

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**“EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA DISTRIBUCION  
DE AMEBAS DE VIDA LIBRE EN UN SISTEMA DE AGUAS  
TERMALES ALIMENTADO POR UN GÉISER  
EN EL ESTADO DE HIDALGO”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**

**B I O L O G O**

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

**CLAUDIA URBINA MARTÍNEZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DRA. ELVIA MANUELA GALLEGOS NEYRA**



**LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO 2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*“Una cosa he aprendido a lo largo de mi vida:  
toda nuestra ciencia, contrastada con la  
realidad, es primitiva e infantil  
-pero, aun así, es lo más preciado que poseemos”*

*Albert Einstein, 1945*

### *Agradecimientos*

Quiero comenzar estos agradecimientos a la Máxima Casa de Estudios, la UNAM, por abrirme sus puertas desde el CCH hasta la Facultad, y formar parte de su tan grande cuerpo estudiantil del cual me siento honrada, y orgullosamente seguiré siendo de sangre azul y piel dorada.

Extiendo estos agradecimientos a mi asesora de tesis, la Dra. Elvia Gallegos Neyra y al Biol. Arturo Calderón Vega por abrirme las puertas del laboratorio de Biología Molecular y ayudarme a realizar mi trabajo de tesis, por cierto a pesar de romper sin querer algunas lámparas de alcohol. De verdad y con todo el corazón, ¡MUCHAS GRACIAS!, ambos son un ejemplo a seguir para mí.

También agradezco a mis revisores de tesis, al Dr. Sergio Cházaro Olvera, a la Dra. Nandini Sarma y a la M.C. Ma. de los Angeles Sanabria Espinoza, por las sugerencias y comentarios emitidos para el mejoramiento de este trabajo.

Con profundo agradecimiento menciono al M.C. Jonathan Franco López por brindarme su ayuda y asesoramiento durante mi estancia en la carrera, y por motivarme a continuar estudiando. GRACIAS.

Nunca voy a olvidar a los profesores que me impartieron clase y que de tal manera ayudaron a mi formación de biólogo. A todos ellos, ¡GRACIAS!.

### *Agradecimientos y Dedicatorias*

Me falta mucho por recorrer, pero este es un paso que doy para continuar en mi camino. Y no lo hubiera logrado si no existiera la presencia de seres tan importantes que forman parte de mi vida, mi familia y Dios, a quien dedico este logro y por seguir con vida.

Papito, se que donde te encuentres me estas viendo; y te agradezco por la herencia más grande y valiosa que me pudiste dar, tu amor. Parte de este logro es tuyo, porque gran parte de tu vida y con esfuerzo la dedicaste a nosotros. TE AMO.

Mamita (“Lolo”) gracias por ser conmigo además de ser mi madre, mi amiga, por escucharme y por inculcarme la humildad y la fuerza, porque hay que sonreírle a la vida aunque por dentro te estés cayendo. Por alentarme a continuar, GRACIAS porque esto también es tuyo.

Y como olvidar a mis encimosos hermanos. Empezando con la “flaca”, porque eres una gran mujer siempre tan aguerrida, y por ser a una de las personas que admiro. Beto, gracias por preocuparte por todas nosotras y claro por ser para mí un ejemplo a seguir. A la “Naye” gracias por estar con mi hermano y por querer formar parte de esta familia, y más gracias por traer al “Juan Simón” en tu panzita, que por cierto ya quiero abrazarlo. Triny, mi “manita”, has estado conmigo desde que eras una mocosita, y te agradezco por ser mi compañera de juegos, de ilusiones y sueños, por escuchar mis tonterías, y sobre todo por ser mi amiga porque me conoces y sabes todo de mí.

“Agüela” gracias por quererme y por el ejemplo que me has dado de que “siempre hay algo que hacer”.

Kmonchito, se que es poco el tiempo que hemos compartido, y ya eres parte de mi vida, gracias por quererme, T- ROKIE.

Con afecto y dedicación a mis amigas comadrejas, y por orden alfabético agradezco a: Lauris, Maye, Miriam, Olivia y Viris, por estar conmigo y hacerme su confidente; y a ti Karelia que además de ser compañera de laboratorio, has sido una amiga para mí. Y sin olvidar a mis compañeros de grupo que con ellos también compartí momentos inolvidables en esas tan locas prácticas de campo.

A mis amigas del CCH, a Gaby, Gil y Mari, por no olvidarse de mí y compartirme los momentos que han formado parte de su vida.

A mis compañeros de laboratorio por su amistad: Karelia, Alejandro y Jesús (que por cierto gracias por tus consejos para esta tesis).

Quiero agradecer al Prof. Fulvio Pérez Ortega por alentarme a continuar.

Y tú compañero que lees esta tesis, que espero que te sea de gran ayuda, no dejes de creer que cuando tu quieres algo lo consigues con esfuerzo, y este trabajo es muestra de ello. ¡Buena Suerte!

# CONTENIDO

## I. Resumen

## II. Introducción

1. Ciclo de vida e importancia médico de los principales géneros patógenos de AVL
2. Taxonomía de los principales géneros de AVL
3. Ecología de AVL

## III. Antecedentes

## IV. Justificación

## V. Objetivos

## VI. Área de estudio

## VII. Material y Métodos

1. Muestras
2. Trabajo de campo
  - 2.1. Recolección y transporte de muestras
    - 2.1.1. Agua
  - 2.2. Parámetros fisicoquímicos "*in situ*"
    - 2.2.1. Temperatura del agua
    - 2.2.2. Temperatura ambiental
    - 2.2.3. Oxígeno disuelto
    - 2.2.4. pH
    - 2.2.5. Conductividad
3. Trabajo de laboratorio
  - 3.1. Análisis bacteriológicos
    - 3.1.1. Bacterias y coliformes totales
  - 3.2. Aislamiento de AVL
  - 3.3. Clonación
  - 3.4. Identificación taxonómica de los aislados
  - 3.5. Pruebas de transformación ameboflagelar
  - 3.6. Axenización
  - 3.7. Determinación de amebas en un gradiente de temperatura del agua
4. Análisis estadístico

## VIII. Resultados y Discusión

1. Diversidad de AVL durante los muestreos
2. Temperatura del agua
3. Diversidad y distribución de AVL en relación a la temperatura del agua
4. Temperatura ambiental
5. Oxígeno disuelto
6. pH
7. Bacterias y coliformes totales
8. Análisis de agrupamiento (Ligamiento simple: Jaccard)
9. Coeficiente de correlación

## IX. Conclusiones

## X. Referencia bibliográfica

## Anexo 1

## Anexo 2

**Anexo 3**  
**Anexo 4**

## I. RESUMEN

Las amebas de vida libre (AVL) se encuentran distribuidas ampliamente en la naturaleza, por lo que se han aislado de una gran variedad de hábitats debido a que tienen la característica de soportar amplias variaciones ambientales, como lo pueden ser las temperaturas elevadas. La característica de las amebas de ser termotolerantes favorece su proliferación en aguas termales naturales y en aguas contaminadas térmicamente. Debido a esta condición, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la temperatura sobre la distribución y diversidad de AVL en el balneario “El Géiser” ubicado en Tecozautla, en el estado de Hidalgo. Este municipio se encuentra en la región hidrológica del Pánuco, en la cuenca del río Moctezuma, y del río Tecozautla el Municipio se localiza en una zona rica en manantiales de aguas termales. Se realizaron cuatro muestreos a lo largo de un año de tal manera que cada muestreo cubriera un período estacional. Se tomaron los parámetros fisicoquímicos *in situ*, temperatura del agua y ambiental, pH, oxígeno disuelto, conductividad, además del análisis de bacterias y coliformes totales presentes en el agua. Se determinó la composición especies y géneros amebianos del balneario por microscopía de contraste de fases y claves dicotómicas para gimnamebas. El género con mayor frecuencia de aislamiento fue *Naegleria* (38%), seguido de *Vahlkampfia* (22%) y *Acanthamoeba* (16%). La mayoría de los aislados se distribuyeron en el intervalo de temperatura de 33 a 40°C. La temperatura del agua influyó en la distribución de las amebas que han sido reportadas como termotolerantes, aunque estadísticamente no hubo relación entre este parámetro y la distribución de estos protozoos. Los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria* se aislaron a temperaturas mayores de los 43°C, siendo estos géneros reportados como termotolerantes. A pesar de que las amebas del género *Naegleria* se distribuyeron uniformemente en el intervalo que se registró para las amebas en este muestreo, sólo dos aislados pertenecientes a las especies *N. fowleri* y *N. gruberi* se aislaron a 53°C. Por lo que respecta a los demás parámetros, los valores registrados se encontraron dentro de los intervalos tolerados por las AVL. Es importante mencionar que entre las especies aisladas se encuentran aquellas que han sido reportadas como patógenas para el humano, siendo un riesgo para los usuarios de este balneario. Se concluye que la temperatura si tiene un efecto en la distribución y diversidad de AVL, en este sistema acuático.

## II. INTRODUCCIÓN

Las amebas de vida libre (AVL) son un grupo de organismos que tiene una amplia distribución en la naturaleza (suelo, agua y atmósfera) y tienen la característica de ser ubicuos, ya que han sido aislados de una gran variedad de regiones alrededor del mundo, además no dependen de un hospedero para su transmisión y dispersión (Cabanés *et al.*, 2001).

Estos protozoos, también son conocidos como amebas “típicas”, pertenecen a la subclase Gymnamoebia o amebas “desnudas”, ya que carecen de testa o caparazón, es importante destacar en ellos la forma en que se dividen el o los núcleos, ya que esto se utiliza para la sistemática del grupo (Martínez-Pérez *et al.*, 2004). Dentro de esta subclase se incluye a los géneros *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia*, *Vanella*, *Rosculus*, y *Sappinia*, y varias otras representativas que en reconocimiento de su habilidad para sobrevivir dentro de hospederos (mamíferos, reptiles, aves, peces) y como organismos de vida libre han sido llamadas amebas anfitriónicas (gr. *amphi*= ambos lados) (Page, 1974).

Dentro de este grupo de amebas existe un conjunto de especies de importancia médica, debido a que tienen la capacidad de producir infecciones en el sistema nervioso central (SNC), tales como la meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP) o la encefalitis amebiana granulomatosa (EAG), así como infecciones en los ojos, piel y otros tejidos del ser humano. La puerta de entrada para estas infecciones puede ser a través de la piel o mucosas, así como por la aspiración nasal de agua o aire contaminados con amebas o quistes viables de las mismas. Algunas de estas infecciones son consideradas como oportunistas como es el caso de la EAG (causadas por *Acanthamoeba* y *Balamuthia*) enfermedad crónica; en contraste la MEAP (causada por *Naegleria fowleri*) y la queratitis ocular, son infecciones no oportunistas. (Kilvington *et al.*, 1991; Visvesvara *et al.*, 1993).

Desde el punto de vista ecológico, uno de los principales factores para la distribución de las AVL's es la presencia disponible de bacterias como fuente principal de alimento. Además las AVL's tienen la característica de ser termotolerantes y esta condición favorece su proliferación en ambientes específicos, por lo que se les encuentra comúnmente en aguas termales, naturales y aguas contaminadas con descargas industriales térmicas (De Jonckheere y Van de Voorde, 1977), además pueden soportar variados ámbitos de salinidad y pH, debido por lo que tienen una amplia distribución en la naturaleza (Schuster y Visvesvara, 2004).

### **1. Ciclo de vida e importancia médica de los principales géneros patógenos de amebas de vida libre**

Las AVL's son organismos con características morfológicas distintas a lo largo de su ciclo biológico, y la fase que adopten en su ciclo de vida depende de las

condiciones fisico-químicas del ambiente en que se desarrollan. El ciclo de vida de las AVL's comprende una fase activa que es el trofozoíto, el cual se alimenta y se reproduce; y una fase inactiva en forma de quiste. En algunos géneros de la familia Vahlkampfiidae se presenta una forma flagelada durante su ciclo biológico (Bottone, 1993; John, 1993).

De manera general el trofozoíto de una ameba de vida libre presenta un núcleo con un nucleolo central y se divide por fisión binaria a través del proceso mitótico, su citoplasma tiene vacuolas contráctiles muy prominentes. El quiste es la forma resistente a la desecación y permite que el organismo se encuentre en estado de latencia utilizando sus reservas (glucógeno) de tal manera que persista en la naturaleza. Se distingue por poseer una capa externa (ectoquiste) y una capa interna (endoquiste), en las cuales las paredes se comunican a través de un poro con un tapón de mucoide llamado opérculo (Bottone, 1993).

Las AVL's las podemos encontrar en la naturaleza alimentándose en forma de trofozoíto, en un ambiente acuático en forma de ameboflagelado, o bien en forma de quiste. Cuando el humano entra en contacto con ellas, las amebas pueden entrar en cualquiera de estas formas a través de sitios primarios como la piel, el neuroepitelio u otras superficies respiratorias, y es importante mencionar que sólo una pequeña porción de amebas que se asientan en estas puertas de entrada sobrevive, por lo tanto para que se de una infección exitosa, por ejemplo para *Naegleria fowleri*, se necesita una dosis elevada de amebas asociada a bajos niveles de respuesta antiamebiana, como puede ocurrir en los niños o en individuos inmunodeprimidos como pacientes de SIDA, diabetes o alcohólicos para una infección causada por *Acanthamoeba* (Martínez, 1980; Marciano-Cabral *et al*, 1987). Una vez que han entrado ocurre la invasión del sistema nervioso central en donde las amebas revierten su forma a trofozoíto.

Debido a la distribución de estas amebas en la naturaleza y al frecuente contacto del humano con ellas, se han detectado anticuerpos contra *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Balamuthia* aumentando el efecto tóxico de los macrófagos y neutrófilos en contra de las amebas (Marciano-Cabral *et al*, 1987). Las infecciones que llegan a causar estos protozoos son la Encefalitis Amebiana Granulomatosa (EAG) y la Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MEAP).

Para causar infección por EAG, *Acanthamoeba* debe invadir el SNC por vía hematogena a partir de la instilación nasal y luego atravesar la mucosa nasal, sin embargo, existe otra vía de acceso que puede ser por infección cutánea; una vez que la ameba ha llegado al sistema nervioso ataca el tejido del cerebro produciendo lesiones de necrosis de tipo hemorrágico, principalmente en el encéfalo, cerebelo, y en el tallo cerebral, en donde las amebas se incuban en un período que puede ir de semanas a meses. Los síntomas de la EAG son dolor de cabeza, fiebre y comportamientos anormales del individuo que la padece (Martínez, 1980; y Schuster y Visvesvara, 2004).

Otra de las infecciones causada por *Acanthamoeba* es la queratitis, la cual es considerada una infección no oportunista, ya que puede desarrollarse en

personas no inmunocomprometidas, aunque pueden padecerla pacientes crónicamente enfermos. Los factores riesgo para contraer esta infección son la falta de higiene en lentes de contacto, usar soluciones salinas contaminadas, o nadar en agua donde se encuentre este organismo (Schuster y Visvesvara, 2004).

*Naegleria fowleri* es el agente etiológico de la meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP), esta es una enfermedad fulminante que se desarrolla en horas después de que se ha estado expuesto a agua contaminada con la ameba, acusando la muerte de algunos individuos en un lapso tan corto que puede ser de hasta 72 horas. La fase invasiva de *N. fowleri* es el trofozoíto, y la infección es causada por aspiración de agua contaminada, en donde puede haber flagelados o quistes los cuales entran a la nariz del bañista, una vez que han entrado, la ameba puede revertirse a la forma trófica e invadir la mucosa nasal, la placa cribiforme y los bulbos olfatorios del cerebro. En el caso de la MEAP, solo los trofozoítos de *Naegleria* son abundantes en el tejido del cerebro y en el fluido espinal, a diferencia de la EAG en donde los trofozoítos y los quistes de *Acanthamoeba* se pueden encontrar en cortes histológicos, aunque están ausentes en el fluido cerebroespinal (Bottone, 1993; John, 1993).

Otras especies que han sido reportadas actualmente como patógenas son *Balamuthia mandrillaris*, a la cual se le han atribuido casos de encefalitis granulomatosa (balamutiosis) en pacientes enfermos de VIH/SIDA; y *Sappinia diploidea* causante de encefalitis en un hombre inmunocomprometido (Schuster, 2004).

## **2. Taxonomía de los principales géneros de amebas de vida libre**

El esquema clásico de Bütschli (1880-1889) divide a Protozoa en Sporozoa (grupo de parásitos), Mastigophora (especies flageladas), Infusoria (flagelados) y en Sacordina (organismos ameboides), siendo aquí donde las AVL pertenecen a la subclase Gymnamoebia o amebas “desnudas” ya que carecen de este o caparazón y son organismos que no tienen una forma constante, sin embargo esta clasificación fue abandonada hace décadas por los protozoólogos; desgraciadamente esta clasificación aún es usada por gente no especializada en protozoología. A pesar de algunas controversias, los datos que han aportado los más reciente estudios sobre morfología, bioquímica y filogenéticos han sido generalmente complementarios (Adl, *et al*, 2005; Martínez-Pérez *et al*, 2004). Desde los primeros estudios la principal problemática para los investigadores es categorizar a las amebas. Bovee (1953) escribió: “uno de los problemas conocidos en la zoología es la identificación de amebas desnudas”; por lo que esto apoya a que sistemas de identificación de organismos ameboides sean subsecuentemente modificados (Page, 1987; Smirnov y Goodkov, 1999).

Actualmente se ha propuesto una clasificación donde se reconocen las taxas evolucionariamente relacionadas y aquellas taxas que son parafiléticas. Los reconocidos grupos superiores han sido resumidos recientemente por Simpson (2002) y Roger (2004) en 6 grupos: Opisthokonta (animales, hongos, choanoflagellados y Mezomycetozoa); Excavata (oxymonados, parabasalidos, diplomonadidos, grupos de heterótrofos flagelados, incluyendo a Euglenozoa y

Heterolobosoa); Rhizaria (Foraminífera y Cercozoa, incluyendo a ameboflagelados y algunas amebas testadas), Archaeplastida (Glaucophyta, algas rojas, algas verdes y Plantae), Chromalveolata (agrupa a Alveolata: ciliados, dinoflagelados y Apicomplexa) y **Amebozoa** (agrupa a las tradicionales amebas desnudas, testadas, ameboflageladas y varias especies sin mitocondria) (Adl *et al*, 2005). Dentro de Amebozoa y Excavata se acomodan los principales grupos de AVL como se muestra en el cuadro 1.

**Amebozoa** (Lühe, 1913; Cavalier-Smith, 1998)

- Tubulinea (Smirnov *et al*, 2005)
  - .. Tubulinida (Smirnov *et al*, 2005)
    - *Hartmanella*
  - .. Leptomyxida (Pussard y Pons, 1976; Page, 1987)
    - *Leptomyxa*, *Rhizamoeba*
  - .. *Incertae sedis* Tubulinea: *Echinamoeba*
- Flabellinea (Smirnov *et al*; 2005)
  - ..Dactylopodida (Smirnov *et al*; 2005)
    - *Mayorella*, *Vexyllifera*
  - ..Vanellida (Bovee, 1979)
    - *Platyamoeba*, *Vanella*
  - ..Techamoebida (Shaeffer, 1926; Smirnov y Goodkov, 1993)
    - *Sappinia*, *Thecamoeba*
- Acanthamoebidae (Sawyer y Griffin, 1975)
  - *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Protacanthamoeba*

**Excavata** (Cavalier-Smith, 2002; Simpson, 2003)

- Heterolobosea (Page y Blanton, 1985)
  - ..Vahlkampfiidae (( Jollos, 1917)
    - *Naegleria*, *Vahlkampfia*

(-) Super grupo; (·) Primer nivel; (..) Segundo nivel

**Cuadro 1. Ubicación taxonómica de las principales amebas de vida libre, basada en Adl y colaboradores (2005).**

**3. Ecología de las amebas de vida libre**

Los hábitat naturales son heterogéneos, y algunas especies son capaces de habitar éstos dependiendo de sus requerimientos y preferencias biológicas, permitiéndoles así explorar una diversidad de ecotipos, y las AVL no son una excepción. Evidentemente su distribución se relaciona a las condiciones y gradientes ambientales, pero factores particulares causan una selección y agregación de estos organismos (Smirnov, 2003).

Las AVL son un grupo de protozoos cosmopolitas debido a su carácter eurioico lo que les permite soportar variaciones ambientales amplias. En el suelo juegan un papel destacado en el ciclo de los nutrientes, porque estimulan el crecimiento dentro de la tasa de transformación bacteriana del fósforo y del nitrógeno a formas aprovechables para las plantas, por lo que hay una mayor producción de biomasa vegetal. De manera general, se desarrollan mejor en las interfases agua-aire, suelo-aire, agua-suelo, agua-organismo, y aire-

organismo, ya que en estas zonas se concentra la mayor cantidad de materia orgánica, bacterias, hongos levaduras, algas y protozoarios, incluyendo amebas (Fenchel, 1987; Rodríguez, 1994).

Las especies que se encuentran en el agua y en el suelo pueden ser las mismas, aunque es común que en el suelo los organismos sean de menor tamaño y que predominen las especies más pequeñas; las cuales se alimentan selectivamente de bacterias controlando el número y la diversidad de especies. Debido a las habilidades que tienen estas amebas desnudas para acelerar la actividad bacteriana, son consideradas como un importante grupo de microorganismos que aumentan el proceso de degradación. Además estos protozoos son a su vez una fuente de alimento de otros organismos como nemátodos, rotíferos y microartrópodos (Anderson, 2002; Bhattacharya *et al*, 1987)

La capacidad de colonizar diversos ambientes se debe a que pueden soportar los cambios ambientales ya que pueden llevar a cabo el proceso de enquistamiento, por medio del cual es la manera en que las amebas responden a cada uno de los cambios ambientales, de tal manera que las amebas pueden sobrevivir a la sequía, cambios de pH, falta de oxígeno y escasez de alimento. En este sentido los quistes sirven como forma de resistencia y dispersión, ya que pueden ser acarreados hacia la atmósfera mediante corrientes de convección, sistemas frontales, turbulencias o burbujas de aire. Estas especies que forman quiste tienen cierta ventaja sobre aquellas que no forman quistes, como algunas pertenecientes a los géneros *Mayorella* y *Amoeba*, ya que pueden aprovechar la acumulación de alimento en ambientes irregulares hasta que esta acumulación sea suficiente y disponible, de lo contrario revertirán al proceso de enquistamiento (Rivera *et al.*, 1993; Rodríguez, 1994).

Las amebas pueden llegar al agua por corrientes de aire, y a través de los cuerpos de agua pueden ser arrojadas a la atmósfera en forma de aerosoles, por lo tanto la suspensión, transportación y resuspensión dependen de la dinámica atmosférica más que de sus propios mecanismos de dispersión (Rodríguez, 1994), una vez en un hábitat nuevo las AVL pueden enquistar o proliferar si hay una fuente de alimento disponible (materia orgánica, bacterias) (Rivera *et al.*, 1993).

Las condiciones básicas que necesitan las amebas para sobrevivir en cualquier ambiente son alimento, oxígeno, agua y una temperatura adecuada. Estos factores tienen una marcada influencia en la estructura de las comunidades de amebas en ambientes acuáticos (Smirnov, 2003).

En el ambiente acuático pueden encontrarse en un intervalo de pH muy amplio; se ha reportado que el intervalo que estas amebas pueden soportar es de 4.6 a 9.5. Solamente las especies del género *Acanthamoeba* son tolerantes a los cambios de salinidad de las aguas cuando están en forma trófica y el quiste es resistente al ataque del cloro hasta niveles de 2 ppm, a diferencia de los quistes de *Naegleria*, los cuales son vulnerables al cloro (De Jonckheere, 1979; Kyle y Noblet, 1985).

Las temperaturas extremas para las amebas son las que están por debajo de los 4°C y por encima de los 37°C, y algunas son capaces de sobrevivir a temperaturas mayores de 45 °C debido a su capacidad de ser termotolerantes. Los cuerpos de agua que tienen una temperatura superior a los 35 °C son ideales para la supervivencia y desarrollo de especies patógenas como las aguas termales, naturales y aguas contaminadas térmicamente (De Jonckheere y Van de Voorde, 1997; Cabanes *et al.*, 2001). Aunque las amebas de vida libre patógenas tienen velocidades de crecimiento inferiores a las no patógenas, las primeras pueden crecer e incrementar paulatinamente su número hasta llegar a niveles infectivos. De esta manera los cuerpos de agua contaminados térmicamente ofrecen un lugar abundante en materia orgánica y están libres de competencia, y representan un nicho vacío de ameboflagelados, con escasa o nula depredación. Esto es similar con el cerebro de los vertebrados, en donde hay un ambiente con una temperatura ideal para las amebas con abundante alimento y sin depredación. En general, las especies patógenas toleran temperaturas mayores de 40 °C, sin embargo no todas las amebas que crecen a estas temperaturas son patógenas (Griffin, 1983).

Se ha reportado que cuando las amebas se encuentran bajo estrés térmico, la fluidez de su membrana cambia debido a un incremento en la concentración de ácidos grasos permitiendo que puedan soportar las variaciones térmicas. Tomando en cuenta las especies patógenas y virulentas, estas son capaces de secretar enzimas serina-proteasas, teniendo importancia en la adaptación a condiciones de estrés y a su capacidad de causar enfermedades (Jones, *et al.*, 1991; Lorenzo-Morales, *et al.*, 2005).



### III. ANTECEDENTES

Las amebas de vida libre (AVL) son encontradas ampliamente distribuidas en aguas naturales, en el suelo y en el polvo alrededor del mundo, por lo que son una fuente potencial de infecciones como la meningoencefalitis y queratoconjuntivitis en humanos y otros animales.

Los primeros estudios realizados sobre AVL fueron realizados por Culbertson y colaboradores (1958), cuando examinaron un cultivo de tejidos contaminado por un organismo citopático. Fue hasta que Fowler y Carter (1965) en Australia, y Butt (1966) en Florida fueron los primeros en reconocer la meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP) en humanos, y creyeron que la ameba causante de esta infección era la misma que había sido examinada por Culbertson en su cultivo. Cotter en 1973, reportó 100 casos de MEAP en el mundo debido a amebas de forma "limax". En el mismo año, Willaert publicó casos de MEAP ocurridos generalmente en verano y la fuente de infección pudo ser inmersión en albercas, lagos, agua encharcada, aguas termales u otros. Jamieson y Anderson (1973) aislaron AVL de muestras de suelo y de agua en albercas (Im, 1990; Shin e Im, 2004).

Una de las fuentes de infección son las albercas que no tienen un mantenimiento adecuado, y debido a los casos que han sido reportados, Cerva y Huldt (1974) realizaron un estudio en 5 albercas en Estocolmo reportando la presencia de amebas "limax" potencialmente patógenas, aislando *N. gruberi* como la especie más representativa debido a que las condiciones de la piscina favorecieron la multiplicación de amebas, así como la deficiente tecnología de tratamiento del agua. Otro estudio fue realizado en Bélgica por Jonckheere en 1979, en donde inspeccionó 16 piscinas, aislando en gran porcentaje organismos pertenecientes a *Acanthamoeba*, debido a que los quistes de este género son resistentes al cloro.

Debido a su carácter eurioico, han sido aisladas de una gran variedad de hábitats, sobre todo acuáticos con condiciones extremas tales como la temperatura, por lo que se han llevado a cabo investigaciones sobre la distribución de estos microorganismos en distintos cuerpos de agua que han sido relacionados con infecciones causadas por agentes amebianos, como es el estudio realizado por Kyle y Pittman (1985), quienes determinaron la distribución vertical de las amebas patógenas en los lagos Issaqueena y Willard's en Estados Unidos correlacionando esta distribución con parámetros ambientales. También se han aislado AVL en cuerpos de agua contaminados termalmente, como en el estudio realizado por Sykora y colaboradores (1983), en donde registraron la presencia de *N. fowleri* en descargas termales de plantas eléctricas al oeste de Pensilvania, encontrando que este organismo es frecuente a elevadas temperaturas. Otro estudio hecho en el lago Willard's, fue realizado por Kyle y Noblet (1986), quienes estudiaron la distribución estacional de estos protozoos en este lago; y en 1987 estudiaron en el lago Issaqueena la distribución estacional de amebas de vida libre termotolerantes. Tyndall y colaboradores (1989) analizaron el efecto de la contaminación térmica sobre la densidad y distribución de las amebas termofílicas y de *Naegleria fowleri* en un cuerpo de agua durante periodos de adición termal causada por una planta

generadora de electricidad en Carolina del Norte, encontrando un incremento de amebas termófilas, *Naegleria* sp y *Naegleria fowleri*. En 1990, Huizinga y McLaughlin analizaron la presencia de *Naegleria fowleri* antes y después de la contaminación termal por una planta nuclear en el lago Clinton en Illinois; esta presencia se incrementó significativamente con la temperatura del agua.

Debido a los casos de enfermedades causadas por amebas de vida libre, se realizó una investigación en hábitats acuáticos en Oklahoma por John y Howard en 1995, en donde estudiaron la distribución estacional de amebas de vida libre patógenas. Aunque *N. gruberi* no es patógena fue la especie más frecuentemente aislada, seguida de *Acanthamoeba* sp. y *N. fowleri*; un pequeño porcentaje correspondió a amebas leptomixas, las cuales no han sido aisladas del ambiente.

Ettinger y colaboradores (2003), en el río James, Virginia, llevaron a cabo un estudio sobre la distribución de amebas de vida libre, encontrando cinco géneros en donde *Naegleria* y *Vanella* son los más frecuentes en la columna de agua. Correlacionaron la presencia de estos microorganismos con bacterias de origen fecal.

Lorenzo-Morales y colaboradores (2005) analizaron fuentes de agua para beber y agua de mar, identificando *Acanthamoeba*, encontrando que el potencial patógeno en este organismo se incrementa con las elevadas temperaturas y con la osmolaridad.

En México se han reportado casos y por ende se han llevado a cabo investigaciones sobre las AVL, como el realizado por Rivera y colaboradores (1983) en donde muestrearon distintas albercas en la Ciudad de México para la presencia de AVL patógenas, aislando organismo con importancia médica como *N. fowleri* y *A. castellanii* encontrando estas especies a 45°C y 40°C respectivamente, también hallaron los géneros *Amoeba*, *Entamoeba*, *Thecamoeba* y *Vanella*.

En 1993, Rivera y colaboradores estudiaron la presencia de AVL en albercas para fisioterapia en la Ciudad de México, encontrando frecuentemente en primavera y en verano especímenes de los géneros *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia*, *Hartmannella* y *Naegleria*. También en ese mismo año, Lares-Villa y colaboradores, aislaron cinco tipos de *Naegleria* de pacientes con MEAP y uno aislado de un canal de agua para riego, encontrando que todos los tipos de *Naegleria* fueron patógenos en ratones. Este es el primer estudio en donde se aisló *N. fowleri* de pacientes con meningoencefalitis.

En San Luis Potosí, Rodríguez-Zaragoza y colaboradores (1993) realizaron durante un año muestreos para aislar AVL de la atmósfera de dicha ciudad, los aislados fueron abundantes en la época de sequía, y siendo *Acanthamoeba* el género más frecuente durante los muestreos.

Otro estudio realizado en la Huasteca Potosina por Gallegos (1997) reportó seis géneros presentes en los sistemas recreacionales más populares, encontrando a *Hartmannella*, *Naegleria*, *Echinamoeba*, *Willaertia*, *Vahlkampfia*

y *Acanthamoeba*; los factores ambientales que se midieron en dicho trabajo, como la temperatura del agua, el pH, oxígeno disuelto, cloro libre fueron correlacionados con la presencia de las amebas en el agua.

## IV. JUSTIFICACIÓN

Las AVL son consideradas como un grupo cosmopolita, por lo que se ha dedicado una importante atención sobre el estudio de las mismas, dado a que existe un pequeño grupo que provoca infecciones en el SNC como la meningoencefalitis y la queratitis. Gran parte de los trabajos publicados están enfocados sobre su patología, inmunología, biología molecular, taxonomía, morfología. Su ecología, es uno de los aspectos importantes, el cual debe ser estudiado con detenimiento ya que comprendiendo detenidamente los factores ambientales se puede aportar conocimientos sobre la distribución de estos organismos; aunque ha sido sustancial estudiar los nichos y la distribución espacial de los protozoos en general, hay muy poca información sobre las amebas desnudas (Anderson, 2002). Actualmente se conoce que una de las características más sobresalientes de las AVL es su habilidad anfitriónica, debido a que ellas pueden sobrevivir como organismos parásitos y de vida libre, además de que pueden soportar condiciones extremas, tales como las elevadas temperaturas (termotolerantes).

Debido a que pueden encontrarse a temperaturas elevadas como las de aguas termales de uso recreativo, el presente trabajo está encaminado a estudiar la distribución y diversidad de las amebas de vida libre (AVL) en un ecosistema con temperaturas extremas, como en el balneario "El Géiser", localizado en el municipio de Tecozautla en el Estado de Hidalgo. El balneario está formado por un sistema de piscinas que son alimentadas a través de canales que conducen el agua proveniente de un géiser natural, con temperaturas de más de 80 °C desde su origen. En este sistema a medida que el agua se distribuye por las piscinas, la temperatura del agua desciende de los 80 °C hasta poco menos de los 45 °C en las piscinas más alejadas. Muestreos preliminares han demostrado la presencia de AVL en el agua de este balneario. Con este estudio se pretende conocer la variedad de géneros amebianos que habitan en el sistema y determinar si el gradiente de temperatura que se forma desde el origen del agua en el géiser hasta las últimas piscinas tienen influencia sobre la variedad de especies de amebas termotolerantes presentes en el sistema que permitan obtener mayores conocimientos de la presencia de estos organismos en ambientes extremos.

## **V. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar el efecto de la temperatura del agua sobre la distribución y diversidad de géneros y especies de gimnamoebas en un géiser en el estado de Hidalgo.

### **Objetivos particulares**

Aislar e identificar los géneros de gimnamoebas presentes en el balneario “El Géiser”.

Relacionar el papel que desempeñan los parámetros fisicoquímicos del agua: temperatura, pH, oxígeno disuelto y conductividad, en la distribución de gimnamoebas termotolerantes en un sistema de agua termales.

Ubicar las piscinas donde pueden ser aisladas las amebas patógenas y emitir recomendaciones preventivas para los usuarios del balneario.

## VI. ÁREA DE ESTUDIO

Tecoautla (“Lugar donde abunda el ocre amarillo”), se encuentra ubicado en las coordenadas 20° 31’58’’ de latitud norte y 99° 37’57’’ de latitud oeste, a una altitud de 1700 metros sobre el nivel del mar. Tiene una superficie de 537.83 km<sup>2</sup> lo que representa el 3% del territorio del estado de Hidalgo (Figura 1).

La zona tiene una vegetación de matorrales, siendo las especies que destacan *Myrtillo cactus* (garambullo), *Yucca filifera* (palma), *Neopringlea integrifolia* (ingrillo), *Helietta parvifolia* (barreta), *Amelanchier denticulada* (membrillo).

El clima que predomina es semiseco cálido y semiseco templado, con una temperatura de 19°C; tiene una precipitación pluvial de 500 a 600 mm anuales. Se encuentra ubicado en la región hidrológica del Pánuco, en la cuenca del río Moctezuma, y cuenta con el río Tecozautla el cual es perenne, por lo cual es una zona rica en manantiales de aguas termales, situación que lo coloca como importante municipio turístico de Hidalgo, con balnearios especialmente atractivos como: “Taxhidó”, “Gañido”, “Uxdejhe”, “Carrizal del Lago” y “El Géiser”, siendo este último el balneario donde se realizó el presente trabajo ([www.hidalgo.gob.mx](http://www.hidalgo.gob.mx)).

“El Géiser”, se encuentra ubicado en una depresión rodeada de anchos y escarpados cerros de mediana altura. Su principal atractivo es el géiser (de donde se toma su nombre) del que brota un potente chorro de agua con una temperatura de 80°C que se eleva a gran altura y con un alto contenido de azufre. Cuenta con tres albercas, dos chapoteaderos y dos estanques sauna, todos ellos con aguas curativas ([www.hidalgo.gob.mx](http://www.hidalgo.gob.mx)).

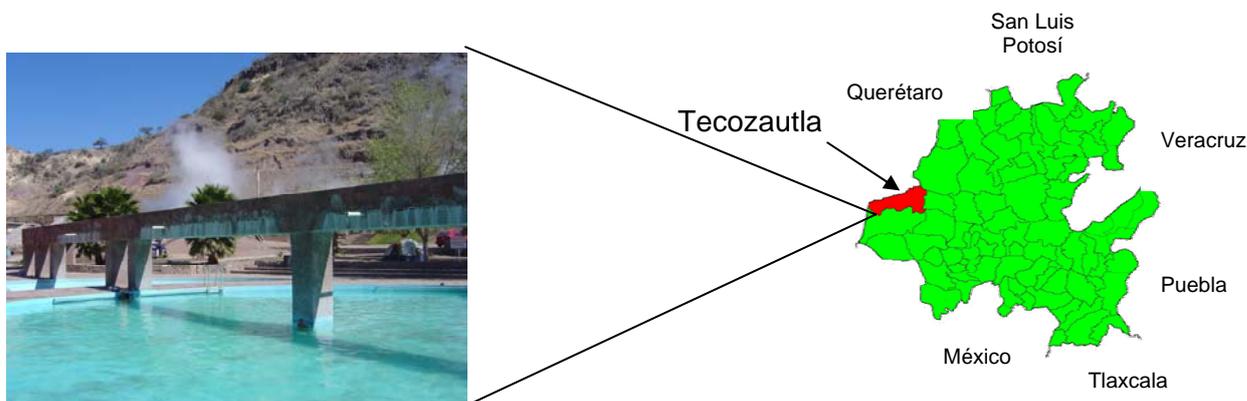


Figura 1. Mapa del estado de Hidalgo, donde se muestra la ubicación de Tecozautla, y fotografía del balneario “El Géiser”.

## VII. MATERIAL Y METODOS

### 1.- Muestreos

Se realizaron cuatro muestreos en el balneario “El Géiser” ubicado en Tecozautla, en el estado de Hidalgo; en cada muestreo se tomaron de 16 a 18 muestras desde donde brotaba el agua hasta la última piscina (Figura 2). El primer muestreo se hizo en el mes de Septiembre, el segundo en el mes de Octubre de 2004, el tercer muestreo en enero de 2005 y el cuarto muestreo en mayo de 2005.

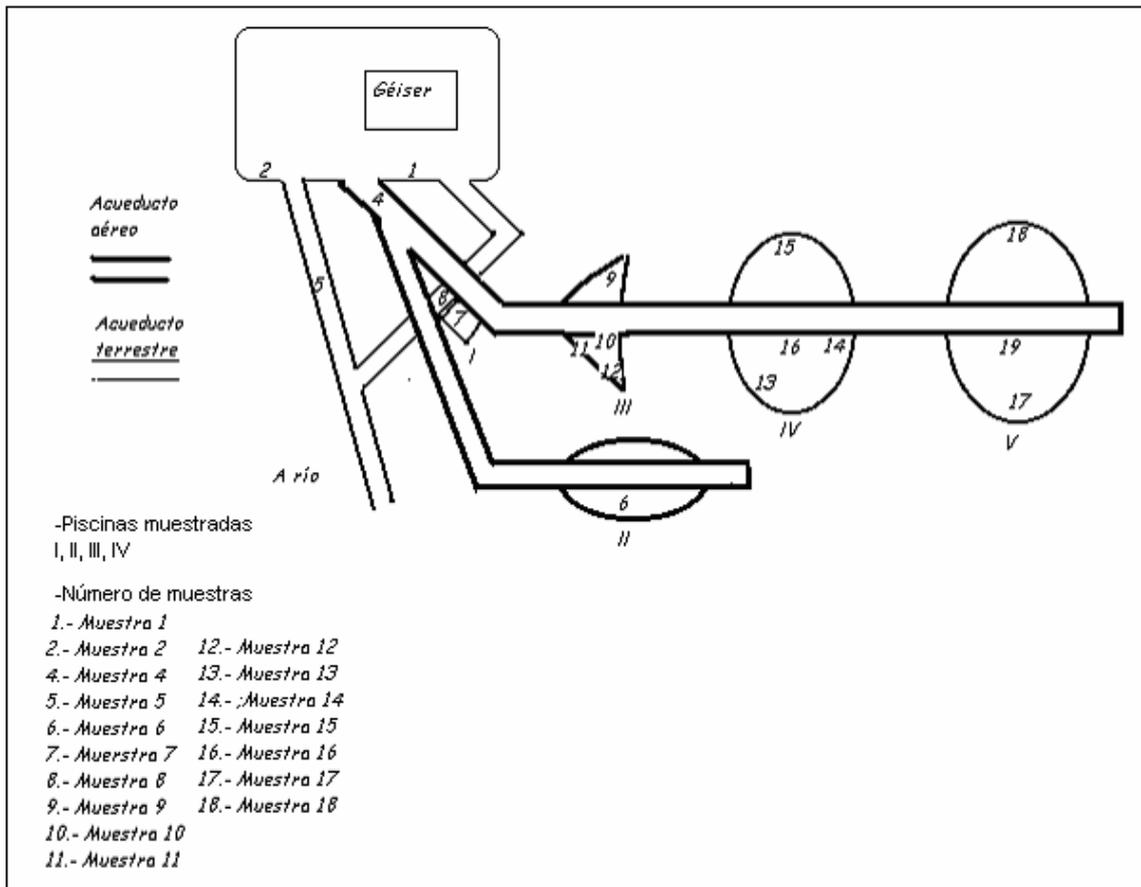


Figura 2. Distribución de las piscinas muestreadas en el balneario “El Géiser”

### 2.- Trabajo de campo

#### 2.1. Recolección y transporte de las muestras

##### 2.1.1. Agua

Se recolectaron muestras compuestas de agua en frascos de polipropileno esterilizados de 1 litro desde el origen del géiser hasta la última piscina como se muestra en la figura 2. La toma de muestras de agua se hizo desde la superficie hasta el fondo de la columna de agua, en los casos en donde hubo sedimento o limo en las paredes o en el piso de las piscinas se recolectaron muestras para ser analizadas en busca de organismos amebianos.

Las muestras de agua recolectadas se transportaron al laboratorio de Biología Molecular de la UIICSE en la FES Iztacala UNAM a temperatura ambiente ya que las amebas son sensibles a las bajas temperaturas.

## **2.2. Parámetros fisicoquímicos “*in situ*”**

### *2.2.1. Temperatura del agua*

La temperatura es una variable física fundamental en la vida de los organismos y en el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos, ya que las reacciones químicas del metabolismo son dentro de ciertos límites proporcionales a la temperatura a la que ocurren, es decir, a mayor temperatura, mayor actividad metabólica (Riolobos, 2002) y por lo tanto puede tener influencia en la abundancia estacional de las AVL termotolerantes. Las temperaturas elevadas en el agua, son un factor importante en el crecimiento y extensión de aquellas amebas que son termotolerantes, por lo cual han sido aisladas de aguas termales, albercas y de efluentes termales de plantas eléctricas y fábricas (John, 1993; Rodríguez, 1994), además se ha encontrado que las temperaturas elevadas activan el potencial patógeno que tienen estos organismos amebianos aumentando el riesgo para la salud (Lorenzo-Morales *et al.*, 2005).

La temperatura del agua fue registrada con un termómetro Hanna modelo HI9040, introduciendo el electrodo en el agua a una profundidad de 15-20 cm permitiendo que el termómetro se estabilizara hasta obtener una lectura fija, los datos se registraron en grados centígrados (°C).

### *2.2.2. Temperatura ambiental*

La temperatura ambiental, es también un factor determinante sobre la distribución estacional de amebas, ya que influye en la temperatura del agua, y de esta forma proliferan aquellas que sean termotolerantes quedando libres de competencia. Se ha registrado que la densidad de la población de amebas termotolerantes en hábitats acuáticos es elevada durante el verano (Rodríguez, 1994). La temperatura del ambiente se registró en grados centígrados (°C) con un termómetro Hanna modelo HI9040.

### *2.2.3. Oxígeno disuelto*

En un medio acuático, la concentración de oxígeno disuelto es determinante, dado que aunque haya una fuente de alimento suficiente, pero bajas concentraciones de éste parámetro son un factor de estrés para las amebas presentes en el agua. Las amebas de vida libre son estrictamente aerobias, sin embargo, pueden tolerar condiciones anaerobias por la formación del quiste como una protección, de esta manera podemos saber en que fase de su ciclo de vida se pueden encontrar las amebas en el agua (John, 1993).

La concentración de oxígeno disuelto en el agua fue medida con un oxímetro Hanna modelo HI9143 introduciendo la sonda al agua, esperando que se estabilizara en un valor fijo, los datos obtenidos se expresaron en mg/L y en

porcentaje de saturación de oxígeno disuelto. Cuando la temperatura en algunas piscinas y en el origen del géiser era mayor de 40°C, se tomo una muestra de agua en tubos de polipropileno sumergiéndolos en el agua y cerrándolos inmediatamente para evitar que la concentración del oxígeno en el agua se disipara al ambiente, posteriormente cuando la temperatura de la muestra disminuyó a menos de 40°C inmediatamente se destapó el tubo y se sumergió el electrodo del oxígeno sellándose la boca del tubo con muestra para evitar que la lectura de oxígeno disuelto en el agua se viera afectada por el oxígeno ambiental. Este procedimiento se realizo de esta manera debido a que el oxímetro utilizado no puede registrar valores confiables a temperaturas mayores de 45 °C.

#### 2.2.4. pH

El pH puede ser un factor limitante sobre los organismos acuáticos, ya que las condiciones de acidez o alcalinidad extremas puede provocar la muerte de los mismos. Las reacciones químicas que se efectúan en el agua son importantes para la distribución de los organismos, aunque las amebas pueden soportar variaciones amplias de pH desde 4.6 hasta 9.5 (Kyle y Noblet 1985); en condiciones de laboratorio se ha encontrado que los quistes de estas amebas pueden soportar valores de pH a 8-12 (Sykora *et al.*, 1983). El registro de este parámetro se realizó por medio de un potenciómetro pHtestr1 (Oakton Instruments) de igual manera se introdujo el electrodo del potenciómetro al agua hasta que se estabilizara para tomar la lectura.

#### 2.2.5. Conductividad

La conductividad es una manera de medir la capacidad de conducir la corriente eléctrica a través de las sales disueltas en el agua, de tal manera que permite expresar la concentración de sólidos totales. La conductividad esta afectada por la temperatura en un incremento de 2% de incremento por grado centígrado. Esto tiene importancia en la distribución de las AVL, ya que en los cuerpos de agua estas se encuentran adheridas a partículas flotantes o a sedimentos existentes en la columna de agua (Riolobos, 2002).

La conductividad fue expresada en  $\mu\text{S}/\text{cm}$  y fue tomada con conductímetro WalkLab (Trans Instruments). Las lecturas registradas se ajustaron a valores equivalentes de 25°C, ya que esta es la temperatura media para los cuerpos de agua en México, y expresaron como conductividad específica (K 25).

### 3.- Trabajo de laboratorio

#### 3.1. Parámetros bacteriológicos

##### 3.1.1. Bacterias y coliformes totales

Aquellas aguas de origen natural poseen una diversa población bacteriana autóctona, aunque en muchas ocasiones esta población nativa se ve aumentada debido a la adición de nuevos grupos provenientes del suelo, del aire y de las excretas de humanos u otros mamíferos, por lo que esta flora (bacterias totales) incluye a las coliformes totales, y éstas a su vez a las

coliformes fecales. Uno de los principales factores en la distribución de AVL en el agua es la presencia de una disponible fuente de alimento bacteriano, por lo que son reconocidas como consumidoras voraces y depredadoras de bacterias, principalmente de aquellas que son de origen intestinal, favoreciendo su proliferación en aguas de desecho. Se ha encontrado que el número de amebas se correlaciona con el número de bacterias, y si estas no están disponibles para alimento, aunque existan condiciones ideales en el hábitat, la amebas no se desarrollan potencialmente (Kyle y Noblet, 1985), por lo que las poblaciones de amebas son dinámicas, debido a que se ha demostrado que la presencia de estos protozoos en el agua y en el suelo incrementa la mineralización, estimulando la actividad metabólica de las bacterias (Rodríguez-Zaragoza,1994). La importancia de este parámetro radica en las Normas Oficiales para Aguas de uso recreativo, ya que debe haber ausencia de organismos bacterianos.

Para determinar la presencia de bacterias y coliformes totales se utilizaron juegos de reactivos Coli-Count Millipore, tomando una muestra de agua en pequeñas botellas muestreadoras e inmediatamente se sumergiendo la paleta del muestreador durante 30 segundos en la muestra, una vez concluido el tiempo se retiró la paleta y se desecharon las muestras de líquido, para insertar nuevamente las paletas a su respectiva botella sellándola adecuadamente para ser llevadas al laboratorio e incubarlas durante 24 horas a una temperatura de 30°C.

### **3.2. Aislamiento de AVL**

La importancia de esta fase es para aislar estos organismos de aquellos que no son de importancia en este trabajo y de esta manera facilitar su procesamiento en las técnicas que se realizarán para su identificación. Las muestras se procesaron según por el método descrito por De Jonkheere (1984) para aislar AVL, se tomaron duplicados de 50 ml de agua (mínima cantidad para aislar un número considerable de amebas) de cada muestra de 1 litro recolectada, y se centrifugaron a 1000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó y la pastilla fue inoculada sobre placas con medio de agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes* (NNE) inactivada por calor (75 °C durante 30 minutos). Las placas sembradas se incubaron a 37 °C en posición invertida dentro de bolsas de plástico para evitar su desecación. De igual forma se procesaron las muestras donde se obtuvo sedimento.

A las 24 horas de incubación se observó las placas en un microscopio invertido. En las placas de NNE se localizaron las zonas con la presencia de amebas y se marcó un cuadro (aprox. 5 mm) donde se limitó la zona, después se cortó en condiciones de esterilidad, para resembrar a una placa nueva de NNE incubando a temperatura ambiente. Transcurridas otras 24 h se revisaron las placas identificando trofozoítos de morfología diferente y estas se separaron y se sembraron en placas nuevas del mismo medio, por otras 24 horas.

### **3.3. Clonación**

Transcurridas 24 h de incubación, observando con el microscopio invertido se separaron los trofozoítos individuales con la ayuda de una micropipeta para sembrar individualmente los aislados en placas nuevas incubadas a 45 °C por otras 24 h. Todo el manejo de muestras se llevó a cabo con material estéril en campanas de flujo laminar con un nivel de bioseguridad II. El objetivo de la clonación consiste en separar aquellos organismos con morfología diferente e irlos resemebrando para tener copias de ellos y poder procesarlos.

### **3.4. Identificación taxonómica**

La identificación de las AVL se llevó a cabo por diversos métodos basados en características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas y de patogenicidad de estos organismos (Rondanelli, 1987). El primer paso para la identificación fue la observación de trofozoítos al microscopio de contraste de fases, basándose en las claves taxonómicas de Page (1975, 1976, 1988 y 1996) y de Pussard y Pons (1977). Las tinciones de los organismos se realizaron con la tinción tricrómica (modificada por Cerva, L, com. pers.).

### **3.5. Pruebas de transformación ameboflagelar**

Estas pruebas nos permite indagar que aquellos organismos que presentan una fase flagelar, pertenecen a la familia Vahlkampfiidae, ya que los integrantes de ésta familia tienen la característica de revertirse a esta fase cuando los organismos se encuentran presentes en un medio líquido.

La prueba consistió en colocar unas gotas de agua destilada sobre la superficie de una placa de agar NNE (no nutritivo con *Enterobacter*) en la que se hizo crecer una clona de amebas. La placa se observó a intervalos de 30 minutos en el microscopio invertido para determinar formas flageladas y estas cajas fueron marcadas como positivas, lo que permitió utilizar esta transformación ameboflagelar como una característica de identificación taxonómica (Cable y John, 1986).

### **3.6. Axenización**

Una vez identificado el aislado de AVL se transfirieron a tubos con medio líquido para cultivo axénico PBSGM y se hicieron crecer los trofozoítos libres de bacterias, de esta manera se puede utilizar el aislado para otros fines.

### **3.7. Determinación de la distribución de amebas en un gradiente de temperatura de agua.**

Se determinó el género y especie de cada uno de los aislados recolectados del sistema acuático estudiado y se relacionó con la temperatura de cada una de las piscinas donde fueron recolectados, se elaboró un mapa que indica la distribución de géneros o especies de los aislados de acuerdo al gradiente de temperatura registrado.

#### **4. Análisis estadístico**

Dependiendo de la cantidad y el tipo de datos se efectuó un análisis estadístico para determinar la correlación entre los parámetros fisicoquímicos y la presencia o ausencia de AVL. En el caso de este trabajo de investigación se utilizó el análisis de correlación de Spearman, además del análisis de similitud de Jaccard (ligamiento simple) para determinar aquellos sitios con mayor grado de similitud.

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Diversidad de AVL durante los muestreos

Se realizaron cuatro muestreos de septiembre de 2004 a mayo de 2005 en las piscinas del balneario “El Géiser” en el Estado de Hidalgo, obteniéndose 84 aislados pertenecientes a 13 géneros y 18 especies. *Naegleria* fue el género más frecuentemente aislado (37%), seguido de *Vahlkampfia* (22%) y *Acanthamoeba* (16%) (Figura 3). Es importante señalar que en los dos primeros muestreos, solo se muestrearon 16 estaciones debido a que la última piscina se encontraba vacía, a partir del muestreo III se incluyeron las 19 estaciones; no se tomó muestra 3 durante los cuatro muestreos.

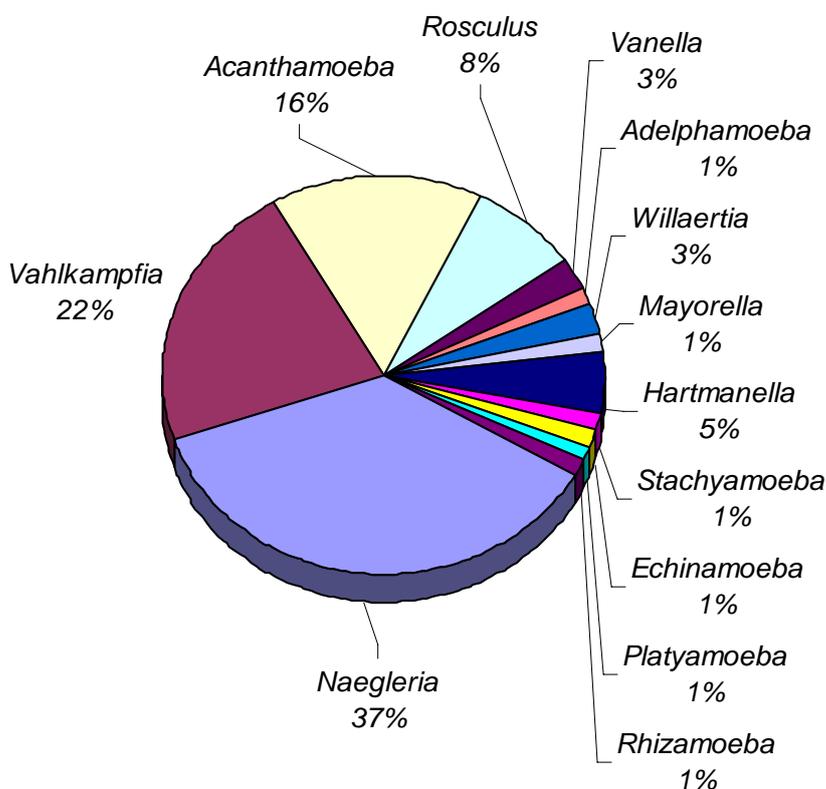


Figura 3. Proporción de los géneros amebianos encontrados en los cuatro muestreos en el agua del balneario “El Géiser”.

A partir de las muestras de agua recolectadas durante el muestreo I del mes de septiembre de 2004, se aislaron e identificaron morfométricamente por microscopía de luz en contraste de fases diversos microorganismos amebianos de vida libre los cuales se muestran en el cuadro 2. De un total de 35 aislados pertenecientes a 9 géneros, se destaca la presencia de *Naegleria* y *Acanthamoeba* con diez y nueve aislados cada uno, siendo de los cuatro muestreos donde hubo una mayor diversidad y abundancia de amebas de vida libre.

Estación de Muestreo	Diagnóstico de los aislados	Temperatura de aislamiento (°C)
1	-	56.0
2	-	53.2

3	--	--
4	-	53.1
5	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> <i>Acanthamoeba polyphaga</i>	52.2
6	-	41.4
7	-	49.7
8	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Naegleria fowleri</i>	43.7
9	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Naegleria</i> spp.	43.7
10	<i>Vahlkampfia avara</i> <i>N. fowleri</i>	38.5
11	<i>Vahlkampfia ustiana</i> <i>Naegleria fowleri</i> <i>Naegleria gruberi</i> <i>Vahlkampfia</i> spp.	38.3
12	<i>Adelphamoeba galeacystis</i> <i>A. astronyxis</i> <i>A. castellanii</i> <i>A. polyphaga</i> <i>H. vermiformes</i> <i>Naegleria</i> sp. <i>Vahlkampfia</i> sp <i>Vahlkampfia</i> sp. <i>V. aberdonica</i> <i>Willaertia</i> sp. <i>W. magna</i>	38.3
13	<i>Naegleria</i> spp. <i>Rosculus ithacus</i>	36.7
14	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Vahlkampfia</i> spp.	36.7
15	ND	36.7
16	<i>Rosculus ithacus</i> <i>Mayorella</i> spp. <i>Hartmannella vermiformis</i> <i>Stachyamoeba</i> spp <i>Vahlkampfia inornata</i>	36.7
1 sedimento	-	56.0
2 sedimento	-	53.2
3 sedimento	<i>Acanthamoeba astronyxis</i> <i>Acanthamoeba polyphaga</i>	53.1
4 sedimento	-	52.2
5 sedimento	<i>Naegleria fowleri</i> <i>Naegleria gruberi</i>	41.4

(--) No hubo muestras

(-) Muestras que fueron negativas para la presencia de AVL

(ND) No Determinado

#### Cuadro 2. Diagnóstico morfológico de los aislados del muestreo I.

La mayoría de las especies de *Acanthamoeba* fueron aisladas principalmente en aquellas estaciones donde se registraron temperaturas mayores a 43.7 °C. De este género se identificaron cuatro especies, *Acanthamoeba astronyxis*, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga* y *A. castellanii*, siendo esta última la más frecuente.

Referente al género amebiano más frecuentemente encontrado, se identificaron dos especies de *Naegleria* las cuales fueron *N. fowleri* y *N. gruberi*, la primera con cuatro aislados registrados para este muestreo. Este

género estuvo distribuido uniformemente en aquellas estaciones con temperaturas de 36 a 43°C. Cabe destacar que *N. fowleri* es una especie reportada como patógena para el humano. Por otra parte, *Vahlkampfia* estuvo presente en este muestreo con 7 aislados con las especies *V. avara*, *V. ustiana* y *V. inornata*. En este muestreo se tomó muestras de sedimento en las primeras cinco estaciones, de las cuales sólo en la 3 y en la 5 se pudo determinar la presencia de amebas de los géneros *Acanthamoeba astronyxis*, *A. polyphaga*, *Naegleria fowleri* y *N. gruberi*.

En el muestreo 2 de un total de 16 muestras de agua recolectadas 5 resultaron positivas para la presencia de amebas de vida libre (Cuadro 3), siendo este el muestreo con menor número de aislados y menor diversidad, donde sólo se presentaron 3 géneros. *Vahlkampfia* fue predominante con las especies *V. aberdonica* y *V. entérica* con 1 y 3 aislados respectivamente.

Estación de Muestreo	Diagnóstico de los aislados	Temperatura de aislamiento
1	-	57.1
2	-	51.8
3	-	-
4	-	52.6
5	-	52.2
6	<i>Vahlkampfia enterica</i> <i>Vanella aberdonica</i>	39.0
7	-	48.3
8	<i>Naegleria fowleri</i> <i>Vahlkampfia aberdonica</i>	43.9
9	-	47.5
10	-	48.0
11	-	48.0
12	-	48.0
13	ND	36.1
14	<i>Naegleria fowleri</i>	36.2
15	<i>Vahlkampfia entérica</i> <i>Naegleria fowleri</i>	36.1
16	<i>Vahlkampfia entérica</i>	36.2

(--) No hubo muestras

(-) Muestras que fueron negativas para la presencia de AVL

(ND) No Determinado

### Cuadro 3. Número y ubicación taxonómica de los aislados del muestreo II.

Del género *Naegleria* se identificó un aislado de la especie *N. fowleri*. La presencia del género *Vanella* se registra por primera vez, aunque es poco abundante ya que sólo se reporta un aislado perteneciente a la especie *V. aberdonica*. En este muestro se registraron las temperaturas del agua más elevadas y las amebas recolectadas se distribuyeron en un ámbito de temperatura de 36 a 43°C.

En el tercer muestreo, de un total de 17 muestras de agua recolectadas, se obtuvieron 10 muestras positivas para la presencia de amebas de vida libre (Cuadro 4). *Naegleria* y *Vahlkampfia* continuaron siendo los géneros más frecuentemente aislados; *Acanthamoeba* no fue aislada en este muestreo. Por

otra parte géneros como *Rhizamoeba* y *Echinamoeba* estuvieron presentes por primera vez; aunque *Rosculus*, *Vanella* y *Hartmanella* fueron reportados de nueva cuenta, sus aislados fueron en menor número. Las amebas tuvieron una distribución amplia con respecto al intervalo de temperatura, que fue desde los 36 a 50 °C.

Estación de muestreo	Diagnóstico de los aislados	Temperatura de aislamiento
1	-	56.0
2	<i>Rhizamoeba flabellata</i> <i>Hartmanella vermiformis</i>	50.7
3	--	--
4	<i>Naegleria</i> sp.	52.2
5	-	50.6
6	<i>Vanella aberdonica</i>	39.4
7	<i>Naegleria</i> sp.	40.9
8	-	44.5
9	<i>Hartmannella vermiformis</i> <i>Naegleria fowleri</i> <i>Echinamoeba silvestres</i>	34.1
10	<i>Vahlkampfia avara</i> <i>Naegleria fowleri</i>	35.1
11	ND	35.3
12	-	35.5
13	<i>Naegleria fowleri</i> <i>Naegleria gruberi</i>	36.7
14	<i>Rosculus ithacus</i>	36.6
15	<i>Vahlkampfia entérica</i> <i>Naegleria</i> sp. <i>Vahlkampfia avara</i>	36.5
16	-	36.7
17	-	45.8
18	-	45.8

(--) No hubo muestras

(-) Muestras que fueron negativas para la presencia de AVL

(ND) No Determinado

#### Cuadro 4. Número de aislados identificados en el muestreo III.

Por lo que respecta al cuarto muestreo, realizado en mayo de 2005, 10 muestras resultaron positivas para la presencia de AVL's de un total de 19 recolectadas (no se tomó muestra en la estación 4, debido a que no hubo agua en ese sitio es esta ocasión). En este muestreo se obtuvieron 20 aislados, de los cuales 9 pertenecieron al género *Naegleria* siendo una vez más el género dominante; *Vahlkampfia*, *Rosculus* y *Hartmannella* fueron frecuentes aunque con poca abundancia; fue hasta este muestreo en el que *Acanthamoeba* volvió a presentarse, aunque con un ligero incremento con tres aislados. Un género que no había sido registrado anteriormente fue aislado en este muestreo, este género correspondió a *Platyamoeba* sp. (Cuadro 5).

Estación de muestreo	Diagnóstico de los aislados	Temperatura de aislamiento
1	-	53.8
2	-	52.4
3	--	--

4	--	--
5	<i>Naegleria fowleri</i>	49.5
6	<i>Acanthamoeba polyphaga</i> <i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Rosculus ithacus</i>	48.2
7	-	49.3
8	-	41.9
9	<i>Acanthamoeba polyphaga</i> <i>Vahlkampfia avara</i> <i>Naegleria sp.</i>	33.6
10	<i>Naegleria gruberi</i> <i>Vahlkampfia avara.</i>	33.6
11	<i>Platyamoeba sp.</i>	33.5
12	<i>Hartmanella vermiformis</i> <i>Rosculus ithacus</i>	33.4
13	<i>Naegleria sp.</i>	37.7
14	<i>Naegleria fowleri</i> <i>Vahlkampfia avara</i>	37.7
15	<i>Naegleria gruberi</i> <i>Naegleria fowleri</i>	37.5
16	<i>Rosculus ithacus</i> <i>Naegleria gruberi</i> <i>Naegleria fowleri</i>	37.8
17	-	42.1
18	-	41.9
19	-	41.9

(--) No hubo muestras

(-) Muestras que fueron negativas para la presencia de AVL

#### Cuadro 5. Número de aislados encontrados en el muestreo IV

El intervalo de temperatura en el cual las amebas fueron aisladas fue de 33 a 49°C, en donde *Naegleria* y *Rosculus* estuvieron presentes a lo largo de este intervalo de temperatura. Sólo dos de los aislados de *Acanthamoeba* estuvieron presentes a una temperatura de 49°C.

## 2. Temperatura del agua

De los datos registrados para la temperatura del agua durante los cuatro muestreos, se obtuvo un intervalo de 33.4 °C hasta 57.1 °C, con una diferencia entre la mayor y la menor de 23.7 °C; esta fue una diferencia notable, pero se hace hincapié a que en algunas ocasiones se muestrearon piscinas que estaban siendo llenadas a través de los acueductos aéreos que llevan el agua del géiser directamente hacia estas, por lo que el agua en estas piscinas tenía una temperatura muy elevada dando como consecuencia que se registraran temperaturas extremas para aguas de este tipo. Este comportamiento puede ser observado en el Cuadro 6. Donde de manera particular puede apreciarse que durante el muestreo II se obtuvieron las temperaturas del agua más altas. En ese mismo cuadro se puede observar que hubo estaciones en donde se registró un incremento en la temperatura con respecto a las registradas en esas mismas estaciones en los demás muestreos.

Estación	Temperatura del agua en °C			
	Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III	Muestreo IV
1	56.0	57.1	56	53.8

2	53.2	51.8	50.7	52.4
3	--	--	--	--
4	53.1	52.6	52.2	--
5	52.2	52.2	50.6	49.5
6	41.4	39.0	39.4	48.2
7	49.7	48.3	40.9	49.3
8	43.7	43.9	44.5	41.9
9	38.3	47.5	34.1	33.6
10	38.5	48.0	35.1	33.6
11	38.3	48.0	35.3	33.5
12	38.3	48.0	35.5	33.4
13	36.7	36.1	36.7	37.7
14	36.7	36.2	36.6	37.7
15	36.7	36.1	36.5	37.5
16	36.7	36.2	36.7	37.8
17	--	--	45.8	42.1
18	--	--	45.8	41.9
19	--	--	--	41.9

(-)= Muestras que no se tomaron

#### Cuadro 6. Temperatura del agua durante los cuatro muestreos.

Como se había mencionado con anterioridad, las estaciones 17, 18 y 19 fueron incluidas a partir del tercer muestreo debido a que la piscina en donde se ubicaban dichas estaciones estaba siendo llenada del agua proveniente del géiser, por lo que las temperaturas registradas para estas estaciones fueron altas (Cuadro 6).

En el cuadro de temperaturas del agua se puede apreciar que existe un gradiente de temperatura a partir de la primera estación muestreada y hasta la última (durante todo el período de estudio), esto se debió a que conforme el agua es conducida por los acueductos desde el origen del géiser para ir llenando las piscinas la temperatura va disminuyendo.

### 3. Diversidad y distribución de AVL en relación a la temperatura del agua

La temperatura del agua sobre la distribución de AVL, tuvo efecto en aquellas que son reportadas como termotolerantes, esto se puede aseverar dado a que en el intervalo de temperatura de 33 a 40°C hubo mayor diversidad y abundancia de aislados (Figura 4). En este ámbito de temperaturas, se describieron 12 géneros amebianos entre los que predomina *Naegleria* con 20 aislados, de los cuales 9 pertenecieron a la especie *N. fowleri*.

Otro de los géneros frecuentemente aislados del agua de las albercas fue *Vahlkampfia* con 17 aislados, aunque con más especies. De estos géneros se ha reportado que hay muchas probabilidades de encontrarlos a temperaturas iguales o mayores a 37 °C (Kyle y Pittman, 1987). Por otro lado *Acanthamoeba* y *Hartmanella* fueron aislados en el agua de las albercas del balneario el Géiser con 6 y con 4 aislados respectivamente. Desde el punto de vista médico, esto tiene relevancia debido a que en las albercas en donde se registraron estas temperaturas y en donde se aisló una alta diversidad de organismos (entre ellos los que son reportados como patógenos) son las más

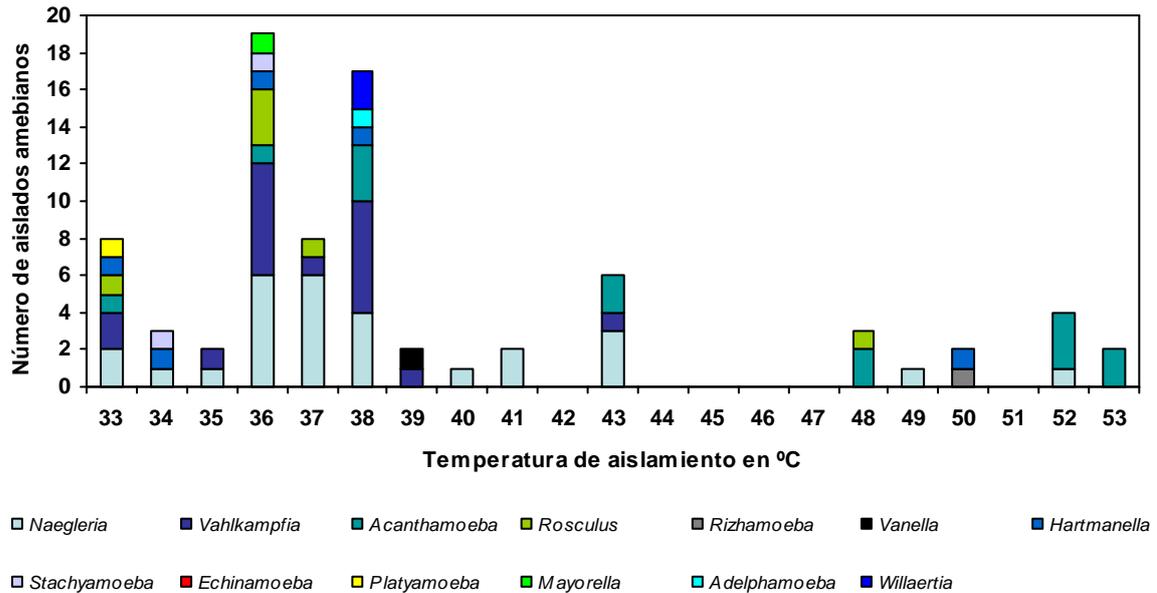
frecuentadas por los bañistas, en especial niños, aunque hay que tener presente que no todas las amebas termotolerantes son patógenas.

En el intervalo de temperatura de 43 a 53 °C se registraron 6 géneros y también fueron muy frecuentes aquellos pertenecientes a *Naegleria*, *Vahlkampfia* y *Acanthamoeba*, este último con 9 aislados correspondientes a 4 especies. Esto confirma que las amebas del género *Acanthamoeba* tienen la capacidad de sobrevivir bajo condiciones que para otras especies pueden ser adversas como lo son en el caso de *Naegleria* (Biddick *et al.*, 1984). En aguas con descargas termales, existe una alta proporción de aislados de *Acanthamoeba* que pueden ser patógenos (Dive *et al.*, 1982) y las especies reportadas en este trabajo han sido documentadas como tales.

De las pocas hipótesis en donde se explica la presencia de *N. fowleri* en aguas termales, Delattre y Oger (1981) postulan que un “hot spot” ( $\geq 45^{\circ}\text{C}$ ) es un factor importante para la presencia de esta ameba. Sin embargo, *Naegleria* no fue aislada con una mayor frecuencia al aumentar las temperaturas; esto no concuerda con lo reportado por Huizinga (1990), en donde afirma que hay probabilidad de que exista una relación directamente proporcional entre la temperatura y la frecuencia de aparición de las naeglerias.

Por otra parte, aunque el género *Hartmannella* estuvo presente solo con un aislado, este mostró ser termotolerante, ya que se le aisló a una temperatura de 50°C, lo que reafirma lo expuesto por Kuchta y colaboradores (citado por Rohr *et al.*, 1998) quienes reconocen a *H. vermiformis* como una especie capaz de tolerar altas temperaturas en el agua. En este punto también es importante señalar que amebas de la especie *Rosculus ithacus* fueron aisladas del agua, aunque en menor número, desde los 33 °C hasta los 48 °C, por lo que se puede afirmar que estas amebas tienen la capacidad de sobrevivir a temperaturas muy elevadas.

La presencia de *Naegleria* y de *Acanthamoeba* en el agua de las piscinas del balneario El Géiser se puede atribuir a su capacidad de termotolerancia y su habilidad para formar quistes, lo cual les confiere una ventaja para sobrevivir a condiciones que pueden ser desfavorables para organismos competidores, tal como fue el caso de temperaturas tan extremas como las halladas en el balneario termal analizado (Biddick *et al.*, 1984). En un trabajo realizado en piscinas con aguas termales en Nueva Zelanda por Brown y colaboradores (1983) en donde *Naegleria* fue el género encontrado más frecuentemente que *Acanthamoeba*, no presentando una distribución estacional aparente, los hallazgos reportados en esta investigación presentan concordancia con lo reportado en este trabajo.



**Figura 4. Gráfica que representa la distribución de AVL en relación al gradiente de temperatura del agua.**

Los resultados obtenidos indican, de manera general, que *N. fowleri*, estuvo distribuida a lo largo del intervalo de temperatura en donde se aislaron AVL, demostrando que posee la habilidad de poder crecer a diferentes y a elevadas temperaturas en el agua. Esta especie ha sido descrita como termotolerante y como agente etiológico de MEAP.

La distribución de las AVL en este sistema recreacional de aguas termales a lo largo del período de estudio fue heterogénea, distribuyéndose principalmente en las albercas III y IV, concentrando durante los cuatro muestreos el mayor número de aislados amebianos (Figura 5). Estas albercas son las más utilizadas y donde se congregan el mayor número de usuarios ya que éstas son las más atractivas para los bañistas debido a la temperatura del agua (33 a 38 °C) ya que el agua de las otras albercas es demasiado caliente.

Los factores que pueden influir para la presencia de amebas en estas albercas, son la inoculación del agua con microorganismos (entre ellos amebas), y materia orgánica por parte de los pies de los bañistas al dirigirse a las albercas (Kyle y Noblet, 1985); el arrastre natural de suelo, y por las corrientes de aire transportando amebas y tierra al agua de las piscinas. Otro punto importante por mencionar, es que en la estación 12 (alberca IV) durante el Muestreo I se encontraron el mayor número de aislados (Figura 5), este punto de recolecta de muestra se encuentra localizado en una pared de la alberca, esto se explicaría porque la pared actúa como una gran superficie de contacto con materia orgánica suficiente para estimular el crecimiento amebiano.

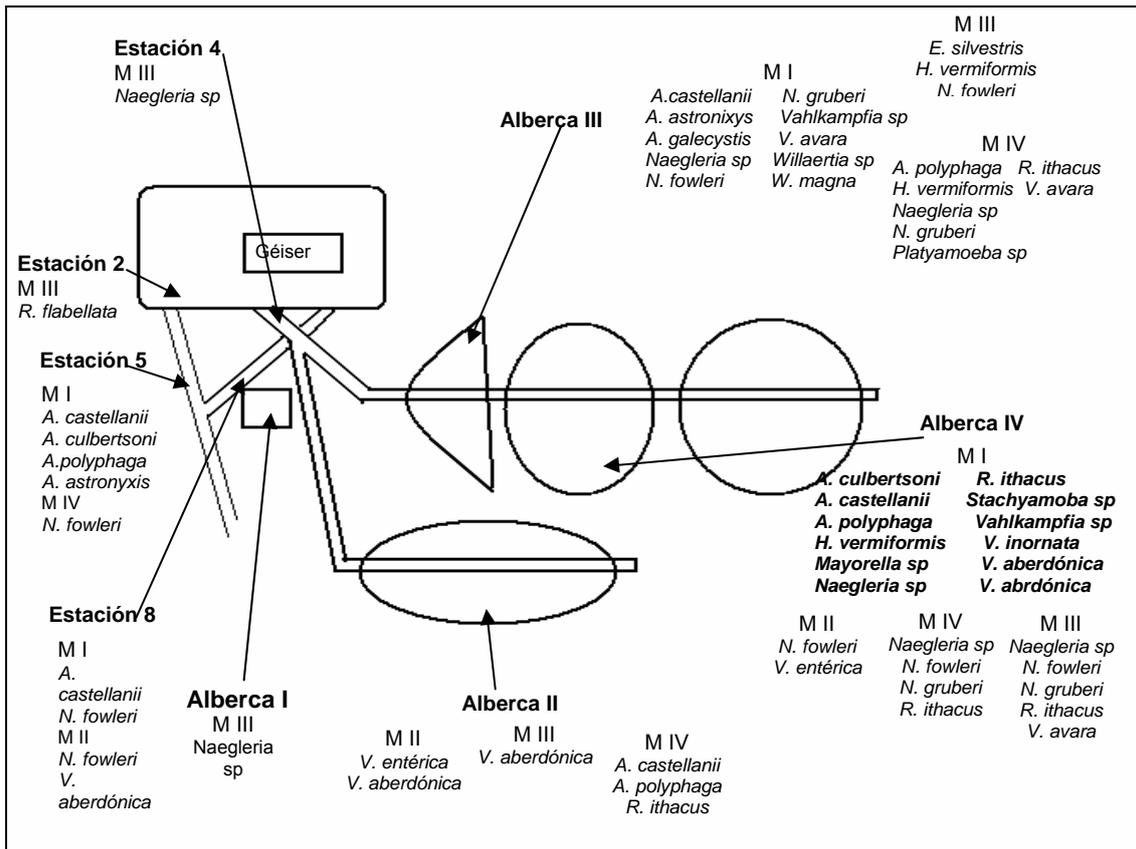


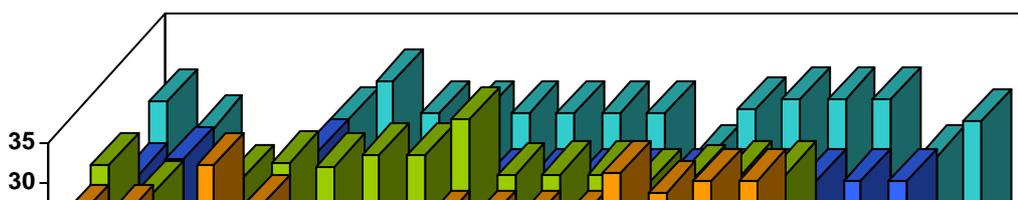
Figura 5. Distribución de AVL en las albercas durante los cuatro muestreos.

En contraste, en la alberca II a pesar de que la presencia de amebas fue menor durante tres muestreos, no deja de tener importancia ya que entre en los aislados se encontraron las especies *A. castellanii* y *A. polyphaga* reportadas como causantes de infecciones en el sistema nervioso central y de infecciones oculares; sin embargo, en este sitio solo se estableció un punto de muestreo por lo que la probabilidad de aislar un mayor número de AVL's pudo verse afectada por este hecho.

Durante el período de estudio, las estaciones 2, 4, 7 y 8 fueron aquellas donde raramente se aislaron amebas (figura 5). También es importante señalar que en la alberca número V nunca se aislaron organismos, ya que en los dos primeros muestreos se encontraba vacía, y posteriormente en los muestreos III y IV se encontraba llenándose, causa que pudiera afectar el aislamiento de AVL.

#### 4. Temperatura ambiental

Además de la temperatura del agua, la temperatura del ambiente tiene influencia en la diversidad, presencia y abundancia de AVL, según la literatura. Este parámetro fue medido en el presente trabajo, en donde 33.9 °C fue el valor más alto registrado durante los cuatro muestreos y corresponde a la estación 9 del muestreo II; y 21.1 °C el valor más bajo en la estación 18 del cuarto muestreo (figura 6), en este intervalo la diferencia fue de 12.8 °C.



### **Figura 6. Temperatura ambiental en cada estación durante los cuatro muestreos.**

En el muestreo III se registraron valores de temperatura ambiente menores (Figura 6), este muestreo fue realizado durante el período invernal, y según datos del INEGI, el promedio de temperatura para enero, mes en el que se realizó este muestreo, es de 14.3 °C lo que explica el porque de los valores bajos. Cabe mencionar que la medición de este parámetro se realizó antes del medio día, entre las 10: 00 y las 11: 30 AM, en donde la temperatura no incide aún marcadamente en la temperatura del agua. Las temperaturas tan elevadas que se registraron en el agua de las albercas se deben a la actividad del géiser y no tanto a la energía solar.

Al parecer este parámetro temperatura ambiental no tuvo una influencia determinante en la temperatura del agua y por ello en la diversidad y distribución de AVL; esto no es necesariamente contrario a lo reportado por De Jonckheere y Van de Voorde (1976) quienes indican que en muchas áreas geográficas, la incidencia de AVL y en especial *N. fowleri* se distingue de acuerdo al ciclo estacional, en donde hay mayor presencia de estos protozoos en el verano y en el otoño, ya que en el sistema estudiado la temperatura del agua depende no tanto del ciclo estacional sino del dinamismo del géiser que provee el agua de donde se llenan las piscinas de este balneario.

### **5. Oxígeno disuelto**

El oxígeno disuelto se ve influido por el aumento o la caída de la temperatura del agua, ya que la solubilidad del oxígeno en un sistema acuoso tiende a disminuir a medida que la temperatura es mayor (Riolobos *et al*, 2002). Como anteriormente se había mencionado, las AVL son aerobias estrictas, aunque en condiciones anóxicas, las amebas pueden revertirse a su estado quístico como protección a estas condiciones; de tal manera que la medida de la concentración de oxígeno disuelto en el agua nos puede indicar la fase en la que pueden encontrarse estas amebas (John, 1993).

En este trabajo las concentraciones mínimas de oxígeno disuelto, registradas a lo largo de los cuatros muestreos estuvieron por encima del 40% de saturación de O<sub>2</sub>/ml (Figura 7, para detalle ver Cuadro A10 en anexo) principalmente en aquellas estaciones donde se presentó un incremento en la temperatura del agua. Aunque en la estación 7 del muestreo III, se registró un 20% de saturación de O<sub>2</sub>, siendo este porcentaje el más bajo a lo largo del estudio, tal vez esto se deba a que esta estación se encuentra situada en un reservorio de agua que se ocupa para que los usuarios se bañen antes de entrar a las albercas, pero en este muestreo no se encontraban ningún bañista por lo que no había ningún movimiento que propiciara la oxigenación del agua, además la temperatura del agua es elevada por lo que también influye en la concentración de oxígeno disuelto.

Valores mayores de hasta un 80% de saturación de OD fueron los más altos (Figura 7), destacándose en estaciones donde la temperatura fue mayor a 40 °C, por ejemplo en el agua de las estaciones 9, 10, 11 y 12 del muestreo II; y la estación 6 del cuarto muestreo, tuvo un porcentaje de saturación del 77 al 81% de OD a temperaturas mayores, esto es debido a que las albercas estaban siendo llenadas a través de los acueductos aéreos provocando que el agua se agitara permitiendo así su oxigenación. Por otro lado, en las piscinas III y IV (durante el primer muestreo) se encontraban bañistas recreándose por lo que ocasionaron su oxigenación y por tal motivo se reportan concentraciones elevadas de oxígeno disuelto a temperaturas que son consideradas como altas.

En la estación 8 durante los cuatro muestreos se registraron valores de porcentaje de saturación de oxígeno disuelto alto con respecto a su temperatura (mayores de 40 °C); este punto de muestreo se localiza en un canal en donde el cauce del agua es rápido favoreciendo la oxigenación de la misma.

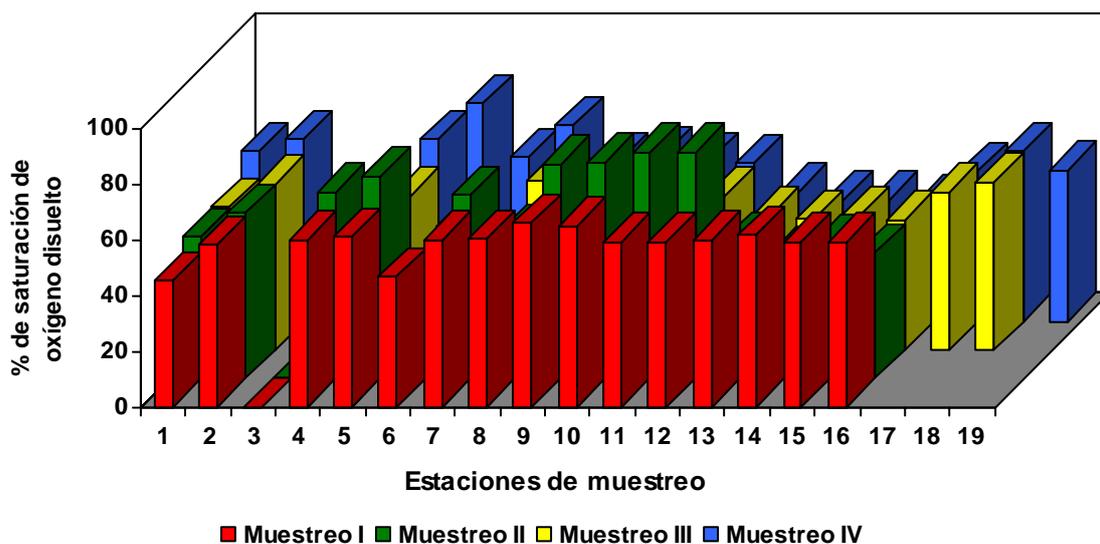


Figura 7. Valores de % de saturación de oxígeno disuelto en los cuatro muestreos.

Así, en este trabajo las fluctuaciones en las concentraciones de oxígeno disuelto son inversamente proporcional a la temperatura del agua, sin embargo, pese a que las AVL son estrictamente aerobias fueron capaces de sobrevivir a condiciones poco oxigenadas, por lo que no hay una influencia determinante por parte de este parámetro ambiental sobre la distribución de estos organismos.

## 6. Conductividad

Los valores de conductividad para este trabajo oscilaron entre 1570 a 2963  $\mu\text{s}/\text{cm}^3$  (para más detalles ver Cuadro A11 en anexo), siendo éste el valor más alto; no hay que olvidar que el agua que se distribuye a este sistema recreacional proviene de un géiser, por lo que en ella hay una gran cantidad de iones disueltos, alterándose considerablemente la conductividad. La conductividad depende en gran medida de la temperatura, ya que a mayor temperatura mayor concentración de sales (Riolobos *et al*, 2002).

En las estaciones 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 ubicadas en las piscinas III y IV, generalmente las más concurridas por los visitantes, hubo un ligero incremento en la conductividad (Figura 8), esto puede atribuirse, en primer lugar a la actividad del géiser ya que a diferentes tiempos la fuerza con la que expulsa agua y vapor cambia y con ello el arrastre de sólidos es diferente. La segunda causa pudo haberse debido también a que las mismas personas que se introducían estaban descalzas, acarreando de esta manera tierra u otras partículas en sus pies. Además hubo estaciones en donde alguna vez se encontraron gran cantidad de hojas de árboles e insectos, lo que pudo haber contribuido al aumento de la conductividad.

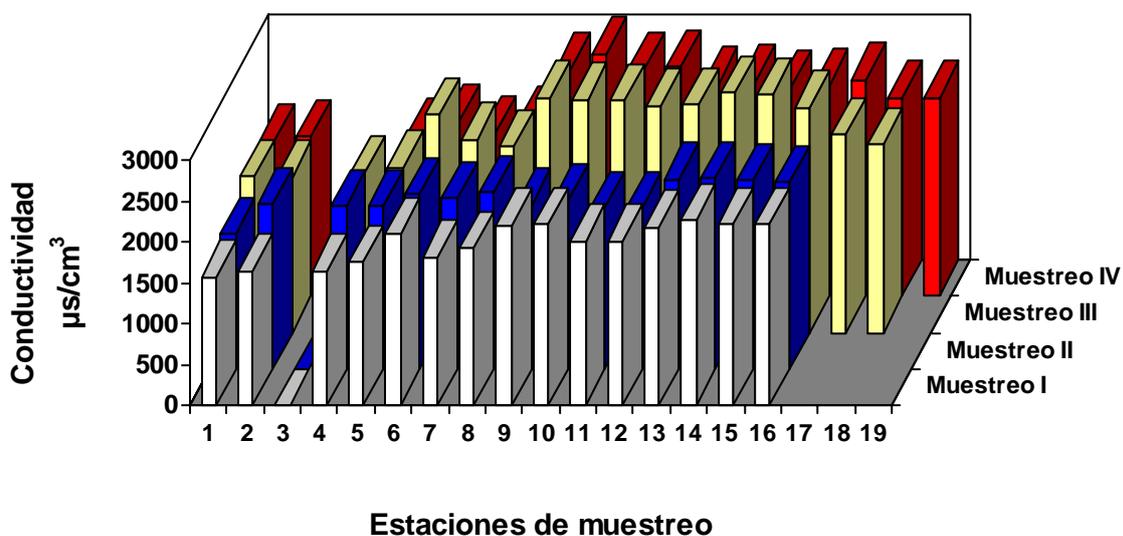


Figura 8. Valores de conductividad en  $\mu\text{s}/\text{cm}^3$  por estación y muestreo.

Como se ha mencionado, la conductividad esta dada principalmente por la presencia de iones o partículas en el agua, y analizando esto se puede interpretar que las AVL estuvieron presentes principalmente en aquellas estaciones con valores de los  $2000 \mu\text{s}/\text{cm}^3$ , ya que estos microorganismos en hábitats acuáticos viven principalmente adheridos a partículas flotantes (Fenchel, 1987).

## 7. pH

Los valores de pH encontrados en este trabajo se encuentran por encima de 9.0 hasta un valor máximo de 10 (figura 9), estos registros fueron altos con respecto al intervalo de 7.2-7.6 que señala el Anteproyecto de la Norma Oficial Mexicana (PROY-NOM-000-SSA1-2005) para aguas de uso recreativo. En el caso de este trabajo, el suelo que presenta el área de estudio en Tecozautla es de tipo feozem, que se caracteriza por tener un pH básico, por lo que el agua va arrastrando del suelo (en el origen del géiser) aquellos iones que son los causantes de la basicidad (Eaton, 1995). Estos valores tan altos de pH se deben también al incremento de la conductividad, como ya se analizó anteriormente la conductividad representa la concentraciones de iones presentes en el agua, influyendo así en la alcalinidad de la misma.

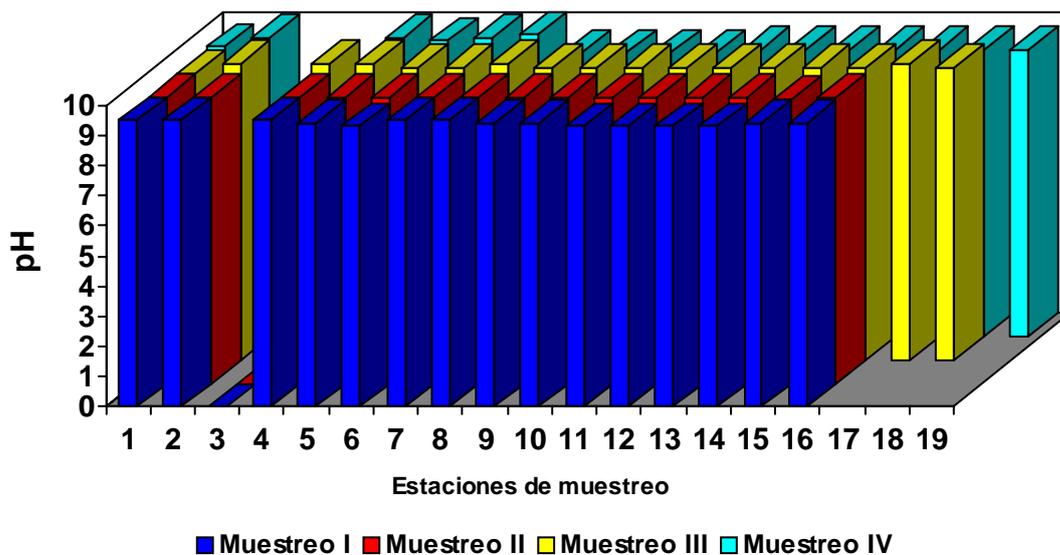


Figura 9. Valores de pH registrados durante los cuatro muestreos.

En estudios anteriores se ha reportado que el intervalo de pH que las amebas pueden tolerar es de 4.6 a 9.5 (Kyle y Noblet, 1985), e incluso se ha descrito su supervivencia a un pH de 10 (Sykora *et al.*, 1983). En este trabajo en la estación 8 del muestreo IV se registró un pH de 10 (figura 9), no encontrándose en este sitio ningún tipo de amebas de vida libre, esto no necesariamente es contrario a lo citado por Sykora (1983), ni se pretende afirmar que a un pH de 10 no debe haber AVL, ya que la ausencia de estos protozoos en este sitio y a este pH específico pudo deberse también a otros factores.

De manera general, no se encontró una marcada fluctuación en los valores de pH durante los cuatro muestreos, por lo que se considera que este parámetro no tuvo una influencia determinante sobre las AVL.

## **8. Bacterias y coliformes totales**

Durante este trabajo, la concentración de bacterias totales en el agua de las albercas del balneario “El Géiser” fue mayor a diferencia de los valores encontrados para las coliformes totales. Como se sabe, estas últimas forman parte del grupo de las bacterias totales, por lo que es habitual encontrar pocas bacterias coliformes en aguas que no tienen fuentes de contaminación y que son de contacto primario. Sin embargo, el hecho de que haya coliformes se puede deber al aporte de los bañistas y a la carencia de un sistema de cloración para el agua que alimenta a las piscinas, dado que este centro acuático recreativo es alimentado por agua proveniente del géiser que se encuentra en el lugar, lo que permite el crecimiento bacterias. Por otra parte las estaciones seleccionadas en los acueductos terrestres, tenían cierta cantidad de sedimento, de tal forma que son sitios aptos para el crecimiento bacteriano, además estos canales no reciben mantenimiento constante, y pueden ser inoculados de bacterias a través del escurrimiento del agua de lluvia o por los mismos visitantes.

La menor concentración de coliformes totales fue de 100 UFC/ml, esta concentración se encontró en estaciones donde no eran frecuentados por los usuarios como en la estación 7, 18 y 19, aunque también estaciones ubicadas en las albercas comúnmente frecuentadas como la estación 16 del muestreo I, y las estaciones 14 y 15 del muestreo II tuvieron esta concentración; la mayor concentración fue de 5000 UFC/ml (los datos de este valor no se muestran en la figura 10 ya que fueron puntuales y se salen del ámbito en el que se encontraron la mayoría de los valores, ver Cuadro A13 en anexo), sin embargo, esta última concentración no fue consistente en todos los muestreos y estaciones ya que se encontró solamente en la estación 8 durante los muestreos I y II, la estación de referencia corresponde a un acueducto terrestre. En los demás lugares se considera que el número de coliformes detectados fue en escala menor, sin embargo, lo suficiente para servir como alimento y soportar el desarrollo de las amebas aisladas. Sykora *et al* (1983) reporta que el ámbito para encontrar AVL, en especial *Naegleria* es de 326 a 3540 UFC/100ml. Fue aparente que el género amebiano *Naegleria* fue aislado

en aquellos sitios con concentraciones de coliformes de 5000 UFC/ml, lo cual según Ettinger (2003) resulta una situación común.

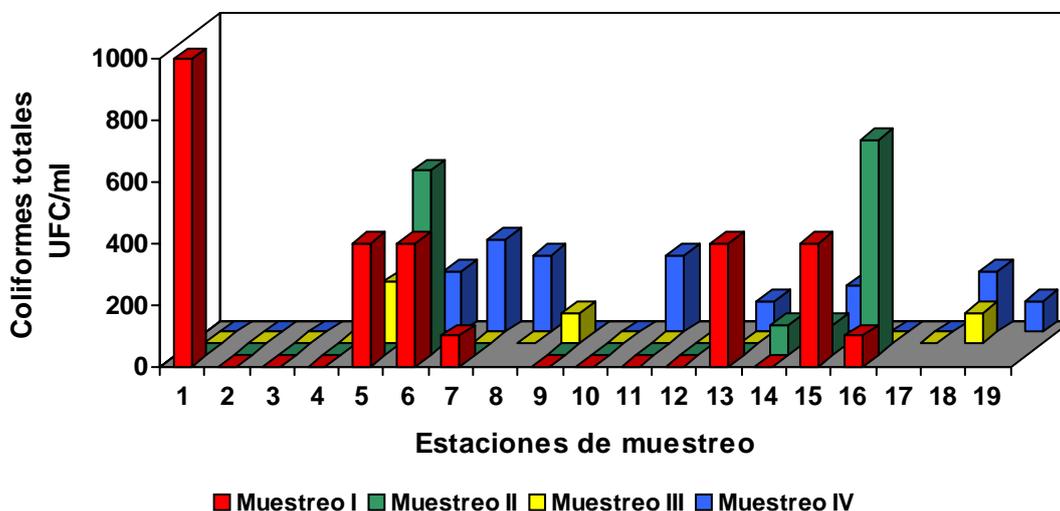


Figura 10. Concentración de coliformes totales registradas durante los cuatro muestreos.

En contraste con las coliformes totales, la concentración máxima de bacterias totales señalada como DPSC (demasiadas para ser contadas) estuvieron principalmente en las albercas más frecuentadas por los visitantes como en las estaciones 15 y 16 del muestreo II y muestreo III, la mínima concentración fue de 100 UFC/ml (Figura 11), en la estación 1 del primer muestreo. Aunque el aumento de la temperatura en el agua influye en la solubilidad del oxígeno, en el sistema se observó un descenso en la temperatura del agua desde el origen hasta la última alberca, sin embargo las temperaturas que se registraron fueron aptas para la actividad bacteriana e influyeron las bajas concentraciones de oxígeno disuelto (Riolobos, 2002).

Se ha sugerido que existe una estrecha relación entre la disponibilidad de una fuente bacteriana y la prevalencia de AVL en la columna de agua (Rodríguez, 1994). Las bacterias son el principal alimento para estos protozoos, y tienen una especial preferencia sobre las bacterias coliformes, sin embargo, las bajas concentraciones de estas no se consideraron como una limitante para la presencia de AVL, ya que había suficiente alimento disponible en forma de bacterias totales, y esto se aprecia con la constante presencia de amebas en las estaciones que también fueron positivas para bacterias.

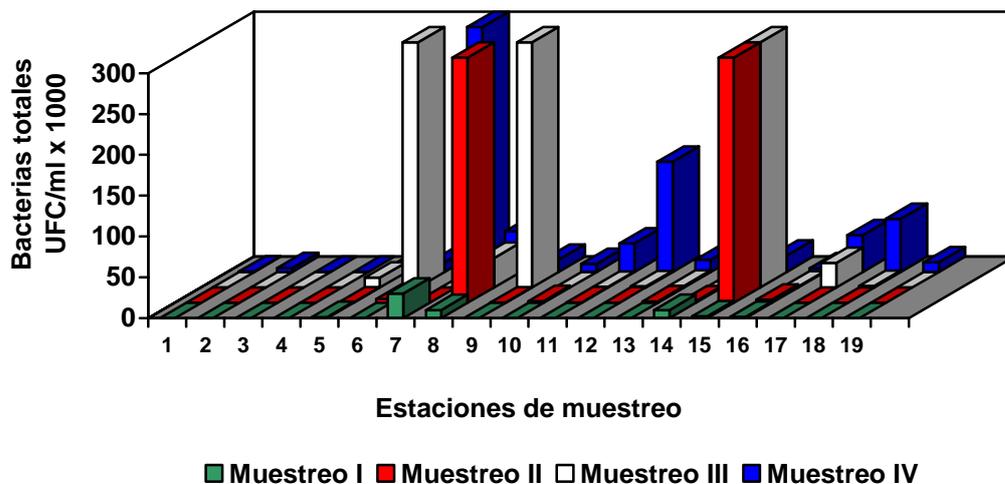


Figura 11. Concentraciones de bacterias totales registradas durante los cuatro muestreos.

En las estaciones 9, 10, 11 y 12 del muestreo I en donde no se detectaron coliformes y bacterias totales, se aislaron diversas formas de AVL, en especial los géneros *Naegleria*, *Vahlkampfia* y *Acanthamoeba*. Para *Acanthamoeba* no se ha establecido una correlación positiva con el número de bacterias que deben estar presentes en el medio (De Jonckheere, 1991).

Las AVL tienen la capacidad de formar quistes cuando las condiciones son adversas principalmente cuando no hay alimento. Aislados del género *Vanella* fueron encontrados en estaciones con una gran cantidad de bacterias. Este género no presenta una fase quística, probablemente el incremento del alimento bacteriano puede ser ideal para la supervivencia de este género sin la necesidad de depender de un quiste (Ettinger, 2003).

### 9. Análisis de agrupamientos (Ligamiento simple: Jaccard)

El análisis de agrupamiento, formo grupos con aquellos sitios de muestreo con mayor similitud y con presencia de *Naegleria* (tanto *N. fowleri* como *N. gruberi*), cabe señalar que la mayoría de estos sitios se ubicaron en las albercas con temperaturas mayores a 36 °C, y que algunos tienen la característica de presentar altas concentraciones de bacterias.

En la figura 12 se aprecia el dendrograma donde se puede observar la formación de 5 grupos bajo el criterio de un 70 % de similitud. El grupo 1 esta representado por las estaciones 4 MIII, 7 MIII y 13 MIV, y cuentan con la presencia de una sola especie (*Naegleria* sp); además de esta especie, estos sitios tienen en común las temperaturas de aislamiento las cuales se encuentran por arriba de los 37 °C. Las estaciones de este grupo son unidas

por el análisis con las estaciones 13 MI, 14 MIII, 12 MIV y 9 MI para formar un grupo secundario con un 50 % de similitud. Este agrupamiento se debe a que la estación 13 MI cuenta con *Naegleria sp*, además de una segunda especie, *R. ithacus* la cual también tiene presencia en 14 MIII y en 12 MIV, en esta última estación hubo presencia de *H. vermiformis*, la cual es una de las especies con un aislamiento poco frecuente; la estación 9MI cuenta con las especies *Naegleria sp* y *Acanthamoeba castellanii*. Las temperaturas de aislamiento en estos sitios son mayores de los 36 °C, por lo que permite el agrupamiento con las estaciones del grupo 1.

Las estaciones que conforman el grupo 2, son 10 MI, 10 MIII y 14 MIV, estas dos últimas son similares debido a la presencia de 2 especies, *N. fowleri* y *Vahlkampfia avara*, esta es una de las especies más frecuentes y pertenece uno de los géneros con un alto porcentaje de aislamiento después de *Naegleria* durante los cuatro muestreos. Por otra parte, en el grupo 3 las estaciones 14 MII, 15 MII y 5 MIV tienen la presencia de *N. fowleri*, aunque hay una segunda especie que es *Vahlkampfia entérica* que se aisló en el sitio 15 MII. En este grupo se encuentran dos estaciones del muestreo II, siendo este el muestreo en el que se presentó el menor número de aislados y la menor diversidad. Por lo que respecta al grupo 4, las estaciones 13 MIII y 15 IV estuvieron representadas por *N. fowleri* y *N. gruberi*, sin embargo, el análisis une las estaciones de este grupo con la estación 16 IV para formar el grupo 5. Esta última estación cuenta con las mismas especies de *Naegleria*, aunque esta representada por una tercera especie, *Rosculus ithacus* la cual fue identificada en tres muestreos. Con los grupos 2, 3, 4 y 5 se da la formación de un nuevo grupo con el 50 % de similitud y tienen la característica de presentar aislados de los géneros *Naegleria* y *Vahlkampfia*, los organismos amebianos más frecuentes durante los cuatro muestreos, aunque cabe mencionar que junto con las estaciones 8 MI, 11 MI y 8MII conforman este grupo; dichas se caracterizan por la presencia de *N. fowleri*, además de *Acanthamoeba castellanii*, especie del género aislado durante dos muestreos y uno de los tres géneros más frecuentes; *Vahlkampfia ustiana*, especie poco aislada aunque pertenece a uno de los géneros más frecuentes; y *Vanella aberdónica*, especie raramente aislada.

Los grupos que se forman con un 50 % de similitud o menos, son aquellos conformados por estaciones que presentan especies poco frecuentes como las pertenecientes al género *Acanthamoeba*, *Rosculus* y *Hartmanella*, o raras como *Platyamoeba sp*, *Willaertia magna*, *R. flabellata*, *V. aberdonica*, *Stachyamoeba sp*. y *Echinamoeba sp*.

Es evidente que los grupos con similitud del 100 % son aquellos con la presencia de *Naegleria* junto con la de *Vahlkampfia*, y que a medida que son agrupados con aquellos sitios con géneros poco aislados o raros tiende a disminuir el porcentaje de similitud. El análisis del dendrograma en este trabajo muestra ciertas similitudes, exhibiendo aquellos pocos sitios que se agrupan con tipos similares de especies.



p $\geq$ 0.05) ya que estas se encuentran adheridas a partículas flotantes en la columna de agua (Fenchel, 1987).

A pesar de que se ha reportado que la temperatura, pH, oxígeno disuelto, conductividad y la disponibilidad de alimento bacteriano benefician la presencia de estos microorganismos, ha sido difícil establecer una clara asociación entre estas variables fisicoquímicas y la presencia de amebas de vida libre (Rodríguez, 1994).

Parámetros fisicoquímicos	MI (N=16)		MI (N=16)		MIII (N=18)		MIV (N=19)	
	R	p	R	p	R	p	R	p
Temperatura agua/No. sp	-.400	.125	-.318	.231	-.306	.217	-.280	.246
Temperatura amb/No. sp	-.100	.714	.053	.845	.138	.586	<b>.502</b>	.029
pH/no. sp	-.284	.286	.124	.647	-.011	.967	-.081	.743
Oxígeno disuelto/No. sp	.391	.134	-.365	.164	.016	.950	-.100	.682
Conductividad/ No. sp	.259	.333	-.439	.089	.415	.087	<b>.518</b>	.023
Col. Totales/No. sp	-.201	.455	<b>.719</b>	.002	.088	.729	-.097	.693
Bact. Totales/No. sp	-.079	.772	<b>.688</b>	.003	.218	.384	-.001	.997

N= Número de datos pareados

R= Coeficiente de correlación

p= Nivel de significancia

**Cuadro 7. Coeficientes de correlación de Spearman entre los parámetros fisicoquímicos y la presencia de AVL.**

## IX. CONCLUSIONES

El géiser natural localizado en el Municipio de Tecozautla en el Estado de Hidalgo, crea un ambiente adecuado para el desarrollo y presencia de amebas de vida libre. En este trabajo de investigación se identificaron en el lapso de ocho meses un total de 84 aislados amebianos pertenecientes a 13 géneros y 18 especies, lo que es indicativo de una alta diversidad de organismos considerando las temperaturas tan extremas del sistema medidas entre 41.4 y 56.0 °C.

Los géneros de AVL's frecuentemente aislados fueron *Naegleria*, *Vahlkampfia* y *Acanthamoeba*. Es importante considerar el hallazgo de especies como *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba castellanii*, *A. culbertsoni* y *A. polyphaga*, organismos referidos en la literatura científica como altamente patógenos; estas especies se aislaron de las albercas I, II, III y IV, lo cual representa un riesgo para la integridad de la salud de los usuarios en este sistema acuático recreativo.

En este estudio, se demostró que solo la temperatura del agua tuvo influencia en la distribución y diversidad en aquellas que han sido reportadas como termotolerantes, además se observa que la formación de un gradiente de temperatura del agua a lo largo de todo el sistema es un factor determinante en la composición de las poblaciones amebianas, aunque estadísticamente no hubo relación entre este parámetro y la distribución de AVL.

La temperatura ambiental, estadísticamente fue positiva, aunque en el área de estudio no hubo una estacionalidad marcada para intervenir en la temperatura del agua. Otros parámetros como la presencia de bacterias coliformes y bacterias totales favorecieron significativamente la aparición de AVL en el agua de las albercas durante el segundo muestreo, según el análisis estadístico, aunque en este muestreo se obtuvo un bajo número de aislados. La conductividad fue otro de los parámetros que estadísticamente favoreció la presencia de AVL en el muestreo IV, encontrándose este muestreo un considerable número de aislados respecto al primer muestreo. Referente a los demás parámetros (pH y oxígeno disuelto), sus valores se encontraron dentro de los intervalos que las amebas pueden soportar.

Es importante recomendar a la gente que frecuenta este balneario que haga uso de los artefactos necesarios para la natación como goggles, esto con el fin de evitar infecciones oculares como la keratitis; tapones para la nariz y oídos, y tratar de no introducir la cabeza al agua para no contraer infecciones como la meningoencefalitis amebiana granulomatosa. Como esta agua son usadas como curativas por personas enfermas, tratar de no introducirse con heridas, ya que estas son una puerta de entrada para estas amebas y evitar introducir restos de tierra u otro tipo de materia orgánica con los pies, así para impedir el crecimiento bacteriano y propiciar la presencia de estos protozoos. Para los propietarios de este balneario hacer uso de medios de desinfección como la cloración para dar un mejor mantenimiento a dicho centro recreativo.



# ANEXO 1

## MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES PARA TINCIONES

### Medio NNE

Para aislar a las amebas de vida libre se utilizan placas de agar no nutritivo con una capa de *Enterobacter aerogenes* inactivada; este medio se conoce como NNE (No Nutritivo con *Enterobacter*). El medio NNE proporciona sales y fuente de carbono a partir de las bacterias, necesarios para el sostenimiento de las amebas de vida libre. Se prepara con los componentes de la solución salina de Neff y agar bacteriológico a una concentración de 1.5% (De Jockheere, 1984).

NaCl.....	0.120g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0.004g
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O.....	0.004g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.142g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.136g
Agar bacteriológico.....	15.0g
Agua destilada.....	1000ml

El medio NNE se prepara mezclando todos los componentes en seco y se agrega después el agua destilada que se calienta hasta ebullición. La mezcla se esteriliza a 121°C durante 15 minutos, posteriormente se deja enfriar un poco para que se pueda vaciar en placas de Petri (previamente esterilizadas) una cantidad de 20 ml de este medio. Cuando el agar se solidifica, se le inocula una solución de bacterias *Enterobacter aerogenes* inactiva. Estas bacterias se obtienen cosechándolas a partir de cultivos puros en solución con agua destilada e inactivándola en baño de agua a 70°C por 30 minutos.

En las placas con agar se siembran aproximadamente una cantidad de 0.5 ml de solución de bacterias, la cual se distribuye homogéneamente por toda la superficie del medio con una varilla acodada. Las placas de NNE se dejan reposar una hora aproximadamente y se guardan en el refrigerador hasta su uso.

### Medio PBSGM (Medio Chang)

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

Biotriptasa.....	16.6g
------------------	-------

Dextrosa.....	2.7g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1.5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.9g
Agua destilada.....	1000ml

Después este medio se vacía en tubos de ensaye con tapón de rosca una cantidad de 2.7ml. Posteriormente los tubos se esterilizan con el medio a 15 libras de presión durante 15 minutos.

Una vez que se ha esterilizado el medio y ya frío, se agregan a cada tubo 0.3ml de suero fetal de bovino con antibióticos penicilina y kanamicina a una concentración de 200mg/ml. Los tubos se conservan en refrigeración.

## TINCIONES

### Proceso de fijación

Se lava una placa con amebas en buen crecimiento con 5ml de agua destilada previamente esterilizada, se hace el arrastre de este lavado de amebas con una varilla de vidrio acodada.

En los portaobjetos se marca un círculo de cera donde se va a poner el concentrado de amebas.

Se toma el lavado de las placas de Petri con una pipeta pasteur y se vacía en un tubo de ensaye, después se centrifuga a 1500 xg durante 10 minutos. El sobrenadante se desecha y se toman 3 gotas de la pastilla que se ha sedimentado y se colocan en los portaobjetos ya marcados con la cera.

Los portaobjetos se colocan en cámaras húmedas, las cuales se incuban a 37°C durante 30 minutos con la finalidad de que las amebas se adhieran a la superficie del portaobjeto. Inmediatamente después de que se sacan de la incubadora se observan al microscopio para verificar que las amebas se han adherido al vidrio.

Los más pronto posible se sumergen en alcohol sublimado por un período de 1 a 2 horas, esto con el fin de evitar que las amebas se separen del vidrio.

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

NOTA: Las preparaciones no se deben dejar secar; al día siguiente se hace un cambio a agua destilada para enjuagar.

## Proceso de tinción

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

Hematoxilina de Gómori

Cromótopo 2R.....	0.2g
Verde rápido FCF.....	0.3g
Ácido fosfowolfrámico.....	0.6g
Ácido acético.....	1.0ml
Agua destilada.....	100ml

Hematoxilina de Koolovsek

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

Alcohol sublimado

HgCl <sub>2</sub> .....	40g
NaCl.....	50g
Alcohol 50%.....	1000ml

Carbonato de litio al 1%

Alcohol

Alcohol etílico 96%.....	99.0ml
Ácido acético.....	1.0ml

Las preparaciones se toman con pinzas y se sumergen en agua destilada cinco veces y se seca. A la muestra se le agrega encima hematoxilina de koolovsek no más de 40 segundos.

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

Después la muestra se sumerge en bicarbonato e litio por cinco segundos y posteriormente se deja secar, se enjuaga con agua de la llave por cinco segundos y nuevamente se deja secar.

Una vez secas, se cubren las preparaciones con solución de Gómori (Mezcla Tricrómica) durante 10 minutos y se deja escurrir el exceso de solución. Se enjuaga por 15 segundos en la mezcla de solución ácido-acético-alcohol para quitar el exceso que haya quedado de la solución de Gómori.

Se sumerge la muestra en etanol al 96% 10 veces (sacando y metiendo), esto para evitar la deshidratación. Finalmente se sumerge en xilol durante 5 minutos.

## ANEXO 2

### ANÁLISIS MORFOMÉTRICO Y PRUEBAS BIOLÓGICAS DE LOS AISLADOS AMEBIANOS

Estación	Aislado	Quiste		Trofozoíto	
		X	S	X	S
3	<i>A. astronyxis</i>	17.57	2	L=32.60 A= 25.1	L=5.30 A=3.09
	<i>A. polyphaga</i>	12.81	1.56	L=24.52 A=20.45	L=2.87 A=2.93
5	<i>A. castellanii</i>	12.34	1.6	L=20.8 A=14.43	L=5.56 A=2.60
	<i>A. culbertsoni</i>	12.53	1.57	L=21.26 A=13.35	L=3.81 A=2.09
	<i>A. polyphaga</i>	11.90	1.59	L=19.23 A=3.26	L=13.86 A=2.52
	<i>N. gruberi</i>	9.84	1.73	ND	ND
	<i>N. fowleri</i>	8.55	1.23	L=16.16 A=6.94	L=2.45 A=1.34
8	<i>A. castellanii</i>	11.34	1.6	L=19.8 A=14.43	L= 4.56 A=1.80
	<i>N. fowleri</i>	10.03	1.46	L=15.25 A=9.34	L=2.69 A=2.05
9	<i>A. castellanii</i>	12.3	3.28	ND	ND
	<i>Naegleria</i> sp.	9.05	1.36	L=17.34 A=9.10	L=2.70 A=1.61
10	<i>V. avara</i>	9.05	1.53	L=21.32 A=6.56	L=1.42 A=1.40
	<i>N. fowleri</i>	10.08	1.51	L=18.32 A=9.03	L=3.79 A=1.53
11	<i>N. fowleri</i>	9.6	1.11	L=16.4 A=6.56	L=3.75 A=1.42
	<i>N. gruberi</i>	9.54	1.45	ND	ND
	<i>Vahlkampfia</i> sp.	ND	ND	ND	ND
	<i>V. avara</i>	8.46	1.23	L=15.58 A=8.02	L=3.15 A=1.63
	<i>V. ustiana</i>	9.6	1.48	L=20.91 A=4.92	L=1.73 A= 0
12	<i>A. astronyxis</i>	17.22	1.42	L=33.70 A=25.12	L=4.30 A=3.50
	<i>A. castellanii</i>	9.79	1.68	L=17.22 A=13.2	L=3.24 A=1.60
	<i>A. polyphaga</i>	8.11	1.13	L=14.14 A=10.43	L=3.58 A=2.21
	<i>A. galeacystis</i>	ND	ND	ND	ND
	<i>H. vermiformis</i>	8.48	1.25	L=27.05 A=5.70	L=3.88 A=1.17
	<i>Naegleria</i> sp.	7.38	0	L=17.20 A=9.13	L=2.50 A=1.50

	<i>Naegleria sp</i>	9.2	1.20	L=13.94 A=2.84	L=5.74 A=1.42
	<i>Vahlkampfia sp</i>	10.33	1.10	L=21.20 A=4.97	L=4.10 A=1.30
	<i>Willaertia sp</i>	ND	ND	L=39.36 A=24.6	L=0.5 A=.8
12	<i>W. magna</i>	8.2	1.6	ND	ND
13	<i>Naegleria sp</i>	7.70	1.30	L=15.78 A=6.36	L=2.21 A=1.26
	<i>R. ithacus</i>	6.27	1.46	L=9.73 A=7.17	L=2.2 A=2.16
14	<i>A. castellanii</i>	8.65	1.33	L=14.74 A=3.64	L=10.51 A=1.93
	<i>Vahlkampfia</i>	8.27	1.19	L=20.36 A=4.97	L=5.10 A=1.15
15	ND	ND	ND	ND	ND
16	<i>Mayorella sp</i>	ND	ND	L=20.09 A=13.89	L=5.25 A=13.59
	<i>H. vermiformis</i>	10.29	1.96	L=27.55 A=6.39	L=5.28 A=1.27
	<i>R. ithacus</i>	5.01	0.69	L=10.08 A=5.57	L=1.59 A=1.17
	<i>Stachyamoeba sp</i>	9.13	1.50	L=15.18 A=10.68	L=3.01 A=2.59
	<i>V. inornata</i>	9.55	0.80	L=19.15 A=8.43	L=4.03 A=1.55

**L= Largo; A= Ancho; X= Media; S= desviación estándar**

Cuadro A1. Análisis morfométrico de los aislados correspondientes al primer muestreo

Estación	Aislados	Quiste		Trofozoíto	
		X	S	X	S
6	<i>V. entérica</i>	ND	ND	ND	ND
	<i>Vanella aberdónnica</i>	ND	ND	L=27.06 A=9.68	L=1.94 A=.8
8	<i>N. fowleri</i>	5.53	1.23	L=17.34 A=2.70	L=9.10 A=1.61
	<i>V. aberdónica</i>	11.80	1.10	L=18.03 A=8.05	L=4.0 A=1.55
13	ND	ND	ND	ND	ND
14	<i>N. fowleri</i>	8.01	1.38	L=20.57 A=4.0	L=9.61 A=1.32
15	<i>V. entérica</i>	10.6	1.42	L=23.50 A=18.0	L=1.4 A=1.2
	<i>N. fowleri</i>	12.3	0	L=22.14 A=9.84	L=1.23 A=1.2
16	<i>V. entérica</i>	10.8	1.20	L=22.14 A=17.22	L=1.3 A=1.3

**L= Largo; A= Ancho; X= Media; S= desviación estándar**

Cuadro A2. Análisis morfométrico de los aislados correspondientes al segundo muestreo.

Estación	Aislado	Quiste		Trofozoíto	
		X	S	X	S
2	<i>R. flabellata</i>	5.86	1.36	L=15.79 A=6.0	L=4.0 A=.66
	<i>H. vermiformis</i>	6.06	1.27	L=18.72 A=4.09	L=4.1 A=1.42
4	<i>Naegleria sp</i>	10.92	1.32	L=14.66 A=1.80	L=8.16 A=1.17
6	<i>Vanella aberdónica</i>	ND	ND	ND	ND
7	<i>Naegleria sp</i>	7.70	1.36	L=15.7 A=6.35	L=2.21 A=1.26
9	<i>H. vermiformis</i>	8.7	1.42	L=28.33 A=8.61	L=5.22 A=1.7
	<i>N. fowleri</i>	9.64	1.42	L=14.95 A=8.51	L=3.60 A=1.93
	<i>E. silvestris</i>	8.05	1.10	L=16.35 A=10.27	L=7.27 A=3.71
10	<i>V. avara</i>	11.78	1.03	L=10.27 A=22.14	L=3.47 A=8.0
	<i>N. fowleri</i>	8.79	1.51	L=17.22 A=8.61	L=0 A=1.73
11	ND	ND	ND	ND	ND
13	<i>N. fowleri</i>	8.31	1.30	L=14.75 A=856	L=3.64 A=1.94
	<i>N.gruberi</i>	10.6	1.53	L=20.17 A=11.3	L=5.33 A=2.20
14	<i>R. ithacus</i>	4.92	0	L=9.49 A=5.80	L=1.98 A=1.29
15	<i>Naegleria sp</i>	9.93	1.10	L=20.45 A=3.01	L=9.59 A=1.98
	<i>V. entérica</i>	ND	ND	L=19.9 A=8.53	L=5.16 A=2.16
	<i>V. avara</i>	9.69	2.2	L=24.6 A=7.38	L=0.92 A=0

**L= Largo; A= Ancho; X= Media; S= desviación estándar**

Cuadro A3. Análisis morfométrico de los aislados correspondientes al tercer muestreo.

Estación	Aislado	Quiste		Trofozoíto	
		X	S	X	S
5	<i>N. fowleri</i>	9.75	1.17	L=17.44 A=9.09	L=4.36 A=1.89
6	<i>A. castellanii</i>	11.02	1.42	ND	ND
	<i>A. polyphaga</i>	8.84	1.21	L=17.22 A=12.52	L=2.46 A=2.56
	<i>R. ithacus</i>	8.46	1.50	L=8.43 A=1.93	L=2.56 A=5.62
9	<i>A. polyphaga</i>	10.03	1.09	L=17.22 A=12.52	L=2.46 A=2.56
	<i>Naegleria</i> sp	9.75	1.17	L=17.44 A=9.09	L=4.36 A=1.89
	<i>V. avara</i>	9.40	1.60	L=32.9 A=14.28	L=8.2 A=3.81
10	<i>N. gruberi</i>	9.08	1.53	L=15.61 A=6.36	L=8.02 A=2.98
	<i>V. avara</i>	10.23	1.76	L=24.6 A=1.2	L=17.22 A=1.16
11	<i>Platyamoeba</i> sp	9.23	19.1	L=10.91 A=9.02	L=4.33 A=2.06
12	<i>H. vermiformis</i>	7.29	0.81	L=20.95 A=6.78	L=3.33 A=1.07
	<i>R. ithacus</i>	6.17	1.24	ND	ND
13	<i>Naegleria</i> sp	8.61	1.32	L=22.73 A=10.43	L=4.90 A=2.96
14	<i>N. fowleri</i>	8.02	1.09	L=16.54 A=7.71	L=2.03 A=1.15
	<i>V. avara</i>	9.59	1.21	L=23.19 A=8.08	L=3.30 A=2.44
15	<i>N. gruberi</i>	ND	ND	ND	ND
	<i>N. fowleri</i>	8.06	1.11	L=17.74 A=9.31	L=4.33 A=2.19
16	<i>N. fowleri</i>	10.38	1.5	L=16.49 A=10.56	L=3.55 A=2.25
	<i>N. gruberi</i>	10.66	1.38	L=9.77 A=8.61	L=4.58 A=1.87
	<i>R. ithacus</i>	5.02	0.70	L=10.0 A=5.75	L=1.2 A=1.17

**L= Largo; A= Ancho; X= Media; S= desviación estándar**

Cuadro A4. Análisis morfométrico de los aislados correspondiente al cuarto muestreo.

## PRUEBAS BIOLÓGICAS DE LOS AISLADOS AMEBIANOS

Aislado		42°C		45°C	
		24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs
5		-	-	-	-
8		+	+	+	-
9		+	+	+	+
10	a	ND	ND	ND	ND
	b	+	+	+	+
11	a	+	+	+	+
	b	+	+	+	+
12	a	+	+	+	+
	b	ND	ND	ND	ND
13	a	+	+	+	+
	b	+	+	ND	ND
14		+	+	+	+
15		ND	ND	ND	ND
16	a	+	+	+	+
	b	+	+	+	+
3s		+	+	+	+
5s		+	+	+	+

Cuadro A5. Pruebas de temperatura realizados a los aislados del primer muestreo.

Aislado		42°C		45°C	
		24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs
6		ND	ND	ND	ND
8		+	+	+	+
13		+	+	+	+
14		+	+	+	+
15		+	+	+	+
16		+	+	+	+

Cuadro A6. Pruebas de temperatura realizados a los aislados del segundo muestreo.

Aislado	42°C		45°C	
	24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs
2	+	+	+	+
6	+	+	+	+
7	ND	ND	ND	ND
9	+	+	+	+
10	+	+	+	-
11	ND	ND	ND	ND
13	+	+	+	+
14	-	-	-	-
15	+	+	+	+

Cuadro A7. Pruebas de temperatura realizadas a los aislados del tercer muestreo.

MUESTREO IV				
Aislado	42°C		45°C	
	24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs
5	ND	ND	ND	ND
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	ND	ND	ND	ND
11	+	+	+	+
12	+	+	+	+
13	+	+	+	+
14	+	+	ND	ND
15	+	+	+	+
16	+	+	+	+

Cuadro A8. Pruebas de temperatura realizadas a los aislados del cuarto muestreo.

## ANEXO 3

### CUADROS DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DE LOS CUATRO MUESTREOS

Estación	Temperatura ambiental en °C			
	Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III	Muestreo IV
1	25.7	28.2	22.9	28.1
2	25.7	24.8	25	24.8
3	--	-	-	-
4	32.2	26.8	21.4	-
5	27.0	28.5	25.9	25.9
6	ND	28.1	23.1	30.6
7	ND	25.9	22.3	26.6
8	ND	25.9	22.3	26.6
9	25.1	33.9	22.3	26.7
10	25.1	27.0	22.3	26.7
11	25.1	27.1	22.3	26.7
12	25.1	27.1	22.3	26.7
13	31.3	26.3	22.3	28.4
14	28.7	26.8	22.3	27.2
15	30.3	27.1	22.2	28.4
16	30.3	27.1	22.2	28.4
17	--	--	22.2	28.4
18	--	--	22.2	21.1
19	--	--	--	25.6

(--)= Muestras que no se tomaron

Cuadro A9. Temperatura ambiental registrada durante los cuatro muestreos.

Estación	Oxígeno disuelto (% de saturación)			
	Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III	Muestreo IV
1	45.6	50.7	51.5	61.0
2	58.1	59.4	59.6	65.3
3	--	-	-	-
4	60.0	67.0	56.6	-
5	61.2	72.5	55.3	65.3
6	46.6	41.3	44.6	78.0
7	60.0	65.7	20.1	58.8
8	60.6	51.8	60.5	70.2
9	66.2	77.0	52.0	57.0
10	65.1	77.7	55.2	59.4
11	59.4	81.2	55.2	57.4
12	59.4	81.2	55.1	56.9
13	60.1	49.4	48.0	46.5
14	62	44.0	47.1	43.6
15	59.2	48.4	48.2	43.6
16	59.2	45.0	46.7	42.1
17	--	--	56.7	53.7
18	--	--	60.1	61.0
19	--	--	--	54.3

(--)= Muestras que no se tomaron

Cuadro A10. Valores de % de saturación de oxígeno disuelto en el agua de las piscinas durante los cuatro muestreos.

Estación	Conductividad del agua en $\mu\text{s/cm}$			
	Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III	Muestreo IV
1	1570	1655	1915	1896
2	1650	2017	1895	1943
3	--	--	--	-
4	1646	1997	1961	-
5	1763	1994	2021	1975
6	2101	2138	2666	2148
7	1820	2083	2362	1994
8	1923	2160	2273	2116
9	2208	2000	2871	2765
10	2226	2063	2850	2963
11	2011	1966	2841	2770
12	2011	1966	2773	2800
13	2182	2318	2779	2591
14	2272	2331	2930	2619
15	2215	2310	2910	2559
16	2215	2281	2746	2571
17	--	--	2419	2638
18	--	--	2304	2419
19	--	--	--	2426

(--)= Muestras que no se tomaron

Cuadro A11. Conductividad registrada durante los cuatro muestreos.

Estación	pH del agua			
	Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III	Muestreo IV
1	9.5	9.5	9.5	9.6
2	9.5	9.5	9.8	9.9
3	--	-	-	-
4	9.5	9.5	9.8	-
5	9.4	9.5	9.8	9.9
6	9.3	9.5	9.7	9.8
7	9.5	9.5	9.7	9.9
8	9.5	9.5	9.8	10.0
9	9.4	9.5	9.7	9.4
10	9.4	9.5	9.7	9.4
11	9.3	9.5	9.7	9.4
12	9.3	9.5	9.7	9.4
13	9.3	9.5	9.7	9.5
14	9.3	9.5	9.7	9.5
15	9.4	9.4	9.7	9.5
16	9.4	9.5	9.7	9.5
17	--	--	9.8	9.5
18	--	--	9.7	9.5
19	--	--	--	9.5

(--)= Muestras que no se tomaron

Cuadro A12. Valores de pH registrados en los cuatro muestreos.

Estación	Coliformes totales UFC/ml			
	Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III	Muestreo IV
1	1000	N	N	0
2	N	N	N	0
3	--	--	--	--
4	N	N	N	--
5	400	N	200	N
6	400	600	N	200
7	100	N	N	300
8	5000	5000	N	250
9	N	N	100	0
10	N	N	N	0
11	N	N	N	250
12	N	N	N	250
13	400	N	N	100
14	N	100	N	0
15	400	100	N	150
16	100	700	N	0
17	--	--	N	0
18	--	--	100	200
19	--	--	--	100

(--)= Muestras que no se tomaron; N= Nulo

Cuadro A13. Valores de coliformes totales obtenidos durante los cuatro muestreos.

Estación	Bacterias totales UFC/ml			
	Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III	Muestreo IV
1	100	N	N	500
2	N	N	N	5000
3	--	--	--	--
4	N	N	N	--
5	1 400	200	12 000	7500
6	N	4700	TNTC	12000
7	30 000	N	N	300000
8	10 000	TNTC	360 00	50000
9	N	400	TNTC	15000
10	N	2100	N	10000
11	N	500	700	35000
12	N	100	1 400	135000
13	N	1700	2000	15000
14	10 000	2000	500	17000
15	2 300	TNTC	TNTC	20000
16	1600	3800	1000	4500
17	--	--	30000	45000
18	--	--	1800	65000
19	--	--	--	12000

*(--)* Muestras que no se tomaron ;(N) Nulo

Cuadro A14. Valores de bacterias totales (UFC/ml) obtenidas en los cuatro muestreos.

## ANEXO 4

### DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LOS GÉNEROS PRINCIPALMENTE AISLADOS

#### *Naegleria*

*Naegleria* es un organismo ameboflagelado, se le llama así debido a que este término describe a las amebas que pueden diferenciarse en formas flageladas y esta es una característica que distingue a este género. El ameboflagelado presenta dos flagelos en un extremo del trofozoíto, y esta fase puede persistir en un período de 60 a 90 minutos cuando se encuentran en un medio líquido como agua destilada o soluciones amortiguadoras, aunque incluso en el ambiente pueden encontrarse estas formas.

El ciclo de vida de *Naegleria* incluye una fase ameboidea o trófica, una quística, y una fase flagelar. El trofozoíto comúnmente presenta una forma monopodial (forma de dedo) (figura 13), con un movimiento activo y unidireccional producido por uno o más lobópodos o pseudópodos hialinos eruptivos, su tamaño varía entre 13-20  $\mu\text{m}$ . Cuando las condiciones ambientales son adversas para la existencia de la ameba, esta puede revertirse a una forma quística; el quiste presenta una doble pared (endo y ectoquiste) y su tamaño se encuentra entre 7-10  $\mu\text{m}$ . En el quiste se puede observar claramente el núcleo rodeado por los gránulos perinucleares, este también es una característica propia de los quistes de este género.

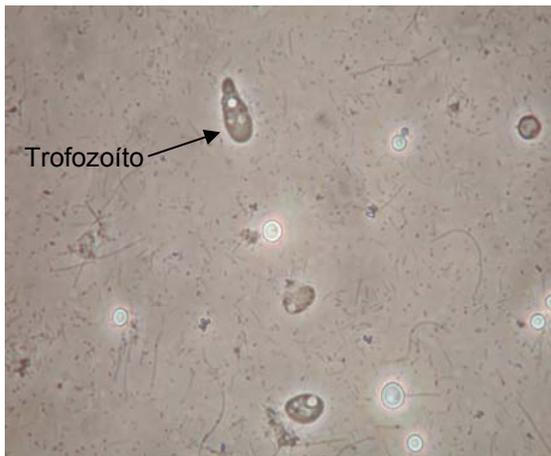


Figura 13. Trofozoíto de *Naegleria* sp

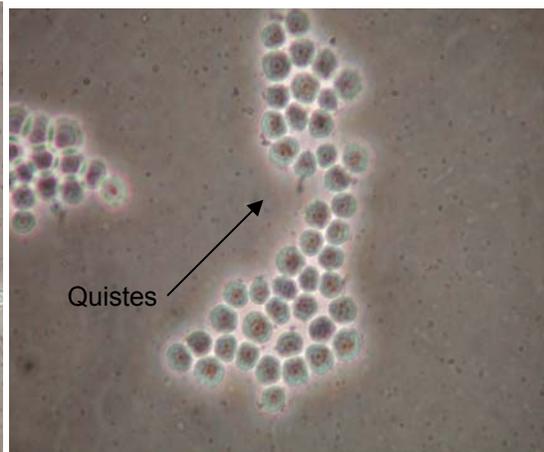


Figura 14. Quistes de *Naegleria* sp

Las amebas del género *Naegleria* se encuentran distribuidas en el agua y en el suelo, y son más sensibles a cambios ambientales como sequías, pH extremo y salinidad por lo que no pueden sobrevivir en ambientes salobres como el mar, estos organismos son menos ubicuos que aquellos del género *Acanthamoeba* (Schuster y Visvesvara, 2004).

## ***Acanthamoeba***

*Acanthamoeba* es un protozoo de vida libre oportunista que se encuentra distribuido en diversos ambientes como en el suelo, agua dulce, agua salada y de manera ocasional en el aire; también se ha aislado de agua mineral embotellada, soluciones salinas, agua destilada, e incluso de albercas que han sido cloradas. Se han aislado de vegetales, peces, reptiles, aves y mamíferos, y se conoce que es uno de los organismos más ubicuos. Debido a su naturaleza ubicua y a nuestra constante exposición con estos organismos, el sistema inmune del humano ha desarrollado defensas en contra de *Acanthamoeba* (Kahn, 2003).

El trofozoíto de *Acanthamoeba* es aplanado e irregular, de su citoplasma se proyectan seudópodos flexibles y alargados llamados acantópodos. El quiste es poliédrico o convexo con una doble pared, en ellas es evidente la presencia de poros u ostiolas, los cuales se encuentran cerrados por tapones. El quiste le sirve de protección para la desecación, escasez de alimento, agentes físicos (altas temperaturas, congelamiento, rayos ultravioleta) y desinfectantes (Shin e Im, 2004). *Acanthamoeba* se puede ubicar en 3 grupos a través de acuerdo a su morfología quística; en el Grupo I el quiste es más grande y puede llegar a medir 18  $\mu\text{m}$  o más y presenta un ectoquiste liso o rugoso. El Grupo II se caracteriza por tener quistes muy pequeños ( $\geq 18 \mu\text{m}$ ) con una forma poliédrica, globular u ovoide y un ectoquiste ondulado. En el Grupo III los quistes son menores de 19  $\mu\text{m}$  con un endoquiste ondulado u ovoide y un ectoquiste liso y ondulado (Schuster y Visvesvara, 2004).

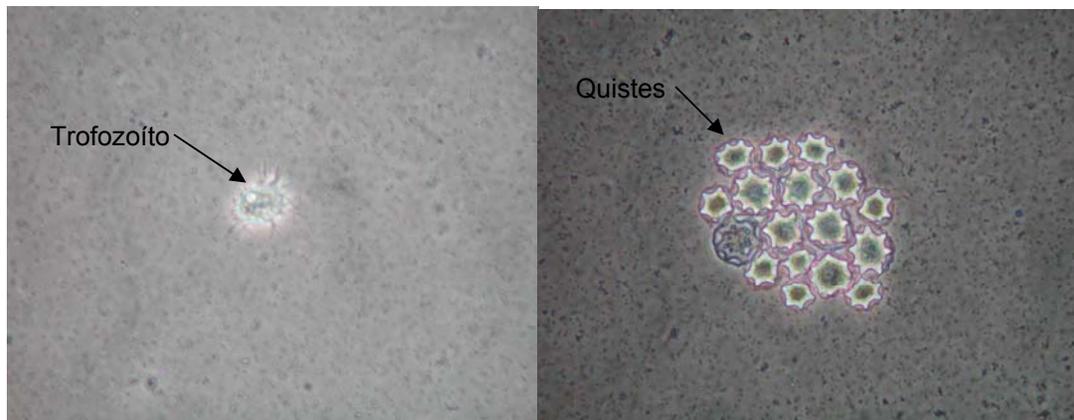


Figura 15. Trofozoíto de *Acanthamoeba* sp. Figura 16. Quistes de *Acanthamoeba* sp

## ***Vahlkampfia***

Este género tiene una amplia distribución en la naturaleza, tanto en ambientes edáficos como acuáticos. El trofozoíto de este género presenta una forma cilíndrica con una longitud aproximada de 10 a 35  $\mu\text{m}$  siendo más grandes a diferencia de los trofozoítos de *Naegleria*. Las amebas pertenecientes a este género son usualmente más rápidas y a diferencia de los demás integrantes de la familia Vahlkampfiidae este género no presenta una forma flagelar. Sus quistes son redondeados u ovalados con una delgada capa gelatinosa, y su tamaño va de 8 a 11  $\mu\text{m}$  aproximadamente.

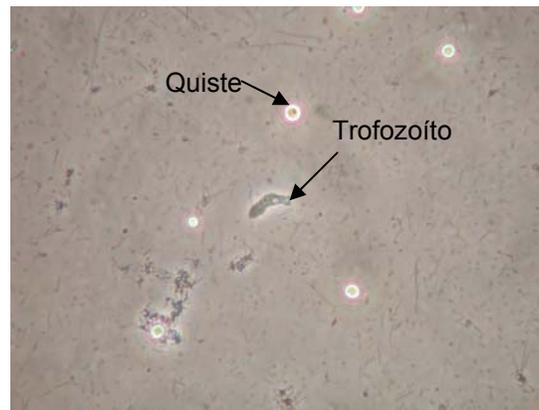


Figura 17. Trofozoíto y quistes de *Vahlkampfia* sp.

## X. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Adl, S., Farmer, M., Andersen, R., Anderson, R., Barta, J., Bowser, S., Brugerolle, G., Fensome, R., Fredericq, S., James, T., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C., Lewis, L., Lodge, J., Lynn, D., Mann, D., McCourt, R., Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standridge, S., Nerad, T., Sheraer, C., Smirnov, A., Spiegel, F., y Taylor, M. 2005. The new taxonomic level classification Eucaryotes with emphasis on the taxonomy of Protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* **52**(5): 399-451.
- Anderson, O. R. 2002. Laboratory and field-based studies of abundances, small-scale patchiness, and diversity of Gymnamoebae in soils of varying porosity and organic content: evidence of microbiocoenoses. *J. Eukaryot. Microbiol.* **49**(1): 17-23.
- Bhattacharya, A., Ghosh, M. y Choudhury, A. 1987. Seasonal abundance of *Acanthamoeba rhyssodes* (Singh 1952) (Protozoa: Gymnamoebia) in a mongrive litter-soil ecosystem of Gangetic-Estuary, India. *J. Protozool.* **34**(4): 403-405.
- Biddick, C., Rogers, L. y Brown, T. 1984. Viability of pathogenic and non-pathogenic free-living amoebae in long-term storage at range of temperatures. *Appl and Environ Microbiol.* **48**(4): 859-860.
- Bottone, E. 1993. Free-living amoebas of the genera *Acanthamoeba* and *Naegleria*: An overview and basic microbiologic correlates. *Mount Sinai J. Med.* **60**(4): 260-270.
- Brown, T. J., Cursons, R. T., Keys, E. A., Marks, M., Miles, M. 1983. The occurrence and distribution of pathogenic free-living amoebae in thermal areas of the north island of New Zeland. *N. Z. J. Marine Freshw. Res.* **17**: 59-69.
- Cabanès, P., Wallet, F; Pringuez, E., y Perring, P. 2001. Assessing the risk of primary amoebic meningoencephalitis from swimming in the presence of environmental *Naegleria fowleri*. *Appl. and Environ. Microbiol.* **67**(7): 2927-2931.
- Cable, B. L. y John, D.T. 1986. Conditions for maximum enflagellation in *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.* **33**(4). 467-472.
- De Jonckheere, J. F., Van Dijck., H y Van de Voorde. 1977. The distribution of *Naegleria fowleri* in man-made thermal waters. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **26**: 10-15.
- De Jonckheere, J. F. 1979. Pathogenic free-living amoebae in swimming polls: survey in Belgium. *Ann Microbiol Inst Pasteur.* **103 B**: 205-212.
- De Jonckheere, J. F. 1984. Postgraduate Course on Biochemical Techniques for the diagnosis of Primary Amoebic Meningoencephalitis. UNAM, México. 70 pp.
- De Jonckheere, J. F. 1991. Ecology of *Acanthamoeba*. *Rev. Infect. Dis.* **13** (suppl 5): S385-7.

- De Jonckheere, J. F. 2002. A century of research on the ameboflagellate Genus *Naegleria*. *Acta Prtozool.* **41**: 309-342.
- Delattre, J. M., y Oger, C. 1981. *Naegleria fowleri* and heated aquatics environments: a possible mechanism. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* **61**: 441-452.
- Dive, D. C., Delattre, J. M., Leclerc, H. 1982. Occurrence of thermotolerant amoeba in an electric power plant cooling pond. *J. Therm. Biol.* **7**: 11-14.
- Eaton, A. Clesceri, L. y Greenberg, A. 1995. Standard Methods for the Examination of the Water and Wastewater, 19a. edición.
- Ettinger, M., Webb, S., Harris, S., McIninch, P., Garman, G. y Brown, B. 2003. Distribution of free-living amoebae in James River, Virginia, USA. *Parasitol Res.* **89**: 6-15.
- Fenchel, T. 1987. *Ecology of Protozoa*. Science Tech. Estados Unidos de Norteamérica. 197pp.
- Griffin, J. I. 1983. The pathogenic ameboflagellate *Naegleria fowleri*: isolations competitors, ecologic interactions and the flagellate-empty habitat hypothesis. *J. Protozool.* **30**:403-409.
- Huizinga, H. y McLaughlin, G. 1990. Thermal ecology of *Naegleria fowleri* from a Power Plant cooling reservoir. *App and Environ Microbiol.* **56**(7): 2200-2205.
- John, D. T. 1993. Oportunistically pathogenic free-living amoebae. **En: Parasitic Protozoa**. Ed por Kreier J. P. y Baker J. R. Academic Press, Nueva York. 140-246.
- John, D.T. y Howard, M. 1995. Seasonal distribution of pathogenic free-living amoebae in Oklahoma waters. *Parasitol Res.* **81**. 193-201.
- Kahn, N. A. 2003. Pahtogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microbiol Pathogenesis.* **34**:277-285.
- Kilvington, S., Mann, P. y Warhurst, D. 1991. Pathogenic *Naegleria* amoebae in the waters of bath, a fatality and its consequences. *Hot Spring of Bath*. Ed. Kellaway, G. A. Bath City Council, Reino Unido: 89-96.
- Kyle, D., y Noblet, G. 1985. Vertical distribution of potentially pathogenic free living amoebae in freshwater lakes. *J. Protozool.* **33**(3):422-434.
- Kyle, D., y Noblet, G. 1986. Seasonal distribution of termotolerant free-living amoebae. I. Willard's Pond. *J. Protozool.* **33**(3):422-434.
- Kyle, D., y Noblet, G. 1987. Seasonal distribution of termotolerant free-living amoebae. II. Lake Issaqueena. *J. Protozool.* **34**(1): 10-15.

-Lares-Villa, F., De Jonckheere, J.F. De Moura, H., Rechi-Iruretagoyena, A., Ferreira, E., Fernandez, G., Ruiz, C. y Visvesvara, G. 1993. Five cases of Primary Amebic Meningoencephalitis in Mexicali, Mexico: Study of the isolates. *J of Clin. Microbiol.* **31**(3): 685-688.

-Lorenzo-Morales, J., Ortega, A., Foronda, P., Martínez, E. y Valladares, B. 2005. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitol Res.* **95**: 273-277.

-Marciano-Cabral, F., Cline, M. L. y Bradley, S. G. 1987. Specificity of antibodies from human sera for *Naegleria* species. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 692-697.

- Martínez, A. J. 1980. Is *Acanthamoeba* encephalitis an oportunist infection. *Neurology.* **30**: 567-574.

-Martínez Pérez, J. A., Elías Gutiérrez, M. y Varona, D. E., 2004. Protozoología; Aspectos Morfofuncionales. FES Iztacala. México. 242 pp.

-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. *Rosculus ithacus* Hawes, 1963 (Amoebida, Flabellidae) and the amphizoic tendency in amoebae. *Acta Protozool.* **13**: 143-154.

-Page, F. C. 1975. Morphological variation in the cyst wall of *Naegleria gruberi* (Amoebida, Vahlkampfiidae). *Protist.* **11**: 195-204.

- Page, F. C. 1976. *An Illustrated Key to Freshwater and Soil Amoeba with Notes on Cultivation and Ecology*. Freshwater Biological Association Scientific Publication. Londres. 122 pp.

- Page, F. C. 1988. *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae With Instructions for Culture*. Freshwater Biological Association Scientific Publication. Londres. 122 pp.

-Rhor, U., Weber, S., Michel,, Selenka, F. y Wilhelm, M. 1998. Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Appl and Environ Microbiol.* **64**(5): 1822-1824.

-Riolobos, P., Álvarez, C. M., Rojo, C., Rodrigo, M. A., Ortega, E. y Cirujano S. 2002. Técnicas habituales de análisis físicos, químicos y biológicos del Grupo de Investigación del Agua. Real Jardín Botánico, CSIC, Estudios Europeos de Medio Ambiente, S.L y Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC. Madrid, España. 80 pp.

-Rivera, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Ortiz, R., Zaldívar, B., Ramírez, P. y Durán, A. 1993. Pathogenic and free-living

amoebae isolated from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. *Environ Res.* **62**: 43-52.

-Rodríguez, S. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Critic Rev in Microbiol.* **20**(3): 225-241.

-Rodríguez, S., Rivera, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Gallegos, E., Calderón, A., Ortiz, R., y Hernández, D. 1993. Amebological study of the atmosphere of San Luis Potosí, Mexico. *J. Exp. Anal. Environ. Epidemiol.* **3**: 229-241.

-Rondanelli, E. G. 1987. *Infectious diseases. 1. Amphizoic Amoeba Human Pathology*. Piccin Nuova Libreria. Padua, Italia. 279 pp.

-Schuster, F. y Visvesvara, G. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and no-opportunistic pathogens of human and animals. *Inter.J. Parasitol.* 1-27.

-Shin, H. J. y Im, K. 2004. Pathogenic free-living amoebae in Korea. *Korean J. Parasitol.* **42**(3): 93-119.

-Smirnov, A. y Goodkov, A. 1999. An Illustrated list of basic morphotypes of *Gymnamoebia* (Rhizopoda, Lobosea). *Protistol.* **1**: 20-29.

-Sminorv, A. y Thar, R. 2003. Spatial distribution of *Gymnamoebae* (Rhizopoda, Lobosea) in brackish-water sediments at the scale of centimeters and millimeters. *Protist.* **154**: 359-369

-Sykora, J., Keleti, G., y Martínez, J. 1983. Ocurrente and pathogenic of *Naegleria fowleri* in artificially heated waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**(3): 974-979.

-Tyndall, R.L., Ironside, K.S., Metler, P.L., Tan, E.L., Hazen, T.C., y fliermans, C.B. 1989. Effect of thermal additions on the density and distribution of thermophilic amoebae and pathogenic *Naegleria fowleri* in a newly created cooling lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(3): 722-732.

-Visvesvara, G., Schuster, F. y Martínez, J. 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N. G., N. sp., agent of amoebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J. Euk. Microbiol.* **40**: 504-514.

-<http://www.hidalgo.gob.mx/estado/municipios/>