayendo un trozo de agar en condiciones de esterilidad. Este procedimiento de clonación sirvió para aislar cada una de las cepas. Las amebas separadas de esta forma fueron sembradas en medio NNE nuevo y se reincubaron a 37°C por otras 24 horas.

4.4.2 Identificación morfológica.

La identificación de las AVL se realizó con base en características morfológicas. El paso inicial fue la observación de los trofozoitos y quistes en un microscopio de contraste de fases, utilizando las claves taxonómicas de Page (1966, 1975, 1976, 1988) y de Pussard y Pons (1977). Las muestras fueron observadas directamente a 40 X. Se tomaron las medidas de 50 trofozoitos (longitud y ancho) y 50 quistes (diámetro), reportando media moda, rango, desviación estándar, tamaño de la muestra. Se registraron las diferentes formas adoptadas por el trofozoito y quiste de cada uno de los organismos identificados.

Para observar los aislados, se hicieron preparaciones teñidas con la tinción tricrómica de Gómoni (modificada por Cerva, 1971). Se hizo el registro fotográfico de estas preparaciones en el fotomicroscopio a 800 y 1000 X en contraste de fases. Detalles de la tinción empleada puede consultarse en el Apéndice 1.

4.4.3 Prueba de transformación ameboflagelar

Todos los aislados se analizaron para determinar si tienen capacidad de transformación ameboflagelar.

Esta prueba consistió en colocar gotas de agua destilada sobre la superficie de una caja de NNE inoculada con la ameba que se sospechaba pertenecía a la familia Vahlkampfiidae y se incubó a 37°C durante dos horas. La placa se observó con el microscopio invertido a intervalos de 30 minutos para observar la presencia de formas flageladas. Cuando esta prueba era positiva las amebas se clasificaban en la familia anterior con posibilidades de tratarse de *Naegleria fowleri* (Rivera y Paz, 1978; Rivera, *et al.*, 1978 a, b; De Jonckheere, 1988).

4.4.4 Axenización

Todos los organismos amebianos que se desarrollaron, se pasaron a un medio líquido libre de bacteria con suero fetal de bovino. La importancia de axenizar a los aislados es para asegurar que en las pruebas de patogenicidad con ratones y en las pruebas de biología molecular,

tengamos a la ameba sin ninguna contaminación bacteriana que pudiera producir errores en los resultados. Los trofozoítos se transfirieron a los tubos de cultivo con medio líquido cortando pequeños trozos de las placas de agar NNE en donde se encontraba crecimiento amebiano y se incubaron a 42°C, manteniendo los tubos inclinados y sin agitación con el fin de que las amebas pudieran adherirse a la superficie del tubo (De Jonckheere, 1987).

Los medios líquidos que se utilizaron para axenizar fueron: medio PBSGM (Phosphate Bactocasitone Serum Glucose Medium) o medio Chang, Bactocasitona al 2% y medio PYNFH, (Phosphate: Yeast: Nucleic acid: Folic: Hemin), (Ver Apéndice 1), para evitar contaminación bacteriana, se agregó penicilina sódica, estreptomycin y kanamicina en concentraciones de 200 µg/mL, las amebas no se ven afectadas por los antibióticos.

4.4.5 Análisis estadístico

En el análisis estadístico, se obtuvo el coeficiente de correlación de Pearson (prueba paramétrica) entre la presencia o ausencia de amebas y todas las variables ambientales medidas en las colectas, los cálculos fueron realizados en el programa Statistica versión 6.0, 1998.

5. RESULTADOS

5.1. AVL en las muestras colectadas.

Se realizaron tres muestreos en 16 canales de riego en el Valle de Mexicali, Baja California, durante marzo y septiembre de 2002 y octubre de 2003 con el fin de detectar y determinar la distribución de AVL en los canales de riego.

En el muestreo I (Tabla 3) se estudiaron 16 canales de riego en el Valle de Mexicali, en el Estado de Baja California, durante el mes de marzo de 2002. Nueve de los canales fueron positivos en la detección de AVL dando un total de 16 aislamientos. Los géneros de amebas más frecuentemente aislados fueron *Naegleria* y *Hartmannella* con cuatro aislamientos, siguiéndole *Vahlkampfia*, con tres. El mayor número de aislamientos (tres) se presentó en el canal Coronita con tres y el menor número en los canales Silva sur, Represa Morelos y Nayarit con un solo aislamiento.

El 75% de los aislamientos de AVL con mayor potencial patógeno (*Vahlkampfia*, *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Hartmannella*) fueron obtenidos en los nueve canales que resultaron positivos en la detección de AVL.

Tabla 3. Géneros aislados de AVL determinados en muestras de agua superficial de canales de riego. Muestreo I, marzo, 2002

Lugar	<i>Vahlkampfia</i>	<i>Naegleria</i>	<i>Hartmannella</i>	<i>Acanthamoeba</i>	<i>Rosculus</i>	<i>Willaertia</i>	Total de aislados
Coronita	1	1	1				3
Abasolo			1		1		2
Ladrillera I		1				1	2
Ladrillera II				1	1		2
Tulicheck.	1		1				2
Ejido Xochimilco Morelos (chapoteadero)							0
Independencia (Ley)			1		1		2
Silva sur		1					1
Represa Morelos	1						1
Nayarit		1					1
Subtotal	3	4	4	1	3	1	16
Total							16

En el muestreo II (Tabla 4) corresponde al mes de septiembre de 2002, se estudiaron siete canales de riego, los resultados muestran un total de siete aislamientos de AVL. El canal de riego con mayor números de aislamientos de AVL resultó ser Islas Agrarias, estas pertenecen a

los géneros *Naegleria* y *Vahlkampfia*; en el canal Oaxaca no se obtuvieron aislamientos. Los géneros de amebas más frecuentemente aislados fueron *Naegleria*, *Vahlkampfia* con tres y dos aislamientos respectivamente, también se aislaron organismos del género *Thecamoeba*.

Tabla 4. Géneros aislados de AVL en muestras de agua superficial. Muestreo II (Septiembre 2002).

Lugar	<i>Naegleria</i>	<i>Thecamoeba</i>	<i>Vahlkampfia</i>	<i>Acanthamoeba</i>	Total de aislados
Coronita	1	0	0	0	1
Nayarit	1	0	0	0	1
Oaxaca	0	0	0	0	0
Irapuato	0	1	0	0	1
Islas agrarias B	1	0	1	0	2
Abasolo	1	0	0	0	1
<u>Independencia (Ley)</u>	0	0	1	0	1
Subtotal	4	1	2	0	7
Total					7

En el muestreo III (Tabla 5), realizado en el mes de octubre de 2003, trece de los dieciséis canales muestreados fueron positivos en la detección de AVL, los canales Alimentador Norte, Silva sur y Silva sur 2, se encontraban secos al momento del muestreo, obteniendo un total de 30 aislamientos. En el canal Coronita se registró el mayor número de aislamientos con cinco, correspondientes a los géneros *Vahlkampfia*, *Naegleria*, *Hartmannella*, *Acanthamoeba* y *Amoeba*, los cuatro primeros con potencial patógeno, mientras que el canal Tulicheck-Xochimilco, Independencia Morelos, Represa Morelos y Oaxaca registró el menor número de aislamientos con uno.

Los géneros más frecuentemente aislados fueron *Naegleria* y *Acanthamoeba* con seis aislamientos, *Vahlkampfia* con cuatro. En este sentido 40% de los aislados de AVL con mayor potencial patógeno (*Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Hartmannella* y *Acanthamoeba*) se concentraron en los canales Coronita, Ladrillera II; Nayarit, Islas Agrarias e Independencia (chapoteadero). En el muestreo III se aislaron géneros inócuos hacia el ser humano como *Mayorella*, *Amoeba*, *Vanella* y *Platyamoeba* ausentes en los dos primeros muestreos.

Tabla 5. Géneros aislados de AVL en los canales de riego, Mexicali B. C. Muestreo III, octubre, 2003

Lugar	<i>Vahikampfia</i>	<i>Naegleria</i>	<i>Hartmannella</i>	<i>Acanthamoeba</i>	<i>Rosculus</i>	<i>Willisertia</i>	<i>Thecamoeba</i>	<i>Mayorella</i>	<i>Amoeba</i>	<i>Vanella</i>	Total
Irapuato				1	1						3
Represa		1									1
Morelos											
Morelos		1		1	1					1	5
Ladrillera II											1
Morelos							1				1
(Independencia)											
Morelos	1	1									2
(chapoteadero)											
Oaxaca		1									1
Independencia					1				1		2
(Ley)											
Islas Agrarias			1							1	3
B											
Abasolo	1					1					2
Coronita	1	1	1	1				1			5
Tulicheck Ejido				1							1
Xochimilco											
Nayarit	1	1									2
Ladrillera I				1				1			2
Canal											
alimentador											
norte*											
Silva sur*											
Silva sur 2*											
Subtotal	4	6	2	6	3	2	1	1	1	3	30
total											

*Canales secos

La abundancia y distribución de organismos encontrados en cada canal y en las tres diferentes tomas de la muestra en este muestreo III se presenta en la Tabla 6. El mayor número de aislamientos tanto en superficie como en perifiton fue para el canal Coronita y Ladrillera II con tres aislamientos así como canal Abasolo y Ladrillera II con dos aislamientos respectivamente. En el muestreo a dos tercios de profundidad total el mayor número de aislamientos se obtuvo en los canales Coronita, Represa Morelos e Irapuato con un aislamiento.

El mayor número de aislamientos considerando el tipo de muestreo se registró en el perifiton con 13 aislamientos y 14 en el muestreo superficial y la menor se registró a 2/3 de profundidad con dos aislamientos. El muestreo superficial presentó el mayor número de aislamientos de géneros potencialmente patógenos con diez predominando *Acanthamoeba* y *Naegleria*.

Tabla 6. Géneros amebianos aislados en diferentes microhábitats durante muestreo III.

Ejido o canal	Agua		
	Muestreo superficial	Muestreo 2/3	Perifiton
Irapuato	<i>Acanthamoeba</i> spp.	<i>Rosculus</i>	<i>Platyamoeba</i>
Represa Morelos	<i>Naegleria</i>		
Ladrillera II	<i>Rosculus</i> <i>Acanthamoeba</i> spp. <i>Willaertia</i>		<i>Naegleria</i> <i>Vanella</i>
Morelos (Independencia)			<i>Thecamoeba</i>
Morelos (chapoteadero)	<i>Naegleria</i>		<i>Vahlkampfia</i>
Oaxaca			<i>Naegleria</i>
Independencia (Léy)	<i>Rosculus</i>		<i>Vanella</i>
Islas Agrarias B	<i>Vanella</i> <i>Hartmannella</i>		<i>Acanthamoeba</i> spp
Abasolo			<i>Vahlkampfia</i> <i>Willaertia</i>
Coronita	<i>Acanthamoeba</i> spp. <i>Hartmannella</i> <i>Naegleria</i>	<i>Vahlkampfia</i>	<i>Amoeba</i>
Tulicheck Ejido Xochimilco.			<i>Acanthamoeba</i> spp
Nayarit	<i>Naegleria</i>		
Ladrillera I	<i>Acanthamoeba</i> spp.		<i>Mayorella</i>
Canal alimentador norte			
Silva sur*			
Silva sur 2*			

* Canales secos

Finalmente los géneros más frecuentemente aislados fueron *Naegleria*, *Vahlkampfia* y *Acanthamoeba* con 32 organismos, mientras que *Mayorella*, *Amoeba* y *Thecamoeba* presentaron tres aislados (Tabla 7).

Tabla 7. Total de Géneros amebianos aislados en los tres muestreos en Mexicali, B. C.

Género	No. de aislamientos
<i>Naegleria</i>	13
<i>Vahlkampfia</i>	9
<i>Acanthamoeba</i>	9

<i>Hartmannella</i>	6
<i>Rosculus</i>	5
<i>Willcertia</i>	3
<i>Vanella</i>	3
<i>Thecamoeba</i>	2
<i>Mayorella</i>	1
<i>Amoeba</i>	1
<i>Platyamoeba</i>	1
Total	53

En la Tabla 8 se muestra el número de aislamientos obtenidos durante los tres muestreos, con 53 gimnamebas.

Tabla 8. Número de aislamientos por canal en tres muestreos en Mexicali, B. C.

Lugar	No. de aislamientos
Coronita	9
Ladrillera II	8
Abasolo	5
Irapuato	4
Islas Agrarias B	4
Nayarit	4
Ladrillera I	4
Morelos (Independencia)	3
Tulicheck Ejido Xochimilco	3
Independencia (Ley)	3
Represa Morelos	2
Morelos (chapoteadero)	2
Oaxaca	1
Canal alimentador norte	0
Silva sur	0
Silva sur 2	0
Total	53

Tomando en consideración la toma de la muestra en superficie durante los tres muestreos, el mayor número de aislamientos se presentó en el muestreo I con 16. Los canales que mostraron un incremento en el número de aislamientos respecto del muestreo I al realizado en el mes de octubre (muestreo III) fueron: Ladrillera II con un incremento de frecuencia de 2 a 3 aislamientos, también ocurrieron aumento en Irapuato, Chapoteadero, Independencia Ley e Islas Agrarias B.

La ubicación espacial de los aislamientos amebianos en los diferentes canales estudiados se muestran en la figura 2. Un aspecto interesante es la proximidad que guardan los diferentes aislamientos con la población humana. Únicamente Independencia ley, dentro de la ciudad de Mexicali, el resto corresponde a la zona rural, dotados con los servicios públicos indispensables,

excepto los ejidos Silva sur y Silva sur 2, Ladrillera I y II, que carecen de sistema de alcantarillado, sin embargo utilizan fosas sépticas para sus necesidades fisiológicas, no obstante se descarta la infiltración de desechos humanos hacia los cuerpos de agua, puesto que los canales están revestidos de concreto.

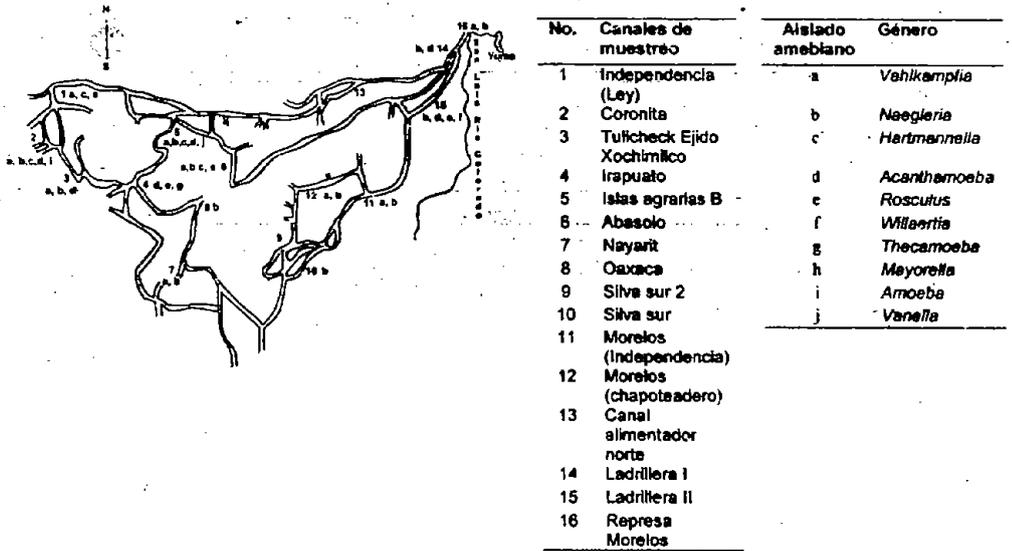


Figura 2. Ubicación espacial del total de los géneros amebianos aislados determinados en los tres muestreos en el Valle de Mexicali, B. C (muestreo I: marzo. 2002; muestreo II: sep. 2002; muestreo III: oct.2003).

5.2. Factores ambientales

5.2.1. Determinaciones en campo.

Temperatura del agua.

De la información contenida en las figuras 3, 4 y 5 se resumen las temperaturas medidas durante los tres muestreos, la menor temperatura registrada correspondió para el canal Represa Morelos con 16.0°C y la temperatura mayor fue de 31.8°C para el canal Irapuato en el muestreo II, también se observa que en el transcurso de los tres muestreos hubo cambios drásticos en la temperatura del agua, en el muestreo I se presentaron las temperaturas del agua más bajas las cuales no sobrepasan los 20°C, excepto en el canal Morelos (Chapoteadero) con 25°C, los valores que se alcanzan en el muestreo II son de 30°C a excepción del canal Coronita y Oaxaca.

En el muestreo III hubo un comportamiento homogéneo no hay una separación marcada en la temperatura en los diferentes canales que va desde los 20.8 a 28.1°C.

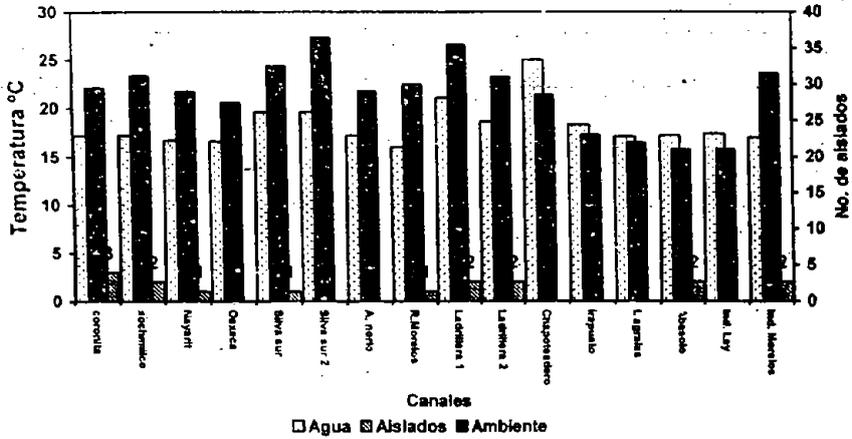


Figura 3. Temperatura del agua y el ambiente y número de aislados de AVL durante el muestreo I, marzo 2002. El dígito sobre la barra de los aislados representa el número de amebas recuperadas de cada canal.

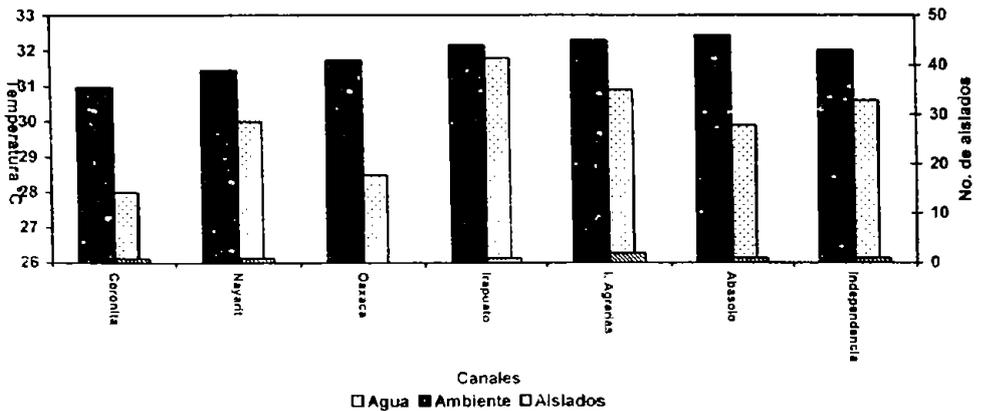


Figura 4. Temperatura del agua y el ambiente, y número de aislados de AVL durante el muestreo II, septiembre 2002.

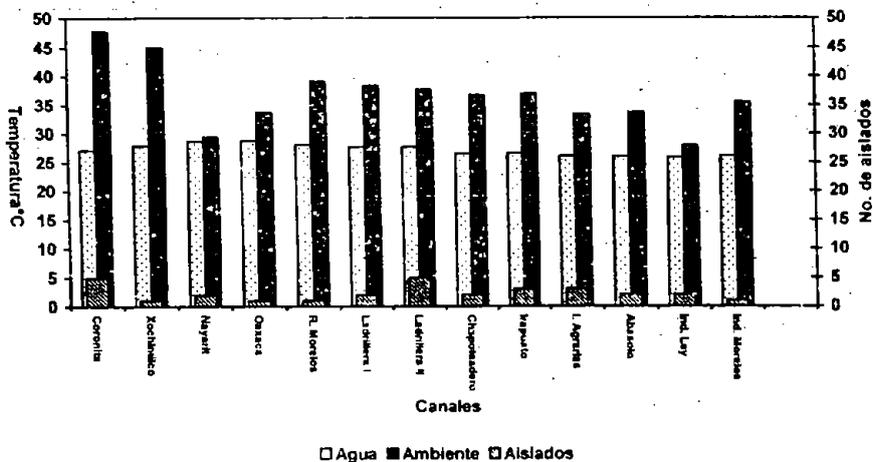


Figura 5. Temperatura del agua y el ambiente, y número de aislamientos de AVL durante el muestreo III, octubre 2003.

Temperatura del ambiente.

De la información contenida en las figuras anteriores (4, 5 y 6) se representan la temperatura ambiental en el transcurso de los tres muestreos. En la Figura 3 se observa que el valor mínimo fue para el canal Abasco e independencia Ley con 21.0°C en el muestreo I y la mayor temperatura se registro en el canal Coronita con 47.8°C en el muestreo III (Figura 5). Cabe señalar que los valores de la temperatura ambiental para el muestreo I fluctuaron entre los 20 y 36.5°C (Figura 3), como se puede ver en la figura 4, en el muestreo II se presentaron los valores más altos sobrepasando los 40°C, excepto los canales Nayarit y Coronita. En el muestreo III la temperatura varió en 8°C con respecto al muestreo II, los canales Coronita y Tulicheck Ejido Xochimilco alcanzaron los 45°C en el último muestreo (Figuras 4 y 5).

Oxígeno disuelto.

En las figuras 6, 7 y 8 se representa la concentración de oxígeno disuelto a lo largo de los tres muestreos. En ellas se observa que la mínima concentración se encontró en el canal Irapuato con 3.1 mg/L en el muestreo III (Figura 8) y la mayor concentración fue de 18.7 mg/L en el canal Ladrillera II (Figura 7) en el muestreo I. Este parámetro presentó una gran variación en los canales de riego durante los tres muestreos de forma tal que los valores obtenidos van desde los 10.5 mg/L para el canal Irapuato, en muestreo I hasta 3.1 mg/L en el muestreo III, en el caso del canal Ladrillera II, la variación fue de 18.7 mg/L en el muestreo I disminuyendo a 5.7 mg/L en el muestreo III; en el canal Ladrillera I ocurrió una disminución de oxígeno disuelto de 10.3 mg/L en el muestreo I y en el muestreo III a 5.1 mg/L.

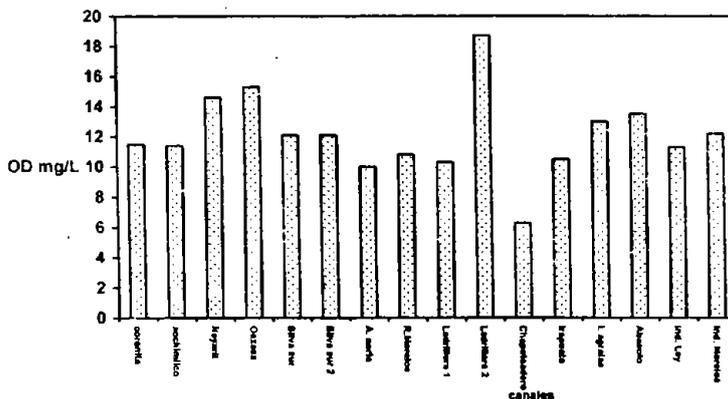


Figura 6. Oxígeno disuelto, durante el muestreo I, marzo, 2002.

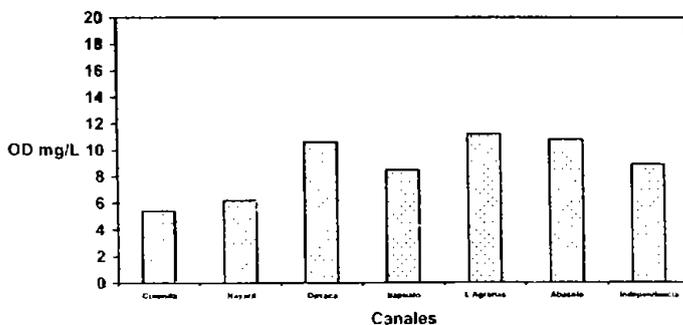


Figura 7. Oxígeno disuelto, durante el muestreo II, septiembre, 2002.

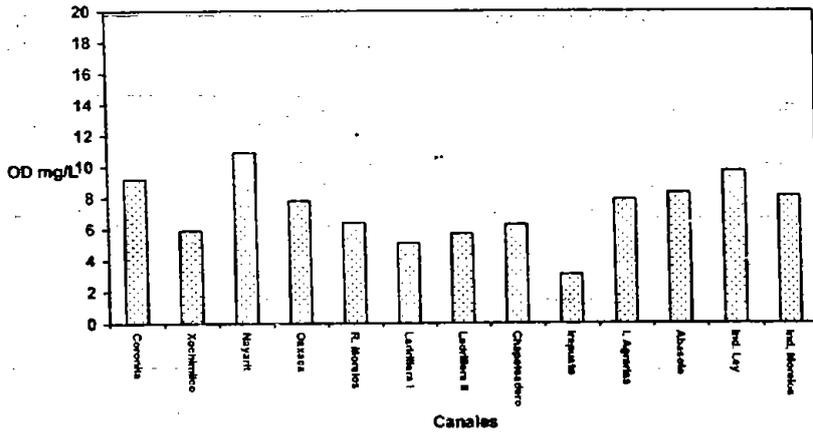


Figura 8. Oxígeno disuelto, durante el muestreo III, octubre 2003

pH

Los valores de pH de las figuras 9, 10 y 11 muestran las mediciones de pH encontrados en los tres muestreos. Las mediciones de pH indican un valor mínimo de 7.7 en el canal Irapuato en el muestreo I (Figura 9) y el mayor valor de 9.7 para el canal Morelos (Independencia), en el muestreo III (Figura 11). Los valores para los otros sitios de muestreos indican que los canales de riego no estuvieron sometidos a cambios de pH amplios, oscilando entre 8.0 y 8.9 de pH en los tres muestreos, variaciones de una unidad se registraron en el canal Coronita (8.4) en el muestreo I que ascendió a 9.2 en el muestreo III e Morelos (Independencia) que registro un pH de 8.4 en el muestreo I que ascendió a 9.7 en el muestreo III.

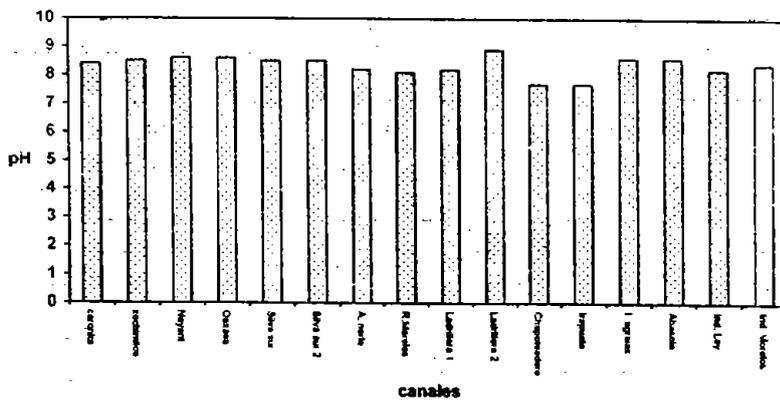


Figura 9. pH del agua durante el muestreo I, marzo 2002

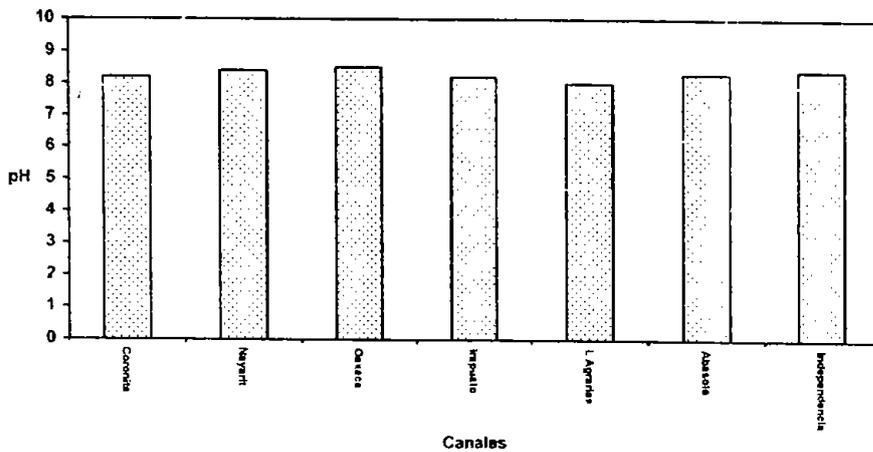


Figura 10. pH del agua, durante el muestreo II, septiembre, 2002.

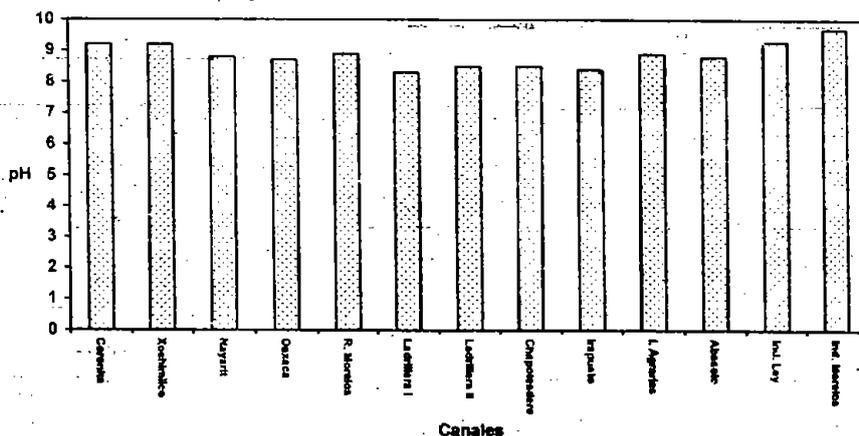


Figura 11. pH del agua, durante el muestreo III, octubre 2003

Conductividad.

En las figuras 12, 13 y 14 se observan los valores de conductividad encontrados en los canales de riego para los tres muestreos. El valor mínimo encontrado fue para el canal Morelos (chapoteadero) con 903 ($\mu\text{S}/\text{cm}$) en el muestreo I (Figura 12) y el valor máximo fue de 5822 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para el canal Irapuato en el muestreo III (Figura 14). Los valores de conductividad medidos en todos los canales de riego se mantuvieron estables durante los tres muestreos, no rebasando los límites de 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Esta observación se aplica individualmente para cada canal de riego.

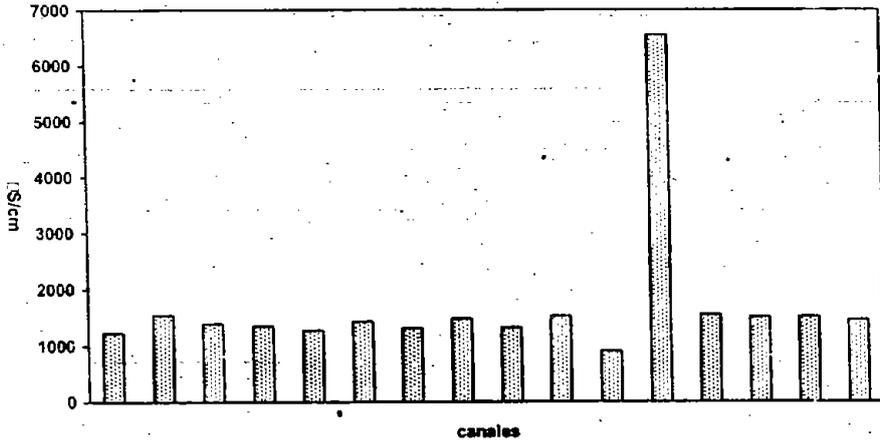


Figura 12. Conductividad durante el muestreo I, marzo 2002

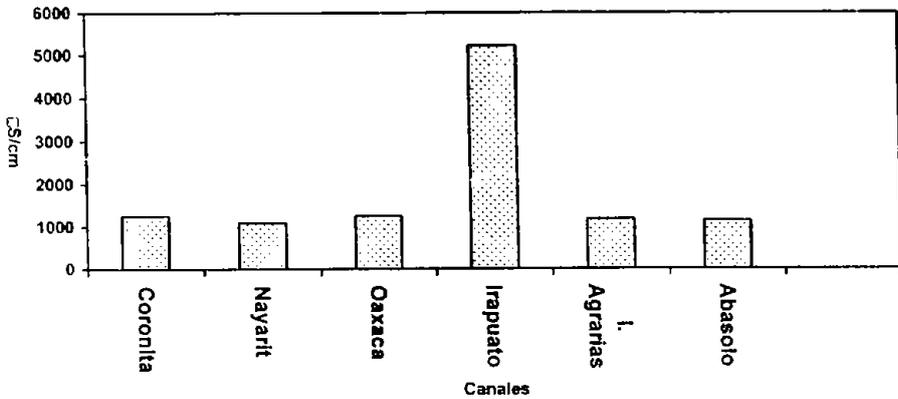


Figura 13. Conductividad durante el muestreo II, septiembre 2002

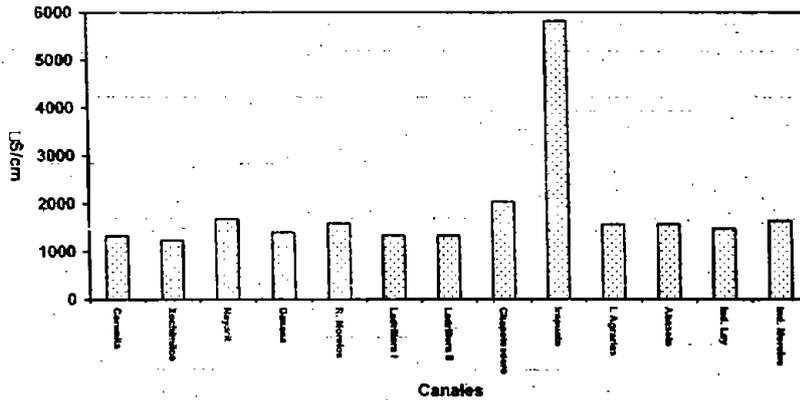


Figura 14. Conductividad, durante el muestreo III, octubre 2003

Cloro libre

Con los antecedentes del muestreo I y II, se realizaron para el muestreo III la determinación de cloro libre, los datos medidos en todos los canales de riego mostraron ausencia de cloro (<0.01mg/L).

Coliformes totales

En las figuras 15, 16 y 17 se representa el número de coliformes totales en UFC/100 mL (unidades formadoras de colonias UFC) registradas en los tres muestreos, se observa además que el valor mínimo fue de >0.5 UFC/100 mL para Tulichick Ejido Xochimilco, Silva Sur y Morelos (chapoteadero) mientras que el canal Irapuato presentó el valor máximo con 2900 UFC/100 mL en el muestreo I (Figura 15), asimismo se observa una disminución del número de coliformes totales en el canal Irapuato y Coronita en el transcurso de los muestreos, se destaca también que en el resto de los canales hubo un aumento en la concentración de coliformes durante los análisis. Esta observación se aplica individualmente para los canales Morelos (chapoteadero) y Tulichick Ejido Xochimilco que muestran un aumento de >0.5 UFC a 600 y 1800 UFC/100 mL de agua respectivamente. En la Figura 17 se puede observar que en el muestreo III se presentaron los valores más elevados de coliformes totales y en el muestreo I los valores más bajos. Durante las observaciones de campo fue posible detectar viviendas y en la

periferia de los campos agrícolas el cambio de uso de suelo a fábricas maquiladoras por lo que es posible que existan vertidos ilegales de aguas residuales, lo que explicaría la presencia de coliformes totales.

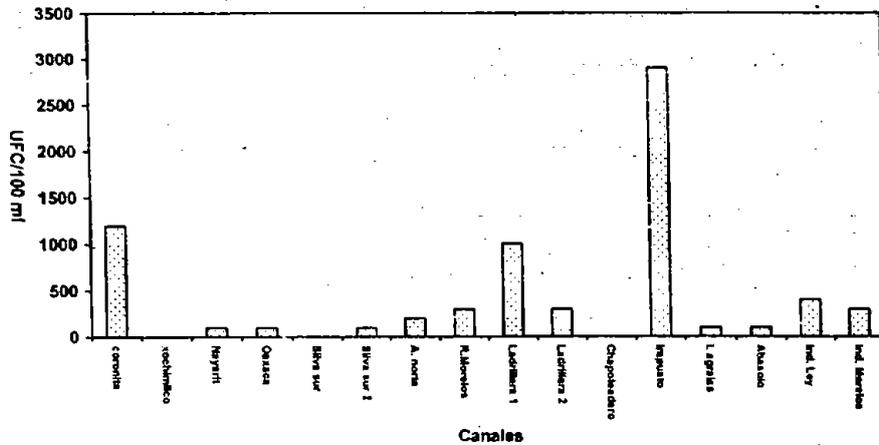


Figura 15. Coliformes totales durante el muestreo I, marzo, 2002

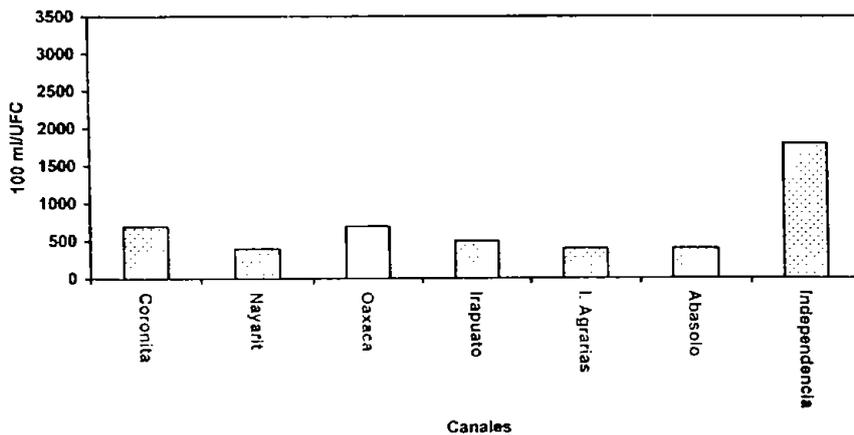


Figura 16. Coliformes totales durante el muestreo II, septiembre, 2002

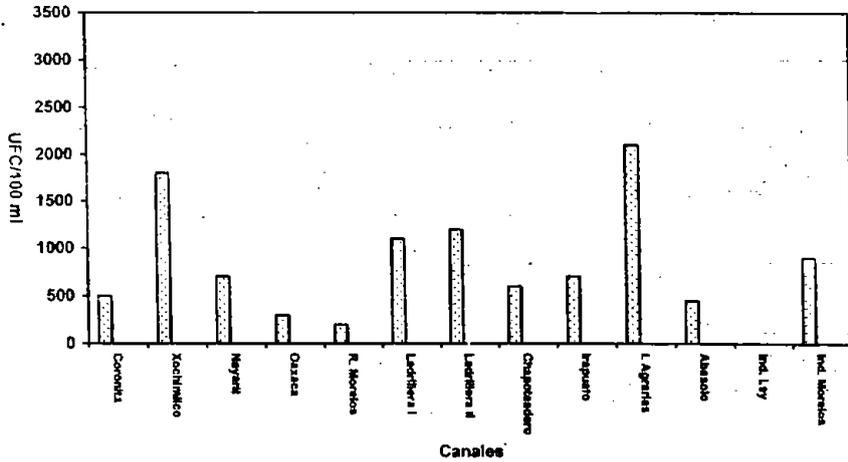


Figura 17. Coliformes totales durante el muestreo III, octubre, 2003

Bacterias heterótrofas totales

En la Figura 18 se muestran los resultados de bacterias heterótrofas totales determinados solo en el muestreo III, la concentración máxima fue de 4.32×10^4 UFC/100mL en el canal Irapuato. y la mínima de 2.3×10^3 UFC/100 mL en Represa Morelos.

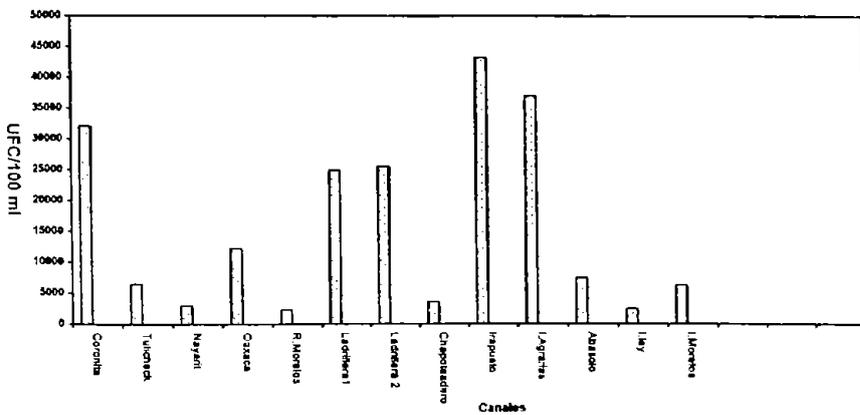


Figura 8. Bacterias totales durante el muestreo III, octubre, 2003

Durante el muestreo III, los canales de riego no estuvieron sujetos a variaciones en el pH y oxígeno disuelto, las mediciones a diferentes profundidades así lo indican. Por ejemplo, el canal Tulicheck Ejido Xochimilco con 2.6 m de profundidad, el pH en la superficie y a dos tercios de profundidad, registro un pH de 9.2; el canal Represa Morelos con 2.5 m de profundidad presentó el mismo comportamiento, tal vez por lo somero de los canales.

5.2.2 Determinaciones de parámetros fisicoquímicos complementarios.

Para el muestreo III se midieron aquellos parámetros relacionados con la materia orgánica presente en los canales de riego. Los análisis aplicados fueron sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos fijos (SSF) y sólidos suspendidos volátiles (SSV).

En la Figura 19 se muestran los resultados de los obtenidos para los sólidos suspendidos en los canales de riego. La concentración máxima fue de 228 mg/L (SST), encontrada en el canal trapuato, la menor concentración se registró en el canal Represa Morelos con 4mg/L de SST. Los valores obtenidos de este parámetro para el resto de los canales de riego oscilan por debajo de los 100 mg/L, a excepción del canal Islas agrarias que alcanza valores de 169 mg/L de SST.



Figura 19 Sólidos suspendidos durante el muestreo III, octubre, 2003

5.2.3 Prueba estadística.

Para establecer de manera confiable una posible relación entre las amebas aisladas y los parámetros ambientales medidos, se obtuvieron los índices de correlación de Pearson (prueba estadística paramétrica). En el análisis se emplearon dos conjuntos de datos cada vez, para buscar una posible relación entre el número de aislamientos contra cada uno de los parámetros fisicoquímicos analizados (Tabla 9).

Tabla 9. Coeficientes de correlación de Pearson entre número de aislamientos y los parámetros fisicoquímicos. N= 30

Variable 1	Variable 2	R ²	p
Aislamientos Superficie	Temperatura del agua	0.0166	0.923
	Temperatura ambiental	0.0798	0.644
	pH	-0.0360	0.835
	OD	-0.0306	0.859
	Conductividad	0.0226	0.896
	Coliformes totales	0.0658	0.703
	Bacterias totales	0.5355	0.590
	Sólidos suspendidos totales	0.5185	0.690
	Sólidos suspendidos fijos	0.5229	0.670
Aislamientos 2/3	Sólidos suspendidos volátiles	0.4944	0.386
	Bacterias totales	0.2144	0.482
	Sólidos suspendidos totales	0.1969	0.519
	Sólidos suspendidos fijos	0.1370	0.655
	Sólidos suspendidos volátiles	0.4051	0.170
Aislamientos perifiton	Bacterias totales	0.3818	0.198
	Sólidos suspendidos totales	0.2849	0.345
	Sólidos suspendidos fijos	0.3188	0.288
	Sólidos suspendidos volátiles	0.1955	0.522

En el apartado de discusión de resultados se comentaran las cifras obtenidas con esta prueba estadística.

5.3 Identificación de los aislamientos.

5.3.1 Morfología. Mediciones morfométricas

De la tabla 10, 11 y 12 destaca las estimaciones obtenidas de amebas crecidas en medios NNE de 7 a 10 días de crecimiento a temperatura ambiente de los tres muestreos realizados durante el presente estudio.

Tabla 10. Morfometría: Estimación de trofozoitos y quistes de AVL aisladas de los canales de riego en Mexicali, B. C. Muestreo I (marzo, 2002)

Intervalo (I); media (X); Desviación estándar (DS); tamaño de la muestra (n); Moda (mo); medida en micrómetros

Lugar	AVL aislada	trofozoito		quiste	ameboflagelado		
		largo	ancho		Largo	A. post.	A. ant.
Coronita	<i>Naegleria ssp</i>	I=7.05-16.45 X=11.94; DS=2.36 mo=14.1; n=50	I=3.05-11.75 X=6.98; DS=2.25 mo=7.05; n=50	I=7.05-11.75 X=9.87; DS=1.25 Mo=9.40; n=50			
Tulchek Ejido Xochimilco	<i>Vahlkampfia aberdornica</i>	I=7.04-30.55 X=15.55; DS=8.4 mo=11.75 n=50	I=2.35-9.4 X=6.48; DS=2.40 mo=4.7 n=50	I=7.05-11.75 X=10.25; DS=1.82 Mo=11.75; n=50			
Ejido Nayarit	<i>Naegleria gruberi</i>	I= 9.56-23.9 X= 14.62; DS= 3.3 mo=11.95; n=50	I= 2.39-9.56 X= 5.78; DS= 1.69 mo= 4.78 n= 50	I=4.78-11.95 X= 7.46; DS= 2.40 mo=7.67; n= 50			
Silva sur	<i>Vahlkampfia inornata</i>	I=9.48-33.18 X= 16.47; DS=6.51 mo= 11.85; n= 50	I=4.74-11.85 X= 9.0; DS= 4.87 mo= 7.11; n= 50	I=4.74-9.48 X= 7.42; DS= 2.0 mo= 7.11; n= 50			
Represa Morelos	<i>Naegleria ssp</i>	I= 7.17-21.55 X=12.01; DS=3.42 mo=11.95; n=50	I=2.39-11.56 X=5.44; DS=2.26 mo=7.17; n=50	I=4.74-9.48 X=9.01; DS=2.3 mo=9.48; n=50			
Ladrillera I	<i>Naegleria fowleri</i>	I=7.05-14.1 X=9.87; DS=1.84 mo=9.4; n=50	I=2.35-7.05 X=5.0; DS=1.12 mo=4.7; n=50	I=7.05-11.75 X=8.79; DS=1.56 mo=9.4; n=50	14.22	9.48	4.74
Ladrillera II	<i>A. castellanii</i>	I=11.95-16.02 X=11.95; DS=2.30 mo=14.02; n=50	I=4.78-9.56 X=5.78; DS=1.23 mo=4.78; n=50	I=7.05-16 X=13.95; DS=2.46 mo=14.20; n=50			
	<i>A. polyphaga</i>	I=6.3-23.2 X=14.0; DS=2.9 mo=13.20; n=50	I=4.78-7.3 X=6.72 DS=3.1 mo=5.8; DS=1.6	I=9.4-17.95 X=12.8; DS=3.5 mo=16.8; n=50			

	<i>A. cultibersoni</i>	I=10.9-18 X=14.96, DS=1.27 mo=15.3; n=50	I=2.39-7.17; X=6.56; DS=3.1 mo=5.1; n=50	I=9.7-17.8 X=17; DS=1.9 mo=16; n=50	
Ejido canal independencia	<i>Rosculus ithacus</i>	I=6.9-25.2 X=12.1; DS=3.96 mo=16.50; n=50	I=2.37-8.0 X=4.2; DS=1.86 mo=2.37; n=50	I=2.37-7.11 X=5.02; DS=1.47 mo=4.74; n=50	
Canal Abasolo	<i>Rosculus ithacus</i>	I=7.11-23.7 X=13.0; DS=5.72 mo=14.52; n=50	I=2.37-7.26 X=4.0; DS=2.0 mo=2.37; n=50	I=4.7-9.4 X=5.3; DS=1.98 mo=4.7; n=50	

Tabla 11. Estimación de trofozoitos y quistes de AVL aisladas de los canales de riego muestreo II (septiembre, 2002). Intervalo (I); Media (X); Desviación estándar (DS) Moda; tamaño de la muestra (n); medida en micrómetros.

Lugar	AVL aislada	Trofozoito		Quiste
		Largo I=9.8-18.8 X=13.77 DS=2.64 mo= 14.1 n=40	Ancho I=4.7 X=7.0 DS=1.61 mo=7.05 n= 50	
Nayarit	<i>N. fowleri</i>			I=4.7-11.75 X=7.09 DS=1.81 mo=7.05 n=50
Oaxaca		I= 26.07-68.73 X=48.67 DS=11.30 mo= 47.47 n=50	I= 21.33-35.55 X= 28.82 DS=5.28 mo=23.7 n=50	
Irapuato	<i>Thscamoeba</i>			I=7.11-14.22 X=9.72 DS=1.61 mo=7.05 n=50
I. Agrarias	<i>Vahlkampfia</i>	I=14.1 X=23.0 DS=4.15 mo=25.85 n=50	I=4.7-11.85 X=7.61 DS=1.81 m=7.05 n=50	I= 7.05-11.75 X= 10.25 DS=1.82 mo=11.75 n=50
	<i>Naegleria spp.</i>	I=11.75-23.50 X=18.52 DS=3.44 mo=21.15 n=50	I=7.05-11.75 X=7.94 DS=2.6 mo=7.05 n=50	I=7.05-14.1 X=11.52 DS=2.34 mo=11.75 n=50
Abasolo	<i>N. fowleri</i>	I=14.22-37.22 X=23.35 DS=6.45 mo=25.85 n=50	I=7.05-14.1 X=7.94 DS= 2.6 mo=7.05 n=50	I=7.11-14.22 X=11.71 DS=2.22 mo=14.22 n=50
Independencia Ley	<i>Vahlkampfia</i>			I=09.48-16.45 X=12.32 DS=1.96 m=11.85 n=50

(-) aislamiento negativo

Tabla 12. Estimación de trofozoitos y quistes de AVL aisladas de los canales de riego muestreo III (Octubre 2002). Intervalo (I); Media (X); Desviación estándar (DS) Moda; tamaño de la muestra (n); medida en micrómetros.

Lugar	AVL aislada	trofozoito		quiste
		largo	ancho	
	<i>Rosculus ithacus</i>	I= 9.4-11.75 X=12.22; DS=1.89 mo=7.05; n=50	I=4.7-9.4 X=7.38; DS=1.58 mo=7.05; n=50	I=4.7-9.4 X=7.14; DS=1.04 mo=7.05; n=50

Irapuato	<i>Platyamoeba</i>	I=11.75-25.85 X=21.09; DS=3.53 mo=23.5; n=50	R=7.05-9.4 X=7.75; DS=1.07 mo=7.05; n=50	I=11.75-23.5 X=18.0; DS=4.0 mo=21.15; n=50
	<i>Acanthamoeba spp</i>	I=11.75-30.55 X=20.74; DS=6.37 mo=23.5; n=50	I=11.75-21.15 X=18.40; DS=2.95 mo=18.8; n=50	I=9.4-16.45 X=12.89; DS=1.71 mo=11.75; n=50
Represa Morelos	<i>Naegleria spp</i>	I=18.8-25.88 X=24.0; DS=2.17 mo=25.88; n=50	I=9.4-11.75 X=10.20; DS=1.12 mo=11.75; n=50	I=7.05-11.75 X=9.60; DS=1.47 mo=11.75; n=50
Ladnitera II	<i>Wilberbia magna</i>	I=23.5-47 X=40.80; DS=6.74 mo=37.8; n=50	I=11.75-25.85 X=20.48; n=50 mo=23.5; n=50	I=14.1-25.85 X=21.87; DS=3.72 mo=23.5; n=50
	<i>Rosculus thacus</i>	I=9.4-14.1 X=11.47; DS=1.60 mo=11.75; n=50	I=4.7-9.4 X=7.24; DS=1.47 mo=7.05; n=50	I=4.7-11.75 X=7.94; DS=2.06 mo=7.94; n=50
	<i>Vanella spp</i>	I=18.45-28.2 X=23.31; DS=3.11 mo=23.5; n=50	I=7.05-16.45 X=12.20; DS=2.33 mo=13.52; n=50	sin cuiste
	<i>Naegleria spp</i>	I=14.1-28.2 X=23.70; DS=3.57 mo=23.5; n=40	I=7.05-11.75 X=8.93; DS=1.88 mo=7.05; n=50	I=11.74-21.15 X=15.85; DS=2.84 mo=16.45; n=50
	<i>Acanthamoeba spp</i>	I=11.75-28.85 X=18.71; DS=3.30 mo=15.45; n=50	I=11.75-18.8 X=12.83; DS=1.57 mo=11.75; n=50	I=9.4-14.1 X=12.55; DS=1.38 mo=11.75; n=50
Independencia Ejido Morelos	<i>Naegleria spp</i>	R=9.4-14.1 X=13.58; DS=2.58 mo=23.5; n=50	R=7.05-14.1 X=9.18; DS=3.01 mo=11.75; n=50	
Independencia (chapoteadero) Ejido Morelos	<i>Vahlkampffia aberdonica</i>	I=11.75-18.8 X=15.60; DS=2.65 mo=18.8; n=50	I=4.7-11.75 X=8.39; DS=1.75 mo=7.05; n=50	I=4.7-7.05 X=6.53; DS=0.94 mo=7.05; n=50
	<i>Naegleria spp</i>	R=7.05-25.85 X=17.02; DS=2.56 mo=23.5; n=50	R=7.05-14.1 X=9.18; DS=3.01 mo=11.75; n=50	R=7.05-14.1 X=8.9; DS=2.09 mo=9.4; n=50
Ejido Oaxaca	<i>Naegleria spp</i>	I=11.75-16.45 X=16.83; DS=1.72 mo=18.45; n=50	I=7.05-11.75 X=8.50; DS=1.48 mo=9.4; 7.05; n=50	I=4.7-9.4 X=7.05; DS=1.24 mo=7.05; n=50
Independencia Ley. Centro de Mexicali	<i>Thecamoeba</i>	I=9.4-14.1 X=13.55; DS=1.08 mo=14.1; n=50	I=7.05-11.75 X=10.2; DS=1.48 mo=11.75; n=50	ND
Ejido Islas Agrarias	<i>Hartmannella vermiformis</i>	I=11.75-25.85 X=21.10; DS=4.27 mo=25.85; n=50	I=7.05-14.10 X=9.10; DS=2.38 mo=9.4; n=50	ND
	<i>Vanella spp.</i>	I=16.45-30.55 X=24.94; DS=3.82 mo=28.2; n=50	I=7.05-18.2 X=11.70; DS=28.4 mo=11.75; n=50	sin cuiste
	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	I=11.75-30.55 X=20.7; DS=6.37 mo=23.5; n=50	I=11.75-21.15 X=16.40; DS=2.84 mo=11.75; n=50	I=11.75-21.15 X=14.1; DS=1.94 mo=11.75; n=50
Colonia Abasolo	<i>Wilberbia magna</i>	I=23.5-47 X=37.69; DS=4.65 mo=47; n=50	I=11.75-23.5 X=17.58; DS=4.81 mo=23.5; n=50	I=14.1-25.85 X=22.37; DS=2.41 mo=23.5; n=50
	<i>Vahlkampffia spp</i>	I=14.1-32.25 X=23.34; DS=5.44 mo=25.85; n=50	I=7.05-14.1 X=10.06; DS=2.58 mo=9.4; n=50	I=7.05-14.1 X=11.84; DS=2.57 mo=14.1; n=50
Coronita Col. Ahumadas	<i>Amoeba spp</i>	I=16.8-51.7 X=38.4; DS=8.09 mo=35.25; n=50	I=14.1-37.8 X=25.24; DS=7.20 mo=28.2; n=50	I=14.1-18.8 X=18.12; DS=2.0 mo=16.45; n=50
Coronita Col. Ahumadas	<i>Hartmannella vermiformis</i>	I=21.15-37.6 X=27.97; DS=5.21 mo=25.85; n=50	I=9.4-18.8 X=12.70; DS=0.79 mo=11.75; n=50	
	<i>Acanthamoeba spp</i>	I=11.75-28.2 X=17.37; DS=5.42 mo=14.1; n=50	I=9.4-18.8 X=12.70; DS=0.79 mo=11.75; n=50	I=7.05-16.45 X=12.12; DS=2.05 mo=11.75; n=50
	<i>Vahlkampffia spp</i>	I=14.1-35.25 X=27.54; DS=4.46 mo=25.85; n=50	I=7.05-16.45 X=10.86; DS=2.30 mo=11.75; n=50	I=9.4-14.1 X=11.48; DS=1.74 mo=11.75; n=50
	<i>Naegleria spp</i>	I=23.5-39.95 X=34.0; DS=7.30 mo=39.95; n=50	I=11.75-25.85 X=19.65; DS=3.9 mo=23.5; n=50	I=14.1-18.8 X=18.30; DS=2.25 mo=18.8; n=50

Ejido Xochimilco Canal Tulicnek	<i>Acanthamoeba</i> spp	I=16.45-25.85 X=22.94; DS=2.47 mo=18.8; n=50	I=14.1-23.5 X=19.24; DS=4.60 mo=18.8; n=50	I=11.75-14.1 X=12.93; DS=0.18 mo=11.75, 14.1; n= 50
Ejido Nayarit	<i>Vahlkampfia aberdonica</i>	I=23.5-35.25 X=30.69; DS=3.30 mo=30.55; n= 50	I=4.7-18.8 X=10.33; DS=2.68 mo=9.4; n=50	I=9.4-14.1 X=12.40; DS=1.48 mo=11.75; n=50
	<i>Naegleria</i> spp	I=11.75-25.83 X=15.62; DS=2.35 mo=23.5; n=50	I=7.05-11.75 X=8.98; DS=2.25 mo=11.75; n=50	I=7.05-14.1 X=9.60; DS=1.90 mo=9.4; n=50
Ladrillera N	<i>Mayorella</i> spp	I=16.45-23.5 X=19.65; DS=1.98 mo=18.8; n=50	I=9.4-14.1 X=20.46; DS=4.72 mo=23.5; n=50	I=14.1-25.85 X=21.87; DS=3.72 mo=23.53; n=50
	<i>Acanthamoeba</i> spp	I=11.75-30.55 X=18.28; DS=5.22 mo=14.1; n=50	I=11.75-21.15 X=14.0; DS=2.25 Mo=14.1; n=50	I=11.75-14.1 X=12.78; DS=1.66 mo=11.75; n=50

Las mediciones de los aislamientos permitieron identificar los diferentes organismos tanto en su fase de trofozoito como de quiste. La media mínima promedio del largo y ancho de la fase del trofozoito para el aislado *Naegleria* es de 0.5 μm y $9.87 \mu\text{m}$ respectivamente fue aislado del canal Ladrillera I. Sin embargo, la media máxima de largo y ancho corresponde para el aislado *Naegleria* determinado en el canal Nayarit y Coronita con una estimación de 6.98 μm y 14.62 μm respectivamente. El tamaño promedio de los quistes igualmente muestra diferencias, la media mínima corresponde al aislado *Naegleria* del canal Nayarit con 7.46 μm , la máxima promedio es de 9.87 μm aislado en el canal Coronita. El género *Vahlkampfia* muestra diferencias menos pronunciadas, el promedio mínimo del largo del trofozoito corresponde al aislado del canal Tulicheck Ejido Xochimilco con 15.55 μm una diferencia de 2 μm respecto al aislado determinado en el canal Silva sur, el promedio máximo del ancho del trofozoito corresponde al aislado del canal Silva sur con 9.0 μm .

El género *Rosculus ithacus* muestra estimaciones similares, el largo mínimo es de 12.1 μm aislado en el canal Independencia Ley y el mínimo ancho del trofozoito es de 4.0 μm del aislado en el canal Abasolo. La estimación máxima del largo del trofozoito es de 13.0 μm del aislado en el canal Abasolo, el máximo del ancho del trofozoito es de 4.2 μm del aislado en el canal Independencia. El tamaño promedio de los quistes de ambos aislados es muy similar de 5.0 μm y 5.3 μm .

En relación al género *Acanthamoeba* se identificaron tres aislados diferentes. *A. castellanii*, *A. polyphaga* y *A. cultbersoni*. El mínimo y máximo del largo del trofozoito oscilo entre 6.3 a 23.2 μm que corresponde a *A. polyphaga*, sin embargo, el promedio de 14 μm es compartido con *A. cultbersoni*, las diferencias en el ancho promedio del trofozoito entre los tres aislados son notables, alrededor de 7 μm . La descripción de los géneros se puede consultar de manera más detallada en el Apéndice 3.

5.3.2 Pruebas de flagelación y temperatura.

Las tablas 13, 14 y 15 resumen los resultados de la identificación de los aislamientos de AVL basados en criterios de pruebas de flagelación y temperatura de crecimiento.

En el primer muestreo cuatro de los dieciséis aislados fueron positivos, *Naegleria* y *Willaertia*, en el muestreo II se obtuvieron resultados similares. En el muestreo III siete aislados presentaron flagelación positiva, en los géneros *Naegleria* y *Willaertia*.

De los 53 aislamientos sometidos a cuatro temperaturas de crecimiento, 100% de los aislamientos presentó un crecimiento a 37°C en un período de incubación de 24 horas, mientras que el 70% de los aislados se desarrolló a 40°C, requiriendo un período mayor de incubación (48 horas), algunos géneros comenzaron a enquistarse como *Rosculus*, *Willaertia* y *Vahlkampfia*.

Los aislamientos crecidos a 42°C, representaron el 28%, géneros como *Vanella*, *Mayorella* no desarrollaron quistes sometidos a temperaturas de 42 y 45°C, el período de incubación fue de 120 horas, en tanto que el 13 del total de los aislados es capaz de crecer a 45°C y mantenerse sin enquistarse durante 48 horas, después de este lapso de tiempo comenzaron a enquistarse. El género *Vahlkampfia* aislado del canal Abasolo creció rápidamente en menos de 48 horas.

Tabla 13. Resultados de las pruebas de flagelación y temperatura, de los aislamientos amebianos del muestreo I.

Ejido o canal	AVL aislada	Flagelación	Temperatura de crecimiento			
			37°C	40°C	42°C	45°C
Represa Morelos	<i>Naegleria</i>	+	+	-	-	-
	<i>Willaertia</i>	+	+	+	-	+
Ladrillera I	<i>Naegleria</i> spp.	+	+	-	-	-
	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	-	+	-	-	-
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	-	+	-	-	-
Ladrillera II	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	-	+	-	-	-
	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-	+	+	-	-
Independencia Ejido Morelos	<i>Rosculus ithacus</i>	-	+	+	-	-
	<i>Rosculus ithacus</i>	-	+	+	-	-
Abasolo	<i>Rosculus ithacus</i>	-	+	+	-	-
	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-	+	+	-	-
Coronita	<i>Vahlkampfia enterica</i>	-	+	+	+	-
	<i>Naegleria</i> spp.	+	+	+	-	-
	<i>Vahlkampfia enterica</i>	-	+	+	-	-
Ejido Xochimilco Canal Tulichek	<i>Vahlkampfia aberdonica</i>	-	+	+	-	-
	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-	+	+	-	-
	<i>Naegleria</i> spp.	+	+	-	-	-

Tabla 10. Resultados de la prueba de flagelación y temperatura de los aislados amebianos del muestreo II.

Ejido o canal	AVL aislada	Flagelación	Temperatura de crecimiento			
			37°C	40°C	42°C	45°C
Coronita	<i>Naegleria fowleri</i>	+	+	+	+	+
Abasolo	<i>Naegleria fowleri</i>	+	+	+	+	+
Irapuato	<i>Thecamoeba</i>	-	+	-	-	-
Ejido Islas Agrarias	<i>Vahlkampfia</i>	-	+	+	-	-
Independencia Ley Centro de Mexicali	<i>Vahlkampfia</i> spp.	+	+	+	+	+
Ejido Nayarit	<i>Naegleria fowleri</i>	+	+	+	+	+

Tabla 11. Resultados de las pruebas de flagelación y temperatura, de los aislamientos amebianos del muestreo III.

Ejido o canal	AVL aislada	Flagelación	Temperatura de crecimiento			
			37°C	40°C	42°C	45°C
Represa Morelos	<i>Naegleria</i>	+	+	+	-	-
Ladrillera I	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	+	-	-
	<i>Mayorella</i>	-	+	+	-	-
Ladrillera II	<i>Acanthamoeba</i> spp.	-	+	+	+	-
	<i>Vannella</i> spp.	-	+	-	-	-
	<i>Willaertia magna</i>	+	+	+	-	-
	<i>Rosculus ithacus</i>	-	+	+	-	-
Independencia Ejido Morelos	<i>Naegleria</i> spp.	+	+	+	-	-
	<i>Thecamoeba</i>	-	+	-	-	-
Abasolo	<i>Vahlkampfia</i>	-	+	+	+	+
	<i>Willaertia magna</i>	+	+	+	-	-
Coronita	<i>Vahlkampfia</i>	-	+	+	+	-
	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	+	-	-
	<i>Naegleria</i> spp.	+	+	+	-	-
	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-	+	+	-	-
	<i>Amoeba</i>	-	+	-	-	-
Ejido Xochimilco Canal Tulichek	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	+	+	-
Ejido Nayarit	<i>Naegleria</i> spp.	+	+	+	-	-
	<i>Vahlkampfia</i>	-	+	+	+	-
Independencia Ejido Morelos	<i>Thecamoeba</i>	-	+	-	-	-
Ejido Oaxaca	<i>Naegleria</i> spp.	+	+	+	-	-
Irapuato	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	+	+	-
	<i>Rosculus ithacus</i>	-	+	+	-	-
	<i>Platyamoeba</i>	-	+	-	-	-
Ejido Islas Agrarias	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	+	+	-
	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-	+	+	-	-
	<i>Vannella</i>	-	+	-	-	-
Independencia Ley Centro de Mexicali	<i>Rosculus ithacus</i>	-	+	+	-	-
	<i>Vannella</i>	-	+	-	-	-
Independencia (chapoteadero) Ejido Morelos	<i>Naegleria</i> spp.	+	+	+	-	-
	<i>Vahlkampfia</i>	-	+	+	+	+

DISCUSION

Las AVL están distribuidas mundialmente, sin embargo la composición de especies en un lugar, depende del sitio en particular, en que momento llegan, en que etapa fisiológica se encuentran, las condiciones fisicoquímicas, la presencia de depredadores y la calidad del alimento (Rodríguez-Zaragoza, 1994).

A pesar de que son cosmopolitas no es posible emitir una explicación simple para la presencia de las AVL en estos cuerpos de agua, es claro por principio que los organismos con mayor abundancia corresponden a géneros como *Naegleria*, *Vahlkampfia* y *Acanthamoeba*. Respecto a este último género son abundantes debido posiblemente a que son resistentes a condiciones extremas, condición dada por la estructura de su quiste constituida de celulosa (Bonilla *et al.*, 1999). Además, la fase de trofozoito tolera variaciones a las condiciones de pH, temperatura y disponibilidad de oxígeno disuelto (John, 1993; Rodríguez-Zaragoza, 1994). Los resultados encontrados en el presente estudio, coinciden con los trabajos realizados en otros ambientes acuáticos en los que un alto porcentaje de organismos pertenecientes al género *Naegleria*, *Vahlkampfia* y *Acanthamoeba* predominan frecuentemente (Kyle y Noblet, 1986; Rivera *et al.*, 1993; Sadak *et al.*, 1997 y Bonilla *et al.* 1999). No puede asegurarse si estos géneros fueron aislados en estado de quiste o trofozoito, por las razones antes expuestas. Géneros como *Vanella*, *Platyamoeba*, *Amoeba* y *Mayorella*, se encontraron en menor número, debido a que algunos géneros no forman estructura de resistencia (quiste) como es el caso de *Mayorella* y *Vanella*. Es común que las AVL se detecten con baja frecuencia en las etapas tempranas del desarrollo de una sucesión y son muy abundantes entre el vigésimo y quincuagésimo día de la misma (Anderson, 1988).

Los resultados indican un incremento en el número de aislamientos a medida que se realizaban los muestreos, los canales de riego están sujetos a flujo cuando las compuertas son abiertas, evento que provoca el aumento o disminución de las poblaciones de AVL (Kyle y Noblet, 1986). Otro evento importante a considerar es que el Valle de Mexicali es una región agrícola, con suelos desnudos, sujetos a vientos, las cuales transportan suelo hacia los canales de agua; el flujo vehicular también participa en este fenómeno, algunos reportes señalan que poblaciones de gimnamebas presentes en el suelo también se pueden encontrar en ambientes acuáticos (Banforth, 1985; Rodríguez-Zaragoza, 1994). Puesto que las AVL son habitantes comunes del suelo, en su forma de quiste hacia la atmósfera y pueden entrar en contacto con las personas, infectando a individuos sanos, como es el caso de *Acanthamoeba* en la queratitis ocular, las

corrientes de viento son comunes en el Valle de Mexicali. El sistema de riego empleado en los campos agrícolas es por inundación o anegamiento y por surcos. las AVL pueden desprenderse del agua en forma de aerosoles, las amebas viven sobre la superficie, adheridas a partículas flotantes en la columna de agua o en los sedimentos, por lo que es un riesgo para los trabajadores. Es común que eventos naturales y artificiales cambien la composición de un cuerpo de agua o suelo (Lewontin, 1993). Las actividades del hombre realizadas en el río Colorado en los inicios del siglo XX ha impactado de forma negativa en la flora y fauna del Golfo de California (Glenn *et al.*, 2001). La construcción de presas y obras de irrigación y la utilización del agua en la industria y consumo urbano, influye en las poblaciones ambientales al modificar su comportamiento natural, promoviendo que especies nativas sean desplazadas por otras más resistentes, también afecta el comportamiento de los depredadores que controlan las poblaciones ambientales (Kyle y Pitman 1985; Rivera *et al.*, 1993; 1994)

Durante los tres muestreos, el aislamiento de AVL de la capa superficial del agua fue evidente, posiblemente como resultado de la deposición de quistes transportados por el aire, las amebas pueden sobrevivir en la capa superficial o por debajo de ella, puesto que la utilizan como sustrato (Finlay *et al.*, 1988).

El aislamiento de *Naegleria fowleri* de los canales de riego apoya la hipótesis de la aspiración de estos patógenos por personas que nadaron durante los brotes de MEAP en Mexicali durante 1989 y 1990. La temperatura del agua no fue muy alta (máximo 31.8°C) en el canal Irapuato durante el muestreo II, sin embargo permitió aislar naeglerias patógenas (*N. fowleri*) y no patógenas (*N. gruberi*). Este hecho es importante puesto que la temperatura por arriba de los 30°C favorece pero no es indispensable para el crecimiento de amebas del género *Naegleria* (Kadlec *et al.*, 1978). La ausencia de cloro y presencia de materia orgánica son variables que favorecen el crecimiento y proliferación de las Naeglerias (Rivera *et al.*, 1989; 1990). El aislamiento de *N. fowleri* durante el muestreo I y II coincide con los reportes de Lares-Villa y colaboradores (1993) quienes aislaron *N. fowleri* en los canales de riego de Mexicali con temperaturas que oscilaban entre los 28 y 32°C, muy similares a las registradas en el presente trabajo. No obstante que los canales son para uso de riego agrícola, la población los utiliza para nadar y mitigar el excesivo calor que prevalece en la región, el aislamiento de AVL potencialmente patógenas de la superficie del agua facilita la inoculación directa de amebas como *N. fowleri* y *Acanthamoeba* las cuales entran en contacto con la mucosa nasal o los ojos. Individuos con posibles infecciones en la piel, se introducen en los canales de agua exponiéndose a acantamebas oportunistas. La concentración mínima para desarrollar MEAP asociada con prácticas recreativas como natación o buceo es de 1 a 10 amebas de *N. fowleri* por litro (Cabanés *et al.*, 2001)

Las diferencias de temperatura del agua encontradas en los canales de riego obedecen al comportamiento de la temperatura ambiental, el registro de este último parámetro se realizó a diferentes horas del día. Durante el muestreo I la medición de la temperatura de agua en los canales Morelos (chapoteadero), Irapuato, Islas Agrarias B e Independencia Ley se efectuó en el intervalo de la 4:00 y 7:00 PM, el registro de los parámetros ambientales en los canales Silva sur, Silva sur 2, Ladrillera I y II se efectuó entre las 12:00 y 3:30 pm, por lo que el efecto de la temperatura en el agua se incrementa. Este mismo comportamiento se observa en los muestreos II y III. El promedio de temperatura ambiental para el muestreo I, II y III es de 28.6, 41.2 y 36.5 °C respectivamente. El registro de temperatura media mensual que reportó el INEGI (1999) para el periodo de 1986-1999 para los meses de marzo, septiembre y octubre es de 18.8, 30.6 y 25.4 °C respectivamente.

La temperatura ambiental es un factor que debe considerarse cuando se busca AVL en ambientes acuáticos. Algunos reportes señalan la relación directa que existe entre la presencia de AVL con potencial patógeno con la temperatura ambiental y la temperatura del agua (Cain *et al.*, 1981; Lares-Villa *et al.*, 1983; John, 1993; Rivera *et al.*, 1993; Kivington *et al.*, 1993). Page (1988), De Jonckheere (1984) y Rivera *et al.* (1986) señalan que es posible aislar amebas desnudas en un ámbito de temperatura de 10 a 30°C. Es importante señalar que la medición de ambos parámetros de temperatura se realizó en los 16 canales a diferente hora del día.

Es evidente por consiguiente, que las diferencias de temperatura del agua en los canales estudiados en un mismo muestreo, pueden ser explicados por el hecho de que el agua recibe los rayos solares directamente, esta radiación por lo tanto eleva la temperatura del agua durante el transcurso del día.

Las AVL son organismos aerobios estrictos, y las condiciones anaerobias son tóxicas para algunas AVL como *Hartmannella*, *Vahlkampfia* y *Naegleria* (Kyle y Noblet, 1986); sin embargo estos cambios inducen la formación del estado del quiste de las formas trófica y flagelada como respuesta natural contra condiciones adversas (Rivera *et al.*, 1993). La concentración de oxígeno disuelto (OD) nos señala indirectamente en que fase se encuentran estos organismos.

Acanthamoeba puede resistir bajas concentraciones de oxígeno o condiciones microaerófilas por ejemplo *A. castellanii* resiste condiciones anaerobias empleando una ruta alterna metabólica de transporte de electrones que no es inhibida por H₂S (Lloyd, *et al.*, 1981)

Estos datos indican que las concentraciones de oxígeno disuelto no son un factor limitante para la ausencia o presencia de AVL. Estudios realizados por Turne y colaboradores (1997) señalan que las amebas del género *Acanthamoeba* sometidas a una concentración de 21% de oxígeno no tienen ningún efecto en trofozoitos; una concentración de 5.2 % produce un efecto de enquistamiento. En los tres muestreos las condiciones de OD rebasan el 100% de saturación

para todos los canales estudiados, excepto Coronita y Nayarit con el 56 y 80% de saturación de oxígeno respectivamente en el muestreo II.

Las altas concentraciones de OD son explicadas por la alta actividad fotosintética realizada por la presencia de una planta vascular acuática llamada *Hydrilla verticillata*; dichas concentraciones son ideales para el desarrollo de peces. Las observaciones de campo confirmaron la presencia de Tilapia, un pez introducido en los canales para controlar el crecimiento de la planta referida.

H. verticillata es una planta acuática que crece enraizada y totalmente sumergida prefiriendo aguas someras, transparentes y con movimiento moderado, se adapta a distintas calidades de agua, desde las oligotróficas a las eutróficas, y aún tolera aguas alcalinas y salobres (Cook y Lüönd, 1983, citado por Novelo y Martínez, 1987). Cubre grandes extensiones del cuerpo de agua por medio de la reproducción vegetativa, tubérculos y los turiones que se desarrollan en las axilas de las hojas, estas estructuras son las responsables de las reinfestaciones de la planta (Olvera, 1989). Los canales son someros, el flujo de corriente es a favor de la pendiente lo que incrementa el contacto y el aporte de oxígeno del aire, la toma de la muestra es el transcurso del día por lo que la productividad fotosintética es alta lo que explica los valores elevados de oxígeno disuelto.

El ámbito de pH que las AVL pueden soportar está entre 4.6 a 9.5 (Kyle y Pitman, 1985). Por lo que este factor no fue limitante en la presencia o ausencia de estos organismos. En general, las AVL desnudas y testadas son resistentes a cambios de pH, son muy abundantes a pH de 7.6, algunas pueden tolerar pH de 8.6 o más (Page, 1988). *Acanthamoeba* tolera pH en un ámbito de 4-12 dos genes regulan esta capacidad PHR1 y PHR2 (Khan, 2003). Los valores de pH básico registrado en los canales de agua, pueden atribuirse a un estado de crecimiento explosivo de las macrofitas que al consumir el CO₂ disuelto en el agua desequilibra la relación ácido-base de esta, desplazando el pH a condiciones básicas. La planta puede usar el CO₂ que fue liberado durante la respiración nocturna antes que otras plantas se activen, siendo más eficiente el uso de este compuesto que de HCO₃ (Olvera, 1989).

La legislación para aguas de uso agrícola que contempla la Ley de Derchos en Materia de Agua 2001 en su artículo 278-B da valores de criterios ecológicos de calidad del agua para pH en un ámbito de 6.0 a 9.0.

La conductividad permite estimar la cantidad de sales. Las AVL son de amplia tolerancia; así especies de *Acanthamoeba* y *Hartmannella* son tolerantes a cambios de salinidad de las aguas donde están en su forma trófica y el quiste es resistente al ataque de cloro (Rivera *et al.*, 1994). Valores de >3 gramos (3000 µS/cm) se consideran agua salina, afectando negativamente la riqueza de especies. Por debajo de este ámbito es clasificada como agua dulce con un

incremento en la riqueza de especies. Las concentraciones altas encontradas en el canal Irapuato es debido a que es un canal cerrado, el agua se estanca, favorece la evaporación y genera una alta concentración de sales, sin embargo, fue posible aislar amebas del género *Thecamoeba*, *Acanthamoeba*, *Rosculus* y *Platyamoeba*. Al parecer tal resistencia se debe al quiste y la capacidad de los trofozoitos de tolerar cambios de salinidad, presión osmótica (Rodríguez-Zaragoza, 1996). Gallegos y colaboradores (1999) lograron aislar amebas en un ámbito de alcalinidad de 319 mg/L a 560 mg/L en aguas subterráneas del Valle del Mezquital en Hidalgo; este factor no es limitante en la presencia o ausencia de las AVL. La ley de Derechos en materia de Agua (2001) en su artículo 278-B para uso agrícola no contempla un criterio de calidad de agua para este parámetro, sin embargo valores de referencia permisibles internacionales indican conductividades de 50 a 1500 $\mu\text{s}/\text{cm}$ para agua potable, la mayoría de los canales de agua estudiados se ajustan a este ámbito. Todas las AVL son sensibles al cloro libre, es el factor más inhibitorio. El género *Naegleria fowleri* es más sensible que las cepas no patógenas del mismo género, los quistes de *N. fowleri* son destruidos a concentraciones de 0.5 mg/L de cloro, los trofozoitos del género *Acanthamoeba* son resistentes a concentraciones de 4 mg/L después de tres días de exposición (De Jonckheere y De Voorde, 1976), las mediciones de cloro libre realizados en todos los canales durante el muestreo III indican valores menores al límite de detección cero, por lo que favorecen el desarrollo sin restricción de los organismos que nos ocupan en el presente estudio.

Las AVL son depredadoras de una amplia variedad de microorganismos, bacterias gram-negativas y en menor cantidad de gram-positivas (Wang y Ahearn, 1997), así como de levaduras y algas (Marciano-Cabral, 1997).

Ciertos estudios de nutrición amebiana señalan que las amebas pueden provocar una disminución en la población de bacterias de 10^8 a 10^5 por gramo de suelo (Habte, 1978; Bryant, 1982), sin embargo la capacidad es diferente para cada especie de ameba; 600 a 3 600 células de *Rhizobium meliloti* son necesarias para producir un trofozoito de *Hartmannella*, 800 a 7 500 células de *Xantomona campestris* para producir un trofozoito de *Naegleria sp* (Danso, 1975) y 8 300 células de *P. paucimabilis* para producir un trofozoito de *A. polyphaga* (Bryant, 1982). Durante los tres muestreos los valores de coliformes totales variaron en los tres muestreos en este sentido Bohn y Buchouse (1985) sostienen que cambios ambientales diarios y periódicos afectan las poblaciones de coliformes totales, observaciones de campo indican que los canales de riego fluyen de manera continua lo que impide la acumulación de materia orgánica y de bacterias. Los canales de riego están revestidos de concreto por lo que se descarta la infiltración de desechos humanos hacia los cuerpos de agua. Las aguas utilizadas en el riego, están sujetas en su calidad microbiológica después de su conducción a través de las presas, caldas de agua y canales donde se retienen sedimentos por períodos diversos en ambos países en el tratado

establecido en 1947; en el territorio nacional se encuentran sujetas a tratamiento por dos plantas de tratamiento que también son destinadas a consumo humano. Sin embargo en el muestreo III se aisló el género *Platyamoeba* y *Rosculus*, es común la presencia de este tipo de organismos en cuerpos de agua ligeramente contaminados (Page, 1988).

Este parámetro no tiene una influencia decisiva para la presencia o ausencia de AVL en los canales de riego, puesto que este tipo de organismos se alimenta además de levaduras, hongos y ciliados (Marciano-Cabral, 1987).

Los sólidos suspendidos comprenden las sustancias orgánicas e inorgánicas disueltas o suspendidas en el agua, la Ley de Derecho en Materia de Agua en su artículo 278-B para uso agrícola contempla un criterio de calidad de agua para este parámetro en 500 mg/L, valor que no sobrepasan ninguno de los canales estudiados. En este muestreo III se aislaron 30 AVL, 14 en la superficie, 13 en el perifiton y 2 a 2/3 de profundidad. Estos resultados coinciden con los reportes de Kyle y Noblet (1985) y O'Dell (1979) quienes aislaron amebas de la columna y la superficie del agua, puesto que las amebas pueden asociarse con las partículas suspendidas donde se encuentran la interfase agua-aire, donde tienen mayores oportunidades de sobrevivir debido al efecto de concentración de los nutrientes. Es importante señalar el aislamiento de AVL en sedimentos adheridos a la pared de los canales lo que incrementa el riesgo a la salud humana. Estos microorganismos se transportan hasta estos lugares por efecto de las corrientes (situación común en los canales de riego), manteniéndose adheridas debido a la producción de material extracelular que esta compuesta de proteínas y polisacáridos, además de fuerzas electrostáticas.

Es importante señalar que el aislamiento de los géneros como *Acanthamoeba* y *Hartmannella*, incrementa el riesgo a la salud humana, puesto que juegan un papel como vehículos de transporte de bacterias patógenas (Marciano-Cabral et al., 2000), como *Legionella*, *Listeria* y *Vibrio*, protegiéndolas de condiciones adversas, lo que permite la supervivencia, replicación y diseminación de dichas bacterias en ecosistemas naturales y artificiales.

Respecto a la temperatura algunos reportes (Rivera et al., 1993; Lares-Villa, 1983;) señalan una relación directa entre la temperatura y el número de amebas, al analizar la información contenida en la tabla se observa que no existe una relación entre el número de aislamientos con la temperaturas del agua y del ambiente con valores ($r^2=0.0166$, $P=0.923$) y ($r^2=0.0798$ y $p=0.644$). Sin embargo la presencia de amebas tiene una explicación, estos organismos se adaptan a un amplio ámbito de temperatura lo que influye en los valores obtenidos.

En relación al oxígeno disuelto y pH se encontró una relación inversamente proporcional, es decir que a mayor concentración de OD en el agua, el número de aislados disminuye, sin embargo, se contrapone con lo reportado con la literatura que señala que estos organismos toleran amplios ámbitos de pH y las AVL son organismos aerobios. Otra posibilidad es considerar que las altas concentraciones de OD permita el crecimiento de ciliados, flagelados y nematodos que controlen las poblaciones de amebas (Finlay *et al.*, 1988).

En relación al resto de los parámetros fisicoquímicos no se encontró correlación alguna con el número de aislamientos obtenidos.

En el muestreo III se reflejó una ligera correlación directamente proporcional entre los aislados amebianos obtenidos en el perifiton y las variables ambientales correspondientes a las bacterias totales ($r^2=0.5355$, $P=0.59$) y SST ($r^2=0.5185$, $P=0.69$), es decir que a mayor concentración de bacterias y sólidos suspendidos existe una mayor cantidad de amebas, aunque marginalmente con bajas probabilidades. Rodríguez-Zaragoza (1994) sugiere una posible relación entre la disponibilidad de bacterias como alimento y la presencia de AVL en el agua.

El análisis de correlación de Pearson no mostró alguna relación estadística que indique cierta presencia o ausencia de los organismos estudiados con alguna de las variables medidas, por ejemplo con la temperatura del ambiente y del agua (0.0166 y 0.0178 respectivamente). Sin embargo existen algunos reportes que mencionan que las épocas más calurosas del año existe un incremento en los casos de meningitis en casos de AVL (Lares-Villa, 1993; Rivera *et al* 1994; 1995). El Valle de Mexicali posee las características ambientales adecuadas para la supervivencia de AVL, particularmente las especies patógenas. Fue posible presenciar en el recorrido por los canales de riego a jóvenes sumergiéndose al nadar en estos cuerpos de agua. Actividad que es frecuente debido a las altas temperaturas que se alcanzan durante el día. Sin embargo no puede afirmarse de manera categórica que no exista una correlación entre las AVL y alguno de los parámetros medidos. Los estudios de Kyle y Noblet (1986) y O'Dell (1979) señalan que el crecimiento y la proliferación de estas poblaciones pueden explicarse como una acción conjunta entre los parámetros considerados en este estudio.

Rodríguez-Zaragoza (1994), sugiere que la temperatura, pH, OD y la presencia de bacterias están relacionadas en la abundancia de las AVL, sin embargo, no es posible establecer con claridad si algunos de estos parámetros están relacionados con la presencia de amebas en el agua.

La estimación en el tamaño y forma del trofozoito y quiste, así como las características de comportamiento en la locomoción permitió diferenciar las AVL aisladas a nivel de género con

exactitud. Sin embargo, la identificación a nivel de especie no es sencilla por varios factores. Las AVL similar a otros protozoos es asexual, un género con varias especies puede comprender una mezcla de cepas patógenas y no patógenas. Por ejemplo, un aislado patógeno como *N. fowleri* con un tamaño promedio de 8.79 μm no se diferencia significativamente de *Naegleria gruberi* no patógeno con un tamaño promedio de 7.46 μm (Tabla 10). Las diferencias observadas en el tamaño de los quistes y trofozoitos aislados en los canales de riego pueden explicarse como resultado a diferencias en el estado fisiológico o a condiciones de cultivo (Weekers, 1993), por lo que la identificación de las amebas debe ser empleada con precaución cuando existen condiciones de cultivo, ya que incluso pueden llegar a reflejarse en diferencias en los patrones isoenzimáticos incluso dentro de la especie (De Jonckheere, 1983), no puede conocerse si la variación es a causa de la dieta o a la presencia o ausencia de nutrientes.

Las condiciones del medio de crecimiento pueden causar la selección de subpoblaciones de trofozoitos (Rivera, 1984). Estas aseveraciones son evidentes en el trofozoito de *Acanthamoeba*, la longitud del trofozoito en locomoción es de aproximadamente 20-40 μm (Pussard y Pons, 1977), lo cual no coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo, el aislado *Acanthamoeba* determinado en el canal Ladrillera II en el ámbito del trofozoito es de 11.95 a 18.02 μm . Por lo que la identificación se apoyo principalmente en las características del quiste.

Un segundo aspecto a considerar en la identificación morfológica es que si bien se trata de organismos clonados, las clonas muestran solamente el ámbito del fenotipo del genotipo de la clona, por lo que es posible medir la variación dentro de una clona, pero es difícil determinar el ámbito de variación dentro de una especie. Un tercer elemento es el manejo de los organismos en el momento de la identificación, la colocación de gotas en el portaobjeto conteniendo las amebas y su posterior colocación de cubreobjetos, están sometidas a deficiencias de oxígeno, presión y evaporación, juegan un papel en el comportamiento y forma de las amebas, incrementando la dificultad en la identificación.

La temperatura en que se presentó un óptimo crecimiento de los diferentes aislamientos de AVL correspondió a 37°C, los aislamientos al ser sometidos a temperaturas de 42° y 45°C se enquistan después de un tiempo y comienzan a morir, los trabajos realizados por Scaglia y colaboradores (1987), Sawyer y colaboradores (1998), Bonilla y colaboradores (1999), señalan que las amebas toleran temperaturas de crecimiento in vitro a 37°C, *Acanthamoeba* crece a 42°C, pero comienza a enquistarse, géneros como *Vanella*, *Harmannella* crecen a intervalos de temperatura entre 21 a 37°C, resultados que coinciden a los hallazgos del presente trabajo.

VIII. CONCLUSIONES

Los aislamientos de amebas de vida libre recolectadas en 16 canales de riego agrícola en Mexicali en el estado de Baja California, estuvieron representada por 53 aislamientos que correspondieron a cuatro ordenes, cinco familias y once géneros: *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Hartmannella*, *Rosculus*, *Willaertia*, *Thecamoeba*, *Mayorella*, *Vanella*, *Amoeba* y *Platyamoeba*.

Los géneros más abundantes fueron *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Hartmannella*. Tres aislados fueron identificados como *Naegleria fowleri* y tres aislados como *Acanthamoeba castellanii*, *A. polyphaga* y *A. culbertsoni*, especies reportadas en la literatura como potencialmente patógenas lo que implica un factor de riesgo para los bañistas que se ponen en contacto con este tipo de aguas.

Durante todos los muestreos se aislaron consistentemente organismos amebianos a partir del agua de riego de los 16 canales estudiados.

De los canales Ladrillera I y II, Coronita, Tulicheck Ejido Xochimilco, Irapuato, Islas Agrarias, Abasolo, Independencia Ley, Silva sur, Represa Morelos, Nayarit, Oaxaca y Morelos (chapoteadero) se obtuvieron especies de amebas potencialmente patógenas y de ellos Coronita, Abasolo y Ladrillera II representaron los sistemas que tuvieron el mayor número de aislados patógenos.

El mayor número de aislamientos amebianos se obtuvo en el mes de octubre con 30 aislamientos, marzo con 16 y el mes de septiembre con 7 aislamientos.

Las condiciones físicas y químicas del agua de los canales no presentaron factores de beneficio o de inhibición determinantes para la presencia o ausencia de las AVL, las concentraciones de alimento incluyendo bacterias coliformes, totales y sólidos suspendidos pudieron ejercer una cierta influencia en el crecimiento de las amebas, pero ella no fue significativa.

La temperatura ambiental y del agua no tuvo influencia en el desarrollo de las poblaciones de AVL, es decir, no se encontró que a mayor temperatura mayor número de aislamientos, la prueba estadística así lo comprueba.

La ausencia de cloro en el agua, es un factor que posiblemente influyó en la presencia de amebas en los canales de riego.

LITERATURA CITADA

- Anderson, R. V., Elliot, E. T., McClellan, J. F., Coleman, D. C., Cole, C. V. y Hunt, H. W. 1978. Trophic interactions in soils as they affect energy and nutrient dynamics. III. Biotic interactions of bacteria, amoebae and nematodes. *Microb. Ecol.* 4: 361.
- Anderson, R. O., 1988. *Comparative Protozoology. Ecology, Physiology, Life History*, Springer-Verlag, New York.
- Banforth, S., 1982. The role of protozoa in litters and soils. *J. Protozool.* 32: 404.
- Brown, S., De Jonckheere, F. J. 1994. Identification and phylogenetic relationships of *Vhalakampia* spp. (free living amoebae) by riboprinting. *FEMS Microbiol Letters.* 115: 241-246.
- Bonilla, P., Ramírez, E., Ortíz, R., Calderón, A., Gallegos, E. y Hernández, D. 1999. Occurrence of pathogenic and free-living amoeba in aquatic systems of the Huasteca Potosina, México. *Aquatic Ecosystems of México: Status and Scope*. Ecovision World. Monograph Series. Backhuys Publishers. The Netherlands.
- Bryant, R. J., Woods, L. E., Coleman, D.C., Fairbanks, B. C., McClellan, J. F., y Cole, C. V. 1982. Interactions of bacteria and amoeba populations in soils microcosms with fluctuating moisture content. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 747.
- Butt, C. G. 1968. The pathology of amebic encephalitis. *J. Bull. Pathol.* 9: 83-92.
- Cabanes, P.A., Wallet, F., Pringuez, E. y Pemin, P. 2001. Assessing the risk of primary amebic meningoencephalitis from swimming in the presence of environmental *Naegleria fowleri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(7):2927-2931.
- Carter, R.F. 1972. Description of a *Nagleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis, and of the experimental changes induced by it. *J. Pathol.* 100: 217-582.
- Campos, P., Cabrera, J., Gotuzzo, y E. Guillen. 1999. Neurological involvement in free living amebiasis. *Rev. de Neurologia.* 29(4): 316-318.
- CGSNEGI. 1995. Carta Geológica. Escala. 1: 000 000.
- CGSNEGI. 1995. Carta Fisiográfica. Escala. 1: 000 000.
- CGSNEGI. 1995. Carta de Climas. Escala. 1: 000 000.
- CGSNEGI. 1996. Carta de uso de suelo y vegetación. Escala. 1: 000 000.
- Cirillo, J.D., Yan, L., Bermúdez, L. E., Falkow, S., y Tompkins, L.S. 1994. Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infection Immunity.* 67(9):4427-34.
- Comisión Nacional de Aguas Nacionales. Ley de Aguas Nacionales 1992. Ed. Ligusa 70 pp.
- Culbertson, C. G., Smith, J y Minner, J. 1958. *Acanthamoeba* observations on animal pathogenicity. *Science* 127:1506

- De Jonckheere, J. F. 1977. Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Naegleria fowleri* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 751-757.
- De Jonckheere, J. F. 1981. Pathogenic and non pathogenic *Acanthamoeba* spp. thermally polluted discharges and surface waters. *J. Protozool.* **28**: 56.
- De Jonckheere, J. F. 1987. Amphizoic amoebae. En: Human Pathology. Epidemiology, Ed. por Rondanelli, E.G. Puccin Nuova Libreria. Padova Italy. Chapter 5. 125-147pp.
- De Jonckheere, J. F. y Van De Voorde, H. 1976. The distribution of *Naegleria fowleri* in man-made thermal waters. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **26** (1): 10-15.
- De Jonckheere, J. F., Permin, P., Scaglia, M. y Michel, R. 1984. A Comparative study of strains of *Naegleria australiensis* demonstrates the existence of a highly virulent subspecies: *N. australiensis italica* n. spp. *J. Protozool.* **31**: 324-331.
- De Jonckheere, J. F. y Michel, R. 1988. Species identification and virulence of *Acanthamoeba* strains from human nasal mucosa. *Parasitol. Res.* **74**: 314-316.
- De Napoli T. S., Rutman J. Y., Robinson J. R. y Rhodes M. M. 1996. Primary amoebic meningoencephalitis after swimming in the Rio Grande Texas. *Medicine.* **92**(10):59-63.
- Detterline, J. L. y Wilhelm, W. E. 1991. Survey of pathogenic *Naegleria fowleri* and thermotolerant amoebas in federal recreational waters. *Trans. Am. Micros. Soc.* **110** (3): 244-261.
- Dykova, J. I., Schroder, J. M., Borton, G.C. y Byer, T.J. 1999. *Acanthamoeba* strains isolated from organs of freshwater fishes. *J. Parasitol.* **85**(6):1106-1113.
- Ettinger, R.M., Webb, R.S., Harris, A.S., McIninch, P.S., Gorman, C., y Guy-Brown, L. B. 2002. Distribution of free-living amoebae in James River, Virginia, USA. *J. Parasitol.* 436-438.
- Fields, B. S., Nerad, T. A., Sawyer, T. K., King, C. H., Barbarre, J. M., Martin, W. T., Morril, W. E. y Sanden, G. N. 1990. Characterization of an axenic strain of *Hartmannella vermiformis* obtained from an investigation of nosocomial legionellosis. *J. Protozool.* **37** (6): 581-583.
- Finlay, J. B., Clark, J. K., Cowlin, J. A., Hindle, M. R., y Rogerson, A. 1988. On the abundance and distribution of Protozoa and their food in a productive freshwater pond. *Europ. J. Protistol.* **23**: 205-217.
- Fiordaliso, I., Christie, J. y Moffitt, C. 1992. Primary amoebic meningoencephalitis. North Carolina, 1991. *J. A. M. A.* **268** (7): 862-863
- Fluviá, C., Mascaró, C., Guevara, D. C., Pérez, M. I., Mascaró, M. L. y Osuna, A. 1983a. Aislamiento de amebas de vida libre a partir de aguas minerales y minero-medicinales envasadas. *Rev. Iber. Parasitol.* **43** (1): 33-38.
- Fluviá, C., Mascaró, C., Pérez, M. I., Mascaró, M. L., Guevara, D. C y Osuna, A. 1983b. Evolución de las poblaciones de amebas limax (Protozoa: Lobosea) en aguas embotelladas: influencia del tiempo de almacenamiento. *Rev. Iber. Parasitol.* **43** (2): 155-159.
- Fowler, M. y Carter, F. 1965. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp. *Brit. Med. J.* **2**: 740-742.
- Fritsche, R. T., Sobek, D., y Gauton, K.R. 1998. Enhancement of *in vitro* cytopathogenicity by *Acanthamoeba* spp. following acquisition of bacterial endosymbionts. *FEMS Microbiol. Letters.* **166**: 231-236.

- Froumis, N.A., Mondino, B.J. y Glasgow, B. J. 2001. *Acanthamoeba* keratitis associated with fungal keratitis. *Am. J. Ophthal.* **131**(4):508-509.
- Gallegos E., Warren, A., Robles, E., Campoy, E., Calderon, A., Sainz G., Bonilla, P y Escolero O. 1999. The effects of wastewater irrigation on groundwater quality in México. *Wat. Sci. Tech.* Vol **40**(29):45-52
- Garcia, J., Avila, E., Villasmil, G., Russian, C., Redondo, C., Nuñez, M. J., Pérez, E., y Ríos, A. 1997. Meningoencefalitis crónica por *Acanthamoeba* ssp. Reporte de un caso y revisión de la literatura. *Bol. Venez. Infectol.* (1):9-13.
- Gelman, P.B., Rauf, S.J., Nader, R., Popov, V., Borkowski, J., Chaljub, G., Nauta, H. W y Visvesvara, G. S. 2001. Amoebic encephalitis due *Sappinia diploidea*. *J. A. M. A.* **285**: 2450-2451.
- Glenn, P. E., Zamora-Arroyo, F., Nagler, L.P., Briggs., M., Shaw, W., Flessa, K. 2001. Ecology and conservation biology of the Colorado River Delta, Mexico. *J. Arid. Environt.* **49**: 5-15
- Gordon, S. M., Steinberg, J. P., Dupuis, M. H., Kozarský, P. E., Nickerson, J. F. y Visvesvara, G. S. 1992. Culture isolation of *Acanthamoeba* species and leptomyxid amebas from patients with amoebic meningoencephalitis, including two patients with AIDS. *Clin. Inf. Dis.* **15**: 1024-1030.
- Griffin, J. L. 1987. The pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*: environmental isolations, competitors, ecological interactions and flagellate-empty habitat hypothesis. *J. Protozool.* **30**: 403.
- Habte, M. y Alexander, M., Protozoan density and the coexistence of protozoan predators and bacteria prey, *Ecology.* **59**: 140.
- Howe, K. D., Vodkin, H.M., Visvesvara, G., y MacLaughlin, L. G. 199). Identification of two genetic markers that distinguish pathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. *Parasitol. Res.* **83**: 345-348.
- Huang, Z.H., Ferrante, A., y Carter, R.F. 1999. Serum antibodies to *Balamuthia mandrillaris*, a free living amoebae recently demostred to cause granulomatous amoebic encephalithis. *J. Inf. Dis.* **179** (5):1305-1308.
- Huang, CH. Y., Lee., W. M., Kong, H. H., Jeong, H. J y Chung, D. H. 2004. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a lamin-binding protein (AhLBP) from *Acanthamoeba* *healyi*. *Exp. Parasitol.*
- INEGI. 1993. Baja California, Diccionario de nombres geográficos. Cabeceras municipales. 52 pp.
- INEGI. 1999. Desarrollo commercial del estado de Baja California y otras informaciones. 56 pp
- INEGI. 2002. Censo poblacional del estado de Baja California 2000. 145 pp.
- Jager, B. V. y Stamm, W. P. 1972. Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. *Lancet ii*: 1343-1345.
- Jjemba, P.K. 2001. The interaction of protozoo with their potencial prey bacteria in the rhizosphere. *J. Euk. Microbiol.* **48** (3): 320-324.
- Jaramillo, Y. R., Chávez, M. G., Olvera, J. R. y Martínez, J. A. 1989. Encefalitis por una nueva amiba de vida libre, probablemente leptomixida. *Patología* **27**:137-141.

- John, D. T. y De Jonckheere, J. F. 1985. Isolation of *Naegleria australiensis* from an Oklahoma lake. *J. Protozool.* 32 (4):571-575.
- John, D.T. 1993. Oportunistically pathogenic free-living amoebae In: Parasitic Protozoa, Ed. por Kreier J. P. y Baker J., R. Academic Press, Nueva York. 140-246.
- Johnson, R.J. 2000. Development of polymerase chain reaction-based assays for bacterial gene detection. *J. Microbiol. Meth.* 41:201-204.
- Khan, A.N., Jarroll, L.E., Paget, A.T. 2002. Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. *Curr.Microbiol.* 45:197-202.
- Khan, A.N. 2003. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microbiol. Phath.* 34 (6): 277-285.
- Kilvington, S., y Beeching, J., 1995. Development of a PCR for identification of *Naegleria fowleri* from the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(10):3764-7.
- Kyle, D. E. y Pittman, N. 1985. Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in freshwater lakes. *J. Protozool.* 33 : 99-105.
- Kyle, D. E. y Noblet, G. P. 1986. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. I. Willard's Pond. *J. Protozool.* 33 (3): 422 -434.
- Lares-Villa, De Jonckheere, J. F., Moura, H., Rechi, I. A., Ferreira, G. E., Fernández, Q. G., Ruiz, M. C. y Vivesvara, G. S. 1993. Five cases of primary amebic meningoencephalitis in Mexicali, Mexico: Study of the isolates. *J.Clin. Microbiol.* 31:685-688.
- Levy D. A, Bens M. S, Craun G. F, Calderon R. L y Herwaldt B. L. 1998. Surveillance for waterborne-disease outbreaks—United States, 1995-1996. Mor Mortal Wkly Rep CDC Surveill Summ 1998 Dec 11; 47(5):1-34
- Law, R. Y Morton, D., Alternative permanent states in ecological communities. *Ecology*, 71: 1347.
- Lloyd, D., Protheroe, R., Williams, T.N. y Williams, J. L. 1983. Adaptation of the respiratory system of *Acanthamoeba castellanii* to anaerobiosis. *FEMS Microbiol. Let.* 17: 143-146.
- López-Corella, E., De León, B. B. y De Jonckheere, J. F. 1989. Meningoencefalitis amibiana primaria por *Naegleria fowleri* en un adolescente de Huetamo Michoacán México. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 46: 619-622.
- Marciano-Cabral, F. y M. Cline. 1987. Chemotaxis by *Naegleria fowleri* for bacteria. *J. Protozool.* 34:127-131.
- Marciano, C. F., Puftenbargaert, R y Cabral, G. A. 2000. The increasing importance of *Acanthamoeba* infections. *J. Euk. Microbiol.* 47:29-36.
- Marciano-Cabral, F., Ferguson, T., Bradley, G.S y Cabral, G. 2001. Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), the major psychoactive component of marijuana, exacerbates brain infection by *Acanthamoeba*. *J. Euk. Microbiol.* 4s-5s.
- Marciano-Cabral, F., Maclean, R., Merisah, A y LaPat-Lulasko, L. 2003. Identification of *Naegleria fowleri* in domestic water sources by nested PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(10): 5864-5869.

- Martinez, A. J. 1983. Isolation of the two strains of *Acanthamoeba culbertsoni* from human tissue and their pathogenicity and isoenzyme profiles. *J. Clin. Microbiol.* **18**: 1405-1412.
- Martínez, A. J. 1991. Infection of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. *Rev. Inf. Dis.* **13**: 5399-5402.
- Martínez, A. J. y Amado-Iedo, 1979. Meningoencefalitis y encefalitis producidas por amibas de vida libre. *Protozoología, Epidemiología y Neuropatología. Morfología Normal y Patológica B3*: 679-704.
- Ma, P., Visvesvara, G. V., Martínez, A. J., Theodore, F. H., Daggett, P. M. y Sawyer, T. K. 1990. *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections: A review. *Rev. Inf. Dis.* **12** (3): 490-513.
- Meyeryan, H. 1991. The prevalence of *Acanthamoeba* in the human environment. *Rev. Inf. Dis.* **13** (suppl 5): s390-1.
- Migueles, S., y Kumar, P. 1998. Primary cutaneous *Acanthamoeba* infection in a patient with AIDS. *Clin. Inf. Dis.* **27** (6): 1547-1548.
- Milligan, S.M y Band, R. N. 1988. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA as aid in the taxonomy of *Naegleria* and *Vahlkampfia*. *J. Protozool.* **35** (2): 198-204.
- Miller, F. R. 2000. Clinical presentation and significance of emerging opportunistic infection. *J. Euk. Microbiol.* **47**(1): 21-23.
- Nerad, A.T., Hill, F.B., Sawyer, K.T., Anthony, G.L y Gonzalez, T. 1992. *Acanthamoeba*: new agents of human eye disease. *ATCC Quarterly Newsletter.* **3**(12): 6-7.
- Newsome, L.A., Farone, B.M., Beck, G.S y Gunderson, H.J. 2001. Free-living amoebas as opportunistic host for intracellular bacterial parasites. *J. Euk. Microbiol.* **13s-14s**
- Niederhorn, Y. J., Alizache, H., Leer, H., McCulley, P. J. 1999. The patogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. *Microbes infection.* **437-438**
- Novelo, A, y Martínez, M. 1987. *Hydrilla verticillata* (Hydrocharita ceae), problemática maleza acuática de reciente introducción en México. *Anales. Inst. Biol. UNAM.* **58**:97-102.
- Old, K. M., y Darbyshire, J. F. 1980. Mycophagous amoebae in Australian forest soils. *Soil. Biol. Biochem.* **12**: 169.
- Ontiveros, D., Lara, R. M. A. y López L. F. J. 1995. Meningoencefalitis por amiba de vida libre. Revisión de siete casos. *Rev. Med. IMSS* **33** (4). 367369.
- Page, F. C. 1966. *Taxonomical Criteria for Small Amoebae, With a redefinition of the Genera Hartmanella and Acanthamoeba and Descriptions of Three New Species.* Tesis Doctoral, University of Wisconsin. 150 pp.
- Page, F. C. 1974. A further study of taxonomic criteria for limax amoebae with descriptions of new species and a key to genera. *Arch. Protistenk.* **116**: 149-84.
- Page, F. C. 1975. Morphological variation in the cyst wall of *Naegleria gruberi* (Amoebida, Vahlkampfiidae). *Protistologica* **11**: 195-204.
- Page, F. C. 1976. *An illustrated Key Freshwater and soil Amoebae with Notes on Cultivation and Ecology.* Freshwater Biological Association Scientific Publication, Londres. 180 pp

- Page, F. C. 1988. *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae*. Freshwater Biological Association Scientific Publication, England. 122 pp.
- Pireha, M., Suresh, K., Sivanandam, A., Khairul Anuar, A., Ramakrishnan., y Suresh Kumar, G. 1999. Field's stain- a rapid staining method for *Acanthamoeba* spp. *Parasitol. Res.* **85**: 791-793.
- Preston, T.M., Richards, H., y Waton, R.S. 2001. Locomotion and feeding of *Acanthamoeba* at the water air interface of ponds. *FEMS Microbiology Letters*. **19** (2):143-147.
- Prtizker, S. A., Kim, K. B., Agrawal, D., Southern, M. P y Pandya, G. A. 2004. Fatal granulomatous amebic encephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris* presenting as a skin lesion. *J. Am. Acad. Der.* **50** (2): 38-41.
- Pussard, M., y Pons, R. 1977. Morphologie de la paroi kistique et taxonomies du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*. **13**: 557-598.
- Rivera, F., Cerva, L., Martínez, J., Keleti, G., Lares, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Graner, S. R., Saha, A. K. y Glew, R. H. 1990. *Naegleria lovaniensis tarasca* new subspecies, and the Purepecha strain, a morphological variant of *Naegleria lovaniensis* isolated from natural thermal waters in Mexico. *J. Protozool.* **37** (4), pp 301-310.
- Rivera, F. y Paz, E. 1978. Discusión y comentarios sobre los criterios taxonómicos para las amibas del grupo "limax". *Arch. Mex. Anat.* **15**:72-82.
- Rivera, F., Sánchez, M. R., Lugo, A., Ramírez, P., Ortiz, R. y Calderón, A. 1987. Ciliates in a waste stabilization pond system in Mexico. *Water, Air and Soil Pollution Journal*. **34**: 245- 262.
- Rivera, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Ortiz, R., Saldivar, B., Ramírez, P. y Durán A. 1993. Pathogenic and free-living amoebae from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. *J. Environ. Res.* **62**: 43-52.
- Rivera Agüero, F., Lares Villa, F., Gallegos Neyra, E., Ramírez Flores, E., Bonilla Lemus, P., Calderón Vega, A., Martínez Jose, J., Rodríguez Zaragoza, S. Alcocer Durand, J. 1989. Pathogenic amoebae in natural thermal waters of three resorts of Hidalgo, Mexico. *J. Environ. Res.* **50**: 289-295.
- Rivera, F., Medina, F., Ramírez, P., Alcocer, J., Vilaclara, G. y Robles, E. 1983. Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients. *Environ. Res.* **33**: 428-440.
- Rivera, F., Romero, R. y Medina, F. 1984. Meningoencefalitis amebiana primaria producida por *Naegleria fowleri*. *Rev. Fac. de Medicina*. **27**(3):113-122.
- Rivera, F., García, G., Lugo, A., Zierold, E., Islas, J., Ramírez, E. y Bonilla, P. 1986. Amoebae in a waste stabilization pond system in Mexico. *Water, Air and Soil Pollution Journal*. **28**:185-198.
- Rivera, F., Roy-Ocolla, G., Rosas, I., Ramírez, E., Bonilla, P. y Lares, F. 1987. Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *Environ. Res.* **42**: 149-154.
- Rivera, F., Lares, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Ramírez, P. y Paulín, P. 1988. Pathogenic Amoebae Isolated from the Atmosphere of Mexico City and Environs. En: Abbou, R. 1988. *Hazardous Waste: Detection, Control, Treatment*. Ed. Elsevier Science Amsterdam, The Netherlands: 1175-1179.

- Rivera, F., Gallegos, E., Bonilla, P., Ramírez, E., Calderón, A., Ortiz, R. y Rodríguez, S. 1991. Félix Dujardin (semblanza histórica). *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 42: 13-17.
- Rivera, F., Lugo, A., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, R., Rodríguez, S., Ortiz, R., Gallegos, E., Labastida, A. y Chávez, M. 1992. Seasonal distribution of air-borne protozoa in Mexico City and its suburbs. *Water, Air and Soil Pollution* . 61: 17-36.
- Rivera, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Calderón, A., Rodríguez, S., Ortiz, R., Hernández, D. y Rivera, V. 1994. Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in Mexico City and its suburbs. *Water, Air, and Soil Pollution*. 74: 65-87.
- Rodríguez-Zaragoza, S. 1994. Ecology of Free-Living Amoebae. *Crit. Rev. Microbiol.* 20(3): 225-241.
- Robert, V. V. y Rorke, L. B. 1973. Primary amebic encephalitis, probably from *Acanthamoeba*. *Ann Intern. Med.* 79: 174-179.
- Rodríguez, R., Méndez, O., Molina, O., Luzardo, G., Martínez, A. J., Visvesvara, G. S., y Cardozo, J. 1998. Infección del sistema nervioso central por amebas de vida libre: Comunicación de tres nuevos casos venezolanos. *Rev. Neurol.* 26(154):1005-1008.
- Sawyer, T. K. 1989. Free-living pathogenic and non-pathogenic amoebae in Maryland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (5): 1074-1077.
- Seijo, M.M., Gonzalez-Mediero, G., Santiago, P., Rodríguez, D. A., Diz, J., Conde, C., y Visvesvara, G. S. 2001. Granulomatous amebic encephalitis in a patient with AIDS. Isolation of *Acanthamoeba* sp. Group II from brain tissue and successful treatment with sulfadiazine and fluconazole. *J. Clin. Microbiol.* 38 (10): 3892-5.
- Sheehan, K. B., fagg, J.A., Ferris, M.J y Henson, J.M. 2003. PCR detection and analysis of the free-living amoeba *Naegleria* in hot springs in Yellowstone and grand teton national parks. 69 (10): 5914-5918.
- Shuster, L. 2002. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin. Microbiol. Rev.* 15 (3): 342-354.
- Shuster, F.L., DeJonckheere, J.F., Moura, H., Srirum, R., Garner, M.M., Visvesvara, G.S. 2003. Isolation of a thermotolerant *Paravhal Kampfia* sp. From lizard intestine: biology and molecular identification. *J. Euk. Microbiol* 50 (5): 373-378.
- Rowbotham, T. J. 1983. Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interactions of those and other isolates with amoeba. *J. Clin. Pathol.* 36: 978.
- Skocil, V., Drorab, R., Sterva, J., Serbus, K. C., y Cerva, L. 1972. Epidemiological study of amoebae of limax group in military communities. V. Relation between the presence of amebas of the limax group in nasal swabs and a pathological finding in nasal mucosa. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 16:101
- Tomlinson, A., Simmons, P.A., Seal, D.V., y Mcfadyen, K. 2000. Salicylate inhibition of *Acanthamoeba* attachment to contact lenses: a model to reduce risk infection. *Ophthalmology.* 107(1): 112-117.
- Valenzuela, G., López-Corella, E. y De Jonckheere, J. F. 1984. Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from northwestern México. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78: 558-559.

Vivescan, O. V. 1989. Dinamica poblacional de *Hydrilla verticillata*, Rol y simulación de su control por el pez Amor utilizando un modelo Presa-Depredador. C.N.A. I.M.T.A. pp.1-19.

Visvesvara, G. S., Martínez, A. J., Shuster, F. L., Leitch, G. J., Wallace, S. V., Sawyer, T. K. y Anderson, M. 1990. Leptomyxid ameba, a new agent of amebic meningoencephalitis in humans and animals. *J. Clin. Microbiol.* **28** (12) : 2750-2756 .

Visvesvara, G. S., y Stehr-Green, J. K. 1990. Epidemiology of free-living ameba infections. *J. Protozool.* **37** (4) : 255-335 .

Walöchnick, J., Obwaller, A y Aspöck, Horst. 2002. Correlations between morphological, molecuar biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (10): 4408-4413.

Weekers, P. H. H. y Van Der Drift, C. 1993. Nitrogen metabolizing enzyme activity in the free-living soil amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga* and *Hartmannella vermiformis*. *J. Euk. Microbiol.* **40** (3): 251-254.

Weldon-Linne, M., Tan, B. A., Rhone, D. P., Penning, CH. L. y Visvesvara, G. S. 1992. *Acanthamoeba* infection presenting as skin lesions in patiens with AIDS. *Am. J. Clin. Pathol.* **97**: 460.

Winieka-Krusnell, J y Linder, E. 2001. Bacterial infections of free-living amoebae. *Res. Microbiol.* **152**: 613-619.

Yagita, K., Endo, T., y De Jonckheere, F. J. 1994. Clustering of *Acanthamoeba* isolates from human eye infections by means of mitochondrial DNA digestions patterns. *Parasitol. Res.* **84**. 284-289.

APÉNDICE I.

Medios de Cultivo y Tinciones

Medio agar no nutritivo con *Escherichia coli*: (NNE).

La composición y preparación del medio se da de acuerdo con De Jonckheere (1984)

NaCl.....	0.120 g.
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0.004 g.
CaCl ₂ ·H ₂ O.....	0.004 g.
Na ₂ HPO ₄	0.192 g.
KH ₂ PO ₄	0.132 g.
Bactoagar.....	15 g.

Se mezclan en seco todos los ingredientes y se disuelven todos los componentes en 500 ml de agua destilada, aforando la mezcla a 1000 ml e hirviéndola hasta disolver totalmente el agar. Enseguida, se esteriliza en una autoclave a 121°C por 20 minutos. El medio se distribuye en cajas Petri estériles (capa delgada), aguardando una hora hasta gelificar. Se adicionan 5 gotas de una suspensión concentrada de agua destilada con *Enterobacter aerogenes* (en sustitución de *E. coli*) muerta a las placas de agar; luego, se extendió la bacteria por toda la caja y se esperó 20 minutos y se almacenó en un cuarto frío a 4°C hasta el tiempo de usarla.

La bacteria se obtiene cosechándola a partir de cultivos puros en solución con agua destilada e inactivándola en baño de agua a 70 °C por 30 minutos.

Medio PBSGM (medio de Chang).

Medio líquido PBSGM (Fosfato, Biotriptasa, Suero, Glucosa Medio, por sus siglas en inglés). Este medio se utiliza para aislar, axenizar y mantener los aislados de AVL que hayan crecido en el medio NNE (De Jonckheere, 1984).

Medio PBSGM

Biotriptasa.....	16.6 g
Dextrosa.....	2.7 g
Na ₂ HPO ₄	1.5 g
KH ₂ PO ₄	0.9 g
Agua destilada.....	1000 mL

Esta solución se envasa en tubos con tapón de rosca, vaciando en cada tubo 2.7 mL de medio. Se esterilizan los tubos con el medio a 15 lb de presión durante 15 minutos. Después de esterilizado el medio ya frío, se agrega a cada tubo 0.3 mL de suero fetal de ternera adicionado con penicilina y kanamicina a una concentración de 200 µg/ mL de cada antibiótico. Los tubos se conservan en refrigeración.

Medio de Nelson para *Naegleria*

Solución de Page.

MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0.4 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O.....	0.4 mg
Na ₂ HPO ₄	14.2 mg
KH ₂ PO ₄	13.6 mg
NaCl.....	12.0 mg
Agua destilada.....	100 mL

A la solución anterior agregar:

Infusión de hígado
(Oxoid Panmede).....0.17 g
Glucosa.....0.17 g

Vaciar 4.5 ml en tubos con tapón de rosca de 16 X 125 mm. Esterilizar en autoclave por tubo (concentración final de 10 % de suero) antes de utilizar.

Medio modificado PYNF

Solución 1

Peptona DIFCO..... 10.0 g
Extracto de levadura DIFCO.....10.0 g
Acido nucleico de levadura
Sigma (almacenar a -20 °C)..... 1.0 g
D-Glucosa..... 1.0 g
Acido fólico.....15 mg
Solución de Hemina..... 0.5 mL
KH₂PO₄..... 0.362 g
Na₂HPO₄..... 0.5 g
Agua destilada.....900 mL

Si es necesario ajustara PH de 6.9 y esterilizar a 121 °C pcr 15 minutos y almacenar a 4 °C.

Solución de Hémina

Hemina.....200 mg
Trietalomina.....100 mL

Almacenar a 4 °C

Medio Completo

Solución 1 900 mL

Suero fetal de bovino.....100 mL
Penicilina (100 000 U/mL)..... 1 mL
Estreptomicina (100 000 U/ mL)..... 1 mL

Almacenar a 4 °C.

Tinciones

Tinción Tricrómica (modificada por Cerva, L.com.pers.)

Hematoxilina de Gómori.

Cromótopo 2R.....0.6 g
Verde rápido FCF.....0.3 g
Ácido fosfowolfrámico.....0.6 g
Ácido acético.....1.0 mL
Agua destilada.....100 mL

Hematoxilina de Koolovsek

Hematoxilina.....	0.2 g
Sulfato de aluminio y potasio.....	5.0 g
Quelaton III.....	0.1 g
(no esencial)	
Peryodato de sodio.....	20 mg.
Agua destilada.....	100 mL

Alcohol sublimado

HgCl ₂	40 g
NaCl.....	50 g
Alcohol 50 %.....	1000 mL

Carbonato de litio al 1 %

Alcohol

Alcohol etílico.....	99.0 mL
Ácido acético.....	1.0 mL

Se lava una caja con amebas en buen crecimiento con 5 mL de agua destilada.

Se hace el arrastre de este lavado de amebas con un asa acodada.

Se marcan los portaobjetos con un círculo de cera donde se va a poner el concentrado de amebas.

Con un bulbo unido a una pipeta Pasteur de punta alargada se toma el lavado de las cajas y se vacía en un tubo de ensaye con tapón de rosca. Centrifugar a 1000 g durante 10 min.

Se desecha el sobrenadante y se toman 3 gotas de la pastilla que se ha sedimentado en el tubo para colocarlas en el portaobjetos ya marcado con la cera.

Se ponen los portaobjetos en cámaras húmedas (cajas Petri con agua destilada).

Estas cámaras se incuban a la temperatura óptima a la que crece la ameba, durante 30 minutos con el objeto de que las amebas se adhieran al cristal. Ver al microscopio inmediatamente al sacarlas de la incubadora.

Se sumerge lo más pronto posible en el alcohol sublimado, debido a que las amebas se pueden separar del vidrio. Se mantiene la muestra sumergida de 1 a 2 horas (en este paso se lleva a cabo la coagulación de las proteínas).

Se hace el cambio de las muestras en alcohol al 80 %, y se deja durante toda la noche.

NOTA: Las preparaciones no de deben dejar secar.

Al día siguiente se hace un cambio de agua destilada para enjuagar.

Proceso de Tinción

La muestra se sumerge en hematoxilina por no más de 30 segundos.

Se enjuaga con agua alcalina (Unas gotas de NaOH 0.1 N en agua destilada con el objeto de que la hematoxilina vire de rojo a azul).

Se enjuaga con agua de la llave abundantemente.

Se le pone la solución de Gómori (Mezcla Tricrómica) durante 10 minutos.

Se enjuaga rápidamente en la mezcla de solución ácido-acético-alcohol para quitar el exceso de solución de Gómori.

Se sumerge la muestra en etanol al 96 % 10 veces.

En otro recipiente con alcohol se vuelve a sumergir la muestra 10 veces (sacando y metiendo). Esto se hace con el objeto de deshidratar la preparación. Finalmente se sumerge en el xilol durante 5 minutos.

APÉNDICE II.

Tablas de resultados. Factores ambientales.

Tabla 16 Parámetros ambientales medidos en los canales de riego Mexicali, B. C. Muestreo I

Lugar	T. amb. ° C	T. agua ° C	OD mg/l	pH	Conductividad microsiemens (µS/cm)	Coliformes Totales UFC/100mL
Coronita	29.5		11.5	8.4	1203	1200
Tulicheck. E. Xochimilco	31.2	17.2	11.4	8.5	1539	>0.5
Nayarit	29.0	16.7	14.6	8.6	1390	100
Oaxaca	27.5	16.6	15.3	8.6	1346	100
Silva sur	32.5	19.6	12.1	8.5	1271	>0.5
Silva sur 2	35.5	19.6	12.1	8.5	1427	100
Canal alimentador	29.0	17.2	10.0	8.2	1304	200
Represa Morelos	30.0	16.0	10.8	8.1	1473	300
Ladriñera I	35.5	21.1	10.3	8.2	1318	1000
Ladriñera II	31.0	18.6	18.7	8.9	1517	300
E. Morelos Chapoteadero	28.5	25.0	6.3	7.7	903	>0.5
Irapuato	23.0	18.3	10.5	7.7	6548	2900
I. Agrarias	22.0	17.1	13.0	8.6	1543	100
Abasolo	21.0	17.2	13.5	8.6	1504	100
Independencia ley	21.0	17.4	11.3	8.2	1509	400
Independencia Morelos	31.5	17.0	12.2	8.4	1451	300

Tabla 17. Parámetros ambientales medidos en los canales de riego Mexicali, B. C. Muestreo II

Lugar	T ambiente °C	T agua °C	pH	OD mg/L	% Saturación OD	Conductividad microsiemens µS/cm	Coliformes Totales UFC/100 ml
Coronita	35.5	28	8.2	5.4	56	1257	700
Nayarit	39	30	8.4	6.2	80.1	1097	400
Oaxaca	41	28.5	8.5	10.6	142	1256	700
Irapuato	44	31.8	8.2	8.5	116	5221	500
I. Agrarias	45	30.9	8	11.2	156	1177	400
Abasolo	45	29.9	8.3	10.8	137	1143	400

Tabla 18. Parámetros ambientales medidos en los canales de riego Mexicali, B. C. Muestreo III

Lugar	Temp. amb. °C	Temp. agua. °C	pH			OD MGL (%)			Conductividad Microsiemens (µS/cm)	Cloro mg/L	Coliformes totales UFC/100 mL	Bacterias totales UFC/100 mL	SST mg/L	SSF mg/L	SSV mg/L
			sup.	2/3	fondo	sup.	2/3	fondo							
Apuato	37.0	26.6	8.4	8.4	8.4	3.1	3.1	2.6	5822	0.0	700	43200	228	200	28
Represa Lorelos	39.1	28.1	8.9	8.9	ND	6.4 (87.6)	6.4 (87.6)	ND	1681	0.0	200	2300	4	2	2
Canal Alimentador Oriente	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Adrillera II	27.7	27.7	8.5	8.9	8.9	5.7 (78.0)	5.1 (84)	ND	1477	0.0	1200	25600	57	50	7
Adrillera I	38.4	27.7	8.3	8.3	ND	8.15 (115)	8.0 (110)	8.15 (115)	1567	0.0	1100	25000	44	37	7
Independencia Morelos	35.5	26.7	9.7	9.7	9.7	8.3 (80)	8.1 (80)	8.2 (79)	1570	0.0	900	6300	10	7	3
Independencia Chapoteadero	38.8	26.5	8.5	8.4	8.5	7.8 (103)	7.8 (103)	ND	1327	0.0	600	3800	10	8	2
Taxaca	33.8	28.8	8.7	8.7	ND	10.9 (148)	11.3 (150)	ND	1231	0.0	300	12300	34	27	7
Layarit	29.5	28.7	8.8	8.8	ND	9.7 (119)	ND	ND	1881	0.0	700	3000	6	7	2
Independencia Ley	27.9	25.8	9.3	ND	ND	7.9 (96.4)	8.0 (98.0)	ND	1477	0.0	>0.5	2600	6	4	2
Las Granjas "B"	33.4	26.1	8.9	8.8	ND	8.3 (109.0)	8.7 (119.0)	8.3 (105.0)	1567	0.0	2100	37000	189	152	17
Basolo	33.8	26.0	8.8	8.9	8.8	9.2 (120)	9.0 (110.0)	ND	1570	0.0	450	7500	5	5	3
Coronita	47.8	27.1	ND	9.2	ND	5.9 (82.0)	5.8 (82.0)	ND	1327	0.0	500	32100	62	45	17
Tulicheck	45.0	27.9	9.2	9.2	ND	5.9 (82.0)	5.8 (82.0)	ND	1231	0.0	1800	6500	34	30	4

APENDICE II

Ubicación taxonómica y descripción de las AVL encontradas en el Valle de Mexicali.

Género *Naegleria*

Las amebas del género *Naegleria* presentan un trofozoito de tamaño variable de 15 a 28 μm . El desplazamiento es muy rápido por la formación de lobópodos eruptivos hialinos.

El quiste tiene forma esférica y varía de tamaño de 5.92 a 11.71 μm con una medida promedio de 5.92 a 7.02 μm en observaciones a microscopio de contraste de fases son visibles uno o varios poros sobre la pared del quiste, los cuales son más conspicuos en quistes vacíos que en quistes maduros o prequistes.

Una característica notable es una fase temporal ameboflagelar, que es aparente cuando las amebas son puestas en contacto con agua destilada a 37 °C, después de 2 horas, se forman de uno a dos flagelos en uno de los extremos del trofozoito de *Naegleria* y el desplazamiento de la ameba por el movimiento flagelar se acelera.

Género *Vahlkampfi*

Los quistes de este género carecen de poros para el exquistamiento; gránulos perinucleares o irregulares en forma y tamaño; la separación de las paredes varía con las especies. No existe una fase flagelar, puede haber pigmentación en algunas especies; presentan un trofozoito de tamaño variable con un tamaño de 14.22 a 37.22 μm ; amebas comúnmente con unos pocos filamentos uroidales, masas polares compactas, no fragmentadas.

Género *Thecamoeba*

El trofozoito es aplanado u ovoide, generalmente uninucleado, con una medida promedio de 10.25 μm , un hialoplasma prominente en el extremo anterior, no se observan pseudópodos o ramificaciones en el extremo anterior excepto en formas muy elongadas; el quiste de forma esférica con una medida promedio de 9.72 μm

Género *Hartmannella*

Son organismos que poseen un trofozoito alargado y monopodial, su forma es "limax" y se desplazan por movimientos suaves, el pseudópodo anterior redondeado, con cubierta hialina siempre presente, la longitud del trofozoito es entre 10 a 36 μm , con una media de 18.3 μm ; los quistes esféricos o ligeramente ovoides con una media de 8.9 μm , estructuras en forma de cáliz por pequeños brazos cónicos, el diámetro promedio es de 13.95 μm

Genero *Willaertia*

Este género tiene el endoquiste y el exoquiste poco unidos, con poros de exquistamiento muy aparentes que salen desde la pared del endoquiste con un ámbito de 14 a 18.9 μm y una media de 18.2 μm ; los trofozoitos tienen una sola capa uniforme de gránulos perinucleares con un ámbito de 9 a 35.3 μm y una media de 25.3 μm .

Genero *Rosculus*

Su forma de locomoción alcanza el ámbito de 7.11-23.7 μm , con una media de 13.08 μm , los quistes son ovales o esféricos y lisos de un diámetro de 5.3 μm y un ámbito de 4.7 a 9 μm .

Género *Acanthamoeba*

Los trofozoítos son irregulares y algo aplanados, y se desplazan por acantópodos cortos y muy finos que son producidos desde los bordes anteriores del lobópodo. Los quistes tienen siempre una doble pared la cual es un distintivo para la separación de las especies. El ectoquiste es generalmente ondulado, el endoquiste es redondo, angular o estrellado y tiene varios poros para el exquistamiento en los bordes angulados. *Acanthamoeba* no presenta una fase flagelar.

Acanthamoeba polyphaga.

Una pequeña porción de los quistes son reticulados; el endoquiste es muy irregular y prácticamente nunca es estrellado; el ectoquiste es delgado y separado del endoquiste; el número promedio de esquinas del endoquiste es de 5-6, el diámetro promedio es de 12.8 μm , con un rango de 9.4-17.95 μm .

Acanthamoeba castellanii.

Presenta un quiste reticulado, el endoquiste es más o menos esférico conectado por pequeños brazos cónicos, el diámetro promedio es de 13.98 μm

Acanthamoeba culbertsoni

El endoquiste es generalmente redondeado, en ocasiones ligeramente poligonal, el ectoquiste es delgado y ondulado, más o menos conectado con el endoquiste, un número promedio de 5-6 poros, el diámetro del quiste es de 17 μm .

Género *Mayorella*.

Trofozoítos con subseudópodos mamiliformes, con una delgada cutícula, generalmente con vacuolas contráctiles, con una longitud promedio de 90 a 160 μm , la forma flotante comúnmente sin una clara separación entre la masa central y los pseudópodos.

Género *Vanella*.

El trofozoíto más o menos flabelado también se conocen en forma de estrella, con el hialoplasma anterior hasta la mitad, uninucleado, sin cristales citoplasmáticos, con una longitud promedio de 24 a 46 μm , hasta el momento no se encuentran quistes en algunas de las especies.

Género *Amoeba*.

Trofozoíto con una longitud de 22 a 62 μm en locomoción, generalmente son polipodiales, superficie cubierta, núcleo esférico muy grande.

Género *Platyamoeba*.

Generalmente ovales, en ocasiones elongadas, la longitud del trofozoíto es de 15 a 35 μm , no se conocen quistes, se sospecha que puede ser *Vannella*.