



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“CARACTERIZACIÓN DE AMIBAS DE VIDA LIBRE
PRESENTES EN AGUA SUBTERRÁNEA DEL
ACUÍFERO DE CUAUTLA MORELOS”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
CYNTHIA SUJEY GÓMEZ ZARZA

DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C. ELIZABETH RAMÍREZ FLORES



Los Reyes Iztacala, Edo. de Mex.

2009



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.

DEDICATORIAS

A Dios por todas las bendiciones recibidas y por no desampararme nunca.

A mis hermanos José Alberto, Daniela Karina y Jesús Alejandro, probablemente no sea el mejor ejemplo a seguir pero nada me daría más gusto que verlos llegar mucho más lejos que yo, los quiero.

AGRADECIMIENTOS

Por todas las facilidades brindadas para la realización de éste trabajo les doy mi agradecimiento a la:

Subgerencia de Explotación y Monitoreo Geohidrológico

Gerencia de Aguas Subterráneas

Subdirección General Técnica

Comisión Nacional del Agua (CNA)

Por todas las facilidades brindadas y su participación en los muestreos les doy mi agradecimiento a la:

Subgerencia de Aguas Subterráneas

Dirección Técnica

Dirección General del Organismo de la Cuenca del Río Balsas

Comisión Nacional del Agua (CNA)

A mi directora de tesis la Maestra Elizabeth Ramírez Flores por dirigirme en la realización de éste trabajo.

A mis sinodales la profesora Esperanza Robles Valderrama, la maestra Dolores Hernández Martínez y el maestro Ricardo Ortiz Ortega por sus valiosos comentarios, pero en especial a la Doctora Patricia Bonilla Lemus por su ayuda y su tiempo dedicado en éste escrito y en el laboratorio.

A la mujer que me dio la vida:

Por haber cuidado de ella y por todo lo que hiciste por mi

Gracias mamá.

A Isaura Zarza Ocaña:

Por que lo das todo sin pedir nada a cambio, por tu ejemplo, tu fuerza y tu valor, por la ayuda que siempre me has dado en todos los aspectos de mi vida, por tantas y tantas cosas

Gracias tía eres una GRAN Mujer.

A Verónica Solís Zarza:

Por tus palabras precisas en los momentos exactos, por las noches de desvelos, por ser oídos cuando necesito hablar, por ser abrazo cuando necesito consuelo, por ser báculo cuando necesito apoyo, por todo tu amor y confianza

Gracias.

A Diego Moreno Solís:

Por la confianza, cariño y complicidad, lo tienes todo juanin solo necesitas echarle ganas.

A mis tres inseparables amigos:

Por tantas experiencias compartidas, por la fuertes carcajadas y por la alegría que han traído a mi vida. A Edgardo por ser una gran persona y sobre todo un gran amigo, por la incalculable ayuda desinteresada que me has brindado desde que te conozco y por cuidarme siempre. A mi amiga gemela Jimena, por tu apoyo, cariño y confianza. A Mayra por tu amistad, tu paciencia y tu tiempo.

Gracias chicos los quiero mucho.

A mí querido amor:

Por los momentos compartidos, por las lecciones aprendidas, por todos los sueños y las ilusiones

Gracias amor.

A Gerardo Gutiérrez Monroy:

Por tu valiosa amistad y compañía

Gracias.

A mis tíos:

Delfino, José, Ángel y Benito, por el apoyo personal y escolar

Gracias.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	3
A) Amebas de Vida Libre	3
B) Importancia Médica	5
C) Acuíferos	8
ANTECEDENTES	10
JUSTIFICACIÓN	12
ÁREA DE ESTUDIO	13
OBJETIVOS	19
MATERIAL Y MÉTODO	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
Presencia de AVL	23
Riqueza específica total	24
Riqueza específica por pozo	25
Frecuencia de géneros	28
Distribución temporal	29
Distribución espacial	35
Prueba de tolerancia a la temperatura	37
Parámetros fisicoquímicos	40
Relación parámetros fisicoquímicos-presencia de amibas	42
CONCLUSIONES	43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXO	49

INTRODUCCIÓN.

Cada año caen aproximadamente 110 billones de m³ de agua en forma de precipitaciones pluviales sobre los continentes del globo terráqueo. La población del planeta es de 5700 millones de habitantes, lo que significa que cada uno recibe en promedio cerca de 53000 litros de agua dulce por día, y esto sin considerar el agua que cae en forma de lluvia o nieve en los océanos. Ciertamente, el agua debería alcanzar para todos, sin embargo, a pesar de ésta aparente abundancia de agua, a diario mueren miles de personas por enfermedades asociadas a esquemas inadecuados de abastecimiento de agua limpia. El problema además de la cantidad de agua y del número de personas es la distribución relativa de ambos, así como el hecho de que el agua no llega de manera regular a través del tiempo (Price, 2007).

El agua subterránea es una de las principales fuentes de abastecimiento de agua en el país. En el Valle de México, 70% de la población se abastece con el agua extraída a través de pozos. Sin embargo, los problemas de sobreexplotación de acuíferos en muchas zonas, así como otras actividades antropogénicas, han ocasionado deterioro en la calidad del agua subterránea en algunos sitios, y en muchos otros condiciones graves de decremento del nivel de los acuíferos y la disminución de sitios de recargas naturales debido a la elevada urbanización, lo que también influye en la afectación de la calidad del agua de recarga (Iturbe y Silva, 1992).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) (1995), considera que el agua subterránea extraída de acuíferos profundos y bien protegidos generalmente está libre de microorganismos patógenos, y en muchos países la distribución de agua sin tratamiento es una práctica común. Esto exige que la zona de influencia se proteja mediante medidas de reglamentación eficaces y que el sistema de distribución se proteja también suficientemente contra la contaminación secundaria por lixiviación de sustancias tóxicas, y organismos de interés en la salud pública.

Como es el caso de las amebas de vida libre (AVL), protozoos cosmopolitas que habitan en ambientes húmedos como el suelo y el agua, aunque también se pueden encontrar en el aire en forma de quistes (Bonilla *et al.*, 2004). A la fecha se han descrito como patógenas las amebas: *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, algunas del género *Acanthamoeba* y *Sappinia diploidea* que recientemente fué renombrada como *Sappinia pedata* por Qvarnstrom y colaboradores (2009). *Naegleria fowleri* es capaz de producir en el hombre meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP) enfermedad fulminante y mortal. *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia pedata* y algunas especies del género *Acanthamoeba* pueden provocar encefalitis amibiana granulomatosa (EAG). *Acanthamoeba* spp. también puede provocar infecciones severas en pulmones, oídos, nariz y queratitis amebiana en ojos. En comparación con otras enfermedades causadas por protozoos, las infecciones causadas por AVL destacan por su amplia distribución, extrema virulencia y falta de tratamiento efectivo (Bonilla *et al.*, 2004).

Hasta hace relativamente poco, la biología del agua subterránea permaneció sin ser estudiada, de modo que se tenía poca información de los organismos que estaban presentes en esta agua, especialmente los protozoos, entre ellos las amebas de vida libre. En acuíferos limpios el número de estos puede ser bajo o incluso de cero, mientras que en acuíferos contaminados orgánicamente la abundancia de los protozoos es usualmente mucho mayor (Ramírez *et al.*, 2001)

MARCO TEÓRICO.

A) Amebas de Vida Libre

Las amebas de vida libre son un grupo de protozoos pertenecientes a los super grupos Amoebozoa y Excavata (Adl *et al.*, 2005). Algunas de ellas reciben la denominación de anfitozoicas, porque son capaces de vivir en el medio ambiente y actuar como parásitos en el ser humano. Se les puede encontrar en suelo, agua y aire. El ciclo de vida de las AVL presenta 2 fases: trofozoíto y quístico, además de un estadio flagelar para *Naegleria* (Galarza *et al.*, 2006).

En los ecosistemas acuáticos las AVL desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento del flujo de energía y el reciclado de los nutrientes, su rápido crecimiento, el uso eficiente de los recursos y el hecho de ser un enlace fundamental entre los desintegradores y niveles tróficos superiores, los convierte en un eslabón importante en las cadenas alimenticias acuáticas. Las especies patógenas son termotolerantes, aunque no todas las termotolerantes son patógenas. Su hábitat principal es el suelo y desde ahí pueden llegar a los cuerpos de agua arrastradas por escurrimientos o a través del aire (Bonilla *et al.*, 2004).

Naegleria es ubicua y tiene una distribución mundial, vive principalmente en el suelo y ambientes acuáticos calentados natural o artificialmente, aunque también se pueden establecer en estanques, cascadas, manantiales lagos y ríos con temperaturas menores. Se han aislado de agua de grifo, piscinas, aguas termales, aguas de desecho, canales de riego, tinas de hidroterapia, lagos artificiales, efluentes calientes de plantas hidroeléctricas, polvo y de la nariz de individuos sanos. Los factores ambientales favorables para el desarrollo de este género de amibas son intervalos de temperatura de entre 30°C y 45°C, niveles óptimos de oxígeno, pH cercano a la neutralidad, alimento suficiente (bacterias y materia orgánica) y un mínimo de humedad. En temperaturas frías probablemente se enquistan y permanecen en el fondo con los sedimentos (Bonilla *et al.*, 2004;

Martínez y Visvesvara 1997). Recientemente Beltrán (2008) y Limón (2008) aislaron *Naegleria* de agua subterránea.

El hábitat de *Balamuthia mandrillaris* no se conoce con exactitud, a sido aislada de mandriles (Lee *et al.*, 2000) y el único aislado obtenido que tiene relación directa con un caso clínico se hizo de una maceta del jardín de la casa donde residía el individuo afectado (Seas y Bravo, 2006), aunque Galarza (2006) considera que probablemente *Balamuthia mandrillaris* también se encuentra en agua.

Acanthamoeba tiene la habilidad de sobrevivir en diversos ambientes y ha sido aislada de distribuidores de agua pública, piscinas, agua embotellada, agua de mar, estanques, agua estancada, lagos de agua dulce y salada, ríos, ductos de ventilación, interfase aire-agua, unidades de aire acondicionado, agua residual, composta, sedimentos, suelo, aire, vegetales, lentes de contacto, y de la atmósfera, indicando la naturaleza ubicua de éstos organismos. Además *Acanthamoeba* a sido aislada de muestras de hospitales, unidades de diálisis, recipientes para lavado de ojos, cavidad nasal humana, tejido de pulmón, lesiones de piel, biopsias corneales, fluido cerebroespinal y necropsia de cerebro (Naveed, 2006).

Sappinia pedata ha sido reportada en un solo caso clínico en la literatura (Schuster y Visvesvara, 2004), pero se a encontrado en agua dulce, suelo y composta (Lee *et al.*, 2000).

Biólogos, médicos y observadores con conocimiento han realizado aportaciones importantes sobre su existencia, se encuentran reportes de AVL en varios lugares del mundo, en donde han sido encontradas en casos de infección humana. Estas infecciones por amebas han ocurrido posiblemente, desde el amanecer de la humanidad y su reconocimiento durante las últimas décadas es el resultado del enorme avance en el tratamiento de las enfermedades infecciosas en las áreas antimicrobianas. Sin embargo, las enfermedades producidas por AVL sólo se

reconocen, aparentemente a partir de 1948, cuando se comunicó el caso de un soldado japonés que falleció por una infección amebiana diseminada; Derrick, realizó la autopsia, atribuyendo la causa de la muerte a un parásito casi idéntico a *Iodamoeba buetschlii*, agente que ha sido considerado posteriormente por algunos como *Naegleria* y por otros como una *Acanthamoeba*. El segundo caso de infección por AVL del que existe información, ocurrió en 1960, en Tucson Arizona, Kernoham y col. publicaron el caso de una niña de 6 años que falleció con una lesión cerebral descrita como granuloma cerebral, la cual fue debida a *Acanthamoeba sp.* (Oddó, 2006).

En 1958, Culberston da a conocer que las AVL eran patógenas para animales de experimentación, sin embargo, no es si no hasta el año 1965 que Fowler reportó el primer caso de infección humana por AVL (*Naegleria*). La primera infección humana por *Acanthamoeba* fue descrita por Jager en 1972 y el primer caso reportado por *Balamuthia* fue descrito por Visvesvara, en 1990 (Schuster y Visvesvara, 2004). En el 2001 Gelman publicó el primer y único caso de encefalitis amebiana causada por *Sappinia pedata* (Oddó et al., 2006).

B) Importancia Médica

Se ha establecido que algunas de las amebas de vida libre producen en el hombre enfermedades de curso diverso, y son consideradas agentes infecciosos emergentes, tanto patógenos primarios como oportunistas, cuyo diagnóstico resulta muy difícil desde el punto de vista clínico y morfológico.

MENINGOENCEFALITIS AMEBIANA PRIMARIA (MEAP).

La meningoencefalitis amebiana primaria es producida por *Naegleria fowleri* y corresponde a un cuadro agudo y fulminante que afecta a personas que tuvieron antecedentes de haber realizado actividades acuáticas de 3 a 7 días antes de presentarse el cuadro. Los protozoos penetran a través del neuroepitelio olfatorio originando una meningoencefalitis necrosante y purulenta con compromiso

predominante de la base del cerebro, tronco cerebral y la base del cerebelo; en los cortes histológicos se encuentran solo trofozoítos, especialmente perivasculares; en el ser humano no se han observado quistes en los tejidos. La MEAP ocurre principalmente en individuos sanos, niños o adultos jóvenes, el periodo de incubación dura de 3 a 7 días, aunque en algunos casos es mayor a dos semanas. Los síntomas comienzan abruptamente con fiebre leve y malestar general, algunas veces acompañados con rinitis y odinofagia; estos síntomas progresan rápidamente, con acentuada cefalea y fiebre, seguida por vómitos rigidez de nuca y signos de irritación meníngea, algunos síntomas leves de compromiso respiratorio superior pueden estar presentes. Al ingreso al hospital, el diagnóstico es generalmente de meningitis piógena; en el hospital, el cuadro clínico es de un continuo deterioro, somnolencia y algunas veces convulsiones. La punción lumbar arroja un fluido turbio con presión elevada. El paciente fallece de insuficiencia respiratoria en menos de 10 días de iniciados los síntomas. Varias especies de *Naegleria* han sido aisladas de las vías nasales y del tracto respiratorio superior de los individuos sanos; algunos de estos aislados han sido identificados solamente como *Naegleria sp* o *Naegleria gruberi*, una especie no patógena, pero unas pocas han sido catalogadas como patógenas, pero el significado de estos descubrimientos en la epidemiología de estas infecciones permanece poco claro (Oddó, 2006).

ENCEFALITIS AMEBIANA GRANULOMATOSA (EAG).

La encefalitis amebiana granulomatosa usualmente ocurre en personas severamente enfermas y debilitadas, algunas de las cuales pueden estar sometidas a terapias inmunosupresoras, algunas enfermedades han sido reportadas con EAG, como la enfermedad de Hodgkin's, el Lupus sistemático eritomatoso, la diabetes mellitus, la deficiencia G6PD, el alcoholismo y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (John, 1993).

El antecedente de inmunocompromiso es relevante en las infecciones por *Acanthamoeba* spp., no así en los casos producidos por *B. mandrillaris*. La puerta de entrada de éstas es el tracto respiratorio o la piel desde donde siguiendo la vía hematológica o una progresión local continúan hacia las vías nerviosas llegando fulminantemente al sistema nervioso central. La enfermedad corresponde a una encefalitis necrosante y hemorrágica aguda, subaguda o crónica, multifocal con angiitis necrótica y con presencia de trofozoitos y/o quistes parasitarios característicos. El compromiso del cerebro por acanthamebiasis ocurre en todas las edades, igual en ambos sexos y sin predilección racial, pero en el caso de *B. mandrillaris* existe una aparente predilección de hispanoamericanos en California. Las manifestaciones clínicas son variables pero en la mayoría de los pacientes se presenta como una encefalopatía focal o difusa y con signos de irritación meníngea. Los síntomas más comunes son anomalías del estado mental, letargo, cefalea, hemiparesias y meningitis. El curso de la enfermedad es subagudo o crónico, de 7 a 120 días. De los casos de EAG solo uno ha sido atribuido a *S. pedata* (Oddó, 2006).

QUERATITIS AMEBIANA (QA).

La queratitis amebiana corresponde a un proceso inflamatorio crónico activo producido por *Acanthamoeba* spp, que afecta la córnea y a veces la conjuntiva y otras estructuras oculares, asociado al antecedente de un traumatismo corneal y la exposición a agua contaminada. Los factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad son el uso de lentes de contacto y su lavado con soluciones salinas caseras (Oddó, 2006).

Las amebas entran al estroma de la córnea por rompimiento del epitelio consecutivo a un traumatismo menor o abrasión del epitelio protector. En general, afecta a un solo ojo y a menudo se confunde con una queratitis viral. Una vez establecidas las amebas en el estroma corneal son difíciles de erradicar; puede haber recurrencia de la infección cuando el tratamiento antimicrobiano se reduce o suspende. Los pacientes pueden requerir de uno o más transplantes corneales

para reparar el daño y en el peor de los casos se tiene que realizar la enucleación (Bonilla y Ramírez, 2008).

Otros factores que favorecen el establecimiento de la queratitis acanthamebiana son la producción de lágrimas con baja actividad microbiana y la contaminación bacteriana secundaria (Bonilla *et al.*, 2004).

INFECCIONES NASOFARÍNGEAS Y CUTÁNEAS.

Estas infecciones son causadas por *Acanthamoeba* y *Balamuthia*; se desarrollan cuando las amebas, ya sea en forma de trofozoíto o quiste, se introducen en una lesión por la piel o por las fosas nasales. Pueden permanecer localizadas, pero en general las amebas se diseminan a otras partes del cuerpo, en particular al sistema nervioso central y no hay delimitación definida entre estas infecciones y la encefalitis (Bonilla y Ramírez, 2008)

Entre las infecciones cutáneas se encuentran la dermatitis acanthamebiana o acanthamebiasis cutánea, una inusual infección oportunista producida por AVL del género *Acanthamoeba*; la cual puede ser una lesión primaria de la piel o manifestación secundaria de una infección diseminada. La mortalidad reportada de la dermatitis acanthamebiana sin compromiso del sistema nervioso central es de aproximadamente 73%; cuando además está afectado el encéfalo, la mortalidad llega a 100% (Oddó, 2006).

C) Acuíferos

Las formaciones rocosas o de material poroso capaces de proporcionar cantidades significativas de agua se denominan acuíferos. Estos se forman con rocas no consolidadas, grava y arena. La mayoría de los acuíferos se consideran como grandes sistemas de almacenamiento de agua subterránea, en los cuales este líquido entra al reservorio por recarga natural o artificial y sale a la superficie

a través de manantiales, pozos y galerías filtrantes (Iturbe y Silva, 1992; Gordon *et al.*, 1987).

Las actividades humanas del hombre relacionadas con la disposición de aguas residuales en suelos, construcciones de rellenos sanitarios en sitios inadecuados, escurrimientos superficiales en zonas urbanas, explotación de acuíferos, etc., pueden ocasionar la contaminación de suelos y acuíferos. La magnitud del problema depende de las características hidrogeológicas del sitio, del tipo de contaminantes presentes de acuerdo con las actividades realizadas, así como de las condiciones de la zona (Iturbe y Silva, 1992).

A partir de la mitad del siglo pasado, el uso del agua subterránea comienza a tomar importancia en Iberoamérica, principalmente a consecuencia del menor costo de explotación y la escasa disponibilidad de agua superficial en algunas regiones. En las últimas décadas se ha observado, en los países desarrollados, un incremento en el interés por conocer acerca de la contaminación del agua subterránea, desarrollándose diversos sistemas de evaluación de la vulnerabilidad regional de acuíferos con objeto de elaborar mapas de sensibilidad y vulnerabilidad, estos ayudan a establecer estrategias de protección del agua subterránea ya que el uso de los mapas de vulnerabilidad permite determinar el riesgo de contaminación de las aguas subterráneas lo cual se puede utilizar para identificar los acuíferos, o zonas de los acuíferos, más vulnerables y establecer aquellas actividades que pueden causar riesgo de contaminación acuática (www.tierra.rediris.es/iberamred/).

ANTECEDENTES.

1) En 1997 Novarino publicó una revisión sobre comunidades protistas en acuíferos, donde encontraron amebas desnudas pertenecientes al género *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Mayorella*, *Rosculus*, *Vahlkampfia*, *Vannella* y *Platyamoeba*.

2) De mayo del 2005 a abril del 2006, Campos (2007) determinó la distribución temporal de las AVL en los manantiales “Las Fuentes” y “El Túnel” del acuífero del Valle de Cuernavaca en el Estado de Morelos, obteniendo amibas de los siguientes géneros: *Hartmannella*, *Naegleria*, *Vannella*, *Vahlkampfia*, *Rosculus*, *Dactylamoeba*, *Platyamoeba* y *Filamoeba*. El género más frecuente en ambos manantiales fue *Hartmannella*.

3) Beltrán (2008) en el mismo período detectó amibas de vida libre en 10 pozos del acuífero de Cuernavaca, Morelos. Encontrando 19 especies pertenecientes a 14 géneros: *Hartmannella*, *Naegleria*, *Vannella*, *Vahlkampfia*, *Rosculus*, *Platyamoeba*, *Thecamoeba*, *Vexillifera*, *Nuclearia*, *Stachyamoeba*, *Echinamoeba*, *Guttulinopsis*, *Cochliopodium* y *Acanthamoeba*; siendo *Hartmannella* la que se presentó con más frecuencia con sus dos especies: *H. vermiformis* y *H. cantabrigiensis*.

4) Del 2005 al 2006, Rubio (2007), García (2007) y Monroy (2007) realizaron un estudio físico-químico y bacteriológico del agua subterránea del Valle de Cuernavaca, Morelos, en las zonas norte, centro-oriente y sur respectivamente. Concluyendo para la zona norte que el agua subterránea muestra en general buena calidad, para la zona centro-oriente que los pozos en general no requieren purificación para el abastecimiento público, y para la zona sur que las descargas de aguas residuales a los suelos están provocando que se degrade la calidad de los mantos acuíferos, lo que implica una disminución en la calidad del agua.

5) En el 2006 Ramírez y colaboradores publicaron un estudio en aguas subterráneas sobre AVL, en el Valle del Mezquital, Hidalgo, una zona contaminada por materia orgánica, aquí aislaron un total de 31 especies, representadas por ocho diferentes géneros: *Acanthamoeba*, *Echinamoeba*, *Hartmannella*, *Mayorella*, *Platyamoeba*, *Vahlkampfia*, *Vannella*, y *Vexillifera*. *Acanthamoeba* fue la más frecuente y 6.5% de éstas fueron patógenas en animales de experimentación.

6) Limón en el 2007 reportó la distribución temporal y espacial de las AVL en 8 pozos del acuífero de Zacatepec, Morelos donde encontró que *Hartmannella vermiformis* fue la más frecuente con el 41.5%, también encontró dos especies patógenas de *acanthamoebas*; *Acanthamoeba polyphaga* y *Acanthamoeba royreba*.

JUSTIFICACIÓN.

El agua es un elemento esencial para cubrir los requerimientos vitales de todos los organismos, las demandas de agua para la población humana cada vez son mayores debido al desarrollo poblacional y por consiguiente el uso del agua subterránea también ha aumentado en los últimos años.

Los estudios acerca de la microbiología del agua subterránea son escasos en comparación con los del agua superficial, además recientemente se ha demostrado que el agua subterránea es vulnerable a la contaminación por diversos factores, entre ellos están los microorganismos como las bacterias, los virus y los protozoos como las AVL, las cuales han cobrado gran importancia debido a su patogenicidad sobre el hombre y su amplia distribución, sin embargo aún no se conoce con exactitud aspectos sobre su ecología y son muy pocos los trabajos realizados con AVL en agua subterránea.

Es por eso que este trabajo pretende ampliar el conocimiento acerca de estos organismos y su distribución en la naturaleza.

OBJETIVOS.

Objetivo General:

Caracterizar las Amibas de Vida Libre presentes en pozos del acuífero de Cuautla, Morelos.

Objetivos Particulares:

1. Determinar la riqueza específica de las Amibas de Vida Libre presentes en el Acuífero de Cuautla, Morelos.
2. Establecer su distribución temporal y espacial.
3. Relacionar la presencia de éstas amibas con los parámetros físico-químicos registrados en el campo; pH, temperatura y oxígeno disuelto.

ÁREA DE ESTUDIO.

LOCALIZACIÓN

El acuífero de Cuautla colinda en la porción Norte con la Cuenca Hidrológica del Valle de México, al Oeste con el acuífero Cuernavaca y Zacatepec, al Este con el acuífero de Tepalcingo-Axochiapan en el Estado de Morelos y al Sur con la cuenca del río Amacuzac, en el estado de Morelos y Guerrero; bajo las coordenadas geográficas extremas: al norte $19^{\circ} 25'$, al sur $18^{\circ} 49'$ de latitud norte; al este $98^{\circ} 57'$; al oeste $99^{\circ} 01'$ de longitud oeste. Es el centro económico de mayor importancia de la zona oriente del Estado de Morelos, dentro de las actividades económicas se encuentran las turísticas, las agrícolas y las pecuarias.

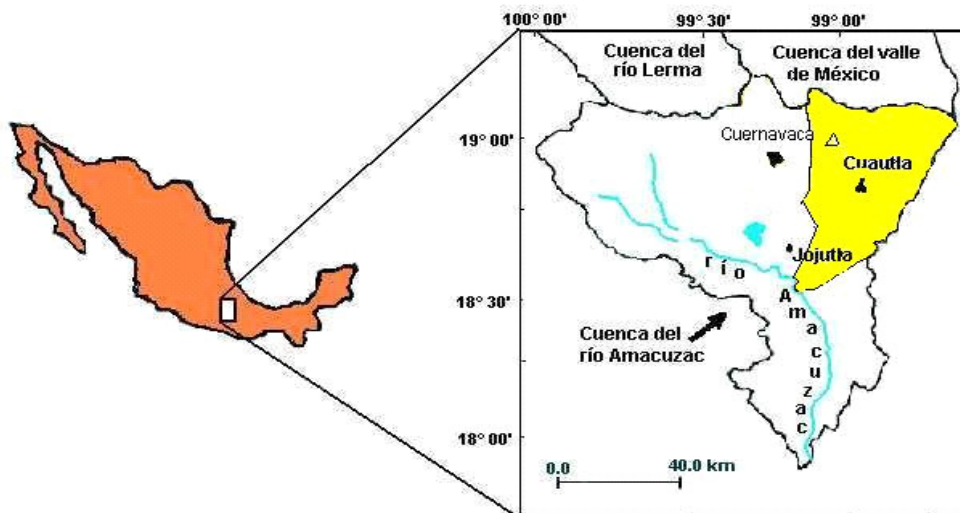


Figura 1. Localización de Cuautla en la República Mexicana.

El acuífero Cuautla-Yautepec cubre una superficie de 2,231.22 km² de los cuales 1,451.16 km² corresponden a la zona de recarga, con pendientes que varían de fuertes a moderadas y 780.07 km² a la zona acuífera o de acumulación. Presenta un potencial hidrológico muy importante. De manera natural aporta a través de manantiales un caudal de 6,827 lps (litros por segundo), que ha sido determinante para el desarrollo de las actividades económicas de la zona de Cuautla.

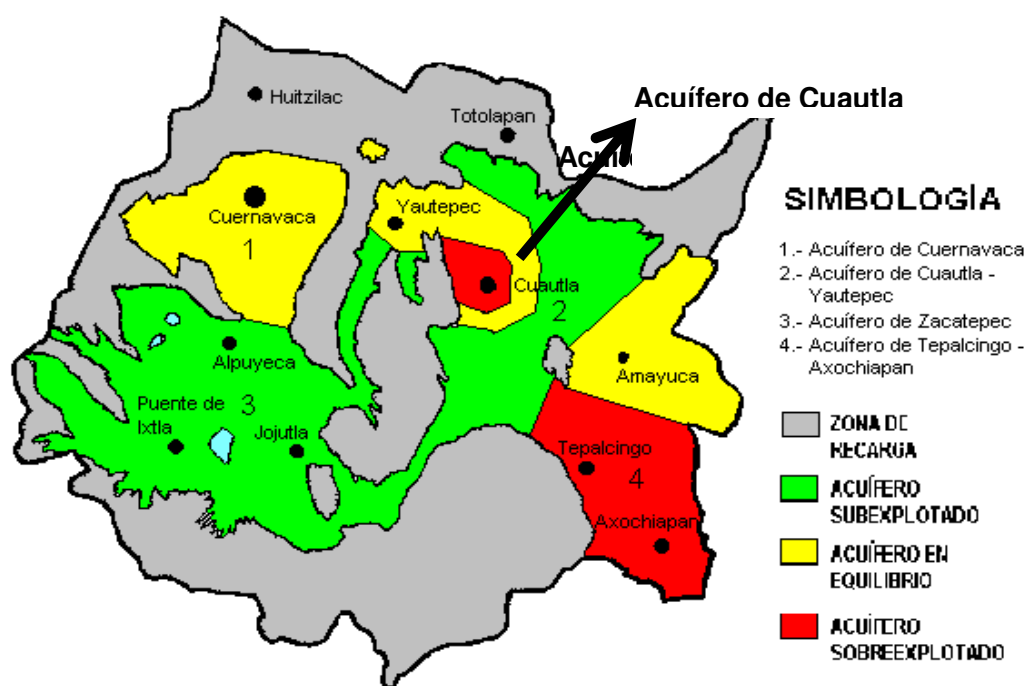


Figura 2. Localización del Acuífero Cuautla-Yautepec.

CLIMA

En particular en el acuífero Cuautla-Yautepec se tiene clima templado en la parte norte de la sierra y en la ladera de ésta, semicálido en el piamonte y cálido en la parte baja de los valles. De acuerdo a la clasificación de Köeppen, modificado por Enriqueta García, el clima que predomina en el acuífero es el cálido subhúmedo con lluvias en verano, con temperatura media anual de 20.0° C y precipitación media anual de 1,003 mm, con un 5% de lluvia invernal.

TIPO DE ACUÍFERO

Presenta tres tipos de acuíferos o unidades geohidrológicas constituidos por uno o varios tipos de roca que se caracterizan en mayor o menor grado por almacenar, conducir y ceder agua subterránea. La primera unidad geohidrológica, definida también como acuífero libre, se ubica en materiales de las formaciones Tlayecac, Depósitos Clásticos Continentales y Chichinautzin. Las dos primeras de regular permeabilidad y de tipo granular mientras que la tercera de alta permeabilidad y de tipo fracturado. Sobre estos materiales se encuentran alojadas las obras de captación que explotan las aguas del subsuelo mediante pozos profundos y norias en el estado de Morelos. Este tipo de acuífero tiene además importantes descargas naturales mediante manantiales. La segunda unidad geohidrológica, definida como un acuitardo, se asocia con los materiales del Grupo Balsas y la formación Mexcala, materiales que tienen la capacidad de almacenar agua pero no fácilmente la ceden y funcionan como basamento del acuífero libre y barrera impermeable entre el acuífero libre y la tercera unidad. El Grupo Balsas y la formación Mexcala se localizan a profundidades del orden de 150 metros, en la porción norte de Oaxtepec y al poniente de Cuautla. La tercera unidad geohidrológica se encuentra debajo del Grupo Balsas y la formación Mexcala. Constituye un acuífero regional o profundo, se encuentra semiconfinado y se aloja en materiales calizos de las formaciones Morelos y Cuautla, siendo además el basamento de la secuencia geohidrológica. El agua subterránea se conduce a través de fallas, fracturas o zonas de disolución y se manifiesta y explota únicamente en la porción del valle de Yautepec por la descarga natural del manantial Las Estacas (CNA, 2002).

Los pozos muestreados se encuentran en los municipios de Tepoztlán, Atlatlahucan, Yecapixtla, Cuautla, Ayala y Tlaltizapan (Figura 3) (Fotografías 1-9).

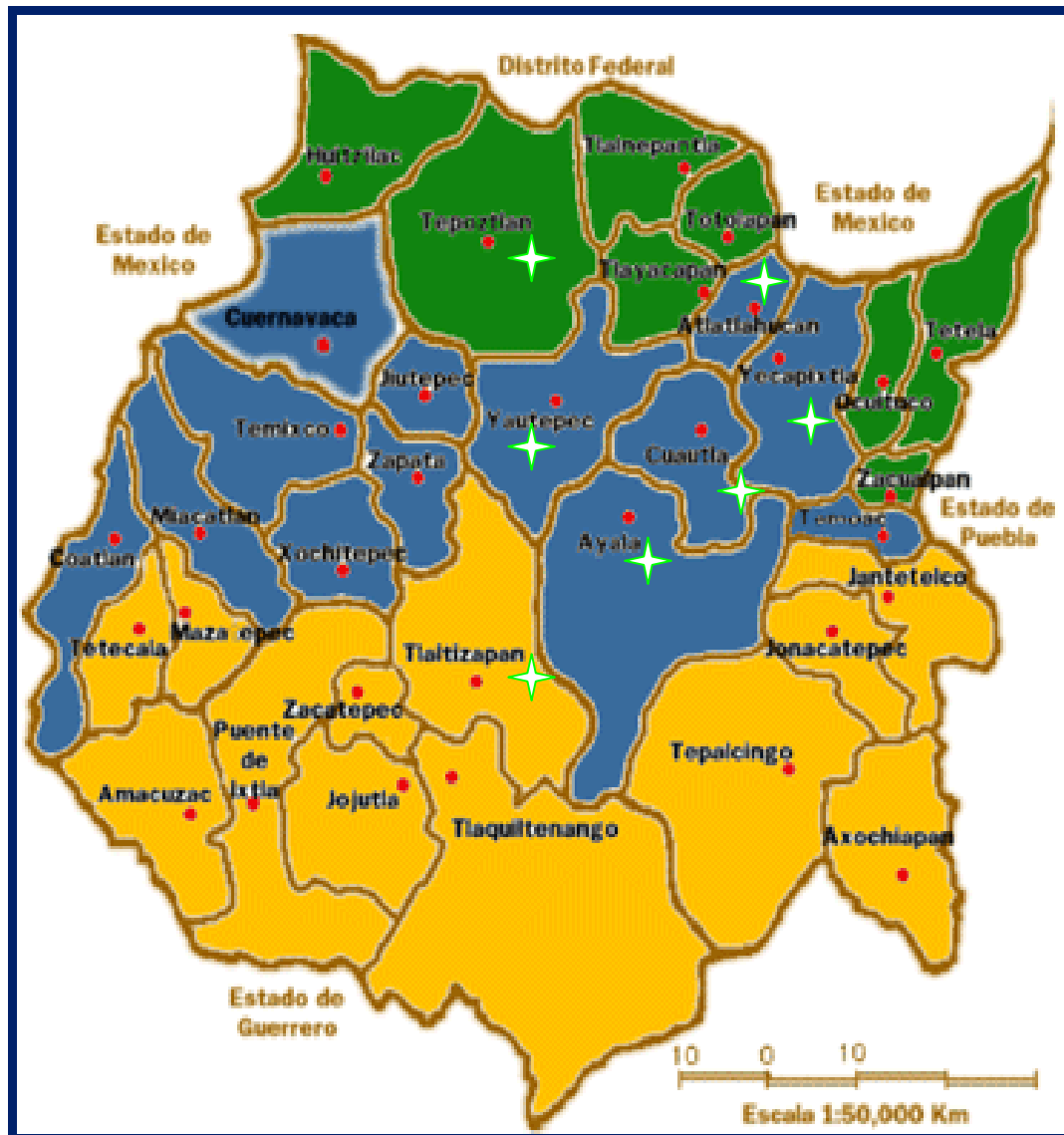


Figura 3. Localización de los pozos muestreados.

POZO	MUNICIPIO	ALTITUD (m.s.n.m)	PROFUNDIDAD (m)	OBSERVACIONES
Panteón	Tepoztlán	1643	150	Se encuentra a un costado de una tabiguera y de un panteón.
El Zarco	Yautepec	1261	150	Se encuentra entre un sembradío de caña de azúcar y casas.
Manantial Santa Isabel	Tlatizapan	960	brotante	Es un balneario.
Tenextepango	Ayala	1134	150	Esta frente a un cultivo de cebolla y maíz.
Anenecuilco	Ayala	1227	150	Esta rodeado por un cultivo de caña de azúcar.
El Calvario	Cuautla	1308	105	Es un predio en zona urbana.
Iztaccíhuatl	Cuautla	1369	150	Hay casas alrededor.
Yecapixtla	Yecapixtla	1564	220	Se encuentra rodeado por cultivos de maíz.
Km 88	Atlatlahucan	1575	250	Está a la orilla de la carretera y rodeada de pastizales.

Tabla 1. Localización y observaciones de los pozos muestreados.



Fotografía 1. Pozo Panteón



Fotografía 2. Pozo El Zarco



Fotografía 3. Manantial Santa Isabel



Fotografía 4. Pozo Tenextepango



Fotografía 5. Pozo Anenecuilco



Fotografía 6. Pozo El Calvario



Fotografía 7. Pozo Iztaccíhuatl



Fotografía 8. Pozo Yecapixtla



Fotografía 9. Pozo Km 88

MATERIAL Y MÉTODOS.

I. Trabajo de Campo.

Se realizaron 12 muestreos, uno por mes, llevados a cabo en 9 pozos del acuífero de Cuautla Morelos, del mes de Marzo del 2008 a Febrero del 2009. Para la determinación de las amibas de vida libre, se recolectaron 1000 ml de agua subterránea en envases esterilizados y se transportaron al laboratorio de Microbiología Acuática en la UIICSE a temperatura ambiente para evitar cambios en la estructura de las amibas. Los pozos muestreados se encuentran en uso para consumo de agua potable, por lo que están entubados, las muestras se tomaron de la válvula que está antes de la cloración.

En el sitio se midieron los siguientes parámetros fisicoquímicos: pH (potenciómetro HANNA Instruments HI 8314), Oxígeno disuelto y temperatura (Oxímetro YSI. Mod. 51-b)

II. Trabajo de laboratorio.

Aislamiento y cultivo de AVL.

Las muestras de 1000 ml se filtraron a través de membranas Millipore de 3.0 µm de poro en condiciones estériles. Las membranas se colocaron hacia abajo en placas de medio agar no nutritivo con bacterias *Enterobacter aerogenes* (NNE) para el aislamiento de las amibas (Limón, 2007). Las placas se incubaron a 30 °C y se revisaron después de ocho días para detectar el crecimiento amebiano, usando un microscopio invertido marca Zeiss.

La identificación de las amebas se realizó tomando en cuenta sus características morfológicas tanto trófica como quística, observando las preparaciones al microscopio de contraste de fases marca Zeiss, a 400 × y 1000 ×, y siguiendo las claves taxonómicas de Page (1988).

Prueba de tolerancia a la temperatura.

De las cajas que tuvieron presencia de amebas a 30 °C, se realizó un resembrado por duplicado las cuales se incubaron a 37 °C y a 42 °C por 48 horas para observar el desarrollo de amebas. La identificación de las amebas se realizó de la misma manera que a 30 °C tomando en cuenta sus características morfológicas tróficas y quísticas, observando las preparaciones al microscopio de contraste de fases a 400 X y 1000 X y siguiendo las claves taxonómicas de Page (1988).

Análisis estadístico.

Para relacionar los parámetros fisicoquímicos (pH, O.D., y Temperatura °C) con la presencia de las amebas se utilizó el análisis de Coeficiente de Correlación Lineal Producto-Momento de Pearson, el cual proporciona una medida de la asociación lineal entre las variables, los valores de la correlación están entre -1 y +1. Si las variables están perfectamente asociadas, entonces el coeficiente de correlación será de 1 ó -1, si por el contrario, las variables no están asociadas, entonces el coeficiente tendrá un valor cercano a cero (Durán *et al.*, 2003).

La tabla 2 servirá como una guía general para dar una interpretación de la magnitud del coeficiente de correlación (Durán *et al.*, 2003).

Valor absoluto de R	Grado de Asociación
0.8-1.0	Fuerte
0.5-0.8	Moderada
0.2-0.5	Débil
0-0.2	Insignificante

Tabla 2. Factor de correlación.

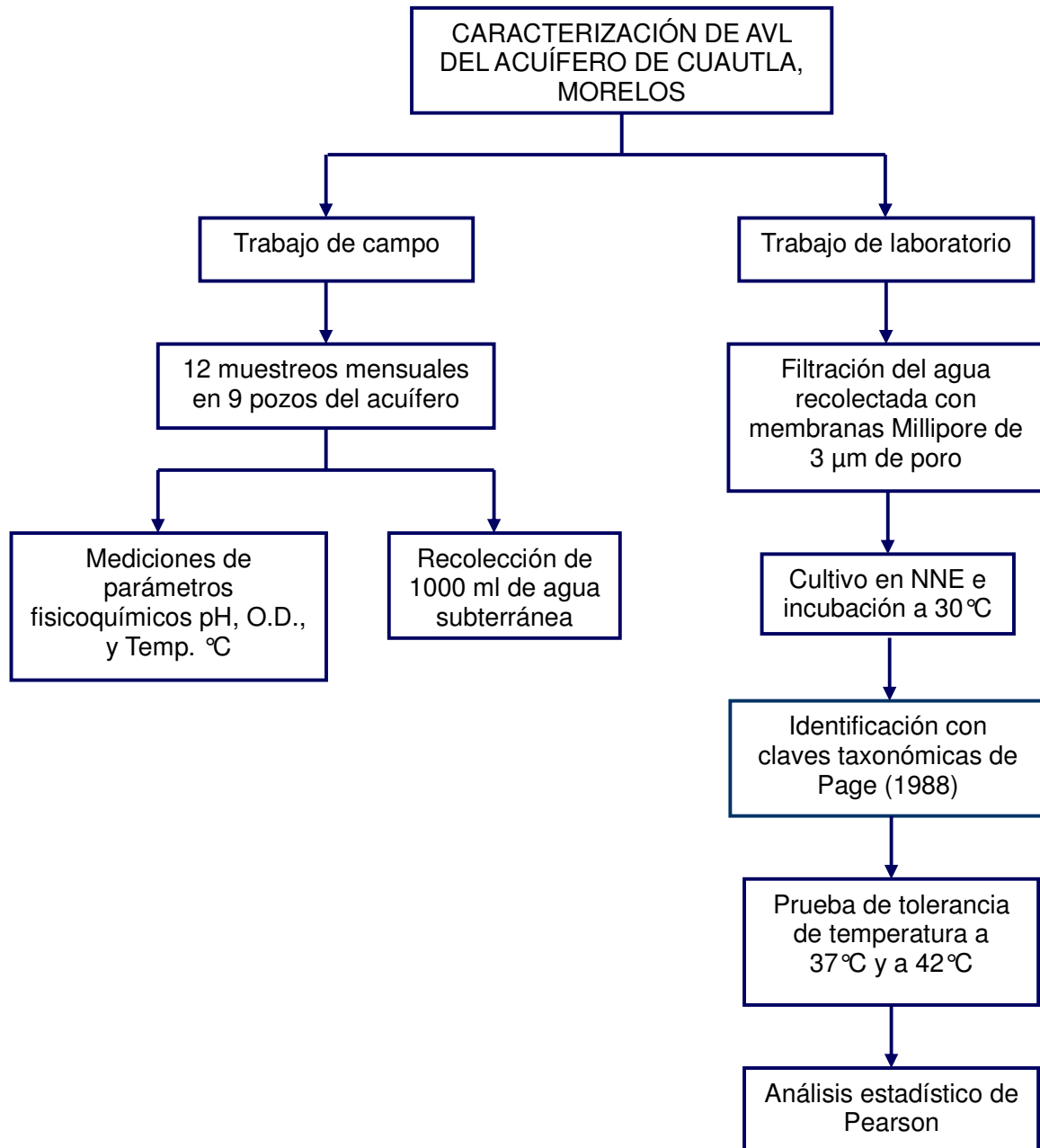


Figura 4. Diagrama de flujo del método empleado para la caracterización de las AVL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Presencia de AVL

En la tabla 3 se puede observar la presencia de amibas de vida libre en los 9 sitios de estudio, el pozo el Zarco tuvo presencia de AVL durante los doce meses del muestreo, seguidos de éste, los pozos el Calvario, Panteón e Iztaccíhuatl consecutivamente fueron los que mayor presencia de amibas tuvieron, contrario a los pozos Anenecuilco y Yecapixtla, que de los doce meses solo tuvieron presencia en 5.

Diciembre fue el único mes que tuvo presencia de amibas en todos los pozos, en los otros meses de 1 a 3 pozos tuvieron ausencia de amibas.

Pozos	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb
Panteón	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
El Zarco	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manantial Santa Isabel	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Tenextepango	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
Anenecuilco	nm	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
El calvario	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Iztaccíhuatl	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Yecapixtla	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	nm	+
Km 88	-	+	+	+	+	nm	+	+	+	+	nm	+

+: presencia, -: ausencia, nm: no muestreado.

Tabla 3. Presencia de AVL en los 9 pozos del acuífero de Cuautla, Morelos.

Riqueza específica total

La tabla 4 nos muestra las 29 especies pertenecientes a los 16 géneros diferentes detectados en el acuífero de Cuautla, Morelos en el periodo estudiado.

El número de géneros y especies encontrados fue mucho mayor a los reportados por Campos (2007), Limón (2007) y Beltrán (2008) en acuíferos del estado de Morelos. Pero similar a lo reportado en el acuífero del Valle del Mezquital (32 especies) por Ramírez y colaboradores (2001); aunque con la diferencia de que la mitad de las especies aisladas en el Mezquital pertenecieron al género *Acanthamoeba*. Éste acuífero que se caracteriza por la extensa contaminación orgánica debido al uso de aguas residuales para la irrigación.

De las *Acanthamoebas* encontradas *A. castellanii* ha sido reportada como patógena en infecciones humanas del Sistema Nervioso Central, ojos, pulmones, próstata, hueso, músculo, seno nasal y piel; mientras que *A. polyphaga* ha sido detectada solamente como patógena en infecciones oculares (John, 1993).

Por su carácter labil y la temperatura de crecimiento (30°C y 37°C) las amibas aisladas del género *Naegleria*, probablemente pertenecieron a la especie *N. gruberi*, que no ha sido reportada como patógena.

SUPER GRUPO	1ª CLASE	GÉNERO	ESPECIE
Amoebozoa	Acanthamoebidae	<i>Acanthamoeba</i>	<i>castellanii</i>
			<i>lenticulata</i>
			<i>polyphaga</i>
Amoebozoa	Flabellinea	<i>Cochliopodium</i>	<i>bilimbosum</i>
Amoebozoa	Tubulinea	<i>Echinamoeba</i>	<i>exundans</i>
			<i>silvestris</i>
Amoebozoa		<i>Filamoeba</i>	<i>nolandi</i>
Excavata	Heteroloboseae	<i>Guttulinopsis</i>	<i>nivea</i>
Amoebozoa	Tubulinea	<i>Hartmannella</i>	<i>cantabrigiensis</i>
			<i>vermiformis</i>
Amoebozoa	Flabellinea	<i>Mayorella</i>	<i>microeruca</i>
			<i>vespertilioides</i>
Excavata	Heteroloboseae	<i>Naegleria</i>	<i>sp</i>
Excavata	Heteroloboseae	<i>Rosculus</i>	<i>ithacus</i>
Amoebozoa	Flabellinea	<i>Thecamoeba</i>	<i>corrugata</i>
			<i>quadrilineata</i>
			<i>striata</i>
Amoebozoa	Flabellinea	<i>Platyamoeba</i>	<i>placida</i>
			<i>stenopodia</i>
Amoebozoa	Tubulinea	<i>Saccamoeba</i>	<i>stagnicola</i>
Excavata	Heteroloboseae	<i>Vahlkampfia</i>	<i>aberdonica</i>
			<i>avara</i>
			<i>inornata</i>
Amoebozoa	Flabellinea	<i>Vannella</i>	<i>lata</i>
			<i>miroides</i>
			<i>platypodia</i>
			<i>simplex</i>
Amoebozoa	Flabellinea	<i>Vexillifera</i>	<i>bacillipedes</i>
Excavata	Heteroloboseae	<i>Willaertia</i>	<i>magna</i>

Tabla 4. Riqueza específica de amibas encontradas en el acuífero de Cuautla, Morelos (Clasificación taxonómica según Adl *et al.* 2005).

Riqueza específica por pozo

Las tablas 5, 6 y 7, nos muestran la riqueza específica de cada pozo muestreado en los 12 meses del muestreo, el manantial Santa Isabel y el pozo Iztacihualt tuvieron la mayor riqueza específica con 14 especies cada uno, la riqueza específica más baja con solo cuatro especies la tuvieron los pozos Anenecuilco, Yecapixtla y Km 88.

Pozos	Marzo	Abril	Mayo	Junio
Panteón	<i>H. vermiformis</i> <i>Naegleria sp.</i> <i>V. lata</i>	<i>H. vermiformis</i>	<i>H. vermiformis</i> <i>P. placida</i>	sc
El Zarco	<i>H. vermiformis</i> <i>E. silvestris</i> <i>T. corrugata</i>	<i>H. vermiformis</i>	<i>H. vermiformis</i>	<i>H. vermiformis</i>
Manantial Santa Isabel	<i>H. vermiformis</i> <i>Naegleria sp</i> <i>V. miroides</i>	<i>A. polyphaga</i> <i>H. vermiformis</i>	<i>H. vermiformis</i> <i>Naegleria sp</i> <i>S. stagnicola</i>	<i>Naegleria sp</i> <i>R. ithacus</i>
Tenextepango	<i>H. vermiformis</i>	sc	<i>H. vermiformis</i>	<i>H. vermiformis</i>
Anenecuilco	nm	sc	sc	<i>H. vermiformis</i>
El calvario	<i>H. vermiformis</i>	<i>H. vermiformis</i>	<i>H. vermiformis</i> <i>Naegleria sp</i>	<i>H. vermiformis</i> <i>V. aberdonica</i>
Iztaccíhuatl	<i>T. corrugata</i> <i>V. bacillipedes</i>	<i>H. vermiformis</i> <i>V. inornata</i>	<i>H. vermiformis</i>	<i>H. vermiformis</i> <i>Naegleria sp</i>
Yecapixtla	sc	nm	<i>H. vermiformis</i>	sc
Km 88	sc	<i>H. vermiformis</i>	<i>H. vermiformis</i>	<i>H. vermiformis</i>

sc: sin crecimiento, nm: no muestreado.

Tabla 5. Riqueza específica de los pozos de Marzo a Junio del 2008.

Pozos	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
Panteón	<i>H. vermiformis</i>	<i>Naegleria sp</i> <i>V. bacillipedes</i> <i>W. magna</i>	<i>H. vermiformis</i>	<i>M. microeruca</i>
El Zarco	<i>H. vermiformis</i>	<i>H. vermiformis</i>	<i>H. vermiformis</i>	<i>H. vermiformis</i> <i>M. microeruca</i> <i>T. striata</i> <i>V. bacillipedes</i>
Manantial Santa Isabel	<i>A. lenticulata</i> <i>A. polyphaga</i> <i>V. simplex</i>	sc	sc	sc
Tenextepango	sc	sc	<i>H. vermiformis</i>	<i>H. vermiformis</i>
Anenecuilco	sc	<i>H. vermiformis</i>	<i>H. vermiformis</i>	sc
El calvario	<i>H. vermiformis</i>	<i>H. vermiformis</i>	sc	<i>T. striata</i>
Iztaccíhuatl	<i>F. nolandi</i>	<i>H. vermiformis</i> <i>P. stenopodia</i> <i>V. bacillipedes</i>	<i>C. bilimbosum</i> <i>H. vermiformis</i> <i>P. placida</i> <i>T. striata</i> <i>V. lata</i> <i>V. miroides</i>	sc
Yecapixtla	<i>H. vermiformis</i>	sc	sc	<i>V. avara</i>
Km 88	<i>H. vermiformis</i>	nm	<i>H. vermiformis</i>	<i>H. vermiformis</i>

sc: sin crecimiento, nm: no muestreado.

Tabla 6. Riqueza específica de los pozos de Julio a Octubre del 2008.

Pozos	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero
Panteón	<i>F. nolandi</i> <i>Naegleria sp</i> <i>V. bacillipedes</i>	<i>G. nivea</i> <i>V. bacillipedes</i>	<i>H. vermiformis</i> <i>T.</i> <i>quadrilineata</i>	sc
El Zarco	<i>H. vermiformis</i> <i>V. platypodia</i>	<i>H.</i> <i>cantabrigiensis</i> <i>M. microeruca</i> <i>Naegleria sp</i>	<i>H. vermiformis</i>	<i>G. nivea</i> <i>H. vermiformis</i> <i>R. ithacus</i> <i>V. bacillipedes</i>
Manantial Santa Isabel	<i>H.</i> <i>cantabrigiensis</i> <i>H. vermiformis</i>	<i>A. castellanii</i> <i>T. corrugata</i>	<i>G. nivea</i> <i>M.</i> <i>vespertilioides</i>	<i>V. platypodia</i> <i>R. ithacus</i>
Tenextepango	<i>H.</i> <i>cantabrigiensis</i>	<i>G. nivea</i> <i>H.</i> <i>cantabrigiensis</i> <i>H. vermiformis</i>	<i>G. nivea</i> <i>H. vermiformis</i> <i>M. microeruca</i> <i>R. ithacus</i> <i>V. platypodia</i>	sc
Anenecuilco	sc	<i>G. nivea</i> <i>R. ithacus</i> <i>V. bacillipedes</i>	<i>H. vermiformis</i>	sc
El calvario	<i>H. vermiformis</i>	<i>H.</i> <i>cantabrigiensis</i> <i>H. vermiformis</i>	<i>H.</i> <i>cantabrigiensis</i> <i>H.</i> <i>vermiformes</i>	<i>E. exundans</i> <i>H. vermiformis</i>
Iztaccíhuatl	<i>T. striata</i>	<i>H.</i> <i>cantabrigiensis</i>	sc	<i>H. vermiformis</i> <i>V. bacillipedes</i>
Yecapixtla	<i>H. vermiformis</i>	<i>H. vermiformis</i>	nm	<i>H.</i> <i>cantabrigiensis</i> <i>H. vermiformis</i> <i>M. microeruca</i>
Km 88	sc	<i>H. vermiformis</i> <i>V. bacillipedes</i>	nm	<i>Naegleria sp</i> <i>P. placida</i>

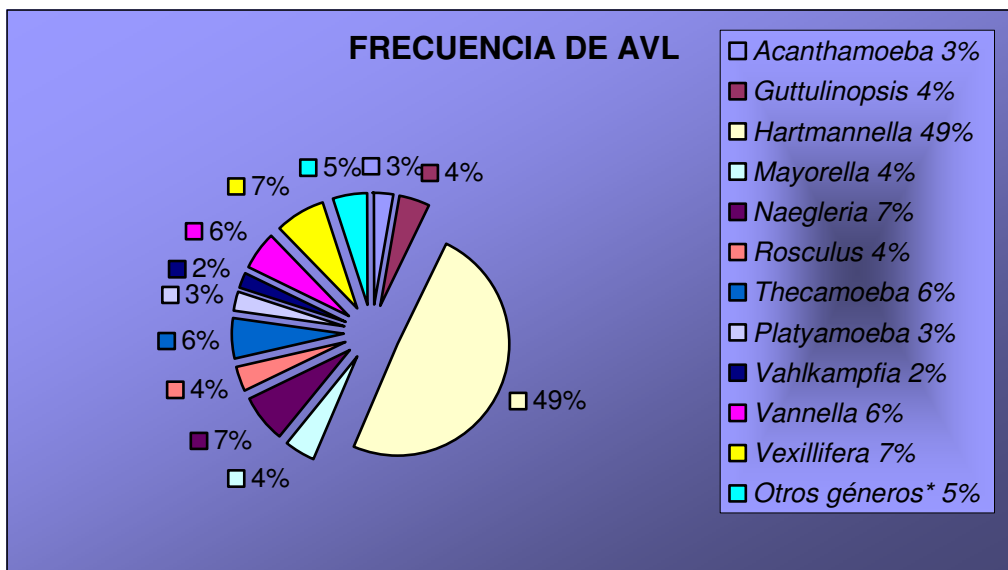
sc: sin crecimiento, nm: no muestreado.

Tabla 7. Riqueza específica de los pozos de Noviembre del 2008 a Febrero del 2009.

Frecuencia de géneros

En el gráfico 1 se presenta la frecuencia de aparición de los géneros de amebas encontradas en los 9 pozos muestreados, en donde se observa que *Hartmannella* presentó la mayor frecuencia (49%), coincidiendo con lo reportado por Campos (2007), Limón (2007) y Beltrán (2008) en otros acuíferos del estado de Morelos, esto, probablemente se debe a la cercanía que existe entre los acuíferos por lo que las condiciones físico-químicas son muy parecidas y por lo tanto también los microorganismos que habitan en ellos.

La frecuencia de aparición de los demás géneros fue menor al 8%, siendo los más bajos *Cochliopodium* con 0.7%, *Saccamoeba* con 0.7%, *Willaertia* con 0.7%, *Echinamoeba* con 1.4% y *Filamoeba* con 1.4%.



*Otros géneros: *Cochliopodium* 0.7%, *Echinamoeba* 1.4%, *Filamoeba* 1.4%, *Saccamoeba* 0.7% y *Willaertia* 0.7%.

Gráfico 1. Frecuencia de los géneros de AVL.

Los géneros *Acanthamoeba*, *Cochliopodium*, *Echinamoeba*, *Filamoeba*, *Guttulinopsis*, *Hartmannella*, *Mayorella*, *Naegleria*, *Platyamoeba*, *Rosculus*, *Thecamoeba*, *Vahlkampfia*, *Vannella* y *Vexillifera*, detectados en el acuífero de Cuautla, también fueron reportados en los trabajos realizados por Beltrán (2008), Campos (2007), Novarino *et al.* (1997), Limón (2007) y Ramírez *et al.* (2006).

De los géneros encontrados *Hartmannella*, *Vahlkampfia* y *Vannella* han sido asociadas a casos de meningoencefalitis y queratitis, pero no se ha comprobado su patogenicidad (Aitken *et al.*, 1996, Centeno *et al.*, 1996, Dua *et al.*, 1998, Inoue *et al.*, 1998, Lorenzo-Morales *et al.*, 2007, Michel *et al.*, 2000, Scheid, 2007 y Solarte *et al.*, 2006).

De los géneros reportados como patógenos, se detecto *Acanthamoeba*, pero en porcentajes muy bajos debido probablemente a que las temperaturas registradas en el acuífero (16.76°C en promedio) fueron muy bajas para permitir su crecimiento.

Distribución temporal

En general, se observó una distribución temporal variable de las amebas en el manantial y en cada uno de los pozos estudiados. Asimismo, no se observaron variaciones temporales similares entre ellos (gráficos 2 a 10).

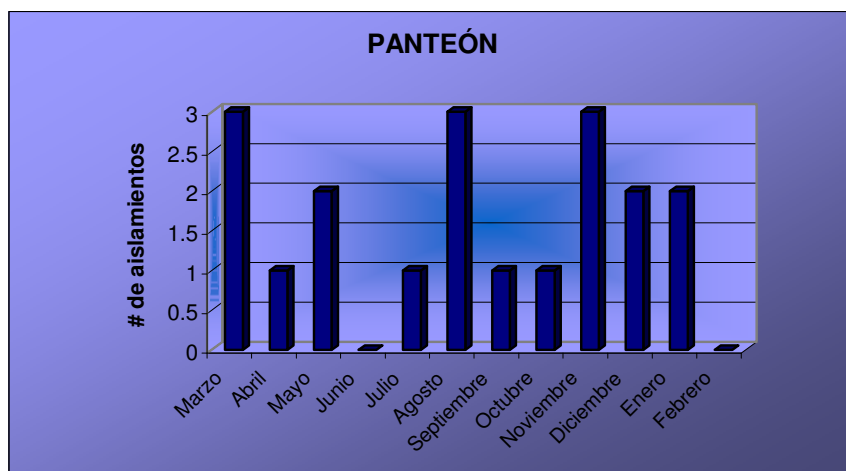


Gráfico 2. Distribución temporal de AVL en el pozo Panteón.

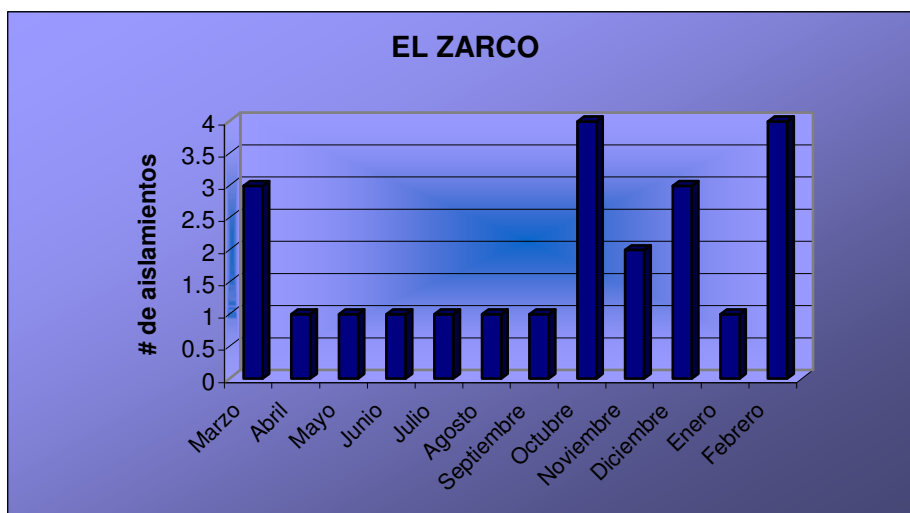


Gráfico 3. Distribución temporal de AVL en el pozo El Zarco.

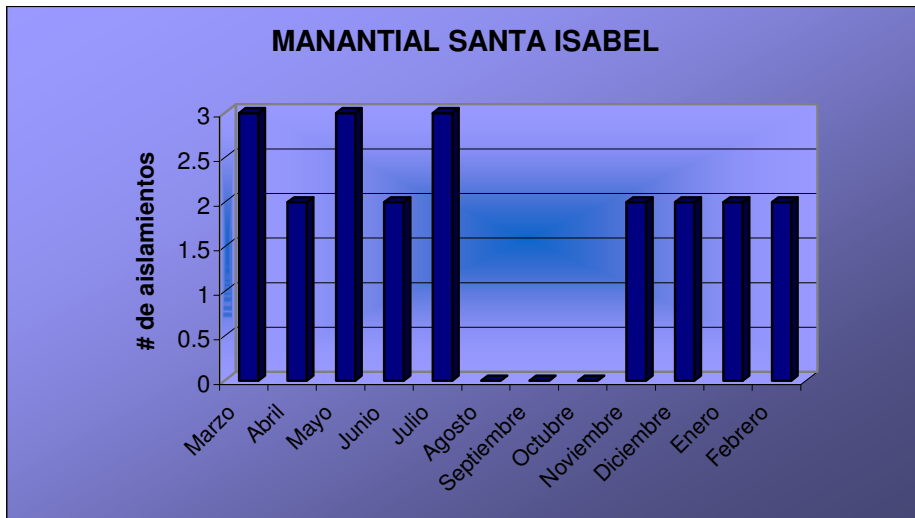


Gráfico 4. Distribución temporal de AVL en el Manantial Santa Isabel.

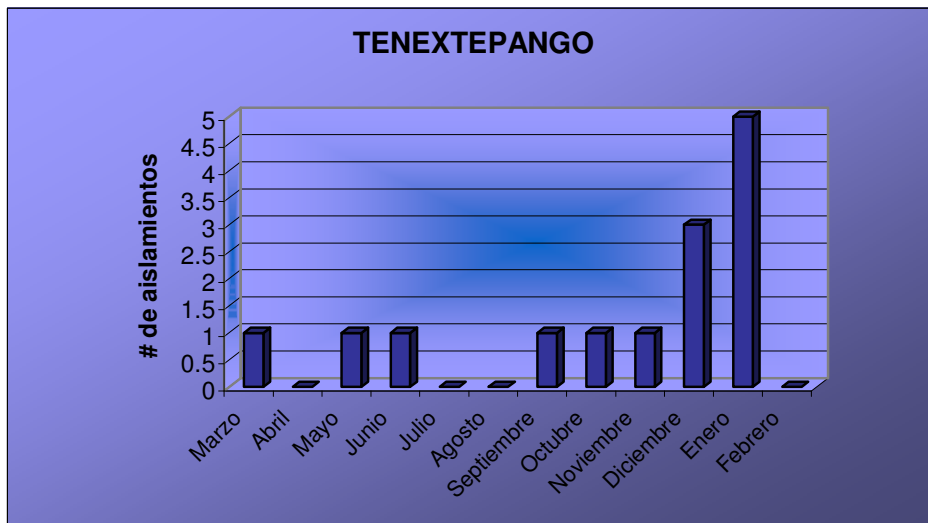


Gráfico 5. Distribución temporal de AVL en el pozo Tenextepango.

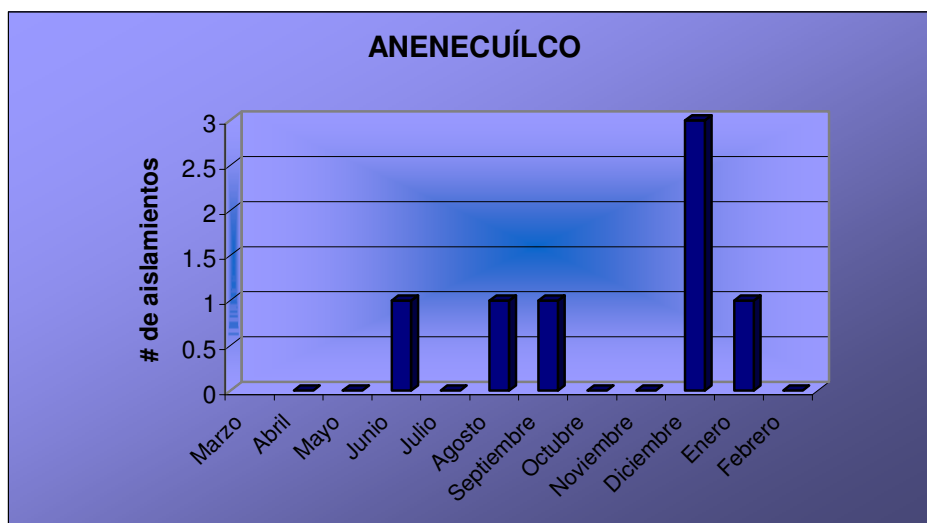


Gráfico 6. Distribución temporal de AVL en el pozo Anenecuilco. En Marzo no hubo muestreo.

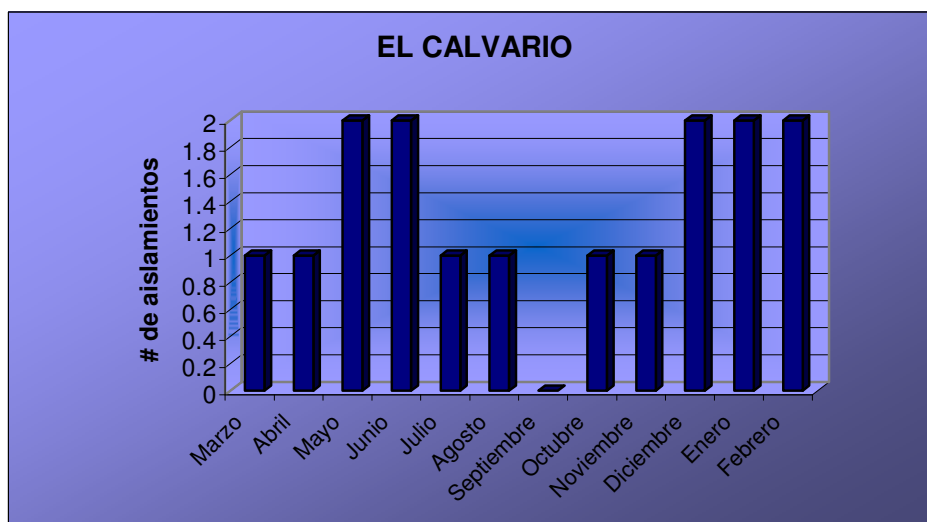


Gráfico 7. Distribución temporal de AVL en el pozo El Calvario.

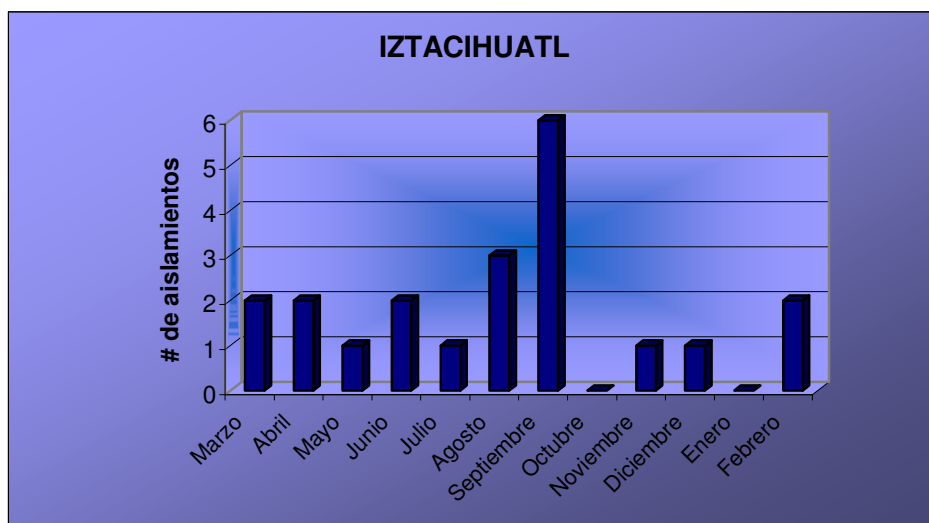


Gráfico 8. Distribución temporal de AVL en el pozo Iztaccíhuatl.

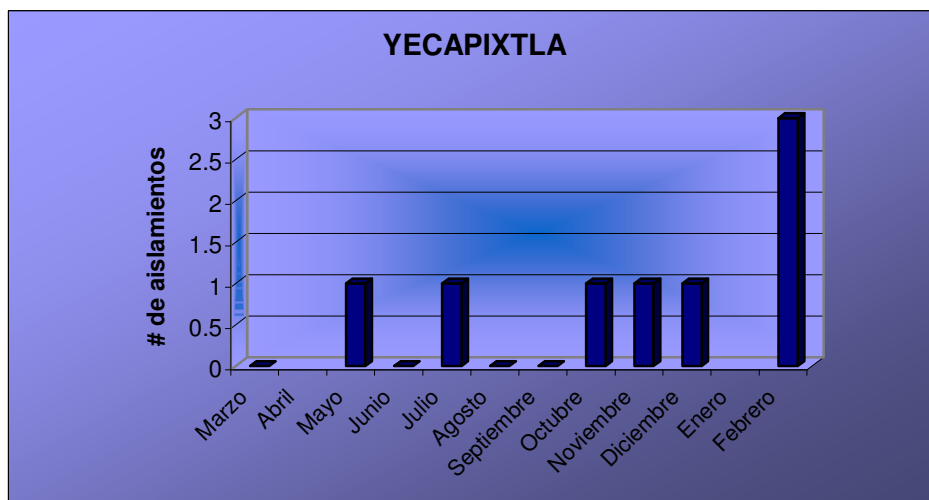


Gráfico 9. Distribución temporal de AVL en el pozo Yecapixtla. En Abril y Enero no hubo muestreo.

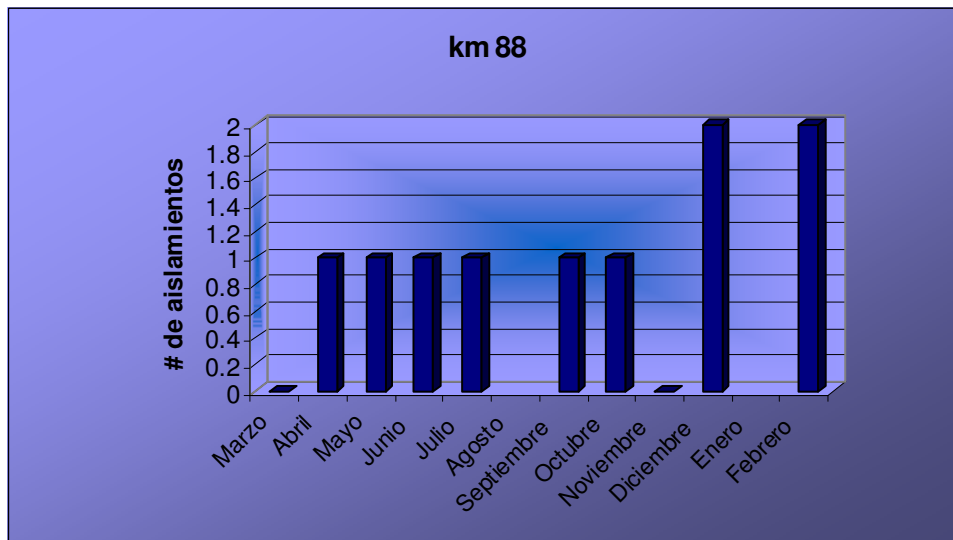


Gráfico 10. Distribución temporal de AVL en el pozo Km 88. En Agosto y Enero no hubo muestreo.

En cambio cuando se observó la distribución temporal total de todos los pozos durante el período de muestreo, los números más altos de aislamientos se dieron en diciembre y febrero que corresponden a meses fríos (gráfico 11). Éste comportamiento también se manifestó en el trabajo realizado por Limón (2007), en donde se realizaron más aislamientos en el mes de diciembre, contrario a Campos (2007) en donde en el manantial Las Fuentes la temperatura alta de los meses calurosos favoreció el crecimiento de las AVL aumentando los aislamientos en mayo, junio y julio, y decreciendo hacia los meses templados y fríos, lo que probablemente se deba a que el manantial está directamente influenciado por los cambios climáticos estacionales al estar en contacto directo con la atmósfera, lo que no ocurre en el agua subterránea.

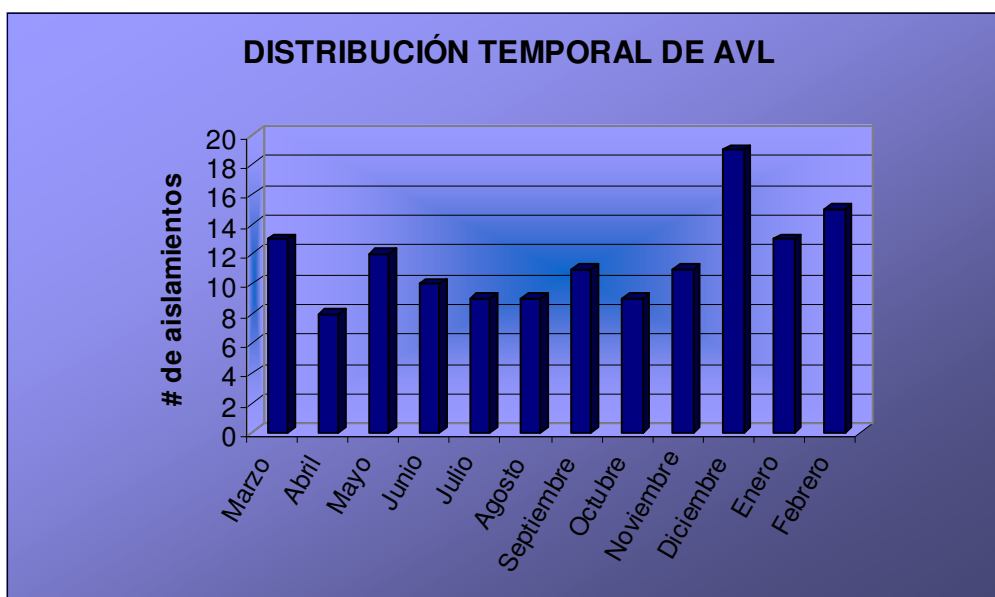


Gráfico 11. Distribución temporal global de AVL de todos los pozos muestreados.

Distribución espacial

La distribución espacial fue muy variable, siendo diferentes pozos los que presentaron mayor o menor número de aislamientos a lo largo de los doce meses de muestreo (Tabla 8).

Pozos	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb
Panteón	3	1	2	0	1	3	1	1	3	2	2	0
El Zarco	3	1	1	1	1	1	1	4	2	3	1	4
Manantial Santa Isabel	3	2	3	2	3	0	0	0	2	2	2	2
Tenextepango	1	0	1	1	0	0	1	1	1	3	5	0
Anenecuilco	nm	0	0	1	0	1	1	0	0	3	1	0
El calvario	1	1	2	2	1	1	0	1	1	2	2	2
Iztaccíhuatl	2	2	1	2	1	3	6	0	1	1	0	2
Yecapixtla	0	nm	1	0	1	0	0	1	1	1	nm	3
Km 88	0	1	1	1	1	nm	1	1	0	2	nm	2

nm: pozo no muestreado.

Tabla 8. Distribución espacial de AVL durante los 12 meses muestreados.

Al obtener el número total de aislamientos por lugar, se observó que en el Zarco se registró el mayor número, seguido por el manantial Santa Isabel y el pozo Iztaccíhuatl; mientras que en los pozos Anenecuílco y Yecapixtla se registraron los números más bajos (gráfico 12). Esto probablemente se deba a que en las localidades donde se encuentran los pozos del Zarco e Iztaccíhuatl, el sistema de drenaje es muy deficiente o inexistente lo que puede constituir una fuente de contaminación orgánica a través de la filtración de agua de desecho hacia el agua subterránea favoreciendo la presencia de bacterias y amibas. En cuanto al manantial al estar localizado en una zona abierta, las amibas se benefician directamente con el aumento de temperatura y la materia transportada a través del viento.

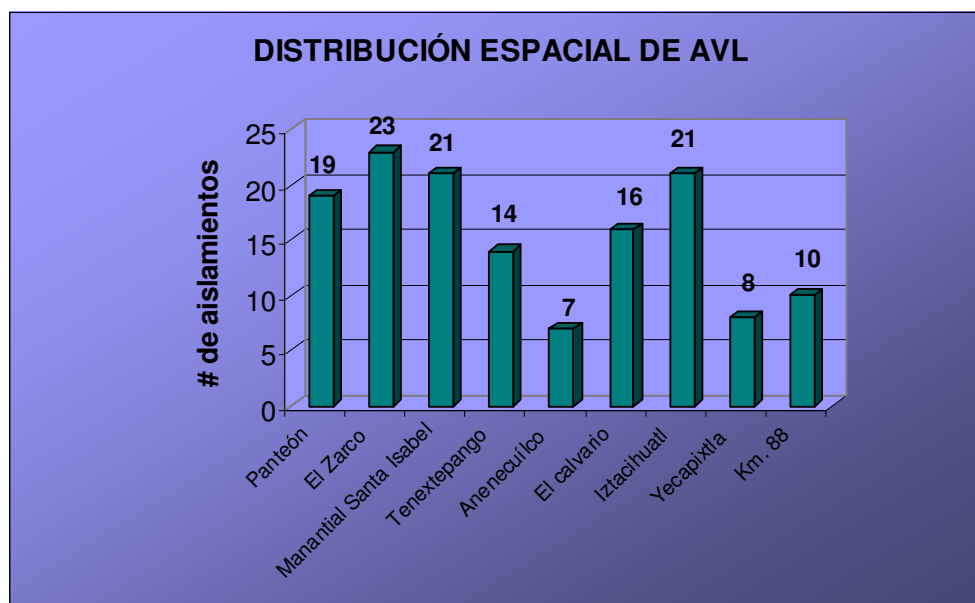


Gráfico 12. Distribución espacial de AVL en los 9 sitios de estudio.

Prueba de tolerancia a la temperatura

Hartmannella vermiformis fue la amiba que presentó mayor termotolerancia ya que además de crecer a 30 °C que fue la temperatura original, siempre creció a 37 °C y casi siempre a 42 °C (tablas 9 a 12).

De las *Acanthamoebas* encontradas que tienen antecedentes de patogenicidad *Acanthamoeba polyphaga* no creció a 42 °C, contrario a *Acanthamoeba castellanii* que si creció a las 3 temperaturas de incubación, esto hay que tomarlo con reserva, porque se sabe que todas las amibas que han sido patógenas son termófilas, pero no todas las termófilas son patógenas.

Naegleria muy pocas veces creció a temperaturas de 37 °C y nunca se desarrollo a temperaturas de 42 °C, probablemente debido a su carácter lábil se trate de *N. gruberi* que no ha sido reportada como patógena (Schuster y Visvesvara, 2004).

Pozos	Marzo			Abril			Mayo		
	30 °C	37 °C	42 °C	30 °C	37 °C	42 °C	30 °C	37 °C	42 °C
Panteón	<i>H. vermiformis</i> <i>Naegleria sp.</i> <i>V. lata</i>	+ + +	+ -- --	<i>H. vermiformis</i>	+ 	+ 	<i>H. vermiformis</i> <i>P. placida</i>	+ --	+ --
El Zarco	<i>H. vermiformis</i> <i>E. silvestris</i> <i>T. corrugata</i>	+ + --	+ -- --	<i>H. vermiformis</i>	+ 	+ 	<i>H. vermiformis</i>	+ 	+
Manantial Santa Isabel	<i>H. vermiformis</i> <i>Naegleria sp</i> <i>V. miroides</i>	+ + +	+ -- --	<i>A. polyphaga</i> <i>H. vermiformis</i>	+ +	-- +	<i>H. vermiformis</i> <i>Naegleria sp</i> <i>S. stagnicola</i>	+ + --	+ -- --
Tenextepango	<i>H. vermiformis</i>	+ 	+ 	--	 	 	<i>H. vermiformis</i>	+ 	+
Anenecuilco	nm	 	 	--	 	 	--	 	
El calvario	<i>H. vermiformis</i>	+ 	+ 	<i>H. vermiformis</i>	+ 	+ 	<i>H. vermiformis</i> <i>Naegleria sp</i>	+ +	+ --
Iztaccíhuatl	<i>T. corrugata</i> <i>V. bacillipedes</i>	-- --	-- --	<i>H. vermiformis</i> <i>V. inornata</i>	+ --	+ --	<i>H. vermiformis</i>	+ 	+
Yecapixtla	--	 	 	--	 	 	<i>H. vermiformis</i>	+ 	+
Km 88	--	 	 	<i>H. vermiformis</i>	+ 	+ 	<i>H. vermiformis</i>	+ 	+

+ crecimiento, -- ausencia, nm: sitio no muestreado.

Tabla 9. Prueba de temperatura. Marzo a Mayo del 2007.

Pozos	Junio			Julio			Agosto		
	30°C	37°C	42°C	30°C	37°C	42°C	30°C	37°C	42°C
Panteón	--			<i>H. vermiformis</i>	+	+	<i>Naegleria sp</i> <i>V. bacillipedes</i> <i>W. magna</i>	-- + --	-- -- --
El Zarco	<i>H. vermiformis</i>	+	+	<i>H. vermiformis</i>	+	+	<i>H. vermiformis</i>	+	+
Manantial Santa Isabel	<i>Naegleria sp</i> <i>R. ithacus</i>	+ --	-- --	<i>A. lenticulata</i> <i>A. polyphaga</i> <i>V. simplex</i>	+ + +	-- -- --	--		
Tenextepango	<i>H. vermiformis</i>	+	+	--			--		
Anenecuilco	<i>H. vermiformis</i>	+	+	--			<i>H. vermiformis</i>	+	+
El calvario	<i>H. vermiformis</i> <i>V. aberdonica</i>	+ --	+ --	<i>H. vermiformis</i>	+	+	<i>H. vermiformis</i>	+	+
Iztaccíhuatl	<i>H. vermiformis</i> <i>Naegleria sp</i>	+ +	+ --	<i>F. nolandi</i>	--	--	<i>H. vermiformis</i> <i>P. stenopodia</i> <i>V. bacillipedes</i>	+ -- --	+ -- --
Yecapixtla	--			<i>H. vermiformis</i>	+	+	--		
Km 88	<i>H. vermiformis</i>	+	+	<i>H. vermiformis</i>	+	+	nm		

+ crecimiento, -- ausencia, nm: sitio no muestreado.

Tabla 10. Prueba de temperatura. Junio a Agosto del 2007.

Pozos	Septiembre			Octubre			Noviembre		
	30°C	37°C	42°C	30°C	37°C	42°C	30°C	37°C	42°C
Panteón	<i>H. vermiformis</i>	+	--	<i>M. microeruca</i>	+	+	<i>F. nolandi</i> <i>Naegleria sp</i> <i>V. bacillipedes</i>	--	--
El Zarco	<i>H. vermiformis</i>	+	--	<i>H. vermiformis</i> <i>M. microeruca</i> <i>T. striata</i> <i>V. bacillipedes</i>	+ + + --	+ -- -- --	<i>H. vermiformis</i> <i>V. platypodia</i>	+ --	+ --
Manantial Santa Isabel	--			--	--	--	<i>H. cantabrigiensis</i> <i>H. vermiformis</i>	+ +	+ +
Tenextepango	<i>H. vermiformis</i>	+	+	<i>H. vermiformis</i>	+	+	<i>H. cantabrigiensis</i>	+	+
Anenecuilco	<i>H. vermiformis</i>	+	+	--			--	--	--
El calvario	--			<i>T. striata</i>	+	--	<i>H. vermiformis</i>	+	+
Iztaccíhuatl	<i>C. bilimbosum</i> <i>H. vermiformis</i> <i>P. placida</i> <i>T. striata</i> <i>V. lata</i> <i>V. miroides</i>	-- -- -- -- + +	-- -- -- -- -- --	--			<i>T. striata</i>	--	--
Yecapixtla	--			<i>V. avara</i>	--	--	<i>H. vermiformis</i>	+	+
Km 88	<i>H. vermiformis</i>	+	--	<i>H. vermiformis</i>	+	+	--		

+ crecimiento, -- ausencia,

Tabla 11. Prueba de temperatura. Septiembre a Noviembre del 2007.

Pozos	Diciembre			Enero			Febrero		
	30°C	37°C	42°C	30°C	37°C	42°C	30°C	37°C	42°C
Panteón	<i>G. nivea</i> <i>V. bacillipedes</i>	+	--	<i>H. vermiformis</i> <i>T. quadrilineata</i>	+	--	--		
El Zarco	<i>H. cantabrigiensis</i> <i>M. microeruca</i> <i>Naegleria sp</i>	+	+	<i>H. vermiformis</i>	+	+	<i>G. nivea</i> <i>H. vermiformis</i> <i>R. ithacus</i> <i>V. bacillipedes</i>	--	--
Manantial Santa Isabel	<i>A. castellanii</i> <i>T. corrugata</i>	+	+	<i>G. nivea</i> <i>M. vespertilioides</i>	--	--	<i>V. platypodia</i> <i>R. ithacus</i>	+	--
Tenextepango	<i>G. nivea</i> <i>H. cantabrigiensis</i> <i>H. vermiformis</i>	+	+	<i>G. nivea</i> <i>H. vermiformis</i> <i>M. microeruca</i> <i>R. ithacus</i> <i>V. platypodia</i>	+	--	--		
Anenecuilco	<i>G. nivea</i> <i>R. ithacus</i> <i>V. bacillipedes</i>	+	+	<i>H. vermiformis</i>	+	+	--		
El calvario	<i>H. cantabrigiensis</i> <i>H. vermiformis</i>	+	+	<i>H. cantabrigiensis</i> <i>H. vermiformes</i>	+	+	<i>E. exundans</i> <i>H. vermiformis</i>	+	--
Iztaccíhuatl	<i>H. cantabrigiensis</i>	+	+	--			<i>H. vermiformis</i> <i>V. bacillipedes</i>	+	+
Yecapixtla	<i>H. vermiformis</i>	+	+	nm			<i>H. cantabrigiensis</i> <i>H. vermiformis</i> <i>M. microeruca</i>	+	+
Km 88	<i>H. vermiformis</i> <i>V. bacillipedes</i>	+	--	nm			<i>Naegleria sp</i> <i>P. placida</i>	+	--

+ crecimiento, -- ausencia, nm: sitio no muestreado.

Tabla 12. Prueba de temperatura. Diciembre del 2007 a Febrero del 2008.

Leiva y colaboradores en su trabajo publicado en el 2008, aseguran que las AVL que no son patógenas son incapaces de crecer a temperaturas de 37°C o más, sin embargo, en éste trabajo las AVL que no tienen antecedentes de patogenicidad, crecieron algunas veces a temperaturas de 37°C como *Echinamoeba silvestris*, *Thecamoeba striata* y *Vexillifera bacillipedes* (tablas 9 a 12), e incluso esporádicamente crecieron a temperaturas de hasta 42°C como *Mayorella microeruca*, *Guttulinopsis nivea* y *Rosculus ithacus* (tablas 11 y 12), lo que concuerda con la aseveración de que no todas las especies termófilas son patógenas (Schuster y Visvesvara, 2004).

Parámetros fisicoquímicos

En el gráfico 13 se observan los promedios de los parámetros fisicoquímicos tomados durante los doce meses del muestreo en el acuífero de Cuautla, Morelos.

La temperatura osciló entre 16°C y 28°C, lo que favoreció la presencia de amibas de vida libre no patógenas, aunque no fue impedimento para la presencia de algunas especies reportadas como patógenas, como *A. castellanii* y *A. polyphaga*.

El oxígeno disuelto tuvo una concentración mínima de 2.90 mg L⁻¹ y máxima de 8.00 mg L⁻¹, el pH tuvo un valor de entre 5.75 y 7.57, encontrándose entre ligeramente ácido y neutro. Tanto el Oxígeno Disuelto como el pH, se encontraron en condiciones favorables para la presencia de las AVL (Bonilla *et al.*, 2004).

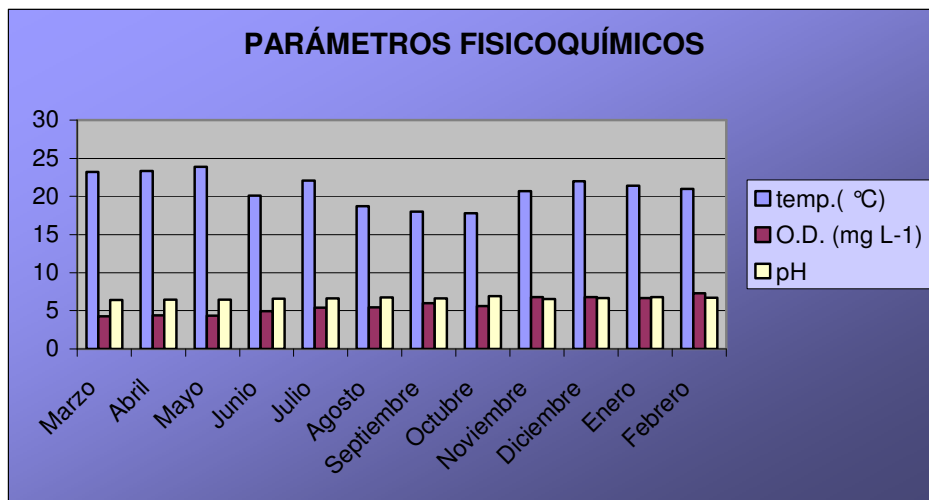


Gráfico 13. Promedio de los parámetros fisicoquímicos durante el periodo de muestreo.

El gráfico 14 nos muestra el promedio de los parámetros fisicoquímicos por sitio de estudio, el pozo en el que se presentó una mayor temperatura promedio fue Iztaccíhuatl con 24.8°C y con 18.6°C el pozo Calvario fue en el que se registro la menor temperatura. La concentración más alta de oxígeno disuelto se dio en el pozo el Zarco con 7.22 mg L⁻¹ y la más baja en el manantial Santa Isabel con 4.51 mg L⁻¹, en cuanto al pH éste se mantuvo más constante, y al igual que con la temperatura el pozo Iztaccíhuatl registró el valor más alto de pH con 7.34 y el pozo el Calvario el valor más bajo con 5.9.

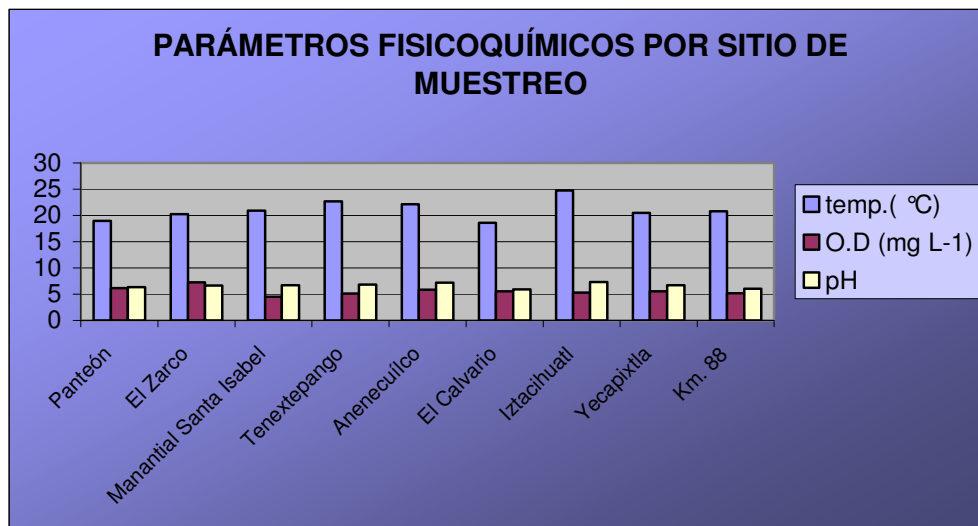


Gráfico 14. Promedio de los parámetros fisicoquímicos de los 9 sitios de estudio.

Relación parámetros fisicoquímicos-presencia de amibas

En la tabla 13 se presentan los resultados obtenidos del análisis del Coeficiente de Correlación Lineal Producto-Momento de Pearson, la cual nos muestra que hubo una relación de las amibas con algunos de los parámetros fisicoquímicos en cinco áreas de estudio (el Zarco, el manantial Santa Isabel, el Calvario, Yecapixtla y Km 88), en los otros pozos la relación que existió fue débil o insignificante (tabla 2).

En el pozo el Zarco se presentó una relación moderada directa con el oxígeno disuelto (0.44346973) y con el pH (0.50208797), en el manantial Santa Isabel y en el pozo el Calvario se presentó una relación moderada directa con la temperatura (0.68512422 y 0.48416483), en los pozos Yecapixtla y Km 88 se presentó una relación moderada directa con el oxígeno disuelto (0.5382857 y 0.48422772).

Pozo	temperatura (°C)	O.D. (mg L ⁻¹)	pH
Panteón	-0.19763999	-0.11469522	-0.08677869
El Zarco	-0.15679076	0.44346973	0.50208797
Manantial Santa Isabel	0.68512422	-0.10964598	-0.28144888
Tenextepango	0.0362747	0.34970562	0.15847104
Anenecuilco	0.00224328	0.19222061	0.1303012
El calvario	0.48416483	0.14062407	0.18651177
Iztaccíhuatl	-0.3055541	0.01862551	0.24206231
Yecapixtla	-0.04353825	0.5382857	0.34398665
Km 88	-0.10539462	0.48422772	0.16572554

Tabla 13. Análisis del Coeficiente de Correlación Lineal Producto-Momento de Pearson.

CONCLUSIONES.

- ✓ Se detectaron amibas de vida libre en el manantial y en los pozos muestreados.
- ✓ Se identificaron 29 especies de AVL pertenecientes a 16 géneros diferentes.
- ✓ La amiba que predominó fue *Hartmannella vermiformis*.
- ✓ De las amibas que se han reportado con potencial patógeno se encontraron *Acanthamoeba castellanii* y *Acanthamoeba polyphaga* en el manantial Santa Isabel pero en bajos porcentajes.
- ✓ Las distribuciones temporal y espacial de las amibas fueron variables.
- ✓ La temperatura favoreció la presencia de amibas reportadas como no patógenas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Adl, M. S., Simpson, B. G. A., Farmer, A. M., Andersen, A. R., Anderson, R. O., Barta, R. J., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, A. R., Fredericq, S., James, Y. T., Karpov, S., Kugrens, P., Drug, J., Lane, E. C., Lewis, A. L., Lodge, J., Lynn, H. D., Mann, G. D., Mc Court, M. R., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, E. S., Nerad, A. T., Shearer, A. C., Nmirnov, V. A., Spiegel, W. F. and Taylor, R. F., 2005. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *Eukaryot. Microbiol. International Society of Protistologists*. 52 (5):399–451.
- Aitken, D., Hay, J., Kinnear, F. B., Kirkness, C. M., Lee, W. R. and Seal, D. V., 1996. Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hartmannella* infection. *Ophthalmol.* 103:485-493.
- Beltrán, O. A., 2008. Determinación de las amibas de vida libre en pozos del acuífero de Cuernavaca, Morelos. Tesis de Licenciatura en Biología. FES-Iztacala. UNAM. México. 46 pp.
- Bonilla, L. P. y Ramírez, F. E., 2008. Amebas de vida libre asociadas a patologías en seres humanos. En Becerril, M. A. *Parasitología Médica*. 2da. ed. Editorial Mc Graw Hill. Pág.22-29.
- Bonilla, P., Ramírez, E., Ortiz, R., Eslava, C., 2004. La ecología de las amibas patógenas de vida libre en ambientes acuáticos. En rosas I., Cravioto A., Ezcurra E. (compiladores), *Microbiología Ambiental*. INE-SEMARNAT, UNAM, PUMA. Pág. 67-79.
- Campos, L. L. U., 2007. Distribución temporal de las amibas de vida libre en dos manantiales del acuífero del Valle de Cuernavaca Morelos. Tesis de Licenciatura en Biología. FES-Iztacala. UNAM. México.36 pp.
- Centeno, M., Rivera, F., Cerva, L., Tsutsumi, V., Gallegos, E., Calderón, A., Ortiz, R., Bonilla, P, Ramírez, E. y Suárez, G., 1996. *Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient

with meningoencephalitis and bronchopneumonia. Archives of Med. Res. 27 (4):579-586

- Comisión Nacional del Agua, 2002. Determinación de la disponibilidad de agua en el acuífero Cuautla-Yautepec, Estado de Morelos.
- Dua, H. S., Azuara-Blanco, A., Hossain, M. and Lloyd J., 1998. Non-*Acanthamoeba* amebic keratitis. Cornea. 18:499-501.
- Durán, D. A. y Cisneros, C. A., Vargas, V. A., 2003. Bioestadística. FES Iztacala. UNAM. México. 136-144 pp.
- Galarza, C., Gutiérrez, E., Uribe, M., Ramos, W., Ortega, A., Ávila, J., Hanco, J., Espinoza, Y., Espinoza, M., Navimcopa, M. y Gámez, D., 2006. Amebas de Vida Libre en infecciones cutáneas, reporte de 4 casos. Dermatología Perú, 16 (1):36-40.
- García, O. N. L., 2007. Estudio físico-químico y bacteriológico del agua subterránea en las zonas centro-oriente del Valle de Cuernavaca, Morelos, México. Tesis de Licenciatura en Biología. FES-Iztacala. UNAM. México. 83 pp.
- Gordon, M. F., Geyer, J. C. y Okun D. A., 1997. Abastecimiento de agua y remoción de aguas residuales. Volumen III. Ed. Limusa. México D.F. 14-16pp.
- Inoue, T., Asari, S., Tahara, K., Hayashi, K., Kiritoshi, A. and Shimomura, Y., 1998. *Acanthamoeba* keratitis with symbiosis of *Hartmannella* ameba. Am. J. Ophthalmol. 125:721-723.
- Iturbe, A. R., Silva, M. A., 1992. Agua subterránea y contaminación. Series del Instituto de Ingeniería. N. 539. Instituto de Ingeniería UNAM. Issn 0185-2345.
- John, D. T., 1993 Opportunistically Pathogenic free-living amoebae: in Parasitic Protozoa, Kreier, J. R. (eds). Vol. III. 2nd. ed. Academia Press, Inc. San Diego. 139-246.
- Lee, J. J., Leedale, F. G. and Bradbury, P., 2000. An illustrated guide to the protozoa. Vol. II. Society of protozoologist. Lawrence Kansas. 690-1432 pp.

- Leiva, B., Clasdotter, E., Linder, E. y Winiecka-Krusnell, W., 2008. Free-living *Acanthamoeba* and *Naegleria spp.* amebae in water sources of León, Nicaragua. *Rev. Biol. Trop.*, 56 (2):439-446.
- Limón, T. J. L., 2007. Caracterización de Amibas de Vida Libre presentes en agua subterránea del Acuífero de Zacatepec, Morelos. Tesis de Licenciatura en Biología. FES-Iztacala. UNAM. México. 71 pp.
- Lorenzo-Morales, J., Martínez-Carretero, E., Batista, N., Alvarez-Marin, J., Bahaya, Y., Walochnik, J. y Valladares, B., 2007. Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *Parasitol. Res.* 102, 167-169.
- Martínez, A. J. y Visvesvara, G. S., 1997. Free-living, Amphizoic and Opportunistic Amebas. *Brain Pathology*, 7: 583-598.
- Michel, R., Schmid, E. N., Böker, T., Hager, D. G., Müller, K. D., Hoffmann, R. y Seitz H. M., 2000. *Vannella* sp. harboring Microsporidia-like organisms isolated from the contact lens and inflamed eye of a female keratitis patient. *Parasitol. Res.* 86:514-520.
- Monroy, P. D., 2007. Estudio físico-químico y bacteriológico del agua subterránea en la zona sur del Valle de Cuernavaca, Morelos, México. Tesis de Licenciatura en Biología. FES-Iztacala. UNAM. México. 85 pp.
- Naveed, A. K., 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Review*, 30: 564-595.
- Novarino, G., A. Warren, H. Butler, G. Lambourne, A. Boxshall, J. Bateman, N. E. Kinner, R. W. Harvey, R. A. Mosse, B. Teltsch. 1997. Protistan communities in aquifers: a review, *FEMS Microbiology Reviews* 20: 261-275.
- Oddó, B. D., 2006. Infecciones por amebas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anatomoclínicos. *Revista Chilena de Infectología*, 23 (3):200-214.
- Oddó, B. D., Ciani, A. S. y Vial, C. P., 2006. Encefalitis amebiana granulomatosa por *Balamuthia mandrillaris*. Primer caso diagnosticado en Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 23 (3):232-236.

- Organización Mundial de la Salud, 1995. Guías para la calidad del agua potable. 2da. Edición. Volumen I. Ginebra.
- Page, F. C., 1988. A new key to freshwater and soil gymnamoebe with instructions for culture. Culture Collection of Algae and Protozoa. Cumbria. England. 112 pp.
- Price, M., 2007. Agua Subterránea. Limusa. México. 330pp.
- Qvarnstrom, Y., Da Silva, A. J., Schuster, F. L., Gelman, B. B. and Visvesvara, G. S., 2009. Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. *J Infect Dis*, 199 (8):1139-1142.
- Ramírez, E., Campoy, E., Matuz, D. y Robles, E., 2006. *Acanthamoeba* Isolated from Contaminated Groundwater. Journal compilation by the International Society of Protistologists. *Eukaryot. Microbiol.*, 53(S1), S10-S11pp.
- Ramírez, E., Campoy, E., Matuz, D., Robles, E., Bonilla, P., Warren, A. y Ortiz, R., 2001. Free-living amoebae in organically-contaminated aquifer in Mexico. En Billot-Bonet, S., Cabunes, P. A., Marciano-Cabral, F., Pernil, P., Pringuez, E. IXth Internacional Meeting of the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceeding. Session II. John Libbey Eurotex. 109-116 pp.
- Rubio, R. M. A., 2007. Estudio físico-químico y bacteriológico del agua subterránea en la zona norte del Valle de Cuernavaca, Morelos, México. Tesis de Licenciatura en Biología. FES-Iztacala. UNAM. México. 96 pp.
- Scheid, P., 2007. Mechanism of intrusion of a microsporidian-like organism into the nucleus of host amoebae (*Vannella* sp.) isolated from a keratitis patient. *Parasitol. Res.* 101:1097-1102.
- Schuster, F. L. and Visvesvara, G. S., 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportnistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*, 34:1001–1027.
- Solarte, Y., Peña, M., Madera, C., 2006. Transmisión de protozoarios patógenos a través del agua para consumo humano. *Colombia Médica*, 37 (1):74-82.

- Seas, R. C. y Bravo, P. F., 2006. Encefalitis amebiana granulomatosa por *Balamuthia mandrillaris*: una enfermedad fatal reconocida cada vez más frecuente en América Latina. Revista Chilena de Infectología, 23 (3):197-199.
- <http://tierra.rediris.es/iberamred/>
- <http://www.cna.gob.mx>

ANEXO

Medio de cultivo.

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

NaCl -----	0.12g
MgSO ₄ 7H ₂ O -----	0.004g
CaCl ₂ 2H ₂ O-----	0.004g
Na ₂ HPO ₄ -----	0.142g
KH ₂ PO ₄ -----	0.136g
Bactoagar -----	15.0g
Agua destilada -----	1000ml

El medio NNE se prepara mezclando los componentes deshidratados y después agregando el agua destilada que se calienta hasta ebullición. Se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos y cuando se ha enfriado un poco se vacían de 15 a 20ml de agar en cajas de Petri previamente esterilizadas. Cuando las placas con el agar solidifican, se les siembra 0.5ml aproximadamente de una preparación de bacterias *Enterobacter aerogenes* inactivadas, las cuales se distribuyen homogéneamente por toda la superficie del medio con una varilla acodada. Las bacterias se obtienen cosechándolas a partir de cultivos puros en solución de agua destilada e inactivándolas en baño de agua a 70°C por 30 minutos. Finalmente las placas de NNE se dejan reposar 1 hora y se guardan en el refrigerador hasta su uso (Limón, 2007).