



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Laboratorio de Microbiología Ambiental CyMA

**“Gimnamoebas aisladas de cuerpos de agua de la zona
Sur de la Cuenca de México”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

DANIELA FALCÓN NAVARRETE

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA BONILLA LEMUS

Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2018





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.

Agradecimientos

Quiero agradecer inmensamente a Dios por dejarme terminar esta etapa maravillosa en mi vida., por darme la fuerza para poder continuar hasta el final.

A mis padres, gracias por darme la vida, gracias por apoyarme en esta aventura, que si bien no ha sido fácil, pero ha sido la mejor para mí, y simplemente ahora estamos aquí, concluyendo de la mejor forma posible este camino. Gracias por su apoyo y su amor incondicional. Mamichí gracias por estar siempre conmigo y apoyarme en todo, porque sin duda alguna eres la mejor. Por enseñarme a tener fe, esperanza, amor, no tengo más palabras para expresarte todo el amor que siento por tí.

De igual forma les doy las gracias a mis dos hermanas porque siempre estuvieron apoyándome, dándome consejos y porque no hasta regañándome. Porque de cierta forma ustedes fueron mi inspiración para poder concluir mi carrera, porque fueron mi ejemplo de que sí se puede.

A tí abue Martha porque siempre nos alentaste a estudiar, por tu fe y tu amor por nosotras, porque hasta el final creíste en mí...por enseñarme también tu fe, y aunque no estás aquí, esto sin duda también va para tí..

Gracias al destino, a la vida, a Dios porque de casualidad llegué al Laboratorio CyMA, porque la conocí Dra Patricia en realidad preguntando por otra profesora, jamás lo olvidaré, y sin duda alguna dicen que existen casualidades bonitas, y esta lo fue, gracias por todo su apoyo, sus consejos, por la asesoría, por transmitirme el amor a estas amibas....Gracias por todo lo que recibí durante estos años. Y por creer en mí.

En general a todo el proyecto CyMA los llevo en mi corazón. Mi querida Chío (Biol. Rocío Ibarra) que te digo, gracias por los consejos, por enseñarme muchas cosas en el laboratorio, por las pláticas y sin duda alguna por tu amistad.

Gracias a todos los buenos amigos que hice en mi estancia en el laboratorio, Mary, Diego (gracias por tu ayuda), Gaby, Sony, Berna, Javi, Juan Pablo...

Don Luis aunque nos abandonó también le quiero agradecer por que aprendí mucho de usted, por la guía, por sus consejos, por todo el apoyo que me brindo.

Mtra Elí gracias de igual forma por las pláticas, por su apoyo, y sus consejos, gracias por las sugerencias brindadas a mi trabajo para hacerlo de la mejor forma posible.

Profesor Ricardo Ortiz por su apoyo en las pruebas de patogenicidad

En general al resto de mis revisores por todas las sugerencias y consejos brindados. Dra Rosario Sánchez, Dr Alfonso Lugo por guiarme en las pruebas estadísticas, Mtra Esperanza Robles por sus sugerencias en los parámetros fisicoquímicos.

Y por ultimo y no menos importante a ustedes... mis amigos, porque no hubiese sido lo mismo mi estancia en la FES sin ustedes., gracias por las risas, las prácticas de campo, los trabajos, las desveladas, por las pláticas, por su apoyo... porque desde primer semestre y hasta el final conocí a excelentes personas ...por cruzarse o cruzarme en su camino gracias... Juliet, Elvita, Belenchis, Dany, Luis, Hugo, Dianita, Eivons, Liz, Tench, Sunny, Marianita, Raque, Perle, Florance, Ulises, Edson, Ale, Miguel..... ¡ Gracias !

Y entonces ahora sí ya por último a mi amada FES... por todo lo que me brindo, y por mi estancia tan linda que pase ahí...

“Nuestra Ciencia confrontada con la realidad, es primitiva e infanti. Y

sin embargo, es lo más valioso que tenemos” ...Albert Einstein

CONTENIDO

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCIÓN.....	2
III.	GENERALIDADES.....	4
IV.	ANTECEDENTES.....	10
V.	JUSTIFICACIÓN.....	12
VI.	OBJETIVOS.....	13
VII.	ÁREA DE ESTUDIO.....	14
VIII.	METODOLOGÍA.....	17
IX.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
X.	CONCLUSIONES.....	46
XI.	LITERATURA CITADA.....	47

ANEXO

I. RESUMEN

Las Gimnamoebas se han aislado del suelo, agua, e inclusive en aire ya que lo utilizan para su dispersión. Viven en el ambiente, donde se alimentan de bacterias y materia orgánica y algunas de ellas también pueden causar enfermedades en el hombre, así como en animales, por lo que se les ha llamado amibas anfizoicas. En los diversos cuerpos de agua desempeñan un papel muy importante en el mantenimiento de flujo de energía, así como el reciclado de los nutrientes. El objetivo de este trabajo fue conocer la presencia y distribución de las Gimnamoebas en 22 sitios en la zona sur de la Cuenca de México. El trabajo se dividió en dos fases; en la fase de campo, se realizaron muestreos puntuales en 22 sitios, y se midió: pH, temperatura, conductividad y oxígeno disuelto. En la fase de laboratorio se procesaron las muestras, las cuales fueron inoculadas en medios específicos. Se identificó a las Gimnamoebas mediante criterios morfológicos con claves taxonómicas.

Se identificaron 25 especies pertenecientes a 14 géneros de Gimnamoebas. La mayor riqueza específica se encontró en el sitio "Confluencia Eslava-Magdalena" con 11 especies. Las especies más frecuentes fueron *Rosculus ithacus* en 17 de los 22 sitios estudiados (77 %), *Vannella platypodia* en 15 de los 22 (68 %) y *Vexillifera bacillipedes* en 9 de 22 (41%).

Con baja frecuencia se aislaron 7 cepas de los géneros reportados como potencialmente patógenos, *Naegleria* y *Acanthamoeba*, pero ninguno resultó patógeno y cuya identificación a nivel de género se confirmó mediante la técnica de PCR.

En relación con los parámetros fisicoquímicos, a excepción de un valor bajo de conductividad, el resto se encontraron dentro de los límites descritos como adecuados para el desarrollo de las Gimnamoebas. La temperatura del agua en promedio es baja por lo que muy probablemente sea esa una de las razones por las que las especies patógenas no se desarrollan en esos cuerpos de agua.

II. INTRODUCCIÓN

El agua es uno de los recursos fundamentales para la vida en el planeta. Los seres humanos dependen de su disponibilidad no solo para el uso doméstico, sino también para el funcionamiento y la continuidad de las actividades agrícolas e industriales, salud, y mantenimiento de los ecosistemas (Informe de la Situación del Medio Ambiente en México, 2012).

En México, los ríos y arroyos que se ubican en las aguas superficiales, constituyen una red hidrográfica de 633 mil kilómetros de longitud. Por los cauces de los 50 ríos principales fluye el 87% del escurrimiento superficial de la República y sus cuencas cubren el 65% de la superficie territorial continental del país (SNIA, 2012).

En las últimas décadas, el agua de los cuerpos superficiales se ha ido contaminando cada vez más, debido a las descargas sin tratamiento previo de aguas municipales e industriales, residuales domésticas; así como por los arrastres que provienen de las zonas que practican actividades agrícolas y pecuarias. Sin duda alguna el problema empeora ya que se requiere dotar del servicio de agua de buena calidad a una población cada vez más numerosa. El problema de la contaminación agrava la posibilidad de utilizar este recurso ya que no tiene una calidad adecuada para ser utilizada (Informe de la Situación del Medio Ambiente en México, 2012).

El agua de ríos, lagos, estanques, manantiales y arroyos es más propensa a ser contaminada por los diversos factores ya mencionados, todo esto puede causar graves daños en la salud de los usuarios, ya que estos cuerpos de agua pueden tener niveles inseguros de microorganismos infecciosos y, por lo tanto, la ingestión y el contacto con la misma puede causar enfermedades (Barrantes *et al.*, 2011).

Dentro de los microorganismos que pueden causar alguna infección se encuentran las Gimnamoebas patógenas. Son un grupo de protozoos, los cuales

pueden ser parásitos o de vida libre. Si bien se ha investigado que solamente algunas especies pertenecientes a cuatro géneros que pueden ocasionar daño a los seres humanos, así como a otros animales, causándoles la muerte o lesiones graves cerebrales, piel y ojo, también se sabe que juegan un papel importante en el mantenimiento del flujo de energía y el reciclado de los nutrientes en los ecosistemas acuáticos y terrestres (Suárez *et al.*, 2002).

III. Generalidades

Gimnamoebas ó Amibas de vida libre (AVL)

Las Gimnamoebas o amibas desnudas carecen de una estructura rígida externa, también conocidas como Amibas de vida libre son protozoos eucariontes unicelulares, presentan citoplasma, núcleo y diversos organelos. El citoplasma se divide en una masa central granular denominada endoplasma y una externa más clara llamada ectoplasma. Pero los elementos más reconocibles en la amiba son su núcleo y vacuolas (Page, 1988).

Como carecen de pared celular, las formas tróficas de las amibas pueden tomar diversas formas ya sea alargada o piriforme, entre otras. Gracias a esa característica el citoplasma puede extenderse, formando así prolongaciones conocidas como pseudópodos, con ellos las amibas pueden desplazarse u obtener alimento.

El tamaño de las amibas puede variar, pero su naturaleza unicelular limita la talla que llegan a alcanzar. En su fase trófica tienen tamaños de 6 a 120 μm y en su fase quística de 6 a 20 μm , aproximadamente. Hay algunas especies más grandes, por ejemplo, los géneros *Amoeba* y *Mayorella* tienden a tener especies con trofozoítos por arriba de los 100 μm (Page, 1988).

También se han observado algunas variaciones en la talla de una misma especie entre aquellas amibas que se encuentran en un cultivo por algún tiempo con respecto a las que se encuentran en su ambiente natural, por lo que se piensa que la presencia de alimento, y ciertas condiciones ambientales, favorecen un aumento en la talla (Page, 1974).

Importancia Ecológica

Las Gimnamoebas son protozoos cosmopolitas que habitan ambientes húmedos como el suelo y agua, inclusive en el aire, ya que lo utilizan como medio de dispersión. En el agua desempeñan un papel importante en el mantenimiento del flujo de energía y el reciclado de los nutrimentos. Su eficiencia en el uso de los recursos los convierte en un enlace fundamental entre los organismos desintegradores y aquellos que pertenecen a niveles tróficos superiores (Fenchel, 1987; Bonilla *et al.*, 2004).

También han sido reconocidas como las principales controladoras del crecimiento poblacional bacteriano, es así como se les considera como uno de los principales grupos de depredadores microbianos, siendo depredadores de hongos, como ya se mencionó de bacterias e inclusive de otros protozoos, y microalgas por ello la importancia del mantenimiento del flujo de energía (Herrera, 2001). En el agua las Gimnamoebas se encuentran en mayor proporción en la microcapa superficial, debido a la abundancia de nutrimentos y se encuentra en menor proporción en el sedimento (Fenchel, 1987). Suelen ser muy abundantes en las películas biológicas que se forman sobre sustratos como rocas, hojas, plantas, etc

Como ya se describió las Gimnamoebas habitan ambientes húmedos como el suelo, por ende, juegan un papel dentro del ciclo de los nutrientes, ya que estimulan el incremento en la tasa de transformación bacteriana del fósforo y del nitrógeno a formas aprovechables para las plantas, lo que produce una mayor producción de biomasa autotrófica (Fenchel, 1987; Tyndall *et al.*, 1989).

Importancia Médica

El estudio de las Gimnamoebas ha demostrado que incluye un pequeño grupo de importancia médica. Existen algunas especies de cuatro géneros asociados a enfermedades en humanos, los cuales son: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Sappinia* (Lares y Lares., 2009; Visvesvara *et al.*, 2007). Estos organismos son capaces de provocar infecciones en el sistema nervioso central

(SNC) como la meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP) causada sólo por *Naegleria fowleri*, encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) que pueden ocasionar la muerte en períodos mayores, provocada por especies del género *Acanthamoeba*, además de ocasionar infecciones severas en otros órganos como son pulmón, piel, ojos y oídos. Estas infecciones se han ido incrementando significativamente en los últimos 20 años (Visvesvara *et al.*, 2007). Las especies de *Balamuthia mandrillaris* y *Sappinia pedata* ocasionan encefalitis amibiana (Bonilla *et al.*, 2004; Martínez y Visvesvara, 1997). La mayoría de las infecciones por especies de *Acanthamoeba*, se han registrado en pacientes inmunosuprimidos (Martínez y Visvesvara, 1997).

Además de su potencial patógeno en humanos, las Gimnamoebas son capaces de parasitar a especies de animales y de tener asociaciones endosimbióticas con bacterias y virus patógenos para el humano (John, 1993; Greub y Raoult, 2004).

Una de las características de las Gimnamoebas patógenas es que pueden soportar altas temperaturas, son termofílicas por lo que con frecuencia se pueden aislar de aguas termales, así como aguas contaminadas térmicamente (Martínez y Visvesvara, 1997; Bonilla *et al.*, 2004).

Ciclo de Vida

El ciclo de vida de las Gimnamoebas comprende dos estadios de viabilidad biológica una fase activa llamada trofozoíto que se alimenta y se reproduce y una fase inactiva de resistencia llamada quiste, la cual es una forma de sobrevivencia en condiciones adversas. De los géneros potencialmente patógenos solo *Naegleria* presenta el estadio ameboflagelar que le sirve para desplazarse mejor a micro ambientes más favorables (Suárez, 2004). Existen Gimnamoebas en las que solo se ha descrito la forma trófica, por ejemplo; *Vannella platypodia*, *Gutullinopsis vulgaris*, *Vexillifera bacillipedes* entre otras (Page, 1988).

Por la importancia médica que tienen algunas especies de Gimnamoebas se describe su morfología a continuación.

Naegleria fowleri

Naegleria fowleri tiene trofozoítos de forma alargada los cuales miden entre 15 y 25 μm , con citoplasma abundante, vacuolado o granular, un núcleo central redondo, nucléolo esférico prominente. Estos trofozoítos son termofílicos y pueden desarrollarse y multiplicarse por división binaria a temperaturas arriba de 30°C e incluso hasta 40 y 45°C en el medio ambiente y en cultivos de laboratorio. La locomoción de esta amiba se debe a pseudópodos redondeados llamados lobópodos. La forma flagelada que se observa en el medio ambiente o medios acuosos en el laboratorio es de forma de pera, es biflagelado y mide 12 a 18 μm . Este estadio es reversible a la fase de trofozoíto. Los quistes son esféricos miden de 8 a 15 μm de diámetro poseen una doble pared con uno o dos poros (Oddó, 2006; Page, 1988).

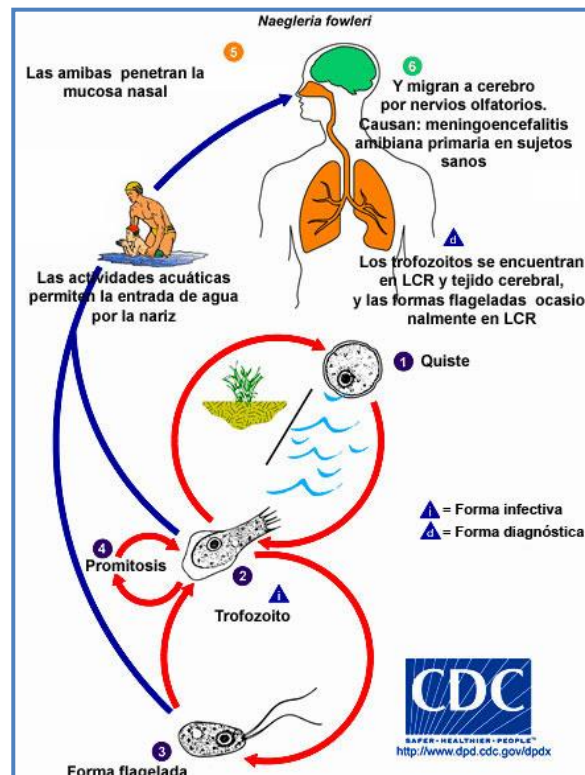


Fig. 1 Ciclo de vida de *Naegleria fowleri*

***Acanthamoeba* spp.**

Presenta forma de trofozoíto y forma de quiste. Los trofozoítos de las diferentes especies de *Acanthamoeba* son irregulares y presentan múltiples proyecciones pseudopodiales retráctiles, filamentosas o espinosas llamadas acantópodos. Los trofozoítos varían de tamaño de acuerdo a las diferentes especies de este género, con promedios de 20 a 40 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.

Los quistes tienen una doble pared, miden de 6 a 30 μm de diámetro, aunque generalmente son de 15 a 25 μm . Entre sus componentes se encuentra la celulosa. La pared externa (ectoquiste) es ondulada y la pared interna (endoquiste) puede ser estrellada, poligonal, esférica u oval. El núcleo es evidente como una débil estructura refráctil, con un aún más refráctil cariosoma redondeado (Oddó, 2006; Martínez y Visvesvara, 1997).

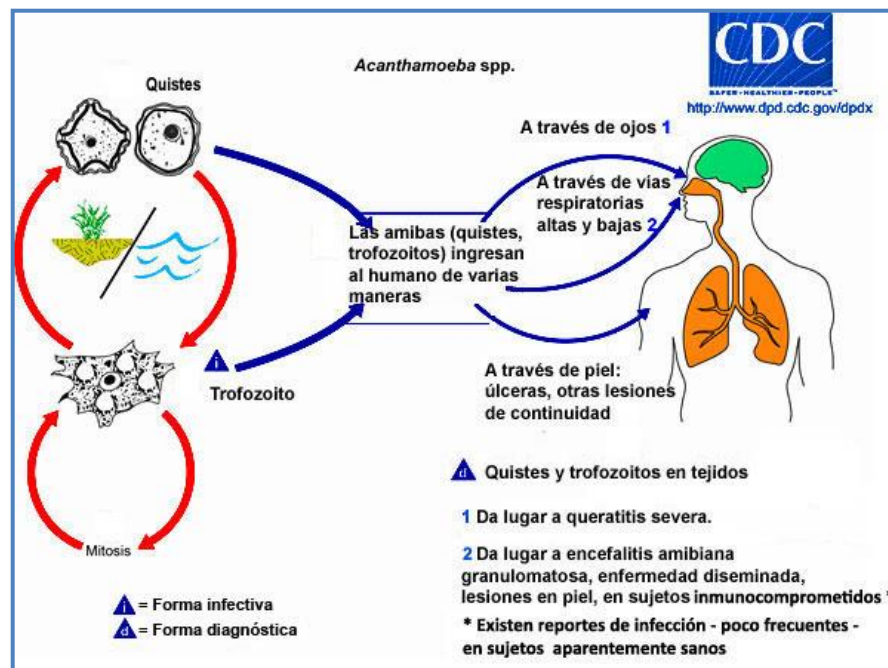


Fig. 2 Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp.

Balamuthia mandrillaris

Balamuthia mandrillaris es muy semejante a *Acanthamoeba* spp. Los trofozoítos miden 12 a 60 μm , con retículo endoplasmático acintado, y se desplazan lentamente mediante amplias proyecciones aplanadas, llamadas lamelipodos tienen forma irregular, algunas veces presentan la forma limax, o forma de araña con numerosos pseudópodos, tiene un núcleo vesicular. El quiste mide entre 13 a 30 μm y tienen una triple pared, carece de poros (Oddó, 2006; Bonilla *et al.*, 2004).

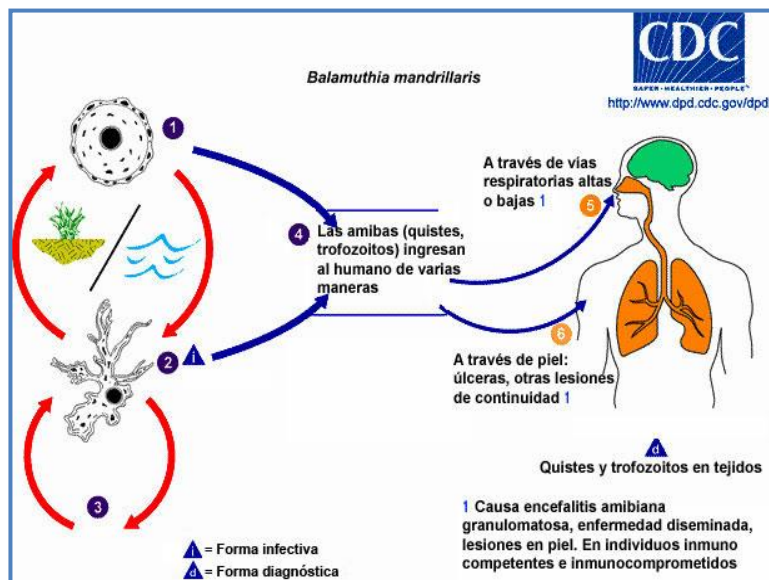


Fig. 3 Ciclo de Vida de *Balamuthia mandrillaris*

➤ ***Sappinia pedata***

Sappinia pedata al igual que las dos anteriores presenta trofozoito y quiste, los trofozoítos miden entre 45 a 85 μm , sus pseudópodos son indistintos y se observa una película que se ondula cuando la amiba se mueve, tiene dos núcleos muy juntos uno del otro, los quistes miden de 13 a 37 μm (Oddó, 2006).

IV. ANTECEDENTES

- © Campos (2007), realizó una investigación en dos manantiales del acuífero del Valle de Cuernavaca, Morelos, los géneros de Gimnamoebas que reportó como más frecuentes fueron: *Hartmannella*, *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Rosculus*, *Dactylamoeba*, *Platyamoeba* y *Filamoeba*, concluyendo que las aguas de esos manantiales no representaban peligro tanto para uso recreativo, como en el consumo de los usuarios.
- © Bonilla *et al.* (2009), en un estudio de Gimnamoebas en ríos de alta montaña de la Cuenca Valle de Bravo-Amanalco, reportaron que los géneros más frecuentes fueron *Vahlkampfia*, *Platyamoeba*, *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Vannella*. La prueba de patogenicidad de los aislamientos de *Naegleria* y *Acanthamoeba* fue negativa.
- © Lares y Lares (2009), identificaron Gimnamoebas en aguas superficiales del Valle del Mayo, Sonora, aislaron 91 cepas, identificando 5 aislamientos sospechosos para *Naegleria fowleri*, realizando las pruebas moleculares se concluyó que no correspondían a dicha especie. Por último, los géneros que predominaron fueron *Hartmannella*, seguido de *Naegleria*.
- © Ortiz *et al.* (2009) realizaron un estudio en diferentes cuerpos de agua naturales como manantiales, cascadas, lagunas naturales y piscinas alimentadas con aguas termales en la Huasteca Potosina, México. Identificaron 39 aislamientos de amibas del género *Acanthamoeba*, algunos fueron patógenos en animales de laboratorio.

- ④ Bonilla *et al.* (2014) realizaron un estudio sobre la presencia y distribución de las Gimnamoebas y su relación con algunos parámetros físicos y químicos en algunos los ríos de la Cuenca de México, identificaron 120 AVL, pertenecientes a 18 géneros, los más frecuentes fueron *Vannella*, *Rosculus* y *Acanthamoeba*. Tres aislamientos de *Acanthamoeba* mostraron baja virulencia.

- ④ Uribe (2014) en un estudio en 6 ríos afluentes a la Subcuenca de Valle de Bravo en el Estado de México, identificó 28 especies pertenecientes a 15 géneros, los géneros con mayor frecuencia fueron *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia* y *Platyamoeba*. Únicamente uno de los aislamientos del género de *Acanthamoeba* resultó con baja virulencia.

- ④ Andrade (2014) aisló un total de 38 cepas de Gimnamoebas en 10 ríos de la Cuenca de México, de las cuales identificó 12 especies pertenecientes a 11 géneros, resultando *Rosculus ithacus* y *Vannella platypodia* las especies más frecuentes. Identificó 2 especies pertenecientes al género de *Acanthamoeba* reportadas potencialmente patógenas, *A. triangularis* y *A. polyphaga*, a su vez identificó una especie del género de *Naegleria*, la cual no fue patógena.

- ④ Suarez *et al.* (2002) realizaron un estudio en diversas fuentes de agua, en la Ciudad de Ica, al sur de Lima, Perú, examinaron 31 muestras de 7 fuentes de aguas naturales y 25 artificiales. De las 31 muestras, en 11 se encontraron amibas del género *Acanthamoeba*, 6 fueron aisladas de fuentes naturales y 5 de fuentes artificiales. Concluyeron así que el género *Acanthamoeba* fue el más frecuente en fuentes naturales en la Ciudad de Ica.

V. JUSTIFICACIÓN

La cuenca de México es una región que presenta vastos recursos hídricos y son escasos los trabajos relacionados con ríos, manantiales, presas u otro cuerpo de agua y las comunidades que los constituyen, por lo general los ríos circulan varios kilómetros antes de mezclarse con aguas negras que se originan de las actividades agropecuarias, turísticas y domésticas. De manera particular, fue necesario conocer la presencia y distribución de las Gimnamoebas en esos cuerpos de agua, ya que forman parte de la estructura y funcionamiento de los ecosistemas acuáticos asociados a las aguas superficiales. A su vez existen especies patógenas que pueden llegar a causar enfermedades graves al hombre y animales e incluso la muerte. Por lo que este estudio contribuirá al conocimiento de la diversidad de Gimnamoebas presentes en cuerpos de agua naturales de la Cuenca de México.

VI. OBJETIVOS

Objetivo General

- ☉ Conocer la presencia y distribución de las Gimnamoebas en 22 sitios en la zona sur de la Cuenca de México.

Objetivos Particulares

- ☉ Identificar morfológicamente a las Gimnamoebas de los cuerpos de agua de la Cuenca de México
- ☉ Confirmar el diagnóstico morfológico de las amibas de los géneros potencialmente patógenos (*Acanthamoeba* y *Naegleria*), mediante el uso de biología molecular (PCR) a nivel de género.
- ☉ Realizar la prueba de patogenicidad a los aislamientos que correspondan morfológicamente a *Acanthamoeba* y *Naegleria*.
- ☉ Determinar *in situ* los parámetros físicos y químicos: pH, Oxígeno disuelto, temperatura y conductividad.
- ☉ Determinar si estadísticamente existe alguna relación entre las Gimnamoebas y los parámetros físicos y químicos medidos.

VII. ÁREA DE ESTUDIO

La cuenca de México es una cuenca endorreica ubicada entre los 19° 20'' LN y 98° 100'' LW, rodeada de grandes montañas o volcanes de la Franja Volcánica Transmexicana, entre los que se encuentran el Popocatepetl, Iztaccíhuatl, Ajusco y de una cadena de Sierras de las cuales descienden 45 ríos aún existentes (Ferrusquía-Villafranca 1993; Legorreta, 2009). Esta Cuenca abarca territorios del estado de México (50%), Hidalgo (26.5%), Distrito Federal (13.8%), Tlaxcala (8.7%) y Puebla (1%). En el presente estudio se seleccionaron 22 ríos los cuales se localizan en diferentes Delegaciones y algunos municipios del Estado de México (Tabla 1, Fig. 4).

Desde el punto de vista biogeográfico, los ríos de la cuenca están catalogados como ríos tropicales de alta montaña (altitud mayor a 2,200 m), en donde la precipitación pluvial y la variación de temperatura a lo largo del año generan una comunidad biológica con mayor afinidad a regiones templadas o boreales (Bojorge *et al.*, 2010).

Clima

La región presenta un clima templado subhúmedo con valores promedio de temperatura entre 12 a 18 °C. En la parte norte y central existen climas semisecos esto es, clima templado semiárido con régimen pluvial máximo en verano. Las precipitaciones se presentan por lo regular de junio a octubre (Legorreta, 2009)

Vegetación y Geología

En las zonas más elevadas de la cuenca presenta una vegetación de bosque de *Abies* y bosque de *Pinus*.

Una de las principales características de esta cuenca es una pendiente menor a 15% de la superficie total, esto resulta favorable para el uso de suelo urbano (asentamientos humanos) así como actividades agrícolas de temporal.

La ubicación privilegiada de la cuenca y sus abundantes recursos hídricos la hicieron propicia para una gran concentración de población, no sólo en las orillas del área lacustre, sino en las montañas que la circundan (Legorreta, 2009).

Tabla 1. Sitios de muestreo estudiados.

Muestreo	Fecha	Sitio y ubicación
1	marzo, 2014	Monte Alegre 1 (Tlalpan, Ciudad de México) Monte Alegre 2 (Tlalpan, Ciudad de México)
2	junio, 2014	Nacimiento Presa Iturbide (Cuautitlán, Edo. de México) Manantial Las Palomas (Cuautitlán, Edo. de México) Río Organillos (Cuautitlán, Edo. de México) Río Xopachi (Isidro Fabela y Jilotzingo, Edo. de México) Manantial San Pedro (Cuautitlán, Edo. de México)
3	octubre, 2014	Confluencia Eslava-Magdalena (Magdalena Contreras, Ciudad de México) Río Magdalena-Santa Teresa (Magdalena Contreras, Ciudad de México)
4	enero, 2015	Truchero Valle Monjas (Cuajimalpa, Edo. De México) Valle de Monjas (Cuajimalpa, Edo. De México)
5	mayo, 2015	Cosamala (Tlalmanalco, Edo. de México) La Castañeda bajo (Amecameca, Edo. de México) Estación UAM (Tlalmanalco, Edo. de México) Confluencia Compañía-San Rafael (Tlalmanalco, Edo. de México) Canal San Rafael (Tlalmanalco, Edo. de México) La Castañeda IV Alto San Rafael (Amecameca, Edo. de México)
6	septiembre, 2015	Presa Iturbide Cortina (Cuautitlán, Edo. de México) Nacimiento Presa Iturbide II (Cuautitlán, Edo. de México) San Luis Ayucán (Jilotzingo, Edo. de México) Transfiguración (Cuautitlán, Edo. De México) Cortina Presa Capoxi (Cuautitlán, Edo. de México)

Temporada lluvias Temporada secas

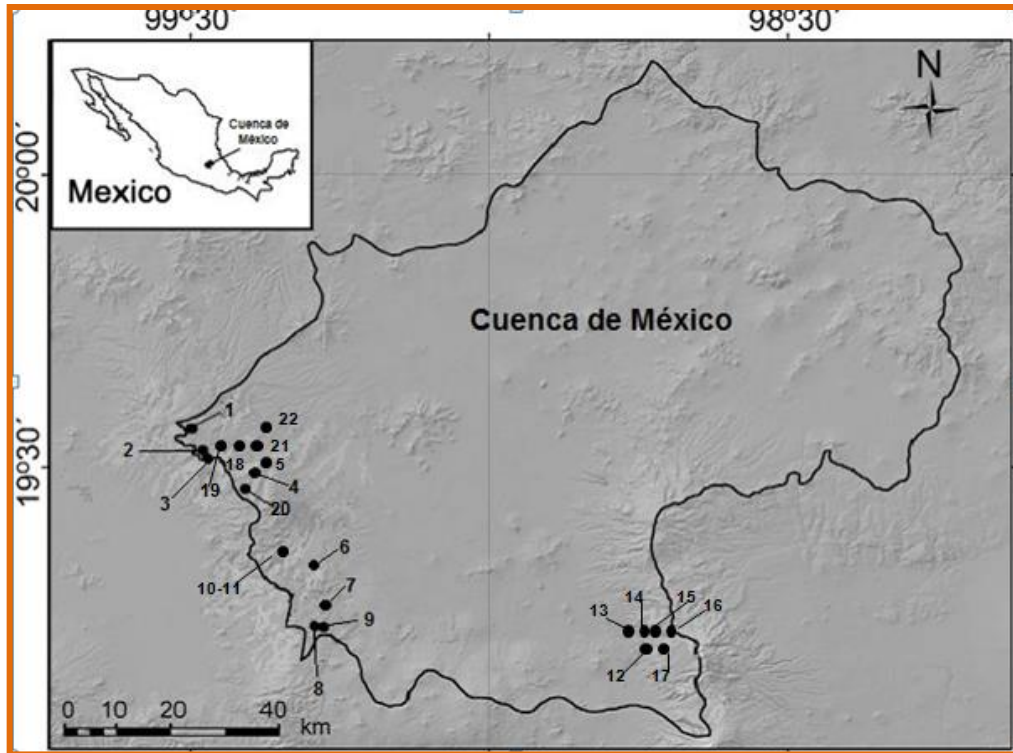


Fig. 4 Ubicación geográfica de los sitios de muestreo en la Cuenca de México (Modificada de Rodríguez, 2014 y Bonilla *et al.*, 2014).

1. Manantial las Palomas 2. Nacimiento Presa Iturbide 3. Río Organillos 4. Río Xopachi 5. Manantial San Pedro 6. Río Magdalena-Santa Teresa 7. Confluencia Eslava-Magdalena 8. Río Monte Alegre 9. Río Monte Alegre 2 10. Truchero Valle Monjas 11. Valle de Monjas 12. La Castañeda bajo 13. Estación UAM 14. Confluencia Compañía-San Rafael 15. Cosamala 16. Canal San Rafael 17. La Castañeda IV Alto San Rafael 18. Presa Iturbide Cortina. 19. Nacimiento Presa Iturbide II 20. San Luis Ayucán 21. Transfiguración 22. Cortina Presa Capoxi.

VIII. METODOLOGÍA

📍 Trabajo de Campo

Se realizaron 22 muestreos puntuales en 22 diferentes sitios de la Cuenca de México (Fig. 4, Tabla 1). Se tomaron muestras de 500 ml en bolsas estériles. Se registraron *in situ* los parámetros físicos y químicos: pH, conductividad y temperatura con un potenciómetro marca Conductronic PC18; oxígeno disuelto con un Oxímetro YSI-85.

Las muestras se transportaron al laboratorio a temperatura ambiente para su posterior procesamiento.

📍 Trabajo de Laboratorio

1. Aislamiento y Cultivo monoaxénico

Cada muestra se homogenizó y se tomó una alícuota de 50 ml por duplicado, se centrifugaron a 3500 rpm durante 20 min, posteriormente el sobrenadante se desechó y el sedimento se inoculó en cajas Petri por duplicado las cuales previamente estaban preparadas con agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes* (NNE), cada duplicado se incubó a 25°C y 37°C. Después de 24 hrs las cajas Petri se revisaron en un microscopio invertido para observar el crecimiento amibiano, todo esto de acuerdo con Rivera *et al.*, (1987).

Las amibas pertenecientes a los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria* se separaron en medio de cultivo NNE nuevo, con el objetivo de obtener cultivos axénicos de ambos géneros.

2. Obtención de cultivos axénicos

Una vez que se obtuvieron cultivos de *Acanthamoeba* y *Naegleria*, libres de otros microorganismos, se seleccionó un área del medio NNE con abundantes trofozoítos o quistes, para colocarlos en los medios axénicos, Chang y Ringer (Anexo).

3. Identificación morfológica

Las Gimnamoebas se identificaron con ayuda de las claves de Page (1988) y Pussard y Pons (1977), con base en las características del trofozoíto y quistes, los cuales se midieron (largo x ancho). Para realizar la identificación se realizaron preparaciones *in vivo* en portaobjetos y se observaron con microscopía de contraste de fases con un microscopio óptico K7 de Zeiss a 40X.

4. Identificación molecular

Esta técnica es una herramienta muy útil, rápida y precisa, siempre y cuando previamente se haya descrito la secuencia específica del organismo a determinar. En el caso de las Gimnamoebas, se ha utilizado principalmente para identificar amibas patógenas de muestras clínicas y muy pocos trabajos se han enfocado a muestras ambientales.

Para realizar esta prueba, fueron cultivados en medio axénico los trofozoítos de ambos géneros.

➤ Reacción de la Cadena de la Polimerasa

Una vez que se obtuvo el crecimiento óptimo de los trofozoítos se cosecharon y posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm por 15 min, obteniendo una pastilla la cual fue usada para realizar la extracción del ARN mediante la técnica de PCR (ZYMO RESEARCH, Quick-g DNA™ MicroPrep)

Una vez preparados los tubos con el mix (Tabla 2) para PCR del género de *Acanthamoeba* se colocaron en un termociclador (Quanta Biotech S-24) y se corrió el programa con las siguientes condiciones a 30 ciclos (Tabla 3).

Se utilizó el primer JDP1-Forward, con secuencia (5'-GGCCCAGATCGTTACCGTGAA-3') y JDP2-Reward (5'-TCTACAAGCTGCTAGGGAGTCA-3'), los cuales amplifican una región de ADN ribosomal del género *Acanthamoeba* (Shroeder *et al.*, 2001). Posteriormente se hizo el corrimiento electroforético de los productos de PCR en un gel de agarosa al 0.8%. Para cargar las muestras en el gel, se mezclaron 1µl de tinte de carga y 4 µl de producto de la PCR. El gel se corrió con buffer TBE al 0.5% con 80V por 30min. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa, los cuales fueron teñidos con Bromuro de etidio donde se observaron los amplicones correspondientes al gen específico para género, el producto final es de 480 pares de bases aproximadamente (Shroeder *et al.*, 2001).

Tabla 2. Preparación de Mix para PCR *Acanthamoeba*

Componentes	Volumen
2x Reaction Mix	40µl
JDP1-Fw	2.0µl
JDP2-Rw	2.0µl
ADN	1.25µl
Agua inyectable	31.0µl

Tabla 3. Condiciones para el corrimiento de la PCR del género *Acanthamoeba*

Inicio/ Fin	Proceso	Temperatura	Tiempo
	Alineamiento	45°	3 min
	Alineamiento	95°	30 seg
Comienza el ciclo	Desnaturalización	95°	30 seg
	Alineación	55°	30 seg
Fin del ciclo	Elongación	72°	45 seg
	Elongación final	72°	5 min
	Almacenamiento	10°	-

Para realizar el corrimiento de PCR del género *Naegleria* también se prepararon tubos con mix (Tabla 4) en este caso se utilizó el primer específico NAE, con secuencia de Nae Forward (5'-CAAACACCGTTATGACAGGGG-3'), Nae Reward (5'- CTGGTT TCCCTCACCT TACG -3') diseñado a partir de la unidad ribosomal 18(S), con esto se espera un producto final de 183 pb (Schild *et al.*, 2007). Una vez preparados los tubos con el mix se colocaron en un termociclador (Quanta Biotech S-24) y se corrió el programa con las siguientes condiciones a 50 ciclos (Tabla 5).

Una vez terminados los ciclos se realizó el corrimiento electroforético de los productos de PCR en un gel de agarosa al 3%. Para cargar las muestras en el gel, se mezclaron 1 µl de tinte de carga y 4 µl de producto de la PCR. El gel se corrió con buffer TAE con 80V por 30 min (ZYMO RESEARCH, Quick-g DNA™ MicroPrep).

Tabla 4. Preparación de Mix para PCR *Naegleria*

Componentes	Volumen
2x Reaction Mix	2.5µl
Nae-Fw	2.5µl
Nae-Rw	2.5µl
ADN	3.0µl
Agua inyectable	12.5µl

Tabla 5. Condiciones para el corrimiento de la PCR del género *Naegleria*

Inicio/ Fin	Proceso	Temperatura	Tiempo
	Alineamiento	50°	30 min
	Alineamiento	94°	2min
Comienza el ciclo	Desnaturalización	95°	15seg
	Alineación	56°	30seg
Fin del ciclo	Elongación	72°	45seg
	Elongación final	72°	5 min
	Almacenamiento	10°	-

5. Prueba de patogenicidad

Para esta prueba se utilizaron cultivos de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria* previamente axenizados. Las amibas se concentraron y centrifugaron a 3000 rpm por 10 min, ajustando a una cuenta de 3×10^5 (De Jonckheere, 1980). De este concentrado se inocularon 0.2 ml por vía instilación nasal (IN) a cinco ratones (cepa Balb/C). Los ratones que sobrevivieron los 30 días de observación, se sacrificaron y se les extrajo el cerebro, pulmones, hígado y riñones y se colocaron en medio NNE y se incubaron a 25°C y 37°C dependiendo a la temperatura a la cual hubiera crecido al inicio las amibas (Fig. 5) (Culbertson, 1959).



Fig.5 Prueba de Patogenicidad. 1. Grupo de machos cepa Balb/c. 2. Inoculación 3. Marcado de ratones 4-6. Extracción y colocación de cerebro, hígado, riñón, en medio NNE

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

📍 Presencia de Gimnamoebas en los ríos de la Cuenca de México.

En total se obtuvieron 87 aislamientos de Gimnamoebas, se identificaron 25 especies pertenecientes a 14 géneros (Tabla 6). En cuanto a los géneros potencialmente patógenos se obtuvieron 2 aislamientos del género *Acanthamoeba* en diferentes ríos y cinco de *Naegleria*.

Tabla 6. Riqueza de Gimnamoebas aisladas de los sitios de muestreo.

Sitios	Especies	Sitios	Especies
Monte Alegre 1	<i>Roculus ithacus</i>	Cosamala	<i>Vannella platypodia</i>
	<i>Vannella platypodia</i>	La Castañeda bajo	<i>Vexillifera bacillipedes</i>
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>		<i>Vannella platypodia</i>
Monte Alegre 2	<i>Rosculus ithacus</i>		<i>Rosculus ithacus</i>
Nacimiento Presa Iturbide	<i>Rosculus ithacus</i>	Estación UAM	<i>Thecamoeba similis</i>
	<i>Vannella platypodia</i>		<i>Naegleria sp *</i>
	<i>Amoeba proteus</i>	Confluencia Compañía – San Rafael	<i>Thecamoeba quadrilineata</i>
Manantial las Palomas	<i>Rosculus ithacus</i>		<i>Rosculus ithacus</i>
	<i>Mayorella cultura</i>		<i>Vannella platypodia</i>
	<i>Vexillifera bacillipedes</i>		<i>Guttulinopsis vulgaris</i>
	<i>Vannella platypodia</i>	Canal San Rafael	<i>Guttulinopsis vulgaris</i>
Organillos	<i>Rosculus ithacus</i>		<i>Vannella platypodia</i>
	<i>Mayorella cultura</i>		<i>Naegleria sp *</i>
	<i>Vannella platypodia</i>	La Castañeda IV Alto San Rafael	<i>Vannella platypodia</i>
Xopachi	<i>Sin presencia</i>		<i>Vexillifera bacillipedes</i>
Manantial San Pedro	<i>Rosculus ithacus</i>		<i>Rosculus ithacus</i>
Confluencia ríos Eslava- Magdalena	<i>Rosculus ithacus</i>		<i>Naegleria sp *</i>
	<i>Polychaos timidum</i>	Presa Iturbide Cortina	<i>Rosculus ithacus</i>

	<i>Vexillifera bacillipedes</i>		<i>Vannella platypodia</i>
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>		<i>Mayorella cultura</i>
	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	Nacimiento Presa Iturbide II	<i>Vannella simplex</i>
	<i>Saccamoeba limax</i>		<i>Platyamoeba placida</i>
	<i>Thecamoeba quadrilineata</i>		<i>Vexillifera bacillipedes</i>
	<i>Vannella lata</i>		<i>Rosculus ithacus</i>
	<i>Amoeba proteus</i>	San Luis Ayucán	<i>Saccamoeba limax</i>
	<i>Naegleria sp *</i>		<i>Vexillifera bacillipedes</i>
	<i>Vannella platypodia</i>		<i>Guttulinopsis vulgaris</i>
Magdalena- Santa Teresa	<i>Rosculus ithacus</i>		<i>Vermamoeba vermiformis</i>
	<i>Naegleria sp *</i>		<i>Valhkampfia ustiana</i>
	<i>Vannella platypodia</i>		<i>Mayorella cultura</i>
	<i>Saccamoeba stagnicola</i>		<i>Rosculus ithacus</i>
	<i>Saccamoeba limax</i>	Transfiguración	<i>Vannella platypodia</i>
	<i>Vexillifera bacillipedes</i>		<i>Vexillifera bacillipedes</i>
	<i>Valhkampfia enterica</i>		<i>Saccamoeba stagnicola</i>
Truchero Valle Monjas	<i>Saccamoeba limax</i>		<i>Guttulinopsis vulgaris</i>
	<i>Vexillifera bacillipedes</i>		<i>Mayorella cultura</i>
	<i>Rosculus ithacus</i>		<i>Rosculus ithacus</i>
	<i>Vannella cirrifera</i>		<i>Valhkampfia avara</i>
	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	Presas Cortina Capoxi	<i>Vannella platypodia</i>
	<i>Vannella platypodia</i>		<i>Valhkampfia avara</i>
Valle de Monjas (escuela)	<i>Amoeba diminutiva</i>		<i>Rosculus ithacus</i>
	<i>Mayorella penardi</i>		<i>Mayorella cultura</i>
	<i>Vannella platypodia</i>		<i>Saccamoeba limax</i>
	<i>Polychaos fasciculatum</i>		<i>Vermamoeba vermiformis</i>

*Por las características morfológicas probablemente *Naegleria* sp, pertenezca a la especie de *Naegleria gruberi*

➤ Frecuencia de las especies identificadas

Las especies más frecuentes fueron *Rosculus ithacus* la cual estuvo presente en 17 de los 22 sitios (77 %), seguida de *Vannella platypodia* con un registro en 15 sitios de muestreo (68 %) y *Vexillifera bacillipedes* se aisló en 9 (40 %) (Fig. 6). Las dos primeras especies fueron igualmente observadas como más frecuentes por Andrade (2014) y Bonilla *et al.*, (2014). A diferencia de lo encontrado por Bonilla *et al.*, (2014) donde *Acanthamoeba* fue la más abundante, siendo una de las *Gimnamoebas* más comunes en el ambiente (Page, 1988). También a menudo se asocia con agua contaminada y rica en bacterias (Bonilla *et al.*, 2009)

Page (1988) menciona que el ciclo de vida de *R. ithacus* incluye la formación de quistes y una fase fúngica, lo que explicaría su resistencia a condiciones adversas del ambiente lo cual explica su presencia frecuente, probablemente esto permite que esta especie se adapte con facilidad a diferentes condiciones de cuerpos de agua así como en ambientes terrestres, volviéndose una especie frecuente en distintos ambientes; también se ha descrito como un organismo consumidor de bacterias (Fig 7.24) (Bonilla y Ramírez, 1993).

La segunda especie más frecuente fue *V. platypodia*, (Fig 7.7-7.9) la cual se caracteriza por poseer únicamente la fase de trofozoíto, además de tener un prominente citoplasma que se extiende formando un abanico, a su vez la forma flotante (Fig 7.10-7.13) posiblemente le ayuda a mantenerse en la columna de agua, permitiendo una mayor movilidad (Bonilla *et al.*, 2014). También se ha asociado a alguna infección en humanos, como queratitis, aunque no se ha comprobado que causa una infección (Hoffmann *et al.*, 1998).

La tercera especie más frecuente fue *V. bacillipedes* se sabe que este género es muy frecuente en agua dulce (Page, 1969). Su morfología es muy similar a la del

género *Acanthamoeba*, pero sus filópodos son más prominentes, su tamaño es pequeño (8-24 μ m) (Fig 7.22-7.23.) En esta especie a semejanza de *V. platypodia* tampoco se ha descrito la formación de quistes (Page, 1988).

Mayorella cultura y *Saccamoeba limax*, (Fig 7.18) estuvieron presentes en 5 y 6 sitios respectivamente. *Mayorella* tiene un tamaño promedio de 20 a 30 μ m y de acuerdo con Page (1988), proliferan en agua dulce y marina. También es formadora de quistes, es por eso que se piensa que puede permanecer por más tiempo en el agua, suelo o inclusive aire. La forma flotante posee pseudópodos radiales, lo cual posiblemente favorece una mayor estabilidad a un sustrato. La mayoría de las especies de *Mayorella* tienen una cutícula visible al microscopio óptico lo que la diferencia de otro género muy similar que es *Dactylamoeba* (Page, 1988).

El género *Saccamoeba* (Fig 7.17-7.18) se distingue por tener cristales pequeños en el citoplasma, además cuentan con un uroide (velloso, arrugado o liso) que les ayuda a adherirse, así como para capturar alimento. Aunque no en todas las especies se puede observar, quizá, esto sea un factor que les ayuda a mantenerse en algún sustrato para permanecer más en el sitio, al igual que su quiste (Page, 1988).

Las especies restantes únicamente aparecieron de una a cuatro veces en algún cuerpo de agua. Aunque se hubiera esperado que las especies con quiste fueran más frecuentes, muy pocas fueron las que estuvieron en la mayoría de los sitios. En el caso de *Acanthamoeba* que es un género con un quiste muy resistente gracias a su doble capa y presencia de celulosa (Fig.7.1-7.3) (Lakhundi *et al.*, 2015), únicamente estuvo presente en dos sitios. *Acanthamoeba* se alimenta de microorganismos en biopelículas, por lo general en las superficies (Brown y Barker, 1999), incluso en la interfase aire-agua (Preston *et al.*, 2001). *Acanthamoeba* cuenta con proyecciones similares a dedos, llamados acantopodos, estas proyecciones les ayuda en el proceso de alimentación (Fig 7.1 7-3). Otra

característica que usan es la detección de presas por quimiotaxis, en su mayoría son bacterias (Upadhyay, 1968; Weekers *et al.*, 1993).

Por otro lado, también se ha demostrado que *Acanthamoeba* y *Naegleria* entre algunas otras AVL, participan como vectores de diferentes especies bacterianas. Por ejemplo, *Legionella pneumophila* es capaz de multiplicarse dentro de la célula amibiana, causar lisis y liberarse nuevamente en el ambiente. *V. cholerae* sobrevive dentro de los quistes de *Naegleria* y puede recuperarse después de que la amiba exquista. Es así como el quiste amibiano no solo ofrece a las bacterias un mecanismo de protección para evadir ambientes hostiles, sino también les provee un medio para transportarse y colonizar nuevos hábitats aprovechando los mecanismos de dispersión de las AVL (Bonilla *et al.*, 2004). A su vez han tomado mucha importancia médica debido a la asociación que se ha encontrado con las especies bacterianas.

Por otro lado, amibas del género *Vermamoeba* se han asociado a encefalitis humana y *Valhkampfia* a casos de queratitis amibiana en humanos, pero no se ha demostrado su papel como agente etiológico de las enfermedades (Brieland *et al.*, 1996; Ramírez *et al.*, 2009).

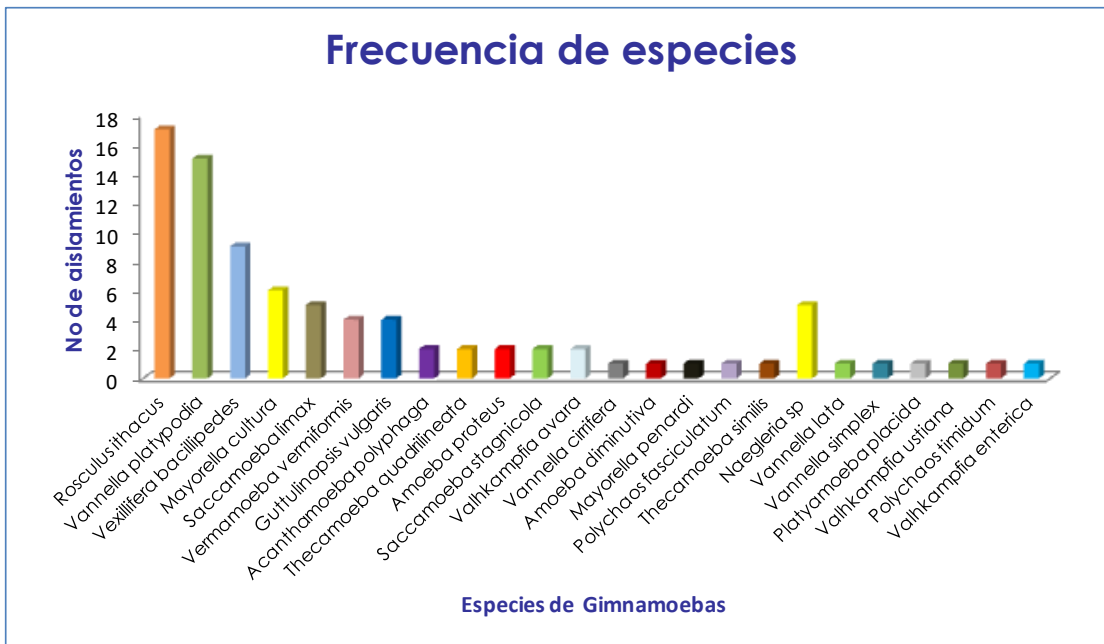


Fig. 6 Frecuencia de las especies identificadas de Gimnamoebas

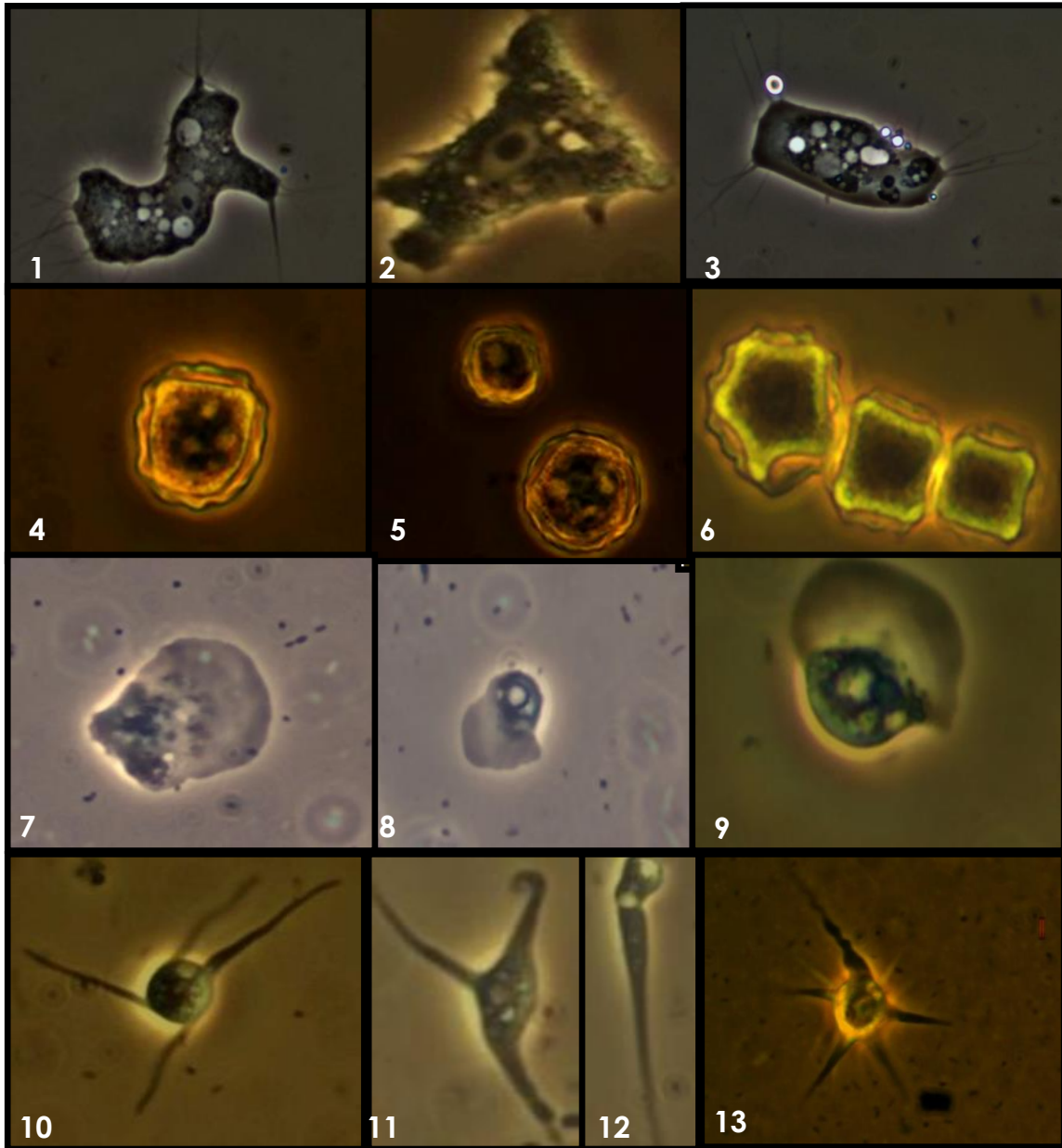


Fig. 7 Gimnamoebas identificadas en cuerpos de agua de la Zona sur de la Cuenca de México. Microscopía de Contraste de fases a 40X.

Trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga* (1-3); Quistes de *A. polyphaga* (4-6); Trofozoíto de *Vannella platypodia* (7-9); formas flotantes de *V. platypodia* (10-13).

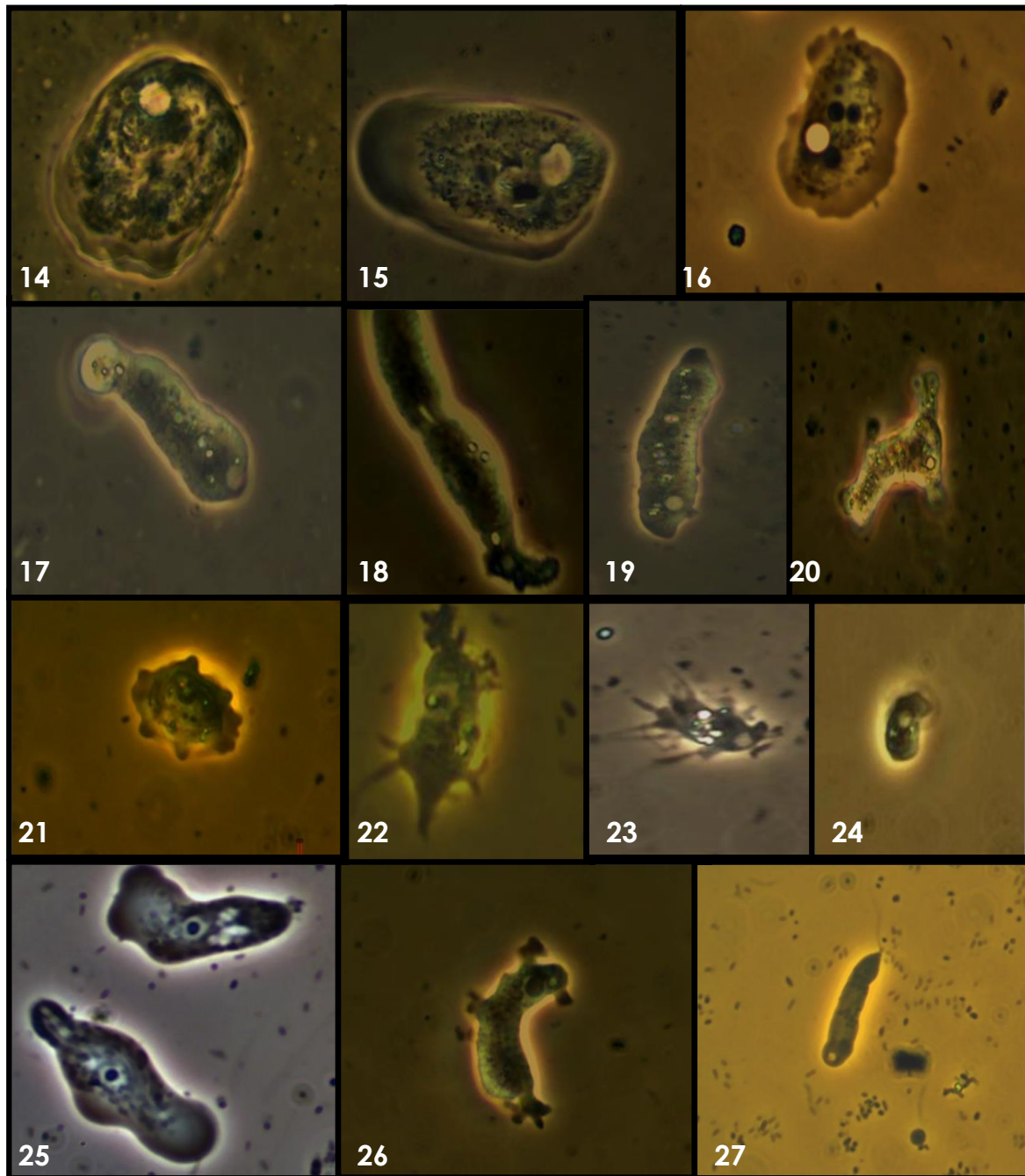


Fig. 7 Continuación

Trofozoíto de *Thecamoeba similis* (14); Trofozoíto de *Thecamoeba quadrilineata* (15); Trofozoíto de *Amoeba proteus* (16); Trofozoíto de *Saccamoeba stagnicola* (17); *Saccamoeba limax* (18); Trofozoíto de *Vermamoeba vermiformis* (19-20); Trofozoíto de *Amoeba diminutiva* (21); Trofozoíto de *Vexillifera bacillipedes* (22-23); Trofozoíto de *Rosculus ithacus* (24); Trofozoíto de *Vahlkampfia enterica* (25); Trofozoíto de *Naegleria* sp. (26-27).

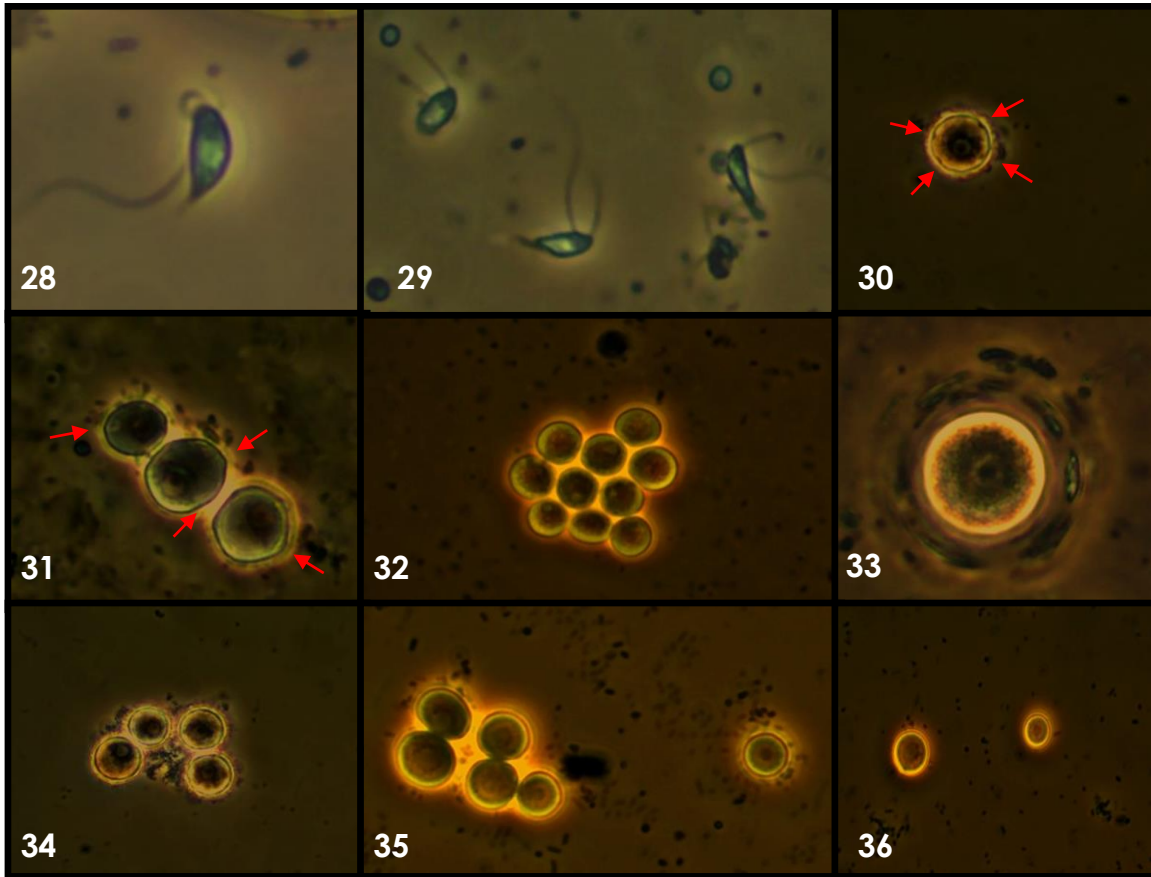


Fig. 7 Continuación

Estadio flagelar de *Naegleria* sp. (28-29); Quiste de *Naegleria* sp. (30-36), en 30-31 se observa la presencia de poros

Riqueza específica

Como se puede ver en la figura 7, en el río Confluencia Eslava-Magdalena se registró el mayor número de especies, 11 en total, seguido del río Magdalena-Santa Teresa, San Luis Ayucán y Transfiguración con 7 especies cada uno.

El río Confluencia Eslava-Magdalena fluye en zonas de conservación y en zonas urbanas dentro de cuatro delegaciones (Magdalena Contreras, Álvaro Obregón, Cuajimalpa, Coyoacán), si bien aguas río arriba se encuentran limpias, en la parte media y baja presenta severa contaminación debido a numerosas e indebidas descargas de aguas residuales y depósitos de basura a lo largo de sus cauces. La mayor problemática en el área son las descargas de aguas negras a cielo abierto en barrancas y ríos, la pérdida de humedad en las zonas altas de las cuencas y los asentamientos irregulares sobre suelo de conservación, que afectan la calidad del agua (Programa de rescate integral de los ríos Magdalena y Eslava, 2006). Probablemente este sea un factor para el aumento de materia orgánica por lo que se encontró una mayor riqueza de amibas ya que la disponibilidad de alimento fue mayor.

En la Tabla 1 se puede observar que los muestreos fueron puntuales, así como que la mayoría de los sitios fueron muestreados en la temporada de lluvias. A pesar de esto, en el sitio de Truchero Valle Monjas que fue muestreado en la temporada de secas se obtuvo un total de 6 aislamientos, estando en el quinto lugar de la riqueza total.

Xopachi fue el único sitio en el que no hubo registro de AVL, lo cual pudo deberse a la combinación de varios factores; la baja temperatura del agua (9.9°C), la conductividad (presencia de sales) que fue muy baja 33 μS / y la baja o nula influencia urbana (Rodríguez, 2014; Ortiz, 2017).

En un estudio realizado por Rodríguez en 2014, se menciona que de acuerdo con el índice de Calidad Ambiental de Ríos Andinos (CERA), la calidad del río Xopachi, es excelente, registrando 37 puntos (excelente ≥ 36) y que cuenta con poca perturbación, y de acuerdo a la NOM-089-ECOL-1994 tiene un registro

bueno para el contacto humano, por último, clasifican a este río con concentraciones menores de nutrientes y con temperatura fría lo cual coincide con los resultados de este estudio. Es decir, la baja concentración de nutrientes y la baja temperatura limitan el desarrollo de las AVL.

En relación con la conductividad, se han reportado AVL en cuerpos de agua superficial con valores muy amplios que van desde los 30 hasta los 1224 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Bonilla *et al.*, 2004; Andrade, 2014).



Fig. 8 Riqueza específica en los sitios de muestreo.

Aislamientos de Gimnamoebas en relación con la temperatura de incubación

Del total del número de aislamientos, el 67% creció a 25°C y el 12% a 37°C, hubo amibas que crecieron perfectamente bien en ambas temperaturas, (21%) (Fig. 8). La mayoría de las Gimnamoebas se desarrollaron bien a 25°C, probablemente debido a que las Gimnamoebas fueron aisladas en cuerpos de agua templados con tendencia a ser fríos con un promedio de 11.84°C (Carmona y Caro, 2017).

Esto coincide con lo reportado en 2014 por Andrade, quien menciona que el mayor número de aislamientos los obtuvo a una temperatura de incubación de 25°C debido a que los ríos estudiados registraron temperaturas bajas, con promedio de 10.3°C. De igual forma en el estudio realizado por Bonilla *et al.*, (2014) también en ríos de la Cuenca de México, mencionan que todos los sitios estudiados fueron reportados con temperaturas bajas. Como ya se mencionó anteriormente, son ríos que se encuentran ubicados en zonas con una temperatura ambiental entre 12 y 18°C con clima templado subhúmedo a semiseco.



Fig. 9 Porcentaje de aislamientos a 25 y a 37°C

Prueba de temperatura

Esta prueba se realizó para determinar la temperatura máxima y óptima de las amibas potencialmente patógenas del grupo *Naegleria-Acanthamoeba*, ya que se ha demostrado que las Gimnamoebas patógenas son termotolerantes, aunque se ha descrito que no todas las termotolerantes son patógenas (Martínez y Janitschke, 1985). Por lo que es una prueba complementaria para identificar a las Gimnamoebas patógenas, conforme a las claves taxonómicas de Page (1988) y Pussard y Pons (1977).

En la tabla 8 se muestra que la cepa de *Acanthamoeba sp.* (M16Aca) creció a 37 y 45°C es decir es termotolerante, lo cual sugiere que puede ser patógena (Lares *et al.*, 2009).

La cepa M18Aca creció inicialmente a 37°C, pero no a 45°C es decir que esa temperatura no fue óptima para su desarrollo, por lo que la probabilidad de que sea patógena es menor.

Por último, el aislamiento de *Naegleria sp.*, (M20Nae) únicamente creció a temperatura ambiente (25°C) sin embargo no se desarrolló bien. Las demás especies de este género probablemente pertenecieran a la especie de *Naegleria gruberi* no pudieron ser axenizadas, debido a su falta de crecimiento en los medios axénicos.

Tabla 7. Prueba de temperatura

Aislamientos	25°C	37°C	45°C
M16Aca	+	+	+
M18Aca	+	+	-
M20Nae	+	-	-

📍 Pruebas moleculares

Esta prueba se realizó para confirmar el diagnóstico morfológico de los géneros potencialmente patógenos *Acanthamoeba* y *Naegleria*, a nivel género.

PCR *Acanthamoeba*

Se confirmó que los aislamientos M16Aca (Fig. 10) y M18 (Fig. 11), pertenecieron al género *Acanthamoeba* el producto de la PCR está entre 423 y 551 pb (Shroeder *et al.*, 2001).

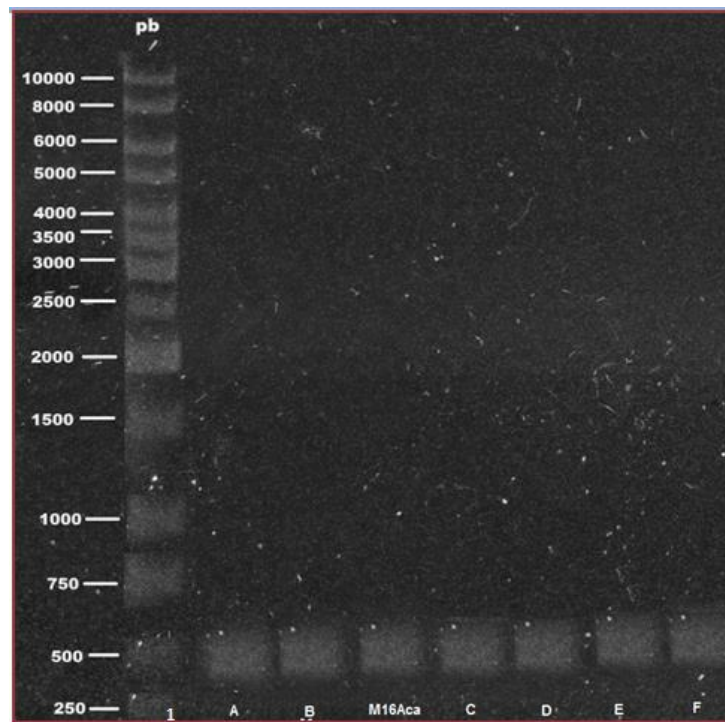


Fig. 10 Revelado de la PCR para la cepa M16Aca comparada con otras cepas del género *Acanthamoeba*

- Carril 1 pb. Marcador de peso molecular
- A y B aislamientos de *A. triangularis* y *A. polyphaga* (Andrade, 2015)
- M16Aca aislamiento de esta investigación
- C *Acanthamoeba culberstoni* (A1) (ATCC)
- D *Acanthamoeba lenticulata* (PD2) (ATCC)
- E *Acanthamoeba* sp. (EF2) aislamiento de agua
- F *Acanthamoeba castellanii* (NEFF) (ATCC)

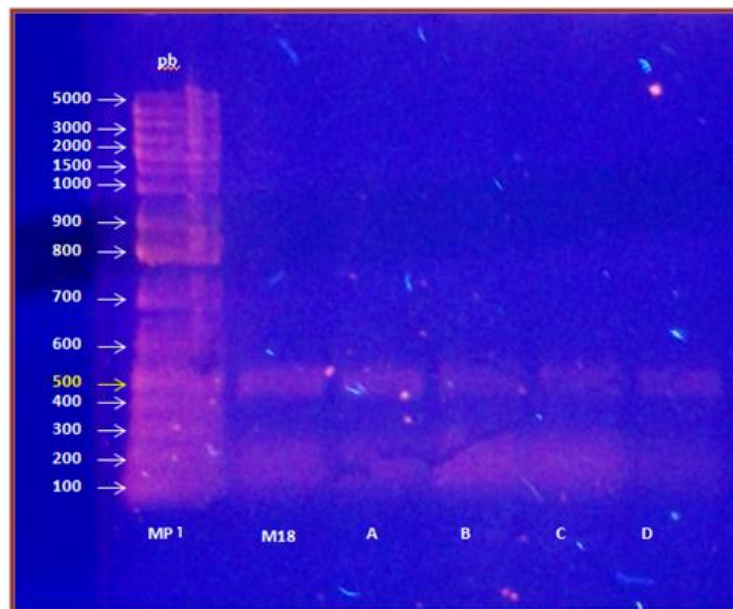


Fig 11. Revelado de la PCR para la cepa M18Aca comparada con otras cepas del género *Acanthamoeba*

- Carril MP 1 pb. Marcador de peso molecular
- M18 aislamiento de esta investigación
- A *Acanthamoeba culberstoni* (A1) (ATCC)
- B *Acanthamoeba castellanii* (NEFF) (ATCC)
- C *Acanthamoeba lenticulata* (PD2) (ATCC)
- D *Acanthamoeba* sp (EF2) aislamiento del agua

PCR *Naegleria*

Se utilizó el primer: NAE-Forward y NAE- Reward, específicos para el género *Naegleria*.

Como se puede ver en la figura 11 se comprueba que el aislamiento M20 si corresponde al género de *Naegleria* amplificando un producto final de 183pb.

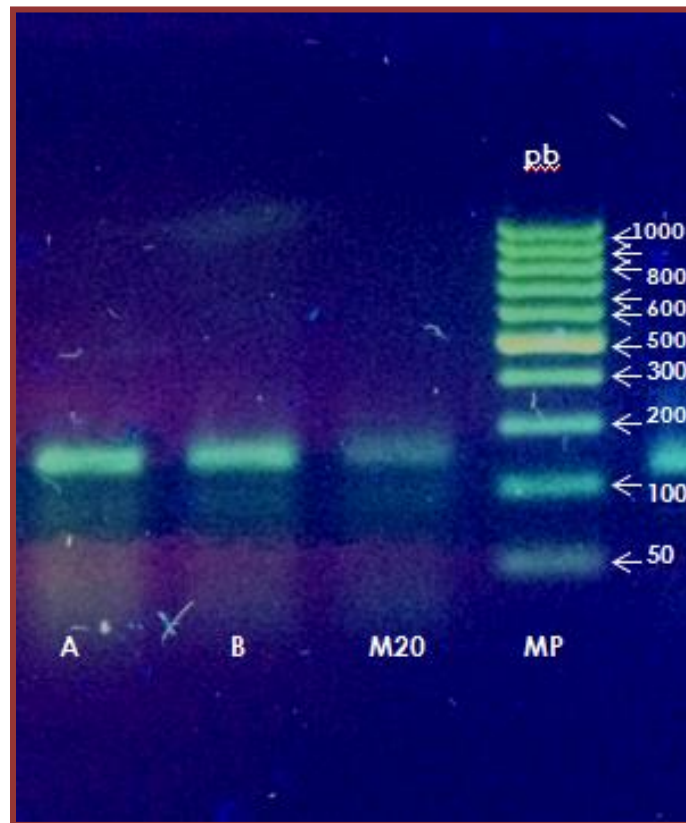


Fig 12. Revelado de la PCR para la cepa de *Naegleria* aislada comparada con otras cepas de *Naegleria*

- Carril 1 pb Marcador de peso molecular
- M20 aislamiento de *Naegleria* sp
- A cepa de referencia *Naegleria fowleri* (ATCC 30808)
- B cepa de referencia *Naegleria gruberi* (ATCC 3022)

@ Prueba de patogenicidad

La prueba de patogenicidad de las dos cepas de *Acanthamoeba polyphaga* aisladas en este estudio, fue negativa (Fig. 5) probablemente una de las razones se debe a que las Gimnamoebas patógenas se desarrollan en ambientes con temperatura por arriba de 30°C (Visvesvara *et al.*, 2007) y por el contrario las temperaturas por debajo de 20°C inhiban a las patógenas, lo cual coincide con los resultados de trabajos previos en la zona (Andrade, 2014; Bonilla *et al.*, 2014). De Jonckheere (1991) reportó que sólo algunas cepas de *Acanthamoeba* aisladas del ambiente son patógenas en animales. También se debe considerar lo reportado por John (1993), en el sentido de que el cultivo continuo en medio axénico puede llevar a la pérdida gradual de virulencia de las especies reportadas como patógenas.

La cepa aislada del género de *Naegleria*, no provocó a los ratones ningún síntoma o muerte, los animales permanecieron en condiciones normales los 30 días de observación. Probablemente se deba a que como ya se mencionó en el caso de *Acanthamoeba*, las especies patógenas se observan frecuentemente en cuerpos de agua con temperaturas mayores a los 30°C. En esta zona de muestreo todo el año las temperaturas del agua son de templadas a frías (debajo de 15°C). De igual forma se ha propuesto que el incremento brusco de temperatura, más que una temperatura elevada constante, es lo que realmente favorece la predominancia de las naeglerias patógenas (Bonilla., *et al* 2009).

📍 Parámetros físicos y químicos

Tabla 8. Datos físicos y químicos de los sitios de muestra

No Dendograma	Sitios	pH	Temperatura °C	Conductividad $\mu\text{S}/\text{cm}$	Oxígeno disuelto mg/L
6	Monte Alegre 1	7.5	13.8	52	7.2
7	Monte Alegre 2	7.1	18.4	78	7.5
1	Nacimiento Presa Iturbide	7	11	50	8.2
2	Manantial las Palomas	6.6	13.2	52	7.6
3	Organillos	6.7	11.8	198	8
4	Xopachi	6.8	9.9	33	9
5	Manantial San Pedro	6.4	11	50	9
8	Confluencia ríos Eslava-Magdalena	7.1	12	86	5.4
9	Magdalena -Santa Teresa	7.6	12.5	74.9	4.5
10	Truchero Valle Monjas	6.6	11.3	100	7.8
11	Valle de Monjas (escuela)	7.3	5.5	83	8.4
15	Cosamala	7	14.6	99	8.6
12	La Catañeda bajo	7.1	11	201	7
13	Estación UAM	7.1	11	201	7
14	Confluencia Compañía-San Rafael	6.9	14.9	137	5
16	Canal San Rafael	6.8	11.3	136	9.1
17	La Castañeda IV Alto San Rafael	7.3	8.3	255	8.9
18	Presa Iturbide Cortina	6.5	13.2	53	7.9
19	Nacimiento Presa Iturbide II	6.1	10.3	53	9.4
20	San Luis Ayucán	6.6	10.8	60	6
21	Transfiguración	7.5	12	63	11
22	Presa Capoxí Cortina	6.4	12.7	48	5
	Intervalo	6.1-7.5	5.5-18.4	33-255	4.5-11

pH

En la Tabla 6 se observa que el pH estuvo entre 6.1 a 7.6 muy cercano a la neutralidad. El pH que correspondió a 6.1 fue el sitio de Nacimiento Presa Iturbide II y el registro más alto en Magdalena – Santa Teresa con un valor de 7.6. Los intervalos de tolerancia de pH para las *Gimnamoebas* fluctúan de 4.6 a 9.5 (Bonilla y Ramírez, 1993; Bonilla *et al.*, 2004), como se puede observar el intervalo de pH en el que se pueden encontrar las *Gimnamoebas* es muy amplio, los

registros de pH en este estudio se encuentran dentro del rango citado. Todos los valores de los 22 sitios muestreados se encuentran cercano del rango de la neutralidad, por consiguiente, el pH no resultó ser un factor limitante para el desarrollo y crecimiento de las Gimnamoebas. En un estudio previo que realizó Duarte-Ruiz (2007), sobre la calidad de aguas superficiales del Río Mayo Sonora, México, se reporta que los valores de pH fluctuaron entre 7.13 y 8.38, coincidiendo con los resultados de este estudio.

El trabajo realizado anteriormente en ríos de la Cuenca de México, por Andrade (2014) y Bonilla *et al.* (2014) muestra un pH muy homogéneo en todos los ríos estudiados, el cual fue cercano a la neutralidad, e indicando que este parámetro no resultó desfavorable para la presencia de las Gimnamoebas. Estos datos son similares a los encontrados en el presente estudio.

Temperatura

La temperatura del agua osciló entre 5.5 y 18.4 °C. En 21 de los 22 sitios la temperatura no rebasó los 15°C, solamente en el sitio Monte Alegre 2, se registraron 18.4°C (Tabla 6), y aunque en este sitio el agua fue menos fría, únicamente se obtuvo *Rosculus ithacus*, (Tabla 7), la cual es una amiba pequeña de 5-17 µm, se relaciona positivamente con la velocidad del flujo y tiene forma plana; esto puede ser muy útil para permanecer en su lugar cuando la velocidad de la corriente es alta (Bonilla *et al.*, 2014). Por otro lado, no se encontraron AVL patógenas, ya que, aunque se identificaron algunas de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria*, ninguna fue patógena en animales de laboratorio, lo que no es extraño, ya que se ha reportado previamente que el valor óptimo de temperatura para la presencia de éstas, es por arriba de los 30°C (Bonilla *et al.*, 2004; Visvesvara *et al.*, 2007) y la temperatura del agua de la mayoría de sitios estudiados estuvo por debajo de 15.0 °C, lo que desde el punto de vista de salud pública es positivo, pues la temperatura no favorece la presencia de especies de Gimnamoebas patógenas.

Estudios recientes (Andrade 2014; Bonilla *et al.*, 2014) en diferentes ríos de la Cuenca de México, mencionan que la temperatura fluctuó por debajo de 17°C.

El sitio con menor temperatura fue el de Valle de Monjas (escuela) con 5.5°C; no obstante, la baja temperatura, se identificaron 4 géneros; *Amoeba*, *Mayorella*, *Vannella*, *Polychaos* (tabla 7). Lo que muestra la tolerancia de esos géneros a temperaturas bajas.

Andrade en 2014, menciona que el mayor número de aislamientos (6 especies) lo obtuvo a 16.7°C (Río Miraflores). De los ríos que analizó, los que tuvieron temperaturas más bajas fueron Castañeda II y Santa Rosa (6.6°C y 7.5°C respectivamente) en el primero identificó 3 especies, una de las cuales pertenece al género *Vannella*, como en este estudio, en el segundo sitio hubo ausencia de amibas por lo que Andrade (2014) sugiere que la temperatura pudo influir en el desarrollo, de las AVL.

Oxígeno disuelto (OD)

El oxígeno disuelto estuvo en concentraciones de 4.5 mg/L hasta 9.4 mg/L, es decir en niveles adecuados y suficientes para las amibas de vida libre (Bonilla *et al.*, 2004). Debido a que las Gimnamoebas son aerobias, el oxígeno es importante para su presencia y distribución. Un factor importante respecto a la cantidad de oxígeno en el agua es la dependencia que tiene con la temperatura, esto es, el agua más fría puede disolver más oxígeno en ella (Robles *et al.*, 2004).

De los 22 sitios estudiados únicamente cuatro estuvieron por debajo de los 5.5 mg/L de OD. El que estos sitios tuvieran una cantidad menor de oxígeno disuelto, no fue un impedimento para la presencia de Gimnamoebas ya que en el río Magdalena-Santa Teresa, donde se registró la menor concentración de OD (4.5 mg/L), se identificaron 7 especies (tabla 7). Los ríos Compañía-San Rafael y Cortina Presa Capoxi, tuvieron 5.0 mg/L; en el primero se obtuvieron 4 especies amibianas y en el segundo 6. Por último, en el río Confluencia Eslava-Magdalena con 5.4 mg/L de OD, se identificaron 11 especies diferentes, siendo el río con

mayor número de aislamientos lo cual probablemente está relacionado con la contaminación por residuos urbanos (orgánica) que tiene el río. Bojorge-García (2002), señala que la calidad del agua en la parte alta de la cuenca es buena pero que, al llegar a la zona urbana, disminuye su calidad al aumentar las comunidades bacterianas debido al aporte de desagües domésticos de la zona.

Conductividad

Este parámetro permite conocer la cantidad de sales disueltas en el agua. En este estudio la conductividad estuvo en un promedio de 98 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (tabla 6). En el río Xopachi se registró la menor conductividad (33 $\mu\text{S}/\text{cm}$) y a su vez, fue el único sitio en el que no se registró la presencia de Gimnamoebas en comparación de los sitios restantes en los cuales la conductividad fue mayor y hubo presencia de las amibas. Aunque puede haber otros factores que también influyeran.

Se sabe que también la conductividad se ve afectada por las variaciones de la temperatura; al aumentar la temperatura aumenta la conductividad (Robles *et al.*, 2004).

📊 Análisis Estadístico.

Se realizó una correlación no paramétrica de Spearman (Durán *et al.*, 2003) para analizar si existía alguna relación entre los parámetros fisicoquímicos y las amibas.

Los resultados obtenidos no mostraron correlación significativa entre las Gimnamoebas y estos parámetros.

Posteriormente se realizó un análisis de Cluster (Durán *et al.*, 2003) para determinar la similitud de las especies entre los sitios de muestreo (Fig. 13). El primer grupo está conformado por cuatro sitios; La Castañeda abajo (Amecameca), Estación UAM (Tlalmanalco), Cosamala (Tlalmanalco) y La Castañeda IV Alto San Rafael

(Amecameca) este agrupamiento se dio con base en la similitud de la composición taxonómica de las Gimnamoebas, (tabla 6). Como se puede observar este grupo incluyó dos sitios en Tlalmanalco y dos en Amecameca, lo que era de esperarse, ya que esos sitios de muestreo se encuentran cercanos unos de otros (Fig. 4).

El segundo grupo incluyó a Monte Alegre 2 (Tlalpan) y Confluencia Eslava-Magdalena (Magdalena Contreras).

Tercer grupo Organillos (Cuautitlán), Manantial San Pedro (Cuautitlán), Truchero Valle Monjas (Cuajimalpa), y Canal San Rafael (Tlalmanalco),

Cuarto grupo Manantial las Palomas (Cuautitlán), San Luis Ayucán (Jilotzingo), Confluencia Compañía-San Rafael (Tlalmanalco) Presa Iturbide Cortina (Cuautitán)

Quinto grupo Monte Alegre 1 (Tlalpan), Magdalena Santa Teresa (Magdalena Contreras) y Transfiguración (Cuautitlán)

Nacimiento Presa Iturbide (Cuautitlán), Xopachi (Isidro Fabela y Jilotzingo y Valle Monjas escuela (Cuajimalpa)

A pesar de que muchos de los sitios de muestreo se encontraban en la misma delegación o municipio su agrupamiento fue diferente, esto probablemente se debe a las condiciones fisicoquímicas particulares de cada sitio, así como al número de especies registradas.

Se hubiera esperado un agrupamiento diferente para el sitio de Xopachi ya que fue el sitio con la conductividad más baja de los ríos. Por último, el sitio de Nacimiento Presa Iturbide II fue el único alejado de los grupos, posiblemente al pH ya que fue el más bajo de todos los ríos.

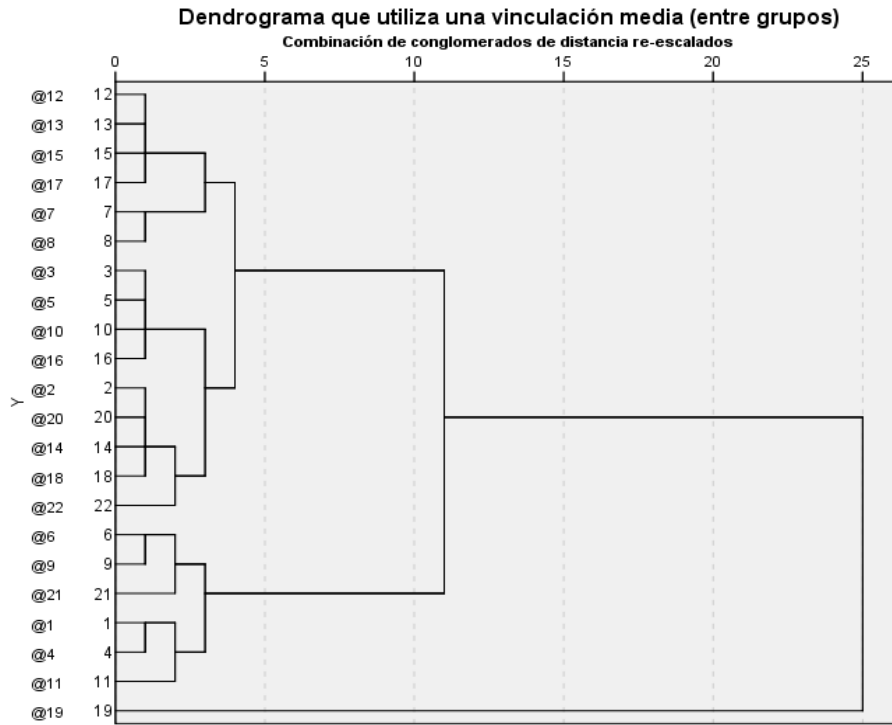


Fig.13 Dendrograma de agrupamiento de los sitios de muestreo y las AVL

X. CONCLUSIONES

En 21 de los 22 sitios muestreados se aislaron Gimnamoebas.

Se aislaron un total de 87 cepas que se identificaron morfológicamente en 25 especies, pertenecientes a 14 géneros de Gimnamoebas.

La especie más ampliamente distribuida fue *Rosculus ithacus* estando presente en 17 sitios de muestreo.

En el río Confluencia Eslava-Magdalena se obtuvo el mayor número de aislamientos distribuidos en 11 especies en total, probablemente debido al mayor contenido de materia orgánica

Por medio de la técnica de PCR se confirmó que M16Aca y M18Aca correspondieron al género de *Acanthamoeba* y M20Nae al género de *Naegleria*.

Las amibas de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* aisladas en los 22 sitios estudiados, no fueron patógenas

Los parámetros físico y químicos estuvieron dentro del rango reportado para la presencia de las Gimnamoebas.

Los resultados de la prueba no paramétrica de Spearman no mostraron correlación significativa entre las Gimnamoebas y los parámetros fisicoquímicos.

El análisis de Cluster no mostró una similitud entre los sitios de muestreo indicando que la cercanía de los lugares no necesariamente se refleja en una composición similar de especies de Gimnamoebas.

XI. Literatura Citada

1. Andrade, M.A. 2014. Determinación de amibas de vida libre en ríos de la Cuenca de México. Tesis de Licenciatura (Biología) Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
2. Barrantes, K., Chacón, L.M., Solano, M., Achí, R. 2011. Contaminación fecal del agua superficial de la microcuenca del río Pures, Costa Rica. *Sociedad Venezolana de Microbiología*. 33: 40-45pp
3. Bass, D., Silberman, J., Brown, M., Pearce, A., Tice, S., Hartikainen, H. 2016. Coprophilic amoebae and flagellates, including *Guttulinopsis*, *Rosculus* and *Helkessimastix*, characterise a divergent and diverse rhizarian radiation and contribute to a large diversity of faecal-associated protists. *Environmental Microbiology* 00. 1604–1619pp
4. Bojorge, M., Carmona, J., Cartajena, A.M. y Beltrán, M.Y. 2010 Temporal and spatial distribution of macroalgal communities of mountain streams in Valle de Bravo Basin, central México. *Hydrobiologia* 641:159-169pp
5. Bojorge, M.G. 2002. Ecología de comunidades algales en una localidad del río La Magdalena, D.F. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 46p.
6. Bonilla, P., Caballero, A., Carmona, J y Lugo, A. 2014. Occurrence of free-living amoebae in streams of the Mexico Basin. *Exp. Parasitol.* 145: S28-S33.
7. Bonilla, P., Ramírez E. 2014. Amebas de vida libre asociadas a patologías en seres humanos. En: *Parasitología Médica* (M.A. Becerril, Ed.). McGraw-Hill Interamericana, Ciudad de México. 22-30pp.
8. Bonilla, P., Ramírez, E. 1993. Sistemas de tratamiento de lecho de raíces. Las amibas de vida libre. *Información Científica y Tecnológica*. CONACYT. 15(203): 22-25pp
9. Bonilla, P., Ramírez, E., Ortiz, R., y Eslava, C. 2004. La ecología de las amebas patógenas de vida libre en ambientes acuáticos. En Rosas I, Cravioto A, Ezcurra E. (Eds). *Microbiología Ambiental*. México INE-UNAM. *Microbiología Ambiental*. PUMA-UNAM e Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT. 67 - 81. ISBN 968 – 817 – 707 – 5.

10. Bonilla, P., Vilaclara, G., Merino, M., Carmona, J., Gaytán, M., Castillo, S., Ramirez, J., Ramírez, E., Ibarra Ma. R. 2009. Free-living amoebae in high-altitude streams from Valle de Bravo-Amanalco basin, central México. XIIIth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free - Living Amoebae. Puerto de la Cruz, Tenerife, España.
11. Brieland, J.K., Fantone, J.C., Remick, D., Legendre, M., McClain, M. 1996. The role of *Legionella pneumophila*-infected *Hartmannella vermiformis* as an infectious particle in a murine model of Legionnaires' disease. *Infection and Immunity*, 65(12), 5330-5333.
12. Brown, MRW, Barker, J. 1999. Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms. *Trends in Microbiology* 7 (1): 46-50pp
13. Campos, L. 2007. Distribución temporal de las amibas de vida libre en dos manantiales del acuífero del Valle de Cuernavaca, Morelos. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.
14. Carmona, J., Caro, A. 2017. The last peri-urban rivers of the Mexico Basin: establishment of potential reference conditions through the evaluation of ecological quality and biological indicators. *Mexicana de Biodiversidad* 88: 425 -436pp.
15. Culbertson, C.G., Smith, J.W., Miner, J.R. 1959. Experimental infection of mice and monkey by *Acanthamoeba*. *The American Journal of Pathology* 35 (1): 185-197pp.
16. De Jonckheere, J.F. 1991. Ecology of *Acanthamoeba*. *Reviews of Infectious Diseases* 13: S385-S387.
17. Duarte-Ruiz, J.C. 2007. Evaluación de la calidad de aguas superficiales en el cauce del Río Mayo. Tesis de maestría no publicada. Instituto Tecnológico de Sonora. México.
18. Durán, A., Cisneros, A., Vargas, A. 2003. *Bioestadística*. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 136-144pp.
19. Fenchel, T. 1987. Ecology of Protozoa: The biology of freeliving phagotrophic protists. Springer Verlag, Wiscosin. 197p.

20. Ferrusquía-Villafranca, I. 1993. Geology of Mexico: A synopsis. In: Ramamoorthy T.P., Bye R., Lot A. & Fa. J. (eds), Biological diversity of Mexico, origins and distribution. Oxford University Press. New York.
21. Greub, G., Raouti, D. 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical Microbiology* 17 (2), 413-433pp.
22. Herrera, J.M. 2001. Riqueza de especies de Amebas desnudas y aislamiento de bacterias endosimbiontes en el suelo desnudo conservado de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Unidad de Biología Tecnología y Prototipos. Escuela Nacional de Estudios Superiores Iztacala. Universidad nacional Autónoma de México.
23. Hoffmann, R., Michel, R., Schmid, E., Muller, K. 1998. Natural infection with microsporidian organisms (KW19) in *Vannella* spp. (Gymnamoebia) isolated from a domestic tap-water supply. *Parasitology Research*. 84: 164-166pp.
24. John, D. 1993. Opportunistically pathogenic free-living amoebae. In *Parasitic Protozoa*. 2(3):135-150pp.
25. Lakhundi, S., Siddiqui, R., Khan, N. 2015. Cellulose degradation: a therapeutic strategy in the improved treatment of *Acanthamoeba* infections. *Parasites & Vectors*. 8(23): 16pp.
26. Lares, L.F., Lares, F. 2009. Aislamiento de amebas de vida libre en aguas superficiales del Valle del Mayo, Sonora. *Latinoamericana de Recursos Naturales*. 5 (2) 161-167pp.
27. Legorreta, J. 2009. Ríos, lagos y manantiales del valle de México. Universidad Autónoma Metropolitana, Gobierno del Distrito Federal. México, D.F.
28. Martínez, A.J., Janitsschke, J. 1985. *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism; A review. *Infection*. 13: 251-256pp.
29. Martínez, A.J., Visvesvara, G. 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Patho* 7:583-598. Madrid.54pp.
30. Oddó, B.D. 2006. Infecciones por Amibas de Vida Libre. Comentarios históricos, taxónomicos y nomenclatura, Protozoología y cuadros anátomos –clínicos. *Revista Chilena de Infectología*. 23(3): 200-214pp.
31. Ortíz, R. 2017. La Calidad hidromorfológica de la Cuenca de México: Una propuesta metodológica para reconocer la calidad del sistema de ribera. Tesis

- de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
32. Ortiz, R., Bonilla, P., Monsalvo, A., Eslava, C. 2009. Detección de Amibas Patógenas del género *Acanthamoeba* por PCR en cuerpos de agua recreativos en el Estado de San Luis Potosí, México. *BIOCYT*. 5(19): 358-365pp.
 33. Page, F. C. 1974. *Rosculus ithacus* Hawes, 1963 (Amoebida, Flabelluidae) and the amphizoic tendency in amoebae. *Acta Protozol*. 13(12), 143-156pp.
 34. Page, F.C. 1988. A new key to freshwater and soil Gymnamoebae with instructions for culture. Culture Collection of Algae and Protozoa. Bio ASSO Scien Pub, Cumbria. 122p.
 35. Preston, T.M., Richards, H., Wotton, R.S. 2001. "Locomotion and feeding of *Acanthamoeba* at the water-air interface of ponds". *FEMS Microbiol Lett* .194(2), 143-147pp.
 36. Programa de rescate integral de los ríos Magdalena y Eslava. Reporte ejecutivo de acciones periodo 2006-2012. Secretaria del Medio Ambiente. Disponible en: <http://martha.org.mx/una-politica-con-causa/wp-content/uploads/2013/09/03-Programa-Rios-Magdalena-y-Eslava.pdf>
 37. Pussard, M., Pons, R. 1977. Morphologie de la paroi Kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba*. *Protistologica*. 13(4):557-598pp.
 38. Ramírez, E., Robles, E., Sainz, M., Ayala, R., Campos, E. 2009. Calidad Microbiológica del Acuífero de Zacatepec, Morelos, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 25(4):247-255pp.
 39. Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, I., Ramírez, E., Bonilla, P., Lares, F. 1987. Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City environs. *Environmental Research* 42:149-154pp.
 40. Robles, E., González, M., Castillo, P. 2004. Contaminantes físicos y químicos del agua: sus efectos en el hombre y el medio ambiente, FES IZTACALA, UNAM. México.

41. Rodríguez, R. 2014. Diversidad y distribución de algas macroscópicas en ríos de alta montaña de la Cuenca de México. Tesis de Licenciatura (Biología) Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias.
42. Schild, M., Gianinazzi, C., Gottstein, B., y Muller, N. 2007. PCR-based diagnosis of *Naegleria* spp. infection in formalin-fixed and paraffin-embedded brain sections. *J Clin Microbiol.* 45: 564-567pp.
43. Schroeder, J.M., Booton, G.C., Hay, J., Niszl, I.A., Seal, D.V., Markus, M.B., Fuerst, P.A., Byers, T.J. 2001. Use of subgenetic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *Journal of Clinical Microbiology.* 39, 1903–1911pp.
44. SEMARNAT. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental. Edición 2012. México. 2013.
45. Sistema Nacional de Información del Agua. (SNIA) 2012. Disponible en <http://sina.conagua.gob.mx/sina/>
46. Suárez, H. 2004. Presencia y distribución de amibas potencialmente patógenas en el Valle de Mexicali Baja California, México. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala
47. Suárez, R., Espinoza, Y., Villanueva, C., Ramos, J., Huapaya, P., Marquina, R., 2002. Aislamiento de amebas de vida libre del género *Acanthamoeba*. *Anales de la Facultad de Medicina.* 63 (2) 101-105pp.
48. Tyndall, R., Ironside, P., Metler, E., Tan, T., 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. *Applied and Environmental Microbiology.* 55: 722-732pp.
49. Upadhyay, J.M. 1968. Growth and bacteriolytic activity of a soil amoeba, *Hartmannella glebae*. *Journal of Bacteriology.* 95, 771-774pp.
50. Uribe, E. 2014. Presencia de Amibas de vida libre en el Sub Cuenca Valle de Bravo-Amanalco y su relación con algunos parámetros fisicoquímicos. Tesis de

licenciatura (Biología) Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala

51. Visvesvara, G., Moura, H., Schuster. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 50:1-26pp.
52. Weekers, P.H.H., Bodelier, P.L., Wijen, J.P., Vogels, G. D. 1993. Effects of grazing on the soil free-living amoebas *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on various bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 2317–2319pp.
53. ZYMO RESEARCH. INSTRUCTION MANUAL. Quick-g DNA TM MicroPrep. Catalog Nos. D3020 & D3021.

Anexo

Agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes* (NNE)

NaCl	0.12g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.004g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.004g
NaHPO ₄	0.142g
KH ₂ PO ₄	0.136g
Bactoagar	15.0g
Agua destilada	1000mL

Mezclar en seco todos los ingredientes, agregar 500mL de agua destilada y disolver, completar el volumen de 1000mL y hervir hasta que se disuelva completamente el agar. Esterilizar a 121°C durante 20 minutos. Se vierten aproximadamente 20mL de agar en cajas Petri. Una vez que el agar se ha solidificado se vierten 5 gotas de una suspensión concentrada de *Enterobacter 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.

Medio Ringer

NaCl	6.0g
KCl	0.075g

CaCl₂	0.1g
NaHCO₃	0.1g
Agua destilada	1000mL
pH	7-7.4

Mezclar todos los ingredientes y envasar 2.7 mL de medio en tubos con tapón de rosca. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos, se deja enfriar. Se guardan en el refrigerador hasta su uso, y posteriormente se le agregó 3 gotas con pipeta pasteur de suero fetal, para un mejor crecimiento de las amibas.