



*Universidad Nacional Autónoma de
México*

*Facultad de Estudios Superiores
Iztacala*

***“RIQUEZA ESPECÍFICA DE AMIBAS DE VIDA LIBRE
EN EL ACUIFERO DE TEPALCINGO-AXOCHIAPAN,
MORELOS”***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIOLOGO

PRESENTA:

Antonio Cruz Sandoval

Directora de Tesis:

M. en C. Elizabeth Ramírez Flores

Los reyes Iztacala, Estado de México 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mi madre Bárbara Sandoval y a mi padre Tereso Cruz, por apoyarme económica y moralmente hasta el último momento en cursar la carrera. Fueron muy tolerantes.

A mis hermanos Eduardo y Gerardo, en poder ser un ejemplo para que cursen sus carreras con mucho éxito.

AGRADECMIENTOS

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por facilitarme sus instalaciones y laboratorios para formarme como biólogo, así como crear un excelente ambiente de trabajo.

A mi directora de tesis M. en C. Elizabeth Ramírez Flores por su apoyo y GRAN disposición para guiarme en el ámbito de la investigación.

A los profesores:

DRA. Patricia Bonilla Lemus

QFB. Esperanza del Socorro Robles Valderrama

MTRO. Ricardo Ortiz Ortega

MTRA. María Dolores Hernández Martínez

Por su disponibilidad de tiempo.

INDICE

I.	RESUMEN.....	4
II.	INTRODUCCION.....	5
III.	MARCO TEORICO.....	6
	A) Amibas de vida libre.....	6
	B) Agua subterránea.....	11
	C) Microorganismos presentes en aguas subterráneas.....	13
IV.	ANTECEDENTES	14
V.	ÁREA DE ESTUDIO	16
VI.	JUSTIFICACIÓN.....	22
VII.	OBJETIVOS	22
VIII.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
	I. Trabajo en campo.....	23
	II. Trabajo de laboratorio.....	23
IX.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
X.	CONCLUSION.....	46
XI.	REFERENCIAS	47

I. RESUMEN

Las amibas de vida libre (AVL) se distribuyen en la zona de la rizófora y alrededor del suelo circundante; sin embargo también pueden alcanzar la zona vadosa de los sistemas de agua subterráneos. A mediados de este siglo se descubrió que algunas amibas del suelo y del agua, podían invadir a los seres humanos así como a otros animales pudiendo causarles la muerte o un daño cerebral irreversible. La presente investigación tuvo como objetivo determinar la riqueza específica de las amibas de vida libre que se encuentran presentes en el acuífero de Tepalcingo-Axochiapan en el Estado de Morelos. Los pozos estudiados se encuentran en los municipios de Zacualpan de Amilpas, Jantetelco, Jonacatepec, Telpancingo y Axochiapan. La metodología se dividió en dos fases. Se realizaron 6 muestreos en 9 pozos del acuífero del Tepalcingo-Axochiapan durante un año, se recolectaron 1000 ml de agua subterránea. Se midieron los parámetros fisicoquímicos; pH, oxígeno disuelto, temperatura y sólidos disueltos. En el laboratorio se llevó a cabo el aislamiento y cultivo de AVL en medio de Agar no nutritivo con la bacteria *Enterobacter aerogenes* (NNE) incubándose a 30°C durante ocho días. La identificación de las amibas se realizó tomando en cuenta las características morfológicas de la fase trófica y de la fase quística siguiendo las claves taxonómicas de Page (1988). La especie más frecuente fue *Vermamoeba vermiformes* con 28% similar a lo reportado en el acuífero de Cuernavaca (24%) (Beltrán, 2008), pero menor a lo reportado en el acuífero de Zacatepec (41%) (Limón, 2007; Vicente, 2009). Las segundas especies más frecuentes fueron *Naegleria sp.*, y *V. bacillipedes* con un 12% las cuales no se ha reportado como patógenas, siendo *Naegleria sp* probablemente *N. gruberi*, por las características morfológicas de su quiste y la temperatura de crecimiento. Las especies menos frecuentes fueron catorce con 1% cada una, siendo *A. polyphaga*, la única que se ha reportado como patógena. El Balneario Aurora presento el mayor número de aislamientos debido a que el pozo del es abierto y se encuentra dentro de un balneario rústico rodeado por árboles frutales, lo que permite que este expuesto a la contaminación por suelo y aire. Abril fue el mes donde se presentó un mayor número de aislamientos. La presencia de amibas de vida libre no patógenas, no representa peligro para la salud, pero en el caso de la presencia de *Vermamoeba*, *Vahlkampfia* y *Vannella*, en donde existe sospecha que pueden causar enfermedades y sobre todo la de *A. polyphaga*, es una llamada de atención para tener precaución en el uso del agua y no descuidar su desinfección.

II. INTRODUCCION.

Las amibas de vida libre (AVL) son los principales depredadores que controlan las poblaciones bacterianas en los suelos. Estas se distribuyen en la zona de la rizófora y alrededor del suelo circundante; sin embargo también pueden alcanzar la zona vadosa de los sistemas de agua subterráneos. Las AVL viven en las interfaces: agua-suelo, agua-animal, agua-plantas, agua-aire, etc., donde se alimentan de bacterias, hongos, levaduras, algas, y protozoos incluyendo otras amibas (Anderson, 1988). Las AVL ayudan a mantener las altas tasas de mineralización de materia orgánica a través de la depredación bacteriana, por lo que sus dinámicas de población están estrechamente ligadas. Este acoplamiento es muy importante para la estabilidad y la productividad de comunidades biológicas (Stout, 1980). En este sentido amibas y protozoarios en general, incrementan el reciclado de nutrientes, acoplando los niveles tróficos más bajos con los más altos (Pimm y Lawton, 1977).

Las AVL potencialmente patógenas se han encontrado en ambientes como; lagos, piscinas, aguas termales, aguas para el enfriamiento de centrales eléctricas y en el agua de grifo, también en unidades de aire acondicionado y agua mineral embotellada (Gianinazzi *et al.*, 2009).

Durante la primera mitad del siglo XX, las AVL eran conocidas como "amibas del suelo", protozoos no patógenos, ubicados en suelos y agua, utilizados como modelos en estudios de biología celular. Posteriormente a mediados de este mismo siglo se descubrió que algunas amibas del suelo y del agua, podían invadir a los seres humanos así como a otros animales pudiendo causarles la muerte o un daño cerebral irreversible. Algunas AVL infectan al sistema nervioso central (CNS) y son agentes causantes de meningoencefalitis amebiana primaria (MAP) y encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) (Martinez, 1991). Las especies patógenas para humanos se ubican dentro de los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Sappinia* (Visvesvara y Maguire, 2006). Su diagnosis clínica ha mejorado en los últimos años, incluyendo el conocimiento de su ultraestructura, bioquímica, fisiología y su biología molecular. Sin embargo el estudio de su ecología es todavía escaso y hay muy poca investigación.

III. MARCO TEORICO.

A) Amibas de vida libre.

- Características generales

Las amibas pertenecen al filo protozoa, son organismos altamente diversos y ampliamente distribuidos en la naturaleza, son de forma variada, muchas de estas especies presentan dos estadios de desarrollo; la de trofozoito y la de quiste que es una forma de resistencia cuando se encuentran en condiciones ambientales adversas (Thomas *et al.*, 2008).

Acanthamoeba spp

Los trofozoítos son pleomórficos, tienen una vacuola contráctil, polaridad antero-posterior, seudópodos con apariencia de espinas (acantópodos), núcleo también con nucleolo grande, central y su tamaño oscila entre 15 - 50 μm . Los quistes son esféricos, con doble pared, la externa lisa y la interna poligonal, estelar o globular, presentan poros y miden de 10 - 25 μm (Schuster y Visvesvara, 2004).

Es un protozoario muy común distribuido en el suelo y el agua. Tiene una distribución cosmopolita y se ha aislado de una gran cantidad de hábitats, es por eso que los seres humanos y animales pueden estar en contacto con estas amibas causándoles graves enfermedades. Soporta temperaturas alrededor de los 37°C, aunque se han reportado especies a temperaturas de 4° C. Tiene dos fases de vida, trofozoito y quiste. En la primera presenta multi pseudópodos, un núcleo vesicular con nucléolo. En la forma de quiste se compone de una doble pared de celulosa con porosidad (Schuster y Visvesvara, 2004).

Naegleria fowleri

Los trofozoítos son alargados, con un uroide en el extremo posterior, ectoplasma claro y endoplasma en el que se aprecian vacuolas digestivas, contráctil, mitocondrias pleomórficas, gránulos, núcleo vesicular con halo claro y un nucleolo grande y central. Miden entre 15 - 25 μm y emiten seudópodos anteriores de movimiento rápido de extremo redondeado (lobópodos). Los quistes tienen una doble pared lisa, poros con tapones mucosos, son esféricos, presentan granulaciones escasas, núcleo y miden entre 8 - 12 μm . Es una amiba que presenta una etapa flagelada transitoria, por lo regular con dos flagelos (Visvesvara *et al.*, 2007).

Balamuthia mandrillaris

Esta amiba fue aislada a finales de los 80's de un mandril en San Diego California. Presenta una etapa vital en forma de trofozoito más grande que *Acanthamoeba* y *Naegleria*, presenta pseudópodos y otra etapa en forma de quiste que presenta

una pared triple, la interior ondulada, la media, fibrilar y la exterior delgada e irregular, con protruberancias. Los trofozoitos miden de entre 15 - 60 μm y el quiste es 10 – 30 μm (Visvesvara *et al.*, 1993; Schuster y Visvesvara, 2004)

Sappinia pedata

Originalmente esta amiba se identifico como *S. diploidea*, pero recientemente fue reclasificada como *S. pedata* (Ovarnstrom *et al.*, 2009). Las etapas de vida (trofozoito y quiste) de esta amiba son binucleares. El trofozoito es ovoide y con vacuolas contráctiles. El quiste es redondo con un diámetro de 15-30 μm (Visvesvara *et al.*, 2007).

- Ecología.

Las amibas de vida libre (AVL) pueden vivir en un amplio rango de diversos ambientes, sin embargo su estudio es complicado debido al tamaño de estas amibas en comparación con las escalas de los ecosistemas. Las AVL viven en las interfaces; suelo-agua, animales-agua, plantas-agua, aire-agua, etc. donde se alimentan de bacterias, hongos, algas y protozoarios incluyendo amibas.

Las AVL desarrollaron dos estrategias para sobrevivir bajo condiciones adversas; formando quistes y produciendo pequeños y numerosos organismos para el aprovechamiento de la acumulación temporal de alimento, esta última estrategia puede ser observada en amibas que no forman quistes. Las AVL juegan un papel importante en la depredación de bacterias por lo que sus dinámicas de población están estrechamente ligadas, este acoplamiento es muy importante para la estabilidad y productividad de comunidades biológicas debido al reciclado y aporte de nutrientes. En este sentido amibas y protozoos en general, incrementan el reciclado de nutrientes, acoplando los niveles tróficos más bajos con los más altos. De esta manera la eficiencia de los protozoarios en la síntesis de biomasa es cerca del 50-70%. Estas amibas también representan una reserva de carbono y nutrientes minerales cuando están en estado de enquistamiento. Por eso estas reservas son esenciales para la estabilidad y productividad de comunidades de plantas y animales, debido a que en esta fase fisiológica solo sirven como acumulación para sedimentos (Zaragoza, 1994).

La porosidad del suelo influye en la distribución de los microorganismos, favoreciendo así la distribución de las pequeñas amibas. Las AVL tienen importancia directa en el crecimiento de raíces, mineralización y el ciclo de nutrientes en los suelos. La participación de estas amibas en el ciclo del nitrógeno es posible y eficiente debido a que estas no necesitan pre sintetizar purinas ni pirimidinas. La presencia de estos protozoarios en la rizófora es importante porque su depredación bacteriana incrementa el reciclado de fosforo y nitrógeno (Zaragoza, 1994).

Las amibas del suelo pueden adaptarse a los ambientes de agua dulce, llegando ahí con frecuencia como quistes llevados por las corrientes de agua, movimientos

de aire, o adheridos al cuerpo de los animales. Su actividad en la columna de agua depende de la cantidad de partículas de materia suspendida ya que se adhieren a estas para alimentarse y completar su ciclo de vida (O'Dell, 1979).

Las AVL utilizan a las algas como substrato y como una fuente de alimento cuando existen bacterias asociadas (Wright *et al.*, 1981). Los sedimentos de los lagos profundos pueden albergar una gran cantidad de actividad amebiana debido a que tienen una mayor difusión de oxígeno en comparación con otros cuerpos de agua como los océanos que solo pueden localizarse en la zona litoral (Pimm y Lawton, 1977).

Las AVL pueden encontrarse en ambientes marinos, aunque no es muy frecuente que las amibas patógenas del suelo puedan sobrevivir en estas condiciones, a excepción del género *Acanthamoeba* (Sawyer, 1980). Estas especies de amibas pueden sobrevivir en el agua debido a su tolerancia a los cambios fuertes de la osmolaridad y de otras situaciones adversas que la mayor parte de las especies terrestres no resisten.

La abundancia estacional de AVL termotolerantes parece estar relacionada a los cambios de temperatura donde se ha reportado que los niveles más altos en densidad poblacional en agua dulce de ambientes naturales son en Verano (Kyle y Noblet, 1985). Sugiriendo que pueden resistir condiciones anóxicas y reductivas en el sedimento. Resisten un pH de 7.6 aunque algunas pueden tolerar hasta 8.6. Pueden tolerar temperaturas de entre 10 y 30°C aunque las especies patógenas pueden resistir hasta 45°C (Zaragoza, 1994).

El factor principal en la distribución de *Acanthamoeba* en el agua y el suelo es la presencia de alimento bacteriano. Es una amiba termo tolerante, que soporta amplios rangos de salinidad y pH, es por eso que la termo tolerancia es necesaria pero no suficiente para las infecciones en mamíferos. Las aguas dulces cálidas junto con la disponibilidad de alimento bacteriano son el hábitat ideal para *Naegleria sp.* Pueden resistir temperaturas alrededor de los 23°C soportan hasta 1mg/ml de cloro en el agua. Sobre la ecología de *Balamuthia mandrillaris* se sabe poco. Estas amibas se alimentan de otros protozoario, su mayor distribución es en el suelo, pero no deja de invadir también ambientes acuáticos. *Sappinia pedata* se ha aislado de diversos ambientes del suelo y agua pero mayor mente se ha aislado de las heces de los mamíferos incluyendo a los humanos. Los quistes soportan el jugo gástrico así como emulsiones características de la bilis (Schuster y Visvesvara, 2004).

Además a nivel mundial, el interés sobre la patología de AVL se ha estado incrementando, como lo muestran los numerosos estudios que se han hecho en los últimos 20 años documentando la importancia de las AVL en la salud humana (Khan, 2006). Sin embargo la ecología de estas en ambientes acuáticos todavía es escasa.

- Importancia médica.

Las amebas de vida libre patógenas tienen la capacidad de existir como organismos de vida libre en la naturaleza, pero también tienen la capacidad de vivir como parásitos dentro del tejido de su hospedero, por lo que se les ha denominado también amibas anfizoicas (Visvesvara, *et. al.* 2007). *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba spp.*, *Balamuthia mandrillaris* y *Sappinia pedata* son patógenos para los seres humanos y animales. Son agentes causales de la Meningoencefalitis Amebiana primaria (MAP), Encefalitis Amebiana Granulomatosa (EAG) y queratitis amebiana (Schuster y Visvesvara 2004).

Acanthamoeba spp

En un principio fue reconocida como un contaminante en cultivos de tejido de los primeros reportes publicados acerca de esta amiba. Algunas amibas en estos cultivos fueron identificadas equivocadamente como virus de Ryan, o como virus citopáticos, cuando se cultivaban durante periodos más prolongados (Willaert, 1974). Trabajos recientes sobre AVL patógenas comenzaron cuando Culbertson y col. en 1958, hicieron pruebas en un cultivo de tejido. Fowler y Carter en 1965 en Australia detectaron los primeros casos de MAP en seres humanos, especulando que era la misma amiba encontrada por Culbertson. Sin embargo, posteriormente se determinó que los casos fueron debido a *Naegleria*.

La amiba encontrada por Culbertson se clasificó como *Acanthamoeba* y se determinó que era la causante de una enfermedad multifocal que se denominó Encefalitis Amebiana Granulomatosa (EAG), una enfermedad crónica del sistema nervioso central (CNS), que se presenta en hospederos inmunocoprometidos (Morales *et al.*, 2005). Por lo que la EAG, como enfermedad oportunista, puede adquirirse en cualquier momento del año, y no sigue un patrón estacional. El inicio de los síntomas son lentos e insidiosos y se desarrollan como una enfermedad crónica que va de varias semanas a meses, manifestando en el hospedero; dolor intenso de cabeza y cuello, anormalidades en el estado mental, náuseas, vómito, fiebre, letargo, ataxia cerebral, disturbios visuales y coma. También se han reportado casos de parálisis facial con entumecimiento, dando por resultado asimetría facial. Los hemisferios cerebrales son usualmente los más afectados del tejido del CNS. *Acanthamoeba spp.* También causa infecciones en el CNS de animales, incluyendo gorilas, monos, perros, bóvidos, caballos, y canguros así como pájaros, reptiles, anfibios, pescados e incluso algunos invertebrados).

Acanthamoeba también puede causar queratitis y pneumonitis. En la queratitis se presenta una infección en la superficie de la cornea del ojo, ya sea por un trauma o por cuidado incorrecto de los lentes de contacto. Los síntomas incluyen dolor, lagrimeo y fotofobia (Visvesvara *et al.*, 2007)

Naegleria fowleri

Casos de *Naegleria* en humanos se reportaron por primera vez en 1965 por Fowler y Carter, quienes estudiaron a cuatro pacientes con Meningoencefalitis

Amebiana Primaria (MAP) en Australia. El término "Meningoencefalitis Amebiana Primaria fue usado por Butt en 1965 y después por Carter 1966, para distinguir de la infección causada por *Entamoeba Histolytica* (Cabral, 1988).

Naegleria fowleri causa una enfermedad aguda llamada Meningoencefalitis Amibiana Primaria principalmente en niños y jóvenes adultos que pudieran haberse expuesto recientemente a aguas naturales como ríos, lagos o charcas. La enfermedad se complica rápidamente y sin la diagnosis correcta las personas infectadas pueden llegar a morir en menos de una semana después de la aparición de los primeros síntomas. Los síntomas son dolor de cabeza bifrontal o bitemporal, fiebre alta, rigidez en la nuca, nauseas, y vomito. La fotofobia ocurre en un estado más avanzado seguida de anomalías neurológicas incluyendo letargo, confusión, coma y finalmente la muerte (Visvesvara *et al.*, 2007).

La anfotericina B ha tenido éxito en el tratamiento de la enfermedad en humanos, cuando se ha aplicado en las primeras etapas. De forma experimental, en ratones infectados con *N. fowleri*, han mostrado un marcado sinergismo entre anfotericina B y tetraciclina para controlar la meningoencefalitis (Shin & Im, 2004).

Balamuthia mandrillaris.

La patología de la enfermedad causada por esta amiba, es similar a la de *Acanthamoeba*. Se sitúa de igual manera en el cerebro causando necrosis hemorrágica en el tálamo, medula oblongada y el cerebelo. *Balamuthia* infecta a niños y a individuos que no necesariamente presentan inmunodeficiencia. Pacientes con EAG por *Balamuthia* presentan lesiones en la piel facial o rinitis con infección en las cavidades nasales u otitis media. Estas lesiones son comúnmente en la cara, aunque también pueden ocurrir en el tronco, manos y pies. Los síntomas en el CNS se manifiestan inicialmente como dolor de cabeza y fotofobia, seguida de nauseas y vomito, fiebre con mialgia y pérdida de peso. El tiempo entre las lesiones en la piel y el inicio de los síntomas neurológicos pueden abarcar de entre un mes hasta dos años (Visvesvara *et al.*, 2007).

No se conoce tratamiento para la encefalitis causada por *B. mandrillaris*, aunque estudios experimentales indican que las amibas son sensibles a pentamidina, isotionina, azitromicina y claritromicina (Shin & Im, 2004).

Sappinia pedata.

Poco se sabe sobre la patología de esta amiba, en el único caso reportado se observo una encefalitis, pero sin la presencia de granulomas. Los síntomas comunes son dolor de cabeza, visión borrosa, fotofobia y vomito (Schuster & Visvesvara, 2004).

AVL como portadoras de patógenos.

Además de su propio potencial patógeno, las AVL pueden ser un depósito de bacterias patógenas, por ejemplo *Legionella pneumophila* y *Mycobacterium avium* (Greub y Raoult, 2004). Estos microorganismos amibo-resistentes incluyen no solamente bacterias sino también virus y hongos que son adquiridos por las amibas mediante la fagocitosis y se repliegan dentro del citoplasma. Las amibas entonces protegen a los microorganismos de las condiciones ambientales adversas (Horn y Wagner 2004).

B) Agua subterránea

Toda el agua que se encuentra en forma natural por debajo de la superficie terrestre se llama agua subsuperficial, independientemente de que se encuentre en la zona saturada o no saturada. El agua en la zona saturada, es decir la que se encuentra debajo del nivel freático, se le llama agua subterránea. Para comprender mejor estos términos y de cómo el agua se encuentra en el subsuelo es preciso mencionar la estructura del subsuelo.

La corteza está constituida de varios tipos de roca las cuales contienen poros u espacios independientemente de su tipo edad u origen. Esta misma porosidad también la presenta la tierra, la cual puede albergar total o parcialmente agua en esa porosidad, los poros pequeños están llenos de agua mientras que los más grandes están casi vacíos, pero a grandes profundidades todos los poros en general están llenos de agua describiéndose a este material como “saturado”. En términos científicos se dice que se pasa de la zona no saturada a la zona saturada. Al nivel que está debajo de todos los poros llenos de agua, es decir el nivel superior de la zona saturada, se le denomina nivel freático. La distancia en que el nivel freático está de la superficie terrestre varía de lugar a lugar, porque no es plano, se eleva y baja dependiendo del terreno en una forma desigual. Esto también lleva a que el agua subterránea no está distribuida uniformemente en la corteza terrestre.

Un aspecto importante de la distribución del agua subterránea es, hasta qué punto las rocas son porosas, si son de baja porosidad, contendrán volúmenes pequeños de agua. También influye, el grado en que los poros están intercomunicados porque esto controla la facilidad con que el agua fluye a través de la roca, a esta propiedad se le llama permeabilidad, es por esta razón que al materia que permite fluir el agua fácilmente se le denomina permeable y a los que dificultan esta acción se les denomina impermeables. Por esta razón una roca que no tiene espacios, excepto una o dos aberturas, tendrá una porosidad baja y almacenará agua en cantidades muy limitadas, pero como el agua puede pasar fácilmente por las fracturas, su permeabilidad será alta. A las capas de roca o de material no consolidado lo suficientemente porosas para almacenar agua, y con la permeabilidad necesaria para permitir que el agua fluya a través de ellas en cantidades económicas y de calidad deseable, se les denomina acuíferos.

En si un acuífero es una formación geológica, grupo de formaciones o parte de una formación que contiene material saturado o suficientemente permeable para proveer de cantidades significativas de agua a pozos y manantiales.

- Tipos de acuíferos.

Acuíferos colgados.

Se presentan por debajo del nivel freático una o más capas de material de baja conductividad hidráulica. El agua que se infiltra es determinada por esta capa formar una lente de agua, la cual es generalmente de extensión limitada y se encuentra sobre la zona de saturación del acuífero principal (fig. 1). A este tipo de cuerpo se le llama acuífero colgado (y a su límite superior, nivel freático colgado) debido a que el agua subterránea en el lente está colgada por arriba de la zona saturada. Los acuíferos colgados son más comunes de lo que en ocasiones se piensa; aunque a veces miden unos cuantos centímetros de espesor, o solo se presentan después de una gran infiltración, en otros casos pueden tener varios metros de grosor y extenderse por distancias considerables. Los acuíferos colgados no constituyen fuentes de abastecimiento confiables para lapsos largos; a menudo sucede que la perforación de estos acuíferos, o la profundización de pozos, traspasan la capa de baja permeabilidad subyacente y ocasiona que el agua se escape al drenar por esa vía.

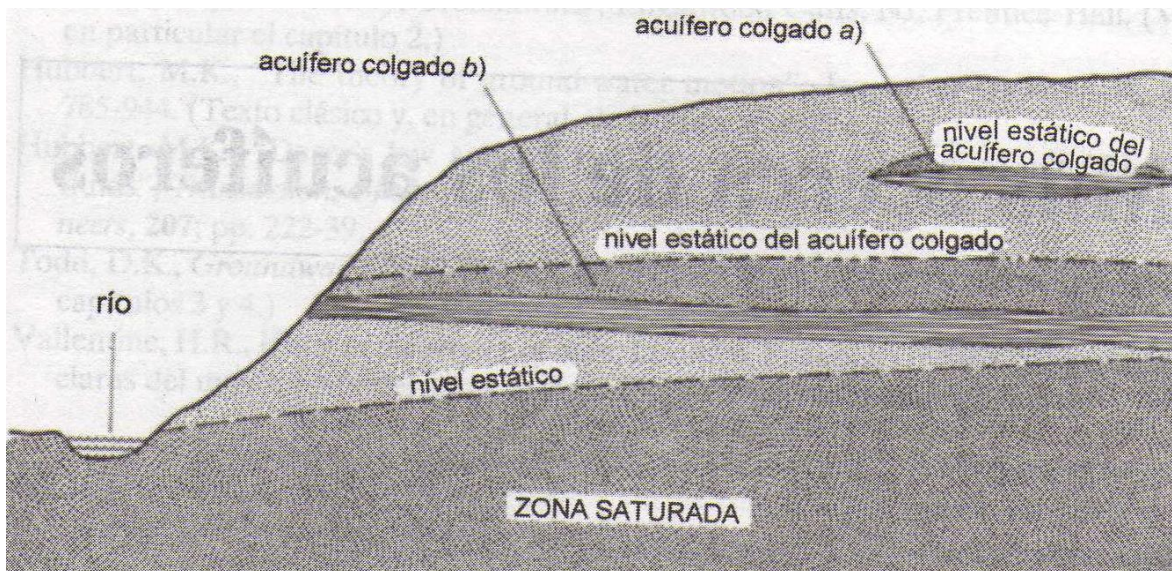


Figura 1. Situación común que ocasiona la presencia de acuíferos colgados

Acuíferos confinados.

El espesor efectivo de este tipo de cuerpo se encuentra entre dos capas de baja permeabilidad, y en cualquier lugar la presión es mayor que la atmosférica. A estos acuíferos también se les llama acuíferos artesianos (fig. 2). Tienen una zona de recarga y descarga que están topográficamente controladas, el flujo de estos

acuíferos es de muchas maneras. En un acuífero confinado los gradientes hidráulicos verticales se incrementan por la presencia de la capa confinante que cubre el acuífero.

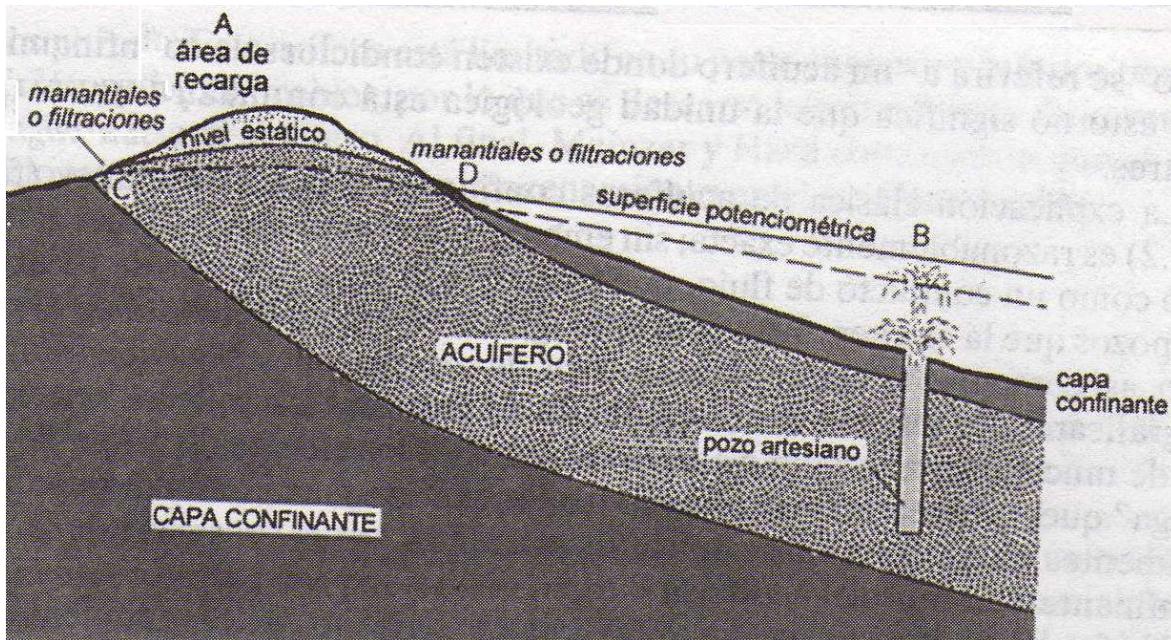


Figura 2. Explicación clásica de un pozo artesiano

Acuíferos no confinados o libres.

En estos la parte superior de la zona saturada (el nivel freático) está a la presión atmosférica. A cualquier profundidad por debajo del nivel freático la presión es más grande que la atmosférica, y en cualquier punto arriba de este nivel la presión es menor que la atmosférica. (Price 2007)

C) Microorganismos presentes en aguas subterráneas.

Las primeras investigaciones microbiológicas agua subterránea indican que los procariontes fueron los microorganismos dominantes y que los eucariontes pueden estar ausentes.

Mientras que la presencia de eucariontes es baja en sedimentos de los acuíferos, hay evidencia de que en acuíferos contaminados por químicos orgánicos, la abundancia de eucariontes es mayor. En estudios recientes se ha reportado que en acuíferos contaminados con hidrocarburos poliaromáticos, muestran un número de protozoarios muy alto en la zona afectada, que fuera de esta. Esto fue interpretado como un reflejo del alto crecimiento bacteriano en la zona contaminada ya que las poblaciones significativamente altas de protozoarios se deben a la disponibilidad de la depredación bacteriana. En base a esto algunos autores sugieren que el tamaño de poblaciones de protozoarios pueden ser

usadas como evidencia para indicar contaminación química en acuíferos. (Chapelle, 1993)

IV. ANTECEDENTES

- 1) **Sinclair y Ghiorse en 1987** reportaron la presencia de protozoarios en acuíferos de Lula, Oklahoma. La mayoría de las muestras a 8 metros de profundidad tenían menos de 0.2 protozoarios/g de sedimento seco. En muestras de grava a una profundidad de 7.5 metros exhibieron de entre 2 a 5 protozoarios/g de sedimento seco. Cabe mencionar que la presencia de protozoarios en el suelo superficial de estos sitios mostro una cantidad de entre 102 a 106 células por gramo de sedimento seco.
- 2) **Novarino et al., en 1997.** Realizaron una revisión sobre el estudio sobre comunidades de protozoarios en acuíferos. Donde mediante distintas hipótesis destacan la importancia de estas comunidades microbianas en acuíferos, como; las diferencias del comportamiento en la navegación acuática entre flagelados, heterogeneidad en la alimentación y diferenciación en nichos, implicando que flagelados que se alimentan de bacterias juegan un papel importante en el control de densidades bacterianas. Y que los flagelados que se alimentan de bacterias de componentes orgánicos degradados, tienen un efecto indirecto sobre el total de las tasas de biodegradación.
- 3) **Ramírez et al. en 2006.** En un acuífero contaminado orgánicamente encontraron 289 aislamientos de AVL de los géneros: *Acanthamoeba* (67.3%), *Echinamoeba* (3.1%), *Hartmannella* (13.5%), *Mayorella* (5.5%), *Platyamoeba* (2.3%), *Vahlkampfia* (4.5%), *Vannella* (3.4%), and *Vexillifera* (0.3%). Sugiriendo que la prevalencia de *Acanthamoeba* en el agua subterránea se debe a la estructura de la pared del quiste. Del género *Acanthamoeba* el 6.5% fueron patógenas en ratones, 64.5% no fueron patógenas y el 29% fueron invasoras pero no provocaron la muerte en ratones.
- 4) **Campos en 2007.** Analizo la distribución temporal de amibas de vida libre en dos manantiales del acuífero del Valle de Cuernavaca Morelos. Encontrando un mayor número de amibas en los meses de Mayo, Junio y Julio, presentándose un decremento en los meses anteriores y posteriormente a este periodo. Se obtuvieron amibas de los géneros: *Hartmannella*, *Naegleria*, *Vannella*, *Vahlkampfia*, *Rosculus*, *Dactylamoeba*, *Platymoeba* y *Filamoeba*.
- 5) **Limón en 2007.** Realizo un estudio sobre la caracterización de amibas de vida libre presentes en el agua subterránea del acuífero de Zacatepec, Morelos. Encontrando que *Hartmannella vermiformis* fue la más frecuente

con 41.50%, seguidas de *Guttulinopsis nivea* con 0.68%, *Mayorella cultura* con 0.68%, *Vannella cirrifera* con 0.68%, *Vannella platypodia* con 0.68% y *Vannella lata* con 0.68%. de las amibas con potencial patógeno se encontraron *Acanthamoeba polyphaga* (6.80%) y *Acanthamoeba royreba* (2.04%).

- 6) **Beltrán en 2008.** Determinaron las amibas de vida libre de los pozos del acuífero de Cuernavaca, Morelos. Encontrando 19 especies pertenecientes a 14 géneros; *Hartmannella*, *Naegleria*, *Vannella*, *Vahlkampfia*, *Rosculus*, *Platyamoeba*, *Thecamoeba*, *Vexillifera*, *Nuclearia*, *Stachyamoeba*, *Echinamoeba*, *Guttulinopsis*, *Cochliopodium* y *Acanthamoeba*; siendo *Hartmannella* el que se presentó con mayor frecuencia con sus dos especies: *Hartmannella vermiformis* con el 24% y *H. cantabrigiensis* con el 13%.
- 7) **Vicente en 2009.** Análisis la distribución temporal y espacial de amibas de vida libre presentes en pozos de la zona suroeste del acuífero de Zacatepec, Morelos. Reportando 21 diferentes especies de AVL en 16 géneros. El pozo con mayores aislamientos fue Tlalquitenango con 25, mientras que Tequesquitengo presentó el menor número de aislamientos con 18. El mes con mayor número de aislamientos fue diciembre con 13 mientras abril presentó solo 3. El género encontrado con mayor frecuencia fue *Hartmannella* (33.65%) y los de menor frecuencia fueron *Vahlkampfia*, *Thecamoeba*, *Stachyamoeba*, *Tetramitus*, *Saccamoeba*, *Echinamoeba*, *Vannella*, *Mayorella*, y *Acanthamoeba* (0.96%) de las cuales con potencial patógeno se encontraron *Acanthamoeba polyphaga* y *Acanthamoeba royreba*. También se encontró con baja frecuencia a *Naegleria sp.*
- 8) **Gómez en 2009.** Caracterizó amibas de vida libre presentes en agua subterránea del acuífero de Cuautla, Morelos, reportando AVL presentes en los 9 pozos muestreados donde *Hartmannella* presentó la mayor frecuencia (49%). De los géneros encontrados *Hartmannella*, *Vahlkampfia*, y *Vannella* han sido asociados a casos de meningoencefalitis y queratitis aunque no se ha comprobado su patogenicidad.
- 9) **Ramírez et al. en 2009.** Realizaron estudios sobre la calidad microbiológica del acuífero de Zacatepec, Morelos. Reportando que todos los pozos presentaron contaminación por coliformes totales, en cambio, los coliformes fecales estuvieron ausentes en cuatro de los pozos muestreados. Se detectaron amibas de vida libre en todos los pozos, se observaron los números más altos en diciembre y enero y el más bajo en abril. Se aislaron 22 especies pertenecientes a 16 géneros; el más frecuente fue *Hartmannella* con 38 %. De las amibas patógenas, se detectó *Acanthamoeba*, pero con baja frecuencia (6.7 %).

V. ÁREA DE ESTUDIO

- Localización.

El acuífero de Tepalcingo-Axochiapan se ubica en la porción oriente del Estado de Morelos, que tiene sus límites al Norte con el flanco Sur del volcán Popocatepetl, al Oeste con la sierra de Huautla, al Este con pequeñas elevaciones o lomeríos derivados de la prolongación del volcán Popocatepetl y al Sur con su zona de descarga que confluye con el río Nexapa.

El acuífero de Tepalcingo-Axochiapan colinda en la porción Norte con la Cuenca Hidrológica del Valle de México, Al Oeste con el acuífero de Cuautla-Yautepec en el estado de Morelos; al Este con el acuífero de Atlixco-Izúcar de Matamoros en el Estado de Puebla y al Sur con la cuenca del río Nexapa, en los límites de los estados de Morelos y Puebla (Figura 3).

Su zona de recarga se ubica en la porción Norte, denominada como “Barranca Amatzinac”, que comprende los municipios de Tetela del Volcán, Zacualpan, Temoac, Jantetelco y Jonacatepec. El valle o zona de explotación se ubica principalmente en los municipios de Jantetelco, Jonacatepec, Tepalcingo y Axochiapan.

La captación y derivación de las aguas de la Barranca Amatzinac y de los ríos San Francisco principalmente, se realiza a través de obras de captación, presas derivadoras y de almacenamiento, respectivamente, en la Barranca de Amatzinac la captación y conducción es a través de mangueras de PVC, en las presas derivadoras y de almacenamiento la conducción es en canales revestidos (principales) y los laterales en tierra (CONAGUA, 2002).

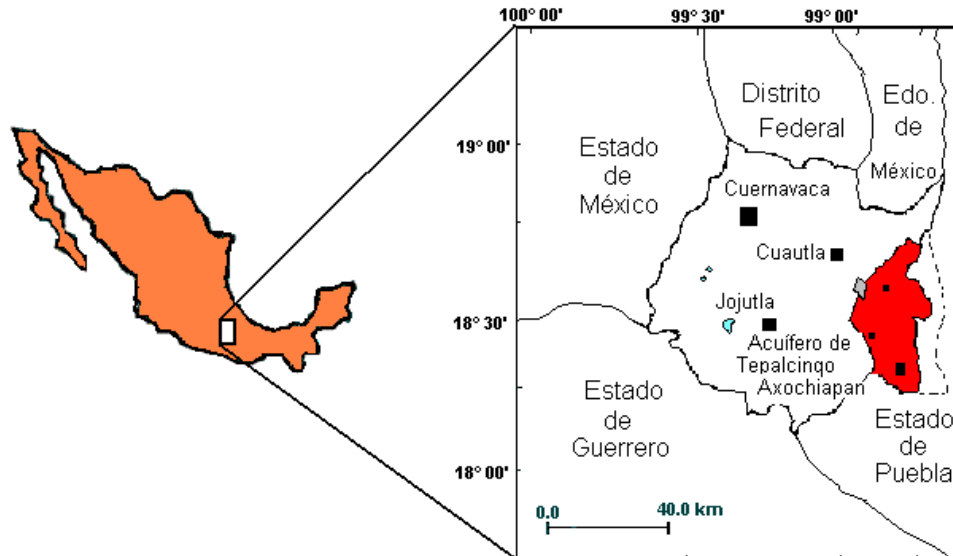


Figura 3. Localización del acuífero de Tepalcingo-Axochiapan.

- Hidrografía.

Determinado por factores geomorfológicos, la red hidrográfica del acuífero de Tepalcingo-Axochiapan define un arreglo muy particular, en donde en la ladera del volcán presenta un arreglo hidrográfico de tipo radial, para pasar en la ladera al tipo dendrítico en donde la dirección preferencial es Norte-Sur, como lo atestiguan los colectores de la zona, la barranca Amatzinac, el río Tepalcingo y San Francisco en Morelos y el río Nexapa en Puebla, afluentes del río Atoyac, pertenecientes al sistema hidrológico del Río Balsas.

Región Hidrológica.

De acuerdo a la regionalización de la CNA, el acuífero de Tepalcingo-Axochiapan se ubica en la Región Hidrológica No. 18, Río Balsas, que incluye parcialmente a los estados de Jalisco, Michoacán, Guerrero, México, Oaxaca, Puebla, Tlaxcala, Veracruz, Distrito Federal y la totalidad del estado de Morelos, a su vez esta región se divide en las subregiones del Alto, Medio y Bajo Balsas (Figura 4.).

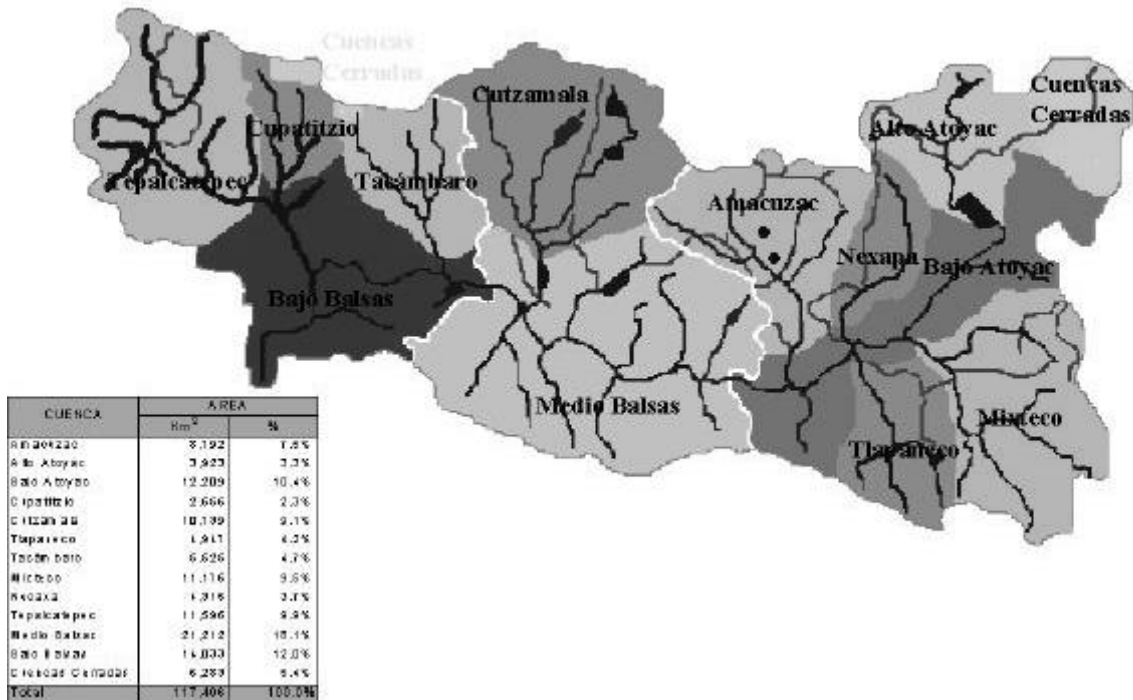


Figura 4. Región hidrológica numero 18 de Tepalcingo-Axochiapan

Subregión.

La subregión donde se localiza el acuífero de Tepalcingo-Axochiapan, es la del Alto Balsas, la cual incluye las cuencas de Amacuzac, Alto y Bajo Atoyac, Cuenca Cerrada de Oriental, Nexapa, Mixteco y Tlapaneco (Figura 4).

Cuenca

En la porción poniente de la cuenca del río Nexapa se ubica el acuífero de Tepalcingo-Axochiapan (Figura 4). Las subcuencas que se incluyen en esta cuenca hidrográfica son: Tepalcingo y Amatzinac.

Subcuenca

El acuífero de Tepalcingo-Axochiapan incluye parcialmente a las subcuencas de el río Amatzinac y Tepalcingo (Figura 4). La primera de ubica en la porción central y la segunda al poniente. Los ríos Amatzinac y Tepalcingo nacen en las estribaciones del Volcán Popocatepetl, el cual forma parte de la Sierra Nevada, el río o barranca Amatzinac nace en las inmediaciones del poblado de Tetela del Volcán, producto de deshielos del mismo, siguen su curso Norte-Sur, bajando del Volcán Popocatepetl, presenta escurrimiento perenne todo el año. El río Tepalcingo se forma a la altura del poblado de Zacualpan y es de régimen intermitente. De manera general los arroyos y barrancas de la región son de régimen intermitente. Casi no hay manantiales, el caso de los manantiales Termas de Atotonilco se dan en la ladera del cerro Cuachi con el valle de Tepalcingo.

Como algo excepcional se presenta en el manantial termal de Ixtlatala, el cual aflora en la margen izquierda del río San Francisco, en el valle de Tepalcingo-Axochiapan.

Los pozos muestreados se localizaron dentro del área del acuífero de Tepalcingo-Axochiapan en los municipios de Zacualpan de Amilpas, Jantetelco, Jonacatepec, Tepalcingo y Axochiapan (Tabla 1, Figura 5).

POZO	MUNICIPIO	ALTITUD (m.s.n.m.)	OBSRVACIONES
1. Zacualpan	Zacualpan de Amilpas	1695.30	En una barranca, zona con mucha vegetación silvestre
2. Amayuca	Jantetelco	1451.88	Dentro de una zona Urbana céntrica, al lado de un mercado
3. Balneario las Pilas	Jonacatepec	1372.27	En la entrada principal de un balneario, rodeado de áreas verdes
4. Manantial del Balneario Las Termas	Tepalcingo	1253.45	Manantial de agua termal, el agua llena las albercas del balneario.
5. El vergel	Tepalcingo	1253.17	En un predio a 20m de la carretera, rodeado de muchos arboles
6. Tepalcingo	Tepalcingo	1178.78	Cerca de la carretera dentro de una zona urbana rodeado de casas
7. Quebrantadero	Axochiapan	1043.71	Dentro de una zona Urbana al lado del palacio municipal y de una iglesia
8. Axochiapan (Pajaritos)	Axochiapan	1039.85	En una zona semi-árida poca vegetación, muy alejada de la zona urbana
9. Balneario Aurora	Axochiapan	1018.00	Es un pozo abierto dentro de un balneario rústico, cerca de la carretera rodeado por árboles frutales.

Tabla 1. Descripción de los pozos muestreados



Pozos

1. Zacualpan
2. Amayuca
3. Balneario Las Pilas
4. Balneario Las Termas
5. El Vergel
6. Tepalcingo
7. Quebrantadero
8. Axochiapan
9. Balneario Aurora

Figura 5. Localización de los pozos muestreados.



Fotografía 1. Pozo Zacualpan



Fotografía 2. Pozo Amayuca



Fotografía 3. Pozo Balneario Las Pilas



Fotografía 4. Manantial del Balneario Las Termas



Fotografía 5. Pozo El Vergel



Fotografía 6. Pozo Tepalcingo



Fotografía 7. Pozo Quebrantadero



Fotografía 8. Pozo Axochiapan (Pajaritos)



Fotografía 9. Pozo Balneario Aurora

VI. JUSTIFICACIÓN

El agua es el elemento más importante para cubrir las necesidades vitales de los organismos, y su disponibilidad ha ido limitándose, debido al mal uso e incremento de la población humana. Por lo tanto, la necesidad de este recurso es cada día mayor y por esta razón es de gran importancia controlar la potabilidad de esta.

Los mantos acuíferos subterráneos, representan una reserva muy importante de agua dulce para consumo humano, por lo que el uso y la explotación de estos ha aumentado cuantiosamente a pesar de que todavía no se sabe a profundidad como funciona su geología y su biología.

Por otra parte la microbiología en aguas subterráneas es también una de las menos estudiadas en comparación con la de otros ambientes acuáticos, y más aun tratándose de Amibas de Vida Libre que representen un potencial patógeno para humanos y animales.

El interés sobre la patología de AVL se ha incrementando considerablemente, como lo muestran los numerosos estudios que se han hecho en los últimos 20 años, documentando la importancia de las AVL en la salud humana (Khan, 2006). Sin embargo, la ecología de estas en muchos ambientes naturales, ha sido escasamente investigada, en especial la de los sistemas acuáticos y más aun los subterráneos

Es por eso que este trabajo contribuirá al conocimiento de la ecología de estos organismos y su distribución en los mantos acuíferos.

VII. OBJETIVOS

General

Determinar la riqueza específica de las amibas de vida libre presentes en el acuífero de Tepalcingo Axochiapan en el estado de Morelos.

Específicos

1. Determinar la distribución espacial y temporal de las amibas de vida libre.
2. Relacionar la amibas de vida libre con los parámetros fisicoquímicos: temperatura, oxígeno disuelto, pH y sólidos disueltos.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

I. Trabajo en campo

Se realizaron seis muestreos durante un año en nueve pozos localizados en acuífero de Tepalcingo-Axochiapan en el estado de Morelos (Figura 5).

Para la determinación de amibas de vida libre, se recolectaron 1000 ml de agua subterránea en envases esterilizados y se transportaron al laboratorio de Microbiología Acuática del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente de la UIICSE a temperatura ambiente para evitar cambios en la estructura de la amibas. Los pozos muestreados se encuentran en uso para consumo de agua potable o para uso recreativo, por lo que están entubados y las muestras se tomarán de la válvula que esta antes de la cloración (Fotografías 1 a 9).

En el sitio se midieron los siguientes parámetros fisicoquímicos: pH (potenciómetro HANNA Instruments HI 8314), oxígeno disuelto y temperatura (Oxímetro YSI Modelo 51-b). El análisis de parámetros de sólidos disueltos se realizo por la técnica de Filtración con membrana, por miembros del Área de Calidad del Agua.

II. Trabajo de laboratorio

- Aislamiento y cultivo de AVL.

Las muestras de 1000 ml se filtraron a través de membranas Millipore de 1.2 μm de poro en condiciones estériles. Las membranas se colocaron hacia abajo en placas de medio agar no nutritivo con bacterias *Enterobacter aerogenes* (NNE) para el aislamiento de las amibas (Limón, 2007). Las placas se incubaron a 30°C y se revisaron después de ocho días para detectar el crecimiento amebiano usando un microscopio invertido marca Zeiss.

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

- **Análisis estadístico.**

Para relacionar los parámetros fisicoquímicos (pH, oxígeno disuelto, temperatura y sólidos disueltos) con la presencia de amebas se utilizo el análisis de Coeficiente de Correlación Lineal Producto-Momento de Pearson, el cual proporciona una medida de la asociación lineal entre las variables, los valores de la correlación están entre -1 y +1. Si las variables están perfectamente asociadas, entonces el coeficiente de correlación será de 1 o -1, si por el contrario, las variables no están

asociadas, entonces el coeficiente tendrá un valor cercano a cero. Se considera que existe relación cuando el valor es superior a 0.811 ó -0.811 (Duran *et al.*, 2003).

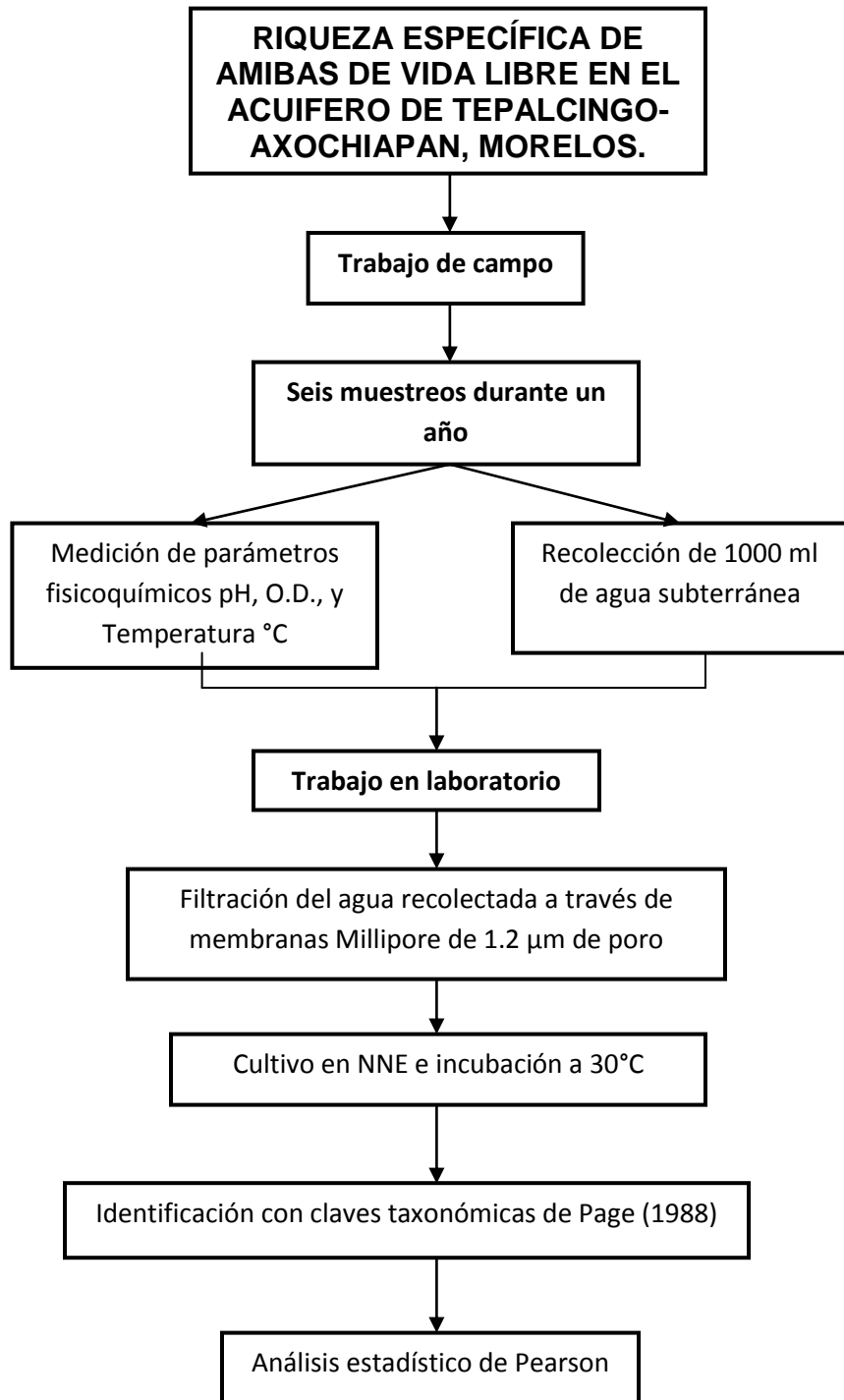


Figura 6. Diagrama de flujo empleado para la caracterización de AVL.

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Presencia de AVL en los pozos.

En la tabla 2 se observa la presencia y ausencia de amibas de vida libre en los nueve pozos muestreados durante el periodo de estudio, el cual se dividió en 6 muestreos. Se observó una presencia constante de las amibas en todos los pozos, en casi todos los meses; solamente estuvieron ausentes en un muestreo en los pozos Tepalcingo, El Vergel y Axochiapan (Pajaritos).

La presencia de amibas de vida libre en agua subterránea de nuestro país ya se había reportado con anterioridad en los acuíferos de Morelos y en el del Valle del Mezquital en Hidalgo (Ramírez *et al.*, 2006; Limón, 2007; Beltrán, 2008; Gómez, 2009; Vicente, 2009).

Pozos	1 (Jun 2009)	2 (Agt 2009)	3 (Oct 2009)	4 (Dic 2009)	5 (Abr 2010)	6 (Jun 2010)
1 Zacualpan	+	+	+	+	+	+
2 Amayuca	+	+	+	n/m	+	+
3 Balneario Las Pilas	+	+	+	+	+	+
4 Manantial Balneario Las termas	+	+	+	+	+	+
5 El vergel	-	+	+	+	+	+
6 Tepalcingo	+	+	-	+	+	+
7 Quebrantadero	+	+	+	+	+	+
8 Axochiapan (Pajaritos)	-	+	+	+	+	+
9 Balneario Aurora	+	+	+	+	+	+

*n/m: No muestreado; +: Presencia; -: Ausencia.

Tabla 2. Presencia y ausencia de Amibas de Vida Libre en el acuífero de Tepalcingo Axochiapan, Morelos.

- **Riqueza específica**

Se encontraron 27 especies pertenecientes a 16 géneros, durante el periodo de muestreo en el acuífero de Tepalcingo-Axochiapan en Morelos, como se muestra en la tabla 3. Esto casi coincide con lo encontrado en el acuífero de Cuautla-Yautepec (Gómez, 2009), en donde se reportó 29 especies y 16 géneros. La coincidencia casi total con este acuífero, probablemente se deba a que estos dos acuíferos son vecinos y existe una relación más estrecha entre ellos que con los otros dos del estado de Morelos (Figura 5) y a que el sistema de drenaje en esas localidades es muy deficiente o inexistente lo que puede constituir una fuente de contaminación orgánica a través de la filtración de agua de desecho hacia el agua subterránea (Ramírez *et al.*, 2009).

El número de especies fue alto en comparación con los datos reportados por Limón (2007) en Zacatepec (14 especies y 11 géneros) y Beltrán (2006) en Cuernavaca (20 especies y 13 géneros).

PHYLUM RHIZOPODA			
ORDEN	FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE
ACANTHOPODIDA	ACANTHAMOEBIIDAE	Acanthamoeba	lugdunensis
			polyphaga
			royreba
			triangularis
	ECHINAMOEBIIDAE	Echinamoeba	silvestris
	Filamoeba	nolandi	
HIMATISMENIDA	COCHLIOPODIIDAE	Cochliopodium	actinophorum
EUAMOEBIDA	PARAMOEBIIDAE	Dactylamoeba	stella
		Mayorella	cultura
	VANNELLIDAE	Vannella	cirrifera
			lata
			miroides
			platypodia
			simplex
			Platyamoeba
	HARTMANNELLIDAE	Vermamoeba	vermiformes
		Saccamoeba	limax
			stagnicola
	THECAMOEBIIDAE	Thecamoeba	quadriliniata
			similis
			striata
			terrícola
AMOEBIDAE	Deuteramoeba	algonquinensis	
VEXILLIFERIDAE	Vexillifera	bacillipedes	
SCHIZOPYRENIDA	VAHLKAMPFIDAE	Naegleria	sp
		Vahlkampfia	avara
	GRUBERELLIDAE	Stachyamoeba	lipophora

Tabla 3. Riqueza específica de Amibas de Vida Libre aisladas del acuífero de Tenancingo Axochiapan, Morelos

Riqueza específica por pozo

En las tablas 4 y 5 se muestra la riqueza específica de amibas de vida libre en cada uno de los pozos muestreados; donde se observa que el pozo Zacualpan tuvo el mayor número de especies (13); esto se pudo deber a que este pozo se localiza en una barranca (Fotografía 1), en donde se vierten los desechos líquidos de las casas aledañas, que se infiltran y contaminan el agua del pozo.

Por el contrario, el pozo con el menor número de especies fue Amayuca con 5 especies, esto probablemente se debió a que el pozo se localiza en una zona urbana céntrica y pavimentada (Fotografía 2), lo que no favorece que haya infiltraciones que lleguen al agua subterránea.

POZO	(Jun 2009)	(Agt 2009)	(Oct 2009)	(Dic 2009)	(Abr 2010)	(Jun 2010)
Zacualpan	D. algonquinensis V. vermiformes Naegleria sp P. placida S. limax T. similis	V. vermiformes Naegleria sp	A. triangularis A. polyphaga V. vermiformes V. platypodia	D. stella V. vermiformes T. similis V. platyamoeba V. bacillipedes	V. vermiformes V. simplex	V. vermiformes E. silvestris
Amayuca	V. vermiformes T. striata	V. vermiformes P. placida	V. vermiformes	n/m	E. silvestris V. platypodia	E. silvestris
Balneario Las Pilas	V. vermiformes S. stagnicola T. striata	V. platypodia	V. vermiformes V. bacillipedes	V. vermiformes	V. vermiformes V. miroides	Naegleria sp
Manantial Balneario Las Termas	V. vermiformes V. bacillipedes	C. actinophorum V. vermiformes Naegleria sp T. similis V. simplex	V. vermiformes	V. lata V. bacillipedes	V. vermiformes V. platypodia	V. vermiformes Naegleria sp
El Vergel	(-)	V. vermiformes Naegleria sp T. similis V. platypodia V. simplex	V. bacillipedes	V. miroides	Naegleria sp V. lata	F. nolandi V. vermiformes V. avara V. bacillipedes

Tabla 4. Riqueza específica de Amibas de Vida Libre de los primeros 5 pozos muestreados.

POZO	(Jun 2009)	(Agt 2009)	(Oct 2009)	(Dic 2009)	(Abr 2010)	(Jun 2010)
Tepalcingo	T. striata	V. vermiformes T. similis V. bacillipedes	(-)	V. vermiformes T. similis T. terricola V. avara	F. nolandi V. vermiformes Naegleria sp T. striata	V. vermiformes Naegleria sp
Quebrantadero	V. vermiformes V. bacillipedes	V. vermiformes Naegleria sp	A. lugdunensis V. vermiformes V. cirrifera	E. silvestris V. vermiformes P. placida T. similis V. bacillipedes	A. royreba V. vermiformes T. striata V. bacillipedes	V. vermiformes V. bacillipedes
Axochiapan (pajaritos)	(-)	T. similis V. platypodia	V. vermiformes	V. vermiformes S. lipophora	V. vermiformes	V. vermiformes T. striata V. bacillipedes
Balneario Aurora	Naegleria sp T. similis T. striata	Naegleria sp T. similis	V. vermiformes M. cultura Naegleria sp V. platypodia	V. vermiformes Naegleria sp V. platypodia V. bacillipedes	V. vermiformes Naegleria sp T. quadrilineata V. miroides V. platypodia V. bacillipedes	T. mstriata V. lata V. platypodia V. bacillipedes

Tabla 5. Riqueza específica de Amibas de Vida Libre de los últimos 4 pozos muestreados

Como se observa en las tablas 4 y 5, la especie *Vermamoeba vermiformes* se encontró en todos los pozos y en la mayoría de los meses muestreados, aislándose en 37 muestras de las 54 analizadas.

De las especies aisladas en este estudio, es la primera vez que se reporta *C. actinophorum*, *D. algonquinensis*, *S. lipophora* y *T. similis* en agua subterránea.

Frecuencia por Género

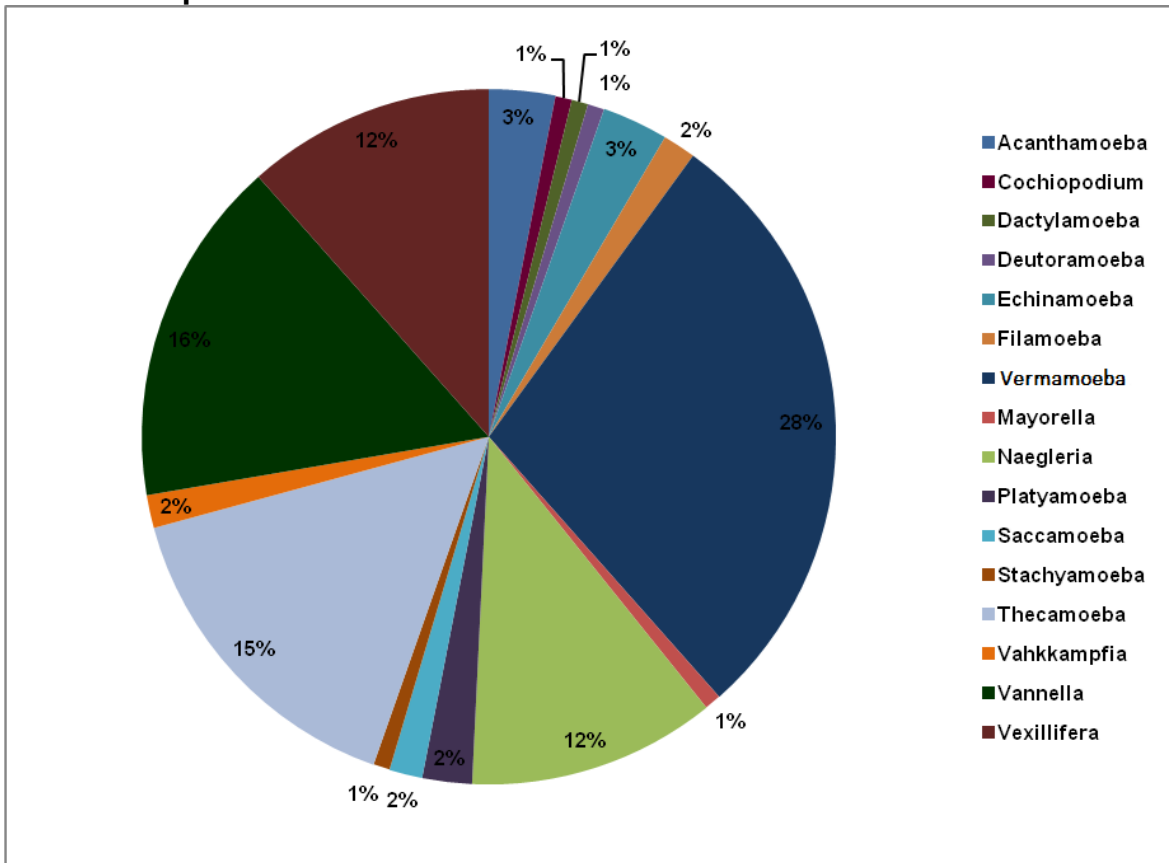


Grafico 1. Frecuencia de los géneros de Amibas de Vida Libre aislados del acuífero

El gráfico 1 muestra la frecuencia de los géneros de amibas de vida libre que fueron encontrados en los nueve pozos durante el periodo de muestreo. Se puede observar que el género *Vermamoeba* fue el que se presentó con mayor frecuencia (28%), esto coincide con lo reportado en los acuíferos de Cuernavaca, Zacatepec y Cuautla (Limón, 2007; Beltrán, 2008; Gómez, 2009; Vicente, 2009). Amibas de este género se han aislado de varios casos de infección ocular y de un caso de infección cerebral, pero en ninguno de ellos se pudo comprobar que

fueron las causantes de las infecciones (Aitken *et al.*, 1996; Dua *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 1998; Centeno *et al.*, 1996; Lorenzo *et al.*, 2007).

El género *Vannella* fue el que siguió en frecuencia (16%), lo que también coincidió con lo reportado en los otros acuíferos de Morelos y aunque esta amiba no se ha reportada como patógena, también se ha encontrado asociada a infecciones oculares (Scheid, 2007; Mitchel *et al.*, 2010).

Los géneros menos frecuentes fueron *Cochliopodium*, *Dactylamoeba*, *Deuteramoeba*, *Mayorella* y *Stachyamoeba* con 1% cada uno. Ninguno de estos géneros ha sido reportado como patógeno.

De los géneros reportados como patógenos, se encontró *Acanthamoeba*, pero en bajo porcentaje (3%), esto contrasta con lo reportado por Ramírez *et al.*, 2006 en el acuífero de Valle del Mezquital, en donde este género se presentó con una frecuencia de 67.3%. Esto se puede deber a que el quiste de *Acanthamoeba* es muy resistente y puede soportar condiciones de mayor contaminación orgánica que otras amibas, como la que se presenta en el acuífero del Valle del Mezquital (Ramírez *et al.*, 2009).

Con respecto al género *Naegleria*, su frecuencia fue similar a la reportada en los acuíferos de Morelos (Limón, 2007; Beltrán, 2008; Gómez, 2009; Vicente, 2009).

Frecuencia por Especie

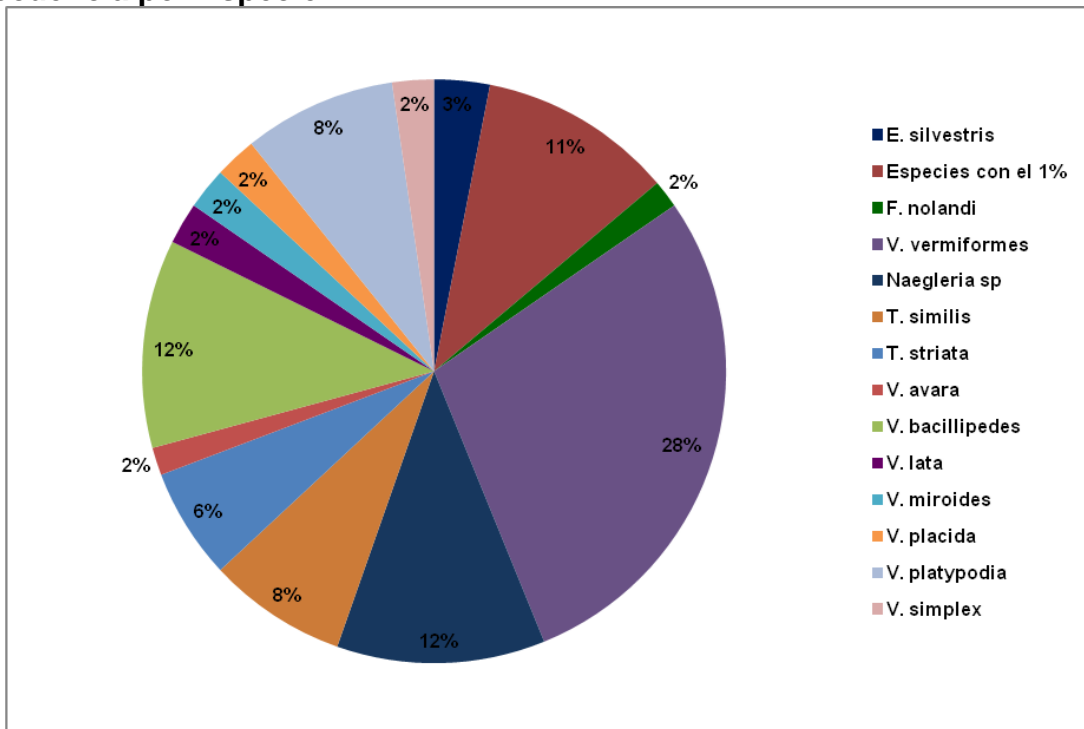


Gráfico 2. Frecuencia de Amibas de Vida Libre aisladas por Especie

***Especies con el 1%:** *Acanthamoeba lugdunensis*, *Acanthamoeba polyphaga*, *Acanthamoeba royreba*, *Acanthamoeba triangularis*, *Cochliopodium actinophorum*, *Dactylamoeba stella*, *Deuteramoeba algonquinensis*, *Mayorella cultura*, *Saccamoeba limax*, *Saccamoeba stagnicola*, *Stachyamoeba lipophora*, *Thecamoeba quadrilineata*, *Thecamoeba striata*, *Vannella cirrifera*.

La especie más frecuente fue *Vermamoeba vermiformes* con 28%, que fue similar a lo reportado en el acuífero de Cuernavaca (24%) (Beltrán, 2008), pero menor a lo reportado en el acuífero de Zacatepec (41%) (Limón, 2007; Vicente, 2009); ésta especie fue la que se encontró en el caso de encefalitis y probablemente fue la que se encontró asociada a los casos de infección ocular (Aitken *et al.*, 1996; Centeno *et al.*, 1996; Dua *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 1998; Lorenzo *et al.*, 2007).

Las segundas especies más frecuentes fueron *Naegleria sp* y *Vexillifera bacillipedes* con 12% cada una. En cuanto a la especie de *Naegleria*, probablemente fue *N. gruberi*, por las características morfológicas de su quiste y la temperatura de crecimiento, la cual no se ha reportada como patógena, al igual que *V. bacillipedes*.

Las especies menos frecuentes fueron catorce con 1% cada una, las cuales se agruparon para evitar sobresaturación en el gráfico 2. En este grupo estuvieron las especies de *Acanthamoeba*: *A. lugdunensis*, *A. polyphaga*, *A. royreba* y *A. triangularis*; de la cuales solamente *A. polyphaga* se ha reportada como patógena.

Distribución temporal

Comparando el número de aislamientos de cada pozo a lo largo del tiempo, no se observa una distribución temporal similar entre ellos (Gráficos 3 a 11); solamente en el mes de abril-2010 tres pozos coincidieron con su mayor número de aislamientos: Amayuca, Tepalcingo y Balneario Aurora (Gráficos 4, 8 y 11).

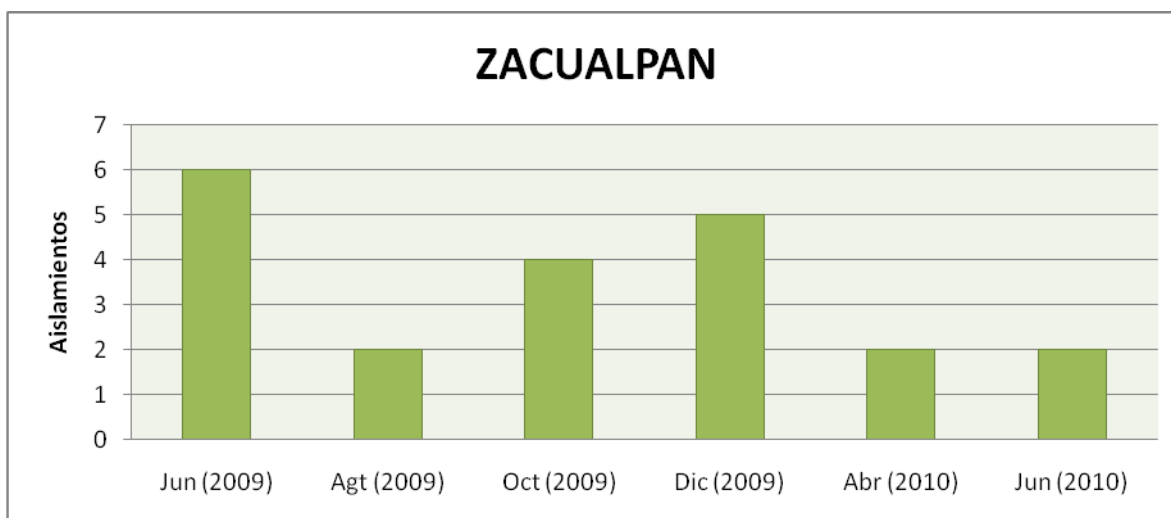


Gráfico 3. Distribución temporal de Amibas de Vida Libre en el pozo Zacualpan

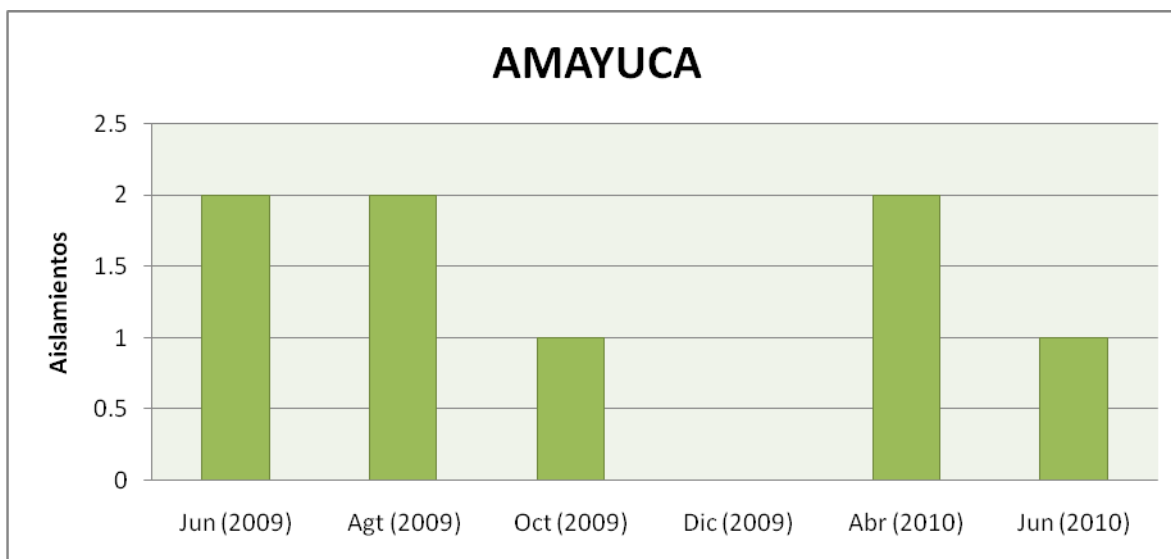


Gráfico 4. Distribución temporal de Amibas de Vida Libre en el pozo Amayuca

*Diciembre no se muestreo por problemas técnicos

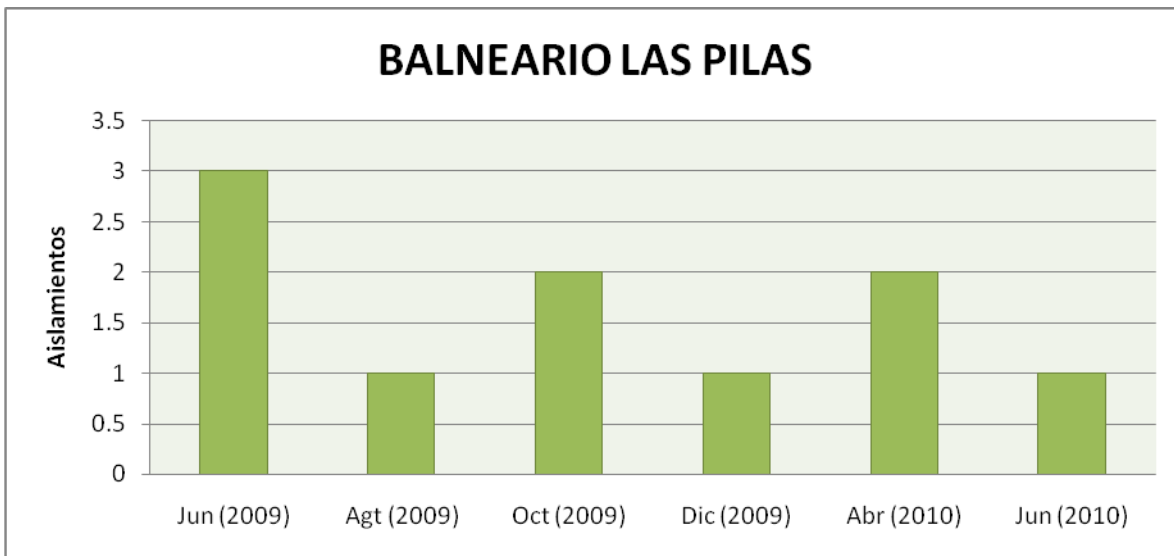


Gráfico 5. Distribución temporal de Amibas de Vida Libre en el pozo del Balneario Las Pilas

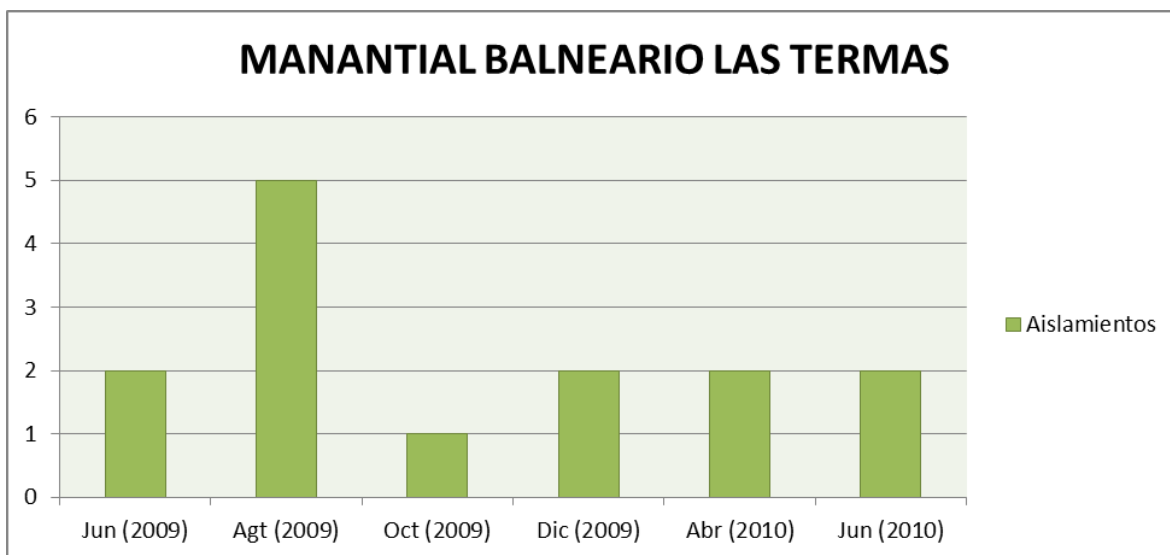


Gráfico 6. Distribución temporal de Amibas de Vida Libre en el Manantial del Balneario Las Termas

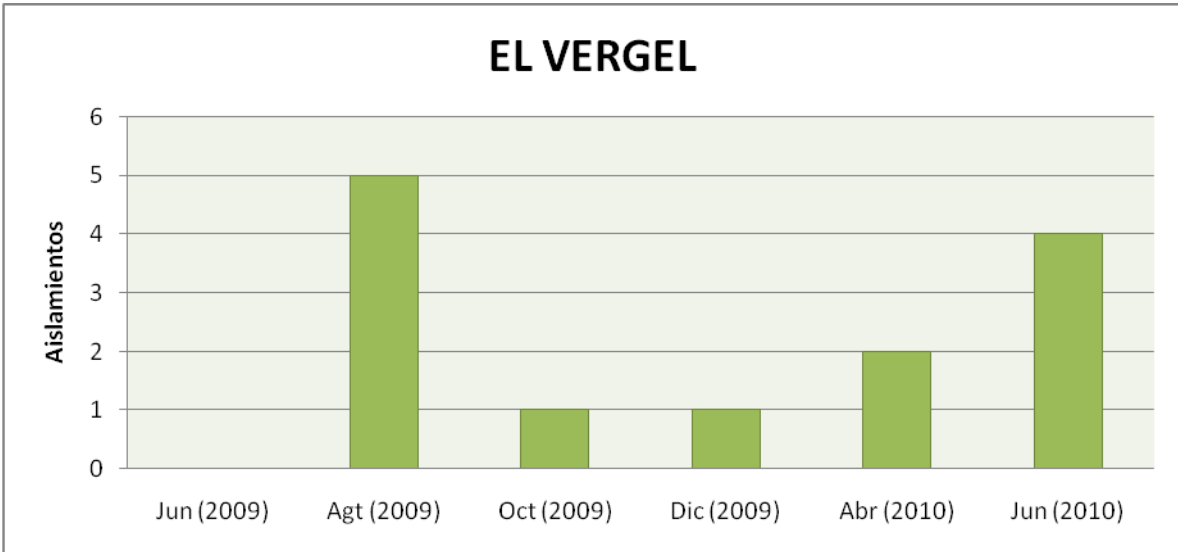


Gráfico 7. Distribución temporal de Amibas de Vida Libre en el pozo El vergel

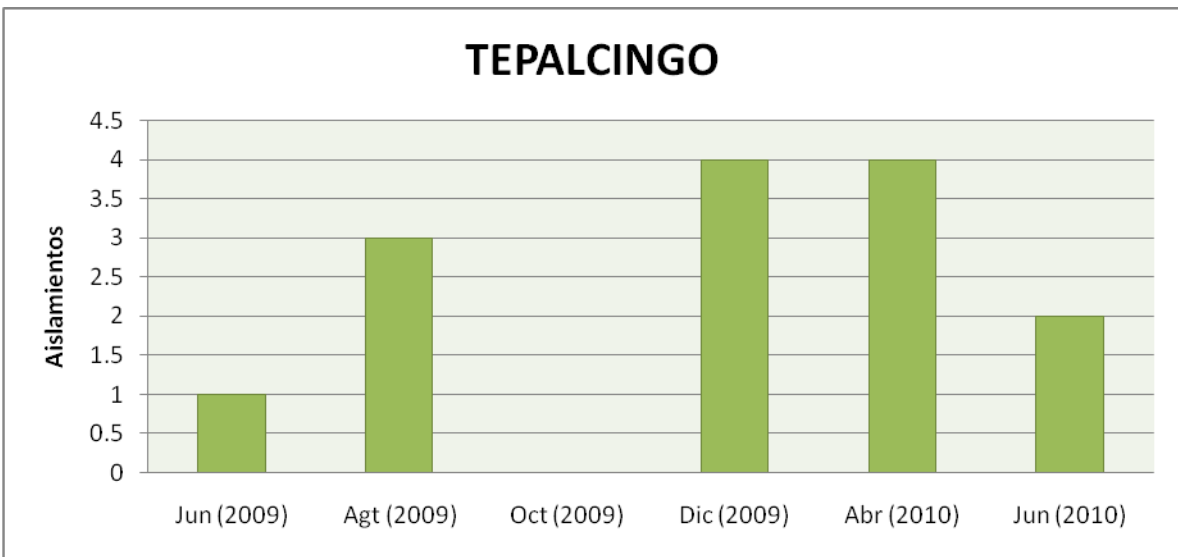


Grafico 8. Distribución temporal de Amibas de Vida Libre en el pozo Tepalcingo

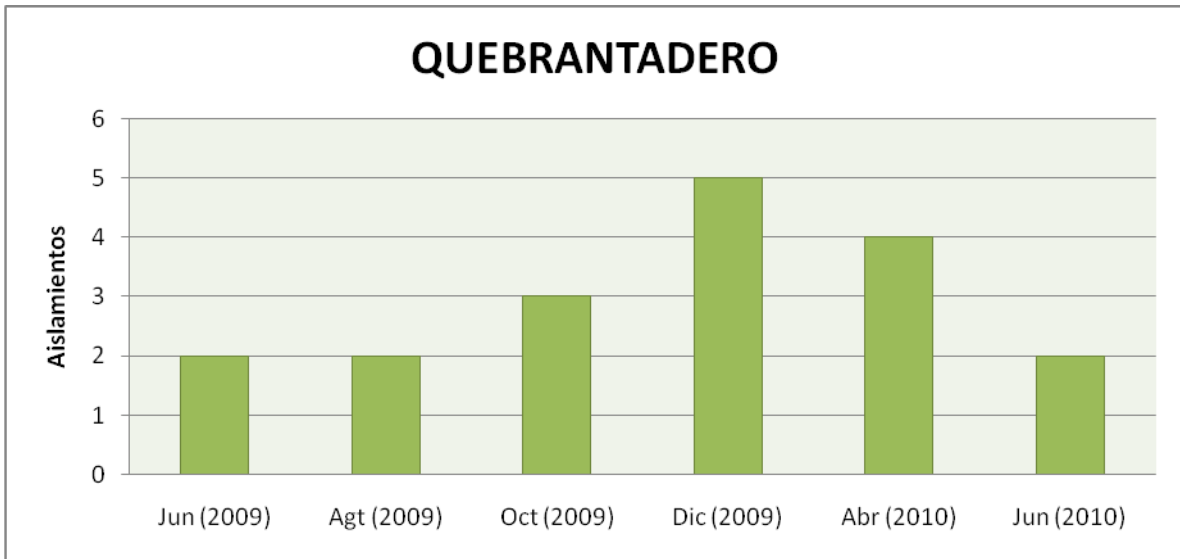


Gráfico 9. Distribución temporal de Amibas de Vida Libre en el pozo Quebrantadero

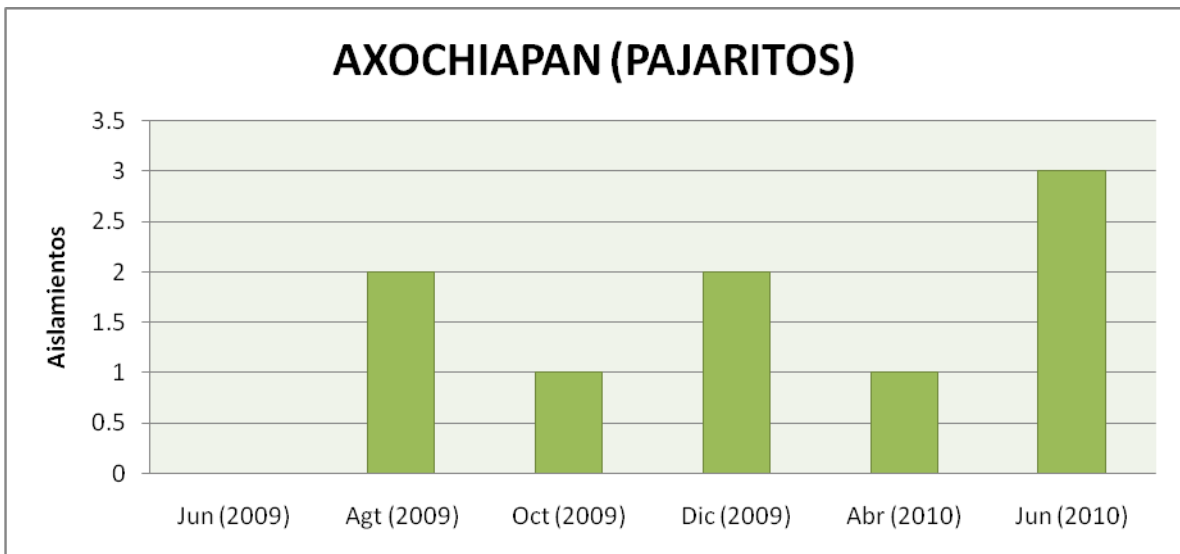


Gráfico 10. Distribución temporal de Amibas de Vida Libre en el pozo Axochiapan

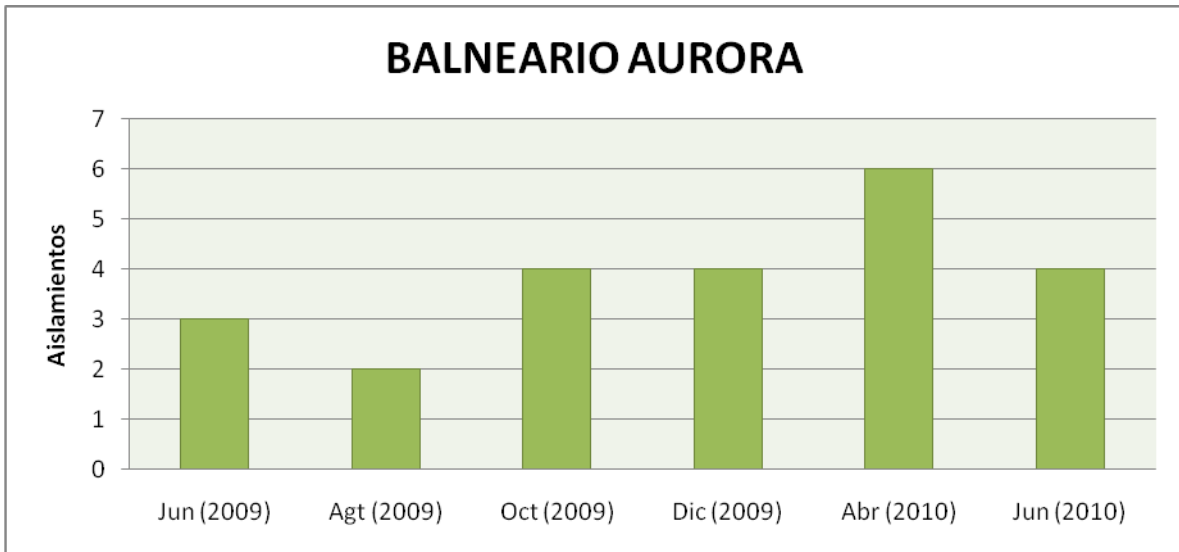


Gráfico 11. Distribución temporal de Amibas de Vida Libre en el pozo del Balneario Aurora

Tomando en cuenta el número de aislamientos totales en cada mes (Gráfico 12), se puede observar que en el mes de abril-2010 se obtuvo el mayor número de aislamientos (25), seguido cercanamente por los meses de Agosto-2009 y Diciembre-2009 con 24 aislamientos cada uno. El mes de Diciembre se ha reportado también como el de mayor número de aislamientos en los acuíferos de Cuautla y Zacatepec en Morelos (Gómez, 2009; Vicente 2009) y en el acuífero del Valle de Mezquital en Hidalgo (Ramírez *et al.*, 2006). Lo anterior llama la atención, porque se sabe que las amibas proliferan mejor en verano, cuando la temperatura ambiental es mayor; pero hay que recordar que el agua subterránea no está influenciada por la temperatura del ambiente por lo que las amibas se pueden presentar en cualquier temporada del año (Ramírez *et al.*, 2009).

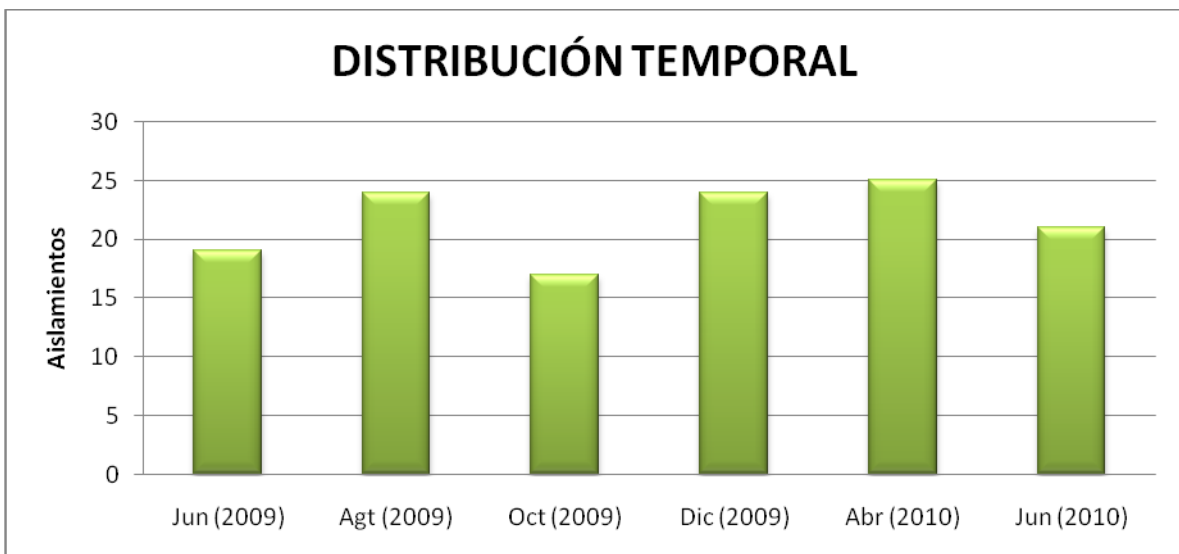


Gráfico 12. Distribución temporal total de Amibas de Vida Libre

Distribución Espacial

En los gráficos 13 a 18 se presenta la distribución espacial de las AVL en cada muestreo. En general se puede decir que el número de aislamientos encontrado en cada pozo fue bajo. Los pozos Zacualpan (Gráficos 13, 15 y 16) y Balneario Aurora (Gráficos 15, 17 y 18) tuvieron el mayor número de aislamientos en tres de los seis meses muestreados.

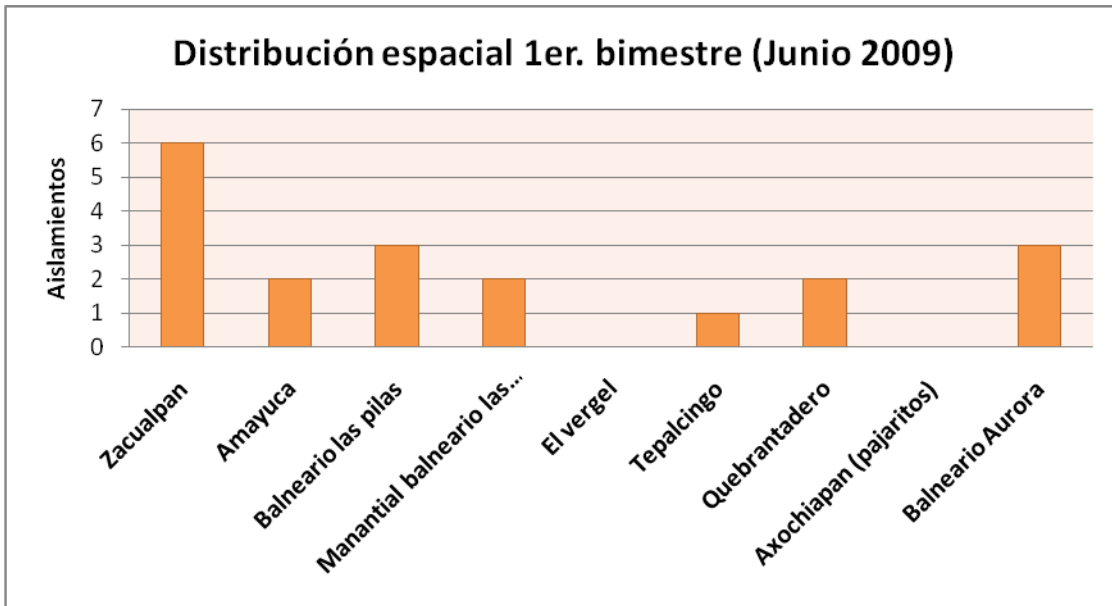


Gráfico 13. Distribución espacial de Amibas de Vida Libre en el mes de Junio del 2009.

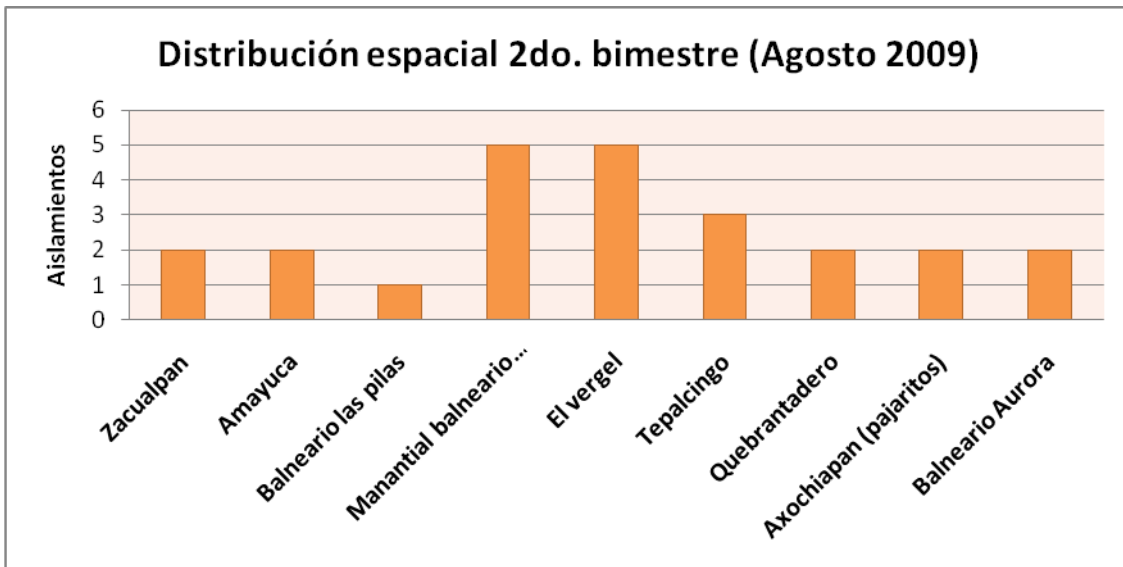


Gráfico 14. Distribución espacial de Amibas de Vida Libre en el mes de Agosto del 2009.

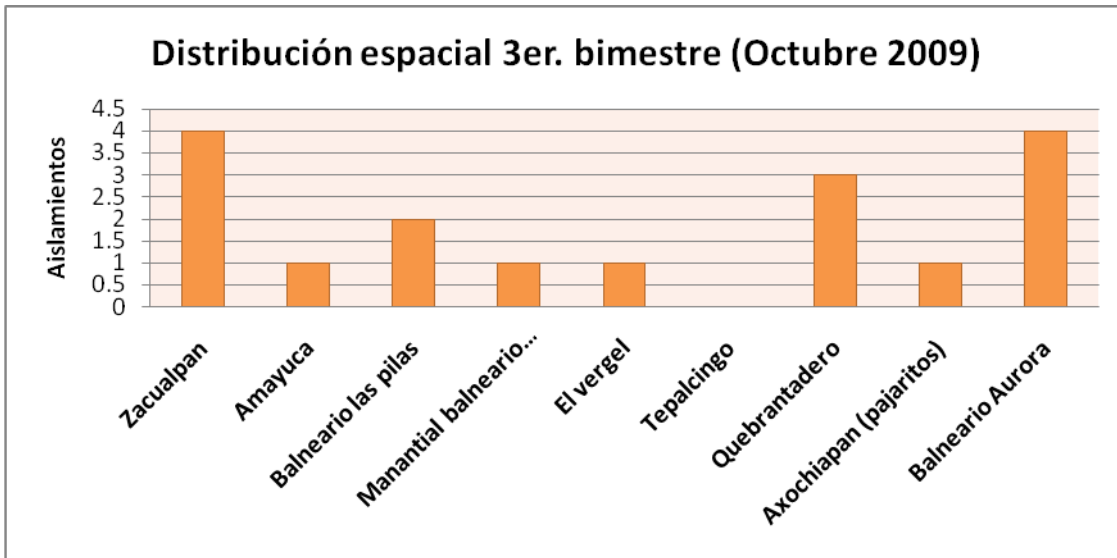


Grafico 15. Distribución espacial de Amibas de Vida Libre en el mes de Octubre del 2009.

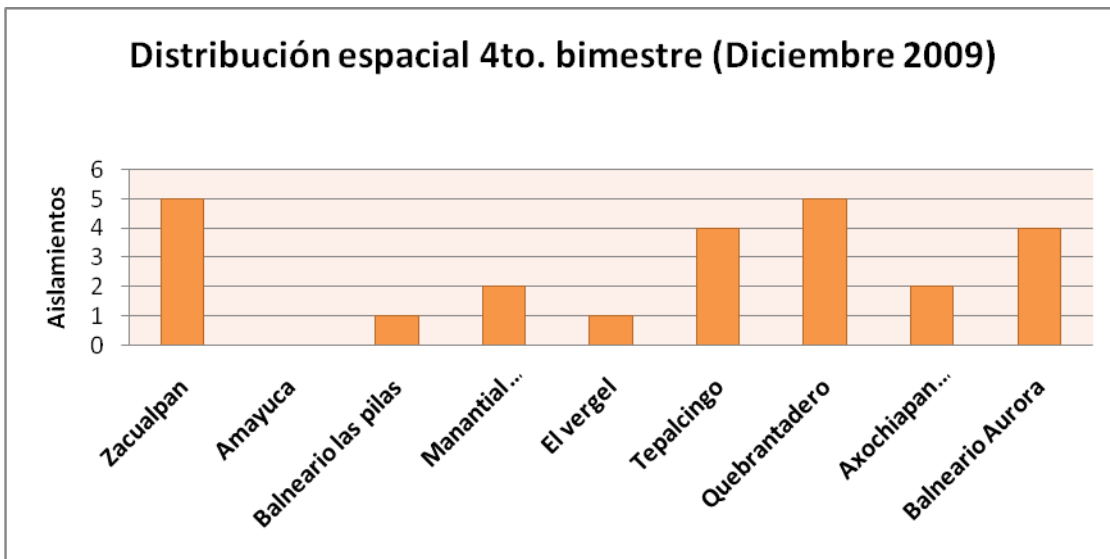


Grafico 16. Distribución espacial de Amibas de Vida Libre en el mes de Diciembre del 2009.

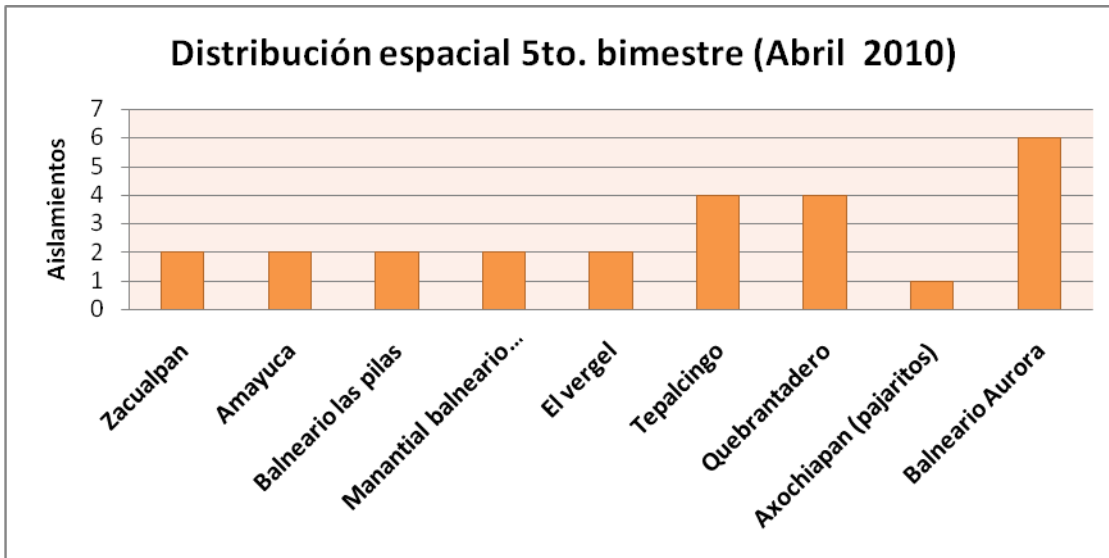


Grafico 17. Distribución espacial de Amibas de Vida Libre en el mes de Abril del 2010.

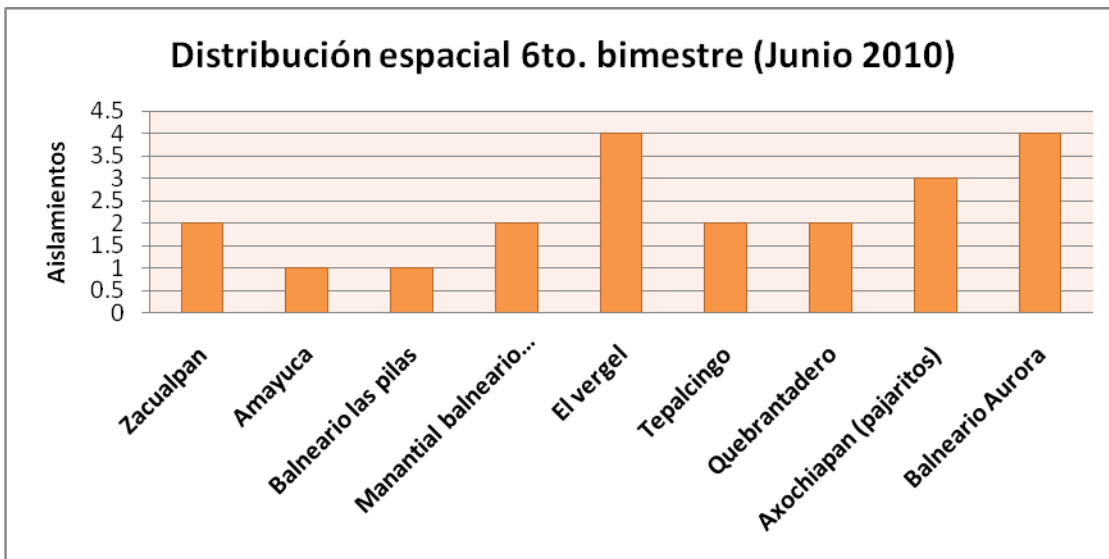


Grafico 18. Distribución espacial de Amibas de Vida Libre en el mes de Junio del 2010.

Con respecto a la distribución espacial global se observó que el pozo del Bañero Aurora presentó el mayor número de aislamientos (23), seguido por el pozo Zacualpan con un total de 21. Esto se pudo deber a que el pozo del Bañero Aurora está abierto (Fotografía 9) y se encuentra dentro de un balneario rústico rodeado por árboles frutales, lo que permite que este esté expuesto a la contaminación por suelo y aire. El pozo Zacualpan también está expuesto porque se localiza en una barranca (Fotografía 1), en donde se vierten los desechos líquidos de las casas aledañas, que se infiltran y pueden contaminar el agua subterránea.

El pozo que presentó el número más bajo de aislamientos fue Amayuca con 8, esto probablemente se debió a que el pozo se localiza en una zona urbana pavimentada con servicio de drenaje (Fotografía 2), lo que evita que los desechos puedan contaminar el agua subterránea.

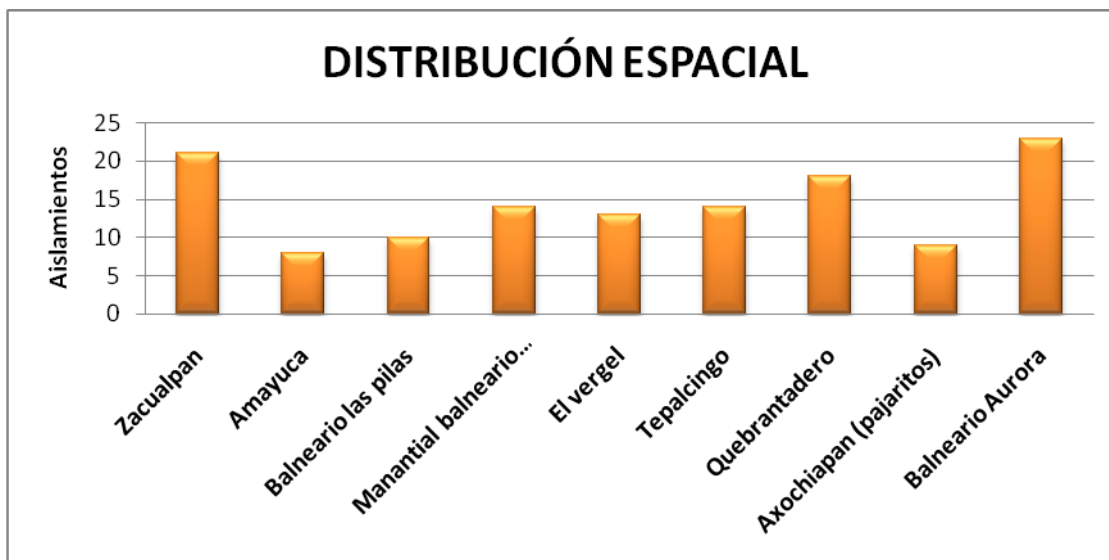


Grafico 19. Distribución espacial de Amibas de Vida Libre anual en los nueve pozos del acuífero de Tenancingo Axochiapan, Morelos.

- **Parámetros Físicoquímicos**

Temperatura

En el gráfico 20 se muestra la temperatura promedio registrada en los 6 muestreos, se observó una oscilación de entre 24 a 33°C, siendo Agosto uno de los meses con la mayor temperatura registrada (33°C). Esto favoreció que se tuviera uno de los mayores números de aislamientos. Esto concuerda con lo mencionado en las referencias, en el sentido de que las temperaturas altas son un ambiente favorable para las amibas patógenas (Zaragoza, 1994).

Es de llamar la atención que octubre que tuvo la misma temperatura promedio que Agosto, presentó el número de aislamientos más bajo y Diciembre, el mes con la temperatura promedio más baja (24°C), tuvo un número de aislamientos relativamente alto. Lo anterior se puede deber a que las amibas presentan una fase de resistencia que les permite soportar diferentes condiciones ambientales (Bonilla *et al.*, 2004).

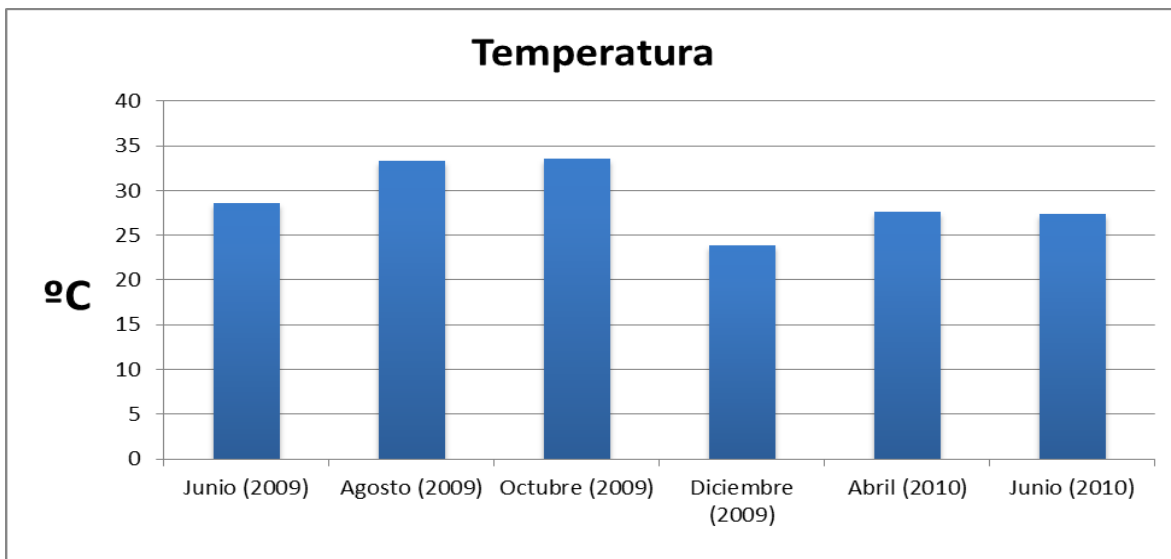


Gráfico 20. Valores de temperatura promedio en cada mes muestreado

En general los nueve pozos muestreados estuvieron en un intervalo de 23.3 a 32°C, a excepción del Balneario las Termas donde la temperatura promedio fue de 35.4 °C (Gráfico 21), pero a pesar de esto, no presentó el mayor número de aislamientos amibianos.

Los valores de temperatura más bajos se registraron en Zacualpan y Amayuca con 23.3°C y 24°C respectivamente. En el caso de Amayuca si correspondió al número de aislamiento más bajo, pero no en el caso de Zacualpan, donde se encontró el segundo número de aislamientos más alto. Confirmando que las AVL

pueden presentarse a diferentes temperaturas, debido a la formación del quiste, que es una estructura de resistencia (Bonilla *et al.*, 2004)

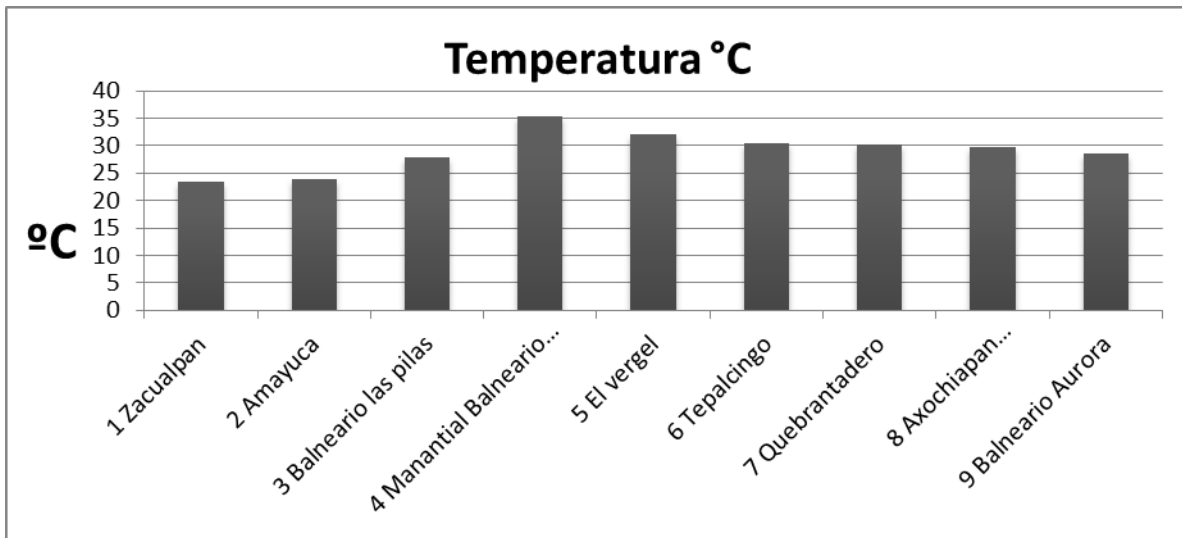


Grafico 21. Valores promedio de temperatura en cada pozo muestreado

El pH se encontró alrededor de la neutralidad en un intervalo de 6.83 a 7.09, a excepción del mes de Diciembre, en donde se registro el valor más bajo (6.2) (Gráfico 22). Estos valores estuvieron dentro del intervalo reportado para la presencia de AVL (Bonilla *et al.*, 2004).

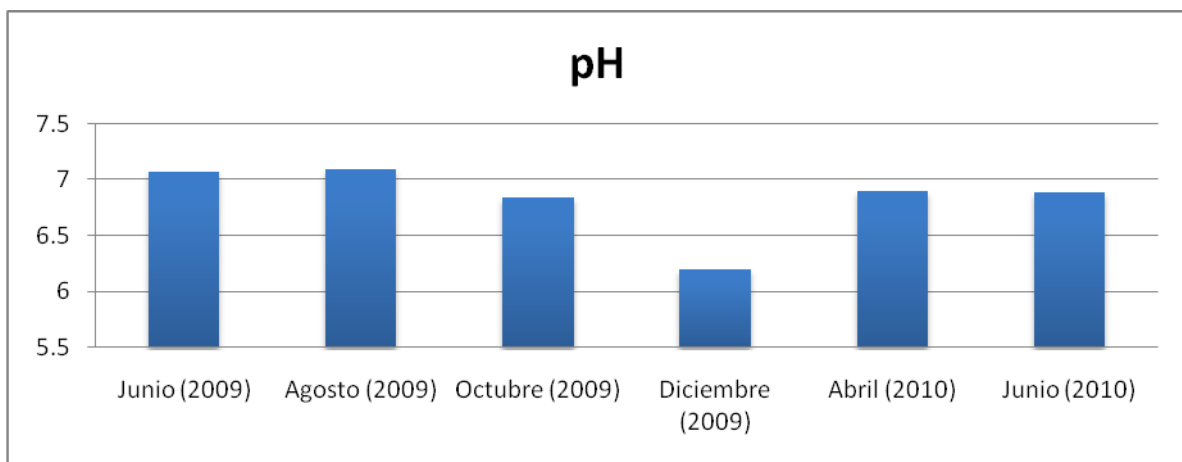


Grafico 22. Valores de pH promedio en cada mes muestreado

En el gráfico 23 se observa que el pH no varió mucho en los pozos, oscilando de 6.0 a 7.5, a excepción de Amayuca que tuvo un valor ligeramente más bajo (5.86), coincidiendo que en este pozo se encontró el número de aislamientos más bajo.

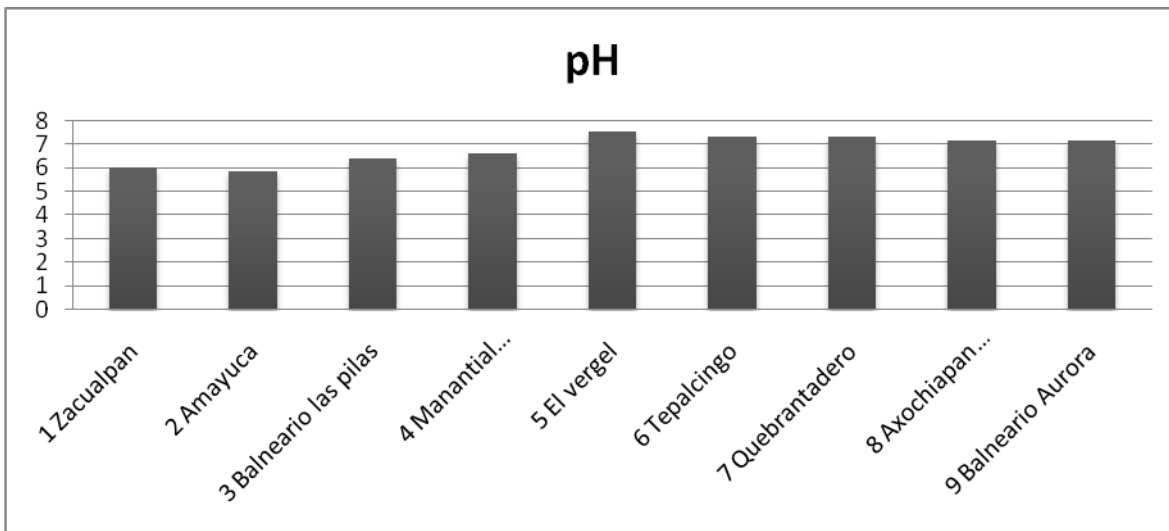


Grafico 23. Valores promedio de pH en cada pozo muestreado

Se observó un comportamiento variable del oxígeno disuelto durante el período de muestreo, en un intervalo de 2.9 a 4.83 mg/L. Los valores más altos se registraron en los meses de Junio 2009 y Abril con 4.83 y 4.61 mg/L respectivamente y el valor más bajo para Agosto con 2.86 mg/L (Gráfico 24). Este parámetro también estuvo en el rango adecuado para la presencia de las amibas de vida libre (Bonilla *et al.*, 2004).

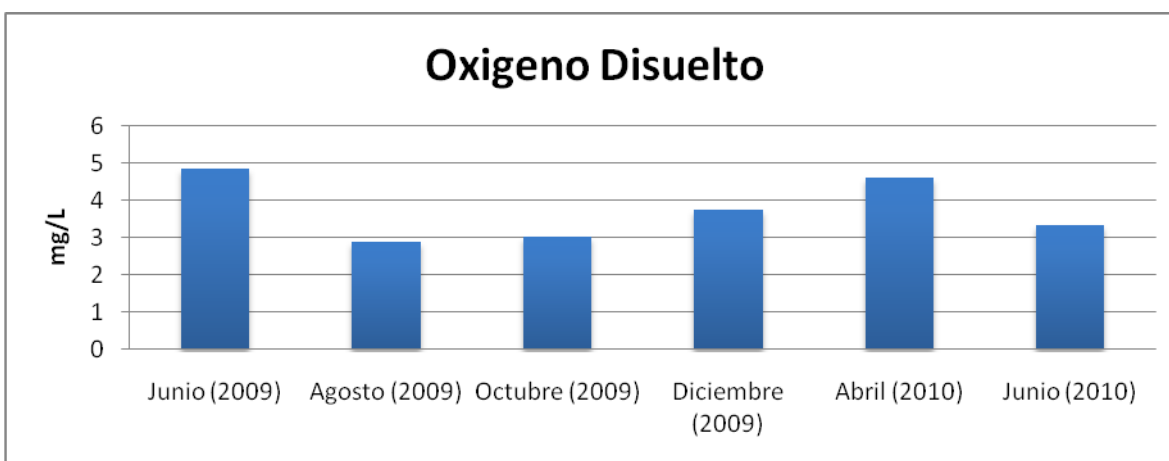


Grafico 24. Valores de oxígeno disuelto promedio en cada mes muestreado

También se observó un comportamiento variable del oxígeno disuelto en los pozos, presentando Amayuca el valor promedio más alto (9.4 mg/L), pero presento el número de aislamientos más bajo. El Balneario las Termas presento el valor

más bajo (1.98 mg/L), los demás pozos oscilaron entre 2.78 mg/L a 5.53 mg/L (Gráfico 25).

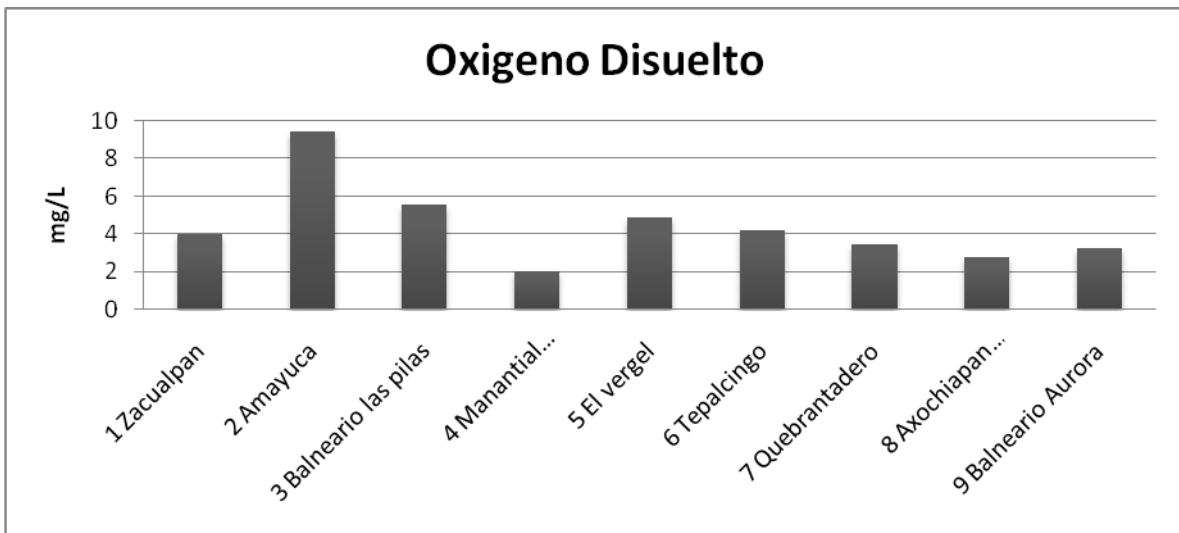


Gráfico 25. Valores promedio de oxígeno disuelto en cada pozo muestreado

En el gráfico 26 se observan los valores promedio de los sólidos disueltos (sales disueltas). Abril fue el mes con el valor más alto (670 mg/L), coincidiendo con el número de aislamientos amibianos más alto (25). Sin embargo, Junio 2009 que tuvo el valor más bajo (639.5 mg/L), también presentó un alto número de aislamientos (24). Esto tal vez se debió a que entre el valor más alto y el más bajo no hubo una gran diferencia.

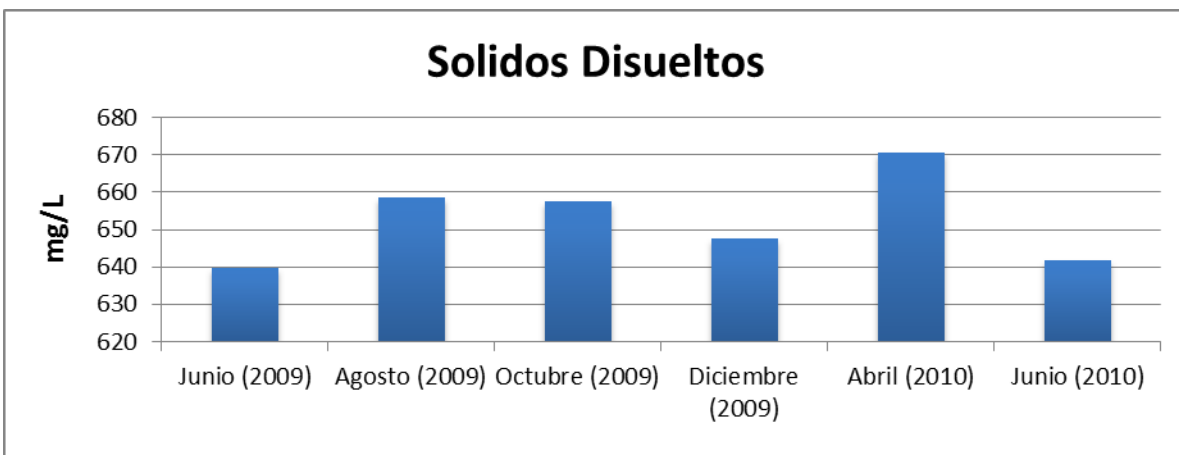


Gráfico 26. Valores de sólidos disueltos promedio en cada mes muestreado

En el gráfico 27 se observa que los pozos se agruparon en dos grupos con respecto a los sólidos disueltos, el primero con valores promedios altos de 556 mg/L a 893.3 mg/L, integrado por El Vergel, Tepalcingo, Quebrantadero, Axochiapan y Balneario Aurora y el segundo con valores más bajos de 297.8 mg/L a 352.16 mg/L, formado por Zacualpan, Amayuca y Balneario Las Pilas. El único pozo que no estuvo en estos grupos fue El Balneario Las Termas, porque presento un valor promedio de 1198.33 mg/L.

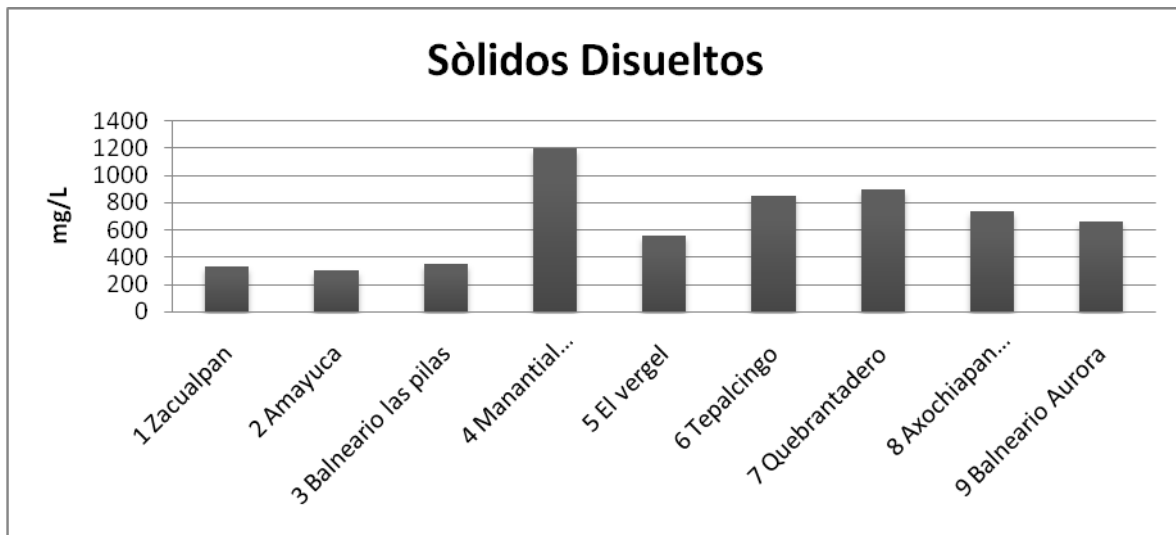


Gráfico 27. Valores promedio de sólidos disueltos en cada pozo muestreado

- **Análisis estadístico.**

En el análisis de Pearson, para que exista una relación estadísticamente significativa el valor debe de ser superior a 0.811 ó – 0.811 (Duran *et al.*, 2003).

En la tabla 6, se muestran los resultados obtenidos para cada pozo respecto a la relación de los parámetros fisicoquímicos y el número de aislamientos amibianos. Se encontraron solamente tres relaciones de las amibas con el pH, una relación directa en los pozos de Balneario Las Termas y Amayuca y una relación inversa en el pozo Quebrantadero.

Análisis de Coeficiente de Correlación Lineal Producto-Momento de Pearson				
Pozos	Parámetros Fisicoquímicos.			
	Temp. °C	pH	O. D. (mg/L)	S. D. (mg/L)
1 Zacualpan	-0.385854085	-0.424385655	0.127322054	-0.135095594
2 Amayuca	0.765117903	0.829610002	-0.061025368	-0.405005182
3 Balneario Las Pilas	0.127314474	0.063156801	0.144623102	-0.518758915
4 Manantial Balneario Las Termas	0.18039125	0.855920985	-0.191445541	0.005960517
5 El vergel	-0.151528922	0.30925661	-0.489187632	0.690821854
6 Tepalcingo	-0.576330191	-0.414002329	0.419440113	0.525337291
7 Quebrantadero	-0.553126575	-0.86223202	0.477618414	0.216870926
8 Axochiapan (pajaritos)	0.209358947	-0.516794663	-0.258254002	-0.611654817
9 Balneario Aurora	-0.766241095	-0.64546557	0.452857789	0.529290199

Tabla 6. Análisis de Coeficiente de Correlación Lineal Producto-Momento de Pearson.

X. CONCLUSION.

- La presencia de amibas de vida libre no patógenas, no representa peligro para la salud, pero en el caso de la presencia de las amibas de los géneros *Vermamoeba*, *Vahlkampfia* y *Vannella*, en donde existe sospecha que pueden causar enfermedades y sobre todo la de *A. polyphaga*, es una llamada de atención para tener precaución en el uso del agua y no descuidar su desinfección.
- Los resultados de esta investigación, en donde se encontraron amibas de vida libre en todos los pozos, aunque en números bajos, confirma que los microorganismos pueden estar presentes en el agua subterránea.
- La presencia de las amibas en el agua de los pozos estudiados se puede atribuir a las actividades antropogénicas, como la agricultura, la ganadería y el establecimiento de asentamientos humanos carentes de adecuados servicios sanitarios y las condiciones deficientes de las tuberías del sistema de drenaje, que da lugar a fugas de agua residual hacia el subsuelo, lo que convierte a los drenajes en una fuente potencial de contaminación del agua subterránea.

XI. REFERENCIAS.

- Aitken D., Hay J., Kinnear F.B., Kirkness C.M., Lee W.R. y Seal D.V. 1996. Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hartmannella* infection. *Ophthalmology*. 103: 485-494.
- Anderson R.O. 1988. *Comparative Proto-zoology. Ecology, Physiology, Life History*. Springer-Verlag. New York, 1988.
- Beltrán A. 2008. *Determinacion de las amibas de vida libre en pozos del acuífero de Cuernavaca Morelos*. Tesis de licenciatura. FES Iztacala. UNAM. 22-41 pp.
- Butt C.G. 1966. Primary amebic meningoencephalitis. *N Engl J Med*. 274: 1473-1476.
- Cabral F.M. 1988. Biology of *Naegleria* spp. *Microbiological Reviews*. Volumen 114-133.
- Campos L.U. 2007. *Distribucion temporal de las amibas de vida libre en dos manantiales del acuífero del Valle de Cuernavaca Morelos*. Tesis de licenciatura. FES Iztacala. 20-31 pp.
- Centeno M., Rivera F., Cerva L., Tsutsumi V., Gallegos E., Calderón A., Ortiz R., Bonilla P., Ramírez E. y Suárez G. (1996). *Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient with meningoencephalitis and bronchopneumonia. *Arch. Med. Res*. 27: 579-586.
- Chapelle F.H. 1993. *Ground-water microbiology and geochemistry*. John Wiley & sons, Inc. New York. 25-46, 130-170 pp.
- CONAGUA. 2002. Determinación de la disponibilidad de agua en el acuífero valle de Tepalcingo-Axochiapan, Estado de Morelos. Gerencia de Aguas Subterráneas. Subgerencia de Evaluación y Modelación Hidrogeológica. 42p.
- Culbertson C.G., J.W. Smith, J.R. Minner 1958. *Acanthamoeba*: Observations on animal pathogenicity. *Science* 127: 1506.
- Dua H.S., Azuara-Blanco A., Hossain M. y Lloyd J. 1998. Non-*Acanthamoeba* amebic keratitis. *Cornea* 17: 675-677.
- Duran D.A., Cisneros C.A., Vargas V.A. 2003. Bioestadística. FES Iztacala. UNAM. México. 136-144 pp.

- Fowler M., Carter M.R. 1965. Acute pyogenic meningoencephalitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: A preliminary report. *Br Med J* 2: 740-742.
- Guerrero T.A, Rives C.,Rodríguez A., Saldivar Y., Cervantes V. 2009. El agua en la ciudad de México. *Redalyc. Ciencias*. No. 94. 16-26 pp.
- Gianinazzi C., Schild M., Wüthrich F., Müller N., Schürch N., and Gottstein, B. 2009. Potentially human pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a heated indoor swimming pool in Switzerland. *Experimental Parasitology*. 121: 180–186.
- Gómez C.S. 2009. *Características de amibas de vida libre presentes en agua subterránea del acuífero de Cuautla Morelos*. Tesis de licenciatura. FES Iztacala UNAM. 23-43 pp.
- Greub G., Raoult R. 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev*. 17:413-433.
- Horn M., Wagner, M. 2004. Bacterial endosymbionts of free-living amoebae. *J Eukaryot Microbiol* 51:509-514
- Khan N.A. 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev*. 30: 564–595.
- Inoue T., Asari S., Tahara K., Hayashi K, Kiritoshi A., Shimomura Y. 1998. *Acanthamoeba* keratitis with symbiosis of *Hartmannella* ameba. *Am. J. Ophthalmol*. 125: 721-723.
- Kyle D.E., Noblet G.P. 1985. Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in freshwater lakes, *J. Protozool.*, 32, 99.
- Limón J.L. 2007. *Caracterización de amibas de vida libre presentes en agua subterránea del acuífero de Zacatepec, Morelos*. Tesis de licenciatura. FES Iztacala UNAM. 31-56 pp.
- Lorenzo-Morales J., Martínez-Carretero E., Batista N., Alvarez-Marin J., Bahaya Y., Walochnik J. y Valladares, B. 2007. Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *Parasitol. Res*. 102: 167-169.
- Marciano-Cabral F, Cabral G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev*. 16(2): 273-307.
- Martínez A.J. 1991 Infection of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. *Rev. Infect. Dis*. 13(Suppl.5): 399.

- Morales J.L., Miranda C.A., Jiménez, C., Tejedor M.L., Valladares B., Rivas, A.O. 2005. Evaluation of *Acanthamoeba* isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Ann Agric Environ Med.* 12: 233–236.
- Novarino G., Warren A., Butler H., Lambourne G., Boxshall A., Bateman J., Kinner N.E., Harvey R.W., Mosse R.A., Teltsch B. 1997. Protistan communities in aquifers: a review. Inglaterra. *FEMS Microbiology Reviews.* 20: 261-275.
- O'Dell WD. 1979. Isolation, enumeration and identification of amoebae from a Nebraska lake, *J. Protozool.*, 26: 265.
- Ovarnstrom Y., Da Silva A.J., Schuster F.L., Gelman B.B., Visvesvara G.S. 2009. Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic Encephalitis. *J Infect Dis.* 199: 1139-1142.
- Pimm S.L., Lawton J.H. 1977. Number of trophic levels in ecological communities, *Nature (London).* 268: 319.
- Price M. 2007. *Agua subterránea*. Limusa Norega editors. Mexico. 3-99 pp.
- Ramirez E., Campoy E., Matuz D., Robles E., Bonilla P., Warren A., Ortiz R. 2001. Free-living amoebae in organically-contaminated aquifer in Mexico. In *Proceedings of IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of free-living amoebae*. S. Billot-Bonef, P.A. Cabanes, F. Marciano-Cabral, P. Pernin, E. Pringuez (eds). John Libbey Eurotext. Paris. Pp. 109-116.
- Ramírez E., E. Campoy, D. Matuz, y E. Robles. 2006. *Acanthamoeba* Isolated from Contaminated Groundwater. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53(S1): 10–11.
- Ramírez E., E. Robles, Ma. G. Sainz, R. Ayala y E. Campoy. 2009. Calidad microbiológica del acuífero de Zacatepec, Morelos, Mexico. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25 (4): 247-255.
- Peralta R., Ayala M.L., Oviedo J.J. 2009. Amibas de vida libre en seres humanos. *Salud Uninorte.* 25(2): 280-292.
- Sawyer T.K. 1980. Marine amoebae from clean and stressed bottom sediments of the Atlantic Ocean and Gulf of Mexico, *J. Protozool.* 27:13.
- Schuster F.L. y G.S. Visvesvara. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol.* 34:1001–1027
- Shin H.J. y Im K. 2004. Pathogenic free-living amoebae in Korea. *The Korean Journal of Parasitology.* 42(3): 93-119.

- Sinclair J.L. y Ghiorse W.C. 1987. Distribution of protozoa in the subsurface sediments of a pristine groundwater study site in Oklahoma. *Applied and Environmental Microbiology*. 53(5): 1157-1163.
- Stout J.D. 1980. The role of protozoa in nutrient cycling and energy flow, *Adv. Microbiol. Ecol.* 4: 1.
- Tavares W, Carneiro L. 2009. Infección por amebas de vida libre. En: Diagnóstico y tratamiento en Infectología y Parasitología. México. Manual Moderno. p. 574-51.
- Thomas V., Loret J.F, Jousset M., Greub G. 2008. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environmental Microbiology*. 10(10): 2728–2745.
- Vicente B.P. 2009. *Distribución temporal y especial de amibas de vida libre presentes en los pozos de la zona suroeste del acuífero de Zacatepec, Morelos*. Tesis de licenciatura. FES Iztacala UNAM. 19-35 pp.
- Visvesvara G.S., Maguire J.H. 2006. Pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. Tropical Infectious Diseases. Vol. 2 (Guerrant RL, Walker DH & Weller PF, eds), pp. 1114–1125. Churchill Livingstone.
- Visvesvara G.S., Moura H., Schuster F.L. 2007. Pathogenic and opportunistic free living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 50: 1–26.
- Visvesvara G.S., Schuster F.L., Martinez A.J. 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N. G., N. Sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J Eukaryot Microbiol*. 40: 504–514.
- Willaert E. 1974. Primary amoebic meningoencephalitis. A selected bibliography and tabular survey of cases. *Ann Soc Belge Med Trop*. 54: 429-440.
- Wright S.J.L., Redhead K., Maudsley H. 1981. *Acanthamoeba castellanii*, a predator of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol*. 125: 293.
- Zaragoza S.R. 1994. Ecology of Free-Living Amoebae. *Critical Reviews in Microbiology*. 20(3): 225-241.