



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**AMIBAS DE VIDA LIBRE EN MANANTIALES DE
AGUAS TERMALES DEL PARQUE ECOALBERTO,
IXMIQUILPAN, HIDALGO, MÉXICO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I O L O G A
P R E S E N T A :**

MONSERRAT BERENICE LÓPEZ CRUZ



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. PATRICIA BONILLA LEMUS**

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO 2014



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.

DEDICADA CON MUCHO AMOR

A MIS PADRES BERTHA Y AURELIO POR EL APOYO QUE ME OTORGARON EN TODO MOMENTO, ESPECIALMENTE EN MI FORMACION EDUCATIVA, ADEMAS POR SU AMOR INCONDICIONAL Y POR SU ESTIMULO PARA SEGUIR SIEMPRE ADELANTE.

A MIS HERMANOS JAZMIN, IVAN Y JESUS POR BRINDARME SIEMPRE SU AMOR Y APOYO.

A MI PAREJA ALBERTO POR SIEMPRE APOYARME EN MI EDUCACION UNIVERSITARIA, POR SUS VALIOSOS CONSEJOS QUE SIEMPRE FUERON DE MUCHA AYUDA Y MOTIVACION Y SOBRE TODO POR SU AMOR.

AGRADECIMIENTOS

A MI DIRECTORA DE TESIS LA DR. PATRICIA BONILLA LEMUS POR SU VALIOSA APORTACION A MI TRABAJO, POR TODAS LAS ENSEÑANZAS, POR SU APOYO, Y PORQUE ADEMAS ME OTORGO SU LINDA AMISTAD.

A LA BIOLOGA ROCIO IBARRA POR SU GRAN APOYO A LO LARGO DE MI TRABAJO DE TESIS, POR APORTARME SUS CONOCIMIENTOS Y POR SU LINDA AMISTAD.

AL DR. RICARDO ORTIZ POR SU VALIOSA AYUDA EN LAS PRUEBAS DE PATOGENICIDAD Y POR SU AMISTAD.

A MIS REVISORES DE TESIS POR SUS SUGERENCIAS Y CONTRIBUCIONES A MI TRABAJO.

AL DR. ALFONSO LUGO POR SU ASESORAMIENTO Y SUGERENCIAS EN LA ELABORACION DE MIS ESTADISTICOS.

AL QUIMICO LUIS FERNANDO POR SU APOYO Y AMISTAD.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS POR SU LINDA AMISTAD.

CONTENIDO	PÁGINA
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
1. Ciclo de vida de las amibas de vida libre	3
2. Importancia médica de las amibas de vida libre	4
3. ANTECEDENTES	6
4. Estudios previos en aguas recreativas	7
5. Estudios previos en México	7
III. ÁREA DE ESTUDIO	9
IV. JUSTIFICACIÓN	12
V. OBJETIVOS	13
VI. METODOLOGÍA	14
1. Trabajo de campo	14
2. Trabajo de laboratorio	15
3. Aislamiento y Cultivo monoxénico	15
4. Cultivo axénico	15
5. Identificación morfológica	15
6. Prueba de transformación amebo-flagelar	15
7. Prueba de tolerancia a la temperatura	16
8. Prueba de patogenicidad	16
9. Análisis estadísticos	16
10. Diagrama de flujo de la metodología	17
VII. RESULTADOS	18
1. Identificación morfológica	19
2. Prueba de transformación amebo-flagelar	24
3. Cultivo axénico	24
4. Prueba de tolerancia a la temperatura	24
5. Prueba de patogenicidad	24
6. Parámetros fisicoquímicos	26
7. Análisis estadísticos	29
VIII. DISCUSIÓN	31
IX. CONCLUSIONES	40
X. REFERENCIAS	41
XI. ANEXO	48

RESUMEN

Las amibas de vida libre (AVL) se han aislado de una gran variedad de hábitats, se les encuentra en el suelo, en el agua y en el aire, el cual utilizan como medio de dispersión. Debido a su capacidad de vivir como organismos de vida libre y como endoparásitos se les conoce como organismos anfizoicos. Se ha visto que las temperaturas elevadas favorecen la proliferación de las amibas patógenas por lo que se les encuentra con frecuencia en aguas termales naturales y en aguas contaminadas térmicamente. En el Edo. de Hidalgo se localiza el Parque Ecoalberto el cual cuenta con manantiales de aguas termales, que alimentan albercas para uso recreativo, es por ello importante estudiar la presencia de AVL y sobre todo de amibas patógenas ya que pueden ocasionar graves enfermedades en el hombre y animales. En el Parque Ecoalberto se realizaron dos muestreos uno en el mes de febrero (temporada de secas) y otro en agosto (temporada de lluvias) de 2011 de manantiales de aguas termales y una alberca alimentada con agua termal de manantial. Se determinaron parámetros fisicoquímicos *in situ*: temperatura del agua, pH, oxígeno disuelto, cloro libre residual y conductividad. Las muestras de agua se concentraron, se inocularon en medio NNE, se incubaron a 25 y 37°C, se identificaron morfológicamente y se realizó la prueba de patogenicidad en ratones. Se obtuvieron 56 aislados de AVL. El género más frecuente fue *Naegleria*, después *Rosculus*, seguido de *Guttulinopsis* y *Vannella* y con menor frecuencia *Mayorella*. Las especies con mayor número de aislados fueron *Naegleria* sp. (15), *Rosculus ithacus* (11) y *Guttulinopsis vulgaris* (8) y con menor frecuencia *Vannella lata*, *Vahlkampfia aberdonica*, *V. ustiana*, *Platyamoeba placida*, *P. stenopodia*, *Acanthamoeba polyphaga*, *A. astronyxis*, y *Mayorella cultura* con un solo aislamiento. La prueba de flagelación resultó positiva en los 15 aislados identificados como *Naegleria*. La prueba de tolerancia de temperatura mostró que *Naegleria* presentó mejor crecimiento a 25 y 37°C, un solo aislado creció a 42°C. *Acanthamoeba* presentó mejor crecimiento a 25 y 37°C, siendo capaces de crecer a 42°C. En la prueba de patogenicidad se probaron 2 aislados del género *Naegleria* y 4 de *Acanthamoeba*. *Naegleria* no fue patógena, pero un aislado identificado como *A. astronyxis* resultó invasiva en ratón. Las condiciones fisicoquímicas del agua se encontraron dentro de los valores reportados como adecuados para la presencia de amibas de vida libre.

INTRODUCCIÓN

Las amibas de vida libre (AVL) son protozoos cosmopolitas, ya que se encuentran en gran diversidad de hábitats (Vargas, 1990). Se han aislado de ambientes húmedos como el suelo y el agua; también en el aire el cual utilizan como medio de dispersión (Galarza *et al.*, 2006). Son capaces de sobrevivir a temperaturas extremas desde menos de 4°C hasta más de 45°C (Ávila *et al.*, 2006).

Se les considera como uno de los principales grupos de depredadores microbianos, debido a que presentan una fuerte selectividad de presas, siendo depredadores de bacterias, hongos, algas y otros protozoarios. De ahí su importancia en los ecosistemas acuáticos ya que desempeñan un papel muy importante en el mantenimiento del flujo de energía y el reciclado de los nutrientes del suelo (Jiménez y Richard, 2003; Rodríguez *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2005). Sin embargo a mediados del siglo XX se descubrió que algunas amibas podían invadir al hombre y a otros animales, llegando a causarles la muerte o daño cerebral irreversible. Por esta capacidad para vivir como organismos de vida libre y como endoparásitos se les conoce como organismos anfizoicos (Peralta y Ayala, 2009).

Una de las características de las AVL potencialmente patógenas es que pueden soportar altas temperaturas (termotolerantes), por lo que se les encuentra con frecuencia en aguas termales naturales y en aguas contaminadas térmicamente por descargas industriales (Ávila *et al.*, 2006; Rivera *et al.*, 1989).

Además de su patogenicidad algunas amibas de vida libre establecen relaciones simbióticas con otros microorganismos siendo vectores de bacterias, hongos y virus patógenos (Flores, 2009; Schmitz *et al.*, 2008). Tal es el caso de *Legionella pneumophila*, la cual habita dentro de *Hartmannella*, *Acanthamoeba* y *Naegleria* sin ser digerida, es capaz de multiplicarse y liberarse nuevamente en el ambiente (Herrera, 2001; Molmeret *et al.*, 2005), *Mycobacterium avium*, sobrevive dentro de *Acanthamoeba castellanii* y *Vibrio cholerae*, sobrevive dentro de los quistes de *Naegleria*, entre otros. Esta asociación les permite evadir ambientes hostiles, como medio de transporte y para colonizar nuevos hábitat (Barker y Brown, 1994).

La mayoría de las especies amibianas son inocuas, sin embargo se ha descrito a las especies *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia pedata* y algunas del género *Acanthamoeba* como patógenas para el hombre y algunos animales (Pereira y Pérez, 2003; Visvesvara *et al.*, 2007).

Ciclo de vida de las amibas de vida libre

Comprende una fase activa llamada trofozoíto que se alimenta y reproduce y una fase quística o quiste, como una forma de sobrevivencia a condiciones adversas y solo en el caso de *Naegleria* se presenta la forma flagelada, cuando se encuentra en un medio sin nutrimentos (Suárez, 2004).

Naegleria fowleri presenta una fase de trofozoíto, una fase temporal flagelar y una fase de quiste. Los trofozoítos presentan una forma alargada, por lo que se les conoce como amiba limax, miden entre 15 a 25 μm , tienen un abundante citoplasma vacuolado o granular, y un gran núcleo central, claro y redondo con un nucleolo esférico prominente y refringente; su movimiento se realiza a través de lobópodos de tamaño variable. La forma flagelada es usualmente piriforme, mide de 12 a 18 μm y es biflagelada. Los quistes son formaciones esféricas de 8 a 12 μm aunque pueden alcanzar hasta 20 μm , tienen un contorno liso con uno o dos poros aplanados (Oddó, 2006).

Acanthamoeba spp. presentan una fase de trofozoíto y una fase de quiste. Los trofozoítos de las diferentes especies de *Acanthamoeba* son irregulares y presentan pseudópodos retráctiles, filamentosos o espinosos llamados acantópodos. El tamaño de los trofozoítos varía de acuerdo a cada especie, con promedio de 20 a 56 μm . El citoplasma es abundante y tiene un aspecto granular y vacuolar; además tienen un núcleo claro, central y esférico con un prominente y denso nucléolo redondeado. El quiste mide entre 11 y 25 μm , presenta una doble pared: la pared externa o ectoquiste es ondulada o arrugada, la pared interna o endoquiste puede ser estrellada, poligonal, esférica u oval y los poros se forman en la unión del ectoquiste y el endoquiste (Jercic, 2007; Oddó, 2006).

Balamuthia mandrillaris presenta una fase de trofozoíto y una fase de quiste. Los trofozoítos miden de 12 a 60 μm , con forma irregular, en ocasiones presenta forma limax o forma de araña con pseudópodos no ramificados. Los quistes miden de 10 a 30 μm , tienen una triple pared característica y no presenta poros (Zúñiga y Lozano, 2011).

Sappinia pedata presenta una fase de trofozoíto y una fase de quiste, sus trofozoítos miden de 45 a 85 μm , sus pseudópodos son indistintos y se observa una película que se ondula cuando la amiba se mueve, presentan dos núcleos, muy juntos uno del otro. Los quistes miden de 13 a 37 μm (Schuster y Visvesvara, 2004).

Importancia médica de las amibas de vida libre

Naegleria fowleri es el agente causal de la Meningoencefalitis amibiana primaria (MAP), se presenta en individuos jóvenes y sanos, con el antecedente de haber realizado actividades deportivas en el agua. La puerta de entrada de los trofozoítos es la cavidad nasal, mediante aspiración de agua contaminada, los cuales pasan al Sistema Nervioso Central (SNC). El periodo de incubación es de 2 o 3 y hasta 7 o 10 días, dependiendo del inóculo y de la virulencia de la cepa. En el cerebro las amibas provocan edema y necrosis hemorrágica provocando graves daños irreversibles, la gran mayoría de los individuos infectados muere aproximadamente dentro de las 48 o 72 horas (o hasta una semana después) del inicio del cuadro clínico, principalmente por paro cardiorrespiratorio y edema pulmonar (Azevedo *et al.*, 2009; Sierra, 2011; Lares *et al.*, 1993).

Acanthamoeba es probablemente la amiba con mayor distribución en la naturaleza debido a la gran resistencia de sus quistes, se ha aislado de agua tratada, natural, subterránea, marina, de grifo, piscinas, aguas termales, agua mineral embotellada, agua de desecho, canales de riego, tinas de hidroterapia, lagos artificiales, efluentes calientes de plantas termoeléctricas y de agua congelada. También se ha aislado de diferentes tipos de suelo, sedimento oceánico, sedimento de lagos, lodos resultantes del tratamiento del agua de desecho, polvo de casas-habitación, de composta y de aire acondicionado (Gertiser *et al.*, 2010).

Es una amiba oportunista que afecta a pacientes inmunosuprimidos e inmunodeficientes, causando Encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), infecciones cutáneas y nasofaríngeas; la vía de entrada e invasión al SNC es hematogena, con el foco primario en la piel o en el tracto respiratorio (pulmón), por inhalación de aire, aerosoles y polvos que contengan quistes o trofozoítos (Martínez y Visvesvara, 1997; Suárez *et al.*, 2002).

Otra infección importante causada por *Acanthamoeba* es la Queratitis amibiana (QA) (Ortiz *et al.*, 2012). Es una inflamación crónica en la córnea que puede causar la pérdida del ojo. Los principales factores de riesgo son el uso de lentes de contacto suaves, uso de soluciones salinas caseras, falta de conocimiento sobre la higiene de los lente de contacto, exposición a agua contaminada y traumatismos menores del ojo (Omaña, 1994; Serrano *et al.*, 2007).

Balamuthia mandrillaris es una amiba oportunista que causa Encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), infecciones cutáneas y nasofaríngeas, pero se conoce poco sobre su distribución en la naturaleza, es probable que sea la menos abundante; se identificó por primera vez en 1990 en el cerebro de un mandril que falleció por una encefalitis en un zoológico de San Diego, también se ha encontrado en gorilas y ovejas (Ferrante, 1991; Huang *et al.*, 1999).

Sappinia pedata puede causar Encefalitis amibiana (EA) sin embargo no se conoce su distribución en el ambiente, solo se ha aislado de suelo contaminado con heces de bovino, de otros animales y de humanos (Oddó *et al.*, 2006).

ANTECEDENTES

En el año de 1958 a las amibas de vida libre se les creía inofensivas hasta que se descubrió que podían entrar por vía intranasal, podían invadir la mucosa olfatoria, migrar al cerebro y producir meningoencefalitis letal en ratones, esto fue una revelación impactante. Culbertson reportó los hallazgos patológicos y sugirió la posibilidad de que la exposición de los seres humanos a estas amibas podía provocar enfermedad, además estableció las características patogénicas de *Acanthamoeba* spp. (Schuster y Visvesvara, 2004).

Entre 1965 y 1970 Fowler y Carter, en Australia, reportaron los primeros cuatro casos en seres humanos de meningoencefalitis amibiana primaria por *Naegleria fowleri*; fueron diagnosticados por histopatología y con semejanzas a los cambios patológicos en animales descritos por Culbertson. En Florida, EUA, se identificaron los primeros tres casos, aislando en uno *N. fowleri*. Pereira y Amstrong reportaron aislamientos de *Hartmannella* en nariz, garganta y fluido bronquial. Richmond reportó en un estudio retrospectivo ocho casos de meningitis fatal; posteriormente se descubrieron cuatro casos más. Cerva, en Checoslovaquia, reportó 16 casos (1962-1965), diagnosticados *post mortem* por estudios clínicos e histopatológicos (Oddó, 2006).

De 1971 a 1980 Kenney, Robert, Rorke, Jagger y Stamm reportaron los primeros casos de encefalitis en seres humanos, en los cuales se identificaron como responsables a las amibas del género *Acanthamoeba* (Ferreira *et al.*, 2010).

A la fecha a nivel mundial se han reportado más de 300 casos de MAP por *N. fowleri*, 200 casos de EAG por *Acanthamoeba* spp., 150 casos de EAG por *Balamuthia mandrillaris* y un caso de encefalitis por *Sappinia pedata*, más de 5000 casos por QA, sólo en EUA y aproximadamente 10 000 en todo el mundo (Bonilla y Ramírez, 2011). Estas cifras seguramente están subestimadas debido al escaso o nulo conocimiento entre la comunidad biomédica.

En México se han identificado 33 casos de MAP: 23 en Mexicali, Sonora, Monterrey, Huetamo, Michoacán y Tamaulipas. 12 casos de EAG por *B. mandrillaris*: 4 en el DF, 4 en Jalisco, 2 en Guanajuato, 1 en el Estado de México y uno en Puebla. También un caso de EAG por *Acanthamoeba* spp. el cual sobrevivió y 5 de QA (Bonilla y Ramírez, 2011).

Estudios previos en aguas recreativas

Madrigal *et al.*, en 1984, estudiaron la presencia de amibas en 16 piscinas abiertas de Madrid. Todas resultaron positivas a AVL, aislando a *Acanthamoeba polyphaga*, *A. lenticulata*, *A. lugdunensis*, *A. astronyxis* y *A. comandoni*.

Muñoz *et al.*, en 2003 realizaron un estudio en 8 piscinas públicas en Santiago de Chile, aislando a *Hartmannella vermiformis*, *Vannella* sp., *Naegleria* sp. y *Acanthamoeba* sp.

Garaycochea *et al.*, en 2008 recolectaron muestras de agua de ríos, lagos, piscinas y pozos de Lima Perú. Entre los géneros aislados, sólo dos de ellos son reconocidos como potencialmente patógenos para los humanos: *Acanthamoeba* y *Naegleria*. Otros géneros aislados fueron *Hartmannella*, *Saccamoeba*, *Vahlkampfia*, *Mayorella* y *Vannella*.

Estudios previos en México

Martínez (1987), realizó un estudio en la región de Tecozautla, Hidalgo, tomando muestras de agua en piscinas y efluentes de agua termal de 3 balnearios, aislando cepas de AVL pertenecientes a los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Willaertia*. Se identificaron especies como *N. gruberi*, *N. australiensis* y *N. lovaniensis* reportadas como no patógenas para el ser humano. Y se identificaron las especies *A. castellanii* y *A. lugdunensis* las cuales resultaron patógenas para ratones.

Suárez (2004), realizó un estudio en 16 canales de riego agrícola en el Valle de Mexicali Baja California, México. Los aislamientos más abundantes corresponden a los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Hartmannella*. Tres aislados identificados como *Naegleria fowleri*, tres como *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga* y *Acanthamoeba culbertsoni*, especies reportadas como potencialmente patógenas.

Urbina en 2006, realizó un estudio de AVL en aguas termales alimentadas por un géiser en el Edo. de Hidalgo, determinando con mayor frecuencia a *Naegleria*, *Vahlkampfia* y *Acanthamoeba*. La mayoría se distribuyeron en un intervalo de 33 a 40°C. Sin embargo *Acanthamoeba* y *Naegleria* se aislaron a temperaturas mayores de los 43°C y solo dos aislados pertenecientes a las especies *N. fowleri* y *N. gruberi* se aislaron a 53°C.

Por otro lado es importante señalar que la calidad del agua es fundamental para prevenir y evitar la transmisión de enfermedades, para lo cual se requiere establecer límites permisibles en cuanto a sus características. En los últimos años se han incorporado indicadores biológicos alternativos que le dan mayor sensibilidad a la evaluación biológica y detectan otros grupos biológicos que dañan al hombre.

Cabe mencionar que desde el año 2008, en el Estado de Hidalgo se publicó la Norma técnica sanitaria para balnearios, parques acuáticos y establecimientos que cuenten con alberca. En la cual incluyeron la detección de Amibas de vida libre.

En 2012 se publicó la Norma Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010, que se refiere a la calidad del agua que deben cumplir las albercas y en la cual se incluyen a las amibas de vida libre patógenas, *Naegleria* y *Acanthamoeba*.

ÁREA DE ESTUDIO

El Parque Ecoalberto (Fig. 1) se encuentra en la localidad El Alberto, municipio de Ixmiquilpan en el Estado de Hidalgo, México. Ésta localidad pertenece al Valle del Mezquital y sus habitantes pertenecen al pueblo indígena Hña Hñu (otomí). Se localiza entre los paralelos 20° 28' 55" de latitud norte y 99° 13' 5" de longitud oeste a 1730 m sobre el nivel del mar. Presenta un clima semiseco templado; la temporada de lluvias es de mayo a septiembre y la temporada de secas es de octubre a abril. Su temperatura media anual es de 17.5°C (INEGI, 1992).

El Centro recreativo es administrado por la comunidad El Alberto, en el área del centro recreativo surge un Manantial (Fig. 2) de aguas termales el cual forma un Riachuelo (Fig. 3) que fluye a cielo abierto aproximadamente 100 m y alimenta una Alberca pequeña (Alberca Amor), la cual se encuentra dentro de otra más grande (Fig. 4) y de ahí, el efluente se incorpora a un Río que está como a 10 metros proveniente de la presa Endho (Fig. 5). Aproximadamente a 200 m se encuentra otro pequeño Manantial que surge del suelo (Fig. 6) y a 3 km aproximadamente se encuentra un sistema de bombeo donde filtran agua de otro manantial con el propósito de usarla para consumo humano.



Figura 2. Manantial de aguas termales (Nuez)



Figura 3. Riachuelo



Figura 4. Alberca Amor



Figura 5. Río proveniente de la presa Endhó



Figura 6. Manantial Ahuehuete

JUSTIFICACIÓN

Las temperaturas elevadas favorecen la proliferación de las amibas patógenas por lo que se les encuentra con frecuencia en aguas termales naturales. En el Estado de Hidalgo se localizan una serie de manantiales de aguas termales que alimentan albercas con fines recreativos como la natación, tal es el caso del Parque Ecoalberto, donde todo el año acude gran cantidad de personas a divertirse y nadar en sus aguas termales, es por ello importante estudiar la presencia de AVL y sobre todo de las amibas patógenas ya que pueden ocasionar graves enfermedades y en la mayoría de los casos la muerte.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de amibas de vida libre (AVL) en manantiales de aguas termales, el efluente de un Sistema de Bombeo y alberca del Parque Ecoalberto.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar e identificar las amibas de vida libre de los manantiales de aguas termales y alberca del Parque Ecoalberto.
- Realizar el diagnóstico morfológico, mediante microscopía óptica de las AVL aisladas del parque Ecoalberto.
- Analizar *in situ* los parámetros fisicoquímicos del agua: conductividad, temperatura, pH, oxígeno disuelto y cloro libre residual.
- Realizar la prueba de tolerancia a la temperatura (25, 37 y 42 °C), a las amibas pertenecientes a los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*.
- Realizar la prueba de transformación amebo-flagelar a las amibas pertenecientes al género *Naegleria*.
- Realizar la prueba de patogenicidad a las amibas pertenecientes a los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*.
- Relacionar la presencia de las AVL con los parámetros fisicoquímicos del agua.

METODOLOGÍA

Trabajo de campo

Se realizaron dos muestreos en el Parque Ecoalberto, el primero en el mes de febrero (temporada de secas) y el segundo en el mes de agosto (temporada de lluvias) de 2011, en una alberca, manantiales y el efluente de un Sistema de Bombeo.

Se seleccionaron 6 sitios de muestreo (Fig. 7) y de cada uno se tomaron 500 ml de agua, en frascos de polipropileno de boca ancha previamente esterilizados y se transportaron al laboratorio a temperatura ambiente.

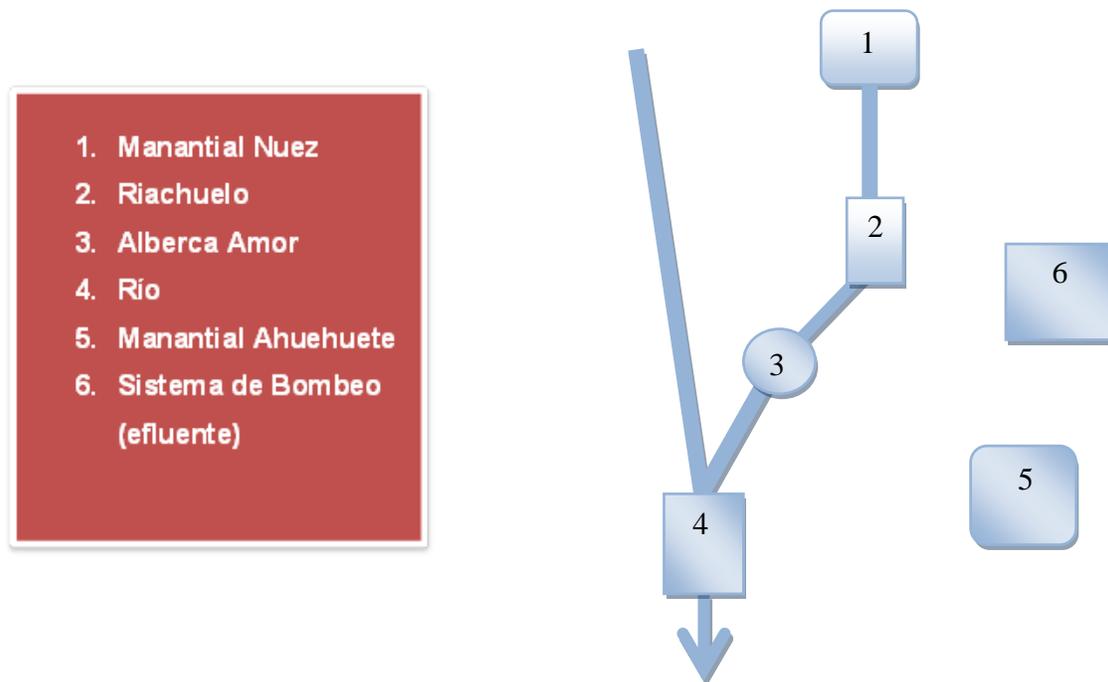


Figura 7. Sitios de muestreo del Parque Ecoalberto, de un manantial independiente y el efluente de un sistema de bombeo.

La determinación de los Parámetros fisicoquímicos se realizó *in situ* de la siguiente manera: Temperatura, pH, y conductividad con un potenciómetro Conductronic PC18, oxígeno disuelto (OD) con un oxímetro YSI Modelo 51b, cloro libre residual con un analizador de cloro ORBECO-HELLIGE Modelo 942.

Trabajo de laboratorio

Aislamiento y Cultivo monoxénico: De cada una de las muestras de agua, se tomaron alícuotas por duplicado de 50 ml de agua y se centrifugaron a 2,500 rpm durante 15 min. El sobrenadante se desechó y la pastilla se inoculó sobre cajas Petri con medio agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes* inactivada (NNE). Las placas sembradas se incubaron a 25 y 37°C en posición invertida dentro de bolsas de plástico para evitar su desecación.

Después de 48 hrs se observaron las placas en un microscopio invertido para detectar crecimiento de amibas y se separaron trofozoítos de las amibas potencialmente patógenas *Naegleria* y *Acanthamoeba* para sembrarlos individualmente en placas nuevas, incubando a la temperatura de crecimiento, con el fin de cultivarlas posteriormente en un medio axénico.

Cultivo axénico: Una vez que obtuvieron cultivos libres de otros microorganismos (hongos y bacterias) a las amibas *Naegleria* y *Acanthamoeba*, se cortaron cuadros de NNE de aproximadamente 1 cm², se colocaron en los medios (Bactocasitona, Chang modificado y Ringer) con 10% de suero de ternera y se incubaron a la temperatura de crecimiento, en posición inclinada.

Identificación morfológica: Se observaron preparaciones en fresco en un microscopio de contraste de fases a 40x y se identificaron con base en las claves taxonómicas de Page (1988) y Pussard y Pons (1977). Para lo cual se midió largo y ancho de 50 trofozoítos y se midió el diámetro de 50 quistes.

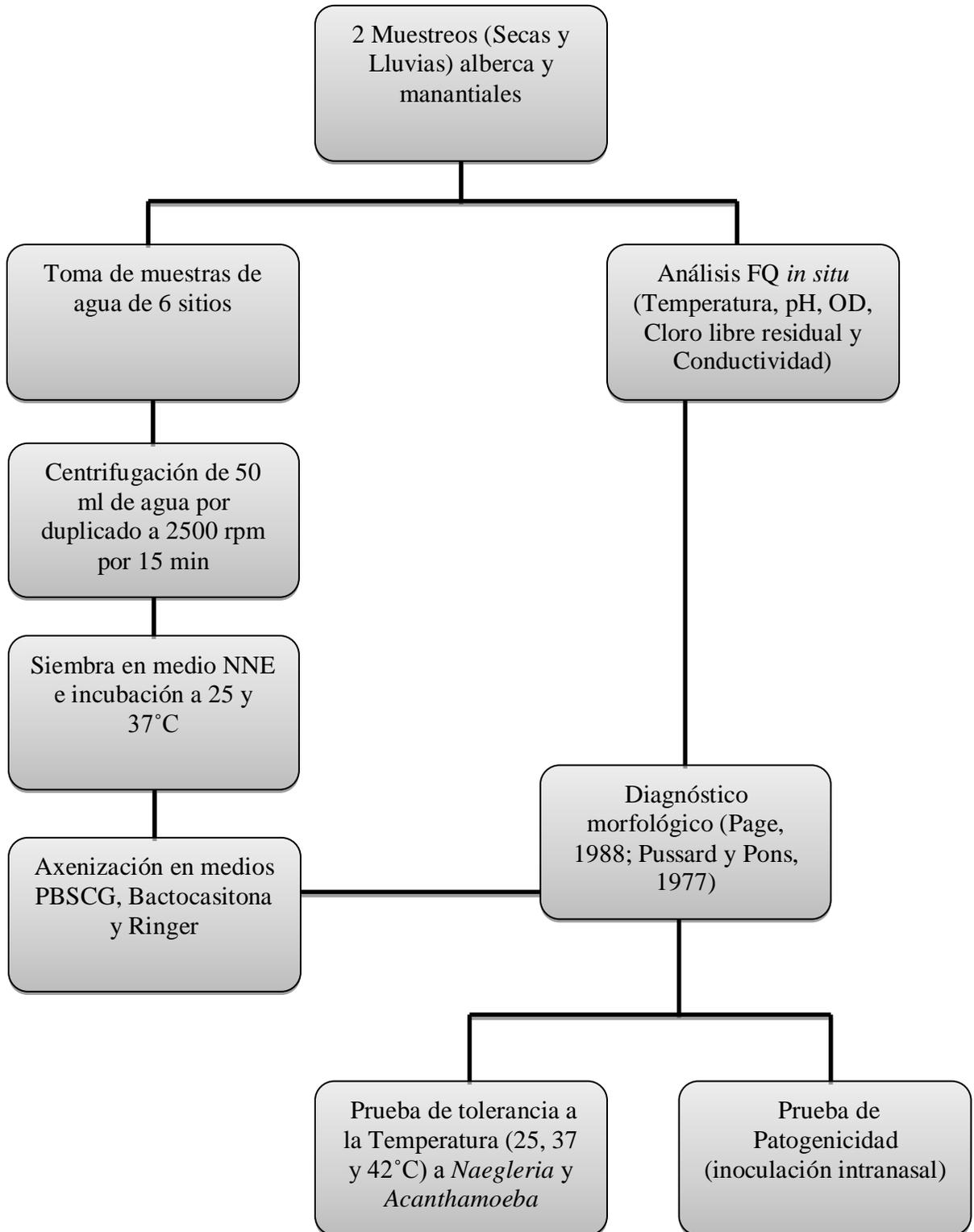
Prueba de transformación amebo-flagelar: Para confirmar el diagnóstico de *Naegleria*, se agregó aproximadamente 1 ml de agua destilada estéril a tubos de ensayo con un cuadro de 1 cm² previamente cortado de placas de NNE con trofozoítos de *Naegleria* y se incubaron a la temperatura de crecimiento, observándose en un invertoscopio cada 20 minutos durante dos horas o hasta que ocurriera la transformación flagelar.

Prueba de tolerancia a la temperatura: Las amibas aisladas de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*, obtenidos en los cultivos de 25°C se resembraron a 37 y 42°C y los obtenidos a 37°C se resembraron a 25 y 42°C. Posteriormente se observaron en un microscopio invertido durante dos semanas para verificar el desarrollo de las amibas.

Prueba de patogenicidad: Se realizó esta prueba solo para los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*, utilizando un cultivo axénico, concentrado y centrifugado a 3000 rpm durante 10 min, ajustándose a una cuenta de 5×10^5 células. De este concentrado se les inoculó 0.02 ml por vía intranasal a 5 ratones (cepa CD-1), machos de 3 semanas de edad. Los ratones inoculados se observaron durante 31 días y se registraron los cambios de su comportamiento. Los que sobrevivieron se sacrificaron y se les extirparon cerebro, pulmón, hígado y riñón y se colocaron en medio NNE y se incubaron a 25 y 37°C respectivamente, para observar crecimiento amibiano en los órganos.

Análisis estadísticos: Se realizó el Análisis Cluster utilizando el índice de Jaccard y el método del enlace completo de grupos a las estaciones de muestreo con la finalidad de conocer la similitud entre ellas respecto a las especies de amibas aisladas en cada uno de los sitios (Biodiversity pro 2.0, 1997). Además se realizó la Prueba de Spearman con la finalidad de obtener la correlación entre los aislamientos de AVL obtenidos y los parámetros fisicoquímicos. Para lo anterior se utilizó un nivel de significancia de 0.05 y 0.01 (Durán *et al.*, 2004).

DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGÍA



RESULTADOS

En los dos muestreos realizados hubo presencia de amibas de vida libre en todos los sitios, excepto en el sitio 6 (efluente del Sistema de Bombeo). En el Manantial Ahuehuete se registró un total de 13 aislados siendo el sitio con el mayor número de aislados, en el Río se registraron 12, en el Manantial Nuez 11, en la Alberca Amor 10 al igual que en el Riachuelo con 10 aislados (Fig. 8).

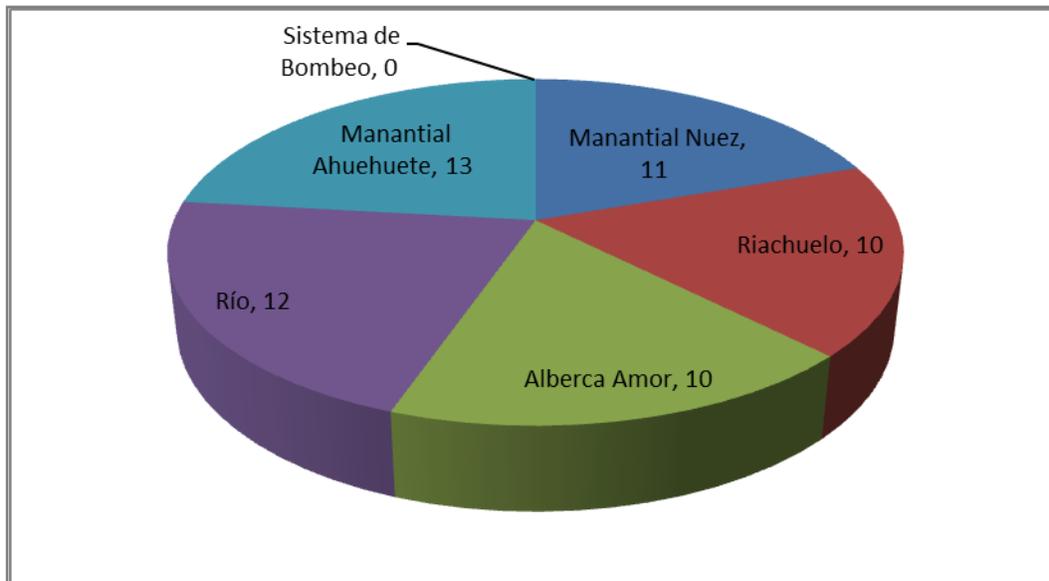


Figura 8. Número de aislados de AVL en los sitios de muestreo.

Identificación morfológica: En el período de secas (febrero) se obtuvo un total de 24 aislados de AVL y 32 en el de lluvias (agosto). Dando un total de 56 aislados de AVL identificados (Tabla 1).

Tabla 1. Amibas de vida libre identificadas en el centro recreativo Ecoalberto.

SITIO	1º MUESTREO Febrero		2º MUESTREO Agosto	
	25°C	37°C	25°C	37°C
1 Manantial Nuez	<i>Vannella lata</i> , <i>Hartmannella vermiformis</i> , <i>Naegleria sp</i>	<i>Guttulinopsis vulgaris</i> , <i>Naegleria sp</i>	<i>Acanthamoeba astronyxis</i> , <i>Naegleria sp</i> , <i>Rosculus ithacus</i>	<i>Guttulinopsis vulgaris</i> , <i>Naegleria sp</i> , <i>Rosculus ithacus</i>
2 Riachuelo	<i>Rosculus ithacus</i> , <i>Vahlkampfia aberdonica</i> , <i>Naegleria sp</i>	<i>Guttulinopsis vulgaris</i> , <i>Naegleria sp</i>	<i>Naegleria sp</i> , <i>Rosculus ithacus</i> , <i>Vannella simplex</i>	<i>Rosculus ithacus</i> , <i>Guttulinopsis vulgaris</i>
3 Alberca Amor	<i>Naegleria sp</i> , <i>Rosculus ithacus</i>	<i>Guttulinopsis vulgaris</i> , <i>Naegleria sp</i>	<i>Naegleria sp</i> , <i>Rosculus ithacus</i> , <i>Vannella platypodia</i>	<i>Hartmannella vermiformis</i> , <i>Rosculus ithacus</i> , <i>Vannella simplex</i>
4 Río	<i>Platyamoeba placida</i> , <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> , <i>Naegleria sp</i>	<i>Vannella platypodia</i> , <i>Rosculus ithacus</i> ,	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i> , <i>Guttulinopsis vulgaris</i> , <i>Vexillifera bacillipedes</i>	<i>Platyamoeba stenopodia</i> , <i>Rosculus ithacus</i> , <i>Vahlkampfia ustiana</i> , <i>Mayorella cultura</i>
5 Manantial Ahuehuete	<i>Naegleria sp</i> , <i>Vannella platypodia</i>	<i>Guttulinopsis vulgaris</i> , <i>Naegleria sp</i> , <i>Acanthamoeba polyphaga</i>	<i>Naegleria sp</i> , <i>Rosculus ithacus</i> , <i>Vannella simplex</i>	<i>Guttulinopsis vulgaris</i> , <i>Naegleria sp</i> , <i>Vannella simplex</i> , <i>Vexillifera bacillipedes</i> , <i>Hartmannella vermiformis</i>
6 Sistema de Bombeo	No hubo presencia	No hubo presencia	No hubo presencia	No hubo presencia

El género más frecuente fue *Naegleria*, después *Rosculus*, seguido por *Guttulinopsis* y *Vannella*; con menor frecuencia se encontró a *Mayorella* (Fig. 9). Con respecto a las especies aisladas, las más frecuentes fueron *Naegleria* sp con 15, *Rosculus ithacus* con 11 y *Guttulinopsis vulgaris* con 8, con menor frecuencia fueron *Vannella lata*, *Vahlkampfia aberdonica*, *Platyamoeba placida*, *Acanthamoeba polyphaga*, *Acanthamoeba astronyxis*, *Platyamoeba stenopodia*, *Vahlkampfia ustiana* y *Mayorella cultura* teniendo un solo aislamiento (Fig. 10).

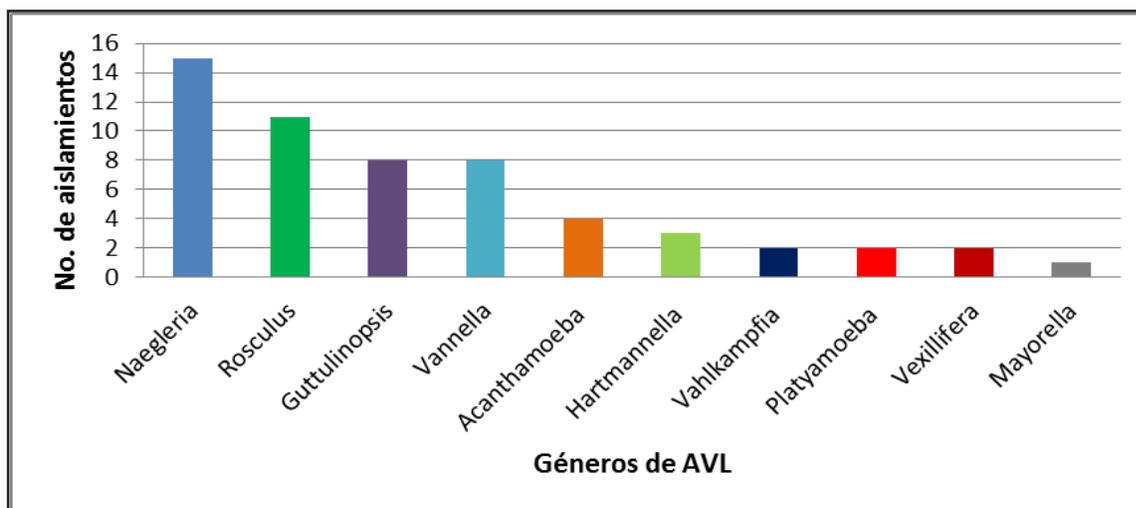


Figura 9. Número de aislamientos de AVL por género amibiano.

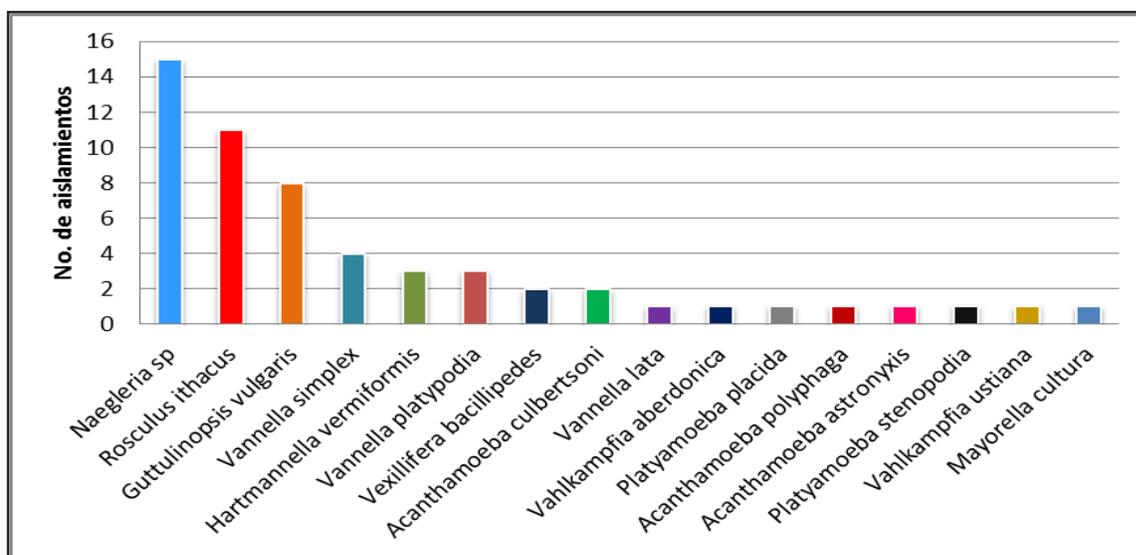


Figura 10. Número de aislamientos de AVL por especie.

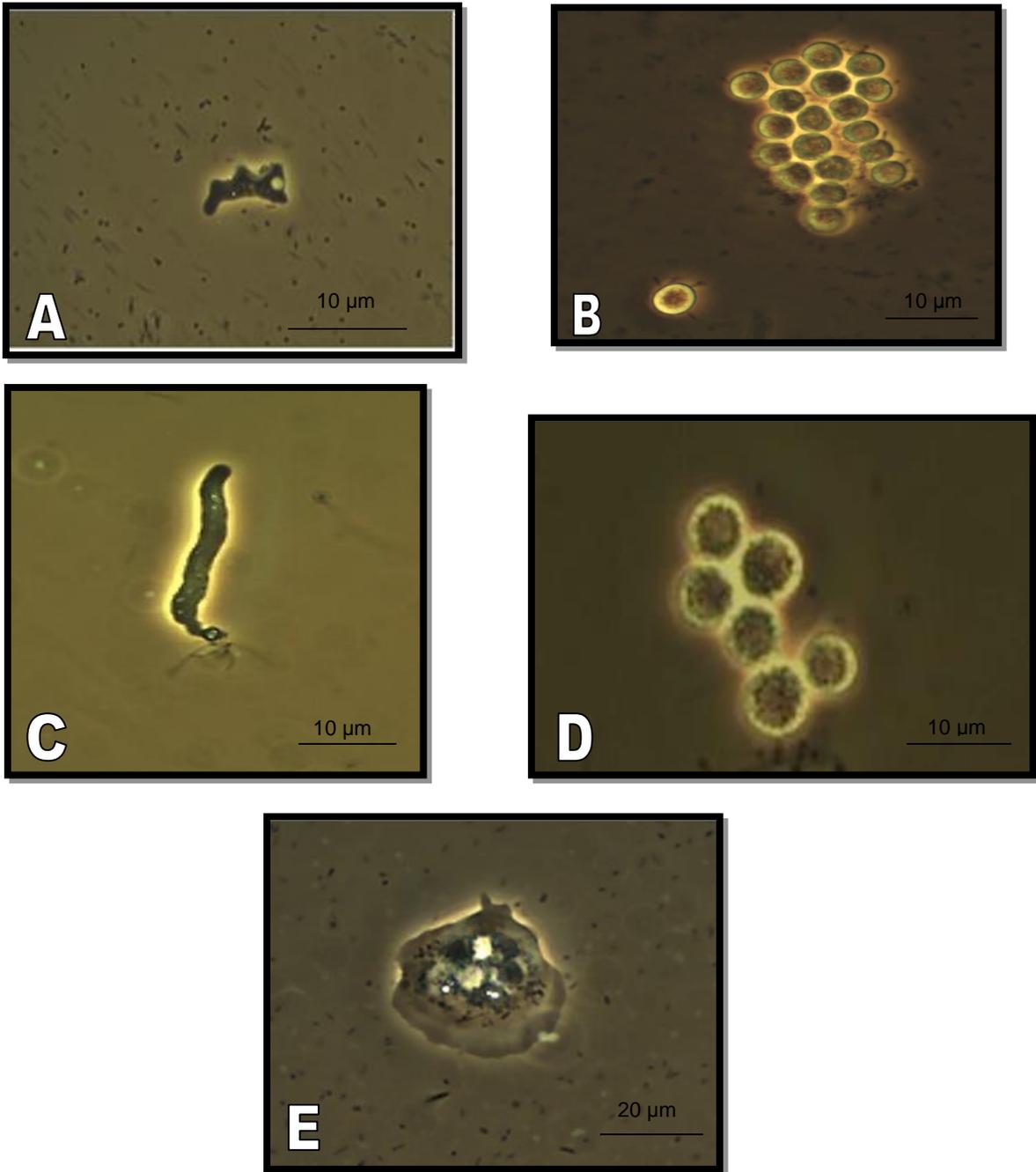
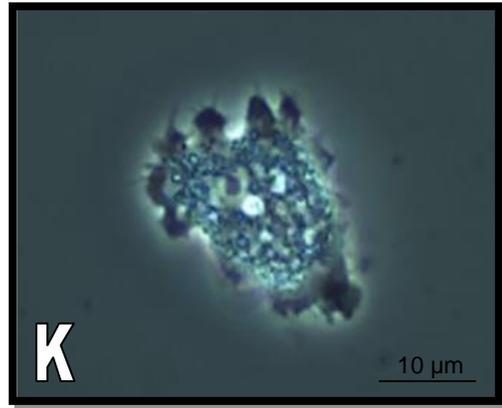
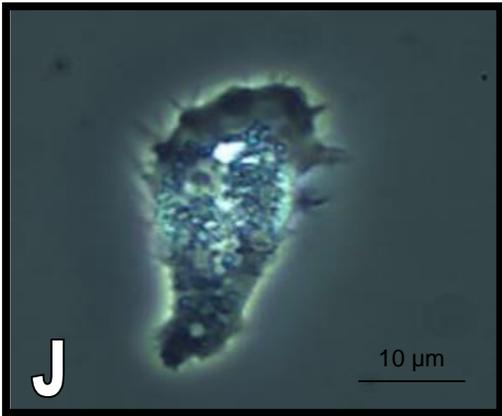
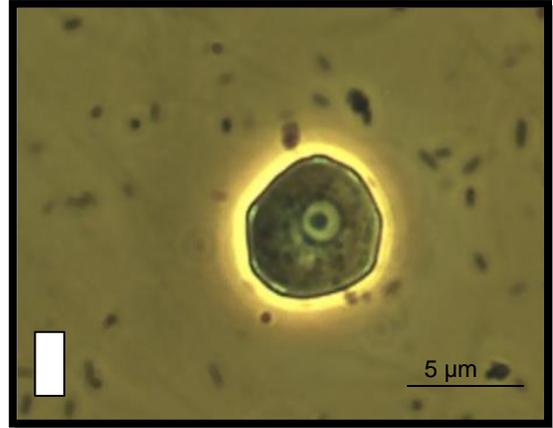
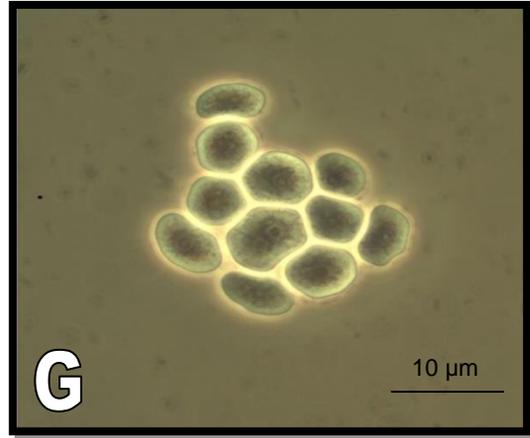
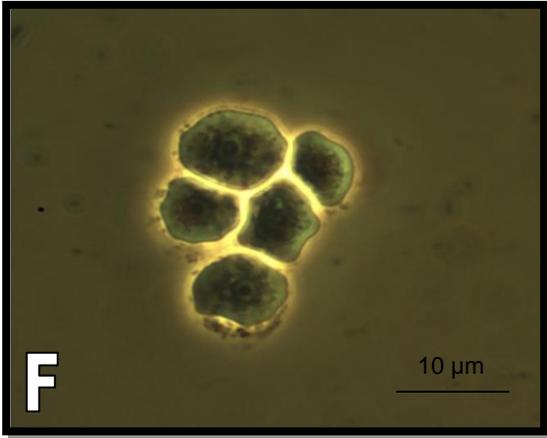
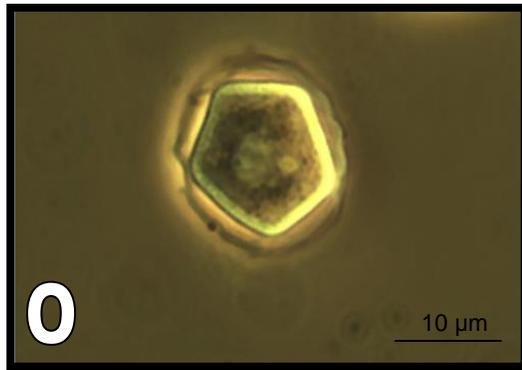
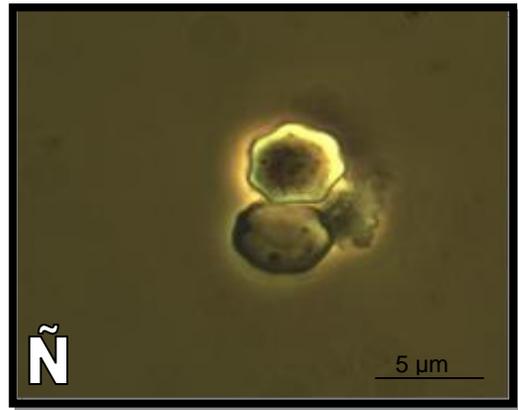
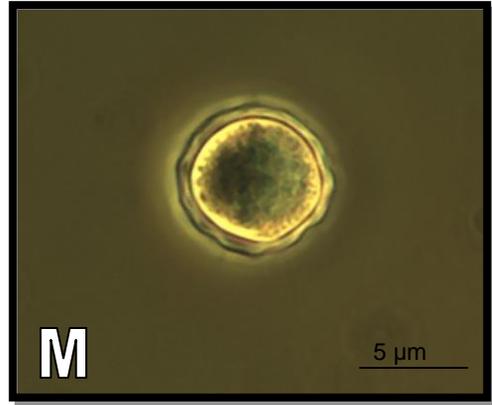
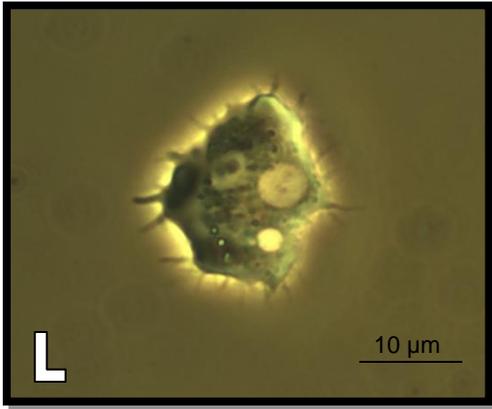


Figura 11. Trofozoítos y quistes de AVL aisladas.

A, *Rosculus ithacus* trofozoíto. **B,** *R. ithacus* quistes. **C,** *Hartmannella vermiformis* trofozoíto. **D,** *H. vermiformis* quistes. **E,** *Vannella* trofozoíto. 40x.



F, G, *Vahlkampfia* quistes. **H**, *Naegleria* sp trofozoítos. **I**, *N.* sp quiste. **J, K**, *Acanthamoeba* trofozoítos. 40x.



L, *Acanthamoeba culbertsoni* trofozoíto. **M**, **N**, *A. culbertsoni* quistes. **Ñ**, *A. astronyxis* quiste. **O**, *A. polyphaga* quiste. 40x.

Con base en la clave taxonómica de Page (1988), se identificaron 15 aislados como pertenecientes al género *Naegleria* y de acuerdo con Page (1988) y Pussard y Pons (1977), se identificaron 4 aislados como *Acanthamoeba*.

Prueba de transformación amebo-flagelar: Los 15 aislamientos identificados como pertenecientes al género *Naegleria*, fueron positivos a esta prueba.

Cultivo axénico: Ninguno de los 15 aislados de *Naegleria* logró adaptarse a los medios de cultivo axénicos Bactocasitona y Chang modificado y solamente 2 de ellos lograron desarrollarse en el medio Ringer (Anexo 2), los cuales pertenecen, uno del Riachuelo del primer muestreo, y el otro del Río del segundo muestreo. Los 4 aislamientos de *Acanthamoeba*, pudieron cultivarse satisfactoriamente en los medios de cultivo axénicos.

Prueba de tolerancia a la temperatura: *Naegleria* presentó mejor crecimiento a 25°C seguido por 37°C, cabe destacar que un solo aislado creció a 42°C, sin embargo no resultó patógeno. Respecto a *Acanthamoeba* tuvieron un mejor crecimiento a 25 y 37°C pero también fueron capaces de crecer a 42°C y tampoco resultaron patógenas.

Prueba de patogenicidad: Se realizó en los 2 aislados pertenecientes al género *Naegleria* que crecieron en medio Ringer y los 4 del género *Acanthamoeba* que lograron axenizarse. Los 2 aislados de *Naegleria* no resultaron patógenos ya que no mataron a los ratones y tampoco se recuperaron de los animales sacrificados. Respecto a los 4 aislados de *Acanthamoeba* solo uno identificado morfológicamente como *A. astronyxis* resultó ser invasivo después de 31 días de haberse inoculado, a partir de las siembras de los órganos del ratón se observó crecimiento de dichas amibas en cerebro, pulmón, hígado y riñón (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de la prueba de patogenicidad.

MUESTREO	SITIO DE MUESTREO	CEPA	PATOGENICIDAD (+, -, invasiva)	RECUPERACIÓN DE LA AMIBA
1	Riachuelo	<i>Naegleria</i> sp	-	No se recuperó
2	Río	<i>Naegleria</i> sp	-	No se recuperó
1	Río	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	-	No se recuperó
1	Manantial Ahuehuete	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	-	No se recuperó
2	Manantial Nuez	<i>Acanthamoeba astronyxis</i>	Invasiva	Cerebro, pulmón, hígado y riñón
2	Río	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	-	No se recuperó

Parámetros fisicoquímicos

En relación a los parámetros fisicoquímicos registrados en los dos muestreos se observan valores similares (Tabla 3). Con respecto al pH, el valor mínimo fue de 6.2 en el sitio 3 del segundo muestreo y el valor mayor de 7.75 en el sitio 4 del segundo muestreo (Fig. 11). La mínima concentración de OD se registró en el sitio 1 con 1.8 mg/L del primer muestreo y la mayor de 4 mg/L en el sitio 6 del segundo muestreo (Fig. 12). La temperatura menor fue de 25°C en el sitio 6 del primer muestreo y la mayor de 39°C en el sitio 1 del primer muestreo (Fig. 13). El valor mínimo de conductividad fue de 969 $\mu\text{S/cm}$ en el sitio 1 del segundo muestreo y el mayor de 1224 $\mu\text{S/cm}$ en el sitio 5 del segundo muestreo (Fig. 14). Solamente se registró 0.04 mg/L de cloro libre residual en la alberca Amor en el segundo muestreo.

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos de los sitios de muestreo.

Parámetros Fisicoquímicos	1° MUESTREO					2° MUESTREO				
	Febrero					Agosto				
	pH	Temp. del agua (°C)	OD (mg/L)	Cloro libre residual (mg/L)	Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	pH	Temp. del agua (°C)	OD (mg/L)	Cloro libre residual (mg/L)	Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)
1.Manantial Nuez	6.8	39	1.8	0	996	6.5	38	2.8	0	969
2.Riachuelo	7.2	32	2.6	0	1077	7.3	32	3	0	1087
3.Alberca Amor	7.1	33	3	0	1085	6.2	33	3.1	0.04	1096
4.Río	7.6	31.9	3.2	0	1021	7.7	28	3.4	0	1174
5.Manantial Ahuehuate	7.6	NM	NM	0	1177	7.3	28	2.7	0	1224
6.Sistema de Bombeo	7.2	25	3	0	1192	7.2	26	4	0	1197

NM: No se tomó muestra.

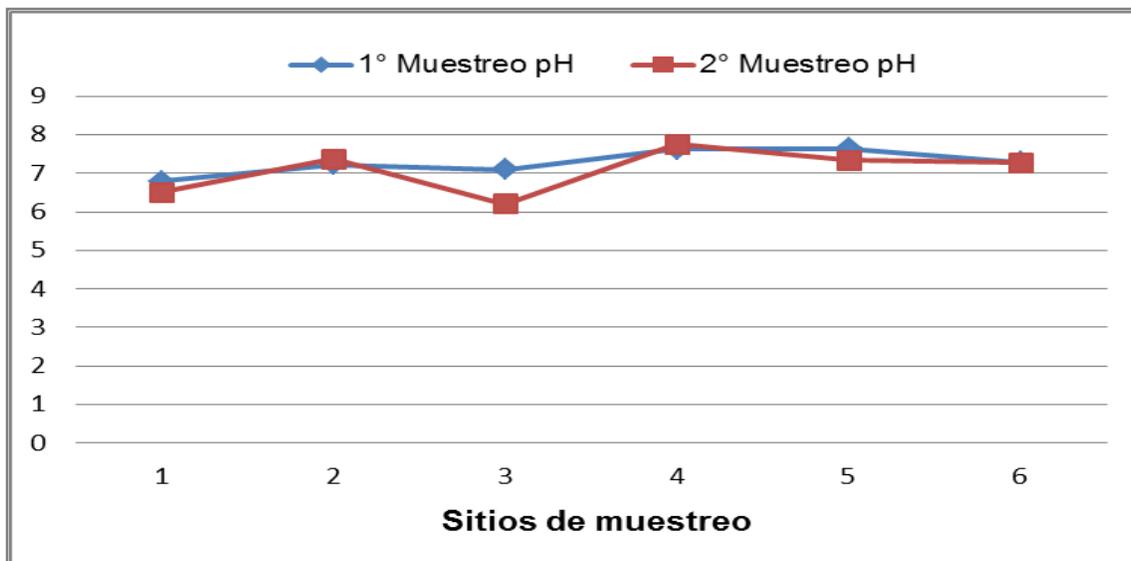


Figura 12. pH del agua de los sitios de muestreo

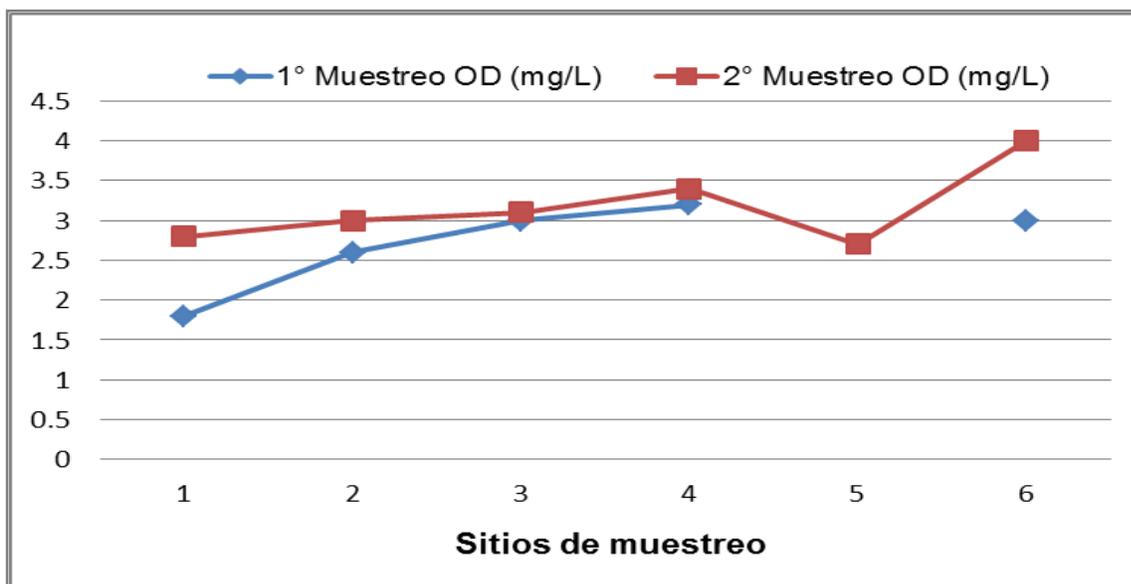


Figura 13. OD del agua de los sitios de muestreo.

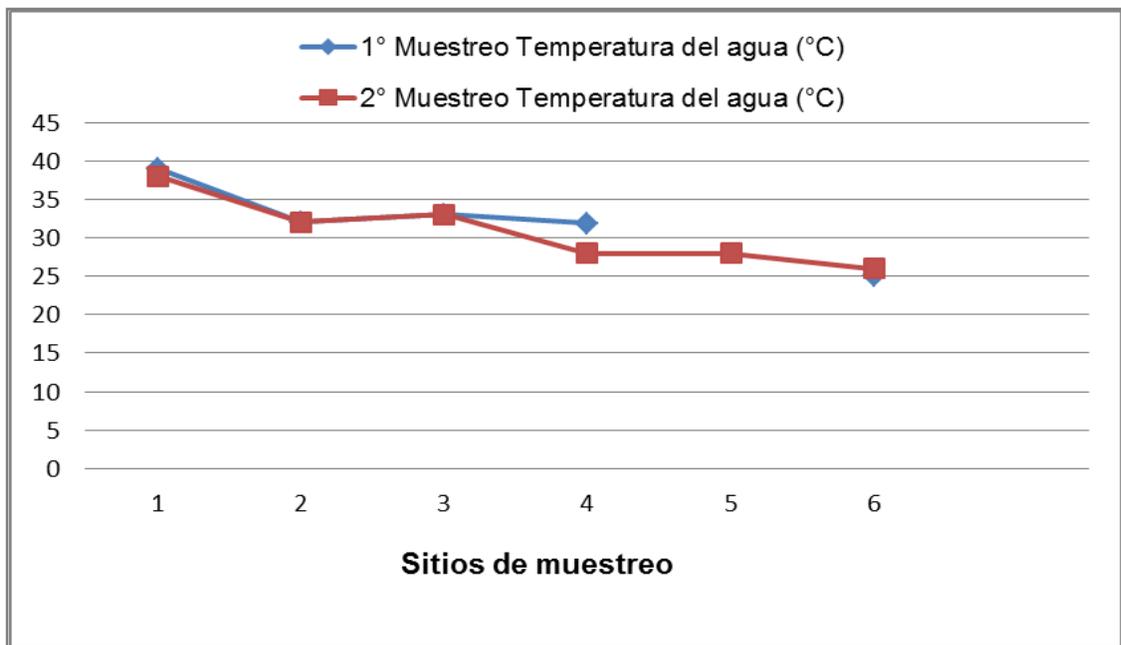


Figura 14. Temperatura del agua de los sitios de muestreo.

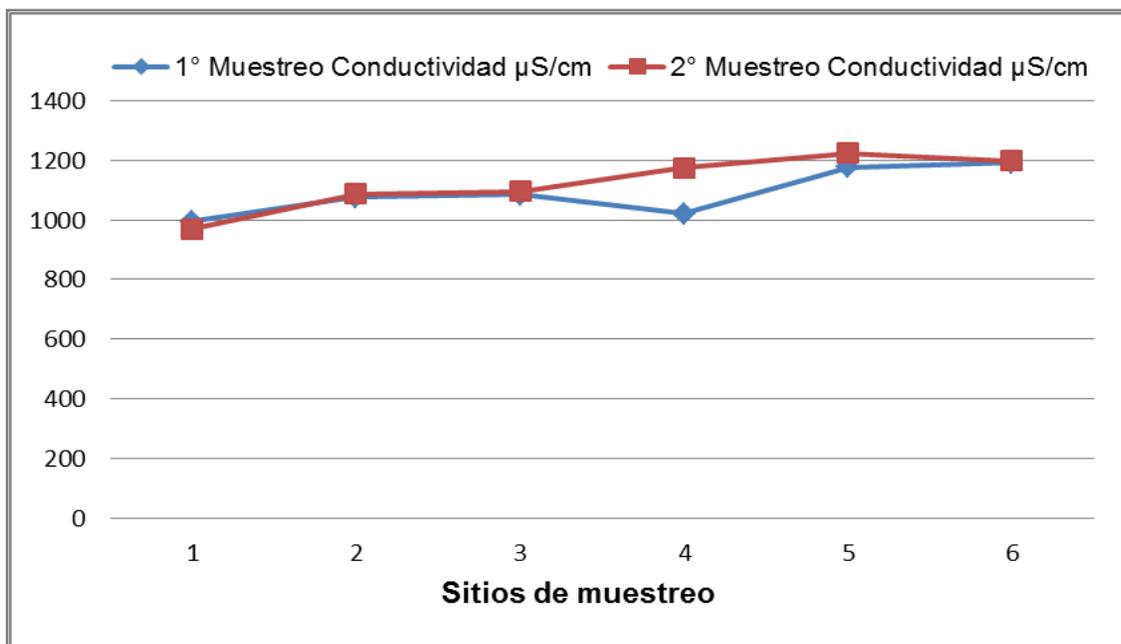
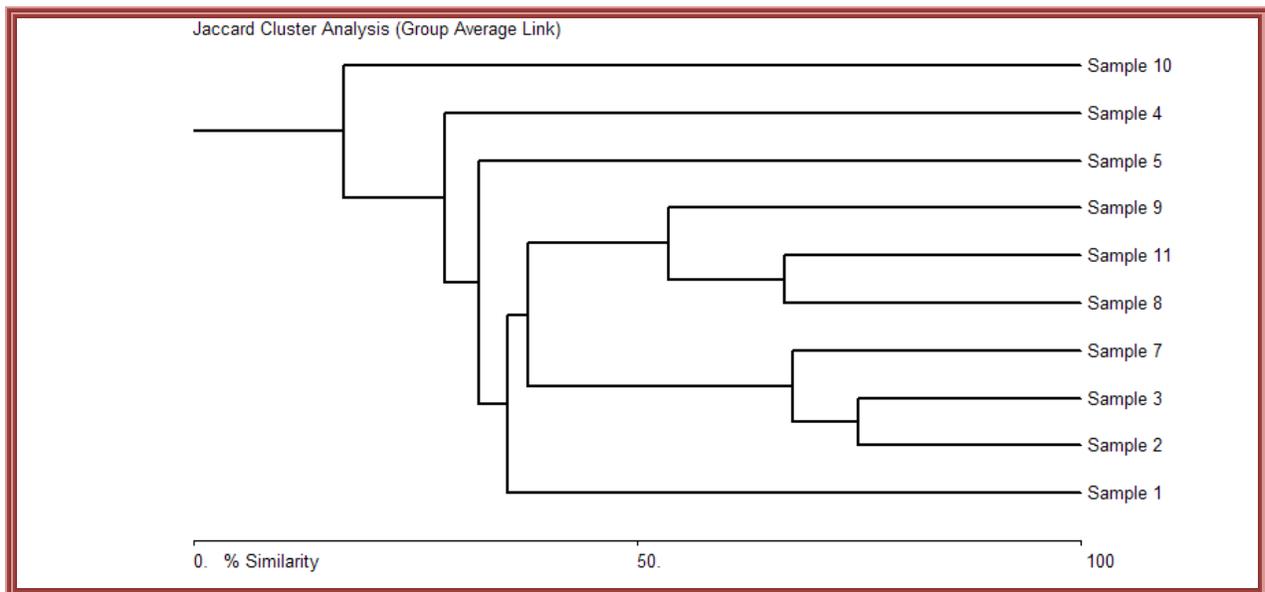


Figura 15. Conductividad del agua de los sitios de muestreo.

Análisis estadísticos

Análisis Cluster: Este análisis mostró que los sitios que más se parecen son el Riachuelo (1°M) y la Alberca Amor (1°M) con aproximadamente un 75% de similitud los cuales forman el primer grupo y a su vez el Manantial Nuez (2°M) se parece a este grupo en un 65% , el segundo grupo con mayor similitud son el Riachuelo (2°M) y el Manantial Ahuehuete (2°M) con un 65% de similitud y a su vez la Alberca Amor (2°M) se asemeja a este grupo en un 55%, los dos grupos que se formaron se asemejan en un 37% y finalmente el Río (1°M y 2°M) es el sitio que menos se parece a los demás con un 17 y 25% de similitud. (Fig. 15).



1° MUESTREO (1°M)	2° MUESTREO (2°M)
1. Manantial Nuez	7. Manantial Nuez
2. Riachuelo	8. Riachuelo
3. Alberca Amor	9. Alberca Amor
4. Río	10. Río
5. Manantial Ahuehuete	11. Manantial Ahuehuete

Figura 16. Dendrograma que muestra el agrupamiento de los sitios de muestreo de mayor a menor similitud entre las AVL aisladas y los sitios de muestreo.

Prueba de Spearman. Los datos que se presentan solo corresponden a los parámetros que tuvieron correlación: La conductividad tuvo una correlación negativa considerable con la temperatura del agua con un coeficiente de correlación de -0.792 con un nivel de significancia del 0.01, *Naegleria* sp tuvo una correlación positiva media con la temperatura del agua con un coeficiente de correlación de 0.650 con un nivel de significancia del 0.05 y finalmente hubo una correlación perfecta entre las amibas *Vahlkampfia ustiana*, *Mayorella cultura* y *Platyamoeba stenopodia* con un coeficiente de correlación de 1 con un nivel de significancia de 0.01 (Tabla 4).

Tabla 4. Coeficiente de correlación de Spearman entre los parámetros fisicoquímicos y la presencia de AVL.

		Temp. del agua (°C)	<i>Platyamoeba stenopodia</i>	<i>Vahlkampfia ustiana</i>	<i>Mayorella cultura</i>
Conductividad (µS/cm)	Coeficiente de correlación	-0.792*	0.000	0.000	0.000
	Sig. (bilateral)	0.004			
<i>Naegleria</i> sp	Coeficiente de correlación	0.650	0.000	0.000	0.000
	Sig. (bilateral)	0.030			
<i>Vahlkampfia ustiana</i>	Coeficiente de correlación	0.000	1.000**	1.000**	1.000**
	Sig. (bilateral)		.	.	.
<i>Mayorella cultura</i>	Coeficiente de correlación	0.000	1.000**	1.000**	1.000**
	Sig. (bilateral)		.	.	.
<i>Platyamoeba stenopodia</i>	Coeficiente de correlación	0.000	1.000**	1.000**	1.000**
	Sig. (bilateral)		.	.	.

*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral) y **. La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

DISCUSIÓN

Se demostró la presencia de amibas de vida libre en el Parque Ecoalberto ya que se aislaron en 5 sitios de muestreo, excepto en el sitio 6 el cual corresponde al efluente de un Sistema de Bombeo, donde se filtra el agua de otro Manantial, que aproximadamente se encuentra a 3 Km del parque recreativo. En este lugar las personas de la comunidad quieren embotellar el agua para consumo humano, sin embargo a pesar de que no se encontraron AVL, es necesario descartar la presencia de otros microorganismos.

El mayor número de aislamientos de AVL se registró en el Manantial Ahuehuete (Fig. 6, 7, 8), lo cual probablemente se debe a que los manantiales surgen directamente del suelo y como está ampliamente documentado (Page, 1988; Bonilla *et al.*, 2004; Martínez y Visvesvara, 1997; Schuster y Visvesvara, 2004), el suelo es su principal hábitat seguido por el agua. Así que es probable que a las AVL del agua de los manantiales, se sumen las del suelo por donde el manantial emerge a la superficie, además había vegetación alrededor, lo que probablemente facilitaba encontrar mayor fuente de alimentación. Sin embargo, hay una gran similitud en el número y diversidad de aislados con los demás sitios. De manera particular, las especies *Naegleria* sp, *Guttulinopsis vulgaris* y *Rosculus ithacus*, estuvieron presentes prácticamente en todos los sitios de muestreo.

El género más frecuente fue *Naegleria*, seguido de *Rosculus*, *Guttulinopsis* y *Vannella*. *Naegleria* y *Rosculus* forman quistes por lo que pueden sobrevivir mayores periodos en condiciones adversas como la escasez de alimento, quizá por esta razón se encontraron entre las más frecuentes, incluso a *Rosculus* se le ha aislado a temperaturas que van desde los 33°C hasta los 48°C (Urbina, 2006). En el caso de *Guttulinopsis* y *Vannella* hasta el momento no se conoce que formen quistes como tal, por lo que pueden perecer en un tiempo relativamente corto si no encuentran alimento, lo que hace pensar que las condiciones ambientales eran favorables para su desarrollo.

Además las especies del género *Vannella* se han registrado con frecuencia en piscinas (Ariza *et al.*, 1989). Y con un solo aislado se encontró a *Mayorella*, esta amiba solo se aisló del sitio de muestreo Río, probablemente proveniente de las aguas de la presa Endho quizá por esa razón no se aisló en los otros sitios de muestreo, además de que no forma estructuras de resistencia, limitando así su capacidad de dispersión (Page, 1988).

Se aislaron amibas de importancia médica como lo son *Naegleria* y *Acanthamoeba*. Esto coincide con trabajos realizados en otros ambientes acuáticos, en los que se han encontrado estos géneros (Rivera *et al.*, 1989; García, 2000; Guzmán *et al.*, 2008).

Naegleria, como se mencionó anteriormente fue la más frecuente, lo cual probablemente está asociado con las temperaturas registradas arriba de los 28°C ya que la prueba de Spearman muestra una posible correlación entre las dos. Se aisló en todos los sitios de muestreo con excepción del Río del segundo muestreo y del efluente del sistema de bombeo, donde no se aisló ninguna AVL.

En relación al cloro libre residual, solamente se registró en baja concentración en el segundo muestreo en la Alberca Amor, esto debido a que la alberca es llenada de agua termal por lo que el agua fluye continuamente y no persiste mucho tiempo ahí, a pesar de que la limpian con cloro y en ocasiones le agregan cloro y dejan confinada el agua para que tenga efecto de desinfección, el efecto microbicida es muy bajo y por esa razón no se observó diferencia significativa en cuanto al número de aislamientos en relación con los otros sitios de muestreo. Otra razón por la que el cloro no persiste mucho tiempo en la alberca es quizá porque cuando la temperatura es alta, en este caso se registró de 33°C, el cloro se puede perder por evaporación, sin embargo en la prueba de correlación el cloro no se vio afectado por la temperatura. Rivera *et al.*, en 1989 señalaron que la ausencia de cloro favorece el crecimiento y proliferación de las naeglerias. Además es una amiba que se ha reportado con frecuencia en el suelo y desde allí puede llegar a los cuerpos de agua arrastradas por escurrimientos o a través del aire (Herrera, 2001).

Morfológicamente, las naeglerias aisladas en este estudio probablemente corresponden a *Naegleria gruberi*, debido a que presentan quistes con 4 o 5 poros, (*N. fowleri* uno o dos) (Rodríguez, 2003), llegando a medir desde los 11 µm a los 13 µm con formas ovaladas no tan redondos a diferencia de *N. fowleri* que llegan a medir desde los 10 µm a los 12 µm con formas esféricas (Gupta *et al.*, 2009) además, de acuerdo con la prueba de temperatura estas amibas tuvieron un buen crecimiento a 25 y 37°C, y no se desarrollan a 42°C, que es una característica distintiva de la especie patógena *N. fowleri* (Griffin, 1972). Hubo un aislado de *Naegleria* que creció a 42°C, cuyos quistes tienen en promedio 21 µm con 3 poros, se ha visto que se puede aislar a este género a temperaturas altas y no corresponde a la especie patógena, incluso se ha aislado a 53°C (Urbina, 2006). Así que se propone que dicho aislado pertenece a la especie *N. gruberi* ya que como menciona De Jonckheere en 1984, la especie *N. gruberi* no está bien definida y puede corresponder a muchas cepas de *Naegleria* que simplemente no corresponden a las otras ya identificadas.

Otra razón para descartar la posibilidad de que los aislados obtenidos corresponden a la especie patógena *N. fowleri* fue la prueba de patogenicidad, la cual resulto negativa, ya que no mataron a los ratones y tampoco se lograron recuperar de sus órganos. Esta prueba también sirvió para descartar la posibilidad de que los aislados correspondieran a *N. australiensis* ya que a pesar de que no es patógena en humanos si lo es en ratones.

Asimismo solamente 2 de los aislados de *Naegleria* crecieron únicamente en medio Ringer (Anexo 2). Martínez en 1987, señaló que la axenización de las amibas del género *Naegleria* en los medios conocidos hasta ahora, presenta dificultades, por lo que recomienda probar y buscar nuevas condiciones de axenización para estas amibas o nuevos medios en base a sus requerimientos nutricionales.

Acanthamoeba solo se aisló de los manantiales (sitios 1 y 5) y del río (sitio 4). Page en 1988, menciona que las amibas que con frecuencia son aisladas de sedimento de ecosistemas acuáticos pertenecen al género *Acanthamoeba*, otra razón que explica su presencia en el río es porque es muy común encontrarla en los ambientes muy

perturbados por los humanos (Rodríguez *et al.*, 2005), característica del Río ya que en ese sitio se mezclan las aguas que provienen de la presa Endho y la que sale de las albercas, además cerca de este punto había basura acumulada.

Es interesante hacer notar que en la mayoría de estudios ambientales, la AVL más común es *Acanthamoeba* (Martínez y Visvesvara, 1997; Gudiño, 2003) a diferencia de lo que se observó en Ecoalberto, donde uno de los géneros más comunes fue *Naegleria*, probablemente favorecidas por las temperaturas relativamente altas (entre los 28 y los 39°C). De manera semejante que en nuestro estudio, en un trabajo realizado por Leiva *et al.*, 2008 obtuvieron más aislados de *Naegleria* en aguas termales que de *Acanthamoeba*.

De este género se identificaron tres especies, *A. astronyxis*, *A. polyphaga* y *A. culbertsoni*. De acuerdo al criterio de identificación de Pussard y Pons, 1977, la morfología del quiste es un criterio clave, proponiendo tres grandes grupos. De acuerdo con este criterio *A. astronyxis*, pertenece al primer grupo, amibas no patógenas que incluye a las especies con los quistes más grandes, el diámetro de los quistes es igual o superior a 18 µm. *A. astronyxis* presenta endoquiste en forma de estrella y en promedio el diámetro de sus quistes es de 19 µm; *A. polyphaga*, pertenece al segundo grupo, donde se encuentran especies patógenas y no patógenas y son las amibas más frecuentemente aisladas, por lo general el endoquiste son de aspecto globular, ovoide o poliédrica, *A. polyphaga* es una amiba potencialmente patógena, en promedio sus quistes tienen un diámetro de 14 µm, con un endoquiste poliédrico; *A. culbertsoni*, pertenece al tercer grupo, presentando quistes de tamaño medio o pequeño, generalmente inferior a 19 µm, con endoquiste en forma globular u ovoide y pertenecen al grupo de amibas patógenas. Específicamente *A. culbertsoni* presenta endoquiste notablemente redondeados con un diámetro promedio de 15, 16 o 18 µm.

A diferencia de *Naegleria* no hubo problema al axenizar los diferentes aislados de *Acanthamoeba*, por lo que los 4 aislados se probaron en ratón, resultando que solo *A. astronyxis* fue invasiva ya que se recuperó del cerebro, pulmón, hígado y riñón de los ratones; aunque la clave utilizada Pussard y Pons, (1977) para su identificación mencionan que *A. astronyxis* pertenece al grupo de las no patógenas, algunos autores la mencionan como potencialmente patógena, que puede ocasionar EAG (Oddó, 2006; Sarría, 2001; Gertiser *et al.*, 2010).

Las amibas *A. culbertsoni* y *A. polyphaga* de acuerdo con Pussard y Pons, (1977) son patógenas para el humano, sin embargo en la prueba de patogenicidad no mataron a los ratones, y tampoco se recuperaron de sus órganos, posiblemente a que se ha observado que el cultivo continuo de amibas patógenas en medio axénico conlleva a la pérdida gradual de su virulencia, la cual puede ser recuperada haciéndola crecer en cultivo de tejidos (John y Howard, 1993 citado en Rodríguez, 2003; Cursons *et al.*, 1980). Estas amibas se aislaron del Río y del Manantial Ahuehuete, lo que representa un peligro ya que sus quistes pueden llegar a las piscinas por el aire (Gertiser *et al.*, 2010).

Otras amibas que se aislaron en el presente estudio, como *Hartmannella* ha sido asociada a casos de encefalitis, *Vannella* y *Vahlkampfia* han sido asociadas a casos de queratitis en humanos, aunque no se ha comprobado su papel como agentes causantes de dichas enfermedades (Ramírez *et al.*, 2009), no puede pasar desapercibida su presencia.

Parámetros fisicoquímicos

En base en las gráficas (Fig. 12-15) los parámetros fisicoquímicos en ambos muestreos mostraron valores similares, entre las temporadas de muestreo analizadas (secas y lluvias).

Los valores de pH oscilaron entre los 6.2 y 7.75. Valores cercanos a la neutralidad, los cuales se encuentran dentro del rango que permiten el crecimiento óptimo de las AVL (Ramírez *et al.*, 2012). Además se ha reportado que las amibas toleran amplios intervalos de pH que van de los 4 hasta los 9.5 (Suárez, 2004).

El oxígeno disuelto oscilo de 1.8 mg/L a los 4 mg/L, lo que no fue un factor limitante para su óptimo crecimiento ya que las AVL son aerobias y en concentraciones mayores a 2 mg/L crecen muy bien. En condiciones anaerobias pueden pasar a su estado quístico como protección a condiciones adversas (John, 1993). Por otra parte la concentración menor que fue de 1.8 mg/L ligeramente menor al crecimiento óptimo para las amibas pudo deberse a que este parámetro se ve influido por la temperatura y en este sitio de muestro se presentó la temperatura más alta, 39°C por lo que se esperaba que tendiera a disminuir la concentración de oxígeno disuelto. Sin embargo el análisis estadístico no mostro una correlación entre estos dos parámetros quizá porque la temperatura no afecto significativamente la concentración de oxígeno disuelto.

La temperatura del agua registrada osciló entre los 25°C y los 39°C. Las amibas toleran temperaturas que van desde los 4° C hasta temperaturas elevadas a más de 30°C y como se ha reportado las amibas patógenas pueden soportar temperaturas de 45°C e incluso se han aislado a 53°C (Urbina, 2006).

En el presente trabajo, la prueba de correlación (Tabla 4) mostro que la temperatura tuvo una ligera influencia en cuanto a la presencia de *Naegleria* sp., aislándose en un rango de 28 a 39°C. Sin embargo aunque algunos autores aseveran que las amibas patógenas proliferan a temperaturas superiores a los 30°C (Visvesvara *et al.*, 2007) las temperaturas registradas en este trabajo por arriba de los 30°C no favorecieron el crecimiento de la amiba patógena y termotolerante *Naegleria fowleri* probablemente como lo menciona Griffin en 1972, esta especie generalmente crece a temperaturas mayores de 45°C.

La conductividad permite estimar la cantidad de sales del agua (Gama *et al.*, 2010). Las AVL tienen amplia tolerancia. Agua con valores mayores a 3000 µS/cm se considera salina, afectando la riqueza de especies (Suárez, 2004). Los valores de conductividad en este estudio estuvieron entre 969 y 1224 µS/cm, valores permisibles para el crecimiento de AVL.

Solamente se registró cloro libre residual (0.04 mg/L) en el segundo muestreo de la alberca amor, concentración que no inhibió el crecimiento de AVL, ya que se aislaron e identificaron 6 aislamientos de AVL. Aunque el agua fluye constantemente, ya que las albercas son alimentadas directamente del manantial de aguas termales, temporalmente el agua está confinada en las albercas permitiendo la acumulación de materia orgánica lo que favorece el crecimiento de amibas pues es una fuente de alimento. Se ha reportado que la concentración de 1.5 mg/L de cloro libre residual es suficiente para inhibir su presencia, sin embargo, otras amibas como las del género *Acanthamoeba*, son más resistentes al cloro y requiere de una concentración mínima de 2 mg/L (Ramírez *et al.*, 2012). Es importante señalar que las concentraciones de 1.5 a 2 mg/L de cloro libre residual son las permitidas para aguas recreativas (Gama *et al.*, 2010).

Análisis estadísticos

En el análisis de similitud de Cluster (Fig. 16), el primer grupo que se conformó con un 75% de similitud fueron el Riachuelo y la Alberca Amor del primer muestreo debido a la presencia de *Naegleria* sp., *Rosculus ithacus* y *Guttulinopsis vulgaris*. El segundo grupo que se conformó con un 65% de similitud fue el Riachuelo y el Manantial Nuez del segundo muestreo debido a la presencia de *Naegleria* sp., *R. ithacus* y *G. vulgaris*. Estos dos grupos entre sí tuvieron una similitud del 37% debido a como ya lo vimos se aislaron 3 especies similares *Naegleria* sp., *R. ithacus* y *G. vulgaris*. Lo que nos hace pensar que estas amibas provenían del agua ya que estos sitios están conectados y las otras amibas que se sumaron a cada sitio posiblemente provenían del suelo o del aire. Finalmente el sitio que menor tuvo similitud fue el Río tanto en el primer como en el segundo muestreo con un 17 y 25% respectivamente, esto posiblemente a que es un sitio de intersección entre aguas provenientes de la presa Endho y las que salen de la alberca.

La prueba de Spearman (Tabla 4) arrojó que la conductividad del agua tuvo una correlación negativa considerable con la temperatura del agua, esto quiere decir que si la temperatura disminuye, la conductividad aumenta de manera proporcional. En el primer muestreo el Manantial Nuez tuvo la temperatura del agua más alta 39°C y con la conductividad del agua más baja 996 µS/cm y en el Sistema de Bombeo se registró la temperatura del agua más baja de 25°C con una conductividad de 1192 µS/cm siendo la más alta. En el segundo muestro se registró algo muy similar el Manantial Nuez volvió a presentar la temperatura del agua más alta 38°C y la conductividad más baja 969 µS/cm y el Sistema de Bombeo presentó también la temperatura más baja 26°C, con una conductividad de 1197 µS/cm, sin embargo el Manantial Ahuehuate con una temperatura de 28°C presentó la conductividad más alta de 1224 µS/cm. Esto quizá porque los iones se pueden incrementar debido a partículas que se suman al agua y en el Manantial Ahuehuate había muchísima vegetación e insectos lo que pudo contribuir a que hubiera un ligero aumento en la conductividad del agua.

Se mostró una correlación no muy clara entre *Naegleria* sp. con la temperatura del agua ya que estadísticamente se tuvo una correlación positiva media, esto quizá se dio ya que *Naegleria* sp., fue aislada en la mayoría de los sitios, por lo que se pensaría que la temperatura la favoreció.

Además hubo una correlación perfecta entre las amibas *Vahlkampfia ustiana*, *Mayorella cultura* y *Platyamoeba stenopodia*, esto porque se aislaron únicamente del Río del segundo muestreo.

Finalmente es importante resaltar la importancia que juegan las AVL y sobre todo *Naegleria* y *Acanthamoeba* en las piscinas, amibas mencionadas en la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-245-SSA1-2010, que se refiere a los requisitos sanitarios y la calidad del agua que deben cumplir las albercas, esto con la finalidad de prevenir y minimizar riesgos a la salud pública por enfermedades gastrointestinales, de la piel y otras como las causadas por las AVL.

En la misma se menciona que *Naegleria* y *Acanthamoeba* deben estar ausentes en las albercas ya que son potencialmente patógenas y como ya se mencionó es muy común encontrarlas en estos sitios. El parque Ecoalberto cumple con la norma ya que no se aisló en la alberca a *Naegleria fowleri*, la especie patógena y tampoco a las especies patógenas de *Acanthamoeba*.

Sin embargo es importante seguir con los monitoreos y sobre todo informar a la gente de las medidas que deben tomar al acudir a parques acuáticos y así poder prevenir infecciones por amibas de vida libre. Cabe mencionar que en 2008 en la Norma Técnica Sanitaria para balnearios y parques acuáticos del Estado de Hidalgo se incluyó la determinación de amibas de vida libre.

CONCLUSIONES

El Parque Ecoalberto es un ambiente adecuado para el desarrollo de amibas de vida libre.

Se identificaron los siguientes géneros amibianos: *Naegleria*, *Guttulinopsis*, *Rosculus*, *Hartmannella*, *Vannella*, *Vahlkampfia*, *Platyamoeba*, *Acanthamoeba*, *Vexillifera* y *Mayorella*.

Las especies con mayor número de aislados fueron *Naegleria* sp., *Rosculus ithacus* y *Guttulinopsis vulgaris*.

Naegleria sp. pudo ser en particular favorecida por la temperatura del agua en los sitios analizados ya que la prueba de correlación mostró una posible relación entre la temperatura del agua y *Naegleria* sp. esto posiblemente porque se aisló en la mayoría de los sitios de muestreo.

No se encontró a la especie patógena *Naegleria fowleri* sin embargo, se aislaron especies potencialmente patógenas del género *Acanthamoeba*: *A. polyphaga* y *A. culbertsoni*, resultando no patógenas en la prueba de patogenicidad, solo *A. astronyxis* fue invasiva.

Los parámetros fisicoquímicos registrados se encontraron dentro de los valores reportados como adecuados para la presencia de amibas de vida libre.

De acuerdo con la NOM-245-SSA1-2010 es importante seguir con los monitoreos de la alberca del parque Ecoalberto, y así brindar un servicio seguro a los usuarios.

Es importante que las personas que acuden a este y otros balnearios tomen medidas como el uso de “googles” para practicar la natación, no introducirse al agua con lentes de contacto, ni con heridas en la piel, usar tapones para la nariz o evitar la entrada brusca del agua por la nariz. Además mantener limpia y en buen estado las albercas.

REFERENCIAS

- Ariza, C., Guevara, D. C., Ubeda, J. M., Cutillas, C. 1989. Description of four species of the genus *Vannella* isolated from freshwater. *Sociedad Española de Microbiología*. 5: 25-33.
- Ávila, I., Rodríguez, M., Infante, D., Llovera, V., Álvarez, O., Briceño, M. 2006. Amibas de vida libre potencialmente patógenas en aguas del parque “Las Cocuizas”, Maracay, Venezuela. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 58 (1): 19-24.
- Azevedo, B., Tanowitz, H., Cabral, F. 2009. *Diagnosis of Infections Caused by Pathogenic Free-Living Amoebae*. Hindawi Publishing Corporation *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 14p.
- Barker, J. y Brown, M. R. W. 1994. Trojan Horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology*. 140 (6): 1253-1259.
- Biodiversity pro 2.0. 1997.
- Bonilla, P., Ramírez, E., Ortiz, R., Eslava, C. 2004. La Ecología de las Amibas Patógenas de Vida Libre en Ambientes Acuáticos. En: Rosas, Cravioto y Escurra (Eds.). *Microbiología Ambiental*. PUMA – UNAM e Instituto Nacional de Ecología – SEMARNAT. 67-81.
- Bonilla, P. y Ramírez, E. 2011. Amibas de vida libre con potencial patógeno. En: Becerril M.A. *Parasitología Médica*. Mc Graw-Hill Interamericana Editores S.A de C.V. 31-42.
- Cursons, R. T. M., Brown, T. J., Keys, E. A., Moriarty, K. M., Till, D. 1980. Immunity to Pathogenic Free-Living Amoebae: Role of Humoral Antibody. *Infection and Immunity*. 29 (2): 401-407.
- De Jonckheere, J. F. 1984. Postgraduate course on biochemical techniques for the diagnosis of primary amoebic meningoencephalitis. UNAM. México. 1-70.

- Durán, Á., Cisneros, A. E., Vargas, A. 2004. Bioestadística.
- Ferrante, A. 1991. Free-living amoebae: pathogenicity and immunity. *Parasite. Immunol.* 13: 31-47.
- Ferreira, E. E., Lares, F., Fernández, G., Velázquez, O., Tapia, R. 2010. Manual 13 para la vigilancia epidemiológica de meningitis por amibas de vida libre. 193-215.
- Flores, S. N. 2009. *Acanthamoeba castellanii* como posible vehículo de transmisión de *Campylobacter jejuni* para *Columba livia* y pollos broiler. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias. Valdivia-Chile. 50p.
- Gama, J. L., Pavón, E. L., Ramírez, T., Angeles, O. 2010. Análisis de Calidad del Agua Relación entre factores bióticos y abióticos. UNAM-FES IZTACALA. Primera edición.
- Galarza, C., Gutiérrez, E., Uribe, M., Ramos, W., Ortega, A., Ávila, J., Hanco, J., Espinoza, Y., Espinoza, M., Ñavimcopa, M., Gámez, D. 2006. Free-living amoebae in skin lesions: report of 4 cases. *Dermatología Peruana.* 16 (1): 36-40.
- Garaycochea, M., Beltrán, M., Morón, C. 2008. Pathogenicity of Free-living Amoebas Isolates in Body Waters from Lima. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública.* 25 (2): 204-207.
- García, D. 2000. Detección de *Naegleria fowleri* en cuerpos de agua de importancia turística en el estado de San Luis Potosí. Tesis de Licenciatura. UNAM-FES IZTACALA. México. 56p.
- Gertiser, M. L., Visciarelli, E., Basabe, N., Perez, M. J., Costamagna, S. R. 2010. *Acanthamoeba* spp. in indoor swimming pools in Bahía Blanca city, Buenos Aires province, Argentina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.* 44 (4): 697-703.
- Griffin, J. L. 1972. Temperature tolerance of pathogenic and non-pathogenic free-living amoebas. *Science.* 178: 869-870.

- Gudiño, G. D. 2003. Estudio Cuantitativo de las amibas de vida libre presentes en un sistema de tratamiento del agua residual del tipo del método de la zona de la raíz (MZR) en el poblado de Matilde, Hidalgo. Tesis de Licenciatura. UNAM-FES IZTACALA. México. 64p.
- Gupta, N., Bhaskar, H., Duggal, S., Ghalaut, P. S., Kundra, S., Arora, D. R. 2009. Primary Amoebic Meningoencephalitis: First Reported Case from Rohtak, North India. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 13 (3): 236-237.
- Guzmán, E., De Jonckheere, J. F., Lares, F. 2008. Identification of *Naegleria* species in recreational areas in Hornos, Sonora. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 79: 1-5.
- Herrera, J. M. M. 2001. Riqueza de especies de amibas desnudas y aislamiento de bacterias endosimbiontes en un suelo desnudo conservado de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos. ENEP-Iztacala. UNAM. México.
- Huang, Z. H., Ferrante, A., Carter, R. F. 1999. Serum Antibodies to *Balamuthia mandrillaris*, a Free-Living Amoeba Recently Demonstrated to Cause Granulomatous Amoebic Encephalitis. *The Journal of Infectious Diseases*. 179: 1305–1308.
- INEGI. 1992. Síntesis Geográfica del Estado de Hidalgo. 134p.
- Jercic, M. I. 2007. Free living Amoeba of Acanthamoeba genus. *Revista Chilena de Infectología*. 24 (6): 491-492.
- Jiménez, J. J. y Richard, T. J. 2003. El arado natural: Las comunidades de macroinvertebrados del suelo en las sabanas neotropicales de Colombia. Cali, CO: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 444p.
- John, D. T. 1993. Opportunistically pathogenic free-living amoebae. *In: Parasitic Protozoa*. 2 (3): 135-150.

- Lares, F., De Jonckheere, J. F., De Moura, H., Rechi, A., Ferreira, E., Fernandez, G., Ruiz, C., Visvesvara, G. S. 1993. Five Cases of Primary Amebic Meningoencephalitis in Mexicali, Mexico: Study of the Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 31 (3): 685-688.
- Leiva, B., Clasdóttir, E., Linder, E., Winiecka, J. 2008. Free-living *Acanthamoeba* and *Naegleria* spp. amebae in water sources of León, Nicaragua. *Revista de Biología Tropical*. 56 (2): 439-446.
- Madrigal, M.J., Santillana, I., Martínez, A. R. 1984. Presencia e Identificación de amibas limax en el agua de piscinas de Madrid. *Revista Ibérica de Parasitología*. 44 (4): 379-386.
- Martínez, G. J.J. 1987. Estudio Protozoológico (Subphylum Sarcodina, Clase Lobosea), de Piscinas de Agua Termal de la Región de Tecozautla, Hidalgo. Tesis de Licenciatura. UNAM-FES IZTACALA. México. 72p.
- Martínez, A. J. y Visvesvara, G. S. 1997. Free-living, Amphizoic and Opportunistic Amebas. *Brain Pathology*. 7: 583-598.
- Matuz, D. 2001. Amibas de vida libre aisladas de aguas subterráneas del Valle del Mezquital, Hidalgo, México. Tesis de Licenciatura. UNAM-FES IZTACALA. México. 53p.
- Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M., Kwaik, Y. A. 2005. Amoebae as Training Grounds for Intracellular Bacterial Pathogens. *Appl. Environ. Microbiology*. 71 (1): 20.
- Muñoz, V., Hernán, R., Toche, P., Cárcamo, C., Gottlieb, B. 2003. Isolation of free living amoebae from public swimming pool in Santiago, Chile. *Parasitología Latinoamericana*. 58: 106-111.
- Norma Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010. Requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las albercas. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5256066&fecha=25/06/2012.

- Norma Técnica Sanitaria para balnearios, parques acuáticos y establecimientos que cuenten con alberca. 2008.
- Oddó, D. 2006. Infecciones por amibas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anatómo-clínicos. Revista Chilena de Infectología. 23 (3): 200-214.
- Oddó, D., Ciani, S., Vial, P. 2006. Granulomatous amebic encephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris*. First case diagnosed in Chile. Revista Chilena de Infectología. 23 (3): 232-236.
- Omaña, M. 1994. Queratitis Amibiana en México. Tesis de Licenciatura. UNAM-FES IZTACALA. México.
- Ortíz, R., Bonilla, P., Monsalvo A., Eslava, C. 2012. Detection of Pathogenic Amoebae of the Genus *Acanthamoeba* By PCR In Recreational Water Bodies In The State Of San Luis Potosi, Mexico. Biología, Ciencia y Tecnología. FES-Iztacala. UNAM. 5 (19): 358-365.
- Page, F. 1988. A new Key to freshwater and soil gymnamoeba. England: Freshwater Biological Association Scientific Press. 122p.
- Peralta, M. y Ayala, J. 2009. Amibas de vida libre en seres humanos. Salud Uninorte. 25 (2): 280-292.
- Pereira, Á. y Pérez, M. 2003. Amibas de vida libre. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago. Farmacéutica. 22 (6): 114-117.
- Pussard, M. y Pons, R. 1977. Morphologie de la paroi Kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba*. Protistologica. 13 (4): 557-598.
- Ramírez, E., Robles, E., Ayala, R., Martínez, B. 2012. Calidad amebológica del agua de pozos utilizados para suministro de agua potable en el Estado de Hidalgo. Ingeniería—Revista Académica de la Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Yucatán. 16 (3): 219-228.

- Ramírez, E., Robles, E., Sainz, M.G., Ayala, R., Campoy, E. 2009. Calidad Microbiológica del Acuífero de Zacatepec, Morelos, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 25 (4): 247-255.

- Rivera, E., Lares, F., Gallegos, E., Ramirez, E., Bonilla, P., Calderon, A., Martinez, J., Rodriguez, S., Alcocer, J. 1989. Pathogenic Amoebae in Natural Thermal Waters of Three Resorts of Hidalgo, Mexico. *Environmental Research*. 50: 289-295.

- Rodríguez, M. A. 2003. Reconocimiento de antígenos específicos para la identificación de la amiba de vida libre *Naegleria fowleri*. Tesis de Maestría. UNAM-FES IZTACALA. México.

- Rodríguez, S., Dorantes, I., Velasco, J., Ferrera, R. 2004. Impacto de la fumigación con bromuro de metilo en tipos morfológicos de amibas desnudas de un suelo agrícola. *Terra Latinoamericana*. 22 (2): 197-205.

- Rodríguez, S., Gaviria, L., Rivera, V. 2005. Species richness of free-living Amoebae in the rhizosphere of *Neobuxbaumia tetetzo* and *Prosopis laevigata* in the drylands of Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. 2 (1): 54-64.

- Sarría, C. A. 2001. Amebas de vida libre. En: *Microbiología y Parasitología Médicas*, Tomo III. Editorial Ciencias Médicas. 125-130.

- Schmitz, S., Toenshoff, E. R., Haider, S., Heinz, E., Hoenninger, V. M., Wagner, M., Horn, M. 2008. Diversity of Bacterial Endosymbionts of Environmental *Acanthamoeba* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 74 (18): 5822-5831.

- Schuster, F. L. y Visvesvara, G. S. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*. 34: 1001-1027.

- Serrano, C., Castillo, C. A., Ramírez, V. G., Gómez, A. J., Villareal, D. 2007. Úlceras corneanas por amibas de vida libre en la Fundación Oftalmológica de Santander. Informe de casos. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Bucaramanga. 10 (2): 121-129.
- Sierra, L. 2011. Demostración del ameboflagelado *Naegleria fowleri* como agente etiológico de meningoencefalitis amébrica primaria en Santiago de Cuba. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 30 (3): 318-331.
- Suárez, H. G. 2004. Presencia y distribución de amibas potencialmente patógenas en el Valle de Mexicali Baja California, México. Tesis de Maestría. UNAM-FES IZTACALA. México. 64p.
- Suárez, R., Espinoza, Y., Villanueva, C., Ramos, J., Huapaya, P., Marquina, R. 2002. Aislamiento de amebas de vida libre del género *Acanthamoeba* a partir de fuentes de agua en la ciudad de Ica Lima, Perú. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. 63 (2): 101-105.
- Urbina, M. C. 2006. Efecto de la temperatura sobre la distribución de amibas de vida libre en un sistema de aguas termales alimentado por un géiser en el Estado de Hidalgo. Tesis de Licenciatura. UNAM-FES IZTACALA. México. 64p.
- Vargas, R. 1990. Avances en microbiología de suelos: Los protozoarios y su importancia en la mineralización del nitrógeno. Agronomía Costarricense. 14 (1): 121-134.
- Visvesvara, G. S., Moura, H., Schuster, F. L. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 50: 1-26.
- Zúñiga, I. R. y Lozano, J. C. 2011. *Balamuthia mandrillaris*: una ameba de vida libre altamente letal. Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría. 24 (96): 134-135.

ANEXO

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

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

Mezclar en seco todos los ingredientes, agregar 500 ml de agua destilada y disolver, completar el volumen de 1000 ml y hervir hasta que se disuelva el agar completamente. Esterilizar a 121°C durante 20 minutos. Se vierten aproximadamente 20 ml en cajas Petri. Cuando el agar se ha solidificado se vierten 5 gotas de una suspensión concentrada de bacteria *E. aerogenes* inactivada por calor a 68°C durante 60 minutos, distribuyendo la suspensión de bacteria sobre la superficie del agar. Las cajas se guardan en el refrigerador hasta su uso.

2) Medio Ringer

NaCl -----	6 g
KCl -----	0.075 g
CaCl ₂ -----	0.1 g
NaHCO ₃ -----	0.1 g
Agua destilada -----	1000 ml
pH -----	7.74

Mezclar todos los ingredientes y envasar 2.7 ml del medio en tubos con tapón de rosca. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos, se deja enfriar y se agrega *Enterobacter aerogenes* inactivada. Se guardan en el refrigerador hasta su uso.

3) Medio Bactocasitona (BC)

Bactocasitona -----	20 g
Agua destilada -----	1000 ml

Mezclar los ingredientes. Se envasa 2.7 ml del medio en tubos con tapón de rosca y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos, se deja enfriar y se guardan en el refrigerador hasta que vayan a ser utilizados.

Cuando se utilice el medio, los tubos se sacan del refrigerador y se ponen a temperatura ambiente, y se les agrega 0.3 ml de suero de bovino con antibiótico.

4) Medio PBSGM (Chang modificado)

Peptona 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

Mezclar en seco todos los ingredientes y se disuelven en agua destilada. Se envasan 2.7 ml del medio en tubos con tapón de rosca y se esterilizan a 121°C por 15 minutos. Se guardan en el refrigerador hasta que vayan a ser utilizados.

Cuando se utilice el medio, los tubos se sacan del refrigerador, se ponen a temperatura ambiente y se les agrega 0.3 ml de suero de bovino con antibiótico.