

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE AMEBAS PATÓGENAS
DEL GÉNERO *Acanthamoeba* EN PISCINAS TERMALES
EN TECOZAUTLA, ESTADO DE HIDALGO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA:

Alejandra Castro Mora

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ELVIA MANUELA GALLEGOS NEYRA

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO, 2012





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| CUADROS..... | 1 |
| FIGURAS..... | 2 |
| I. RESUMEN..... | 4 |
| II. INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| 1. Amebas de vida libre | 5 |
| 2. Ubicación taxonómica de <i>Acanthamoeba</i> spp. | 5 |
| 3. <i>Acanthamoeba</i> spp..... | 6 |
| 3.1 Morfología | 7 |
| 3.2 Ciclo de vida de <i>Acanthamoeba</i> spp. | 8 |
| 3.3 Importancia médica de <i>Acanthamoeba</i> spp..... | 8 |
| 3.4 Infecciones por <i>Acanthamoeba</i> spp. en otros animales | 10 |
| 3.5 Endosimbiontes en amebas de vida libre (AVL) | 11 |
| 3.6 Aspectos ecológicos de <i>Acanthamoeba</i> spp. | 11 |
| 4. Géiseres y manantiales termales | 11 |
| 4.1 Definición de géiser..... | 11 |
| 4.2 Colonización de las amebas a un balneario alimentado por un géiser | 12 |
| 4.3 Utilidad de los géiseres en México | 12 |
| III. ANTECEDENTES | 14 |
| 1. Registros de amebas de vida libre en cuerpos de agua en el mundo | 14 |
| 2. Registros de amebas de vida libre en cuerpos de agua en México | 15 |
| IV. JUSTIFICACIÓN | 16 |
| V. OBJETIVOS | 17 |
| 1. General..... | 17 |
| 2. Particulares | 17 |
| VI. ÁREA DE ESTUDIO | 18 |
| 1. Ubicación..... | 18 |
| 2. Descripción general del balneario..... | 19 |
| 3. Estaciones de muestreo..... | 19 |
| VII. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 20 |
| 1. TRABAJO DE CAMPO | 20 |
| 1.1 Recolección y transporte de las muestras | 20 |
| 1.2 Registro de factores ambientales “ <i>in situ</i> ” | 20 |
| 1.2.1 Temperatura del agua y atmosférica (°C) | 20 |
| 1.2.2 Porcentaje de saturación de oxígeno disuelto (% OD) | 20 |
| 1.2.3 pH | 21 |
| 1.2.4 Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}^3$)..... | 21 |
| 2. TRABAJO DE LABORATORIO..... | 21 |
| 2.1 Parámetros bacteriológicos | 21 |
| 2.1.1 Determinación de coliformes totales por el método de filtro de membrana | 21 |
| 2.2 Aislamiento y cultivo de amebas de vida libre | 22 |

| | |
|---|----|
| 2.3 Clonación | 23 |
| 2.4 Axenización..... | 23 |
| 2.5 Identificación morfológica y registro fotográfico | 23 |
| 2.6 Medición de quistes y trofozoítos | 23 |
| 2.7 Pruebas de tolerancia a la temperatura | 23 |
| VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 24 |
| 1. Aislados amebianos | 24 |
| 2. Identificación morfológica, descripción y registro fotográfico de las amebas del género <i>Acanthamoeba</i> aisladas en el balneario. | 25 |
| 2.1 <i>Acanthamoeba astronyxis</i> Ray y Hayes, 1954. emend. Page, 1967. | 27 |
| 2.2 <i>Acanthamoeba castellanii</i> Douglas, 1930. emend. Volkonsky, 1931 | 28 |
| 2.3 <i>Acanthamoeba polyphaga</i> (Pushkarew, 1913) Volkonsky, 1931 | 29 |
| 2.4 <i>Acanthamoeba</i> spp. | 30 |
| 2.5 <i>Acanthamoeba griffini</i> Sawyer, 1971 | 31 |
| 2.6 <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> Singh y Das, 1970. emend. Page, 1967 | 32 |
| 2.7 <i>Acanthamoeba mauritaniensis</i> Pussard y Pons, 1977. | 33 |
| 3. Descripción de quistes y trofozoítos del género <i>Acanthamoeba</i> | 33 |
| 4. Pruebas de tolerancia a la temperatura | 34 |
| 5. Análisis fisicoquímicos | 37 |
| 5.1 Temperatura del agua | 37 |
| 5.2 Temperatura atmosférica..... | 39 |
| 5.3 Porcentaje de saturación de oxígeno disuelto (OD)..... | 40 |
| 5.4 pH | 41 |
| 5.5 Conductividad | 42 |
| 6. Análisis bacteriológicos | 43 |
| 6.1 Coliformes totales | 43 |
| IV. CONCLUSIONES | 45 |
| X. RECOMENDACIONES | 46 |
| XI. LITERATURA CITADA..... | 47 |
| ANEXO I. Datos de los factores fisicoquímicos | 53 |
| ANEXO II. Datos de los Análisis bacteriológicos | 56 |
| ANEXO III. Medios de cultivo | 57 |

CUADROS

Cuadro 1. Factores de predisposición y enfermedades asociadas (que afectan el sistema inmune) con infecciones por *Acanthamoeba*.

Cuadro 2. Infecciones en animales causadas por amebas del género *Acanthamoeba* spp.

Cuadro 3. Promedio del tamaño medido de las células amebianas del género *Acanthamoeba* aisladas del balneario “El Géiser”.

Cuadro 4. Resultado de las pruebas de tolerancia a la temperatura de los cultivos amebianos.

Cuadro 5. Temperatura del agua (°C) encontrada en las diferentes estaciones durante los cuatro muestreos.

Cuadro 6. Temperatura atmosférica (°C) encontrada en las diferentes estaciones durante los cuatro muestreos.

Cuadro 7. Oxígeno disuelto (% de saturación) encontrado en las diferentes estaciones durante los cuatro muestreos.

Cuadro 8. Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}^3$) encontrada en las diferentes estaciones durante los tres muestreos.

Cuadro 9. Valores de pH encontrado en las diferentes estaciones durante los cuatro muestreos.

Cuadro 10. Coliformes totales (UFC/100ml) encontrados en las diferentes estaciones durante los cuatro muestreos.

FIGURAS

Figura 1. Esquema que indica las dos fases de *Acanthamoeba* spp. y los diferentes órganos que afectan en el ser humano.

Figura 2. Mapa donde se muestra la ubicación del municipio de Tecozautla, Estado de Hidalgo y fotografías del balneario “El Géiser”.

Figura 3. Esquema de las piscinas y estaciones de muestreo (se indican con un número) del balneario “El Géiser”.

Figura 4. Proporción de los géneros amebianos encontrados en los cuatro muestreos en el agua del balneario “El Géiser”.

Figura 5. Quistes de *A. polyphaga*, (A) endoquiste (B) exoquiste (C) poro. Fotografía tomada en microscopio invertido en contraste de fases 40 X.

Figura 6. Trofozoíto de *A. polyphaga*, (A) acantópodo (B) vacuola (C) núcleo. Fotografía tomada en microscopio invertido en contraste de fases 40 X.

Figura 7. Porcentaje de las especies del género *Acanthamoeba* spp. encontradas en los cuatro muestreos en el agua del balneario “El Géiser”.

Figura 8. *A. astronyxis* (A y B) indican el quiste, (C y D) indican el trofozoíto. Fotografías tomadas con un microscopio invertido con contraste de fases 10 y 40 X; esquemas que indican cada una de las partes del quiste y trofozoíto. Barra de referencia = 19 y 20 μm respectivamente.

Figura 9. *A. castellaniii* (A y B) indican el quiste, (C y D) indican el trofozoíto. Fotografías tomadas en microscopio invertido en contraste de fases 40 X; Esquemas que indican cada una de las partes del quiste y trofozoíto, Barra de referencias = 14.2 y 19 μm respectivamente.

Figura 10. *A. polyphaga* (A y B) indican el quiste, (C y D) indican el trofozoíto. Fotografías tomadas con un microscopio invertido con contraste de fases 40 X; esquemas que indican cada una de las partes del quiste y trofozoíto. Barra de referencia = 14.3 y 17.2 μm respectivamente.

Figura 11. *Acanthamoeba* spp. (A) indica el quiste y cada una de sus partes. Fotografía tomada con un microscopio invertido con contraste de fases 40 X; Barra de referencia = 14 μm . Esquema que indica el trofozoíto y cada una de sus partes.

Figura 12. *A. griffini* (A) indica el quiste y cada una de sus partes. Fotografía tomada en microscopio invertido en contraste de fases 40 X. Barra de referencia = 13.8 μm .

Figura 13. *A. culbertsoni* (A) indica el quiste y cada una de sus partes (B) indica el trofozoíto y cada una de sus partes. Fotografías tomadas con un microscopio invertido en contraste de fases 40 X. Barra de referencias = 15.9 y 19 μm respectivamente.

Figura 14. *A. mauritaniensis* (A) indica el quiste y cada una de sus partes. Fotografía tomada con un microscopio invertido en contraste de fases 40 X. Barra de referencias = 15.5 μm .

Figura 15. Distribución de especies amebianas del género *Acanthamoeba* spp. en cada una de las diferentes estaciones durante los muestreos; además se muestra el trayecto del origen del géiser hacia las diferentes piscinas.

Figura 16. La flecha indica el acueducto aéreo por donde viaja el agua para abastecer las diferentes piscinas del balneario.

Figura 17. Valores de temperatura del agua registrada en las diferentes zonas del balneario durante los cuatro muestreos.

Figura 18. Valores de temperatura atmosférica registrada en las diferentes zonas del balneario durante los cuatro muestreos.

Figura 19. Valores de porcentaje de saturación de oxígeno disuelto registrado en las diferentes zonas del balneario durante los cuatro muestreos.

Figura 20. Valores de pH registrado en las diferentes zonas del balneario durante los cuatro muestreos.

Figura 21. Valores de conductividad registrada en las diferentes zonas del balneario durante los tres muestreos.

Figura 22. Valores de coliformes totales registrada en las diferentes zonas del balneario durante los cuatro muestreos.

I. RESUMEN

Las amebas de vida libre (AVL) son protozoos cosmopolitas, sin embargo, las especies con potencial patógeno tienen cierta afinidad hacia cuerpos de agua con temperaturas elevadas, lo que favorece su proliferación en aguas termales. Se les denomina organismos anfizoicos ya que pueden vivir de manera libre o como endoparásitos.

Las AVL son de gran importancia ecológica y médica; desempeñan un papel fundamental en el flujo energético y en el reciclado de los nutrientes. Su crecimiento rápido, el uso eficiente de los recursos comparado con formas superiores de vida, así como el hecho de ser un enlace fundamental entre desintegradores y niveles tróficos superiores, los convierten en un eslabón importante en las cadenas alimentarias acuáticas.

Algunas especies de AVL han sido descritas patógenas como el género *Acanthamoeba* responsable de la (EAG) y de la (QA).

De los cuatro muestreos realizados en el balneario "El Géiser" ubicado en el municipio de Tecozautla, Hidalgo se obtuvieron 53 muestras de las cuales se aislaron e identificaron 167 organismos amebianos por microscopía de contraste de fases y claves dicotómicas para gimnamebas; Entre los aislados destaca el género *Acanthamoeba* que fue el más frecuentemente aislado (72 %), de este género se determinaron siete especies, las más frecuentemente aisladas fueron *Acanthamoeba castellanii* y *A. polyphaga*.

En cuanto a los parámetros fisicoquímicos, el ámbito en que se encontraron las diferentes temperaturas del agua oscilaban entre 38.2 y 55.8 °C.; respecto a la temperatura atmosférica la más alta encontrada fue de 28 °C y la más baja de 17 °C; el pH varió entre los 9.0 y 9.3; los valores de conductividad se presentaron entre los 2.5 y 5.6 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$ El porcentaje de saturación de oxígeno fluctuó entre 31 y 71 %. El número de coliformes totales osciló de 0-250 UFC/100 ml, con excepción del tercer muestreo donde el número de coliformes aumentó considerablemente (hasta 725 UFC/100 ml).

Las mediciones morfométricas de trofozoítos y quistes permitieron corroborar la identificación morfológica previa, debido a que el tamaño promedio de los quistes para las diferentes especies de acantamebas coinciden con el ámbito de tamaño establecido por Page (1966, 1975, 1976 y 1988).

Las pruebas de temperatura demostraron que *Acanthamoeba culbertsoni* y *A. polyphaga* tuvieron un óptimo crecimiento tanto a temperatura ambiente como a temperaturas extremas (45 °C), mientras que *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. griffini* y *Acanthamoeba* sp. presentaron un óptimo crecimiento de los 20 a los 37 °C, después de eso se observaron formas quísticas.

Se concluye que *Acanthamoeba* se encuentra presente, en todas las albercas de este balneario; Es importante mencionar que entre las especies aisladas se encuentran aquellas que han sido reportadas como patógenas para el ser humano, lo cual podría traer graves consecuencias a la salud de los bañistas que acuden a este centro recreativo por lo que se recomienda implementar un sistema de desinfección del agua, para evitar futuros problemas para la salud pública en el parque acuático "El Géiser".

II. INTRODUCCIÓN

1. Amebas de vida libre

Las amebas de vida libre (AVL) son un grupo importante dentro de los protozoos, pertenecen a la subclase Gymnamoebia o amebas “desnudas”, ya que carecen de testa (Martínez *et al.*, 2004). La vida natural de estas amebas transcurre como organismos de vida libre en el ambiente, pero ocasionalmente pueden llegar a los animales o al hombre, en los cuales actúan como parásitos oportunistas, por lo que son llamadas anfizóicas (gr. *amphi*, que significa de ambos lados), (Gallegos, 1997). Estas amebas tienen en común varias características: no están bien adaptadas al parasitismo, pues terminan con la vida del hospedador que invaden, son organismos oportunistas capaces de producir infecciones en el sistema nervioso central y otros órganos como: pulmón, piel, ojos y oídos. A pesar de la característica de ser ubicuos no se conoce un hospedero o vector para su transmisión y dispersión y no se transmiten de humano a humano (Seas y Bravo, 2006).

Las AVL tienen una distribución cosmopolita, se encuentran prácticamente en todo tipo de ambientes desde casquetes polares, suelo y agua (Rivera *et al.*, 1979), sin embargo, las especies con potencial patógeno tienen cierta tendencia hacia cuerpos de agua con temperaturas elevadas (> 35 °C) ya que tienen la característica de ser organismos termotolerantes, por lo que se les encuentra comúnmente en aguas termales naturales y en aguas contaminadas térmicamente por descargas industriales (Kyle y Noblet, 1986).

Estas amebas tienen una gran importancia ecológica y médica, constituyen un grupo muy extenso, que en condiciones normales viven como saprófitos, por lo que ocupan un lugar importante dentro del circuito microbiano, se alimentan selectivamente de bacterias y materia orgánica pudiendo controlar el número y la diversidad de estas especies en su fase trófica y al pasar a su estado quístico, pueden ser diseminados por el aire atmosférico (Beaver y Jung, 1994; Merckell y Voge, 1989); Además ocupan un lugar importante en el ciclo de los nutrimentos nitrogenados y del fósforo (Sleigh, 1989).

2. Ubicación taxonómica de *Acanthamoeba* spp.

A Bütschli (1880-1889) se le considera el gran arquitecto de la sistemática protozoológica (Corliss, 1998) al proponer cuatro clases de protozoos: los flagelados (Mastigophora), las amebas (Sarcodina), los ciliados (Ciliophora o Infusoria) y los esporozoos (Sporozoa). Con el paso del tiempo algunas tendencias se modificaron y en los primeros esquemas, se reconocía un solo phylum Protozoa, tendencia que dominó hasta la clasificación de Honigberg y cols., (1964), esta última fue promovida por la Sociedad de Protozoología. Casi veinte años después, esta misma sociedad, promueve la clasificación de Levine y cols. (1980), considerando siete phyla de protozoos (Sarcomastigophora, Labyrinthomorpha, Apicomplexa, Microspora, Ascetospora, Myxozoa y Ciliophora), ubicando taxonómicamente al género *Acanthamoeba* como sigue:

Reino: Protista Haeckel, 1866
Subreino: Protozoa Goldfuss, 1818; emend. von Siebold, 1846
Phylum: Sarcomastigophora Honigberg y Balamuth, 1963
Subphylum: Sarcodina Schmarda, 1871
Superclase: Rhizopoda von Siebold, 1845
Clase: Lobosea Carpenter, 1861
Subclase: Gymnamoebia Haeckel, 1862
Orden: Amoebida Kent, 1880
Suborden: Acanthapodina Page, 1976
Familia: Acanthamoebidae Sawyer y Griffin, 1975
Género: *Acanthamoeba* Volkonsky, 1931; emend. Page, 1967

En la última década la Sociedad de Protozoología (Lee *et al.*, 2000) publicó una guía ilustrada de los protozoos donde ubican al género *Acanthamoeba* de la siguiente manera:

“Grupo” Ramicristate amoebae (Gymnamoebae)

Orden Centramoebida

Familia Acanthamoebidae Sawyer y Griffin, 1975

Género *Acanthamoeba* Volkonsky, 1931; emend, Page 1967

La mayoría de los investigadores protistólogos, opinan que existen numerosos datos de estudios morfológicos, bioquímicos y filogenéticos que han demostrado la gran diversidad entre los protistas; con base en lo anterior, se ha propuesto el más actual sistema de clasificación de los eucariontes (Adl *et al.*, 2005). En esta clasificación se reconocen seis grupos superiores (Amebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveolata y Excavata) y pueden representar los agrupamientos básicos similares a los reinos tradicionales; dentro del grupo Amebozoa se ubica al género *Acanthamoeba* como se muestra a continuación:

Supergrupo: Amebozoa Lühe, 1913; Cavalier-Smith, 1998

Primer rango: Acanthamoebidae Sawyer y Griffin, 1975

Segundo rango: *Acanthamoeba* Volkonsky, 1931; emend, Page 1967.

3. *Acanthamoeba* spp.

Algunas especies del género *Acanthamoeba* han sido descritas como patógenas, por lo que han adquirido gran interés médico ya que pueden provocar enfermedades severas tales como la encefalitis amebiana granulomatosa (EAG), este padecimiento se presenta en individuos con condiciones de inmunosupresión, la vía de entrada de esta infección es a través de las mucosas por la aspiración de agua o aire contaminados y también por la piel por contacto directo con estas amibas y quistes; mientras que la (QA) se presenta en individuos aparentemente sanos, la infección es por invasión directa de la córnea y principalmente por el uso de lentes de contacto contaminados (Schuster y Visvesvara, 2004).

Su extensa distribución en la naturaleza favorece que los humanos estén en constante exposición con estos organismos, por lo que el sistema inmune ha desarrollado defensas en contra de *Acanthamoeba* (Kahn, 2003).

3.1 Morfología

El género *Acanthamoeba*, presenta dos estadios en su ciclo biológico: (Fig. 1) el trofozoíto o forma activa, en el cual se alimenta y reproduce y el quiste o forma vegetativa (Page, 1988; Pussard y Pons, 1977).

3.1.1 Trofozoíto de *Acanthamoeba* spp.

El trofozoíto de *Acanthamoeba* es aplanado e irregular, mide entre 24 a 56 μm , de largo y presenta un núcleo circular de 7 a 10 μm de diámetro con un nucléolo central, tiene múltiples vacuolas contráctiles y vacuolas digestivas (John, 1993).

Cabe señalar que *Acanthamoeba* se divide por mitosis, con disociación temprana de la membrana nuclear y del nucléolo. Una característica más notoria es que *Acanthamoeba* no presenta formas flageladas; de su citoplasma emergen finas proyecciones llamadas acantópodos (gr. “*acantos*” que significa espina), que le dan el nombre al género.

3.1.2 Quiste de *Acanthamoeba* spp.

El quiste de *Acanthamoeba* está formado de una capa doble, por lo que los hace más resistentes a los efectos adversos del ambiente; tiene un diámetro de 13 a 28 μm , además presenta un exoquiste que en algunas especies es ligeramente ondulado, el endoquiste presenta un arreglo poligonal, esta característica permite distinguir a *Acanthamoeba* de otras AVL y sirve como referencia para diferenciar las variedades de especies de este género (Schuster y Visvesvara, 2004). El citoplasma es denso y contiene diversos organelos compactos. Las paredes del ectoquiste (externas) y el endoquiste (internas) se comunican a través de un poro que presenta un tapón el cual se denomina opérculo y es por donde se lleva a cabo el proceso de exquistamiento (Bottone, 1993).

Se sabe con certeza que factores ambientales desfavorables permiten la formación del quiste, pero hasta el momento se desconocen los mecanismos exactos que conllevan al proceso de enquistamiento y exquistamiento (John, 1993).

Por su morfología quística *Acanthamoeba* se puede clasificar en tres grupos: en el grupo I el quiste es grande y puede llegar a medir más de 18 μm de diámetro, y presenta un endoquiste con brazos que dan una apariencia estrellada rodeado por un exoquiste más o menos redondeado. Las paredes externa e interna del quiste están separadas entre sí y sólo se unen mediante los brazos; se considera que este grupo no es tan relevante ya que carece de representantes patógenos. En el grupo II se agrupan aquellos con quistes muy pequeños con forma estrellada o bien poligonal de manera que las dos paredes se juntan en las esquinas más que en los brazos del endoquiste, el exoquiste presenta una forma más o menos redondeada. A este grupo pertenecen las

formas de mayor importancia médica. En el grupo III el exoquiste es muy delgado y en ocasiones se dificulta su observación mientras que el endoquiste es más o menos redondeado y no presenta brazos por lo que las paredes están muy juntas entre sí (Pussard y Pons, citado por Omaña, 1997).

3.2 Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp.

Las dos formas del ciclo de vida (trofozoíto y quiste) de *Acanthamoeba* se pueden encontrar en los tejidos del hospedero humano (Gallegos, 1997), que entran a través de sitios primarios como la mucosa nasal (por la aspiración de agua y aire contaminados), por heridas en la piel, y a través del neuroepitelio por contacto directo con estas amebas o quistes. Provocando así severas patologías en el sistema nervioso central (SNC) el ojo y otros órganos (John, 1993) (Fig.1).

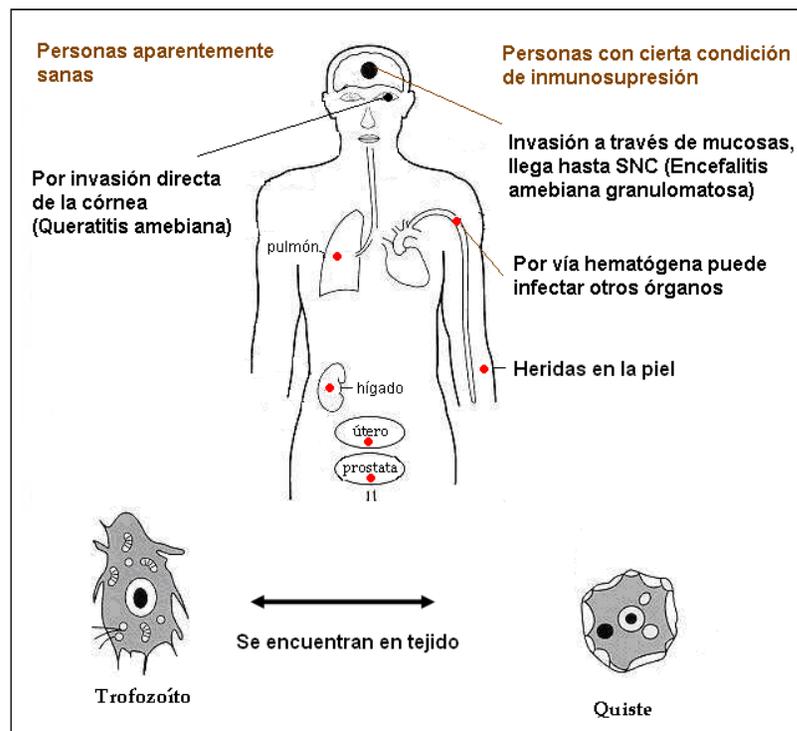


Figura 1. Esquema que indica las dos fases de *Acanthamoeba* spp. y los diferentes órganos que afectan en el ser humano.

3.3 Importancia médica de *Acanthamoeba* spp.

Las enfermedades causadas por amebas del género *Acanthamoeba* han sido reconocidas por más de 35 años, cuando Malcom Fowler y Rodney F. Carter en 1965, reportaron los primeros casos de meningoencefalitis producidas por estos microorganismos, sin embargo, son identificados cada vez con más frecuencia, no solo como causantes de enfermedad en seres humanos inmunosuprimidos, sino también en

huéspedes sanos, por lo que podrían considerarse entre las llamadas enfermedades emergentes (Torres y Gotuzzo, 2002).

De acuerdo a John (1993), siete especies de *Acanthamoeba* han sido identificadas como causantes de infecciones en humanos, estas son: *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. palestinensis*, *A. polyphaga* y *A. rhyzodes*; También se han identificado tres especies patógenas en ratones: *A. lenticulata*, *A. lugdunensis* y *A. royreba*.

La encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) se presenta principalmente en personas debilitadas o crónicamente enfermas, algunas con tratamiento inmunosupresor (Cuadro 1) por lo que se dice que es una enfermedad de carácter oportunista. Esta infección se presenta a través de heridas en la piel o por las mucosas que por vía hematógena se trasladan hasta llegar al SNC, sin embargo, también pueden afectar otros órganos como pulmones, oídos y ojos. La invasión es relativamente lenta y suele estimular la formación de granulomas. Por lo tanto, la enfermedad suele ser de comienzo gradual y seguir un curso crónico prolongado de meses o semanas. Esta enfermedad se caracteriza por cefalea, anormalidades mentales, alucinaciones, convulsiones y fiebre, progresando lentamente a un coma y posteriormente a la muerte (Botero y Restrepo, 2003).

Otra enfermedad provocada por *Acanthamoeba* spp. es la (QA), que ocurre en individuos aparentemente sanos, la infección se da por invasión directa de la córnea y por el uso de lentes de contacto contaminados (Martinez, 1997), después de la abrasión de la córnea, se desarrolla una úlcera; hay dolor intenso y disminución de la visión, si la infección se debe a lentes de contacto contaminados la sintomatología inicial es menos intensa, no hay trauma pero progresa lentamente hasta causar el daño corneal, en casos graves hay invasión de las capas profundas de la córnea y puede llegar a la perforación que no responden a las terapias antifúngicas, antivirales o antibacterianas (Botero y Restrepo, 2003).

Cuadro 1. Factores de predisposición y enfermedades asociadas (que afectan el sistema inmune) con infecciones por *Acanthamoeba* (Gallegos, 1997).

| FACTORES DE PREDISPOSICIÓN | ENFERMEDADES ASOCIADAS |
|--|-----------------------------|
| Embarazo | SIDA |
| Alcoholismo | Diabetes <i>mellitus</i> |
| Quimioterapia | Falla renal crónica |
| Radioterapia | Otitis y faringitis |
| Diálisis peritoneal | Neumonía |
| Transplantes | Lupus eritematoso sistémico |
| Tratamiento con antibiótico y esteroides | Cirrosis hepática |
| Otros parásitos | Cáncer |
| | Úlceras en la piel |
| | Infarto cerebral |

3.4 Infecciones por *Acanthamoeba* spp. en otros animales

Las amebas del género *Acanthamoeba* no solo tienen la facultad de parasitar a humanos, también puede provocar severas infecciones en otros vertebrados; a continuación se mencionan algunos grupos animales de los que se han extraído e identificado trofozoítos en diversos tejidos (Cuadro 2), sin embargo, aun no se sabe si alguno de estos animales funcionan como portadores o reservorios, de igual forma necesitarían ser investigados otros animales que pudieran estar en contacto o servir de alimento a estos (John, 1993).

Cuadro 2. Infecciones en animales causadas por amebas del género *Acanthamoeba* spp. (John, 1993).

| GRUPO ANIMAL | TEJIDO | AMEBA | PAÍS |
|---|---|---------------------------------|----------------------------------|
| PECES | | | |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> (trucha) | Riñón, hígado, meninges, agallas, vejiga, bazo y sangre | <i>Acanthamoeba</i> sp. | Estados Unidos |
| <i>Salminus maxillosus</i> (pez dorado) | | | |
| REPTILES | | | |
| <i>Boa constrictor</i> (boa) | Cerebro | <i>Acanthamoeba</i> sp. | Alemania |
| AVES | | | |
| <i>Pavo cristatus</i> (pavo) | Tráquea e intestino | <i>Acanthamoeba polyphaga</i> | República Checa |
| <i>Columba livia</i> (pichón) | | | |
| MAMÍFEROS | | | |
| <i>Bos taurus</i> (toro) | Pulmón y prepucio | <i>Acanthamoeba polyphaga</i> | República Checa |
| <i>Bos taurus</i> (vaca) | Vagina | <i>Acanthamoeba polyphaga</i> | República Checa |
| <i>Canis familiaris</i> (perro) | Corazón, hígado, pulmón, páncreas, bronquios, cerebro y riñón | <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> | República Checa y Estados Unidos |
| <i>Oryctolagus cuniculus</i> (conejo) | Hígado | <i>Acanthamoeba polyphaga</i> | República Checa |
| <i>Neovison vison</i> (visón de agua) | Pulmón | <i>Acanthamoeba</i> sp. | India |

3.5 Endosimbiontes en amebas de vida libre (AVL)

Las AVL son consideradas simbioses ya que pueden actuar como hospederos naturales de diferentes especies bacterianas tanto en fase trófica como quística, por ejemplo: *Legionella pneumophila* que es capaz de multiplicarse dentro de la célula amebiana, causar lisis y liberarse nuevamente al ambiente hasta colonizar otras amebas, también algunas bacterias coliformes y *Mycobacterium avium* sobreviven dentro de las amebas aunque sin multiplicarse. De esta manera, el quiste amebiano no solo ofrece a las bacterias un mecanismo de protección para invadir ambientes hostiles, sino también les provee un medio para transportarse y colonizar nuevos hábitats aprovechando los mecanismos de dispersión de las AVL (Fields, 1993, citado por Barry, 2002; Resuman *et al.*, 1999).

3.6 Aspectos ecológicos de *Acanthamoeba* spp.

La capacidad que tienen las AVL de colonizar diversos ambientes se debe a su carácter eurioico lo que les permite soportar variaciones amplias de los factores ambientales, de tal manera que puedan sobrevivir a cambios en el pH, poca cantidad de oxígeno y temperaturas extremas; sin embargo, es evidente que su distribución se restringe a factores más específicos que permiten una selección y agregación de estos organismos (Smirnov, 2003) por ejemplo a diferencia de otras amebas, el género *Acanthamoeba* es tolerante a los cambios de salinidad cuando esta en su fase trófica y su quiste es resistente al ataque del cloro hasta niveles de 2 ppm (Gallegos, 1997). El proceso de enquistamiento es otro factor que permite una mayor dispersión ya que pueden ser acarreados hacia la atmósfera mediante corrientes de convección, sistemas frontales, turbulencias o burbujas de aire. El tiempo y la distancia a la que pueden transportarse en la atmósfera depende de el tamaño que posean que por lo general es pequeño y pueden ser llevados por el viento a través de grandes distancias e incluso entre continentes (Rondanelli, 1987). Una vez en un hábitat nuevo con condiciones favorables las amebas pueden exquistar y proliferar si hay una fuente de alimento disponible (bacterias, hongos, levaduras, algas y protozoos). Los lugares donde se concentran la mayor cantidad de materia orgánica son las interfases como: agua-aire, suelo-aire, agua-suelo, agua-organismo y aire-organismo (Fenchel, 1987).

Como se menciona con anterioridad las amebas del género *Acanthamoeba* son organismos con capacidad termotolerante y con una distribución amplia (Rivera *et al.*, 1979), en este sentido las aguas termales juegan un papel importante para la distribución de estos organismos por lo que a continuación se menciona una breve descripción de estos ambientes.

4. Géiseres y manantiales termales

4.1 Definición de géiser

De los fenómenos naturales más espectaculares y misteriosos que brotan de las entrañas de la tierra, los que más llaman la atención son los manantiales termales con

temperaturas muy cercanas a las del punto de ebullición del agua. Sin embargo, todavía mas espectacular es un géiser, que consiste en una fuente emergente dotada de un sistema especial de calentamiento y desfogue que da lugar a una columna de agua y vapor que es expulsada con gran fuerza y que logra alcanzar una altura de varios metros. Antes y después de que el chorro cese, sobreviene un ruido estruendoso provocado por la expulsión rápida de una columna de vapor, seguida por un periodo de calma al terminar la erupción. Este comportamiento confiere al géiser un carácter intermitente y sincrónico con la expulsión de miles de litros de agua por minuto.

En casi todas las aguas de los géiseres y de los manantiales calientes puede notarse el inconfundible hedor a huevos podridos característico del ácido sulfhídrico, resultado de la reacción de las aguas con los vapores emanados del magma (Tello, 1986).

4.2 Colonización de las amebas a un balneario alimentado por un géiser

Los mecanismos de dispersión por los cuales se da la entrada y colonización de las amebas del género *Acanthamoeba* a formaciones volcánicas donde brota agua caliente tiene lugar principalmente por la intermediación de las aguas subterráneas y por el suelo circundante, así como por las hojas desprendidas de los árboles.

4.3 Utilidad de los géiseres en México

Los inicios de la utilización de energía geotérmica en México para la producción de energía eléctrica se remontan a los años sesenta, en los que se comenzó a explotar el campo geotérmico de Pathé en el Estado de Hidalgo. Desafortunadamente, la falta de permeabilidad del campo determinó que el experimento terminara en un fracaso a pesar de que se tenía un gradiente geotérmico en el área de aproximadamente 550 °C/km. De los 3 500 kilowatts instalados sólo se pudieron producir 150 kilowatts, por lo cual se clausuró la planta (Ledezma, 1987).

Hasta la fecha, la Comisión Federal de Electricidad (CFE) ha establecido la existencia de más de mil manifestaciones termales en la República Mexicana, de las cuales sólo una minoría corresponde a sistemas capaces de generar energía eléctrica comercialmente. Sin embargo, la mayoría de estos puntos localizados han sido utilizados como balnearios aun desde tiempos precolombinos (Ledezma, 1987).

La mayor parte de los balnearios se localiza en la parte central del país, coincidiendo con la Faja Volcánica Transmexicana, la cual contiene la mayoría de los volcanes mexicanos que han presentado actividad reciente: Ceboruco, Popocatepetl, Volcán de Colima, Pico de Orizaba, Paricutín, Jorullo, Xitle, etc.; además de otros volcanes que quedan fuera de esta zona, como son: Bárcena, Tres Vírgenes, El Chichón y El Tacaná (Ledezma, 1987).

Uno de los principales factores que determina la aparición de manantiales, aparte de la fuente de calor, es la existencia de agua suficiente para mantener la actividad

hidrotermal. En muchos estados como Hidalgo, Aguascalientes, San Luis Potosí, Guanajuato, etc., se ha dado el caso de que con la explotación de los acuíferos para la agricultura y para consumo humano, se ha provocado un descenso en los niveles del agua subterránea que ha dado como resultado la extinción de numerosos manantiales termales. Esto también se ha observado en zonas donde los manantiales se aprovechan para el embotellamiento de aguas minerales (Tehuacán, Puebla; La Soledad, SLP). Sin embargo, la abundancia de manantiales hace que aún existan bastantes que siguen funcionando como balnearios, teniendo varios de ellos gran renombre en el ámbito nacional, por ejemplo: “El Géiser” en el Estado de Hidalgo (Ledezma, 1987).

III. ANTECEDENTES

1. Registros de amebas de vida libre en cuerpos de agua en el mundo

Los primeros estudios sobre amebas de vida libre a nivel mundial, fueron realizados por Culbertson y colaboradores en 1958, un trabajo realizado en 16 piscinas públicas en Bélgica realizado por Jonckheere en 1979, demostró que el género *Acanthamoeba* fue el más frecuentemente encontrado debido probablemente a la gran resistencia conferida por sus quistes.

Kyle y Pittman (1985), determinaron la distribución de amebas relacionándola con parámetros ambientales en los lagos Issaqueena y Willard's, en Estados Unidos.

John y Howard en 1995, realizaron un estudio sobre distribución estacional de AVL en el que obtuvieron 2016 muestras de agua del río Oklahoma; las amebas patógenas identificadas fueron: *Naegleria australiensis* (38 %), *Acanthamoeba* (35 %), *N. fowleri* (18 %) y *Leptomyxa* (9 %).

Ettinger y colaboradores en el 2003, realizaron un estudio en el río James, en Virginia EUA sobre la distribución de AVL, analizando diversos factores fisicoquímicos como temperatura del agua, pH, oxígeno disuelto y coliformes fecales, logrando correlacionar la permanencia de las AVL con la presencia de coliformes fecales, en este trabajo se lograron aislar de la columna de agua y sedimento cinco géneros: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia* y *Vanella*, siendo *Naegleria* y *Vanella* los géneros amebianos más frecuentemente aislados.

Muñoz y colaboradores en el 2003, analizaron en Santiago de Chile un total de ocho piscinas públicas de las cuales cinco resultaron positivas a AVL, dentro de las amebas patógenas, la que se encontró en mayor número fue *Naegleria* con un 7.8 %, mientras que *Acanthamoeba* obtuvo un porcentaje de 4.7 %.

Lorenzo–Morales y colaboradores en el 2005, en Tenerife, España, analizaron muestras de agua de uso potable y agua de mar, en este trabajo ellos identificaron a *Acanthamoeba* como el organismo mas frecuentemente aislado, además registraron que el potencial patógeno de esta ameba se incrementa principalmente por las temperaturas elevadas y la osmolaridad.

2. Registros de amebas de vida libre en cuerpos de agua en México

En México los primeros estudios sobre las AVL comenzaron con los trabajos de Rivera y cols. en 1978, ellos tomaron muestras de piscinas, grifos y reservorios naturales de agua dulce de la ciudad de México, encontrando así una gran variedad de AVL.

Rivera y cols. en 1993, estudiaron la presencia de AVL en albercas para fisioterapia en la ciudad de México, en el que registraron al género *Acanthamoeba* como el más frecuentemente aislado en la época de primavera y verano.

Gallegos en 1997, realizó un estudio sobre amebas de vida libre con potencial patógeno en la Huasteca Potosina en el Estado de San Luis Potosí, en donde encontró seis diferentes géneros: *Acanthamoeba*, *Echinamoeba*, *Hartmannella*, *Naegleria*, *Vahlkampfia* y *Willaertia* relacionando su presencia con diferentes parámetros ambientales, concluyendo que los factores que más influencia tuvieron sobre el crecimiento y distribución de las amebas fueron: la temperatura del agua y la cantidad de materia orgánica.

Lares-Villa y colaboradores en el 2001, aislaron e identificaron en cuerpos de agua de uso recreativo de Hermosillo, Sonora cinco géneros diferentes, donde el género *Acanthamoeba* fue el más frecuentemente encontrado (48 %), seguido por *Hartmannella* (41 %), *Willaertia* (3.6 %), *Platyamoeba* (3.6 %) y *Naegleria* (3.6 %).

IV. JUSTIFICACIÓN

Los casos de (EAG) y (QA) ocasionados por amebas del género *Acanthamoeba*, a nivel mundial son frecuentes, mientras que en México estas enfermedades son casi desconocidas. Actualmente no poseemos información acerca de reportes de estas enfermedades por *Acanthamoeba* para el municipio de Tecozautla en el Estado de Hidalgo lo que podría sugerir desconocimiento de la problemática al respecto. Sin embargo, es importante mencionar que debido a la falta de conocimiento entre los médicos y los laboratoristas clínicos un número de casos de infecciones debidas a *Acanthamoeba* podrían estar sub-diagnosticados pudiendo pasar desapercibidas y reportando a los pacientes como enfermos debido a otros agentes patógenos como bacterias, virus, hongos y cisticercos, aun cuando el diagnóstico clínico pueda indicar la ausencia de estos microorganismos (Gallegos, 1997).

En el municipio de Tecozautla se ubica un balneario muy popular que se abastece de agua caliente de un géiser de origen natural. A este balneario asisten en excursión niños, jóvenes y adultos mayores de diferentes zonas del país para llevar acabo actividades recreativas y aprovechar las pretendidas propiedades curativas del agua por su alto contenido de sustancias minerales y que son utilizados en la creencia de los usuarios para atender diferentes enfermedades y dolencias.

Si se considera que *Acanthamoeba* se encuentra distribuida en cuerpos de agua de casi cualquier tipo y principalmente los de aguas termales por su tolerancia a temperaturas elevadas y que son uno de los grupos amebianos con mayor distribución en la naturaleza, debido a la gran resistencia conferida por sus quistes, es posible considerar que estas amebas puedan ser aisladas del balneario “El Géiser”, lo que puede representar un riesgo para la salud de las personas que en condiciones de inmunosupresión puedan estar en contacto con estos organismos oportunistas y causar severas infecciones en las personas que incluso las puedan llevar a la muerte.

V. OBJETIVOS

1. General

Aislar e identificar amebas potencialmente patógenas del género *Acanthamoeba* en piscinas termales del balneario “El Géiser” en el municipio de Tecozautla, Estado de Hidalgo.

2. Particulares

- Determinar la taxonomía de las amebas del género *Acanthamoeba* aisladas por criterios morfológicos.
- Relacionar los factores fisicoquímicos y bacteriológicos (temperatura del agua, temperatura atmosférica, oxígeno disuelto, conductividad, pH y coliformes totales) con la presencia de amebas del género *Acanthamoeba* en el agua del balneario “El Géiser”.
- Establecer la temperatura máxima y óptima ideal para la supervivencia de las amebas
- Ubicar las piscinas donde se encuentran con mayor frecuencia las amebas del género *Acanthamoeba* que representan un peligro para la salud pública y emitir recomendaciones preventivas para los usuarios del balneario.

VI. ÁREA DE ESTUDIO

1. Ubicación

El estudio se realizó en el municipio de Tecozautla, que significa: “Lugar donde abunda la tierra amarilla” se encuentra ubicado en las coordenadas 20° 31’ 58” de latitud norte, 99° 37’ 57” longitud oeste, con una altitud de 1,700 msnm. Tiene una superficie de 537.83 Km² lo que representa el 3 % del territorio del Estado de Hidalgo (Fig. 2). Sus colindancias son: al norte con el municipio de Zimapán y Estado de Querétaro, al sur con el municipio de Huichapan, al oeste con el Estado de Querétaro, al este con los municipios Tasquillo y Alfajayucan. (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, gobierno del Estado de Hidalgo, 2002).

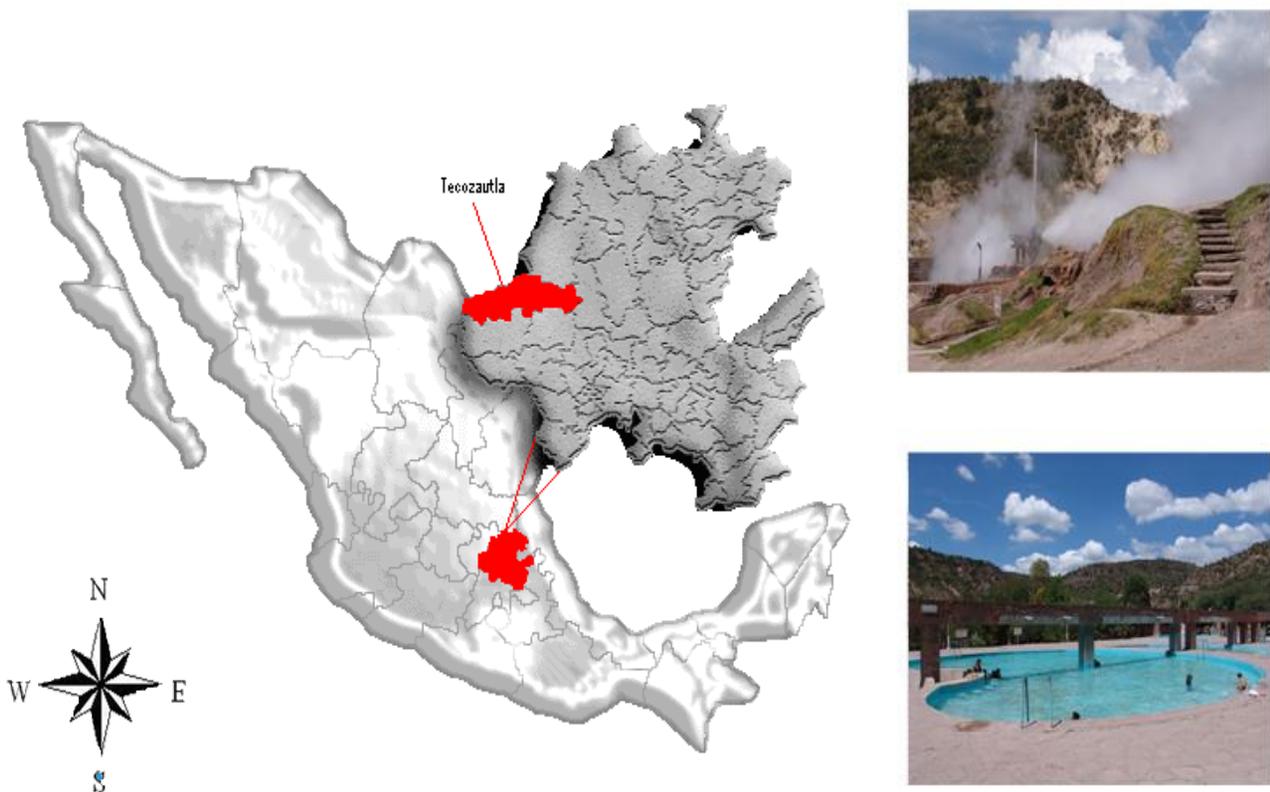


Figura 2. Mapa donde se muestra la ubicación del municipio de Tecozautla, Estado de Hidalgo y fotografías del balneario “El Géiser”.

La zona de estudio tiene una vegetación de matorrales con un clima predominante semiseco cálido y semiseco templado, con una temperatura promedio de 19 °C.

Se encuentra ubicado en la región hidrológica del Pánuco, en la cuenca del río Moctezuma, y colinda con el río Tecozautla, lo que le da la característica de ser un lugar rico en manantiales de aguas termales, situación que lo coloca como un importante

atractivo turístico con un considerable número de balnearios dentro de los que se encuentra “El Géiser”.

2. Descripción general del balneario

Con la finalidad de aprovechar la energía del géiser en el año de 1955 se perforó en este balneario el primer pozo geotérmico de América Latina. Produciéndose energía eléctrica hasta el año de 1971, todavía se observa el caso de la tubería que canalizaba el vapor a los generadores así como las estructuras de lo que fue la planta termoeléctrica. Posteriormente le dieron el giro de balneario recreativo ejidal, en este balneario el principal atractivo es el géiser de origen natural de donde toma su nombre y del cual brota agua sulfurosa con vapor a una temperatura de 95 °C aproximadamente y que abastece todo el sistema de piscinas artificiales del balneario a través de acueductos aéreos construidos de cantera y a desnivel para facilitar la llegada del agua a todas las piscinas; este sistema esta conformado por: un chapoteadero, dos piscinas de 1.60 m de profundidad, una fosa de 5 m de profundidad (Fig. 3), además cuenta con palapas y servicio de restaurante con el atractivo de puentes colgantes y cascadas, también cuenta con zona para acampar, hotel y cabañas (Gobierno del Estado de Hidalgo.2011).

3. Estaciones de muestreo

Para su estudio el balneario se dividió en 14 estaciones de muestreo, desde donde brota el agua del géiser hasta la última piscina (Fig. 3).

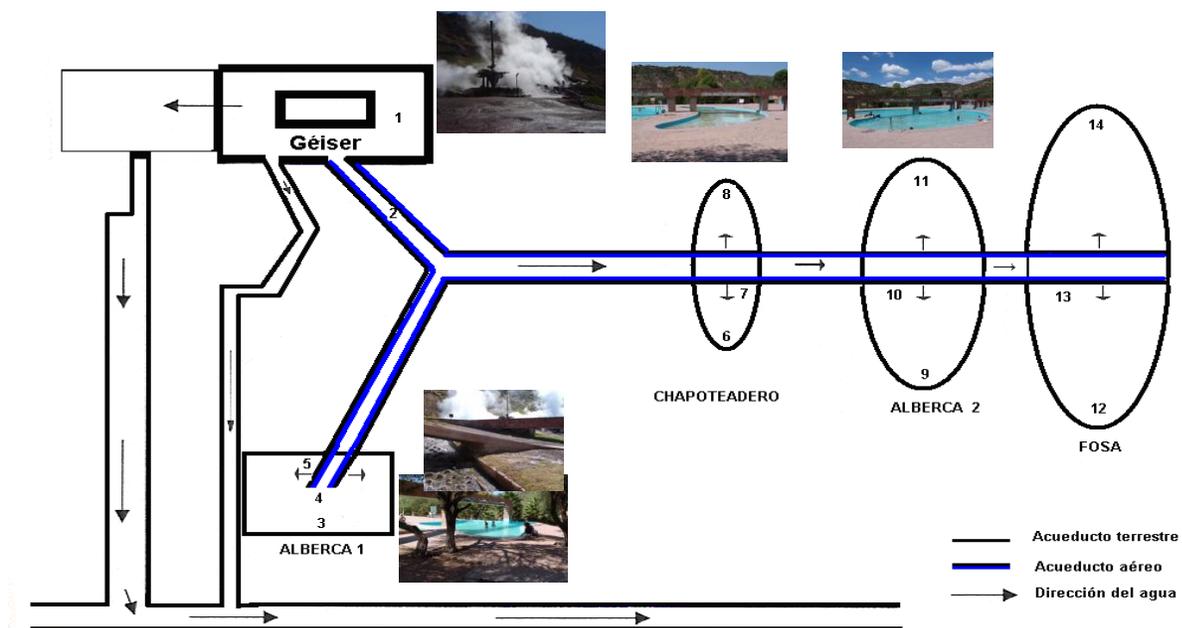


Figura 3. Esquema de las piscinas y estaciones de muestreo (se indican con un número) del balneario “El Géiser”.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevaron a cabo cuatro muestreos en el balneario “El Géiser”, el primer muestreo fue en el mes de febrero de 2006, el segundo en febrero de 2007, el tercer muestreo fue en agosto de 2007 y el cuarto muestreo fue en noviembre de 2007. En el primer muestreo se tomaron cinco muestras, que incluyen el origen del géiser, el acueducto y tres piscinas; mientras que en los muestreos 2, 3 y 4 se tomaron 14 muestras que incluyen el origen del géiser, el acueducto y las cuatro piscinas, de estas últimas se tomaron muestras compuestas de agua, de superficie, a media profundidad y el fondo (Fig. 3).

1. TRABAJO DE CAMPO

1.1 Recolecta y transporte de las muestras

La toma de muestras de agua se hizo en frascos de polipropileno (NALGENE) de boca ancha de 1L, previamente esterilizados. En todos los casos las muestras de agua fueron transportadas a temperatura ambiente (las amebas de vida libre son sensibles a los cambios drásticos de temperatura) al Laboratorio de Patógenos Emergentes de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la Salud y la Educación (UIICSE) de la FES-Iztacala UNAM, para su procesamiento.

1.2 Registro de factores ambientales “*in situ*”

Para comprobar si hay una relación de los factores ambientales y la presencia de estas amebas se hicieron las siguientes determinaciones en el balneario: temperatura del agua (°C), temperatura atmosférica (°C), porcentaje de saturación de oxígeno disuelto (% OD), pH y conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}^3$).

1.2.1 Temperatura del agua y atmosférica (°C)

Se registró la temperatura del agua y la temperatura atmosférica con un termómetro digital HANNA modelo H19040, para tomar los valores del agua se sumergió el electrodo a una profundidad de 15 cm aproximadamente con el tiempo necesario para que el electrodo se estabilizara y así poder obtener una lectura fija, en el caso de la temperatura ambiental el electrodo se expuso al ambiente y de igual forma se dejó estabilizar para poder tomar la lectura.

1.2.2 Porcentaje de saturación de oxígeno disuelto (% OD)

El oxígeno es el parámetro más importante en los cuerpos de agua. El oxígeno evidentemente es esencial para el metabolismo de todos los organismos que presentan una respiración de tipo aerobio tal es el caso de las AVL, por tanto la distribución de oxígeno en estos cuerpos de agua es primordial para comprender la distribución, el comportamiento y el crecimiento de estos organismos, este parámetro se obtuvo

introduciendo a la piscina la sonda del oxímetro digital HANNA modelo H19143, se espero a que se estabilizara y se tomó la lectura en mg/L y en porcentaje de saturación.

1.2.3 pH

Aunque en la literatura se hace referencia a que las amebas pueden soportar variaciones amplias de pH desde 4.6 hasta 9.5 (Kyle y Noblet, 1985), en condiciones de laboratorio se ha demostrado que los quistes pueden soportar valores de pH de 8 a 12 (Sykora *et al.*, 1983), por esta razón se consideró importante medir este parámetro, el registro se efectuó con un potenciómetro digital Oakton modelo Testr1. De igual manera se introdujo el electrodo al agua, se dejó estabilizar y se tomó la lectura.

1.2.4 Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}^3$)

Este parámetro tiene una estrecha relación con la temperatura a la que se esta tomando el registro, por lo que las lecturas obtenidas se ajustaron a un factor de corrección de 25 °C (Arredondo y Ponce, 1998) y fue tomada con un conductímetro digital Trans Instrument modelo Walk Lab, los resultados se expresaron como conductividad específica (Ka 25).

2. TRABAJO DE LABORATORIO

2.1 Parámetros bacteriológicos

2.1.1 Determinación de coliformes totales por el método de filtro de membrana

Debido a la capacidad depredadora que poseen la amebas sobre las bacterias se ven reguladas las poblaciones bacterianas por lo que se reconoce de suma importancia el evaluar este parámetro que pueden indicar la abundancia de AVL y el grado de contaminación bacteriológica de las piscinas y que los datos obtenidos deben adecuarse a los establecidos por las Normas Oficiales para aguas de uso recreativo, la cual indica ausencia de organismos bacterianos para uso recreativo de contacto directo.

Este método se basa en la filtración de una muestra para concentrar células viables sobre la superficie de una membrana y transferirlas a un medio de cultivo apropiado, para posteriormente contar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) desarrolladas después de la incubación.

Selección del tamaño de muestra.

El tamaño de muestra fue de un volumen de agua de 100 ml.

Filtración de la muestra.

Utilizando pinzas estériles, colocar una membrana estéril (cuadrulado hacia arriba) sobre el portafiltro poroso. Cuidadosamente coloque el embudo sobre el receptáculo y asegúrelo en su lugar. La muestra se filtró bajo vacío parcial, con un filtro

Millipore. Se usaron unidades de filtración estériles al principio de cada serie de filtraciones, como precaución para prevenir contaminación accidental.

Técnica de enriquecimiento

Se colocó un cojinete absorbente en una caja de Petri estéril y se pipetearon 2,0 ml de caldo lauril triptosa para saturar el cojinete. Asépticamente se colocó sobre el cojinete una membrana a través de la cual se haya filtrado una muestra de agua, incubar la membrana sin invertir la caja durante 15 a 20 horas a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ en una atmósfera de 90% de humedad relativa. A continuación, con el medio ya sea agar o líquido (con cojinete), se invirtieron las placas e incubaron por 22 horas a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Conteo.

Para determinar la cuenta de colonias sobre el filtro de membrana, se reconocieron las colonias típicas de coliformes totales tienen color rojo oscuro con brillo metálico. El área brillante puede variar de tamaño desde que sólo brille la parte superior de la colonia hasta que abarque la superficie total de la colonia, las colonias atípicas de coliformes pueden ser rojo oscuro o nucleadas sin brillo.

Cálculo de la densidad de coliformes.

Se hizo el conteo, usando filtros de membrana con 20 a 80 colonias de coliformes y no más de 200 colonias para cualquier tipo de colonia según la siguiente ecuación:

Colonias de coliformes contadas

Colonias de coliformes = ----- X 100

totales/100 ml de muestra filtrados.

(American Public Health Association, 1999)

2.2 Aislamiento y cultivo de amebas de vida libre

De cada muestra de 1L se tomaron alícuotas de 50 ml y se concentraron por centrifugación a $1000 \times g$ durante 10 minutos (centrífuga Boeco-U32). Se decantó el sobrenadante hasta dejar un volumen final aproximado de 0.5 ml y el sedimento se resuspendió y se vació en una placa de Petri con agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes* medio monoxénico (NNE) (De Jonckheere, 1979), (Anexo III). La observación de las placas de medio no nutritivo con *E. aerogenes* (NNE) se realizó con un microscopio invertido para verificar el crecimiento amebiano, revisándolas al siguiente día. En las placas de Petri con amebas se marcó la zona de mayor abundancia y se cortó un trozo de agar de aproximadamente 5 mm^2 , y se transfirió a otra placa (NNE) nueva y se mantuvo a la temperatura ambiente en posición invertida dentro de bolsas de plástico para evitar su desecación, se etiquetó cada caja según el sitio de muestreo.

2.3 Clonación

Transcurridas 24 h. de incubación se separaron los trofozoítos y se hicieron las resiembras necesarias con el objeto de aislar y separar las diferentes especies de amebas presentes en los cultivos, ya que se observó que en una estación de muestreo había diferentes especies amebianas creciendo.

2.4 Axenización

Identificados y clonados los aislados, fueron transferidos a tubos de ensaye con medio líquido para cultivo axénico PBSGM con antibióticos, esto con el fin de evitar contaminación del ambiente (Anexo III), Los trofozoítos y quistes fueron seleccionados y transferidos de las placas al medio líquido cortando la zona marcada del agar, lo anterior se hizo siempre con las mejores condiciones de esterilización para evitar contaminación externa, los tubos se incubaron a 37 °C manteniéndolos inclinados y sin agitación.

2.5 Identificación morfológica y registro fotográfico

La identificación de los aislados amebianos se hizo tomando en cuenta los criterios morfológicos de los quistes y trofozoítos amebianos, estas muestras fueron tomadas haciendo un barrido con solución salina y fueron colocadas en portaobjetos para ser observadas en el microscopio invertido en contraste de fases a 10, 20 y 40 X (Nikon Eclipse TS100) e identificadas mediante el uso de claves taxonómicas y el atlas de amebas de vida libre elaborados por Page (1988) y Pussard y Pons (1977). Se procedió a tomar un registro fotográfico con cámara fotográfica Nikon coolpix 990 y se elaboraron esquemas de cada aislado.

2.6 Medición de quistes y trofozoítos

Se hicieron preparaciones en fresco de las amebas aisladas en laminillas y se observaron en un microscopio de contraste de fases a un aumento de 40X (Nikon Eclipse TS100). De cada aislado se registró la medida de 50 trofozoítos (largo y ancho) y 50 quistes (diámetro largo y ancho si es el caso).

2.7 Pruebas de tolerancia a la temperatura

Esta prueba se realizó para conocer la temperatura máxima y óptima de crecimiento de las amebas aisladas, cada uno de los aislados se sembró por triplicado en medio NNE y se mantuvieron a temperatura ambiente (20 a 22 °C), 37, 42 y 45 °C, posteriormente las placas se observaron con un microscopio invertido a 10, 20 y 40 X aumentos durante una semana para observar su crecimiento.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Aislados amebianos

De los cuatro muestreos realizados en el periodo de febrero de 2006 a noviembre de 2007, se obtuvieron 53 muestras de agua del balneario “El Géiser”; El número de colectas se hizo tomando en cuenta la distribución del agua en el balneario, es decir, comprendió desde el origen del géiser, el principal acueducto por donde se distribuye el agua y las cuatro piscinas.

Se aislaron e identificaron 167 organismos amebianos, que corresponden a cinco géneros (*Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Leptomyxa*, *Naegleria* y *Vahlkampfia*).

En este sistema recreacional se favoreció la presencia de los géneros anteriormente citados, debido a la termotolerancia que presentan estas amebas, permitiendo de esta forma que otros microorganismos competentes fueran eliminados a esas temperaturas (Griffin, 1973).

En la figura 4 se observa que *Acanthamoeba* fue el organismo predominante sobre las demás especies (72 %), seguido del género *Naegleria* (14 %) y *Vahlkampfia* (9 %). Cabe mencionar que los dos géneros más frecuentes son de importancia epidemiológica y se han descrito de alto riesgo para los bañistas que visitan estos lugares porque son catalogados como patógenos para el ser humano (Lehman *et al.*, 1998).

La frecuencia de géneros de amebas de vida libre en los diferentes muestreos coincide con los resultados obtenidos por Rivera y colaboradores, 1993 y Lares-Villa y colaboradores en el 2001 que citan al género *Acanthamoeba* como el mas aislado en diversos cuerpos de agua.

Es importante señalar que el balneario, además de ser alimentado con aguas termales, tiene propiedades sulfurosas que forman flóculos de materia orgánica, algas y otros microorganismos que a su vez crean un microhábitat favorable para *Acanthamoeba*.

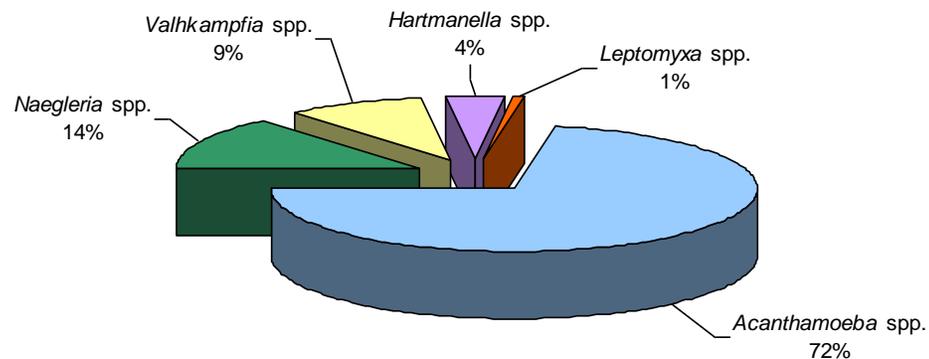


Figura 4. Proporción de los géneros amebianos encontrados en los cuatro muestreos en el agua del balneario “El Géiser”.

2. Identificación morfológica, descripción y registro fotográfico de las amebas del género *Acanthamoeba* aisladas en el balneario.

La identificación morfológica de los aislados se realizó con las claves taxonómicas y el atlas de amebas de vida libre elaborados por Page (1988) y Pussard y Pons (1977), para determinar la presencia del género *Acanthamoeba* se observó detalladamente la forma del quiste que sirve como referencia para diferenciar las especies de este género, también se hicieron observaciones de la forma trófica que se distingue fácilmente de los quistes por sus proyecciones citoplasmáticas en forma de espinas (acantópodos) (Figs. 5 y 6).

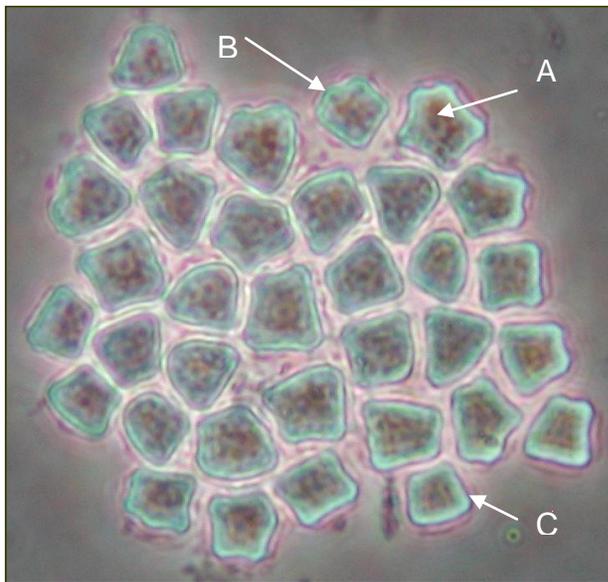
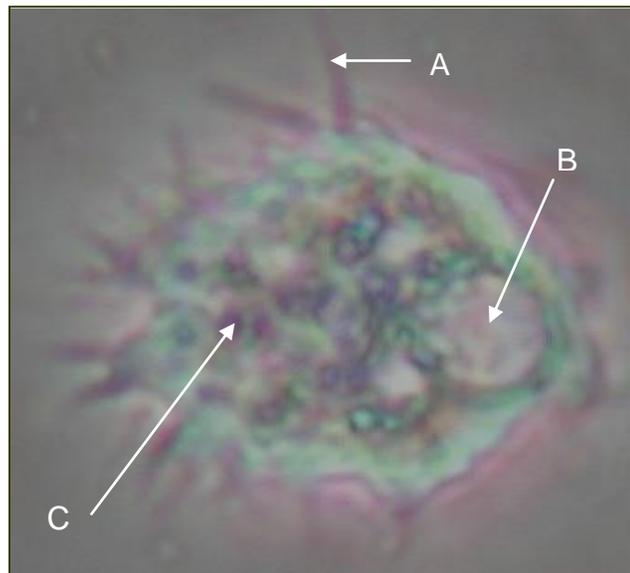


Figura 5. Quistes de *A. polyphaga*, (A) endoquiste (B) exoquiste (C) poro. Fotografía tomada en microscopio invertido en contraste de fases 40X.

Figura 6. Trofozoíto de *A. polyphaga*, (A) acantópodo (B) vacuola (C) núcleo. Fotografía tomada en microscopio invertido en contraste de fases 40X



Se determinaron siete especies del género *Acanthamoeba* y 22 aislados sólo pudieron ser identificados hasta nivel de género (Fig. 7), es importante mencionar que este porcentaje es alto debido a que estas amebas fueron muy frecuentes durante todos los muestreos y no están descritas en las claves taxonómicas.

Las especies más frecuentemente aisladas fueron *A. castellanii* y *A. polyphaga* ambas son consideradas patógenas para el ser humano ya que, infectan el sistema nervioso central (EAG) y los ojos (QA), además *A. castellanii* afecta a otros órganos como pulmón, próstata, huesos, músculos y piel (Janitschke y Martínez, 1985; Martínez, 1983 y Mathers *et al.*, 1998).

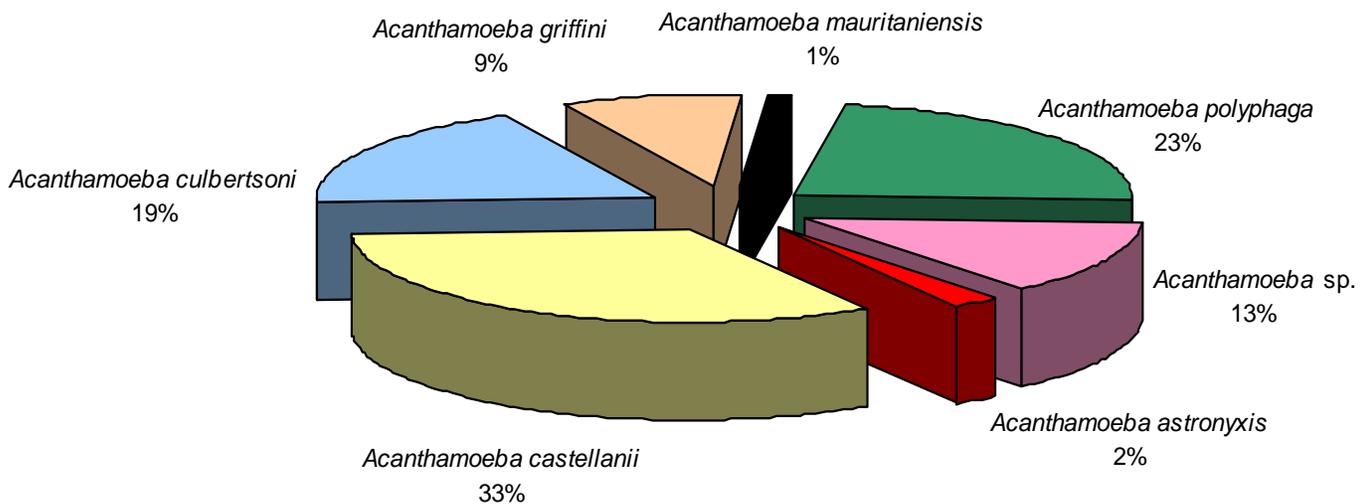
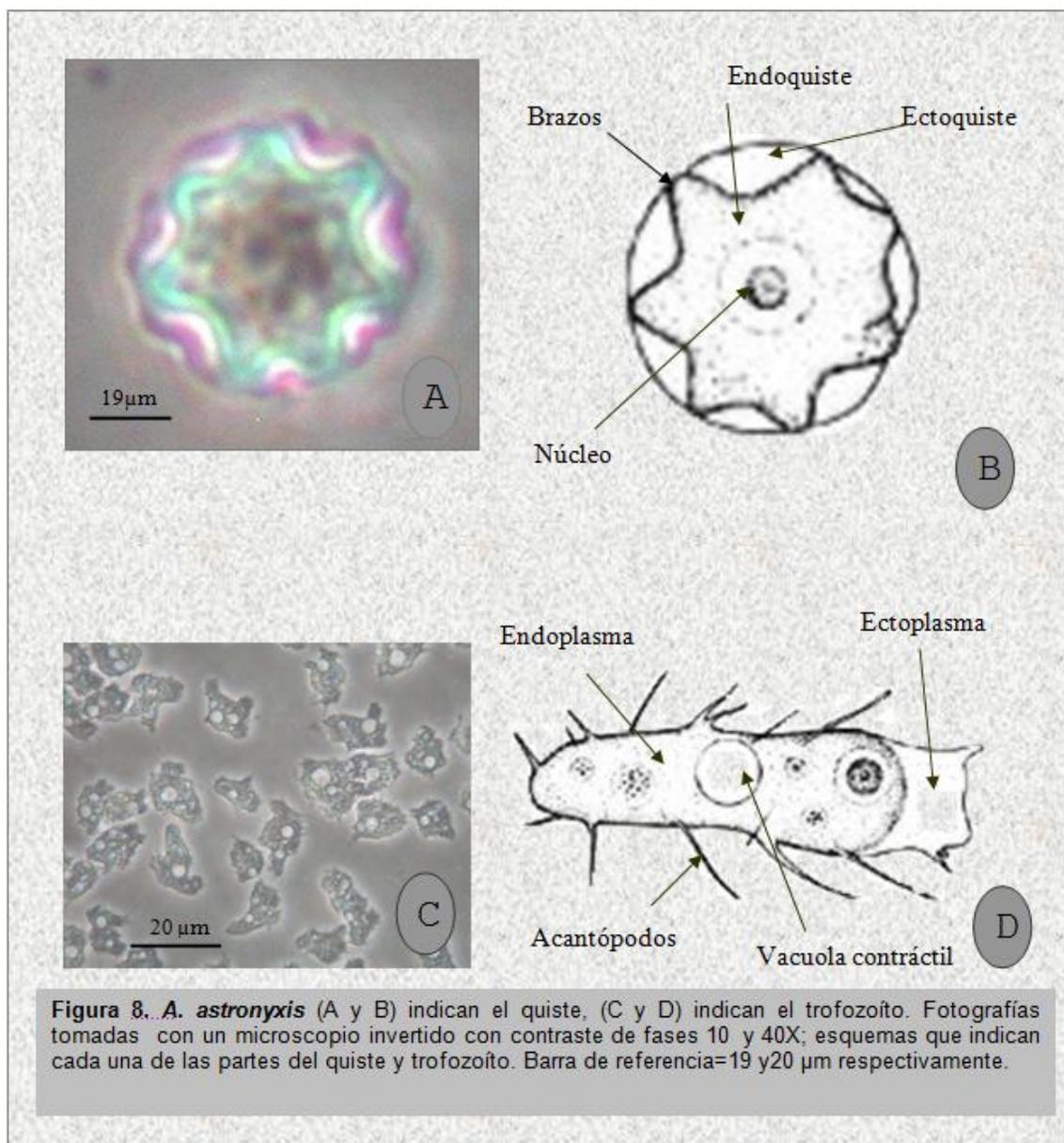


Figura 7. Porcentaje de las especies del género *Acanthamoeba* spp. encontradas en los cuatro muestreos en el agua del balneario “El Géiser”.

A continuación se muestra en detalle algunas características morfológicas y fotografías de las especies amebianas reportadas en este trabajo para el género *Acanthamoeba*.

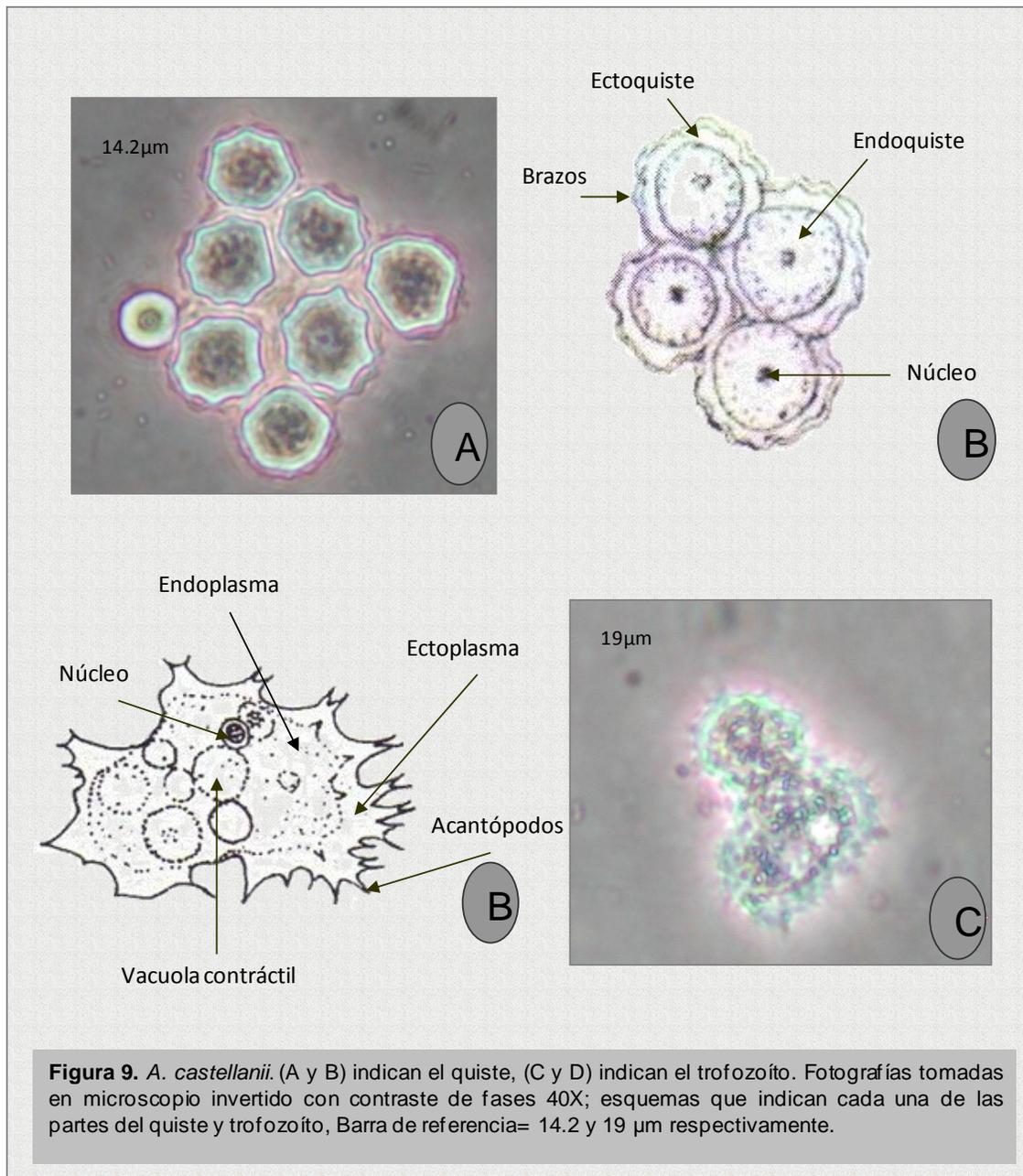
2.1 *Acanthamoeba astronyxis* Ray y Hayes, 1954. emend. Page, 1967.

La mayoría de los brazos del endoquiste están en contacto estrecho con el ectoquiste, presentan de 7 a 9 brazos; el diámetro promedio del quiste es 19.2 a 22.0 μm . Se considera patógena para el ser humano, infecta el sistema nervioso central (SNC), nódulos linfáticos, glándulas suprarrenales, piel, tiroides y senos nasales (John, 1993). Pertenece al grupo I.



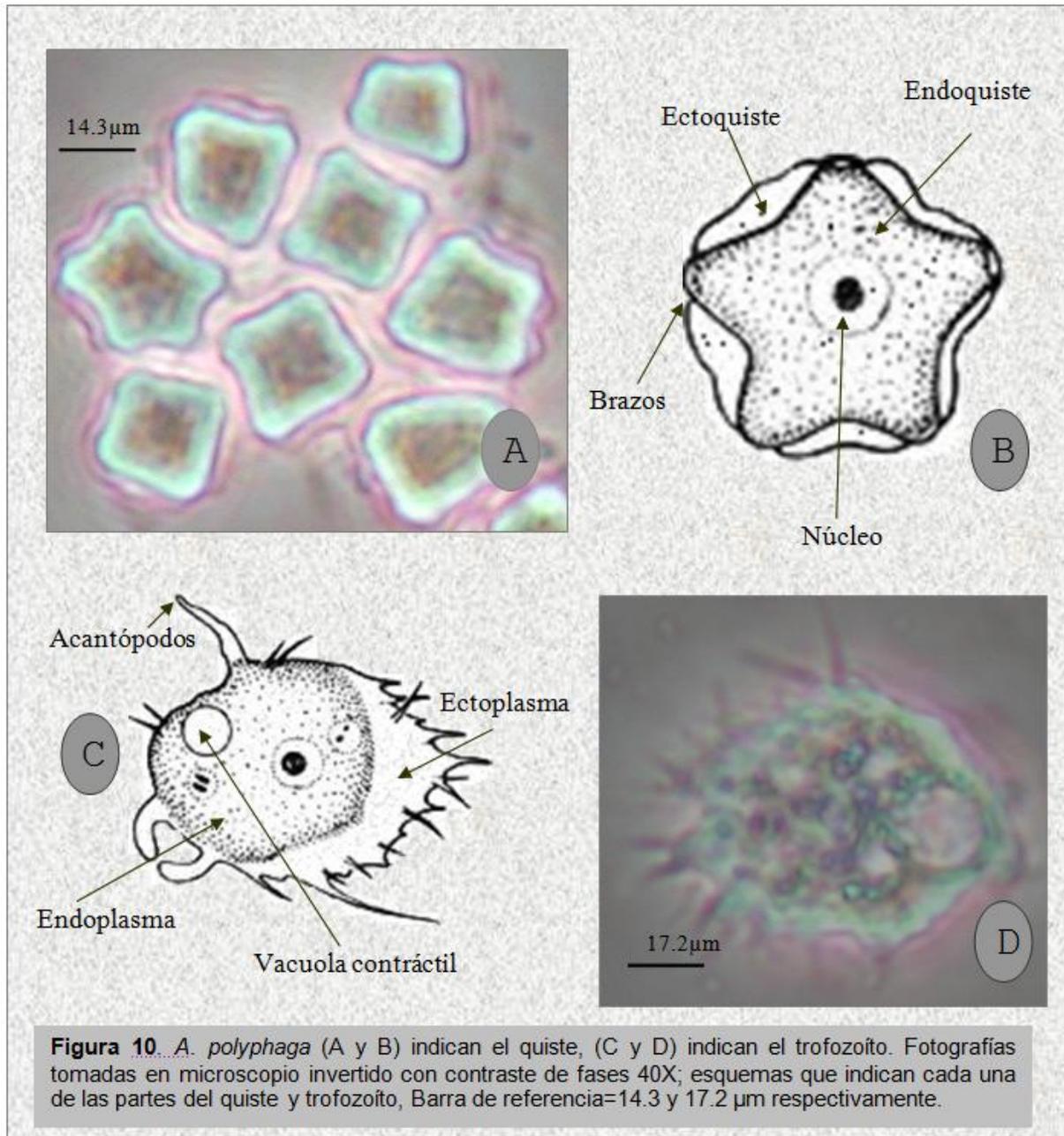
2.2 *Acanthamoeba castellanii* Douglas, 1930. emend. Volkonsky, 1931

Amebas con endoquiste más o menos esférico conectado al exoquiste por pequeños brazos cónicos, ectoquiste grueso y muy plegado; diámetro del quiste de 14 a 16 μm . Se considera patógena para el ser humano, puede infectar el sistema nervioso central (EAG), ojos (QA), pulmón (neumonía), próstata, huesos, músculos y piel (Martínez, 1983; Martínez y Janitschke, 1985; Mathers *et al*; 1998). Pertenece al grupo II.



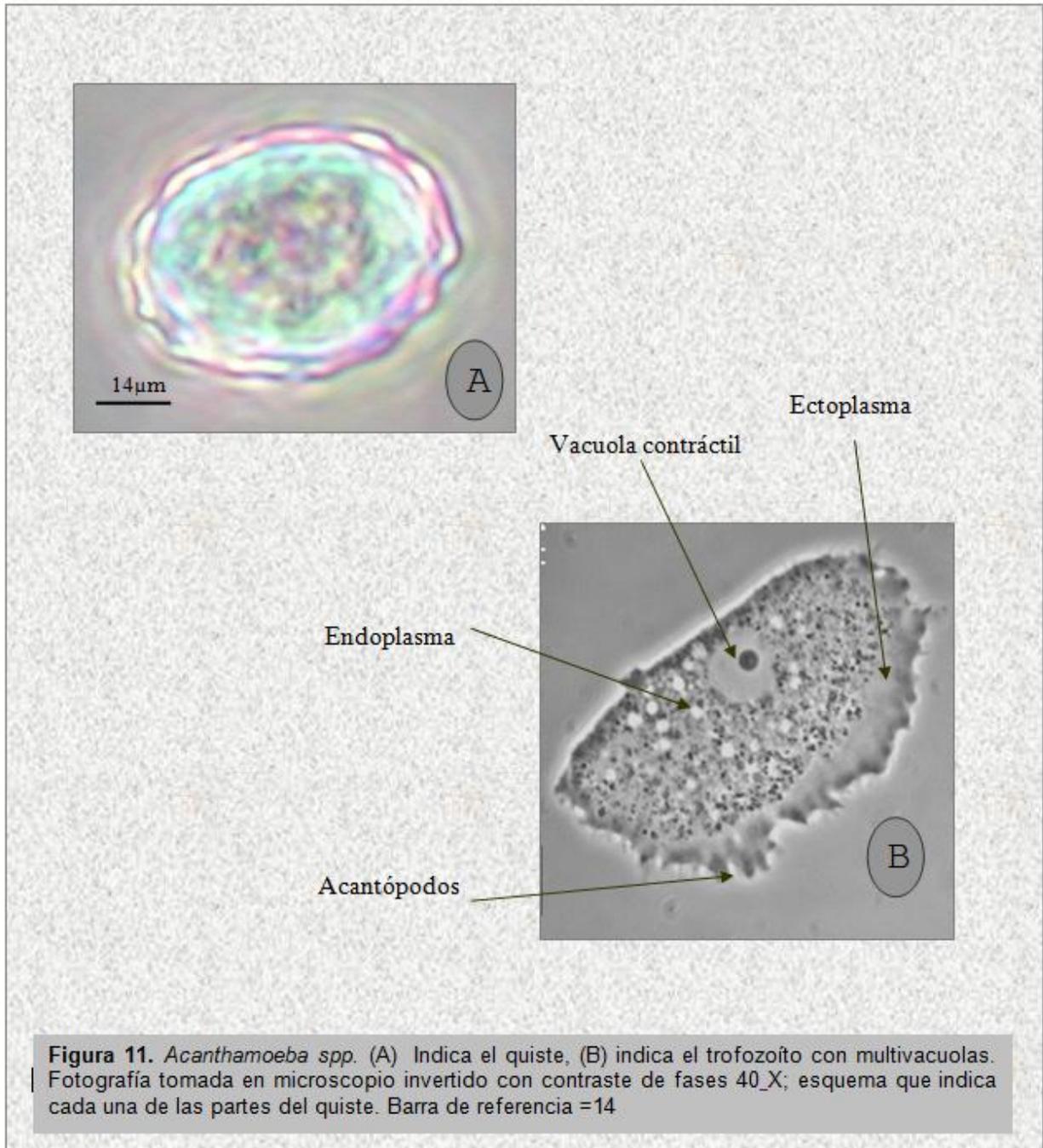
2.3 *Acanthamoeba polyphaga* (Pushkarew, 1913) Volkonsky, 1931

Endoquiste muy irregular y prácticamente nunca es estrellado, el ectoquiste es menos rugoso que en *A. castellanii*, es delgado y está ampliamente separado del endoquiste, el número promedio de los brazos es de cinco; el diámetro medio del quiste es de 14 μm . Se considera patógena para el ser humano, infecta el sistema nervioso central (EAG) y ojos (QA) (John, 1993). Pertenece al grupo II.



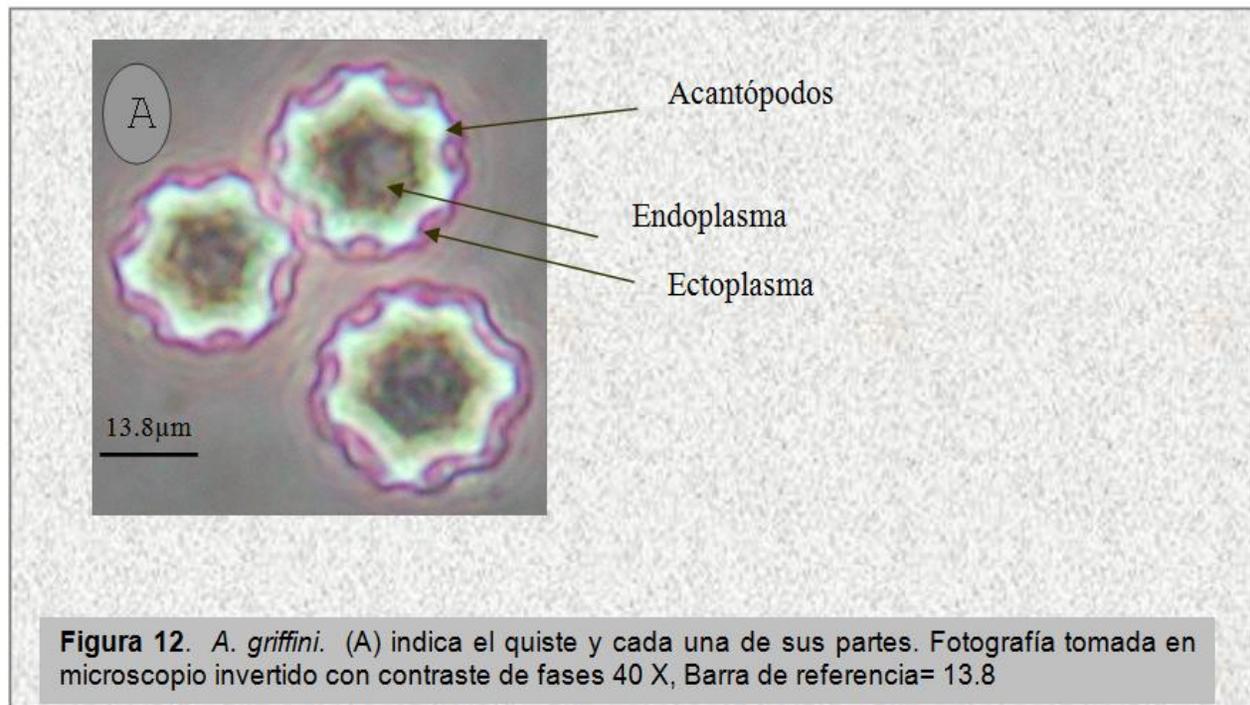
2.4 *Acanthamoeba* spp.

Endoquiste ovalado, ectoquiste pequeño, ondulado o rugoso; estrechamente plegado al endoquiste, no se observan brazos bien definidos, el diámetro promedio del quiste es de 12–14 μm .



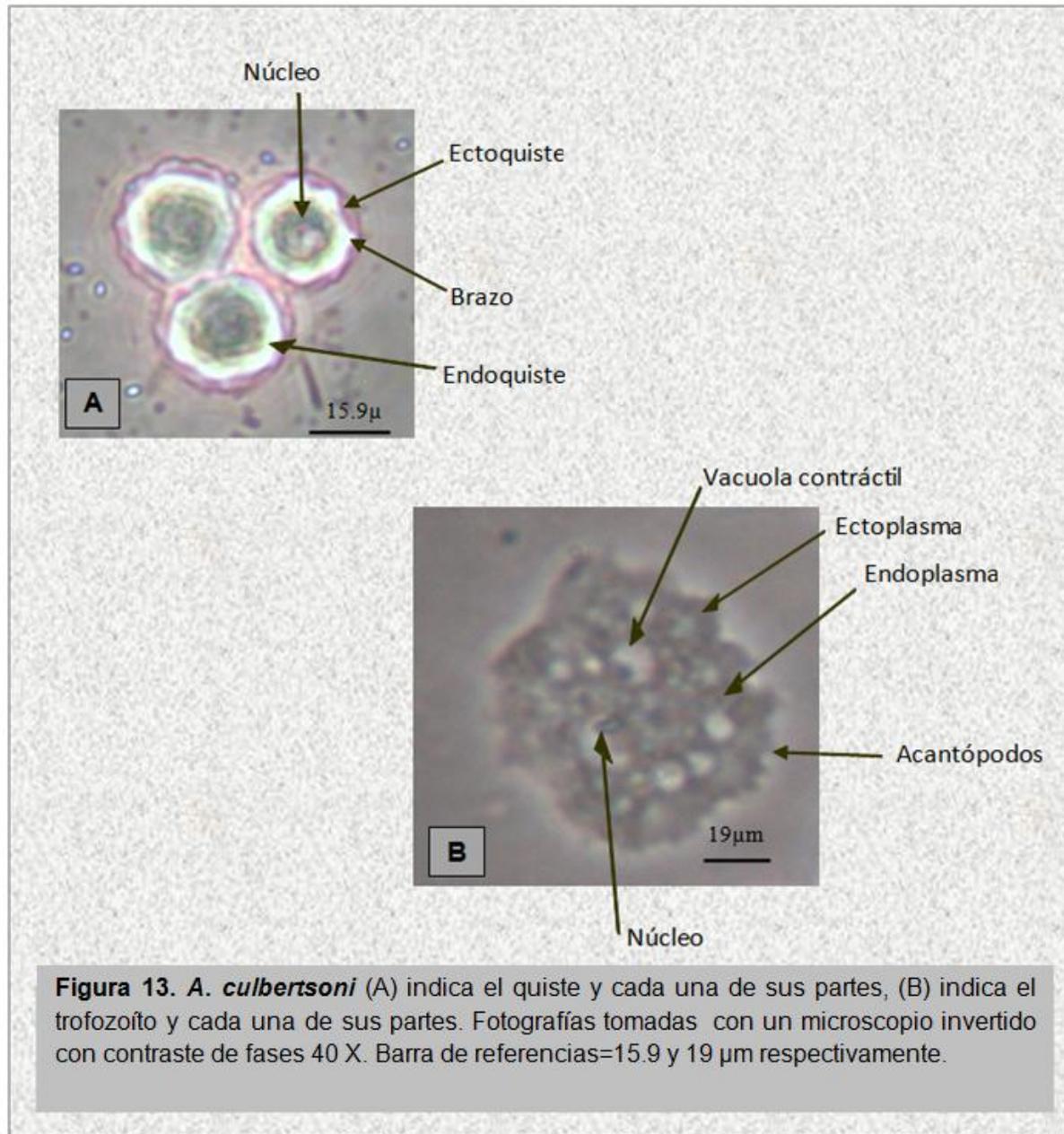
2.5 *Acanthamoeba griffini* Sawyer, 1971

Endoquiste variable, esférico u ovoide con o sin brazos, cuando los hay son cortos y algunas veces bien desarrollados en forma de estrella que dan la apariencia de rueda, ectoquiste ondulado plegado al endoquiste excepto cuando este último es estrellado, con aproximadamente seis brazos, el promedio del diámetro del quiste es de 14 μm . Pertenece al grupo II.



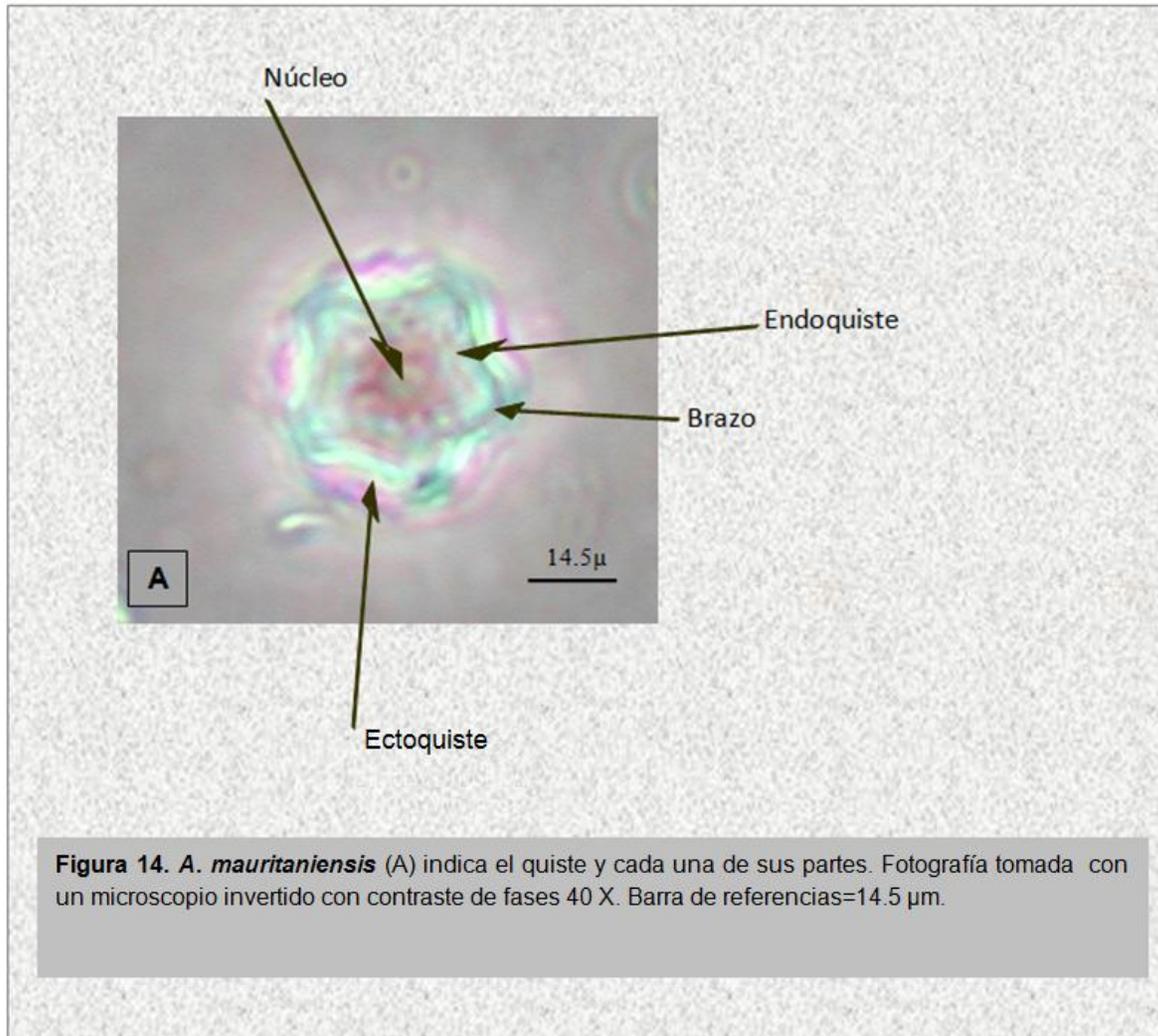
2.6 *Acanthamoeba culbertsoni* Singh y Das, 1970. emend. Page, 1967

Endoquiste redondeado, ocasionalmente de forma poligonal, ectoquiste pequeño, ondulado o rugoso; estrechamente plegado al endoquiste, aproximadamente de cinco a seis brazos, el diámetro promedio del quiste es de 15 a 18 μm . Se considera patógena para el ser humano, infecta el sistema nervioso central (EAG), ojos (QA), hígado, bazo, útero y piel (May *et al*; 1992). Pertenece al grupo III.



2.7 *Acanthamoeba mauritaniensis* Pussard y Pons, 1977.

Quiste reticulado, endoquiste esférico u ovoide, raramente poligonal, en promedio con cinco brazos pequeños, el contorno del ectoquiste es grueso y circular y no está pegado al endoquiste, el diámetro promedio del quiste es de 14 μm . Pertenece al grupo II.



3. Descripción de quistes y trofozoítos del género *Acanthamoeba*.

Se llevaron a cabo mediciones morfométricas de 50 quistes y 50 trofozoítos, (Cuadro 3) estos valores permitieron corroborar la identificación morfológica previa, debido a que el tamaño promedio de los quistes para las diferentes especies de acantamebas coinciden con el ámbito de tamaño establecido por Page (1966,1975, 1976 y 1988).

Las medidas del diámetro del quiste, de los aislados correspondientes a acantamebas se encontraron entre 13 y 17 μm , en el caso de los trofozoítos las medidas del largo y ancho también coinciden con el ámbito establecido por John (1993).

El diámetro del quiste registrado para *Acanthamoeba astronyxis*, es de 17.3 μm . mientras que Page (1988) y Pussard y Pons (1977) mencionan que el tamaño del quiste es de 19.2 a 22 μm ; lo que pondría en duda la identificación taxonómica, sin embargo los caracteres distintivos para esta especie son específicos por lo que la identidad del aislado fue clara, lo mismo sucedió con *A. mauritaniensis* la cual registró una media del diámetro del quiste de 13 μm , mientras que la literatura indica un diámetro de 14 μm , pero las características morfológicas de las amebas fueron únicas para la especie.

En el caso de *Acanthamoeba castellanii* la media del tamaño del quiste osciló entre los 14.6 μm , en el caso de *A. culbertsoni* el tamaño observado fue de 16.3 μm , *A. griffini* tuvo una media de 14.3 μm y *A. polyphaga* presentó una media en el diámetro del quiste de 14.8 μm por lo que se consideran que entran dentro del ámbito establecido por Page (1988) y Pussard y Pons (1977).

Cuadro 3. Promedio del tamaño medido de las células amebianas del género *Acanthamoeba* aisladas del balneario “El Géiser”.

| Especie | Trofozoíto X (μm) | Quiste X(μm) | No. de organismos |
|--------------------------|-----------------------------------|------------------------------|----------------------|
| <i>A. astronyxis</i> | L=19.0 A=13.0 | 17.3 | 100 |
| <i>A. castellanii</i> | L=21.2 A=13.6 | 14.6 | 100 |
| <i>A. culbertsoni</i> | L=22.4 A=17.0 | 16.3 | 100 |
| <i>A. griffini</i> | L=13.5 A=11.5 | 14.3 | 100 |
| <i>A. mauritaniensis</i> | L=15.3 A=11.2 | 13.0 | 100 |
| <i>A. polyphaga</i> | L= 16.1 A= 11.5 | 14.8 | 100 |
| <i>Acanthamoeba</i> sp. | L=11.0 A=17.4 | 13.5 | 100 |

X= Promedio de la longitud del trofozoíto y del diámetro del quiste en μm ;(L)= largo y (A)= ancho.

4. Pruebas de tolerancia a la temperatura

Se realizó una prueba de tolerancia a la temperatura, a partir de muestras de agua (Rivera y colaboradores, 1983). En el cuadro 4, se puede observar que de las siete especies del género que se ensayaron para tolerancia a la temperatura *A. culbertsoni* y *A. polyphaga* tuvieron buena tolerancia a las temperaturas expuestas durante las 72 h; mientras que *A. castellanii* también presentó un buen crecimiento a las diferentes temperaturas, sin embargo, después de 24 horas a 45 °C se detuvo el crecimiento y comenzaron a observarse formas quísticas. Es importante mencionar que

las especies antes mencionadas estuvieron distribuidas por todo el sistema recreacional, lo que confirma que estas amebas no tuvieron restricción para desarrollarse tanto a temperatura ambiente como a temperaturas extremas (mayores de 45 °C) En el caso de *A. astronyxis*, *A. griffini* y *Acanthamoeba* sp. su crecimiento fue óptimo sólo hasta los 37 °C, después de esa temperatura las formas quísticas abundaron. Los cultivos de *A. mauritaniensis* fueron problemáticos porque se contaminaban fácilmente y fue difícil determinar su tolerancia a la temperatura por lo que, el único ámbito donde se observó buen crecimiento fue a 37 °C después de 48 h.

Cuadro 4. Resultado de las pruebas de tolerancia a la temperatura de los cultivos amebianos.

| Especies de <i>Acanthamoeba</i> | Temperatura ambiental (20-22 °C) | | | Temperatura de incubación | | | | | | | | |
|------------------------------------|--|------------|------------|---------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | | | | 37 °C | | | 42 °C | | | 45 °C | | |
| | 24 hrs. | 48 hrs. | 72 hrs. | 24 hrs. | 48 hrs. | 72 hrs. | 24 hrs. | 48 hrs. | 72 hrs. | 24 hrs. | 48 hrs. | 72 hrs. |
| <i>A. astronyxis</i> | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| <i>A. castellanii</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| <i>A. culbertsoni</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>A. griffini</i> | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| <i>A. mauritaniensis</i> | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| <i>A. polyphaga</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>Acanthamoeba</i> sp. | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |

(+) Abundantes trofozoítos (abundaron trofozoítos)

(-) No hubo crecimiento (abundaron quistes)

Distribución de *Acanthamoeba* spp. en el balneario “El Géiser”

Las diferentes especies de los aislados del género *Acanthamoeba* tuvieron una distribución homogénea (desde el origen del géiser hasta la última piscina) (Fig. 15) durante los muestreos en este trabajo, debido posiblemente a que la estructura de sus quistes tienen doble pared, lo que les confiere gran resistencia al cloro y a ambientes adversos (De Jonckheere, 1979), además el trofozoíto tiene la capacidad de tolerar variaciones amplias de temperatura, pH, salinidad y disponibilidad de oxígeno (John, 1993). Por otra parte la capacidad para tolerar temperaturas elevadas les permitió desplazarse por diferentes gradientes de temperatura del agua a lo largo del sistema sin ninguna complicación.

En el primer muestreo, de un total de 17 organismos colectados seis pertenecieron al género *Acanthamoeba*, siendo este el muestreo con el menor número de aislados y menor diversidad, solo se identificaron tres especies diferentes

(*Acanthamoeba polyphaga*, *Acanthamoeba castellanii* y *Acanthamoeba* sp.). Una explicación de la causa de la diversidad de amebas pudo ser el bajo número de muestras recolectadas con respecto a los demás muestreos.

En la segunda colecta se obtuvieron 46 organismos de los cuales 21 correspondieron al género *Acanthamoeba*; las especies más frecuentemente aisladas fueron *A. polyphaga* y *A. castellanii* organismos que también fueron identificados en el muestreo anterior, además se identificaron las especies *A. culbertsoni*, *A. griffini* y *A. mauritaniensis* (esta última solo se registró en este muestreo). Cabe mencionar que esta visita se realizó en el mes de febrero, época en la cual se presentan vientos fuertes y constantes que permitirían y facilitarían la dispersión de AVL del suelo a las piscinas (Kingston, 1969).

En el tercer muestreo se obtuvo un mayor número de organismos (59), de los cuales 46 correspondieron al género *Acanthamoeba*, es decir casi el 78 % del total de los aislados, en este muestreo fue también más abundante la presencia de AVL, este hecho puede ser explicado por la temporada en la que se hizo el muestreo, la cual coincidió con el periodo vacacional de verano en México, por tanto el número de bañistas visitantes al balneario “El Géiser” fue grande y la interacción de la tierra seca que rodea a las piscinas con los bañistas fue significativa como para poder explicar la dispersión de las amebas de la tierra a las albercas, otro factor que pudo haber sido determinante para explicar la presencia de estas amebas en el agua fue el tiempo que tardo en hacerse limpieza a las piscinas, por lo general el mantenimiento se hace cada semana según datos de los ejidatarios, sin embargo, cuando es temporada vacacional el tiempo de limpieza se demora y con esto las poblaciones amebianas se pueden incrementar. En este muestreo *A. castellanii* siguió siendo la más frecuentemente encontrada en el agua, seguida por: *A. culbertsoni*, *A. polyphaga* y otra especie registrada en este muestreo que fue *A. astronyxis*.

En el último muestreo de un total de 46 muestras se obtuvieron 31 aislados que resultaron positivos para el género *Acanthamoeba*, siendo *A. polyphaga* la especie más abundante seguida de *A. castellanii*.

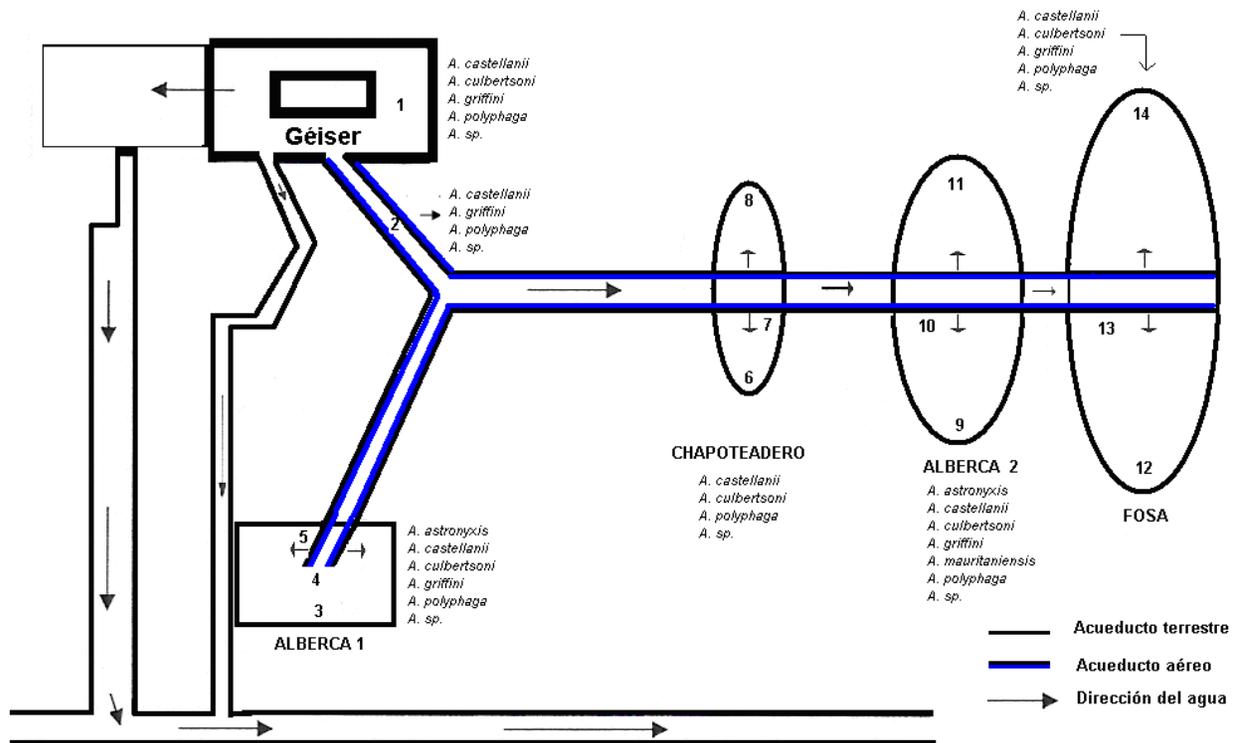


Figura 15. Distribución de especies amebianas del género *Acanthamoeba* spp. en cada una de las diferentes estaciones durante los muestreos; además se muestra el trayecto del origen del géiser hacia las diferentes piscinas.

5. Análisis fisicoquímicos

La distribución de AVL en un lugar depende de la cantidad y calidad de alimento, la presencia de depredadores o competidores y de las condiciones ambientales (Rodríguez-Zaragoza, 1994). Enseguida se muestran los datos fisicoquímicos obtenidos en este estudio y la relación referente el crecimiento y distribución de las amebas.

5.1 Temperatura del agua

Durante el transcurso de este trabajo de investigación se observó un gradiente de temperaturas en el agua desde el origen del géiser hasta la piscina más alejada; en las estaciones 1 y 2 que corresponden al origen del géiser y al acueducto respectivamente se registraron las temperaturas más altas (de 51.8 a 59 °C), sin embargo, la temperatura va disminuyendo gradualmente debido a que el agua que proviene del origen del géiser viaja a través de acueductos aéreos hasta llegar a las piscinas y permite de esta forma que el agua vaya disipando calor (Fig. 16), no obstante hay variables que pueden alterar este gradiente, por ejemplo en algunas ocasiones las piscinas tenían poco tiempo de haber sido llenadas a diferencia de otras, asimismo la

profundidad de las albercas era diferente entre una y otra por lo que tomó mayor tiempo para que se enfriara el agua.

Considerando lo anterior se pudo observar (Fig. 17) que las estaciones 12, 13 y 14 del segundo muestreo tuvieron un incremento en la temperatura con respecto a las registradas en esas mismas estaciones en los demás muestreos. Es importante mencionar que en el primer muestreo no se tomaron en cuenta las estaciones 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12 y 13; debido a que en un principio se pretendía hacer una sola colecta por piscina, no obstante, fue notorio presenciar en la primer visita que los bañistas prefieren determinados lugares de las albercas en especial donde se ubican escalones. Es por esta razón que se procedió a tomar colectas de agua de las orillas y del centro de la piscina que también son lugares donde se concentra la mayor concentración de materia orgánica.



Figura 16. La flecha indica el acueducto aéreo por donde viaja el agua para abastecer las diferentes piscinas del balneario.

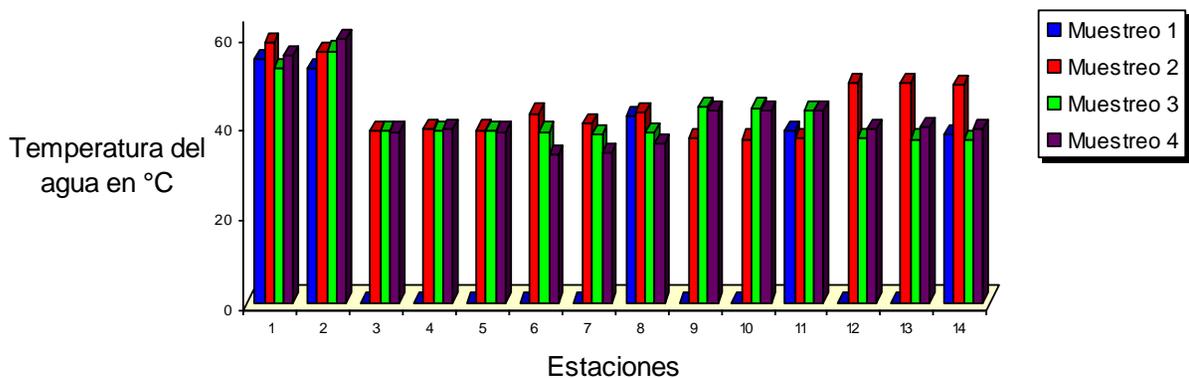


Figura 17. Valores de temperatura del agua registrada en las diferentes zonas del balneario durante los cuatro muestreos.

El ámbito de temperatura que se encontró en los cuatro muestreos osciló entre los 38.2 a 55.8 °C, con una diferencia de 17.6 °C (Anexo I). Estos intervalos de temperatura favorecieron la presencia de organismos termófilos como es el caso de

Acanthamoeba (Marciano–Cabral y Fulford, 1986); sin embargo, la relación de estas temperaturas y la presencia de acantamebas no está bien definida, por lo cual la temperatura del agua no fue el principal factor que afectó la distribución de amebas (Tyndall *et al.*, 1989).

Por otra parte en este estudio se observó que las amebas se encuentran presentes a temperaturas similares a la temperatura promedio del cuerpo humano (37 °C), lo que facilita su capacidad como oportunista para facultarlas de invadir a los usuarios de este balneario, además que juegan un papel importante como vehículos de transporte de diferentes bacterias patógenas como es el caso de: *Legionella*, *Listeria* y *Vibrio* (Marciano–Cabral *et al.*, 2002).

5.2 Temperatura atmosférica

Autores como Sykora y cols. (1983) aseguran que la distribución de amebas está estrechamente relacionada con la temporada del año, siendo la época de lluvias donde más se incrementan las poblaciones amebianas. Con respecto a la zona donde se ubica el balneario “El Géiser” esta se encuentra en una región semidesértica y la temporada de lluvias es corta e intermitente, por lo que los muestreos no coincidieron con lluvias y por lo tanto no se pudo comprobar su relación con la distribución de amebas en el sitio. Sin embargo, en el tercer muestreo realizado en el mes de agosto se encontró el mayor número de aislados amebianos y se registraron los valores de temperatura más altos; por lo que corresponde a los demás muestreos en las diferentes estaciones la temperatura atmosférica fue muy constante. Esto es aparente en el muestreo 1 donde los valores oscilaron entre 18 a 27 °C, en el segundo muestreo la temperatura máxima fue de 28 °C en el origen del géiser y la mínima fue de 17 °C y en la última toma de muestra los valores fluctuaron entre 17 a 27 °C (Fig. 18).

En este trabajo no se pudo demostrar que la temperatura atmosférica tuvo influencia directa sobre el comportamiento de las AVL, ya que en este balneario la temperatura del agua depende principalmente de la dinámica del géiser y no del ciclo estacional, por lo que la dinámica de la distribución de las amebas se debió a diversos factores como la temperatura del agua, cantidad de materia orgánica y a aumento en la afluencia de visitantes en la temporada vacacional que facilitó el arrastre de amebas del suelo a las piscinas, entre otros agentes.

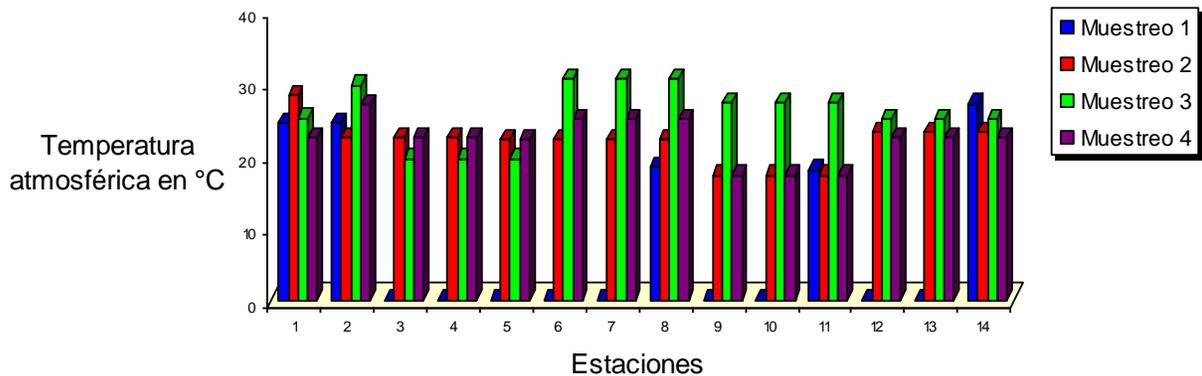


Figura 18. Valores de temperatura atmosférica registrada en las diferentes zonas del balneario durante los cuatro muestreos.

5.3 Porcentaje de saturación de oxígeno disuelto (OD)

Las amebas de vida libre son organismos estrictamente aerobios, sin embargo, pueden tolerar condiciones microaerofílicas, como en el caso de *Acanthamoeba*, que puede resistir bajas concentraciones de oxígeno, y gracias a que desarrollan un quiste pueden incluso sobrevivir en condiciones anaerobias, en especial *Acanthamoeba castellanii* la cual tiene la capacidad de emplear una ruta metabólica alterna (Lloyd *et al.*, 1981).

Turne y colaboradores (1997), realizaron un estudio donde sometieron a *Acanthamoeba* a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto (OD) encontrando que a valores de 21 % no sufren ninguna alteración los trofozoítos, pero a concentraciones de 5.2 % comienza a haber enquistamiento.

Dadas las condiciones de elevadas temperaturas encontradas en el área de estudio se esperaban encontrar concentraciones de oxígeno disuelto bajos, sin embargo, los niveles altos de OD registrados en el agua pueden ser explicados por la circulación de la misma a través de acueductos aéreos (Fig. 16) y por el movimiento y actividades que realizan los bañistas lo que permite que el agua pueda alcanzar niveles altos de oxígeno.

Los valores de OD en el agua registrados durante los muestreos fluctuaron entre 31 y 71 % (Fig. 19), esto indica una gran diferencia entre el valor mínimo y el máximo para este parámetro, la razón por la que estos valores oscilaron podría ser la tasa de transferencia de oxígeno que se ve afectada por las diferentes temperaturas, en el caso del muestreo 1 los valores fueron de 31 a 64 %, en el muestreo II los valores variaron en 38 a 67 %, en el tercer muestreo se presentaron los niveles más bajos de concentración de OD y finalmente en el cuarto muestreo se registró un intervalo de 37 a 71 %.

Los datos indican que las concentraciones de OD no fueron un factor limitante en la presencia de AVL, sin embargo, si pueden mostrar de manera indirecta en qué fase de su ciclo se encuentran (John, 1993).

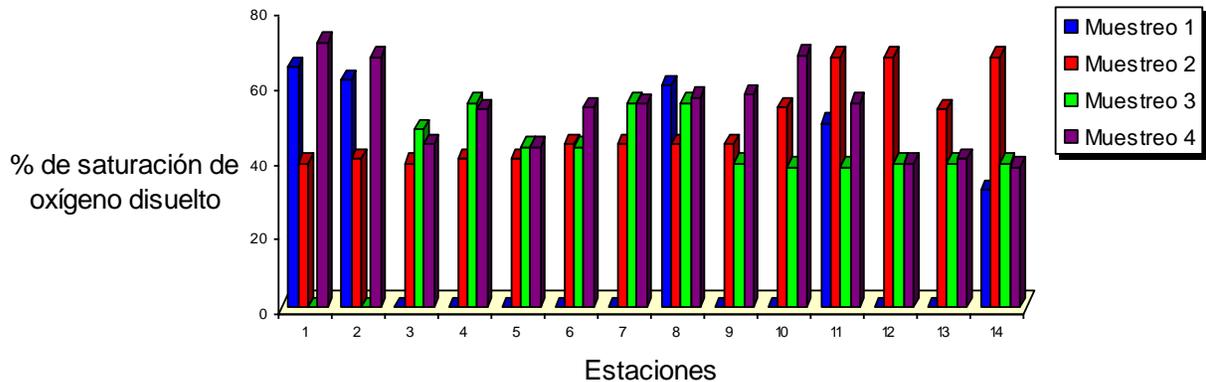


Figura 19. Valores de porcentaje de saturación de oxígeno disuelto registrado en las diferentes zonas del balneario durante los cuatro muestreos.

5.4 pH

El pH se refiere a la concentración de hidrogeniones activos (H^+) y a la interacción de los componentes sólidos y líquidos. El valor de pH se expresa en valores positivos de 0 a 14 y tres son las condiciones posibles de pH en el agua: la acidez (<7), la neutralidad (7) y la alcalinidad (>7).

Los valores de pH encontrados en este trabajo fluctuaron entre 9 a 9.3, estos datos se encuentran por encima con respecto a los límites permisibles reportados por el Anteproyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-000-SSA1-2005 para aguas de uso recreativo que indican un ámbito estrecho de 7.2 a 7.6 (Secretaría de Salud, 2005).

Estos valores de pH elevados se deben principalmente al tipo de suelo alcalino (foezem, pH 7-8) que al contacto con el agua disuelve las sales que posteriormente son llevadas a las piscinas.

En la figura 20 se observa que los valores de pH registrados durante los diferentes muestreos se ajustan al ámbito de crecimiento y supervivencia de amebas según reportes de (Kyle y Noblet, 1985) y es evidente que las amebas no estuvieron sometidos a cambios amplios de pH por lo que este parámetro no se considero un factor limitante que influyera en la distribución de *Acanthamoeba*.

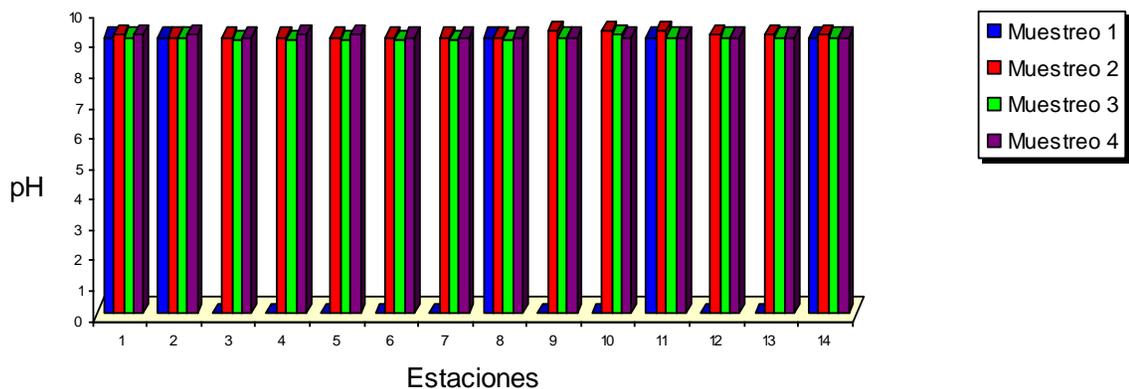


Figura 20. Valores de pH registrado en las diferentes zonas del balneario durante los cuatro muestreos.

5.5 Conductividad

Durante los muestreos la medida de los valores de conductividad oscilaron entre 2.5 a 5.6 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$, parámetro al que las amebas de vida libre tienen una amplia tolerancia (Rivera *et al*; 1994), particularmente aquellas del género *Acanthamoeba* las cuales tienen una doble pared en su quiste, por otra parte, las formas tróficas de las amebas tienen la capacidad de tolerar cambios de salinidad y presión osmótica más allá de los valores registrados en este trabajo (Rodríguez- Zaragoza, 1996), por lo que se consideró a este parámetro como un factor que no restringe el desarrollo de las especies amebianas aisladas en el balneario “El Géiser”.

En la figura 21 se muestra que los valores más bajos correspondieron a las lecturas registradas en el primer muestreo, mientras que en el segundo y el tercero los registros indicaron valores de fluctuación muy bajos, este comportamiento puede ser explicado posiblemente porque del géiser emana un chorro de agua de manera intermitente permitiendo que las concentraciones y el arrastre de sólidos no sean las mismas en cada emisión de agua, es importante mencionar que en el último muestreo no se evaluó este parámetro debido a que el equipo de medición se averió.

En gráfica de la figura 21 se muestra que las estaciones 9,10 y 11 presentaron los valores más altos durante todos los muestreos, ocasionalmente estas estaciones correspondieron a la piscina más frecuentada por los visitantes por lo que se cree que los bañistas tuvieron una influencia en el aumento de la conductividad al transportar tierra a las piscinas y arrojar partículas diversas. Al mismo tiempo de manera natural se notó la presencia de insectos, ramas y hojas sobre las piscinas lo que pudo haber influido en el incremento de la conductividad y trajo consigo agregados de amebas adheridas a partículas flotantes.

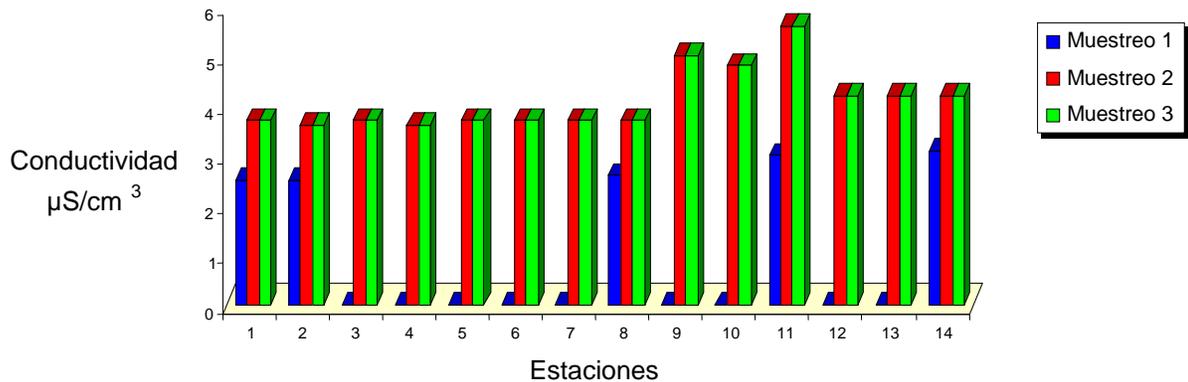


Figura 21. Valores de conductividad registrada en las diferentes zonas del balneario durante los tres muestreos.

6. Análisis bacteriológicos

6.1 Coliformes totales

Los valores registrados para este parámetro fueron fluctuantes entre los muestreos, por ejemplo, en el primero de las 14 estaciones registradas la piscina más frecuentada por bañistas tuvo una concentración de coliformes totales de 200 UFC/100 ml, mientras que las demás estaciones incluidos el géiser y el acueducto donde no hay mucha actividad de personas no se reportó la presencia de coliformes; en el segundo muestreo los valores oscilaron entre 100 y 250 UFC/100 ml, sin embargo, en el tercer muestreo fue evidente un incremento en los valores de bacterias en el agua (Fig. 22), esta diferencia seguramente obedece a que este muestreo se llevó a cabo en la temporada vacacional donde el número de visitantes fue elevado y a simple vista se podía observar que el agua de las piscinas era más turbia en contraste con la de los demás muestreos, en esta ocasión se registraron también una mayor diversidad y abundancia de amebas. Rodríguez (1994), sugiere que existe una relación muy estrecha entre la disponibilidad de materia orgánica y la presencia de amebas es por esto que se considera que el aumento en la presencia de *Acanthamoeba* fue mayor que en los muestreos anteriores, lo que significa además un riesgo a la salud de las personas que frecuentan estos sitios por que las amebas además de ser consideradas como organismos oportunistas juegan un papel importante como vía de transporte de bacterias patógenas como *Legionella* y *Vibrio*, entre otras (Marciano-Cabral *et al.*, 2000). Los valores elevados estuvieron distribuidos en la piscina más visitada, teniendo 725 UFC/100 ml, seguida del chapoteadero que es el principal atractivo de los niños.

Finalmente en el cuarto muestreo fue donde se registraron los valores más bajos para la concentración de coliformes totales de todas estaciones, las cifras estuvieron entre 10 a 75 UFC/100 ml y su medida se relaciona por el hecho de que horas antes las piscinas habían sido lavadas, sin embargo, las bajas concentraciones de coliformes no

se consideran como una limitante para la distribución de amebas ya que estos microorganismos (amebas) se alimentan simultáneamente de levaduras, hongos y otros protozoos (Marciano-Cabral, 1987).

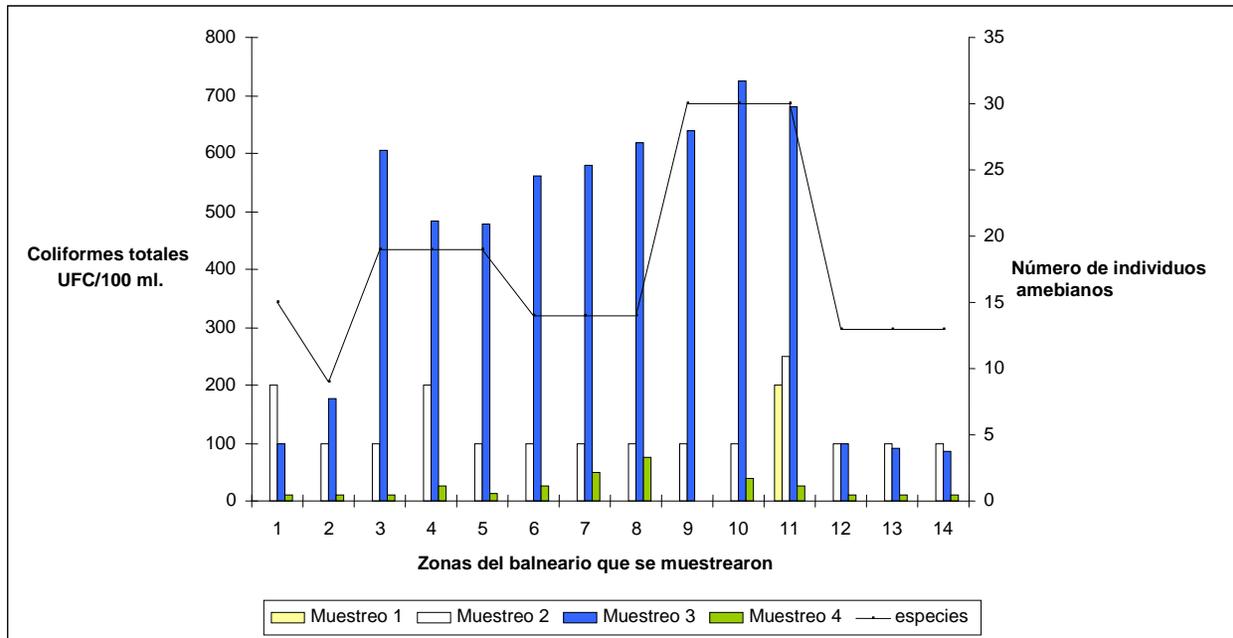


Figura 22. Valores de coliformes totales registrada en las diferentes zonas del balneario durante los cuatro muestreos.

IV. CONCLUSIONES

En cuatro muestreos realizados durante un año a partir del agua del sistema recreacional “El Géiser” se aislaron e identificaron 167 aislados amebianos pertenecientes a cinco géneros: *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Leptomyxa*, *Naegleria* y *Vahlkampfia*; El género más frecuentemente aislado fue *Acanthamoeba* (72 %).

Por morfometría se identificaron siete especies dentro del género *Acanthamoeba*: *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. griffini*, *A. mauritaniensis*, *A. polyphaga* y *A. sp.* las especies más frecuentemente aisladas fueron *A. castellanii* y *A. polyphaga*, ambas especies son consideradas patógenas para el ser humano debido a que infectan el sistema nervioso central causando la EAG y los ojos provocando la (QA), además *A. castellanii* afecta a otros órganos como pulmón, próstata, huesos, músculos y piel.

Los ensayos para tolerancia a la temperatura indicaron que *A. culbertsoni* y *A. polyphaga* tuvieron un crecimiento óptimo a las temperaturas expuestas durante las 72 horas; es importante mencionar que las especies antes mencionadas estuvieron distribuidas por todo el sistema recreacional, lo que confirma que estas amebas no tuvieron restricción para desarrollarse tanto a temperatura ambiente como a temperaturas extremas (mayores de 45 °C) y hay que recordar que todas las amibas patógenas son termófilas.

Con respecto a la relación de la presencia de amebas de género *Acanthamoeba* con los factores ambientales: Temperatura del agua, oxígeno disuelto (OD), conductividad, pH, no se pudo establecer una influencia significativa sobre el crecimiento de las amebas; por lo que se concluye que en el balneario “El Géiser” se observó un ambiente acuático muy estable que no se ve influenciado por los cambios ambientales en las diversas épocas del año.

X. RECOMENDACIONES

Mediante observaciones directas efectuadas en los diferentes muestreos, se comprobó que los hábitos de los bañistas no son los adecuados, ya que por la falta de infraestructura y de cultura muchos visitantes no se bañan antes de ingresar a las piscinas, además no tienen ninguna restricción las personas que acuden enfermas o con infecciones en la piel, lo que facilita la acción oportunista de *Acanthamoeba*, también se observó que las albercas están rodeadas de tierra, es decir los bañistas transportan fácilmente cantidades importantes de tierra a las piscinas, promoviendo con esto que se incorporen al agua grandes cantidades de materia orgánica que sirven como alimento para el crecimiento óptimo de las amebas además de que significa un aporte continuo de bacterias al sistema; aunado a esto los niveles de cloro insuficientes o nulos favorecen la aparición de enfermedades causadas por AVL. Tomando en cuenta lo anterior y considerando que en el balneario “El Geiser” los resultados arrojaron la presencia de microorganismos con potencial patógeno en las diferentes piscinas se recomienda de manera puntual:

- Bañarse antes de entrar a las piscinas
- Personas enfermas y con infecciones en la piel deben abstenerse de entrar a las albercas.
- Prohibido nadar con lentes de contacto, debido a que se registraron especies causantes de QA.
- Vigilar y analizar con mayor frecuencia la calidad microbiológica del agua.
- Debido a que no es conveniente clorar el agua por su flujo continuo y alta temperatura se recomienda dar mantenimiento y limpieza constantes en las piscinas para eliminar sedimentos y eliminar biopelículas en las paredes.

XI. LITERATURA CITADA

- Adl, S., Simpson, A., Farmer, M., Andersen, R., Anderson, R., Barta, J., Bowser, S., Brugerolle, G., Fensome, R., Fredericq, S., James, T., Karpov, S., Krugens, P., Drug, J., Lane, C., Lewis, L., Lodge, J., Lynn, D., Mann, D., Mccourt, R., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S., Nerad, T., Shearer, C., Smirnov, A., Spiegel, F. y Taylor, M. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protist. *J. Eukariot. Microbiol.* **52**(5): 399-451.
- American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation. 1999. Standard methods for the examination of water and wastewater. 14th ed. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation, Washington, D.C.
- *Anteproyecto de Norma Oficial Mexicana PROY- NOM-000-SSA1-2005. Requisitos sanitarios y calidad de agua que deben cumplir las albercas de uso recreativo humano.* Disponible en: <http://www.h2osoluciones.com/documentos/normas/albercas/PROY-NOM-000-SSA1-2005.%20Requisitos%20sanitarios%20y%20calidad%20de%20agua%20que%20deben%20cumplir%20las%20albercas%20para%20uso%20recreativo%20human o..pdf>. consultado el 03 de junio de 2007.
- Arredondo-Figueroa, J. L. y Ponce-Palafox, J. T. 1998. *Calidad del Agua en Acuicultura. Conceptos y Aplicaciones.* AGT Editor S. A. México. 221 pp.
- Beaver P. Ch. y Jung R. 1994. *Parasitología Clínica.* Editorial Salvat. México.
- Biddick, C., Rogers, L. y Brown, T. 1984. Viability of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebae in long-term storage at a range of temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **4** (48): 859-860
- Bottone, E. 1993. Free-living amoebas of the genera *Acanthamoeba* and *Naegleria*: an overview and basic microbiologic correlates. *Mount. Sinai J. Med.* **4** (60): 260-270
- Corliss, J. O. 1998. Clasificación de protozoa and protest: the current status. **En:** Coombs, G. H., Vickerman K, Sleigh M. A. y Warrren A. (eds.) *Evolutionary Relationships Among Protozoa.* Kluger Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands pp.409-447.
- Culbertson, C. G., Smith, J y Minner, J. 1958. *Acanthamoeba* observations on animal pathogenicity. *Science.* **127**: 1506

- De Jonkheere J. F. 1979. Studies on pathogenic free-living amoebae in swimming pools. *Bull. Inst. Pasteur* **77**: 385-392.
- 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: The Biology of Free Living Phagotrophic Protists*. Springer Verlag, Wisconsin. 197 pp.
- Gallegos- Neyra, E. M. 1997. *Amebas de vida libre Potencialmente Patógenas en Cuerpos de Agua de Uso Recreativo en el Estado de San Luis Potosí*. Tesis Doctoral en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias UNAM. México. 130 pp.
- Gobierno del Estado de Hidalgo. 2011. Disponible en: <http://www.Hidalgo.gob.mx> Consultado el 23 de mayo de 2006.
- Honigberg, B. M., Balamuth, W., Bovee, E. C., Corliss, J. O., Gojdics, M., Hall, R. P., Kudo, R. R., Levine, N. D., Loeblich, A. R. Jr., Weiser, J y Wenrich, D. H. 1964. A revised classification of the phylum protozoa. *J. Protozool.* **11**:7-20.
- Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Hidalgo, 2002: Disponible en: http://www.e-local.gob.mx/wb2/ELOCAL/EMM_Hidalgo. Consultado el 23 de mayo de 2006.
- John, D. T. 1993. *Opportunistically Pathogenic Free-living amoebae*. En: *Parasitic Protozoa*. Ed. por Kreier J.P y Baker J.R, Academic Press, Nueva York. 143-246
- 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. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microbiol. Pathogenesis.* **34**:277-285.
- 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. E. y Noblet, G. P. 1986. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoeba. I. Willard's Pond. *J. Protozool.* **33**(3):422-434.
- Kingston, D. y Warhust, D. 1969. Isolation of amoeba from the air. *J. Med. Microbiol.* **2**: 27-36.

- Lares V. F. Ayala, M. I. T. y Verdugo, E. E. 2001. *Amebas de vida libre aisladas de jacuzzis y piscinas de uso recreativo en Hermosillo, Sonora. ITSON-DIEP. 3* (10). 39-47
- Ledezma, R. H. 1987, El calor de la tierra. Disponible en: <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/vol2/ciencia3/058/htm/tierra.htm>. Consultado el 17 de junio de 2008.
- Lehmann, O. J., Green, S. M., Morlet, N., Kilvingston, S., Keys, M. F., Matheson, M. M., Dart, J. K. G, McGill J. I. y Watt, P. J. 1998. Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *IOVS. 39*:7:1261-1265.
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M. Leedale, G. F., Loeblich, A. R., Lom, J., Lynn, H. D., Merinfeld, Page, F. C. Poljansky, G. I., Sprague, V., Vavrá J., y Wallace, F.G. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool. 27*:37-58.
- 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.
- Marciano, C. F., Puffenbargaert, R y Cabral, G. A. 2000. The increasing importance of *Acanthamoeba* infections. *J. Euk. Microbiol. 47*:29-36.
- Martnez, A. J. 1983. Isolation of the two strains of *Acanthamoeba culbertsoni* from human tissue and their pathogenicity and isoenzyme profiles. *J. Clin. Microbiol. 18*: 1405-1412.
- Martinez, A. J. y Janitsschke, J. 1985. *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism; A review. *Infection. 13*: 251-256.
- Martínez-Pérez, J. A., Elías Gutiérrez, M. y Varona, D. E. 2004. *Protozoología; Aspectos Morfofuncionales*. FES Iztacala. México. 242 pp.
- May, L. P, Sidhu, G. S, Buchness y M. R. 1992, Diagnosis of *Acanthamoeba* infection by cutaneous manifestations in a man seropositive to HIV. *J. Amer Academy Dermathol. 26*(2): 352–355.
- Merckell E. y Voge M. 1989. *Parasitología Médica*. Editorial Interamericana. 6a Edición Madrid, España. 1092 pp.

- Muñoz V., Reyes H., Toche P., Cárcamo C. y Gottlieb, B. 2003. Aislamiento de amebas de vida libre en piscinas públicas de Santiago de Chile. *Parasitol. Latin.* **58**:106-111.
- Omaña, M. M. 1997. Estudio comparativo de 3 cepas del género *Acanthamoeba* responsables de los primeros casos detectados de queratitis amibiana en México. Tesis de Maestría en Ciencias. UNAM-FES Cuautitlán. México. 166pp.
- 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 en Ciencia y Tecnología, University of Wisconsin. 150 pp.
- Page, F. 1975. Morphological variation in the cyst wall of *Naegleria gruberi* (Amoebida, Vahlkampfiidae). *Protistology.* **11**:195-204
- Page, F. 1976. *An Illustrated Key to Freshwater and Soil Amoebae with Notes on Cultivation and Ecology.* Freshwater Biological Association, Scientific Publication, Londres. 180pp.
- Page F. C. 1988. *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae with Instructions for Culture.* Freshwater Biological Association Scientific Publication, Londres. 122pp.
- Pussard., M. y Pons, R. 1977 Morphologie de la paroi kstique et taxonomies du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistol.* **13**: 557-598.
- Rivera, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Calderón, A., Rodríguez, S., Ortiz, R., Hernández, D. y Rivera, V. 1994. Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in México City and its suburbs. *Water, Air, and Soil Pollut.* **74**: 65-87.
- Rivera, F., Ortega, A., López, E y Paz, M. 1979. A quantitative morphological, and ecological study of protozoa polluting tap waters in Mexico City. *Trans. Amer. Micr. Soc.* **98**:465-469.
- Rivera, F., Paz M. y López, E. 1978. Transformación ameboflagelar espontánea e inducida en especies del género *Naegleria*, Alexeieff (1912), emend. Calkins (1913), recolectadas en piscinas, grifos y reservorios naturales de agua dulce de la ciudad de México. *Arch. Mex. Anat.* **15**: 9-19.
- 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.

- Rivera, F., Ramírez P., Vilaclara, G, Robles, E. y Medina, F. 1983. A survey of pathogenic and free living amoebae inhabiting swimming pool water in Mexico City. *Environ. Res.* **32**: 205-211.
- Rodriguez, S. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Critic. Rev. Microbiol.* **20**(3): 225-241.
- Rondanelli, E. G. 1987. *Infectious Diseases. 1. Amphizoic Amoeba Human Pathology*. Piccin Nuova Libreria. Padua, Italia. 279 pp.
- Seas, R. C. y Bravo, P. F. 2006. Encefalitis amibiana granulomatosa por *Balamuthia mandrillaris*: una enfermedad fatal reconocida cada vez mas frecuente en América Latina. *Rev. Chil. Infect.* **23** (3):197-199.
- Schuster, F. y Visvesvara, G. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and no-opportunistic pathogens of human and animals. *Inter.J. Parasitol.* 1-27.
- Sleigh, M. 1989. *Protozoa and Other Protists*. Routledge, Chapman, Hall, New York. 320pp.
- Sminorv, A. y Thar, R. 2003. Spatial dstrubtion of Gymnamoebae (Rhizopoda, Lobosea) in brackish-water sediments at the sacale of centimeters and milimeters. *Protist.* **154**: 359-369
- Sykora, J., Keleti, G., y Martínez, J. 1983. Ocurrence and pathogenic of *Naegleria fowleri* in artificially heated waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **45** (3): 974-979.
- Tello, E. H. 1986, Geoquímica del agua de manantiales termales de la zona geotérmica de San Antonio el Bravo. *Rev. Mex. de Geoenergía.* **2** (2); 111-113.
- Torres y Gotuzzo. 2002. Enfermedades causadas por amebas de vida libre. Disponible en: caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeOnce/.../Amebas/.../Infectologia.pdf
- Tyndall, R. Ironside, K. Metler, P; Tan, E. Hazen, T. y Fliermans, C. 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.* **3** (55): 722-732.

ANEXOS

ANEXO I. Datos de los factores fisicoquímicos

Cuadro 5. Temperatura del agua (°C) encontrada en las diferentes estaciones durante los cuatro muestreos.

| Estación de muestreo | Muestreo 1 | Muestreo 2 | Muestreo 3 | Muestreo 4 |
|----------------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | 54.5 | 58.1 | 52.5 | 55.5 |
| 2 | 52.6 | 56.3 | 56.4 | 59 |
| 3 | ND | 38.5 | 38.6 | 38.3 |
| 4 | ND | 38.8 | 38.4 | 39 |
| 5 | ND | 38.7 | 38.5 | 38.3 |
| 6 | ND | 42.4 | 38.3 | 33.2 |
| 7 | ND | 40.1 | 37.6 | 33.5 |
| 8 | 41.8 | 42.5 | 38 | 35.7 |
| 9 | ND | 36.7 | 43.7 | 42.9 |
| 10 | ND | 36.6 | 43.6 | 42.9 |
| 11 | 38.6 | 36.8 | 43.1 | 43 |
| 12 | ND | 49.2 | 36.7 | 39 |
| 13 | ND | 49.1 | 36.6 | 39.2 |
| 14 | 37.7 | 48.8 | 36.4 | 39 |

ND= muestras que no se tomaron

Cuadro 6. Temperatura atmosférica (°C) encontrada en las diferentes estaciones durante los cuatro muestreos.

| Estación de muestro | Muestreo 1 | Muestreo 2 | Muestreo 3 | Muestreo 4 |
|---------------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | 24.4 | 28.2 | 25.1 | 22.5 |
| 2 | 24.4 | 22.4 | 29.6 | 27 |
| 3 | ND | 22.4 | 19.5 | 22.4 |
| 4 | ND | 22.4 | 19.5 | 22.4 |
| 5 | ND | 22.2 | 19.5 | 22.2 |
| 6 | ND | 22.2 | 30.6 | 25 |
| 7 | ND | 22.2 | 30.6 | 25 |
| 8 | 18.3 | 22.2 | 30.6 | 25 |
| 9 | ND | 17.2 | 27.2 | 17.2 |
| 10 | ND | 17.2 | 27.2 | 17.2 |
| 11 | 18 | 17.2 | 27.2 | 17.2 |
| 12 | ND | 23.2 | 25 | 22.5 |
| 13 | ND | 23.2 | 25 | 22.5 |
| 14 | 27.1 | 23.2 | 25 | 22.5 |

ND= muestras que no se tomaron

Cuadro 7. Oxígeno disuelto (% de saturación) encontrado en las diferentes estaciones durante los cuatro muestreos.

| Estación de muestreo | Muestreo 1 | Muestreo 2 | Muestreo 3 | Muestreo 4 |
|----------------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | 64.4 | 38.5 | ND | 71 |
| 2 | 60.9 | 39.6 | ND | 67 |
| 3 | ND | 38.5 | 47.7 | 43.7 |
| 4 | ND | 39.6 | 54.7 | 53.1 |
| 5 | ND | 39.6 | 43 | 43 |
| 6 | ND | 43.7 | 43 | 53.6 |
| 7 | ND | 43.7 | 54.7 | 54.5 |
| 8 | 59.6 | 43.7 | 54.7 | 56.3 |
| 9 | ND | 43.7 | 38.5 | 57 |
| 10 | ND | 53.6 | 37.5 | 67.5 |
| 11 | 49.3 | 67 | 37.5 | 54.7 |
| 12 | ND | 67 | 38.5 | 38.5 |
| 13 | ND | 53.1 | 38.5 | 39.6 |
| 14 | 31.5 | 67 | 38.5 | 37.5 |

ND= muestras que no se tomaron

Cuadro 8. Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}^3$) encontrada en las diferentes estaciones durante los tres muestreos.

| Estación de muestreo | Muestreo 1 | Muestreo 2 | Muestreo 3 |
|----------------------|------------|------------|------------|
| 1 | 2.5 | 3.7 | 3.7 |
| 2 | 2.5 | 3.6 | 3.6 |
| 3 | ND | 3.7 | 3.7 |
| 4 | ND | 3.6 | 3.6 |
| 5 | ND | 3.7 | 3.7 |
| 6 | ND | 3.7 | 3.7 |
| 7 | ND | 3.7 | 3.7 |
| 8 | 2.6 | 3.7 | 3.7 |
| 9 | ND | 5 | 5 |
| 10 | ND | 4.8 | 4.8 |
| 11 | 3 | 5.6 | 5.6 |
| 12 | ND | 4.2 | 4.2 |
| 13 | ND | 4.2 | 4.2 |
| 14 | 3.1 | 4.2 | 4.2 |

ND= muestras que no se tomaron

Cuadro 9. Valores de pH encontrado en las diferentes estaciones durante los cuatro muestreos.

| Estación de muestreo | Muestreo 1 | Muestreo 2 | Muestreo 3 | Muestreo 4 |
|----------------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | 9.1 | 9.2 | 9.1 | 9.2 |
| 2 | 9.1 | 9.1 | 9.1 | 9.2 |
| 3 | ND | 9.1 | 9 | 9.1 |
| 4 | ND | 9.1 | 9 | 9.2 |
| 5 | ND | 9.1 | 9 | 9.2 |
| 6 | ND | 9.1 | 9 | 9.1 |
| 7 | ND | 9.1 | 9 | 9.1 |
| 8 | 9.1 | 9.1 | 9 | 9.1 |
| 9 | ND | 9.3 | 9.1 | 9.1 |
| 10 | ND | 9.3 | 9.2 | 9.1 |
| 11 | 9.1 | 9.3 | 9.1 | 9.1 |
| 12 | ND | 9.2 | 9.1 | 9.1 |
| 13 | ND | 9.2 | 9.1 | 9.1 |
| 14 | 9.1 | 9.2 | 9.1 | 9.1 |

ND= muestras que no se tomaron

ANEXO II. Datos de los Análisis bacteriológicos

Cuadro 10. Coliformes totales (UFC/100ml) encontrados en las diferentes estaciones durante los cuatro muestreos.

| Estación | Muestreo 1 | Muestreo 2 | Muestreo 3 | Muestreo 4 |
|----------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | 0 | 200 | 100 | 10 |
| 2 | 0 | 100 | 177 | 10 |
| 3 | ND | 100 | 604 | 10 |
| 4 | ND | 200 | 484 | 25 |
| 5 | ND | 100 | 477 | 12 |
| 6 | ND | 100 | 560 | 25 |
| 7 | ND | 100 | 578 | 50 |
| 8 | 0 | 100 | 618 | 75 |
| 9 | ND | 100 | 640 | ND |
| 10 | ND | 100 | 725 | 40 |
| 11 | 200 | 250 | 680 | 25 |
| 12 | ND | 100 | 100 | 10 |
| 13 | ND | 100 | 90 | 10 |
| 14 | 0 | 100 | 85 | 10 |

ND= muestras que no se tomaron

ANEXO III. Medios de cultivo

Medio NNE, agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes*

El medio NNE proporciona sales y una fuente de carbono que proviene de las bacterias, ambos elementos son necesarios para el crecimiento y desarrollo de las amebas.

Se preparan los componentes de la solución salina de Neff y el agar bacteriológico a una concentración de 1.5 % (De Jonckheere, 1984).

| | |
|-------------------------------------|----------|
| Na Cl | 12.0m g |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 0.4 mg |
| CaCl ₂ 2H ₂ O | 0.4m g |
| Na ₂ HPO ₄ | 14.2 mg |
| KH ₂ PO ₄ | 13.6 g |
| Agar bacteriológico | 15.0 g |
| Agua destilada | 100.0 ml |

Este medio se prepara mezclando los componentes en seco y después se agrega el agua destilada que es calentada hasta ebullición, se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos y se deja enfriar, posteriormente se vacía en las placas Petri previamente esterilizadas.

Cuando el agar solidifica, se inocula una suspensión de bacterias *Enterobacter aerogenes* inactivada por calor a 70 °C por 30 minutos.

En las placas con agar se agrega aproximadamente 0.5 ml de la suspensión de bacterias, la cual se distribuye homogéneamente por toda la superficie del medio con una varilla acodada.

Las placas se dejan reposar una hora y finalmente son guardadas en bolsas de plástico selladas con cinta adhesiva en el refrigerador.

Medio PBSGM (Medio Chang)

Medio líquido PBSGM (Fosfato, Biotriptasa, Suero y Glucosa Medio, por sus siglas en inglés), Este medio se utiliza para aislar y mantener los aislados libres de contaminación (De Jonckheere, 1984).

| | |
|----------------------------------|---------|
| Biotriptasa | 16.6 g |
| Dextrosa | 2.7 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 1.5 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.9 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

Esta solución se coloca en tubos con tapón de rosca, a cada tubo se le agrega 2.7 ml de medio. Posteriormente se esterilizan los tubos con el medio a 121 °C durante 15 minutos. Ya frío el medio a cada tubo se agrega 0.3 ml de suero fetal neonato bovino con antibióticos y se conservan en refrigeración.

Preparación de suero neonato de bovino para el medio PBSGM (Axenización)

El suero fetal de bovino siempre se mantiene en congelación, se descongela minutos antes de ser utilizado en baño María a 56 °C durante 30 minutos para descomplementarlo. Se prepara una mezcla de antibióticos a base de penicilina G sal sódica (laboratorios Lakeside) y Kanamicina (Bristol) de la siguiente manera:

Penicilina G 1 000 000 U en 2 ml de agua destilada

Kanamicina 1 g en solución 3 ml

Volumen total de 5 ml

Se agregan 1.0 ml de mezcla de antibióticos por cada 100 ml de suero descomplementado para obtener una concentración final de 200 ml de cada antibiótico en 3.0 ml de medio PBSGM.