



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO DE AMIBAS POTENCIALMENTE
PATÓGENAS EN BIOTOPOS DE TRES SISTEMAS DE
CENOTES EN EL ESTADO DE YUCATÁN, MÉXICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARIELA ESQUIVEL SOLIS



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

**COTUTORA:
DRA. ITZEL SIGALA REGALADO**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. DE MX., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Esquivel

Solís

Mariela

5534119666

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

310228765

2. Datos del tutor

Dra

Elvia Manuela

Gallegos

Neyra

3. Datos del sinodal 1

Dr

Alfonso

Lugo

Vázquez

4. Datos del sinodal 2

Dra

Paz María Silvia

Salazar

Schettino

5. Datos del sinodal 3

Biól

Margarita

Reyes

Santos

6. Datos sinodal 4

Dra

Itzel

Sigala

Regalado

7. Datos del trabajo escrito

Estudio de amibas potencialmente patógenas en biotopos de tres sistemas de cenotes en el estado de Yucatán, México

63 p.

2018

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Dra. Elvia M. Gallegos Neyra, por proporcionarme todos los medios y materiales fundamentales para la realización de la tesis, por su apoyo en la identificación de las especies y por asesorar el presente trabajo.

A la Dra. Itzel Sigala Regalado, por asesorarme en todo de este trabajo, por la ayuda y por la atención brindada durante todo el proceso de tesis.

A mi comité, al Dr. Alfonso Lugo, la Dra. Paz Ma. Schettino y a la Biol. Margarita Reyes, por su tiempo, sus comentarios y correcciones.

A las Dras. Liseth Pérez y Margarita Caballero, por la paciencia, apoyo y correcciones durante la elaboración de este trabajo.

A la Dra. María Susana Sosa Najera, por siempre ser un apoyo en el instituto, en el taller y hasta al final seguir siendo parte de mi carrera.

A la Biól. María Jimena Romero, por toda la ayuda brindada durante el trabajo de laboratorio, por enseñarme a realizar cada medio y aventurarse a experimentar con el fin de obtener mejores resultados; por la ayuda en la identificación y apoyo en cada duda respecto esta parte.

Al Biól. Armando Corona, por el apoyo durante la parte de laboratorio, en cada una de sus fases.

A la M. en C. Fernanda Celis, por su ayuda con la elaboración en los análisis ecológicos y la paciencia para resolver cada una de mis dudas respecto los resultados obtenidos.

A Natalia Georgina Quintanilla Mena, por el apoyo en el registro fotográfico, recolección de muestras y seguimiento del trabajo de campo en las grutas Tzabnáh.

Al Mtro. Carlos Augusto Evia Cervantes por su tiempo y apoyo con el grupo Ajau de espeleología.

A Roger Medina González por ayudarme en el envío de mis materiales y por su apoyo en la ciudad de Mérida durante el muestreo.

A Raúl A. Tabaré Gómez Galicia, por su apoyo en la parte final del trabajo escrito.

Al Grupo Ajau de Espeleología por su apoyo en Mérida para el muestreo.

A la Dra. Mónica Chávez por ponerme en contacto con las personas adecuadas para realizar mi muestreo.

Al guía de Tzabnáh Manuel García por apoyarme y auxiliarme en cada sitio muestreado de este sistema.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi mamá, porque sin ella no sería lo que soy ahora y no habría llegado tan lejos, porque su bióloga interna siempre ha sido una inspiración y guía, te amo.

A mi papá, porque nunca dejo de apoyarme económicamente y anímicamente a su manera, te amo pa.

De nuevo, a mi cotutora Itzel, porque sinceramente si no te hubiera conocido tal vez yo no hubiera terminado esta carrera.

A mi adorada Moramay Guerra, porque ella siempre ha puesto toda su fe y apoyo en mí, porque sin ti literalmente muchas veces me hubiera detenido en este camino.

A mi Jefa Viadas, por tu amor y apoyo en esta vida loca.

A mi Tropa, porque ustedes siempre han estado para mí, aunque la carrera me tuviera atrapada, ustedes son una parte fundamental en mi vida, los amo.

A todos y cada uno de mis amigos que conocí en la carrera, Anaís, Esteban, Bere, Allan, etc. porque esta aventura no habría sido lo mismo sin ustedes y su apoyo. Especialmente a ti Ballesteros, lejos o cerca siempre has sido mi “pepe grillo”.

Al Sindicato de Amebas Testadas, porque entre jalones, abrazos y empujones, ustedes son parte de esta tesis...y de esta bióloga.

A mis profesores, de la secundaria, el CCH y la universidad, soy una afortunada por haber sido su alumna, su muy feliz alumna.

A mi familia en general, mis hermanos, mi primo y mis abuelos que jamás dejaron de apoyarme o tal vez sí, pero nunca lo demostraron porque me querían ver triunfar.

Finalmente, a ti, Pipe, porque me acompañaste casi toda la carrera, me empujaste cuando ya no quería o podía seguir, porque siempre te sorprendieron mis conocimientos y mi CV, porque jamás has dejado de creer en mí, gracias por tu apoyo incondicional.

CONTENIDO

1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	2
2.1. Amibas de vida libre potencialmente patógenas (AVLPP).....	2
2.2. Sistema de cenotes de la península de Yucatán, México.....	7
3. Antecedentes.....	8
4. Justificación.....	10
5. Objetivos	
5.1. Objetivo general.....	10
5.2. Objetivos particulares.....	10
6. Área de estudio.....	11
6.1. Sistema de cenotes Tzabnáh.....	12
6.2. Sistema de cenotes X-Bátun.....	14
6.3. Sistema de cenotes D-Zombakal.....	16
7. Métodos	
7.1. Trabajo de campo.....	17
7.2. Trabajo de laboratorio.....	18
7.2.1. Aislamiento y cultivo de amibas de vida libre.....	18
7.2.2. Clonación.....	18
7.2.3. Identificación morfológica y registro fotográfico.....	18
7.2.4. Análisis ecológicos.....	19
8. Resultados	
8.1. Descripción de las especies y registro fotográfico.....	20
8.2. Posición taxonómica.....	28
8.3. Riqueza específica de AVLPP en los tres sistemas de cenotes.....	29
8.4. Parámetros fisoquímicos.....	31
8.4.1. Tzabnáh.....	32
8.4.2. X-Batún.....	32

8.4.3. D-Zombakal.....	33
8.5. Análisis ecológicos.....	34
8.5.1. Análisis de clúster Q-mode Sistemas Tzabnáh y X-Batún.....	34
8.5.2. Análisis de componentes principales (PCA).....	36
8.5.3. Análisis de correspondencia sin tendencia (DCA).....	37
9. Discusión	
9.1.1. Tzabnáh.....	39
9.1.2. X-Batún.....	40
9.1.3. D-Zombakal.....	41
9.2.1. Análisis de clúster Q-mode de sistemas Tzabnáh y X-Batún.....	41
9.2.2. Análisis de componentes principales (PCA).....	44
9.2.3. Análisis de correspondencia sin tendencia (DCA).....	44
10. Conclusión.....	45
11. Bibliografía.....	47
12. Anexos	
12.1. Posición taxonómica de AVL.....	55
12.2. Riqueza específica de AVL en los tres sistemas de cenotes.....	56
12.3. Especie de amiba de vida libre no identificada.....	58
12.4. Soluciones e infusiones para medios de cultivo sólido, semisólido y líquido.....	58

1. INTRODUCCIÓN

Las amibas de vida libre (AVL) según la nueva clasificación propuesta por Adl y colaboradores (2012), son organismos, que pertenecen a los super-grupos: Amoebozoa, Excavata y SAR (Stramenopiles, Alveolados y Rhizaria). Habitan en todo tipo de ambientes y su distribución es cosmopolita. Son parte esencial de las cadenas tróficas en comunidades naturales donde hay agua; se alimentan de bacterias, hongos, algas y de otros protistas (Pelczar *et al.*, 1982). Las AVL presentan dos formas de vida, la vegetativa (trofozoíto) y la de resistencia (quiste), algunas especies pueden presentar una fase ameboflagelar en su ciclo de vida; tienen núcleo vesicular, nucléolo prominente, vacuolas contráctiles, digestivas, mitocondrias y retículo endoplásmico (Aqeel *et al.*, 2015).

Las AVL son parte esencial del flujo energético en los cuerpos de agua y en el reciclado de nutrientes (Merkell y Voge, 1989) se pueden encontrar en estanques, ríos, arroyos, lagos, piscinas, sistemas de tratamiento de agua residual, corrientes subterráneas e incluso agua entubada y embotellada (Rivera *et al.*, 1994).

Las amibas se encuentran en el ambiente, sin embargo, algunas pueden parasitar y causar enfermedades a otros organismos, los géneros de amibas de vida libre potencialmente patógenas son: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Sappinia*, *Vahlkampfia* y *Balamuthia*.

El presente trabajo se realizó en un sistema de cenotes en la península de Yucatán. La península, es una plataforma calcárea que se originó en el Cenozoico medio y alcanzó su forma actual en el Plioceno tardío. Se formó por eolianitas que fueron depositándose en la costa durante el Holoceno (Schmitter-Soto, 2002).

La zona presenta elevada temperatura atmosférica (media anual 26 máxima 36 °C), y tiene un alto índice de precipitación (1 100 mm anuales), la salinidad del agua junto con la estructura geomorfológica del estado le confiere a esta zona marina una alta heterogeneidad ambiental. Estas condiciones permiten la presencia de gran diversidad de hábitats como son los sustratos blandos fangosos y arenosos, praderas de pastos marinos y/o macroalgas, sustratos duros de origen calcáreo, ojos de agua, cenotes, etc. (Pech *et al.*, 2010).

El acuífero de la península de Yucatán es kárstico y tiene una alta permeabilidad. El karst se caracteriza por sus canales subterráneos y cavernas (cenotes) que están ampliamente distribuidos en toda la península (Schmitter-Soto, 2002).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Amibas de vida libre potencialmente patógenas (AVLPP)

Las amibas de vida libre son organismos que constituyen parte esencial de las cadenas tróficas, del flujo energético en los cuerpos de agua y en el reciclado de nutrientes (Merkell y Voge, 1989). Son organismos heterótrofos y tienen la capacidad de alimentarse tanto de forma osmótrofa (materia orgánica disuelta), como holozóica (bacterias, materia particulada y otros organismos) por fagocitosis, de esta forma reducen la población bacteriana y la materia orgánica particulada en suspensión (Bitton, 1999).

El conocimiento e identificación de las AVL se ha basado en su morfología, por ello se han realizado claves taxonómicas y listas ilustradas de morfotipos básicos de las amibas fundamentando esta clasificación en análisis de los patrones de organización morfodinámica de sus estructuras móviles (Smirnov y Goodkov, 1999). Sin embargo, actualmente se han desarrollado técnicas con mayor sensibilidad para evaluar la presencia de AVLPP en muestras ambientales y clínicas, tales como PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) tiempo real, multiplex y anidada, estas técnicas están basadas en la amplificación de fragmentos de genes relacionados con la virulencia (Coronado y Shibayama, 2017).

Las características morfológicas de AVL que se utilizan para la identificación son: forma del trofozoíto, (cilíndrico, monopodial, irregular, aplanado, flabelado (forma de abanico) y/o con varios pseudópodos); largo y ancho del trofozoíto; apariencia del endoplasma y ectoplasma, presencia o ausencia y forma de uroide posterior; presencia o ausencia de colopodio (masa de filamentos producidos por la adhesión de la parte posterior de la amiba a un sustrato); forma y tipo de pseudópodos (acantópodos, puntiformes, digitiformes, cilíndrico delgado o amplio, tubular, amplio); estructura, número y forma nuclear, presencia o ausencia de fase ameboflagelar, velocidad y tipo de locomoción (eruptiva o no eruptiva); pared del quiste (sencilla o doble, lisa, rugosa o poligonal); forma y diámetro del quiste, poros u opérculos de la forma quística, etc. (Page y Siemens, 1991; Patterson y Hedley, 1992; Pussard y Pons, 1977; Smirnov y Goodkov, 1999).

El género *Acanthamoeba* puede causar enfermedades como la encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), queratitis amibiana (QA) y lesiones cutáneas o sinusitis; de estas enfermedades la única con una mortalidad elevada es la EAG, sin embargo, las otras dos infecciones pueden causar daños irreversibles en la salud de los pacientes infectados por estos parásitos. Algunas de las especies reportadas con importancia médica de este género son: *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. commandoni*, *A. culbertsoni*, *A. divionensis*, *A. griffin*, *A. hatchetti*, *A. healyi*, *A. lugdunensis*, *A. polyphaga*,

A. pustulosa, *A. royreba*, *A. stevensoni*, *A. triangularis*, entre otras (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). Cabe mencionar que no todas las especies de este género causan las mismas patologías, difieren según el genotipo y sus preferencias, aunque la mayoría ingresan a su hospedero por una lesión primaria.

Las especies de *Acanthamoeba* involucran dos estadios en su ciclo de vida: trofozoíto y quiste (Fig. 1). El trofozoíto varía en tamaño de 25 a 40 μm y se alimenta por fagocitosis mediante acantópodos o puede vivir en forma axénica captando nutrientes disueltos en el medio. El quiste está compuesto por una doble pared, la exterior se conoce como exoquiste mientras que a la pared interna se le denomina endoquiste, su tamaño varía de 13 a 20 μm según la especie.

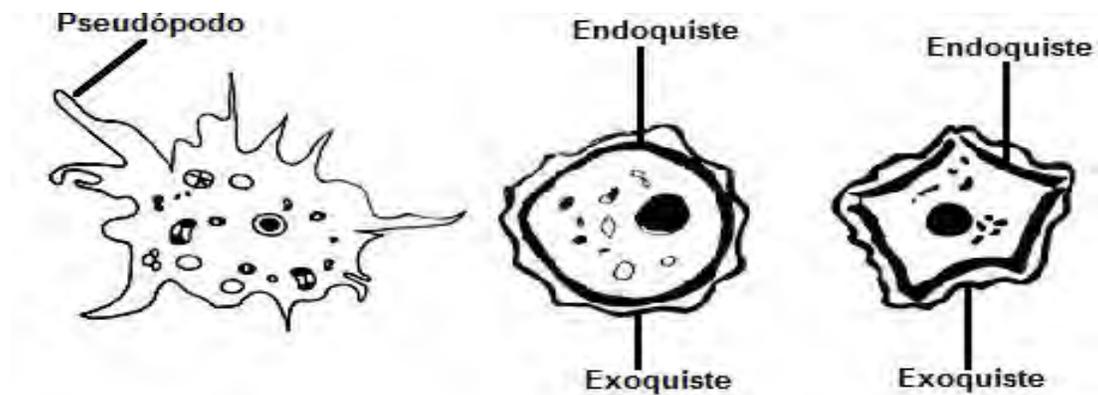


Figura 1. Estadios de *Acanthamoeba* (Modificada de Oddó, 2006).

El género *Acanthamoeba* se divide en tres grupos con base en las diferencias de tamaño y características morfológicas de los quistes (Fig. 2) (Pussard y Pons, 1977). El grupo I está conformado por especies que se caracterizan por poseer grandes quistes y trofozoítos, con endoquistes en forma estrellada y exoquistes que pueden ser lisos o rugosos, con un diámetro del quiste mayor o igual a 18 μm . El grupo II es el más grande, los quistes tienen un diámetro menor a 18 μm , su exoquiste es rugoso y el endoquiste puede ser poligonal, triangular, ovalado o redondeado. Y el grupo III, se caracteriza por amibas con el diámetro de los quistes menor a 18 μm , con exoquiste delgado y ondulado, su endoquiste es generalmente redondeado (Visvesvara, 1991).



Figura 2. Clasificación de los quistes de *Acanthamoeba* spp. (Castrillón y Orozco, 2013).

Naegleria fowleri es otro organismo descrito con potencial patógeno, es el agente causal de la meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP), infección de evolución rápida y con mortalidad elevada. Durante su ciclo de vida *N. fowleri* presenta tres estadios: trofozoíto, ameboflagelado y quiste (Fig. 3); estos estadios se presentarán dependiendo del ambiente donde se encuentre. Los trofozoítos miden aproximadamente de 15-25 μm de diámetro mayor, tienen un abundante citoplasma vacuolado, un núcleo central de gran tamaño, con un nucléolo esférico prominente; sus pseudópodos son lobópodos. La forma flagelada que se observa en el ambiente o en medios acuosos en el laboratorio, es usualmente piriforme, mide de 12-18 μm y es biflagelada. Los quistes son esféricos y lisos, miden de 8-12 μm de diámetro, aunque pueden alcanzar hasta 20 μm . En el ambiente los trofozoítos de *N. fowleri* son termofílicos y pueden desarrollarse y multiplicarse por fisión binaria a temperaturas de 40 a 45 $^{\circ}\text{C}$ (Gutiérrez, 2000; Martínez y Visvesvara, 1997).

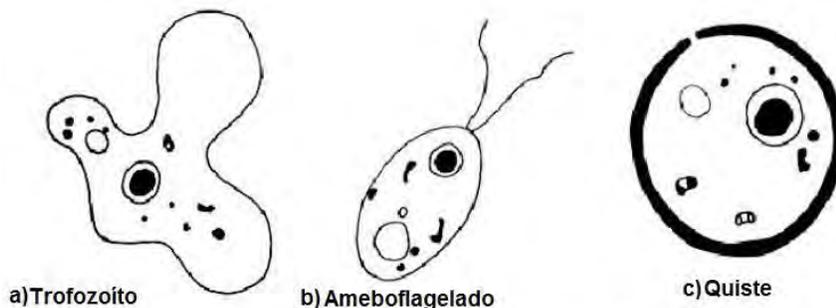


Figura 3. Esquema de trofozoíto: (a), ameboflagelado (b) y quiste (c), de *Naegleria fowleri* (Modificada de Oddó, 2006).

Dos especies del género *Naegleria*, *N. australiensis* y *N. italica*, han mostrado ser patógenas en pruebas de laboratorio con animales y se consideran potencialmente patógenas para el humano (De Jonckheere y Brown, 2005).

Existen otros géneros reportados como peligrosos para el ser humano, *Balamuthia*, *Hartmannella* y *Sappinia* (Cuadro 1) (Oddó, 2006).

Cuadro 1. Patologías que causan algunos géneros de AVLPP (Modificado de Marciano-Cabral y Cabral, 2003)

Género	<i>Acanthamoeba</i>			<i>Balamuthia</i>	<i>Naegleria</i>
	EAG	Queratitis amibiana	Lesiones cutáneas, sinusitis		
Infección	EAG	Queratitis amibiana	Lesiones cutáneas, sinusitis	EAG	MEAP
Vía de entrada	Epitelio olfativo, senos paranasales, tracto respiratorio, piel.	Abrasión corneal	Piel, senos paranasales, tracto respiratorio	Epitelio olfativo, tracto respiratorio, piel	Epitelio olfativo
Período de incubación manifestaciones clínicas	Semanas- meses Confusión, dolor de cabeza, rigidez del cuello, irritabilidad	Días. Visión borrosa, fotofobia, inflamación, anillo corneal	Semanas-meses Lesiones en la piel, nódulos, lesiones en senos paranasales, sinusitis	Semanas-Meses Debilidad muscular, dolor de cabeza, náuseas, convulsiones	Días. Dolor de cabeza, náuseas, confusión, fiebre, rigidez del cuello
Patología	Necrosis focal, granulomas	Ulceración de la córnea	Granulomas en la piel, inflamación	Múltiples focos necróticos, inflamación, edema cerebral	Necrosis hemorrágica
Diagnóstico	Biopsia cerebral, frotis de LCR/ preparación húmeda, cultivo, IIF de tejido PCR	Raspado corneal, biopsia corneal, microscopia confocal	Biopsia de lesiones cutáneas, cultivo, IIF de tejido	Biopsia cerebral, cultivo celular en mamíferos, IIF de tejido	Biopsia cerebral, preparación húmeda de LCR, CSF, IIF de tejido, PCR

Una persona puede infectarse por una AVLPP conviviendo o estando en ambientes donde éstas habitan, sin embargo, se necesitan diversos procesos para que estas puedan entrar al cuerpo humano (Fig. 4). Uno de estos ambientes puede ser los cuerpos de agua naturales que sean termales; las AVLPP necesitan factores determinados para poder habitar y reproducirse en estos cuerpos de agua como son: temperatura elevada, pH neutro o casi neutro y materia orgánica de la cual se alimentarán (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

Algunas especies de AVL pueden ser agentes causales de enfermedades mortales y son consideradas como oportunistas y también pueden provocar enfermedades no mortales, aunque generando patologías extremadamente graves. Una de estas infecciones no mortales es un tipo de encefalitis amebiana causada por *Sappinia diploidea*, que aparentemente no parece ser mortal, aunque solo existe un caso registrado por esta especie (Gelman *et al.*, 2001).

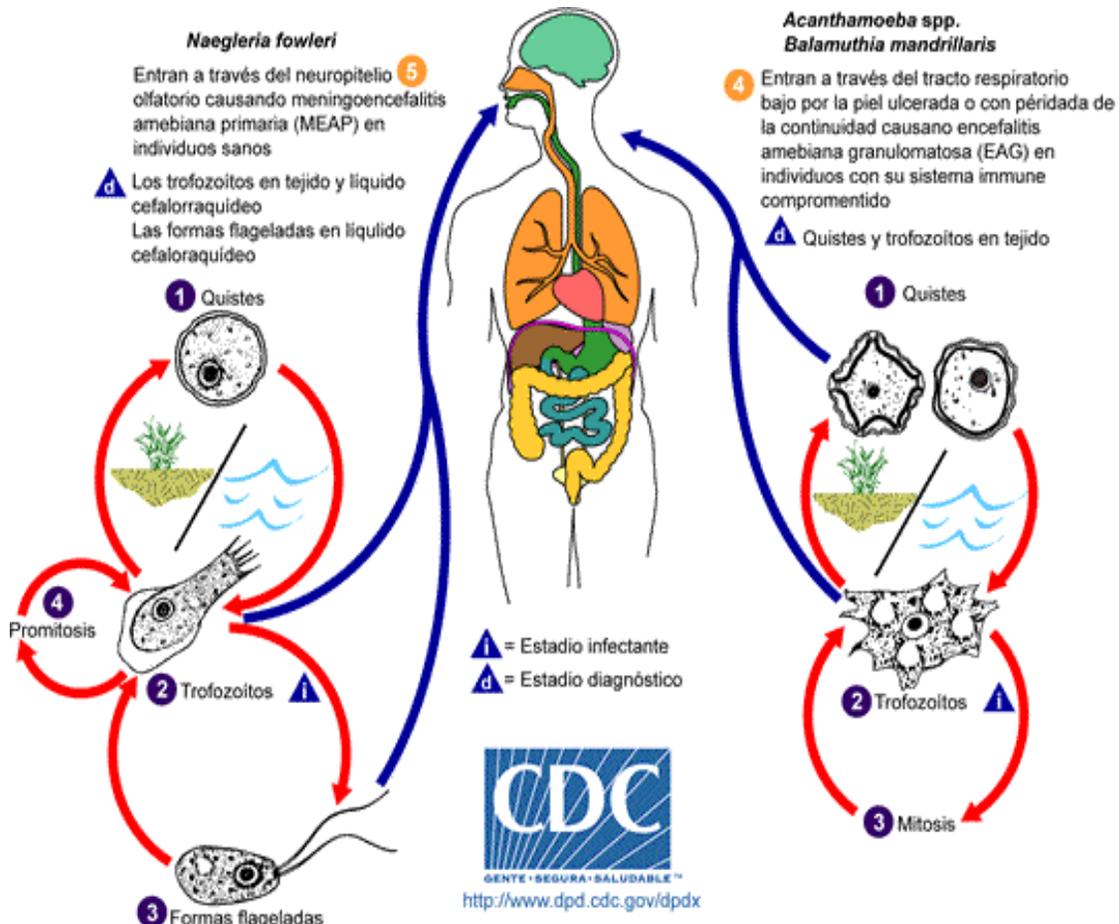


Figura 4. Ciclos de vida, vías de entrada y estadios de *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* y *Acanthamoeba* sp. (CDC, 2004).

Las AVLPP viven en biotopos como agua, sedimento, biopelículas, etc. Un biotopo es el espacio vital cuyas condiciones ambientales son las adecuadas para que en él se desarrolle una determinada comunidad de seres vivos (Haeckel, 1866).

Un factor que favorece la proliferación de AVLPP es la temperatura elevada, por lo que se les encuentra comúnmente en aguas termales naturales y en aguas contaminadas térmicamente por descargas industriales con temperaturas por arriba de los 25 °C (Rondanelli, 1987). Otros parámetros fisicoquímicos del agua que las favorecen son: niveles elevados de oxígeno disuelto, pues son aerobias estrictas, pH cercano a la neutralidad, alimento suficiente (bacterias y materia orgánica particulada) y un mínimo de humedad; sin embargo, pueden soportar variaciones en cualquiera de estos parámetros (Smirnov y Thar, 2003).

2.2. **Sistemas de cenotes de la península de Yucatán, México**

Los cenotes son reservorios de agua o pozos naturales que se abastecen de ríos subterráneos que se forman por la erosión del relieve kárstico, los cenotes son de gran importancia ecológica y cultural para la población que habita en Yucatán, también son la principal fuente de agua potable, para uso humano (Schmitter-Soto, 2002).

Según la clasificación de Hall en 1977, existen cuatro tipos de cenotes, basadas en la forma (Fig. 5): Forma de cántaro, paredes verticales, forma de aguada y forma de caverna.



Figura 5. Tipos de cenotes (Gobierno de Yucatán, 2012).

3. ANTECEDENTES

Las amibas de vida libre potencialmente patógenas se han registrado en varios cuerpos de agua recreativos en el mundo, a pesar de que representan un peligro para la salud de los seres humanos. Su presencia en acuíferos prueba que los microorganismos pueden estar presentes en el agua subterránea y que estos sistemas acuáticos pueden soportar una comunidad microbiológica (Ramírez *et al.*, 2009).

Uno de los primeros estudios de las AVLPP y también de los más completos en México se realizó en la Huasteca Potosina (Gallegos *et al.*, 1997). En esta investigación se reportaron los géneros patógenos *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Hartmannella* y *Vahlkampfia*. El trabajo se complementó con un estudio retrospectivo sobre expedientes de pacientes con meningoencefalitis del Hospital General de Ciudad Valles, entre 1990 y 1993.

Un trabajo más reciente realizado en un sistema de cuevas con agua subterránea fue el realizado por Mulec y colaboradores en el 2016, donde recolectaron muestras de guano en cinco cuevas, e hicieron énfasis en la importancia de éste como biotopo predominante en el establecimiento de AVLPP, además se encontraron ejemplares del género *Acanthamoeba*, descrito como agente oportunista que pueden causar infecciones como la encefalitis amebiana granulomatosa, queratitis y acantamebiosis cutánea, además también obtuvieron registros de géneros como *Naegleria* y la especie *Sappinia diploidea*.

La Gruta "Entrada Dos Cerros" en Tabasco, fue muestreada en el año 2012 con el fin de conocer la comunidad de AVL. Se encontraron diez géneros de organismos amibianos, siendo el género *Acanthamoeba* uno de los que tuvo mayor registro de especies, entre ellas *A. polyphaga* y finalmente se pudo estudiar la microbiota de la gruta y afirmar la presencia de depredadores bacterianos, en este caso las AVL (Zenteno, 2012).

En la zona central de México se realizó un estudio de AVL, en las "Grutas de Tziranda" en Michoacán, las "Grutas de Karmidas" en Puebla y la cueva "La Joya" en Guerrero y se aislaron e identificaron 11 géneros de organismos amibianos; el género más abundante fue *Acanthamoeba* y entre las especies identificadas tres son de importancia médica: *A. castellanii*, *A. culbertsoni* y *A. polyphaga*. Otra especie encontrada en esta tesis con importancia médica fue *Naegleria fowleri*. También se realizó una comparación de biotopos según su riqueza, tanto el biotopo agua como el de suelo resultaron ser los que tenían mayor número de organismos amibianos (Montes, 2012).

Existen algunos otros estudios realizados en ambientes subterráneos, donde se examinaron muestras de pozos de agua potable en los estados de Morelos e Hidalgo (Ramírez *et al.*, 2009, 2012), en ambas investigaciones se encontraron especies de AVLPP, principalmente *Acanthamoeba polyphaga* esto desmintió una hipótesis respecto el agua subterránea, ya que se pensaba que estos ambientes carecían de condiciones para albergar organismos de vida libre. Además, ambos trabajos aportaron información relacionada con la calidad del agua de consumo para los habitantes de ambos estados.

Cuadro 2. Especies de AVLPP en estudios de agua subterránea.

Autor	País	Ambiente*	<i>Acanthamoeba</i> sp.	<i>A. castellanii</i>	<i>A. culbertsoni</i>	<i>A. polyphaga</i>	<i>Naegleria</i> sp.	<i>N. fowleri</i>	<i>Sappinia diploidea</i>
Ramírez <i>et al.</i> , 2009	México	Agua subterránea	-	-	-	X	-	-	-
Ramírez <i>et al.</i> , 2012	México	Agua subterránea	-	-	-	X	-	-	-
Zenteno, 2012	México	Grutas	-	X	-	X	-	-	-
Montes, 2012	México	Cuevas	-	X	X	X	-	X	-
Mulec <i>et al.</i> , 2016	Eslovenia	Cuevas	X	-	-	-	X	-	X

* Se tomo tal cual lo nombra cada estudio. (X representa presencia y - representa ausencia).

4. JUSTIFICACIÓN

En el estado de Yucatán no existen pruebas de calidad del agua de cenotes que busquen amibas de vida libre potencialmente patógenas. Debido a que no hay ríos ni lagos superficiales que abastezcan de agua para uso humano en esta zona, los cenotes y otras fuentes de agua subterránea, abastecen al estado de este vital líquido (Hall, 1977). El posible hallazgo de amibas en estos acuíferos contribuiría al conocimiento de la calidad del agua subterránea, ya que los estudios biológicos de los protozoos son escasos (Ramírez *et al.*, 2009). Las AVLPP pueden ser un riesgo para la salud humana en caso de ser encontradas en estos sitios, por ello es importante realizar una investigación para determinar su presencia, pues todos los usuarios tienen contacto directo (cutánea, ocular, mucosas, etc.) con el agua de los cenotes.

5. OBJETIVOS

5.1. **Objetivo general**

- Estudiar la comunidad de amibas potencialmente patógenas en agua, sedimento y biopelículas de tres sistemas de cenotes (Tzabnáh, X-Batún y D-Zombakal) del estado de Yucatán, México.

5.2. **Objetivos particulares**

- Aislar y cultivar amibas potencialmente patógenas a partir de muestras de agua, sedimento y biopelículas.
- Identificar taxonómicamente por medio de sus características morfológicas a las AVLPP presentes en los biotopos muestreados.
- Determinar y comparar la riqueza específica de las AVLPP obtenida por biotopo, zona y cenote.
- Relacionar los factores fisicoquímicos del agua medidos “*in situ*” (temperatura, conductividad, pH) con la presencia AVLPP.

6. ÁREA DE ESTUDIO

La península de Yucatán (Fig. 6) es una plataforma calcárea su evolución geológica ha generado una alta heterogeneidad ambiental, lo que ha favorecido el establecimiento de una riqueza ambiental y biológica que caracteriza a esta zona (Pech *et al.*, 2010).

La elevada temperatura atmosférica media anual (mínima de 26 y máxima de 36 °C), el alto índice de precipitación (1 100 mm anuales), y la salinidad del agua junto con la estructura geomorfológica del estado, le confiere a esta zona marina y costera una alta heterogeneidad ambiental. Estas condiciones permiten la presencia de gran diversidad de hábitats como son los sustratos blandos fangosos y arenosos, praderas de pastos marinos y/o macroalgas, sustratos duros de origen calcáreo, ojos de agua, cenotes, entre otros (Pech *et al.*, 2010).

Muchos cenotes en el norte de la península se encuentran a lo largo de un semicírculo, conocido como el anillo de cenotes, que está centrada en Chicxulub (Marín *et al.*, 1990). Se ha propuesto que esta distribución de cenotes está asociada con el cráter de impacto de Chicxulub (Sharpton *et al.*, 1993). La densidad de cenotes a lo largo del anillo varía entre uno y unos pocos cenotes por kilómetro (Marín *et al.*, 1990).



Figura 6. Ubicación del estado Yucatán en la República Mexicana (resaltado en color azul).

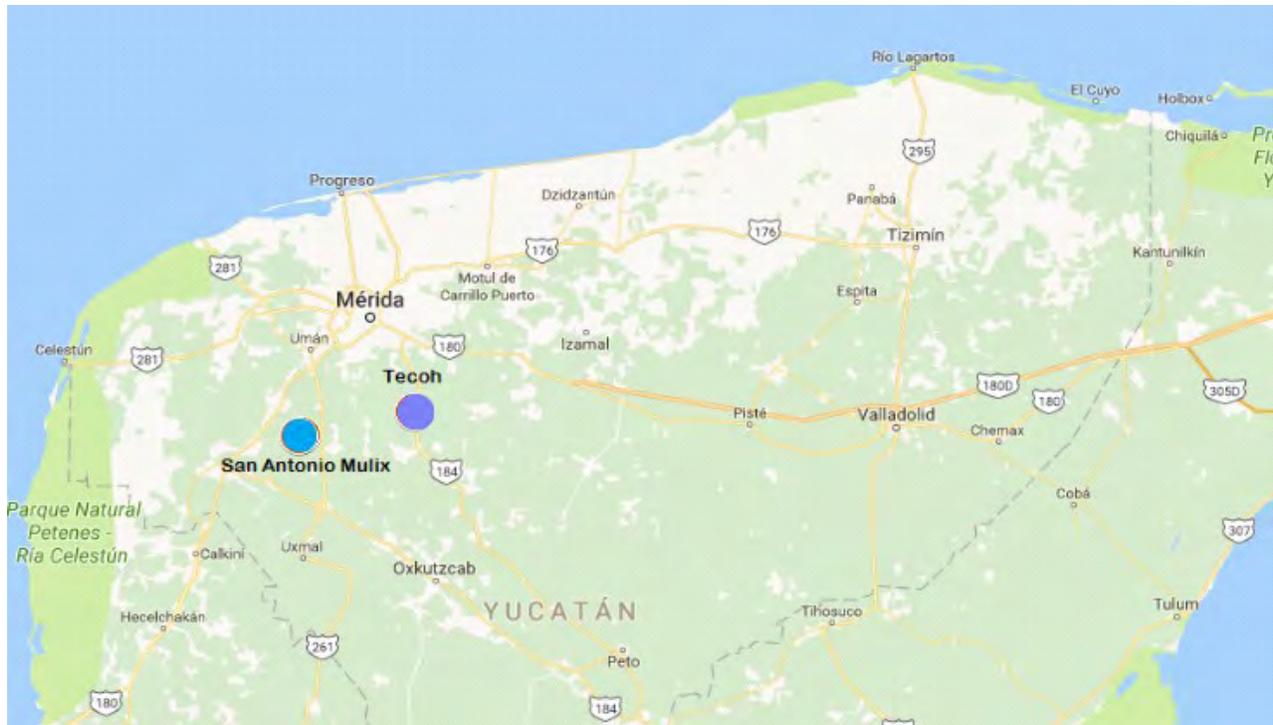


Figura 7. Localidades muestreadas, Tecoh (morado), San Antonio Mulix (azul) (Google maps, 2018).

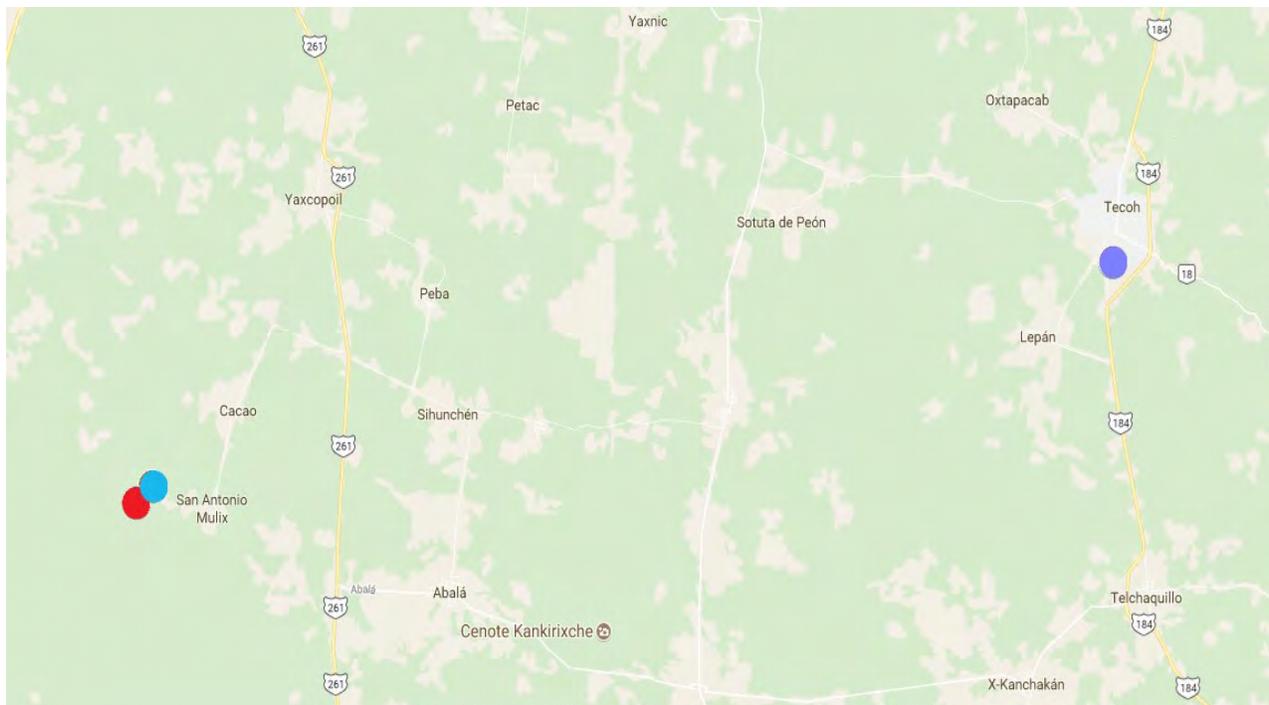


Figura 8. Acercamiento de la ubicación de los cenotes muestreados, (morado) Tzabnáh (TZ), (azul) X- Batúm (XB) y (rojo) D-Zombakal (DZ) (Google Maps, 2018).

6.1. Sistema de cenotes Tzabnáh

En el municipio de Tecoh se encuentra la localidad Tecoh (Figs. 7 y 8), su latitud es 20°43'49.6" y su longitud es 89°28'28.5"

Las grutas de Tzabnáh se formaron hace millones de años por la filtración de agua de lluvia que penetró en la tierra, ocasionando el colapso del techo de la gruta. En esta gruta se encuentran 13 cenotes (SEDUMA, 2012a) (Figs. 9 y 10).

Estos cenotes se encuentran 17 m bajo tierra y todos poseen forma de caverna, a excepción del décimo que tiene forma de cántaro (Hall, 1977).

Los cuerpos de agua tienen ausencia de luz, menos el décimo que tiene una pequeña abertura en el techo por donde entra un haz de luz. Las temperaturas dentro de la gruta llegan a alcanzar 35 °C, en época de lluvia la profundidad de los cenotes aumenta debido a que tiene dos entradas por donde el agua se filtra (SEDUMA, 2012a).

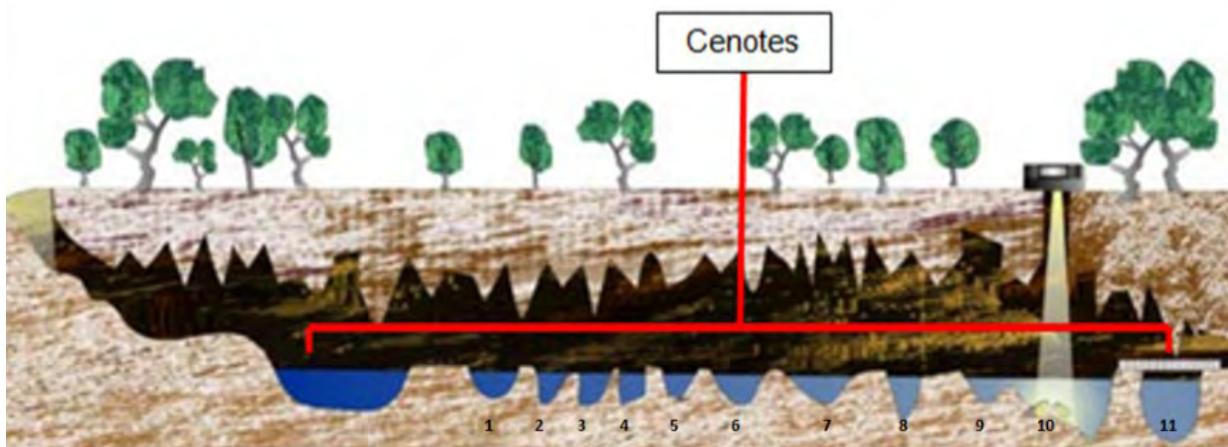


Figura 9. Numeración de los cenotes muestreados en el sistema Tzabnáh, Tecoh (Imagen modificada de SEDUMA, 2012a)

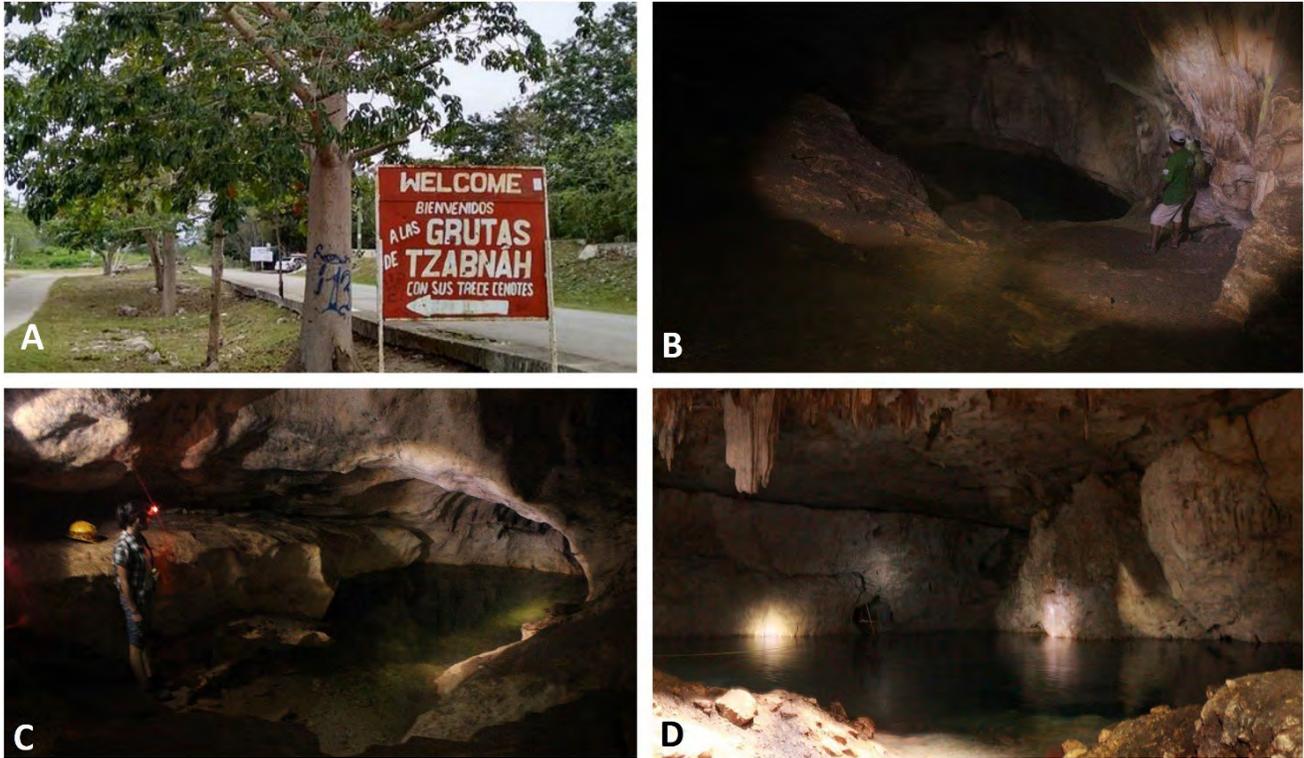


Figura 10. Fotografías de: Entrada de sistema “Grutas Tzabnáh” (A), Cenote dos (B), Cenote tres (C), Cenote diez (D).

6.2. Sistema de cenotes X-Batún

En el municipio Umán se encuentra la localidad San Antonio Mulix (Figs. 7 y 8), su latitud es 20°40’39.1” y longitud es 89°46’37.4”.

El cenote X-Batún, tiene una entrada con paredes verticales y su forma corresponde a una caverna (Figs. 11, 12 y 13) (Hall, 1977). Mide 5 m de largo y 25 m de ancho, con una profundidad máxima de 20 m (SEDUMA, 2012b). El cenote X-Batún, tiene entrada de luz directa y una gran diversidad de flora y fauna; en este cenote las raíces de árboles que están en la parte superior tocan el agua, también cuenta con una zona de tierra “negra”, donde hay grandes cantidades de plantas y despiden un olor azufroso.

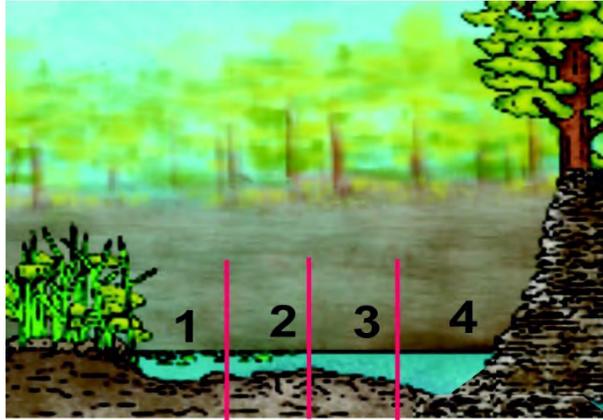


Figura 11. Representación del cenote X-Batún. Puntos de recolecta indicados con números (imagen modificada de Experiencias Xcaret, 2017).



Figura 12. Fotografía de la zona 5 del sistema X-Batún, madera con biopelícula.



Figura 13. Fotografías de: Foto panorámica del sistema X-Batún (A), Zona 1 sistema X-Batún (B), Paredes verticales con cuerpo de agua (C), Paredes verticales con raíces (D).

6.3. Sistema de cenotes D-Zombakal

En el municipio Umán se encuentra la localidad San Antonio Mulix, su latitud es 20°40'11.5" y su longitud: 89°46'42.8".

El cenote D-Zombakal, tiene forma de caverna (Figs.14 y 15) (Hall, 1977). El cenote mide 25 m de largo por 15 m de ancho, con una profundidad mínima de 0.30 m y una máxima de 30 m. En este cuerpo de agua la luz entra parcialmente. El cenote tiene presencia de murciélagos cuya defecación cae directamente en el cuerpo de agua (SEDUMA, 2012c).

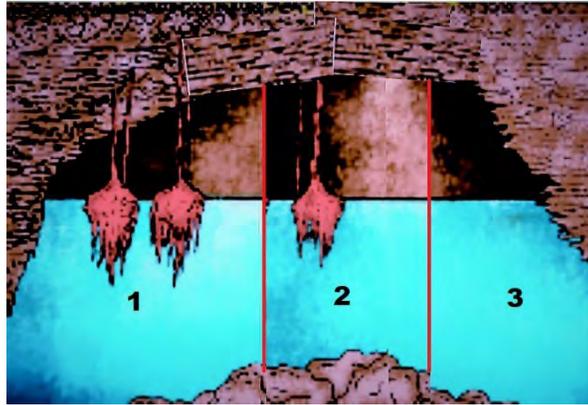


Figura 14. Representación del cenote D-Zombakal. Zonas donde se midieron parámetros fisicoquímicos.



Figura 15. Fotografías de A. Zona este de D-Zombakal, B. Techo del sistema con guano, C. Sustrato del sistema, D. Zona oeste de D-Zombakal.

7. MÉTODOS

7.1. Trabajo de campo

El muestreo se llevó a cabo del 23 al 24 de enero del 2016. En Tzabnáh, los 13 cenotes fueron numerados durante el muestreo de un modo distinto al que le asignan los pobladores y administradores del lugar, esto debido, a que dos de ellos fueron imposibles de muestrear por obstrucción física y profundidad (Fig. 9). Con ayuda de la espeleóloga de la Escuela Nacional de Antropología e Historia, Natalia Quintanilla y el guía Manuel García, en el cenote uno se recolectaron muestras de agua (A), sedimento (S) y biopelícula flotante (BF); en el segundo y tercer cenote se recolecto agua y sedimento; en el cenote cuatro se recolecto agua, sedimento y dos tipos de biopelícula flotante; en el cenote cinco solo se muestreo agua; del cenote seis se obtuvo muestra de agua, sedimento y biopelícula adherida a roca (BR), en el cenote siete solo se muestreo agua y sedimento; en el cenote ocho las muestras obtenidas fueron de agua y dos tipos de sedimentos, el cenote nueve tuvo tres tipos de muestra agua, sedimento y biopelícula flotante, del cenote diez se obtuvo muestra de agua solamente; las muestras 11 y 12 (M1 y M2) fueron combinaciones de agua y sedimento, debido a que los frascos de recolecta se agotaron y finalmente la muestra 13 se tomó de una charca entre los últimos cenotes, de éste se obtuvo agua y sedimento (CHM).

Para mejorar la exactitud en cuanto a la recolección de muestras, el cenote X-Batún se dividió en cinco zonas, debido a que la superficie era muy larga. En la zona uno se recolectaron muestras de los biotopos agua (A), sedimento (S), biopelícula adherida a roca (BR), a raíz (BRa) y a una planta (BP); la zona dos tuvo muestras de agua, dos tipos de sedimento y biopelículas flotantes (BF), adheridas a roca y a raíz; en la zona tres se obtuvo muestra de agua, dos muestras de sedimento, biopelícula adherida a roca y a raíz; la zona cuatro tuvo los biotopos agua, dos tipos de sedimento, dos biopelículas diferentes de roca y una de raíz; finalmente de la zona cinco solamente fue muestreada biopelícula adherida a madera (BM).

En el caso del cenote D-Zombakal se realizó la misma metodología que en X-Batún, para mayor exactitud se dividió el cenote en 20 zonas de muestreo, las 20 muestras fueron del biotopo agua, debido a que la profundidad no permitió tomar muestras de sedimento, y las zonas con sedimento menos profundo no se podía raspar o recolectar, era demasiado compacto.

Todas las muestras sólidas se recolectaron en tubos de centrifuga estériles de 50 ml y las muestras de agua se recolectaron en frascos de 500 ml estériles.

Con el fin de comprobar si hay una relación de los factores fisicoquímicos del agua y la presencia de amibas potencialmente patógenas se realizó la medición *in situ* de: temperatura (°C), pH, conductividad (mS/cm) con un tester digital HANNA modelo HI 98129.

7.2. Trabajo de laboratorio

7.2.1. Aislamiento y cultivo de amibas de vida libre

Se transportaron las muestras al laboratorio de Patógenos Emergentes, donde se realizaron preparaciones para tener una primera observación y registro de los organismos amibianos que se pudieran encontrar tanto enquistados como en su estadio de trofozoíto o en alguna forma flotante. Posteriormente se corroboraron estas observaciones en cultivos.

Las muestras se concentraron por centrifugación a 1 000 rpm durante 10 min de acuerdo con el procedimiento propuesto por De Jonckheere (1984), de cada muestra de agua, biopelícula y sedimento se tomaron aproximadamente 15 ml. En el caso de muestras con biopelícula y sedimento se tuvieron que pesar previamente debido a su variabilidad, esto con la finalidad de tener un peso similar en las muestras y así evitar descalibrar la centrífuga.

Se desechó el sobrenadante de los centrifugados y posteriormente el sedimento fue resuspendido, se agregaron tres gotas de cada muestra en placas de agar no nutritivo (NNE) previamente adicionado con una ligera capa de *Enterobacter aerogenes* inactivado por calor. Se colocó la misma cantidad de muestra en placas de cultivo celular con medio líquido con solución Prescott-James y en placas de Petri con medio semisólido (medio NNE adicionado con solución Prescott-James). Posteriormente se colocaron las cajas en la incubadora a 37 °C.

La observación de las placas de medio no nutritivo (NNE), medio semisólido y medio líquido se realizó con un microscopio invertido de contraste de fases Nikon (Eclipse TS100), con aumentos de 10, 20 y 40X, para detectar el crecimiento amibiano.

7.2.2. Clonación

En las placas de medio NNE donde se observó crecimiento amibiano con un morfotipo similar entre ejemplares, se marcó la zona de mayor abundancia y se cortó un cuadro de agar de aproximadamente 5 mm² con ayuda de un bisturí estéril para transferirlo a otra placa de agar NNE nueva, se incubó de nuevo a 37 °C hasta observar crecimiento amibiano y posteriormente se

almacenó a temperatura ambiente en posición invertida dentro de bolsas de plástico para evitar su desecación, cada caja se etiquetó según el sitio de muestreo.

7.2.3. **Identificación morfológica y registro fotográfico**

La identificación de los aislados amibianos se realizó tomando en cuenta los criterios morfológicos de los quistes y trofozoítos mediante el uso de las claves taxonómicas de Page (1988) y Pussard y Ponds (1977). Posteriormente se tomó un registro fotográfico con una cámara Nikon (coolpix990).

Se realizaron preparaciones en fresco de las amibas aisladas en laminillas y se observaron en un microscopio de contraste de fases a un aumento de 40X. De cada aislado se registró la medida de 50 trofozoítos (largo y ancho) y 50 quistes (diámetro o largo y ancho si era el caso).

7.2.4. **Análisis ecológicos**

Los análisis ecológicos se llevaron a cabo con el software estadístico R versión 3.5.0. Se realizó un análisis de clusters modo Q y R usando distancia Euclidiana y el método de agrupación “complete”. El propósito de los análisis de clusters es determinar la existencia de grupos ecológicamente similares. El tipo de análisis utilizado se eligió por su capacidad para delimitar grupos separados basados en las especies registradas para cada uno de los sitios. Este análisis se usa comúnmente con abundancias relativas, sin embargo, para el presente trabajo solo se realizó con presencia-ausencia.

Posteriormente se realizó un análisis de componentes principales (PCA), para observar la relación de las variables ambientales de los sitios con la presencia de AVLPP, esto se realizó con los datos obtenidos de las mediciones in situ. Para finalizar, se utilizó un análisis de correspondencia sin tendencia (DCA), para determinar si algún biotopo muestra mayor afinidad a la proliferación de AVLPP (Legendre y Legendre, 1998).

8. RESULTADOS

De las 51 muestras recolectadas en los sistemas de cenotes Tzabnáh, X-Batún y D- Zombakal se lograron identificar un total de 20 especies de AVL, de las cuales, ocho especies son AVLPP. Los géneros identificados a los cuales pertenecen estas ocho especies son: *Acanthamoeba*, con seis especies *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. lugdunensis*, *A. polyphaga*, *A. triangularis*; *Sappinia*, con una especie, *Sappinia diploidea* y el último género encontrado fue *Naegleria*, con las especies *N. fowleri* y *N. gruberi*, sin embargo, esta especie no se tomó en cuenta con potencial patógeno para

seres humanos, ya que sigue en discusión si tiene importancia médica humana. En adelante sólo se hará referencia a las especies con potencial patógeno, por ser el objeto de estudio del presente trabajo.

8.1. Descripción de las especies y registro fotográfico

En cada una de las especies de AVLPP se incluye una breve descripción basada en la morfología de los quistes y trofozoítos, además de las medidas aproximadas de cada una de las especies encontradas y comparadas con claves taxonómicas. Además de fotografías de los quistes y de algunos de los trofozoítos encontrados.

Acanthamoeba astronyxis (Ray y Hayes, 1954)

Exoquiste generalmente rugoso, endoquiste en forma estrellada. La mayoría de los brazos del endoquiste están en contacto estrecho con el exoquiste. Aproximadamente nueve brazos, tiende a medir entre 17.22–22.14 μm (Figs. 16 y 17).

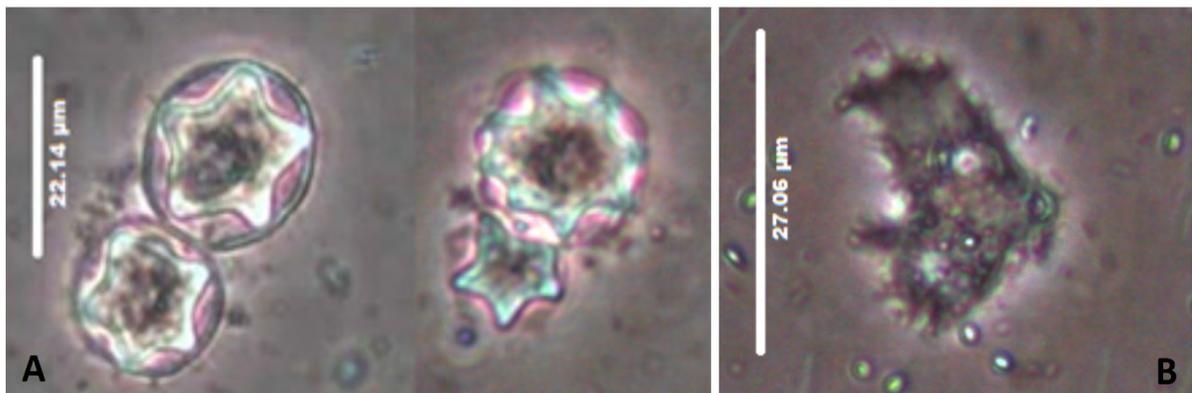


Figura 16. (A) Fotografías de quistes y (B) trofozoíto de *Acanthamoeba astronyxis*, en microscopio invertido de contraste de fases, 40X.

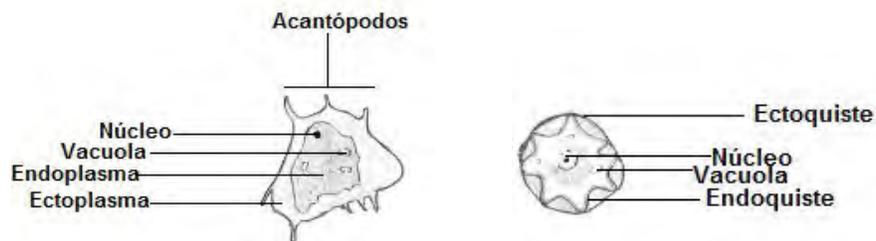


Figura 17. Esquemas de trofozoíto y quiste de *Acanthamoeba astronyxis*.

Acanthamoeba castellanii (Douglas, 1930)

Endoquiste a veces estrellado. Exoquiste grueso, rugoso, de forma poligonal en ocasiones esférica u ovoide. Generalmente con un diámetro menor a 18 μm (Figs. 18 y 19).

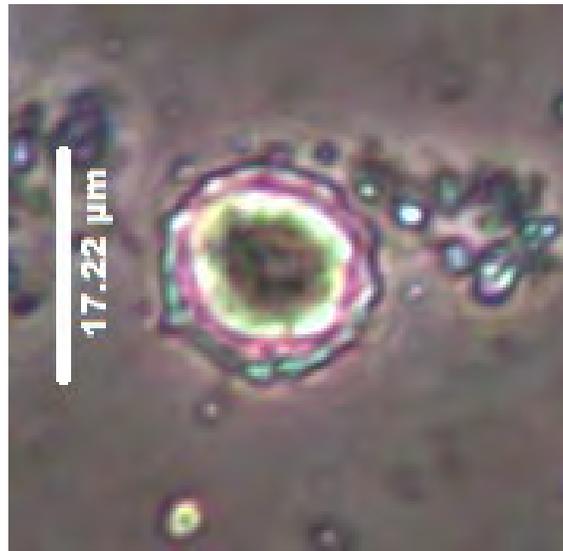


Figura 18. Fotografía de quiste de *Acanthamoeba castellanii*, en microscopio invertido de contraste de fases, 40X.

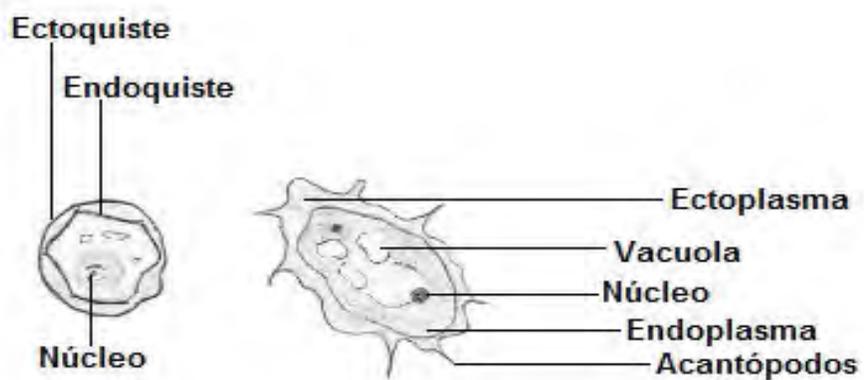


Figura 19. Esquemas de quiste y trofozoíto de *Acanthamoeba castellanii*.

Acanthamoeba culbertsoni (Singh y Das, 1970)

Pared del exoquiste muy delgada, ondulada y rugosa, cercano al endoquiste usualmente redondeado, ocasionalmente en forma poligonal. Mide aproximadamente de 15-18 μm (Figs. 20 y 21).

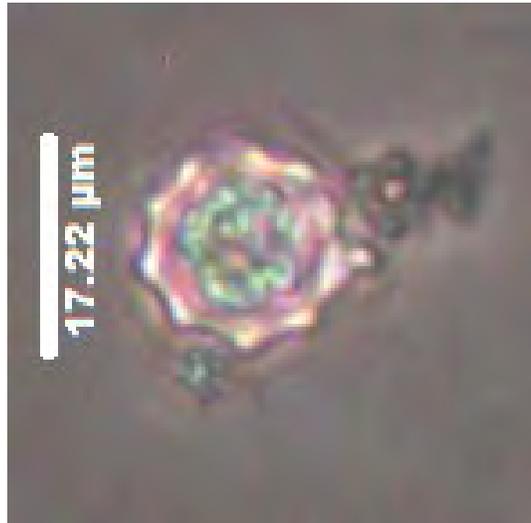


Figura 20. Fotografía de quiste de *Acanthamoeba culbertsoni*, en microscopio invertido de contraste de fases, 40X.

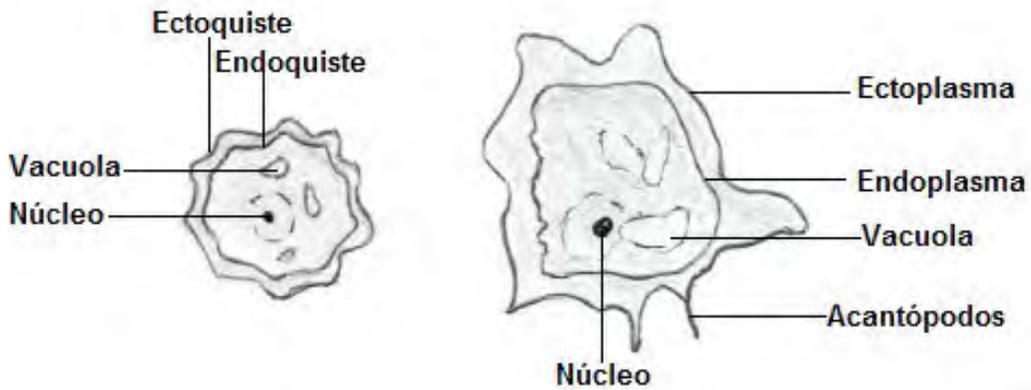


Figura 21. Esquemas de quiste y trofozoíto de *Acanthamoeba culbertsoni*.

Acanthamoeba lugdunensis (Pussard y Pons, 1977)

Quiste no reticulado, endoquiste con forma poliédrica con tendencia forma esférica, exoquiste pegado a endoquiste. Mide aproximadamente 14 μ m (Figs, 22 y 23).

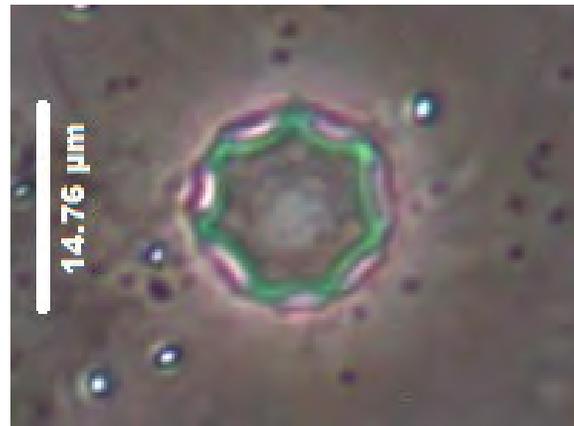


Figura 22. Fotografía de quiste de *Acanthamoeba lugdunensis*, en microscopio invertido de contraste de fases, 40X.

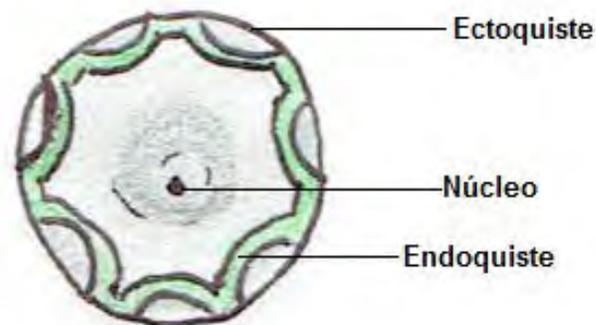


Figura 23. Esquemas de quiste *Acanthamoeba lugdunensis*.

Acanthamoeba polyphaga (Puschkarev, 1913)

Endoquiste irregular, prácticamente nunca estrellado, exoquiste delgado y separado del endoquiste, de forma esférica y en ocasiones ovoide, número de brazos de 4-6, llega a medir 14 μm (Figs. 24 y 25).

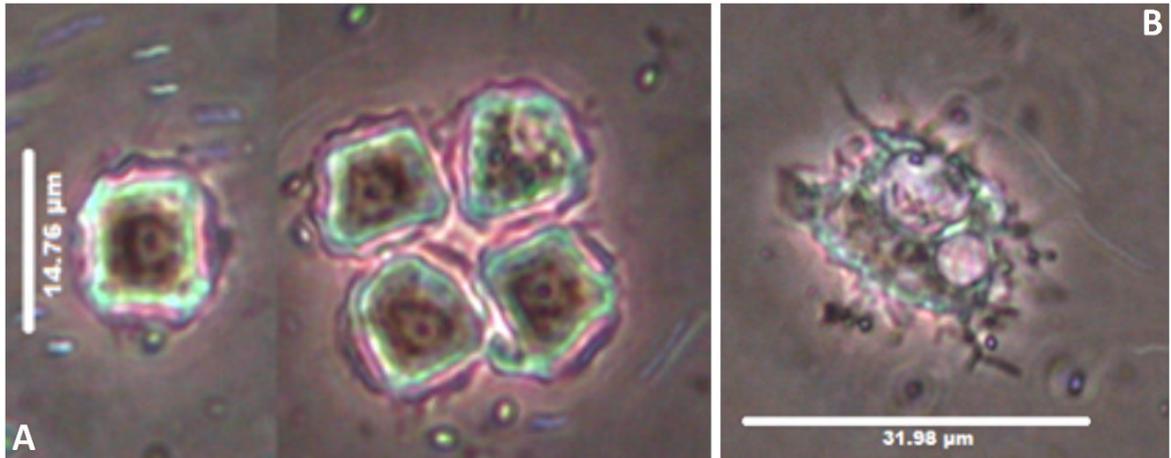


Figura 24. (A) Fotografía de quistes y (B) trofozoíto de *Acanthamoeba polyphaga*, en microscopio invertido de contraste de fases, 40X.

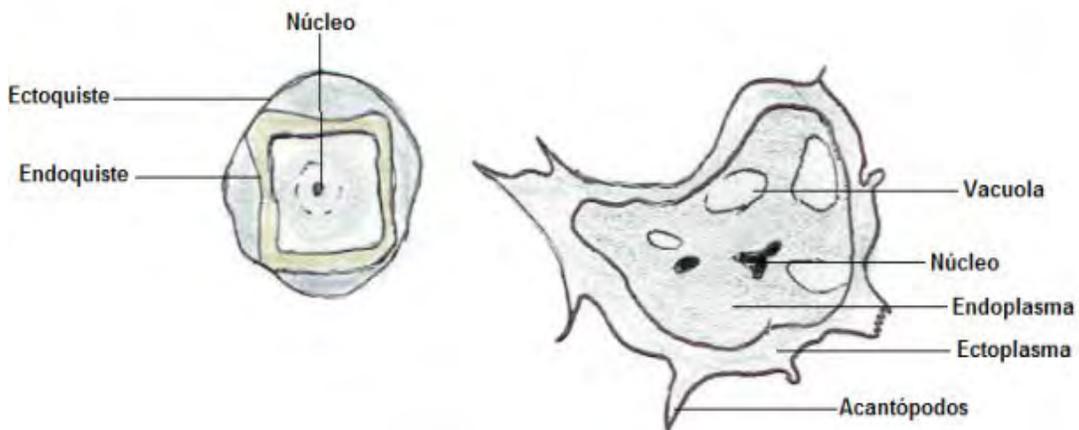


Figura 25. Esquemas de quiste y trofozoíto de *Acanthamoeba polyphaga*.

Acanthamoeba triangularis (Pussard y Pons, 1977)

Exoquiste esférico u ovoide, endoquiste generalmente triangular a veces cuadrado, aproximadamente mide 13 μ m (Figs. 26 y 27).

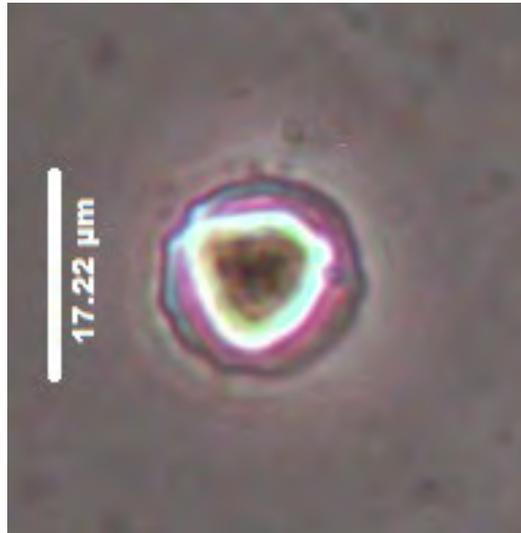


Figura 26. Fotografía de quistes de *Acanthamoeba triangularis*, en microscopio invertido de contraste de fases, 40X.

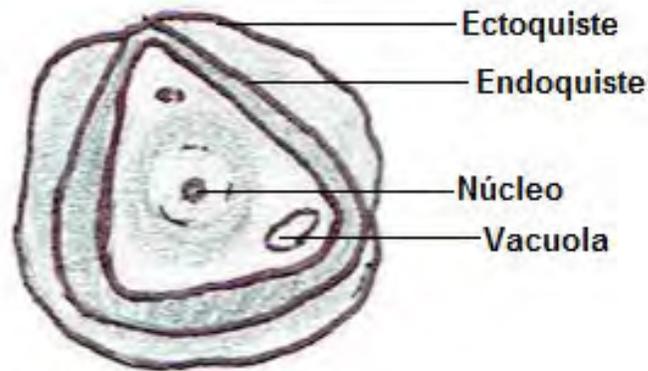


Figura 27. Esquemas de quiste y trofozoíto de *Acanthamoeba triangularis*.

Naegleria fowleri (Carter, 1970)

Quiste totalmente liso, núcleo centrado, tiene un diámetro aproximado de 7-15 μm . Presenta fase ameboflagelar (Figs. 28 y 29).

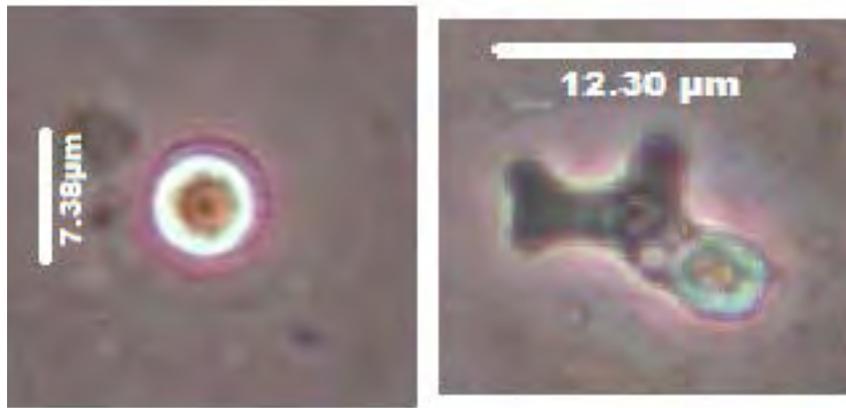


Figura 28. (A) Fotografía de quiste y (B) trofozoítos de *Naegleria fowleri*, en microscopio invertido de contraste de fases, 40X.

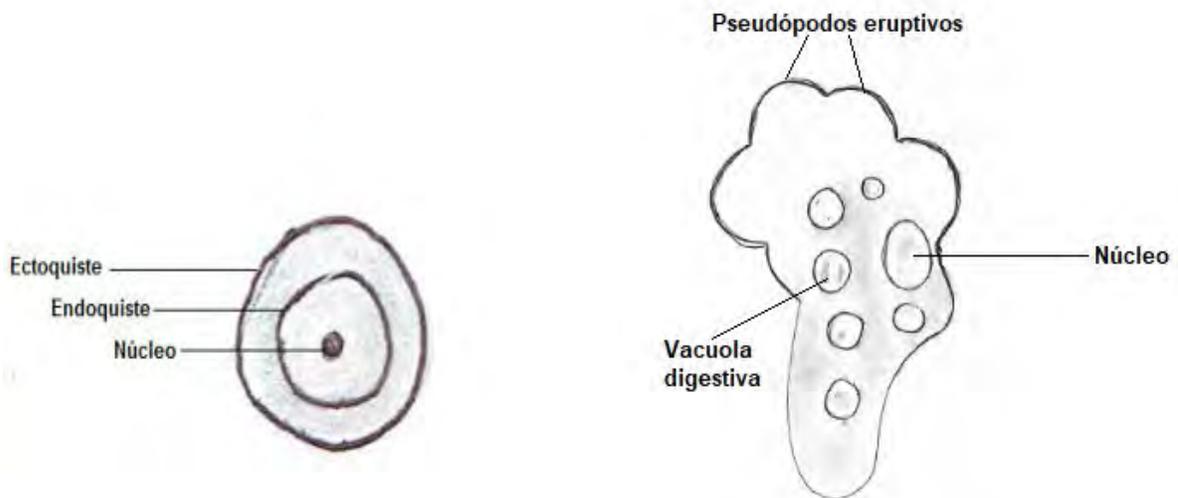


Figura 29. Esquemas de quiste y trofozoíto de *Naegleria fowleri*.

Sappinia diploidea Alexeieff 1912 ex Hartmann y Nägler, 1908

Quiste liso, presenta de dos a tres núcleos generalmente, mide aprox. 15–30 μm (Figs. 30 y 31).



Figura 30. Fotografía de quiste de *Sappinia diploidea* en microscopio invertido de contraste de fases, 40X.

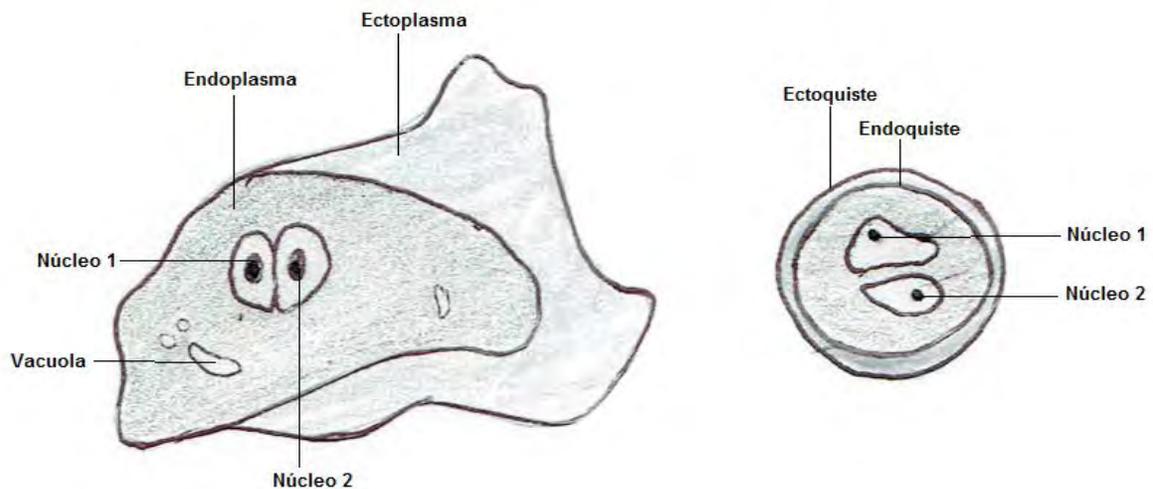


Figura 31. Esquemas de quiste y trofozoíto de *Sappinia diploidea*.

8.2. Posición taxonómica

La clasificación de las AVLPP encontradas en los cenotes Tzabnáh, X-Batún y D-Zombakal; se realizó de acuerdo con el esquema propuesto por Adl *et al.*, 2012 el cual hace énfasis principalmente en los protistas e incorpora información de estudios moleculares y filogenéticos realizados en los últimos años. Después del nombre de cada especie se muestra la simbología, entre paréntesis y negritas, que se usará en toda la tesis para citar los nombres de cada una.

Supergrupo: Amoebozoa Lühe 1913, emend. Cavalier-Smith 1998

● Discosea Cavalier-Smith *et al.*, 2004

●● Longamoebia Cavalier-Smith y Smirnov en Smirnov *et al.*, 2011

●●● Centramoebida Rogerson y Patterson 2002, emend. Cavalier-Smith, 2004

Acanthamoeba polyphaga (Puschkarev, 1913) **(APO)**

Acanthamoeba culbertsoni (Singh y Das, 1970) **(ACU)**

Acanthamoeba astronyxis (Ray y Hayes, 1954) **(AAS)**

Acanthamoeba castellanii (Douglas, 1930) **(ACA)**

Acanthamoeba lugdunensis (Pussard y Pons, 1977) **(ALU)**

Acanthamoeba triangularis (Pussard y Pons, 1977) **(ATR)**

●●● Thecamoebida Schaeffer, 1926

Sappinia diploidea Alexeieff 1912 ex Hartmann y Nägler, 1908 **(SAD)**

Supergrupo: Excavata Cavalier-Smith 2002, emend. Simpson 2003

● Discoba Simpson en Hampl *et al.*, 2009(R)

●● Discicristata Cavalier-Smith 1998

●●● Heterolobosea Page y Blanton 1985

●●●● Tetramitida Cavalier-Smith 1993, emend. Cavalier-Smith en Cavalier-Smith y Nikolaev, 2008

Naegleria fowleri (Carter, 1970) **(NAFO)**

8.3. Riqueza específica de AVLPP en los tres sistemas de cenotes

El biotopo con mayor abundancia y diversidad en el sistema Tzabnáh fue el sedimento, como se puede observar en el cuadro 3, el sedimento del cenote 3, mostró mayor diversidad de AVLPP, mientras que los biotopos menos ricos en especies son las biopelículas. Además, la especie *Acanthamoeba polyphaga*, fue la que se encontró con mayor frecuencia en todo el sistema, seguidas de la especie *Acanthamoeba culbertsoni*.

Cuadro 3. Especies de AVLPP en cada biotopo, sistema Tzabnáh

Especies amibianas	Cenote	Biotopo												Total																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																	
		A	S	BF	A	S	A	S	A	S	BF1	BF2	A	A	S	BR	A	S	A	S1	S2	A	S	BF	A	M1	M2	CHM		
AAS		-	-	-	-	X	-	X	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
ACA		-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	
ACU		-	-	-	X	X	X	X	-	X	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	8	
ALU		-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X	-	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	
APO		X	X	-	-	X	-	X	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-	-	X	-	-	-	-	-	X	9	
ATR		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
NAFO		-	-	-	-	-	X	X	-	X	X	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	X	7	
SAD		X	-	-	-	X	-	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	
Total		2	1	0	1	4	1	7	0	4	1	4	3	4	1	1	0	1	1	2	1	0	2	0	0	0	0	2		

El sistema X-Batún tuvo gran variedad de biotopos (sedimento, agua, biopelículas flotantes, adheridas a rocas, raíces, plantas y madera). Los biotopos con mayor riqueza en especies de AVLPP fueron las biopelículas especialmente las adheridas en rocas. Al igual que en el sistema anterior, la especie *Acanthamoeba polyphaga* predomina, seguida de la especie *Acanthamoeba castellanii* (Cuadro 4).

Cuadro 4. Especies de AVLPP en cada biotopo, sistema X-Batún

Especies amibianas	Zona	1					2					3					4					5	Total	
	Biotopo	A	S	BR	BRa	BP	A	S1	S2	BF	BR	BRa	A	S1	S2	BR	Bra	A	S1	S2	BR1	BR2		BM
AAS	-	-	X	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	X	-	-	-	-	X	X	-	6	
ACA	-	X	X	-	-	-	X	-	-	X	X	-	-	-	X	-	-	-	-	X	X	-	8	
ACU	-	X	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	X	-	6	
ALU	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
APO	-	X	X	-	-	X	X	-	-	X	X	-	-	-	X	-	-	-	X	X	X	-	9	
ATR	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
NAFO	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
SAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
Total		0	5	4	0	0	1	2	0	0	4	4	0	0	0	4	0	0	0	0	4	4	0	

En el cenote D-Zombakal no se encontraron AVLPP, el biotopo muestreado en este sistema fue agua, y no contó con presencia de ninguna especie (Cuadro 5).

Cuadro 5. Especies de AVLPP en cada biotopo, sistema D-Zombakal

Especies amibianas	Zona	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	Biotopo	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
AAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ALU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
APO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ATR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NAFO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Al comparar lo registrado en todos los biotopos por cenote o zona, se puede observar que hubo diferencias respecto la riqueza específica de especies encontradas. El sistema Tzabnáh tuvo los dos cenotes más diversos, cenote tres (TZ3) y cenote cuatro (TZ4), con siete especies distintas de AVLPP;

8.4.1. Tzabnáh

Los cenotes muestreados y medidos en la gruta Tzabnáh registraron un pH neutro o ligeramente básico; la temperatura del agua osciló entre los 27 y 28 °C; mientras los datos de conductividad mostraron variación, cuatro eran menores a los datos descritos para sistemas kársticos, mientras que seis fueron más elevados que el límite de conductividad para agua de sistemas kársticos (Cuadro 7). Normalmente los cuerpos de agua subterránea en sistemas kársticos tienen valores de conductividad que oscilan entre los 0.6 y 0.8 mS/cm (Bibiano *et al.*, 2015).

Cuadro 7. Parámetros fisicoquímicos del agua del sistema de cenotes Tzabnáh*.

Cenote	pH	Temperatura (°C)	Conductividad (mS/cm)
1	7.7	28	1.09
2	8.3	27	0.48
3	8.4	27	0.5
4	7.8	27	0.58
5	8.0	28	0.59
6	8.1	28	0.6
7	8.1	28	0.8
8	7.8	28	1.1
9	7.4	27	1.1
10	7.7	27	1.1
11-M1	7.8	27	1.1
11-M2	7.5	27	1.1

*Las mediciones de los parámetros fisicoquímicos correspondientes al cenote 11, se hicieron en dos puntos debido a la superficie que abarcaba, en los puntos 12 y 13 no se pudo realizar la medición de estos parámetros.

8.4.2. X-Batún

La temperatura del sistema X-Batún, es menor en comparación del sistema Tzabnáh; esto puede explicarse por su recambio constante con el agua subterránea de su caverna. La conductividad es más elevada que en todos los sitios de muestreo, el sedimento de este sistema es de color blanco/grisáceo, característica de los sedimentos que contienen elevadas cantidades de sales y carbonatos; además por los valores que se encontraron de pH (<8.3) se puede saber que su forma dominante de carbonato inorgánico es el bicarbonato, es probable que exista una mezcla con agua del mar en este sistema, puesto que aproximadamente el 87 % del carbón inorgánico del

agua marina es bicarbonato; estos factores pueden estar causando la conductividad sea mayor a la que se registró en el sistema Tzabnáh.

Las zonas del sistema X-Batún registraron un pH neutro o ligeramente básico; la temperatura predominante fue de 26 °C; mientras los datos de conductividad fueron más elevados que en los cenotes de Tzabnáh (Cuadro 8), y rebasan los valores descritos para agua de sistemas kársticos.

Cuadro 8. Parámetros fisicoquímicos del agua del sistema X-Batún

Zona	pH	Temperatura (°C)	Conductividad (mS/cm)
1	7.8	26	1.8
2	8.0	25	1.9
3	7.4	26	2
4	7.4	26	2
5*	0	0	0

*En la zona 5, no se pudo realizar la medición de parámetros fisicoquímicos.

En este sistema, la temperatura es menor que en los dos sistemas anteriores, y su recambio de agua subterránea de la caverna tiene mayor profundidad que la caverna de X-Batún. El pH de este sistema fue de 7.8 en las 20 zonas. Por otro lado, la conductividad tuvo valores más altos que en el sistema X-Batún, y se pudo observar hacia el fondo del sistema que había gran cantidad de carbonatos y sales. La presencia de guano en este sistema pudo afectar el pH y la conductividad.

8.4.3. D-Zombakal

En el sistema D-Zombakal el pH fue básico casi neutro (7.8); la temperatura de 23 °C, y la conductividad (2.1 mS/cm), ésta es mayor a los valores de agua subterránea para sistemas kársticos, sin embargo, es similar a la del sistema X-Batún. Las 20 zonas tuvieron los mismos valores de pH, temperatura y conductividad.

8.5. Análisis ecológicos

8.5.1. Análisis de clúster Q-mode sistemas Tzabnáh y X-Batún

En este análisis se formaron tres grupos (Fig. 32). El primer grupo está conformado por las muestras con mayor riqueza, en éstas predominan los biotopos: biopelícula y sedimento. Todas las muestras de biopelículas pertenecen al sistema X-Batún, mientras que las de sedimento en su mayoría son del sistema Tzabnáh, sin embargo, podemos encontrar una del sistema X-Batún. De las muestras de este grupo la muestra con mayor riqueza específica es TZ3S, con siete especies de las ocho encontradas, la siguiente muestra más rica es también del biotopo sedimento, pero del sistema X-Batún, XBS1. Se puede observar que casi todas las muestras tuvieron presencia de *Acanthamoeba polyphaga*, sin embargo, se aisló a la especie *Acanthamoeba triangularis* solo en una muestra.

En el segundo grupo se pudo observar más variedad entre biotopos y la riqueza de éstos, el biotopo predominante en las muestras fue el sedimento, en la mayoría de los sitios hubo una ausencia casi total de especies a excepción de *Acanthamoeba polyphaga*, que en este grupo también fue la especie predominante, seguida de la especie *Sappinia diploidea*, que se encontró especialmente en muestras de agua y biopelículas. La especie ausente de este grupo fue *Acanthamoeba triangularis*.

Finalmente, en el tercer grupo se contó con dos muestras TZ4BF2 y TZ5A, ambas del sistema Tzabnáh, en este grupo a comparación de los otros dos grupos, la especie ausente fue *Acanthamoeba polyphaga* y las dominantes fueron *Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba castellanii*, otra especie que se encuentra ausente totalmente fue *Acanthamoeba triangularis* como en los grupos anteriores. En este grupo el biotopo más rico en especies resultó ser la biopelícula.

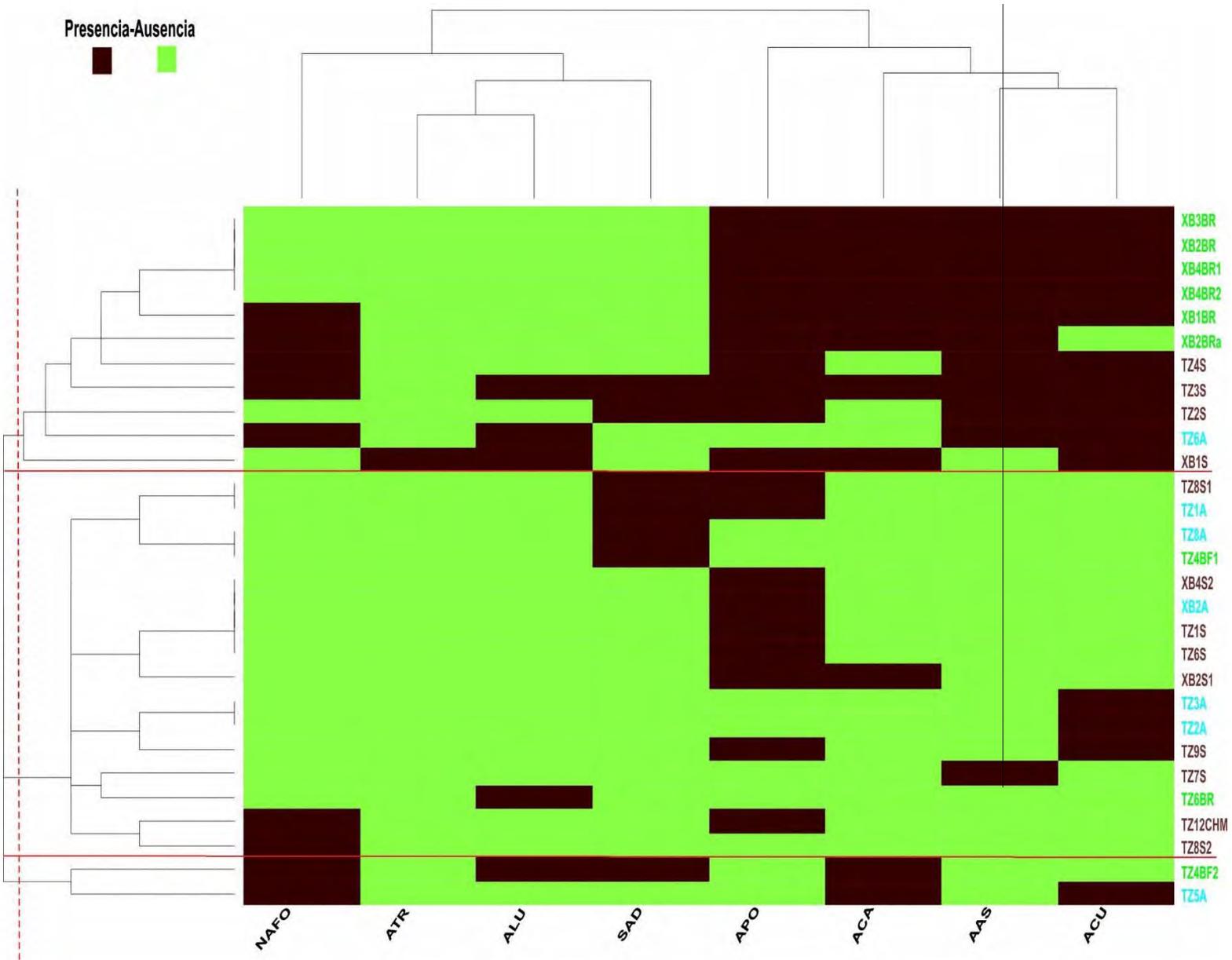


Figura 32. Análisis de similitud por biotopos y riqueza específica de los sistemas Tzabnáh y X-Batúm

8.5.2. Análisis de componentes principales (PCA)

En el análisis de componentes principales (PCA), las muestras con las temperaturas más altas registradas en este trabajo (28 °C) muestran gran proliferación de AVLPP en sus muestras TZ7, TZ5, TZ6, TZ8 y TZ4, esto se demuestra con la cantidad de muestras cercanas al vector de la temperatura; por su parte el pH contó con dos muestras cercanas, ambas muestras TZ2 y TZ3, tuvieron un pH de 8.3 y 8.4 respectivamente, son valores que demuestran la basicidad de ambos sitios, sin embargo, en ambas hay un elevado número de especies de AVLPP. Finalmente, en el PCA se observaron pocas muestras cercanas al vector de conductividad eléctrica, las muestras más cercanas son XB3 y XB4 con valores de 2 mS/cm, en el cenote X-Batún, ambos sitios son los que cuentan con menor número de especies de AVLPP, la conductividad elevada del agua muestra ser un factor limitante para el crecimiento amibiano (Fig. 33).

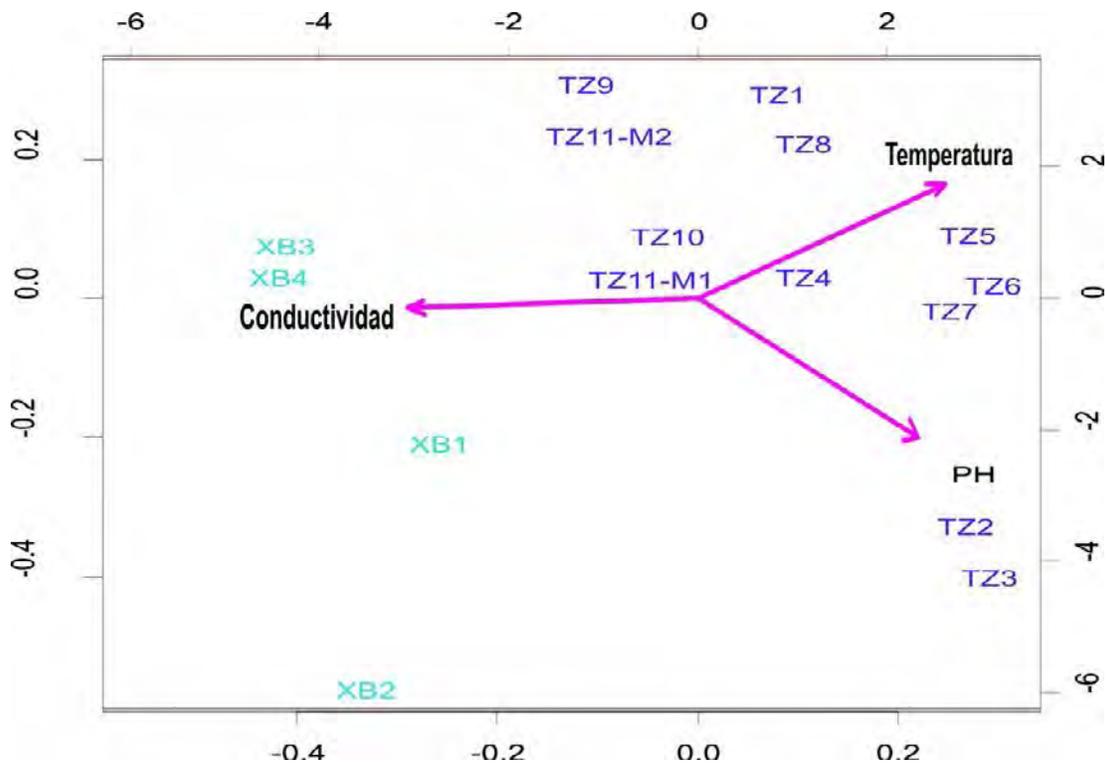


Figura 33. Análisis de componentes principales (PCA) de zonas/cenotes de los sistemas Tzabnáh y X-Batún.

8.5.3. Análisis de correspondencia sin tendencia (DCA)

Mediante el análisis de correspondencia sin tendencia (DCA), se observó cómo se agruparon las muestras con características que favorecen el crecimiento amibiano, éstas muestras son las que tienen mayor riqueza de especies, los biotopos de estas agrupaciones son los que tuvieron una mayor presencia de AVLPP.

Se puede observar también una agrupación en la parte inferior de las muestras TZ1S, TZ6S y XB2A, éstas muestras son iguales según el análisis de similitud que se hizo previamente, las características fisicoquímicas de los sitios de donde se obtuvieron estas muestras no permitieron el crecimiento de casi ninguna especie, solamente de *Acanthamoeba polyphaga*.

Las demás muestras contaron con ciertas características fisicoquímicas que les permitieron tener mayor o menor afinidad a algunas especies, cada una cuenta con factores distintos que condicionan el crecimiento de las AVLPP. En el análisis se observa que, según su cercanía al grupo morado más grande, los factores fisicoquímicos de estos sitios son favorables para el crecimiento de diversas especies de AVLPP (Fig 34).

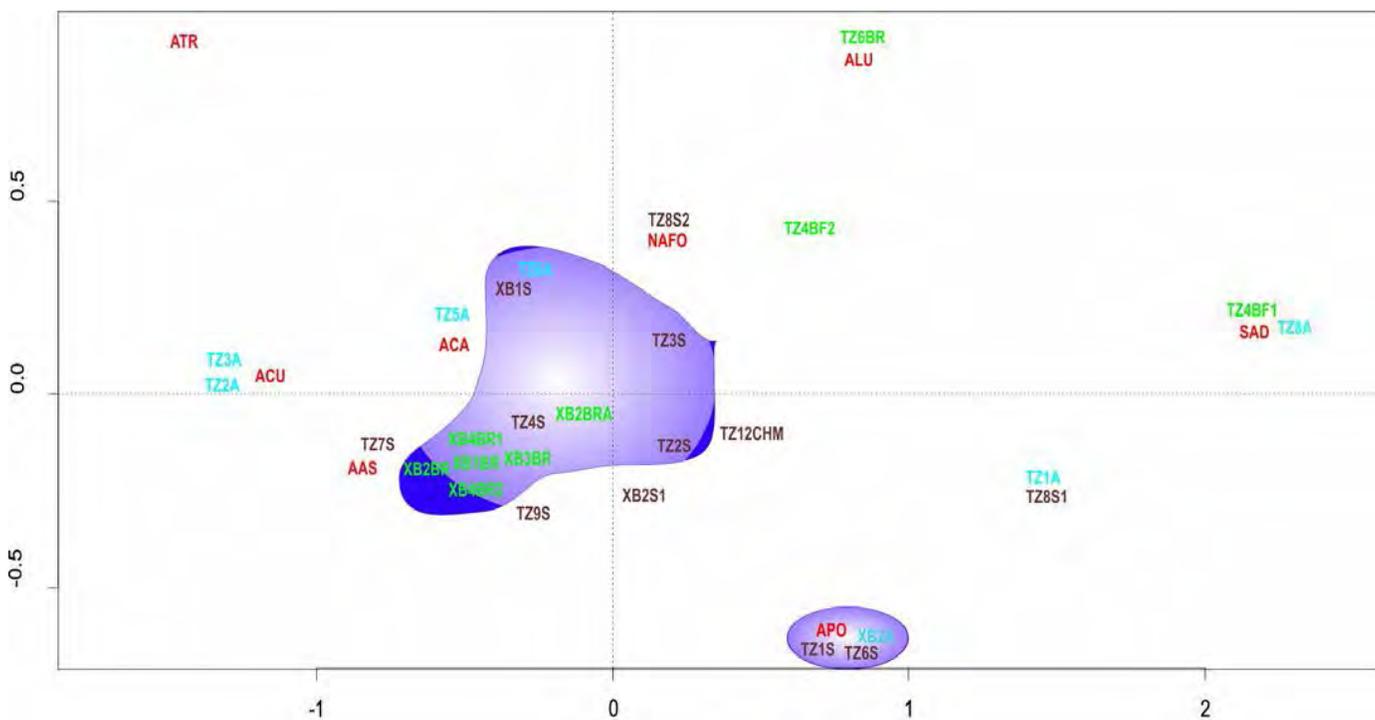


Figura 34. Análisis de correspondencia sin tendencia (DCA) de los biotopos de Tzabná y X- Batún. Sombreado morado con las especies que comparten características fisicoquímicas idóneas para el desarrollo de AVLPP.

*Agrupaciones que favorecen el crecimiento amibiano en color morado.

9. DISCUSIÓN

Las AVLPP ya habían sido estudiadas en México, en sistemas subterráneos como cuevas, grutas y pozos (Ramírez *et al.*, 2009 y 2012; Zenteno, 2012 y Montes, 2012); en estos estudios previos se encontraron siete especies, de las cuales el género dominante fue *Acanthamoeba*, la amiba más abundante en el medio ambiente (De Jonckheere 1981 y 1991). En el muestreo realizado en la península de Yucatán, en los cenotes de los sistemas Tzabnáh, X-Batún y D-Zombakal, se encontró una población de AVLPP menor a la registrada previamente en sistemas salobres (Gallegos-Neyra *et al.*, 2012); se encontraron ocho especies, de las cuales cinco coinciden con la población de organismos amibianos registrada en los sistemas del centro del país (Cuadro 9)(Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Morelos y Puebla); aunque los cenotes pueden ser ecosistemas con limitantes ambientales, las AVLPP han podido colonizarlos y podemos encontrarlas gracias a las elevadas temperaturas que se registran en estos sitios y a la cantidad de bacterias que podemos encontrar en el agua; uno de los contaminantes principales de los cenotes son las coliformes fecales, que llegan a estos sistemas por deficiencias en el alcantarillado y la insuficiencia de plantas de tratamiento de aguas residuales ocasionando descargas continuas de éstas en los cenotes (Nava, 2015), aportando así una gran cantidad de bacterias coliformes de las que las AVLPP se podrían alimentar.

Cuadro 9. Especies encontradas en estudios previos comparadas con el registro de este trabajo realizado en los sistemas de cenotes Tzabnáh, X-Batún y D-Zombakal.

Autor	País	Ambiente	<i>Acanthamoeba</i> sp.	<i>A. castellanii</i>	<i>A. culbertsoni</i>	<i>A. polyphaga</i>	<i>Naegleria</i> sp.	<i>N. fowleri</i>	<i>Sappinia diploidea</i>
Ramírez <i>et al.</i> , 2009	México	Agua subterránea	-	-	-	X	-	-	-
Ramírez <i>et al.</i> , 2012	México	Agua subterránea	-	-	-	X	-	-	-
Zenteno, 2012	México	Grutas	-	X	-	X	-	-	-
Montes, 2012	México	Cuevas	-	X	X	X	-	X	-
"Estudio de amibas potencialmente patógenas en biotopos de tres sistemas de cenotes en el estado de Yucatán, México"	México	Tzabnáh	-	X	X	X	-	X	X
	México	X-Batún	-	X	X	X	-	X	-
	México	D-Zombakal	-	-	-	-	-	-	-

9.1. Riqueza específica de AVLPP en los tres sistemas de cenotes

9.1.1. Tzabnáh

En el sistema Tzabnáh, las condiciones ambientales fueron favorables para que la especie *Acanthamoeba polyphaga* se desarrollara, la temperatura era mayor a los 25 °C y el pH era casi neutro. En general las condiciones son idóneas para que las AVLPP del género *Acanthamoeba* habiten el sistema Tzabnáh, además el biotopo con mayor riqueza de especies fue el sedimento, donde había una mayor concentración de materia orgánica de la cual las amibas se pueden alimentar, se reporta especialmente que las AVL se encuentran asociadas generalmente a suelos y cuerpos de agua (Cabello-Vílchez, 2015). El género *Acanthamoeba* constituye el 43.6 % de la población amibiana en piscinas y el 43.1% en océanos (De Jonckheere, 1981 y 1991), esto debido a que soporta amplios rangos de osmolaridad, temperatura, salinidad y pH (Trabelsi *et al.*, 2012). La resistencia de *Acanthamoeba* se debe en parte a la composición de su quiste, la pared externa (exoquiste) tiene lípidos y proteínas, mientras que el endoquiste tiene celulosa, lo que los puede proteger de la desecación hasta por 20 años (Visvesvara *et al.*, 2011; Gallegos-Neyra *et al.*, 2014), esta capacidad de formar quistes resistentes (en comparación a los quistes del género *Naegleria*) en condiciones desfavorables le facilita una amplia distribución (Martínez, 1991). La posible presencia de *Acanthamoeba* en estos tres sistemas es de gran importancia en ámbitos de la salud humana ya que, como se mencionó anteriormente, algunas especies encontradas de este género pueden causar infecciones como la EAG, queratitis, pérdida total del ojo infectado o la muerte (Martínez, 1991).

Por otro lado, las especies de *Naegleria fowleri* y *Sappinia diploidea*, encontradas casi en misma proporción en los cenotes de este sistema, son también importantes por las infecciones que causan.

Naegleria fowleri, es una especie descrita como termófila, se desarrolla y multiplica a temperaturas de 40 a 45 °C en el ambiente, en este sistema se observó su presencia a temperaturas hasta de 27 °C sin enquistarse. Sin embargo, los quistes en este sistema que tiene mucha humedad podrían ayudar a que esta especie no desaparezca del sitio, ya que en condiciones de desecación los quistes de *Naegleria fowleri* se destruyen (Gutiérrez, 2000, Martínez y Visvesvara, 1997). Esta especie no fue una de las especies más abundantes y por las condiciones en las que se encontró (temperaturas menores a las registradas que necesita) se toma en cuenta como un organismo con potencial patogénico, es decir que podría o no ser una amiba patógena para el ser humano. Todas las especies de amibas con potencial patogénico deben ser identificadas por métodos moleculares (Coronado y Shibayama, 2017), puesto que la identificación morfológica de muestras del

ambiente podría tener errores y causar así aseveraciones respecto organismos que tienen importancia en salud pública.

Naegleria fowleri es una de las amibas más importantes en temas de salud humana, pues es un agente causal de la MEAP, que afecta a personas saludables y les causa la muerte después de un cuadro agudo y fulminante que ataca el SNC (Mierowitz, 1982, Wood y Gutiérrez, 1993, Martínez y Visvesvara, 1997 y Gutiérrez, 2000).

En México del año 1978 al 2009, se han confirmado aproximadamente 30 casos de MEAP, donde se han recuperado los organismos de los pacientes, confirmando la presencia de *Naegleria fowleri* (Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de Meningoencefalitis Amebiana Primaria [Amibas de Vida Libre], 2012).

Sappinia diploidea, es una especie que fue hace poco catalogada con potencial patogénico, en el ambiente se había aislado de suelos, hojarasca, heces de mamíferos y recto de reptiles, en este sistema se encontró *Sappinia diploidea*, y aunque no fue una especie dominante en este sitio, se encontró en siete puntos de muestreo cercanos a la entrada de la gruta, en estos cuerpos de agua se podía observar que entraban algunos animales; la materia orgánica y las heces podrían estar favoreciendo la presencia de esta especie en el sistema, al igual que las características ambientales que no eran desfavorables para el desarrollo de AVL. De *Sappinia diploidea* solo se ha registrado un caso clínico no mortal, sin embargo, su presencia en estos cenotes de Tzabnáh es importante ya que mientras se realizan más estudios respecto esta especie deben tomarse precauciones para no infectarse por esta amiba (Gelman *et al.*, 2001).

9.1.2. **X-Batún**

La especie *Acanthamoeba polyphaga* fue la más abundante en este sistema, sin embargo, las condiciones de este sistema fueron distintas comparándolos con el sistema de Tzabnáh, la conductividad era elevada, la temperatura era menor y el pH estaba en ámbitos idóneos para las amibas. La cantidad de solutos en el agua pudo modificar el biotopo preferencial de las amibas, en este sistema las biopelículas tuvieron una mayor cantidad de organismos; las biopelículas están formadas por sustancias poliméricas extracelulares producto del metabolismo de flora y fauna que se desarrolla sobre algas, plantas, rocas y sustratos artificiales, proveen un microhábitat que brinda protección, humedad y alimento a gran número de microorganismos heterótrofos (Busscher *et al.*, 1995; Costerton *et al.*, 1995; Parry, 2001; English *et al.*, 2002; Heaton y Parry, 2002; Topping, 2002; Egli *et al.*, 2003; Schlickeisen *et al.*, 2003 y Teitzel y Pársec, 2003;).

Las especies que predominaron en este sistema fueron del género *Acanthamoeba*, como se mencionó anteriormente, son especies muy resistentes gracias a la composición de sus quistes a comparación de especies como *Naegleria fowleri* que solo se encontró en dos muestras y *Sappinia diploidea* que no tuvo presencia en este sistema, este sitio cuenta con características ambientales que limitan el crecimiento de estas dos especies, el factor que puede estar ayudando a que las demás especies se desarrollen es la cantidad de bacterias que pueden habitar en las biopelículas formadas; las amibas, junto con otros protozoos microheterótrofos, son reconocidas como las más importantes depredadoras de bacterias ya que consumen casi un 50 % de la biomasa bacteriana en el circuito microbiano (Williams, 1981; Porter *et al.*, 1985), son consideradas como las principales controladoras del crecimiento de dichas poblaciones (Villagrana, 1992; Weekers *et al.*, 1993).

9.1.3. **D-Zombakal**

El sistema D-Zombakal, no tuvo presencia de AVLPP. El sistema contaba con temperaturas del agua de 23 °C, es decir, no tenía la temperatura mínima para que la AVLPP pudieran habitarla (25 °C) y sus niveles de conductividad eran mayores a los valores de los demás sistemas (2mS/cm). Otro factor importante de este sistema fue la ausencia de biotopos de protección como podrían ser las biopelículas; esto puede ser la causa de que no se encontrarán AVLPP.

9.2. **Análisis ecológicos**

9.2.1. **Análisis de clúster Q-mode sistemas Tzabnáh y X-Batún**

Las cuatro muestras pertenecientes al sistema X-Batún del primer grupo que se formó en este análisis (XB3BR, XB2BR, XB4BR1 y XB4BR2), son iguales ya que comparten las mismas especies, todas del género *Acanthamoeba*, como se mencionó anteriormente es un género muy resistente a cambios ambientales, en este sistema la cantidad de solutos en el agua era elevada, sin embargo se ha descrito que las amibas logran colonizar medios como el agua marina o con gran cantidad de solutos, ya que entre sus procesos fisiológicos se encuentra la regulación iónica (Flores, 2000), amibas del género *Acanthamoeba* podrían estar usando este recurso fisiológico para poder habitar en los cenotes, sin embargo, no todas las especies de AVLPP lo soportan por ello encontramos pocas especies y solo de un género en X-Batún.

Se puede observar que la especie *Acanthamoeba triangularis*, está casi ausente, no solo en este grupo, en los demás no se encuentra en ninguna muestra; *Acanthamoeba triangularis* se aisló inicialmente de heces humanas en Francia (Pussard y Pons, 1977); este dato ecológico nos sugeriría que en los sistemas muestreados debería haberse encontrado con mayor frecuencia por las descargas de aguas residuales, sin embargo, no fue así; esto podría ser debido a que se ha adaptado a lo largo del tiempo hasta llegar a ser un querapatógeno (patógeno que afecta a la córnea exclusivamente) o a que posiblemente sigue siendo un organismo que habita en sistema digestivo de los seres humanos y no logra sobrevivir fuera de éste por mucho tiempo.

De todas las muestras recolectadas y revisadas en este trabajo, las que conforman el grupo uno, tuvieron la mayor riqueza. El biotopo es un factor de gran importancia, puesto que puede proveer de alimento, protección y genera un microhábitat idóneo para el establecimiento y reproducción de AVLPP. En el sistema X-Batún, donde los niveles de solutos eran elevados (conductividad) las muestras de agua tuvieron solo una especie de AVLPP, mientras que las biopelículas tuvieron mayor presencia de AVLPP. Debido a que las biopelículas son estructuras colectivas de microorganismos podemos encontrar especies amibianas adheridas a éstas para alimentarse (Barbeau *et al.*, 2001), esta podría ser la condición que favorezca la riqueza de este biotopo, el alimento, el soporte y refugio.

El biotopo con mayor riqueza de este primer grupo es el sedimento, y estas muestras son principalmente del sistema Tzabnáh, en estos sistemas la materia orgánica se acumula en los sedimentos y el agua no muestra condiciones que las desfavorezca, las AVL y AVLPP se establecen en los sedimentos pues les proporciona principalmente el alimento necesario.

El grupo dos formado en este análisis está dominado por la especie *Acanthamoeba polyphaga* en muestras de sedimento, de todas las especies de *Acanthamoeba*, esta es la más resistente y se ha reportado que soporta amplios niveles de osmolaridad, temperatura, pH y salinidad, gracias a que su endoquiste cuenta con celulosa y le permite ser más resistente (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). *Acanthamoeba polyphaga* no solo puede ocasionar queratitis amibiana, sino también puede ser hospedero de microorganismos como *Legionella pneumophila* y *Mycobacterium avium* (Steinert *et al.*, 1998 y García *et al.*, 2007), estos organismos tienen importancia médica. El hecho de que esta especie sea la que caracteriza a este grupo nos proporciona información respecto las afinidades ambientales que puede tener, y así posteriormente realizar búsquedas de esta especie en sitios similares y corroborar un posible riesgo con métodos moleculares para definir el tipo de amiba que son, especialmente en el caso de *Acanthamoeba*, género del cual ya se han caracterizado más los tipos para saber si son un peligro para la salud pública.

La segunda especie con mayor presencia es *Sappinia diploidea*, en muestras de agua y biopelícula, lo cual concuerda con lo descrito de ella anteriormente ya que se había aislado de muestras de agua principalmente y sedimento (Visvesvara, 2007), además de heces de mamíferos vacunos y de rectos de reptiles, por ello se consideraba como una especie coprozoica (Levine, 1961); la preferencia ecológica de esta especie es casi desconocida. Esta especie, se describe como una especie “rara”, y en la zona podría estar proliferando gracias a las excreciones del ganado vacuno, puesto que antes solo se tenían porcinos en la zona, sin embargo, se ha empezado a incluir este otro tipo de ganado (INEGI, 2017).

En este segundo grupo se pudo observar que las muestras XB4S2, XB2A, TZ1S y TZ6S, son iguales, ya que solo la especie *Acanthamoeba polyphaga* las coloniza, en estas muestras el sedimento muestra coloraciones que indican su composición química la cual podría estar explicando esta ausencia de otras especies de AVLPP. Según la clasificación de la carta de colores de suelo de Munsell, que describe la composición del suelo según su color, los suelos rojizos como la muestra TZ6S contiene Fe, este elemento vuelve al suelo más alcalino; los suelos de color gris o blancos como las muestras XB4S2 y TZ1S, contienen carbonatos de calcio (CaCO₃) y las muestras con coloración oscura o negra no siempre es asociada a elevados niveles de materia orgánica, sino a exceso de materia mineral. La mayoría de estos elementos vuelven al medio más alcalino, aunque se ha descrito que las AVL pueden soportar niveles de acidez elevados, no existen muchos trabajos que hablen sobre medios alcalinos donde habiten las AVL. En este muestreo se pudo observar que en biotopos como el agua donde había grandes cantidades de solutos, las amibas estuvieron ausentes, es probable que los elementos que estos lugares contienen como Fe, Ca y algunas otras sales, inhiban la proliferación de AVLPP, y solo especies muy resistentes como *Acanthamoeba polyphaga* puedan habitar estos sistemas.

El tercer y último grupo formado en este clúster, tiene las muestras TZ4BF2 y TZ5A, en este grupo las especies ausentes son *A. astronyxis*, de nuevo *A. triangularis* y *A. polyphaga*, en estas muestras la especie que dominó en todos los demás grupos se encuentra totalmente ausente; las especies que predominaron en ambas muestras son *Naegleria fowleri* y *A. castellanii*; la especie *N. fowleri*, es una especie de parásito facultativo no muy evolucionada (Sánchez, 2000), cuenta con una fase flagelada para desplazarse en condiciones adversas; se ha aislado de cuerpos de agua principalmente (Carter 1970, Laseke *et al.*, 2010); ya que en la columna de agua se puede alimentar de las bacterias o materia orgánica que está suspendida en ésta (Rodríguez-Zaragoza, 1994; De Jonckheere, 2014), además de que la podemos encontrar en biopelículas por la cantidad de bacterias que contienen; *N. fowleri* se ha relacionado con actividad humana debido a la

gran cantidad de bacterias que desechan y de las que *N. fowleri* se alimenta (Ramírez *et al.*, 2009). Por su parte, *A. castellanii*, es de carácter ubicuo, sin embargo, se ha aislado principalmente de ambientes húmedos (Vandamme *et al.*, 1991; Fernández *et al.*, 2010), esto podría explicar porque fue una de las especies dominantes en estas muestras con biotopos de agua y biopelícula.

9.2.2. Análisis de componentes principales (PCA)

Como se puede observar en el PCA, los sitios con temperaturas de 28 °C muestran un buen desarrollo de las comunidades de AVLPP en sus muestras, esto se puede inferir al observar las muestras cercanas al vector de la temperatura; la muestra que se encuentra casi pegada al vector es la muestra TZ4 la cual registro una temperatura de 27 °C, y fue la muestra con mayor riqueza de especies, aunque no es el sitio con el nivel de temperatura más alto puede observarse como la temperatura influyó posiblemente en que las especies de amibas proliferaran. Por su parte el vector de pH cuenta con dos muestras cerca, TZ2 y TZ3, tienen un pH de 8.3 y 8.4 respectivamente, estos valores muestran la basicidad de ambos sitios y en ambas se aislaron un elevado número de especies de AVLPP. En cuanto al vector de conductividad hay pocas muestras cercanas, las muestras más cercanas son XB3 y XB4, éstas se observan a una distancia mayor del vector a comparación de las demás muestras con los vectores a los que son afines; estas muestras tienen valores de conductividad eléctrica elevados, 2 mS/cm, en el cenote X- Batún, ambas muestras son las que cuentan con menor número de especies de AVLPP, al parecer la conductividad es una variable ambiental con gran peso en las comunidades amibianas. La conductividad eléctrica es la variable ambiental que provoca una respuesta en las comunidades de AVLPP en los cenotes muestreados. En el caso de D-Zombakal, solo se tomaron muestras de agua, este biotopo estuvo carente de especies de AVLPP, esto podría haber sido ocasionado por los elevados valores de conductividad eléctrica (2.1 mS/cm) o por la temperatura que era demasiado baja para las AVLPP (23 °C), ambos factores podrían estar influyendo en esta ausencia, sin embargo no se puede descartar que la falta de biotopos donde establecerse fue la causa de que estos organismos estuvieran ausentes en este sistema.

9.2.3. Análisis de correspondencia sin tendencia (DCA)

En este análisis se agruparon al centro las muestras que favorecen más el crecimiento de AVLPP por sus características ambientales, estas muestras coincidieron con las que integran al grupo uno del clúster Q-mode; las demás muestras se encuentran dispersas en el análisis, algunas asociadas únicamente a ciertas especies, como TZ1S, XB2A y TZ6S con *A. polyphaga*.

Estas muestras tienen mayor afinidad o más características que fomentan el crecimiento de algunas especies en particular; las muestras alejadas del centro del análisis no son muestras que estén vacías o que no puedan favorecer el crecimiento de las AVLPP en general, estas muestras cuentan con características ambientales que pueden inhibir o fomentar la proliferación de solo una especie de amibas, pero no de otras especies.

10. CONCLUSIONES

1. Se identificaron morfológicamente ocho especies de AVLPP; *Acanthamoeba astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. lugdunensis*, *A. polyphaga*, *A. triangularis*, *Naegleria fowleri* y *Sappinia diploidea*, las cuales podrían ser un posible factor de riesgo para los usuarios de estos sistemas de cenotes por las infecciones y patologías que causan.

2. *Acanthamoeba* fue el género de AVLPP encontrada con más frecuencia en los tres sistemas muestreados y la especie más frecuente fue *Acanthamoeba polyphaga*.

3. Los biotopos con mayor riqueza amibiana fueron el sedimento y las biopelículas, esto se debe a la elevada cantidad de nutrimento (materia orgánica y bacterias) que ambos biotopos proporcionan a las AVLPP, además de ser nichos de protección en condiciones adversas.

4. Uno de los factores fisicoquímicos del agua más importantes para la presencia de AVLPP fue la conductividad, en los sitios donde era elevada disminuyó la cantidad de especies encontradas.

5. Los sitios alcalinos, como los cenotes, muestran ser medios donde las AVLPP se pueden desarrollar si tienen temperaturas elevadas, pH favorable y alimento, pero no es su medio preferencial. Si alguno de los otros factores o todos no están presentes en el ambiente, las AVLPP no los habitan.

6. Los cenotes de los sistemas Tzabnáh, X-Batún y D-Zombakal de Yucatán, son ambientes donde proliferan las AVLPP, sin embargo, por sus altos niveles de conductividad las comunidades amibianas son reducidas.

7. Es posible que la gran cantidad de bacterias que se encuentran en estos sitios por las descargas continuas de aguas residuales, estén jugando un papel importante en la presencia de AVLPP.

8. La posible presencia de las AVLPP en estos sistemas de cenotes, enfatiza la importancia de hacer cumplir la Norma Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010 y en realizar estudios de calidad del agua, pues se estipula que la amiba *Naegleria fowleri* y el género *Acanthamoeba* deben estar ausentes de aguas de uso recreativo y contacto directo, ya que pueden convertirse en focos de

infecciones amibianas para los usuarios y ser una amenaza para la salud pública.

9. La Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, de Salud ambiental y agua para uso y consumo humano, contempla organismos termotolerables como algunas AVLPP, sin embargo, se debe prestar más atención a esta norma respecto a dichos organismos, a pesar de que no entran al cuerpo humano vía oral pueden infectar a personas vía cutánea, ocular, etc.; en Yucatán el agua de los cenotes es usada para consumo humano, por ello esta norma debe hacerse cumplir.

10. Esta investigación es el primer registro de AVLPP efectuado en agua de los cenotes de la península de Yucatán, por lo cual, se debe tomar precaución al ingresar a estos cuerpos de agua o hacer uso del recurso hídrico (nadar con goggles y tapones de nariz, evitar ingresar al agua con heridas abiertas con alguna enfermedad inmunodebilitante, potabilizar el agua antes de su uso o consumo, etc.).

11. BIBLIOGRAFÍA

- Adl S., Simpson A. G., Lane C., Lukes J., Bass D., Bowser S., Brown M., Burky F., Durthorn M., Hampl V., Heiss A., Hoppenrath, Lara, Gall, Lynn, McManus, Mitchell, Mozley-Stanridge, Parfrey, Pawlowski, Rueckert, Shadwick, Schoch, Smirnov y Spiegel F. 2012. The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59: 429-514.
- Aqeel Y., Siddiqui R., Ateeq M., Shah M.R., Kulsoom H. y Khan N.A. 2015. Atomic Force Microscopic Imaging of *Acanthamoeba castellanii* and *Balamuthia mandrillaris* trophozoites and cysts. *Journal of Eukaryot Microbiology*, 62: 85–94.
- Barbeau J. y Buhler T. 2001. Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. *Journal of Microbiology*, Paris 8:753–760.
- Bibiano L., Gárfias J. y Llanos H. 2015. Hidrogeoquímica y procesos naturales de ablandamiento del agua subterránea en sistemas kársticos. *Tecnología y Ciencias del Agua*, 1 (VI): 57-78.
- Busscher, H. J., Bos, R. y Van der Mei, H.C. 1995. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbiology Letters* 128: 229-234.
- Cabello-Vílchez A. M. 2015. *Balamuthia mandrillaris* en el Perú, lesiones cutáneas, meningoencefalitis y métodos de cultivo. *Infection*, 20(2): 107-119.
- Carter R. F. 1970. Description of a *Naegleria* sp isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental changes induced by it. *The Journal of Pathology*. 100: 217-244.
- De Jonckheere J. F. 1981. Pathogenic and non pathogenic *Acanthamoeba* spp. thermally polluted discharges and surface waters. *Revista Protozoología*, 28: 56-59.
- De Jonckheere J. F. 1991. Ecology of *Acanthamoeba*. *Journal of Infectious Diseases*; 13 (5): 385-387.

- De Jonckheere J. F. 2011. Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 11(7):1520-8.
- De Jonckheere, J. F. 2014. *Experimental Parasitology* 145 Suppl, S2-9.
- Dirección General de Epidemiología. 2012. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de Meningoencefalitis Amebiana Primaria (Amibas de Vida Libre). Revisado en diciembre, 2017, de Secretaría de Salud Pública. Sitio web: http://187.191.75.115/gobmx/salud/documentos/manuales/17_Manual_Meningoencefalitis.pdf
- Egli, K., Bosshard, F., Werlen, C., Lais, P., Siegrist, H., Zehnder, A.J.B. y Van der Meer, J.R. 2003. Microbial composition and structure of a rotating biological contactor biofilm treating ammonium-rich wastewater without organic carbon. *Microbial Ecology*, 45: 419.
- English, J., Parry, J. y Pickup, R. 2002. The potential for interactions between protozoa and coliform bacteria in biofilms. Contributed papers to the spring 2002 BSSP conference at Bristol University.
- Fernández H, Flores S e Inzunza F. 2010. *Arcobacter butzleri* strains isolated from different sources display adhesive capacity to epithelial cells *in vitro*. *Acta Scientiae Veterinariae*, 38: 283-7.
- Flores, V. R. Adaptaciones al medio de los protistas de vida libre. 2000. Universidad Nacional del Comahue. Centro Regional Universitario Bariloche. Cátedra de Invertebrados. Revisado en junio, 2018 en: <http://216.../protista.htm+amebas+de+vida+libre+en+el+mar&hl=e>.
- Gallegos-Neyra E. M. 1997. *Amebas de Vida Libre Potencialmente Patógenas en Cuerpos de Agua de Uso Recreativo en el Estado de San Luis Potosí*. Tesis Doctoral en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias UNAM. México.130 pp.

- Gallegos-Neyra, E., A. Calderón Vega y A. Garduño. 2012. Amibas de vida libre patógenas en playas de Veracruz, México. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 65:148-150.
- Gallegos-Neyra, E. M., Lugo-Vázquez, A., Calderón-Vega, A., Sánchez-Rodríguez, M. R. y Mayén-Estrada, R. 2014. Biodiversidad de protistas amébidos de vida libre en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: 10-25.
- Gelman B.B., Rauf S.J., Nader R, Popov V, Bokowski J, Chaljub G, Nauta H.W. y Visvesvara GS. 2001. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *JAMA* 285: 2450–2451.
- Gutiérrez Y. 2000. Free-Living Amebae. En: Y. Gutiérrez (Ed). *Diagnostic Pathology of Parasitic Infections with Clinical Correlations*. Ed. Oxford University Press. New York; 114-142.
- Hall F. 1977. Cenotes y Aguadas. En: *Enciclopedia Yucatanense*. Mérida, Yucatán: Edición oficial del Gobierno de Yucatán. 67-80.
- Haeckel, E. 1866. *Generelle Morphologie der Organismen*. Vol. 1, Berlin: G. Reimer (Ed).
- Heaton, K. y Parry, J. 2002. The sequence of colonization of a glass surface by protozoa from lake water under laminar flow. Poster Contributions to the spring 2002 BSSP conference held at Bristol University.
- Laseke I., Korte J., Lamendella R., Kaneshiro E.S., Marciano-Cabral F. y Oerther D.B. 2010. Identification of *Naegleria fowleri* in warm ground water aquifers. *Journal of Environmental Quality*, 39 (1): 147-153.
- Legendre P, Legendre L. 1998. *Numerical Ecology*, 2nd English edn. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Levine N. 1973. Protozoan parasites of domestic animals and of man, 2nd edn. Burgess, Minneapolis, Minnesota: Burgess Pub. Co.
- Marciano-Cabral y Cabral. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Journal Clinical Microbiology*, 16 (2): 273-307.

- Marín, L. E., Perry E. C., Pope K. O., Duller C. E., Booth C. J. y Villasuso M., 1990. Hurricane Gilbert: its effects on the aquifer in northern Yucatán, Mexico. En: E. S. Simpson y J. M. Sharp, (eds.), *Selected Papers on Hydrogeology from the 28th International Geologic Congress*, Washington, D.C., USA, July 9-19, Hanover, Verlag Heinz Heise, International Association of Hydrogeologists, v (1): 111-128.
- Martínez A. 1991. Infection of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. *Journal of Infectious Diseases*; 13 (5): S 399-402.
- Martinez, A. J. y Visvesvara, G. S. 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathology*. 7: 583-598.
- Merckell E. y Voge M. 1989. *Parasitología Médica*. Ed. Interamericana. 6a Edición Madrid, España.
- Mierowitz R.L. 1982. Granulomatous amebic encephalitis and disseminated acanthamebiasis. En: Mierowitz RL. (Ed). *The Pathology of Opportunistic Infections*. New York: Raven Press. 235-42
- Montes Colima N. A., 2012, Identificación de Amibas de Vida Libre en Cuevas de la Región Central de México. Tesis Licenciatura (Biología). UNAM, México.
- Mulec Janez, Üstüntürk-Onan Dietersdorfer Miray y Walochnik Julia. 2016. *Acanthamoeba* y otras amibas de vida libre en el guano de murciélago, un hábitat extremas. *Parasitology, Research*, 115: 1375-1383.
- Nava Galindo, V. 2015. Percepción, conocimiento local y descripción de la calidad del agua de cenotes de interés turístico y recreacional. Tesis de Maestría (Ciencias en especialidad de Ecología Humana). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Mérida.
- Oddó D. B. 2006. Infecciones por amebas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anátomo-clínicos. *Revista Chilena de Infectología*, 23 (3): 200-214.
- Page, F.C 1988. *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae with Instructions for Culture*. *Freshwater Biological Association Scientific Publication*, Londres. 122.

- Page, F. C. y Siemens, F. J. 1991. *Nackte Rhizopoda und Heliozoa*. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, New York. 297.
- Paltiel M, Powell E, Lynch J, Baranowski B. y Martins C. 2004. Disseminated cutaneous acanthamebiasis: a case report and review of the literature. *Cutis*, 73 (4): 241–248.
- Parry, J. 2001. Protozoan participation in biofilm dynamics. Contributed papers at the spring 2001 BSSP meeting, UEA, UK.
- Patterson, J. D. y S. Hedley. 1992. *Free-Living Freshwater Protozoa (a colour guide)*. BPC Hazell Books LTD. Aylesbury, England. 203.
- Pech D, Simoes N, Mascaro M. y Enriquez C. 2010. Ambientes marinos. En: Duran R., y Méndez M.(Eds). *Biodiversidad y desarrollo humano en Yucatán*. CYCY, PPD-FMAM, SEDUMA. 496.
- Pelczar J. M., Reid D. R. y Chan S. C. 1982. *Microbiología*. McGraw Hill, Nueva York. 826.
- Porter, K. G., Sherr, E.B., Sherr, B. F., Pace, M. y Sanders, R. W. 1985. Protozoa in planktonic food webs. *Protozoology*. **32**: 409-415.
- Pussard M, Ponds R. 1977. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistology*; 13: 557-598.
- Ramírez E., Robles E., Sainz M.G., Ayala R. y Campoy E. 2009. Calidad microbiológica del acuífero de Zacatepec, Morelos, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 25 (4): 247-255.
- Ramírez Flores, E., Robles Valderrama, E., Ayala Patiño, R. y Martínez Rodríguez, B. 2012 Calidad amebológica del agua de pozos utilizados para suministro de agua potable en el Estado de Hidalgo. Ingeniería [en línea]: [Fecha de consulta: 13 de enero de 2017] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46725267006>>ISSN 1665-529X

- Rivera F., Bonilla P., Ramírez E., Calderón A., Rodríguez S., Ortiz R., Hernández D. y Rivera V. 1994. Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in Mexico City and its suburbs. *Water, Air, and Soil Pollution*, 74: 65-87.
- Rodríguez-Zaragoza, S. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Critical Review in Microbiology*, 20: 225-241.
- Rondanelli E. G. 1987. *Infectious Diseases. Amphizoic Amoebae Human Pathology*. Piccin Nuova Libreria, Padua, Italia. 279.
- Sánchez C. 2000. Origen y evolución del parasitismo. Discurso de ingreso. Academia de Ciencias de Zaragoza. Zaragoza. España.
- Schlickeisen, E., Tietjen, T. E., Arsuffi, T. L. y Groeger, A. W. 2003. Detritus processing and microbial dynamics of an aquatic macrophyte and terrestrial leaf in a thermally constant, spring-fed stream. *Journal Microbial Ecology*, 45 (4): 411-418.
- Schmitter-Soto J.J., Comín F.A., Escobar-Briones E., Herrera-Silveira J., Alcocer J., Suárez-Morales E., Elías-Gutiérrez M., Díaz-Arce V., Marín L.E. y Steinich B. 2002. Hydrogeochemical and biological characteristics of cenotes in the Yucatan Peninsula (SE Mexico). *Hydrobiología*, 467: 215-228.
- SEDUMA. 2015. Reglamento de la Ley de protección al medio ambiente del estado de Yucatán en materia de cenotes, cuevas y grutas. 09/05/2016, de Gobierno del Estado de Yucatán Sitio web: <http://www.seduma.yucatan.gob.mx/cenotes-grutas/documentos/ReglamentoCenotesYucatan2015.pdf>
- SEDUMAa. 2012-2018a. Tzabnáh. 28/03/16, de Gobierno del estado de Yucatán Sitio web: http://www.seduma.yucatan.gob.mx/cenotes-grutas/fichas-tecnicas/Yucatan_Tecoh_cenote_Tzabnah.pdf
- SEDUMAb. 2012-2018b. X'Batún. 28/03/16, de Gobierno del estado de Yucatán Sitio web: http://www.seduma.yucatan.gob.mx/cenotes-grutas/fichas-tecnicas/Yucatan_Uman_cenote_Xbatun.pdf

- SEDUMAc. 2012-2018c. Dzonbacal. 28/03/16, de Gobierno del estado de Yucatán
Sitio web: [http://www.seduma.yucatan.gob.mx/cenotes-grutas/fichas-tecnicas/Yucatan Uman cenote Dzonbacal.pdf](http://www.seduma.yucatan.gob.mx/cenotes-grutas/fichas-tecnicas/Yucatan%20Uman%20cenote%20Dzonbacal.pdf)
- Sharpton, V. L., Burke K., Camargo-Zanoguera A., Hall S.A., Lee D.S., Marín L.E., Suárez-Reynoso G., Quezada-Muñeton J.M., Spudis P.D. y Urrutia-Fucugauchi J. 1993. Chicxulub multiring impact basin: Size and other characteristics derived from gravity analysis: *Science*, 261: 1564-1567.
- Steinert, M., Ockert, G., Luck, C. y Hacker, J. 1998. Regrowth of *Legionella pneumophila* in a heat-disinfected plumbing system. *Zentralblatt Bakteriologie*, 288: 331-342.
- Smirnov, A. V. y Goodkov, A. V. 1999. An illustrate list of basic morphotypes of *Gymnamoeba* (Rhizopoda, Lobosea). *Protistology*, 1: 20-29.
- Sminorv A. y Thar R. 2003. Spatial distribution of *Gymnamoebae* (Rhizopoda, Lobosea) in brackish-water sediments at the scale of centimeters and millimeters. *Protistology*, 154: 359-369.
- Teitzel, G. M. y Parsek, M. R. 2003. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 2313-2320.
- Topping, B. 2002. Wipe out both *Legionella* and biofilm with ORP control and oxidising biocides. Aquarius Technologies Pty. Ltd.
- Trabelsi H., Dendana F., Sellami A., Sellami H., Cheikhrouhou F., Neji S., Makni F. y Ayadi A. 2012. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathology of Biology*, 60 (6): 399-405.
- Vandamme P, Falsen E, Rossau R, Hoste B, Segers P, Tytgat R y De Ley J. 1991. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Journal of System Bacteriology*, 41: 88-103.
- Villagrana, L. J. 1992. Análisis sobre amibas de vida libre. UNAM. *Hoy*. Año 3: 17-22.

- Visvesvara, G. S. 1991. Classification of *Acanthamoeba*. *Journal of Infectious Diseases*. 13: 369-372.
- Weekers, P. H. H., Bodeliers, P. L. E., Wijen, J. P. H. y Vogels, G. D. 1993. Effects of grazing by the free-living soil amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga* and *Hartmanella vermiformis* on various bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 59: 2317-2319.
- Williams, P. J. L. 1981. Incorporation of microheterotrophic processes into the classical paradigm of the planktonic food web. *Kiel. Meeresforsch.* 5: 11-28.
- Wood G. L. y Gutierrez Y. 1993. Blood and Tissue Protozoa. *Acanthamoeba* and *Leptomyxid* amoeba. En: G. L Woods y Y. Gutierrez (Eds). *Diagnostic Pathology of Infectious Diseases*. Philadelphia. Lea & Febirger. 502-503.
- Zenteno Robledo E. 2012. *Comunidades de Amebas de Vida Libre en Cuatro Galerías de la Gruta "Entrada Dos Cerros", Tacotalpa, Tabasco, México*, (Tesis Maestría). UNAM, México.

12. ANEXOS

Información de AVL encontradas en este muestreo

12.1. **Posición taxonómica de AVL**

Supergrupo: Amoebozoa Lühe 1913, emend. Cavalier-Smith 1998

- Discosea Cavalier-Smith *et al.*, (2004)
- Longamoebia Cavalier-Smith and Smirnov en Smirnov *et al.*, 2011
- Dermamoebida Cavalier-Smith, 2004

Mayorella Schaeffer, 1926

- Flabellinia Smirnov *et al.*, 2005
- Dactylopodida Smirnov *et al.*. 2005

Korotnevella Goodkov, 1988

- Vannellida Smirnov *et al.*, 2005

Platyamoeba Page, 1969

Vannella Bovee, 1970

- Tubulinea Smirnov *et al.*, 2005
- Euamoebida Lepšić 1960, emend. Smirnov *et al.*, 2011

Glaeseria Volkonsky, 1931

Supergrupo: Excavata Cavalier-Smith 2002, emend. Simpson 2003

- Discoba Simpson en Hampl *et al.*, 2009(R)
- Discicristata Cavalier-Smith 1998
- Heterolobosea Page & Blanton 1985
- Tetramitia Cavalier-Smith 1993, emend. Cavalier-Smith en Cavalier-Smith y Nikolaev 2008

Vahlkampfia

12.2. **Riqueza específica de AVL en los tres sistemas de cenotes (Tzabnáh, X-Batún y D- Zombakal).**

Cuadro 11. Especies de AVL, Tzabnáh

Especies amibianas	Cenote/muestra		1		2		3		4		5		7		8		9		11	
	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	M2(S+A+BF)	
<i>Acanthamoeba</i> sp.	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dactylamoeba</i> sp.	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glaeseria</i> sp.	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Korotnevella</i> sp.	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mayorella</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Naegleria gruberi</i>	X	X	-	-	X	-	X	X	-	X	X	-	X	-	X	-	X	-	X	X
<i>Platyamoeba</i> sp.	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rosculus ithacus</i>	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stachyamoeba lipophora</i>	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vahlkampfia</i> sp.	X	-	-	X	X	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-	-

Cuadro 12. Especies de AVL, X-Batún

Especies amibianas	Zona		1		2		3		4		5	
	S	BP	BF	BR	Bra	S2	BR1	BR2	BM			
<i>Acanthamoeba</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glaeseria</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hartmannella</i> sp.	X	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-
<i>Korotnevella</i> sp.	-	X	-	-	X	-	X	-	-	-	X	-
<i>Mayorella</i> sp.	-	-	X	-	-	-	X	X	-	-	-	-
<i>Naegleria gruberi</i>	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X
<i>Platyamoeba</i>	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
<i>Rosculus ithacus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stachyamoeba lipophora</i>	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vahlkampfia</i> sp.	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 13. Especies AVL, D-Zombakal

	Cenote/Gruta	Tzabnáh	X-Batún	D-Zombakal
Especies ambianas	<i>Acanthamoeba sp.</i>	X	-	-
	<i>Glaeseria sp.</i>	X	-	-
	<i>Hartmannella sp.</i>	-	X	-
	<i>Korotnevela sp.</i>	X	X	-
	<i>Mayorella sp.</i>	-	X	-
	<i>Naegleria gruberi</i>	X	X	-
	<i>Platyamoeba sp.</i>	X	X	-
	<i>Rosculus ithacus</i>	X	-	-
	<i>Stachyamoeba lipophora</i>	X	X	-
	<i>Thecamoeba sp.</i>	-	X	-
	<i>Vahlkampfia sp.</i>	X	-	X
<i>Vannella sp.</i>	-	X	-	
Total	8	8	1	

Cuadro 14. Comparación de AVL entre los cenotes Tzabnáh, X-Batún y D-Zombakal

Especies ambianas	Zona	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	Biotopo	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>Acanthamoeba sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dactylamoeba sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glaeseria sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Korotnevela sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mayorella sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Naegleria gruberi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Platyamoeba sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rosculus ithacus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stachyamoeba lipophora</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vahlkampfia sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

12.3. Especie de amiba de vida libre no identificada

Se realizó un registro de varios ejemplares de una especie de *Acanthamoeba* sp. 1 (Fig. 1 de los anexos) que no se logró identificar morfológicamente.

Quiste liso, con poros aproximadamente seis poros de desenquistamiento, mide 14.76 μm .

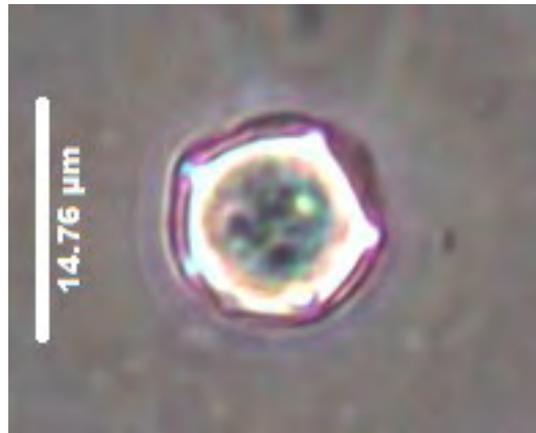


Figura 1. Especie no identificada, posible *Acanthamoeba* sp. 1

12.4. Soluciones e infusiones para medios de cultivo semisólido y líquido

a) Extracto líquido de suelo

Puntos que considerar antes de preparar el extracto de suelo:

- 1.-Suelo de jardín, evite usar suelo de bosque o un tipo de suelo que tengan un exceso de materia orgánica, arena o arcilla.
- 2.-Deje secar el suelo al sol aproximadamente tres días antes de usarlo, el tiempo dependerá de la cantidad de humedad que contenga el mismo.
- 3.-Cuando el suelo este completamente seco, se pasará a través de diferentes tamices, esto con la intención de dejar el suelo lo más fino posible.

Procedimiento

1.-Mezclar el suelo con el agua siguiendo estas proporciones:

	Botella(500mL)	Botella(250mL)	Tubo
Suelo de jardín	52g	35g	2g
Agua destilada	330mL	220mL	15mL

2.-Mezclar la cantidad de suelo con el volumen de agua destilada de acuerdo con las proporciones señaladas.

3.-Filtrar la mezcla con un filtro de café

4.-Esterilizar en autoclave a 15psi, 121 °C durante 15min.

b) Extracto de suelo con sales

Materiales

- Extracto liquido desuelo.....10ml
- K₂HPO₄, 0.1 %p/v.....2ml
- MgSO₄.7H₂O, 0.1 %p/v.....2ml
- KNO₃ 1.0%p/v.....2ml
- Agua destilada.....84ml

Procedimiento

1. Mezclar los volúmenes de cada solución y esterilizar en autoclave a 15psi, 121 °C durante 15min.

c) Solución Prescott- James (para *Amoeba proteus*)

Realiza tres soluciones stock, cada una con 100ml de agua destilada

Solución stock A CaCl₂.2H₂O □ 0.433g KCl □ 0.162g

Solución stock B K₂HPO₄ □ 0.512g

Solución stock C MgSO₄.7H₂O □ 0.280g

Procedimiento

1. Combinar 1ml de cada solución stock y aforar a 1 litro con agua destilada para obtener la solución final.
2. Esterilizar en autoclave a 15psi, 121 °C durante 15min.

d) Infusión de granos

Use granos los cuales no hayan sido tratados con fungicidas o insecticidas.

1. Pasar ligeramente los granos por la flama de un mechero.
2. Colocar el agua destilada en un vaso de precipitado o matraz.
3. Colocar los granos.
4. Calentar hasta ebullición y dejar calentando hasta alcanzar el tiempo recomendado para cada grano.

Tiempo de cocción por cada tipo de grano:

- Cebada, avena y arroz integral: dos o tres granos por cada 25 a 30 ml de agua. Hervir por 5 minutos
- Alpiste: 10 a 12 granos por cada 25 a 30 ml de agua. Hervir por 5 minutos.
- Maíz: Use granos de maíz secos, uno por cada 25 a 30 ml de agua. Hierva por 10 minutos, luego haga un hoyo a lado de cada grano de maíz
- Mijo: Alrededor de 5 granos por cada 25 a 30 ml de agua. Hierva por un minuto.
- Arroz integral: 2 a 3 granos por cada 25 a 30 ml de agua. Hervir solamente el agua por cinco minutos, dejar enfriar y agregar los granos de arroz.

e) Infusión de planta (Cerophyl 0.15%)

Material

- Cerophyl..... 0.15 g
- Agua destilada..... 100 ml
- Filtro de café
- Parrilla eléctrica
- Potenciómetro

Procedimiento

1. Disolver 0.15 g de cerophyl en 100 ml de agua destilada, llevar a ebullición y después hervir a fuego lento por 10 minutos.
2. Clarificar la infusión pasándola a través de un filtro de café, posteriormente el pH del filtrado será ajustado a 7 usando 0.1M de NaOH.
3. Esterilizar en autoclave a 15psi, 121 °C durante 15min.

f) Medio líquido con solución Prescott-James

Reactivos

- Solución Prescott –James (estéril)
- Extracto de suelo con sales(estéril)
- Infusión de granos (trigo, maíz, arroz)
- Infusión de planta (Cerophyl 0.15%)(estéril)
- Tubo de concentrado de Enterobacter aerogenes inactivada por calor
- Concentrado de muestra centrifugada
- Arena de mar (estéril) (Usar para cultivo de amibas tecadas)

Material

- Placa de 6 pozos para cultivo celular
- Pipetas Pasteur estériles
- Mecheros
- Pipeta de 1 ml estéril
- Pinzas

Procedimiento

1. Agregar 1mL de la solución Prescott-James en cada pozo de la placa de cultivo celular a utilizar.
2. Posteriormente agregar la cantidad de las soluciones en la siguiente proporción:

Extracto de suelo con sales (4gotas)

Infusión de granos (3 gotas por cada infusión de trigo, maíz y arroz)

Infusión de planta (3 gotas)

Tubo de concentrado de Enterobacter aerogenes (1gota)

Concentrado de la muestra centrifugada (6 gotas)

***Arena de mar (estéril): Agregar una pizca de granos de arena**

3. Dejar a temperatura ambiente o colocar en incubadora según sea el objetivo de estudio

g) Medio NNE (Agar no Nutritivo)

Reactivos:

- NaCl -----> 0.12 g
- MgSO₄.7H₂O ----->0.004 g
- Na₂HPO₄----->0.146 g
- CaCl₂.2H₂O ----->0.004 g
- KH₂PO₄----->0.136 g
- Bactoagar -----> 15 g
- Agua destilada----->1000 ml

Procedimiento:

Mezclar en seco todos los componentes, agregar primero 500 ml y agitar hasta homogeneizar la solución, posteriormente aforar a 1L.

Calentar hasta ebullición hasta disolver el agar

Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos

Verter en caja Petri (15 ml aproximadamente)

Al solidificar el agar, se coloca 4 gotas de un cultivo puro de Enterobacter aerogenes inactivado por calor, se distribuye homogéneamente con un asa de vidrio estéril.

Dejar reposar 1 hora aproximadamente

Guardar en el refrigerador de manera invertida

h) Medio semisólido con medio NNE y solución Prescott-James

Reactivos

- Medio NNE
- Solución Prescott –James (estéril)
- Extracto de suelo con sales(estéril)
- Infusión de granos (trigo, maíz, arroz)
- Infusión de planta (Cerophyl 0.15%)(estéril)
- Tubo de concentrado de Enterobacter aerogenes inactivada por calor
- Concentrado de muestra centrifugada
- ***Arena de mar (estéril) (Usar para cultivo de amibas tecadas)**

Material

- Cajas Petri
- Pipetas Pasteur estériles
- Mecheros
- Pinzas

Procedimiento

1. Vaciar medio NNE en cajas Petri aproximadamente con 5mm de grosor
2. Posteriormente agregar la cantidad de las soluciones en la siguiente proporción:

Solución Prescott –James (6 gotas)

Extracto de suelo con sales (4 gotas)

Infusión de granos (3 gotas por cada infusión de trigo, maíz y arroz)

Infusión de planta (3 gotas)

Tubo de concentrado de Enterobacter aerogenes (1gota)

Concentrado de la muestra centrifugada (6gotas)

***Arena de mar (estéril): Agregar una pizca de granos de arena**

3. Dejar a temperatura ambiente o colocar en incubadora según sea el objetivo de estudio