



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

Facultad de  
**MEDICINA**

“Análisis morfológico y molecular de *Acanthamoeba* y otras amebas de vida libre en suelo adosado a *Solanum tuberosum* (papa) vendido por agricultores en un mercado de Lima Norte - Perú”

“Morphological and molecular analysis of *Acanthamoeba* and other free-living amoebae in soil attached to *Solanum tuberosum* (potato) sold by farmers in a market in northern Lima - Peru”

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA EN LA ESPECIALIDAD DE  
LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA**

**AUTOR**

Jorge Luis Jara Bazan

**ASESOR**

Alfonso Martin Cabello Vílchez

LIMA – PERÚ

2023



## **JURADO**

**Presidente:** Dra. Maritza Mercedes Calderón Sánchez

**Vocal:** Lic. Delia Margot Faustino Arias

**Secretario:** MSc. Juan Carlos Agapito Panta

**Fecha de sustentación:** 13 de enero de 2023

**Calificación:** Aprobado

**ASESOR DE LA TESIS**

**ASESOR**

Dr. MSc, PharmD, PhD Alfonso Martin Cabello Vílchez

Jefe coordinador del Laboratorio de Protozoarios y Endosimbiontes Patógenos del

Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt

**ORCID: 0000-0003-2284-6042**

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a mi madre Digna Luisa Bazan Buiza y a mi hermano Leonardo

Jara Bazan por todo el apoyo y esfuerzo que siempre me dedicaron.

Agradezco a mi asesor el Dr. Alfonso Martin Cabello Vílchez MSc. PhD quien con su experiencia, conocimiento, motivación y paciencia me brindó toda su ayuda desde el inicio del proyecto de investigación hasta la parte final del mismo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al laboratorio de Protozoarios y Endosimbiontes patógenos (LPEP) que tiene como jefe al Dr. Alfonso Martin Cabello Vílchez del área del Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” donde realicé toda mi investigación.

A la Universidad Peruana Cayetano Heredia por las oportunidades brindadas.

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

El presente estudio ha sido financiado por el Laboratorio de Protozoarios y Endosimbiontes Patógenos del Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt”.

## **DECLARACION DE CONFLICTO DE INTERES**

El autor declara que no hay conflictos de intereses potenciales con respecto a la investigación, autoría y/o publicación del presente estudio.

## RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD

Análisis morfológico y molecular de Acanthamoeba y otras amebas de vida libre en suelo adosado a Solanum tuberosum (papa) vendido por agricultores en un mercado de Lima Norte-Perú”

### INFORME DE ORIGINALIDAD

<b>12%</b>	<b>12%</b>	<b>3%</b>	<b>0%</b>
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

### FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>repositorio.upch.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>8%</b>
<b>2</b>	<b>zagan.unizar.es</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>3</b>	Jane K.A. Cook, Christine A. Dolby, Debra J. <u>Southee</u> , A.P.A. <u>Mockett</u> . " <u>Demonstration of antibodies to Turkey rhinotracheitis virus in serum from commercially reared flocks of chickens</u> ", Avian Pathology, 1988 Publicación	<b>&lt; 1%</b>
<b>4</b>	<b>www.coursehero.com</b> Fuente de Internet	<b>&lt; 1%</b>
<b>5</b>	<b><u>Submitted to Universidad San Francisco de Quito</u></b> Trabajo del estudiante	<b>&lt; 1%</b>
<b>6</b>	<b>repositorioacademico.upc.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>&lt; 1%</b>

## TABLA DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	OBJETIVOS.....	5
3	MATERIALES Y METODOS .....	6
3.1	Diseño de Estudio .....	6
3.2	Población.....	6
3.3	Muestra.....	6
3.4	Procedimientos y técnicas .....	6
3.4.1	Recolección de la muestra .....	6
3.4.2	Preparación de medios de cultivo.....	6
3.4.3	Aislamiento de AVL .....	6
3.4.4	Uso de las claves de identificación morfológica .....	7
3.4.5	Extracción de ADN.....	7
3.4.6	Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	8
3.4.7	Electroforesis de ADN en gel de Agarosa.....	9
3.4.8	Análisis Filogenético.....	10
4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	11
5	RESULTADOS .....	12
6	DISCUSIÓN .....	13
7	LIMITACIONES.....	19
8	CONCLUSIONES.....	20
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
10	TABLAS Y FIGURAS .....	30



## RESUMEN

**Antecedentes:** En el Perú y otros países latinoamericanos la papa suele ser vendida tal como es cosechada; es decir, la tierra que está adosada al tubérculo no es retirada, y de esa manera llegan a los principales mercados de las capitales. Es de conocimiento que la tierra contiene muchos microorganismos que pueden ser potencialmente patógenos, una de ellas son las amebas de vida libre. **Objetivo:** Determinar la presencia de *Acanthamoeba sp* y otras amebas de vida libre del suelo adosado a *Solanum tuberosum* que son vendidos por los agricultores en un mercado de Lima Norte - Perú. **Materiales y Métodos:** El estudio realizado fue de tipo observacional descriptivo transversal. Se evaluó la tierra adosada de 5 papas variedad huayro que fueron compradas en un mercado de Lima Norte. Para obtener la muestra se utilizó una solución salina para amebas, esta tierra fue concentrada en frascos estériles de boca ancha y finalmente sembrada en placas de agar no nutritivo con *Escherichia coli* y sin *Escherichia coli*. **Resultados:** *Acanthamoeba sp* y otras amebas como *Leptomyxa sp*, *Arboramoeba sp*, y *Angulamoeba sp* fueron identificadas morfológicamente mediante cultivo monoxénico. Además, se identificaron 5 cepas de *Acanthamoeba sp* genotipo T4 y una cepa de *Darbyshirella sp* mediante la técnica reacción en cadena de la polimerasa. **Conclusiones:** La tierra adosada a las papas variedad huayro que se analizaron contienen *Acanthamoeba sp* genotipo T4 y otras amebas de vida libre no antes descritas en el Perú.

**PALABRAS CLAVES:** Ameba, suelo, aislamiento y purificación

(Fuente: DeCs/MeSH)

## ABSTRACT

**Background:** In Peru and other Latin American countries, potatoes are usually sold as soon as these are harvested, that is, with the soil attached to the potatoes. In that status, the potatoes arrive to the main markets of the capital. It is known that the soil contains many microorganisms that can be potentially pathogenic, one of them is the free-living amoebae. **Objective:** To determine the presence of *Acanthamoeba sp* and other free-living amoebae in soil adhering to *Solanum tuberosum* sold by farmers in a market in northern Lima - Peru. **Material and Methods:** The study was a cross-sectional descriptive observational study. The soil attached to 5 "huayro" potatoes purchased in a market in northern Lima was evaluated. A saline solution for amoebae was used to obtain the sample, this soil was concentrated in sterile wide-mouth bottles and finally sowed on non-nutritive agar plates with *Escherichia coli* and without *Escherichia coli*. **Results:** *Acanthamoeba sp* and other amoebae such as *Leptomyxa sp*, *Arboramoeba sp*, and *Angulamoeba sp* were morphologically identified by monoxenic culture. In addition, five strains of *Acanthamoeba sp* genotype T4 and one strain of *Darbyshirella sp* were identified by polymerase chain reaction technique. **Conclusions:** Soil attached to the "huayro" potatoes, that were analyzed, contained *Acanthamoeba sp* genotype T4 and other free-living amoebae not before described in Peru.

**KEYWORDS:** Amoeba, soil, isolation and purification

(Fuente: MeSH)

## 1 INTRODUCCIÓN

Las amebas de vida libre (AVL) son protozoarios omnipresentes, pertenecientes al reino Protista y de características heterotróficas que se encuentran considerablemente distribuidos en muchas áreas en el mundo, y estas mismas se sostienen nutriéndose de las bacterias que se encuentran a su alrededor, como las biopelículas y Rizósferas (1).

Los diferentes tipos de protozoarios están relacionadas con la Rizósfera y pueden presentarse como parásitos o formas de vida libre, incluso pueden presentar o no un estadio de quiste. Además, pueden disponer de un solo núcleo, pero también ciertos grupos de ellos como las AVL pueden ser multinucleadas (2).

Las amebas de vida libre han sido denominadas especímenes no patógenos hasta mediados del siglo XX, posteriormente estos protistas empezaron a ser reconocidos por su patogenicidad y su alta letalidad en los seres humanos y animales (3).

Actualmente existen 4 especies de AVL que son capaces de causar infecciones en los seres vivos. Originalmente *Naegleria fowleri*, luego *Acanthamoeba sp* genotipo T4, *Balamuthia mandrillaris*, y por último *Sappinia diploidea*. La primera es causante de meningoencefalitis, mientras que las demás fueron identificadas como agentes primordiales en la causa de encefalitis, varios de ellos son causa importante de enfermedades y poseen una alta mortalidad (mayor a 98%) (4, 5).

Como ya se mencionó las AVL ocupan muchas áreas en el mundo, pero sobre todo se distribuyen en grandes cantidades en los suelos (6).

Investigaciones acerca de los microorganismos del suelo son cada vez mayores, pero la biodiversidad, hasta la actualidad, no ha sido calculada. Muy pocos estudios

acerca de la presencia de AVL han sido conducidos en Perú y el suelo de los Andes no es la excepción. Solo existen estudios de bacterias y otros microorganismos en los suelos andinos (7, 8, 9).

*Solanum tuberosum* (papa) es el tubérculo sembrado con más renombre y es reconocido con el título de "papa común" en muchos lugares del mundo (10).

Desde tiempos ancestrales en nuestro territorio peruano la papa ha servido como producto alimentario, incluso desde los inicios de las culturas Pre-Incas e Incas. En el Perú se halla el mayor número de especies de este tubérculo, convirtiéndose en el producto más consumido y comercializado (11). Existen 5000 diversidades de papas que son sembradas por todo el mundo, y aproximadamente unos 4000 están ubicadas en territorio peruano (12). *Solanum tuberosum* al igual que otras especies de tubérculos son sembrados en suelos cultivables; es decir, suelos con todas las condiciones favorables para un buen crecimiento. Un ejemplo son los suelos de los Andes peruanos/ bolivianos (13).

Como se mencionó, la papa crece en suelos cultivables, pero es importante saber que el suelo es el hábitat natural de múltiples microorganismos (14). La presencia de protozoarios como las AVL, tienen una alta presencia en los suelos cultivables. Aproximadamente la población de estas amebas van desde los  $10^3$  y  $10^6$  organismos por gramo de suelo (15).

Los microorganismos o comunidad microbiana favorecen el óptimo crecimiento y la calidad del tubérculo; uno de estos son las AVL que mantienen un papel importante con respecto a la descomposición de la materia orgánica, ciertas especies brindan la remineralización de nutrientes (16, 17).

Calvo, *et al.* observó que la presencia y proliferación de diferentes tipos de bacterias en los suelos de cultivos de papa están condicionadas por el tipo de pH; es decir, su existencia se basa en el pH y en el aporte de nutrientes de los exudados de las plantas sobre estas poblaciones bacterianas. Además, se describe la posibilidad de que el tipo de papa pueda incidir sobre el crecimiento de estas poblaciones (8).

La frecuencia de muertes por infecciones debido a AVL no es tan alta, pero debido a su alta ubicuidad las personas están probablemente propensas a exponerse a estos microorganismos de manera pasiva generando anticuerpos frente a estos protozoarios. Sin embargo, la letalidad de *Acanthamoeba spp*, *Balamuthia mandrillaris* y *Naegleria fowleri* si son extremadamente altas > 95% (5).

Chappell y colaboradores investigaron la presencia de anticuerpos de *Acanthamoeba* en el suero de personas sanas dando como resultado un porcentaje mayor del 40% a tres diferentes especies de *Acanthamoeba* en el suero de las personas sanas; estos resultados indican que la colonización e infección por AVL es común de lo que se imaginaba (18). Lo que se desconoce es si estos anticuerpos tienen una inmunidad protectora frente a las infecciones de AVL (19).

Existen artículos científicos donde mencionan que las personas se infectan de AVL sin tener antecedentes de tener contacto con tierra u agua contaminada. Revisando la tesis de Sifuentes, nos informa que existen un 78,75% de protozoos y otros microorganismos en tubérculos que son consumidos crudos por la población en el distrito de Ate (20).

En nuestro país, analizando la actividad común y diaria que se realiza dentro del hogar, el proceso de lavado de tubérculos es una práctica común de los latinoamericanos; es decir, primero, se requiere un proceso de lavado manual de las

papas en las casas, debido a que los tubérculos son extraídos de la misma tierra por los agricultores y puestas directamente en sacos sin ningún lavado previo para ser distribuidos a los puntos de Lima; esta actividad podría generar la aerosolización, y de esta manera estos aerosoles diseminarían los quistes y/o trofozoitos (no necesariamente patógenos) que quedarán suspendidos en el ambiente por algún tiempo dentro de las casas, ingresando así a las mucosas nasales y generando posiblemente una inmunidad pasiva o una infección grave por AVL; Martínez y Visvesvara mencionan en su capítulo de libro que las personas presentan infección por AVL tales como *Naegleria fowleri* debido a la inhalación de polvo contaminado con trofozoitos o quistes (21, 22). En consecuencia, la aerosolización podría de alguna manera explicar cómo es que las personas adquieren altos niveles de anticuerpos frente a *Acanthamoeba sp* y otras AVL.

Debido a lo que se describió previamente, se realizó este estudio con el propósito de determinar la presencia de *Acanthamoeba sp* y otras AVL del suelo adosado a *Solanum tuberosum* (papa) que son vendidos por los agricultores en un mercado de Lima Norte – Perú.

## **2 OBJETIVOS**

### **Objetivo general:**

Determinar la presencia de *Acanthamoeba sp* y otras amebas de vida libre del suelo adosado a *Solanum tuberosum* (papa) que son vendidos por los agricultores en un mercado de Lima Norte-Perú.

### **Objetivos específicos:**

1. Comparar el aislamiento de AVL en dos medios diferentes: Agar no nutritivo con *Escherichia coli* y sin *Escherichia coli*.
2. Identificar las AVL presentes en la tierra adosada a las papas mediante claves de identificación morfológica.
3. Identificar el genotipo de la *Acanthamoeba sp* que se pueda aislar de la tierra adosada a las papas.

### **3 MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1 Diseño de Estudio**

El estudio que se realizó fue de tipo observacional descriptivo transversal.

#### **3.2 Población**

En este estudio, la población estuvo conformada por las tierras adosadas a las papas, compradas en 5 puestos diferentes en un mercado de Lima Norte en el año 2017.

#### **3.3 Muestra**

La muestra utilizada fue la tierra adosada en 5 papas variedad huayro de un mercado de Lima Norte en el año 2017. Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia.

#### **3.4 Procedimientos y técnicas**

##### **3.4.1 Recolección de la muestra**

Para obtener la muestra de tierra se realizó un procedimiento de lavado a cada papa individualmente, agregando 200 – 300ml de Solución Salina para Amebas de Page (Page's Amoeba Saline Solution). La muestra de tierra obtenida posterior al lavado fue recolectada en 5 frascos estériles de boca ancha diferentes para cada papa. Estos frascos se dejaron reposar 48 horas a temperatura ambiente.

##### **3.4.2 Preparación de medios de cultivo**

Se prepararon placas de Agar No Nutritivo (ANN) sin *Escherichia coli* (*E. coli*) y placas de ANN enriquecidas con una suspensión de *E. coli* viva ATCC 25922 para aislar AVL y *Acanthamoeba sp* respectivamente.

##### **3.4.3 Aislamiento de AVL**

De cada frasco que se mantuvo en reposo, con una pipeta Pasteur se cogió una muestra de tierra de 50µl y se sembró en cinco posiciones diferentes en toda la placa



Petri con ANN con *E. coli*. Asimismo, realizando el mismo procedimiento se sembró la muestra de tierra en ANN sin *E. coli* según lo descrito por Page (23). Las placas fueron selladas con parafilm para evitar la desecación y contaminación del medio; estas placas se dejaron incubar a temperatura ambiente. Cada placa fue observada después de 48 horas mediante microscopía óptica para evaluar el crecimiento de AVL en sus dos estadios trofozoitos y quistes. Como la muestra de tierra tiene una cantidad exorbitante de microorganismos la mezcla de especies era abundante; debido a esto se siguieron los pasos para llevar a cabo el método de “clonamiento de amebas” descrito por Page (23).

1. Cortar y extraer pequeños fragmentos de agar en donde exista solo el crecimiento de AVL (quistes o trofozoitos).
2. Transferirlos inmediatamente a nuevas placas con ANN con *E. coli* y sin *E. coli*.
3. Realizar los pasos 1 y 2 de 10 a 15 veces con la finalidad de lograr cultivos puros sin contaminación y con un crecimiento homogéneo de AVL.

#### **3.4.4 Uso de las claves de identificación morfológica**

Para la identificación del género de las AVL según la morfología se revisaron manuales como las de Page (23), Page, *et al.* (24) y Smirnov, *et al.* (25) y la tesis de Stefan Geisen (30) para lograr identificar morfológicamente a las AVL, con el fin de describir y comparar géneros de AVL.

#### **3.4.5 Extracción de ADN**

Con cultivos puros y homogéneos se realizó el siguiente proceso:

1. Agregar 1ml de Solución Salina para Amebas de Page a cada una de las placas con cultivos de AVL hasta cubrir toda la superficie de la placa de agar, con el objetivo de resuspender cualquier tipo de AVL presente.
2. Dejar reposar las placas durante media hora.
3. Al termino del reposo raspar con un asa de siembra la superficie del agar de cada placa con la finalidad de quitar todas las AVL que estaban en el ANN con *E. coli* y sin *E. coli*.
4. Trasladar la Solución Salina para Amebas de Page con AVL a un tubo Falcon de 15ml y centrifugar.
5. Finalmente, decantar el sobrenadante conservando el “*pellet*”. El “*pellet*” servirá para realizar la extracción de ADN.

En este estudio se realizó la extracción de ADN usando el kit de extracción: GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit.

#### **3.4.6 Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Para confirmar si los aislamientos caracterizados morfológicamente pertenecían al género *Acanthamoeba sp* y a otros géneros nuevos de AVL, se realizó la técnica de PCR.

Para esta técnica se siguieron los pasos del protocolo elaborado en el laboratorio de protozoarios y endosimbiontes patógenos del Instituto de Medicina Tropical Alexander Von Humboldt con el objetivo de identificar *Acanthamoeba sp* mediante PCR. Para que la mezcla de reacción tenga un volumen final de reacción de 50µl se preparó 25µl PCR Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific) que contiene 1.25 U de Taq ADN polimerasa, buffer de reacción, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM de cada dNTP. Además, 0.3 µM de cada cebador, 10pg - 1µg de ADN templado y se

completó con agua libre de nucleasas para 50µl de volumen final. La técnica de PCR se realizó en el termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) y se amplificó por el método de Sanger. Para este estudio, se utilizaron los cebadores JDP1 y JDP2:

Cebadores o primers específicos para *Acanthamoeba* (26).

JDP1: 5' – GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA – 3'

JDP2: 5' – TCTCACAAGCTGCTAGGGGAGTCA – 3'

Los cebadores JDP1 y JDP2 amplificaron una región de 423 - 551pb del gen ARNr 18S correspondiente a la región ASA.S1 (*Acanthamoeba* Specific Amplimer) que incluía el Fragmento de Diagnóstico 3 (DF3) (26).

Además, se utilizaron los cebadores universales Euka A y Euka B para amplificar aproximadamente 2000pb de las regiones conservadas del gen 18S rDNA de otras AVL que pudieron haber crecido en nuestras placas (27).

Euka A 5' – AACCTGGTTGATCCTGCCAGT – 3'

Euka B 5' – TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC – 3'

#### **3.4.7 Electroforesis de ADN en gel de Agarosa**

Los fragmentos de ADN amplificados fueron separados en gel de agarosa al 1% con Tris-Acetato-EDTA (TAE) (Panreac Applichem) empleando Gel Loading Dye Blue (6X) (Thermo Fisher Scientific) en electroforesis a 90 voltios durante 30 minutos (Figura 7, 8). Los fragmentos de ADN amplificados se revelaron en el transiluminador Chemi-Doc (Biorad) con el software ImageLab. El tamaño del ADN se verificó con Plus Opti-DNA Marker 100 bp (Applied Biological Material Inc.).

### 3.4.8 Análisis Filogenético

Los productos de PCR se obtuvieron en el Laboratorio de Epidemiología Molecular del IMTA<sub>v</sub>H-UPCH, y para la secuenciación, fueron enviados a la empresa MACROGEN de Seúl, Corea. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias disponibles en el GenBank (NCBI) mediante el programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) y de esta manera establecer el género y especie de los nuevos aislamientos.

Se elaboraron dos árboles filogenéticos (Figura 9, 10) el primero para evidenciar asociaciones genéticas en relación a genotipos de *Acanthamoeba sp* y el segundo para establecer el orden taxonómico de la nueva ameba aislada, una cepa de *Darbyshirella sp*. Para la base de datos del primer árbol filogenético se seleccionaron secuencias de nucleótidos relacionadas al gen ARNr 18S representativas de cada genotipo de *Acanthamoeba sp* que fueron utilizadas en estudios realizados por Corsaro, *et al.* (28) y Coronado, *et al.* (29). Para el segundo árbol filogenético se compararon las secuencias consenso a través de BLAST y se seleccionaron secuencias representativas en base al match del BLAST considerando un *Valor E* cercano a cero y un porcentaje de identidad >95%. Para el análisis filogenético realizamos la alineación múltiple de secuencias de nucleótidos con el programa BioEdit y el alineamiento de las secuencias se realizó con ClustalW. Se utilizó el software MEGA7.0. Para la construcción del árbol filogenético se utilizó el método basado en distancia *Neighbor-Joining* (NJ), el modelo de sustitución de nucleótidos 2-parámetros de Kimura y Tamura 3 parámetros con un Bootstrap de 1,000 replicaciones y se admitieron valores de Bootstrap superiores al 50% en la topología de cada rama.

#### **4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

En este estudio, al tener variables de índole cualitativa nominal; todos los datos obtenidos fueron registrados en una base de Excel, para posteriormente con estos datos realizar tablas de frecuencia.

## 5 RESULTADOS

Se obtuvo crecimiento de *Acanthamoeba sp* (Figura1) en las 10 placas evaluadas (placas de ANN con *E coli*). Además, se obtuvo crecimiento de AVL sugerentes al género *Darbyshirella sp*, *Arboramoeba sp*, *Leptomyxa sp*, *Angulamoeba sp* (Figura 2, 3, 4, 5) en 4 placas evaluadas (placas de ANN sin *E. coli*) (Tabla 1 y 2). *Acanthamoeba sp* crece exponencialmente en ANN con *E.coli*; mientras que las otras AVL reticuladas son inhibidas frente a la presencia de *E coli*.

Mediante la técnica de PCR y electroforesis de ADN en gel de agarosa se obtuvieron y confirmaron los géneros de *Acanthamoeba sp* y *Darbyshirella sp*.

No se les realizó la prueba molecular a las cepas *Arboramoeba sp*, *Leptomyxa sp*, *Angulamoeba sp* identificadas morfológicamente, porque no se logró obtener cultivos puros y homogéneos de cada una de estas AVL, debido a la mezcla de especies en las placas de ANN sin *E coli*.

## 6 DISCUSIÓN

Las amebas de vida libre se hallan considerablemente distribuidas en todo el ambiente, tal como los suelos, lodos, aire, etc. (1). Existen estudios donde investigan la presencia de AVL en muestras de tierra, como lo menciona Tanzifi, *et al.* en su investigación detección de AVL en suelos recreacionales y públicos al norte de Irán (31). Al igual que esta última investigación mencionada existe una amplia diversidad de investigaciones que analizan las muestras de tierra. El presente estudio es el primero en investigar amebas de vida libre en la tierra adosada a las papas en Lima Norte – Perú.

El hallazgo de *Acanthamoeba sp* encontrada en todos los cultivos, evidencian un posible factor de riesgo o de protección para las personas.

A pesar de que no existan estudios donde se evalúe de manera directa la tierra adosada a las papas, comparamos otros estudios donde han identificado *Acanthamoeba sp* en otro tipo de muestras. Un estudio en Tenerife, España la autora Adriana Valencia, reportó la presencia de trofozoitos con un citoplasma granular, vacuolas contráctiles, capa hialina irregular y quistes con la pared interna de forma estrellada correspondientes al género *Acanthamoeba* genotipo T4 en muestras de lechugas y zanahorias (3). Priego., 2021 identifica la presencia del 53% de *Acanthamoeba sp* en las muestras de espinacas y lechugas en la ciudad de Valencia (32).

La presencia de *Acanthamoeba sp* genotipo T4 en la tierra adosada a la papa, nos pregunta ¿el porqué de su presencia en la tierra? Se sabe que la tierra contiene múltiples microorganismos potencialmente patógenos para el ser humano, pero también existen microorganismos en estos suelos que ayudan a desarrollar los

cultivos como las bacterias. Estos microorganismos crecen alrededor de las raíces de las plantas favoreciendo su crecimiento gracias a los diferentes nutrientes que estas mismas generan (33). Una de las funciones de las AVL en el ecosistema es el control de la biomasa de las bacterias, algas y levaduras para evitar su proliferación excesiva (34).

Existen otras evidencias que demuestran que las AVL tienen gran asociación con las Rizósferas, así como lo describen Foster y Dormaar en su investigación amebas que consumen bacterias *in situ* en la Rizósfera (35). Es importante mencionar la influencia de los exudados de las plantas sobre las poblaciones rizosféricas. Calvo, *et al* mencionan que los exudados generan un ambiente favorable para el crecimiento de diversas comunidades microbianas y estas a la vez favorecen la aparición de AVL como la *Acanthamoeba sp* entre otras (8). Whitaker *et al.* sugieren que algunos grupos microbianos generan la mineralización favorable para el crecimiento de las plantas esto debido a la capacidad funcional de los microorganismos en lugar de las propiedades bióticas del suelo (36).

Alrededor del mundo existen un reducido número de investigadores dedicados a describir amebas de suelo. Uno de ellos fue el doctorante Stefan Geisen, y describió en el transcurso de su investigación 16 nuevas especies y 7 nuevos géneros manifestando la falta de conocimiento acerca de las amebas del suelo (30). En nuestra investigación hemos aislado AVL de nuevas taxas, las amebas identificadas morfológicamente fueron, *Leptomyxa sp*, *Arboramoeba sp*, *Angulamoeba sp*. En nuestro estudio hemos identificado mediante PCR una especie muy recientemente descrita llamada: *Darbyshirella sp* que tiene un crecimiento lento al igual que las amebas de nuevas taxas ya mencionadas.



Perú es el país donde existe una alta producción de cultivos de papa, el 90% de los cultivos son de zonas de gran altitud (2500 a 4000 msnm). Estas zonas son principalmente alto-andinas, un ejemplo de ellos es el departamento de Junín, que son altos productores en cultivos de papa (37). Las papas investigadas en este estudio son originarias de Junín, la cual está entre los 3000 – 4200 msnm.

Desafortunadamente hay muy pocos trabajos que analizan el suelo de los andes, los que existen están dirigidos al grupo bacteriano, algunos estudios han sido realizados a 3500 msnm en los Andes orientales del Perú y en la cordillera Vilcanota en los Andes peruanos a 5000 msnm (38, 39). Finalmente, Sivila y Herve estudiaron la microbiota del suelo del altiplano boliviano y dentro de sus hallazgos la población microbiana total alcanza valores promedio que van desde 1.6 millones -1.4 millones de microorganismos por gramo de suelo seco (40).

Si bien en otras latitudes se han estudiado la microbiota del suelo a nivel de protistas (amebas, ciliados y flagelados), pero a las latitudes de los andes peruanos no existen aún el interés para el análisis de estos microorganismos.

Nuestra investigación se aproxima a los hallazgos descritos por Stefan Geisen, sus investigaciones han demostrado AVL tipo reticuladas (*Arboramoeba sp*, *Darbyshirella sp*) aisladas en los montes de Holanda y el Tíbet (5000msnm) (30). Según Geisen la mayor fuente de nutrición de las amebas reticuladas hallados en las dos zonas mencionadas anteriormente son las bacterias, hongos, nematodos del mismo suelo (30). En nuestro caso las AVL reticuladas como *Arboramoeba sp*, *Leptomyxa sp*, *Angulamoeba sp* crecieron sin *E. coli*. a diferencia de las otras amebas como *Acanthamoeba sp* que si crecían con esta bacteria como fuente nutricional. Lo que sugiere que hay una carga sustancial de la microbiota que

permite el crecimiento de ciertos protistas a estas altitudes en el suelo. EL ANN sin *E. coli* es el mecanismo para el aislamiento de protistas que se nutren de la microbiota del suelo, si empleamos *E. coli*, limitamos el crecimiento de estos nuevos protistas. Por otro lado, la presencia de *Acanthamoeba sp* es muy alta en estas mismas muestras, ya que con *E. coli* crecen de 24 - 48 horas.

En el Perú, se han reportado pocos casos de infecciones por *Acanthamoeba sp* alrededor de 8 casos oficialmente y 55 casos de *Balamuthia mandrillaris* (5, 19). No se tiene registro de casos de infecciones por AVL en los Andes del Perú. Posiblemente exista algún factor abiótico que genere algún tipo de protección. Por lo tanto, los resultados en esta investigación nos sugieren que las personas que están en contacto con la tierra adosada a las papas podrían estar expuestos al agente infeccioso causante del compromiso cerebral.

Nuestros aislados de *Acanthamoeba sp* pertenecen al genotipo T4 lo que sugiere que son potencialmente patógenas, estas cepas serían capaces de generar inmunidad pasiva en las personas. El estudio de Chappell, *et al.* es un ejemplo claro, debido a que reportaron la presencia de anticuerpos de *Acanthamoeba* en el suero de personas sanas, así como también en mucosas nasales (18). Pocos estudios se han realizado posterior a este estudio. Recientemente, Cabello Vélchez *et al.* demostró la presencia de *Acanthamoeba* T4 y T15 en mucosa nasal de la población sana en Lima y Piura (41). Esta evidencia demuestra la posibilidad de generar capacidad inmunológica en poblaciones costeras de Perú. El único estudio que revela un grado de inmunidad en poblaciones hispanas es el de Chappell, *et al.* concluyendo que los sujetos hispanos fueron 14.5% ( $p= 0.0025$ ) menos probables en generar inmunidad (18). Esto entra en contradicción con la evidencia de Cabello-Vélchez, *et al.* Esto

nos hace pensar que la inmunidad se generaría por inhalación de los protistas en el ambiente y que el polvo ambiental juega un rol importante en este proceso. Con lo que la presencia de AVL en el suelo adosado a las papas y su posterior lavado genera aerosolización dentro de los domicilios siendo perfectamente factible la posibilidad de generar un estado de inmunidad pasiva.

Por otro lado, los demás géneros aislados en nuestro estudio (*Arboramoeba sp*, *Leptomyxa sp*, *Angulamoeba sp*) nunca han sido aisladas ni estudiadas en Perú. Este es el primer aislamiento y descripción de estas nuevas especies de AVL. Desafortunadamente, no fue posible un cultivo puro porque el crecimiento de estas AVL en placas de agar siempre fue un cultivo mixto, dos o tres especies. Además, algunas AVL eran depredadoras.

*Darbyshirella sp* fue la única cepa con cultivo puro y homogéneo que pudimos obtener, y por ello se logró realizar la técnica de PCR y posteriormente su secuenciamiento.

La cepa de *Darbyshirella sp* (Huayro-Perú) es una ameba reticulada recientemente descrita. Nuestro modelo de aislamiento nos ha permitido obtener de forma pura a nuestra *Darbyshirella sp* con número de acceso **OP650266.1**. El modelo de aislamiento en este estudio también ha sido empleado como modelo para el aislamiento de *Balamuthia mandrillaris* hace más de 30 años atrás. Este género recientemente descrito tiene muy poca diferencia con las AVL descritas por Stefan Geisen. Nuestra *Darbyshirella sp* ha sido hallada de los Andes centrales, sin embargo; es necesario realizar más estudios al respecto para determinar su real ubicación y si esta AVL tiene alguna función en el ecosistema de *Solanum tuberosum*. Es la primera vez que se describe esta AVL en Sudamérica.

En consecuencia, nuestro estudio demuestra la existencia de *Acanthamoeba* T4 y otras 4 especies nuevas de AVL. Es importante destacar que debería seguir estudiándose los suelos de los Andes y describir y analizar con herramientas moleculares y bioinformáticas la presencia de protistas potencialmente patógenos a humanos. Hacer conocer a las autoridades competentes la importancia de la limpieza en los lugares de recojo de la producción para no exponer a la población a riesgos potenciales y seguir investigando al respecto.

## **7 LIMITACIONES**

- El tamaño muestral al inicio de la investigación.
- La gran carga microbiana que se aisló impidiendo los cultivos homogéneos.
- La falta de estudios previos que nos guíen para el análisis morfológico de estos protistas en nuestra región.
- Fuentes de financiamiento en la investigación.

## 8 CONCLUSIONES

- Se evidenció la presencia de amebas potencialmente patógenas del género *Acanthamoeba sp* genotipo T4. Además, de otros géneros como *Darbyshirella sp*, *Arboramoeba sp*, *Angulamoeba sp* y *Leptomyxa sp*.
- Las placas de ANN sin *E. coli* son un buen medio para el crecimiento de AVL.
- *Acanthamoeba sp* crece a temperatura ambiente en un lapso de 24 - 48 horas después de su siembra en las placas de ANN con *E. coli*.
- *Darbyshirella sp*, *Arboramoeba sp*, *Angulamoeba sp* y *Leptomyxa sp* crecen a temperatura ambiente después de 2 a 4 semanas en las placas de ANN sin *E. coli*.
- *Angulamoeba sp* identificada morfológicamente tiene un comportamiento depredativo frente a otros protistas (Figura 6 - d, e, f).
- *Angulamoeba sp* a diferencia de todas las AVL aisladas en este estudio es la única que forma “tracks” (caminos) muy marcados cuando se desplaza sobre el agar.
- La mezcla de especies que habían en las placas de ANN sin *E. coli* dificultan la obtención de cultivos puros y homogéneos.

## 9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Benito M, LaPlante D, Fernández T, Miguel N, Lasheras A, Gómez J, *et al.* Amebas de vida libre en aguas residuales y fangos: Su papel como reservorio natural de bacterias potencialmente patógenas. *Rev Salud Ambient.* 2018; 18 (1): p. 69-77. Disponible en: [https://zaguan.unizar.es/record/75895/files/texto\\_completo.pdf](https://zaguan.unizar.es/record/75895/files/texto_completo.pdf)
2. Gertiser M. Aspectos biológicos y epidemiológicos de amebas de vida libre aisladas en la República Argentina, con énfasis en *Acanthamoeba spp* [Tesis para optar el grado de Doctor en Bioquímica]. Bahía Blanca: Universidad Nacional del Sur, 2015. Disponible en: <https://repositoriodigital.uns.edu.ar/handle/123456789/2567>
3. Valencia L. Estudio de amebas de vida libre en verduras crudas en Tenerife, Islas Canarias España [Trabajo de fin de Máster]. España: Universidad de la Laguna; 2012. Disponible en: <https://es.calameo.com/read/00200323823e43e010e74>
4. Schuster F, Visvesvara G. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* [Internet] 2004 [Consultado 2020 Abr. 21]; 34 (9): 1001-1027. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0020751904001365> DOI: 10.1016/j.ijpara.2004.06.004.
5. Cabello-Vílchez AM. *Balamuthia mandrillaris* en el Perú, lesiones cutáneas, meningoencefalitis y métodos de cultivo. *Rev Infectio.* 2016; 20 (2): p. 107-119. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v20n2/v20n2a09.pdf>

6. Wagner C. Aislamiento y caracterización molecular de amebas de vida libre en Venezuela [Tesis doctoral]. San Cristóbal de la Laguna: Dialnet, Universidad de la Laguna; 2017. Disponible en: <file:///C:/Users/USER/Downloads/Aislamiento%20y%20caracterizacion%20molecular%20de%20amebas%20de%20vida%20libre%20en%20Venezuela.pdf>
7. Goitia Zarzoso J. Aislamiento de bacterias diazotróficas en suelos de cultivo, virgen y humus de lombriz del Distrito de Puno y su efecto in vitro en la germinación de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) [Tesis para optar por el título de Licenciado en Biología]. Puno: Repositorio institucional, Universidad Nacional del Altiplano; 2014. Disponible en: [https://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14082/2414/GOITIA\\_SARZOSO\\_JANET\\_EMILIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14082/2414/GOITIA_SARZOSO_JANET_EMILIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
8. Calvo-Vélez P, Reymundo-Meneses L, Zuñiga-Dávila D. Estudio de las poblaciones microbianas de la Rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Rev Ecológica Aplicada*. 2008; 7 (1,2): p. 141-148. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v7n1-2/a17v7n1-2.pdf>
9. Ogata K, Zuñiga D. Estudio de la microflora de la Rizósfera de *Caesalpinia spinosa* en la provincia de Huánuco. *Rev Zonas Áridas*. 2008; 12 (1): p. 191-208. Disponible en: <http://www.lamolina.edu.pe/zonasaridas/za12/pdf/art%2012ZA12.pdf>
10. Machida-Hirano R. Diversity of potato genetic resources. *Breed Sci*. 2015; 65 (1): p. 26-40. DOI: 10.1270/jsbbs.65.26



11. Montalvo-Otivo JM. Diversidad genética de papa nativa cultivada (*Solanum sp*) de cuatro comunidades de Huancavelica-Perú [Tesis para optar el grado de Magister Scientiae en mejoramiento genético de plantas]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2019. Disponible en: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3813/montalvo-otivo-jorge-manuel.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
12. Chávez P. La papa, tesoro de los Andes. [Internet] Perú: CIP (Centro Internacional de la Papa); 2015 [Consultado 2020 ene. 25] Disponible en: [https://fci.uib.es/digitalAssets/177/177040\\_peru.pdf](https://fci.uib.es/digitalAssets/177/177040_peru.pdf)
13. Rojas-Calderon NJ. Sistemas de abonamiento en la producción del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) var. Canchan en la comunidad de Seccelambras - Acocro – Huamanga-Ayacucho [Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agrónomo]. Ayacucho: Universidad Nacional de Huancavelica; 2014. Disponible en: <https://apirepositorio.unh.edu.pe/server/api/core/bitstreams/7862867d-8067-4e29-bd1c-ad816320380a/content>
14. Rosero Egas C, Tinajero Carrera M. Aislamiento de microorganismos capaces de producir antibióticos, a partir de suelos de las regiones naturales de Ecuador [Tesis para optar por el título de ingenieras en biotecnología de los recursos naturales]. Quito: Repositorio institucional, Universidad Politécnica Salesiana; 2016. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12142/1/UPS-QT09705.pdf>

15. Vargas R. Avances en microbiología de suelos: Los protozoarios y su importancia en la mineralización del nitrógeno. Agr. Costarricense. 1990; 14 (1): p. 121-134. Disponible en: [https://www.mag.go.cr/rev\\_agr/v14n01\\_121.pdf](https://www.mag.go.cr/rev_agr/v14n01_121.pdf)
16. Sanabria-Pulido AY. Protozoos de vida libre en Colombia: Un análisis de la importancia en las ciencias limnológicas [Trabajo de grado en modalidad de Monografía para optar al título de Licenciada en Biología]. Colombia: Universidad distrital Francisco José de Caldas; 2018
17. Ruiz Leyva W. Comportamiento de ocho genotipos de la población de papa B3C3 para rendimiento en Cajamarca [Tesis para optar el título profesional de ingeniero agrónomo]. Cajamarca: Repositorio institucional, Universidad Nacional de Cajamarca; 2019
18. Chappell, C. L., Wright, J. A., Coletta, M., & Newsome, A. L. (2001). Standardized Method of Measuring Acanthamoeba Antibodies in Sera from Healthy Human Subjects. *Clinical and Vaccine Immunology*, 8(4), 724–730. DOI:10.1128/cdli.8.4.724-730.2001
19. Cabello-Vílchez AM. *Acanthamoeba spp* un agente oportunista en infecciones humanas. *Revista de Investigación de la Universidad Norbert Wiener*. 2015; 4 (1): p. 11-32. DOI: 10.37768/unw.rinv.04.01.002
20. Sifuentes Rosales DL. Prevalencia de protozoos y nematodos en tubérculos que son consumidos crudos, expendidos por los agricultores del distrito de Ate, 2012 [Tesis para optar por el título profesional de químico-farmacéutico]. Lima: Repositorio institucional, Universidad Wiener; 2013.

21. Zenón Ramos S. Almacenamiento y multiplicación de papa-semilla utilizando brotes de calidad [Internet]. Huancayo: Instituto Nacional de Innovación Agraria – INIA; 2014. [Consultado 2020 Dic. 22] Disponible en: [file:///C:/Users/USER/Downloads/Ramos Manual\\_almacenamiento...papa\\_semilla.pdf](file:///C:/Users/USER/Downloads/Ramos%20Manual_almacenamiento...papa_semilla.pdf)
22. Martínez, A. y Visvesvara G. Free-living, Amphizoic and Opportunistic Amebas. *Brain Pathology*. 1997; 7: 583-598. DOI: 10.1111/j.1750-3639.1997.tb01076.x
23. Page FC. A new key to freshwater and soil Gymnamoebae: With instructions for culture. Ambleside: Freshwater Biological Association; 1988. 122 p. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(89\)80039-9](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(89)80039-9)
24. Page F, Siemensma P. *Nackte Rhizopoda and Heliozoa*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1991. 297 p. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(11\)80056-4](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(11)80056-4)
25. Smirnov A, Brown S. Guide to the methods of study and identification of soil Gymnamoebae. *Protistology*. 2004; 3(3):148-190. Disponible en: <file:///C:/Users/USER/Downloads/SmirnovandBrown-Guidetosoilamoebae.pdf>
26. Schroeder J, Booton G, Hay J, Niszl I, Seal D, Markus M, et al. Use of Subgenic 18S Ribosomal DNA PCR and Sequencing for Genus and Genotype Identification of Acanthamoebae from Humans with Keratitis and from Sewage Sludge. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2001 May [cited 2019 Mar 22]; 39(5):1903– 1911. DOI: 10.1128 / JCM.39.5.1903-1911.2001

27. Medlin L, Elwood H, Stickel S, Sogin M. Characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. Vol. 71, Issue 2. EEUU: Elsevier; 1988. 9 p. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90066-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90066-2)
28. Corsaro D, Walochnik J, Köhler M, Rott MB. *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (Genotype T 19). Parasitol Res [Internet] 2015 [Consultado 2020 Abr. 26]; 114 (7): 2481-2490. Disponible en: <https://europepmc.org/article/med/25869957> DOI: 10.1007/s00436-015-4445-8
29. Coronado D, Silva A, Castro F, Lares L, et al. *Acanthamoeba* mauritaniensis genotype T4D: An environmental isolate displays pathogenic behavior. Parasitol Int [Internet] 2020 [Consultado 2020 Jul. 25]; 74 (1): 1-11. Disponible en: <https://europepmc.org/article/med/31669294> DOI: 10.1016/j.parint.2019.102002
30. Stefan G. Soil Protists diversity, distribution and ecological functioning [Tesis para optar el grado de Doctor]. Lahnstein: Universidad de Colonia, 2014. Disponible en: [https://kups.ub.uni-koeln.de/5757/1/PhD\\_general\\_publication.pdf](https://kups.ub.uni-koeln.de/5757/1/PhD_general_publication.pdf)
31. Tanzifi A, Moghaddam Y, Dodangeh S, et al. Detection and Molecular Characterization of Potentially Pathogenic Free-Living Amoebae from Recreational and Public Soils in Mazandaran, Northern Iran. Vol. 16, Iran: Iran J Parasitol; 2021. 10 p. DOI: 10.18502/ijpa.v16i2.6316

32. Gajas Priego SM. Microbioma de amebas de vida libre (FLA) presentes en alimentos organicos: ¿potencial riesgo para la Salud Pública? [Trabajo Final de Grado en Biotecnología]. Valencia-España: Universitat Politècnica de València; 2021. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/171580>
33. Condori-Titto X. Identificación y clasificación de microorganismos eficientes del suelo, en la estación experimental Patacamaya. [Tesis de Grado para optar el título de Ing. Agrónomo]. La Paz-Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés; 2020. Disponible en: <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/24902/T-2770.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
34. Castrillón J, Orozco L. *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. Rev Chilena Infectol 2013; 30 (2): 147-155. Disponible en: <https://www.scielo.cl/pdf/rci/v30n2/art05.pdf>
35. Foster RC, Dormaar JF. Bacteria-grazing amoebae in situ in the rhizosphere. Biol Fertil Soils [Internet] 1991 [Consultado 2020 May. 15] 11 (2): 83-87. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/001670379090203W>  
DOI: 10.1016/0016-7037(90)90203-W
36. Whitaker J, Ostle N, McNamara NP, Nottingham AT, *et al.* Microbial carbon mineralization in tropical lowland and montane forest soils of Peru. Front Microbiol [Internet] 2014 [Consulta 2020 May. 10]; 5: 1-13. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00720/full> DOI: 10.3389/fmicb.2014.00720

37. Flores Ccahuana FA. Análisis de los factores que inciden en la baja productividad de 5 variedades de papa nativa en la provincia de Cotabambas, región Apurímac, 2015. [Tesis de Grado para optar el título de Ing. Agrónomo] Arequipa-Perú. Universidad Nacional de San Agustín; 2017. Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/2725/Agflccfa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
38. Fierer N, McCain CM, Meir P, Zimmermann M, *et al.* Microbes do not follow the elevational diversity patterns of plants and animals. *Ecology* [Internet] 2011 [Consultado 2020 May. 10]; 92 (4): 797-804. Disponible en: <https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1890/10-1170.1>  
DOI: 10.1890/10-1170.1
39. Nemergut DR, Anderson SP, Cleveland CC, Martin AP, *et al.* Microbial community succession in an unvegetated, recently deglaciated soil. *Microb Ecol* [Internet] 2006 [Consultado 2020 May. 05]; 53 (1): 110-122. Disponible en: <https://europepmc.org/article/med/17186150> DOI: 10.1007/s00248-006-9144-7
40. Sivila R, Hervé D. Análisis de la microbiota en suelos cultivados del Altiplano Central. En: Primer congreso Boliviano de la ciencia del suelo [Memorias del primer congreso Boliviano de la ciencia del suelo]. La Paz-Bolivia; 1999. Disponible en: [https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins\\_textes/divers11-03/010025653.pdf](https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers11-03/010025653.pdf)
41. Cabello-Vílchez AM, *et al.* Genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains isolated from nasal swabs of healthy individuals in

Peru. Acta trop., 130C (2013), pp. 7-10. DOI:  
10.1016/j.actatropica.2013.10.006

## 10 TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1 Resultados del aislamiento de AVL a partir de muestras de tierra adosada a la papa

Código de muestra	Tipo de ANN	Detección en cultivo	Detección por PCR	Género de ameba de vida libre
P1-CEC	Con <i>Escherichia coli</i>	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba</i>
P2-CEC	Con <i>Escherichia coli</i>	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba</i>
P3-CEC	Con <i>Escherichia coli</i>	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba</i>
P4-CEC	Con <i>Escherichia coli</i>	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba</i>
P5-CEC	Con <i>Escherichia coli</i>	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba</i>
P6-CEC	Con <i>Escherichia coli</i>	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba</i>
P7-CEC	Con <i>Escherichia coli</i>	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba</i>
P8-CEC	Con <i>Escherichia coli</i>	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba</i>
P9-CEC	Con <i>Escherichia coli</i>	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba</i>
P10-CEC	Con <i>Escherichia coli</i>	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba</i>
P1-SEC	Sin <i>Escherichia coli</i>	Negativo	NSTM	NSI
P2-SEC	Sin <i>Escherichia coli</i>	Negativo	NSTM	NSI
P3-SEC	Sin <i>Escherichia coli</i>	Positivo	Positivo	<b><i>Darbyshirella sp,</i></b> <i>Arboramoeba sp,</i> <i>Leptomyxa sp,</i> <i>Angulamoeba sp</i>
P4-SEC	Sin <i>Escherichia coli</i>	Positivo	Positivo	<b><i>Darbyshirella sp,</i></b> <i>Arboramoeba sp,</i> <i>Leptomyxa sp,</i> <i>Angulamoeba sp</i>
P5-SEC	Sin <i>Escherichia coli</i>	Negativo	NSTM	NSI
P6-SEC	Sin <i>Escherichia coli</i>	Negativo	NSTM	NSI
P7-SEC	Sin <i>Escherichia coli</i>	Positivo	Positivo	<b><i>Darbyshirella sp,</i></b> <i>Arboramoeba sp,</i> <i>Leptomyxa sp,</i> <i>Angulamoeba sp</i>
P8-SEC	Sin <i>Escherichia coli</i>	Positivo	Positivo	<b><i>Darbyshirella sp,</i></b> <i>Arboramoeba sp,</i> <i>Leptomyxa sp,</i> <i>Angulamoeba sp</i>
P9-SEC	Sin <i>Escherichia coli</i>	Negativo	NSTM	NSI
P10-SEC	Sin <i>Escherichia coli</i>	Negativo	NSTM	NSI

NSTM: no se realizó la técnica molecular

NSI: no se identificó



TABLA 2 Frecuencia de AVL mediante cultivos de ANN en tierra adosada a *Solanum tuberosum* que fueron comercializadas en un mercado de Lima Norte en el año 2017

Muestras de tierra adosada a la papa	ANN con <i>Escherichia Coli</i>		ANN sin <i>Escherichia coli</i>	
	n=10	%	n=10	%
Cultivo positivo para AVL	10	100.00	4	40.00
Cultivo negativo para AVL	0	0.00	6	60.00
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>	<b>100.00</b>	<b>10</b>	<b>100</b>



Figura 1: Trofozoitos de *Acanthamoeba sp* aislado en cultivo monoxénico. Visualización a 100X empleando microscopía óptica (a, b)

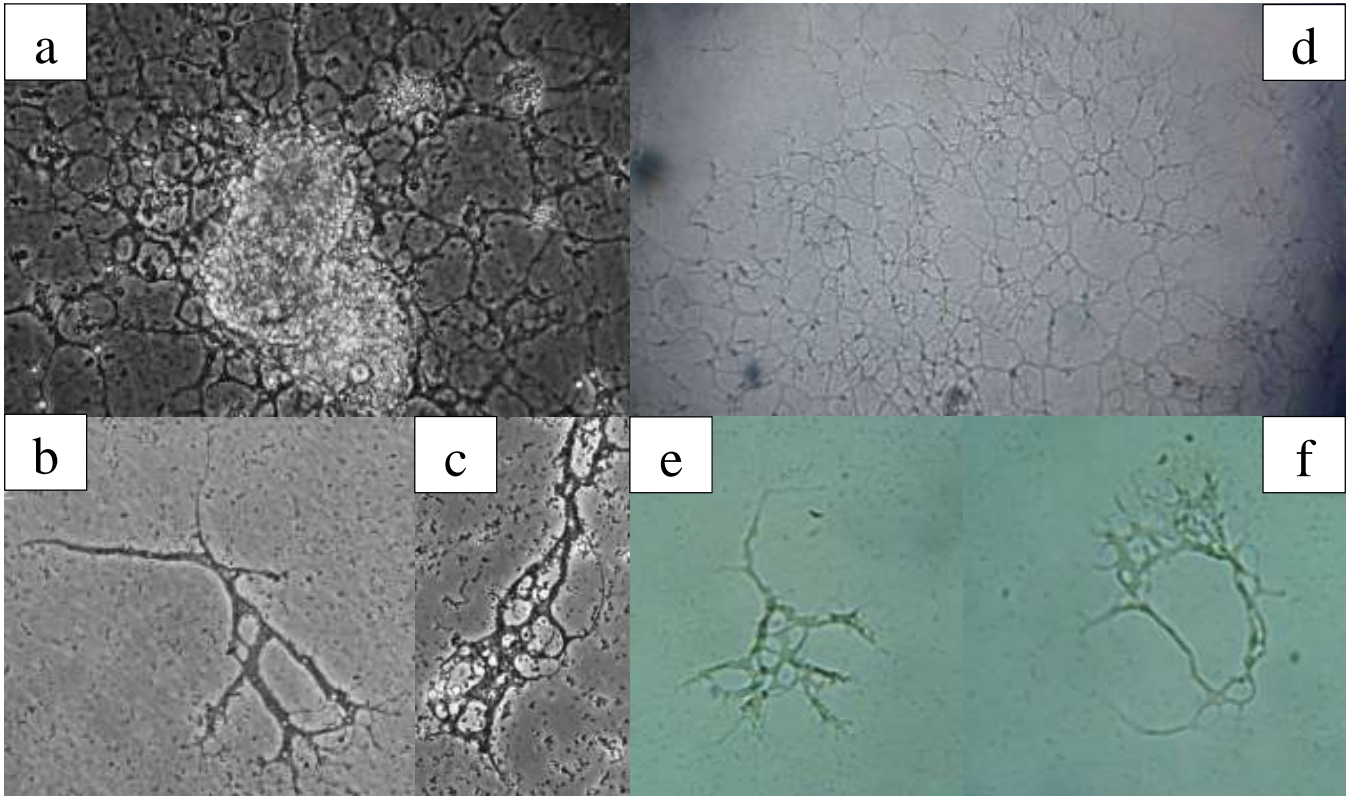


Figura 2: Las imágenes (a, b y c) fueron tomadas de la tesis doctoral: Soil Protists Diversity, Distribution and Ecological Functioning (Tesis doctoral) del Dr. Stefan Geisen, pues son las primeras sobre *Darbyshirella terrestris*. La imágenes (d, e, f) son trofozoitos de *Darbyshirella sp* aisladas en cultivo monoxénico. Visualización a 100X empleando microscopia óptica.

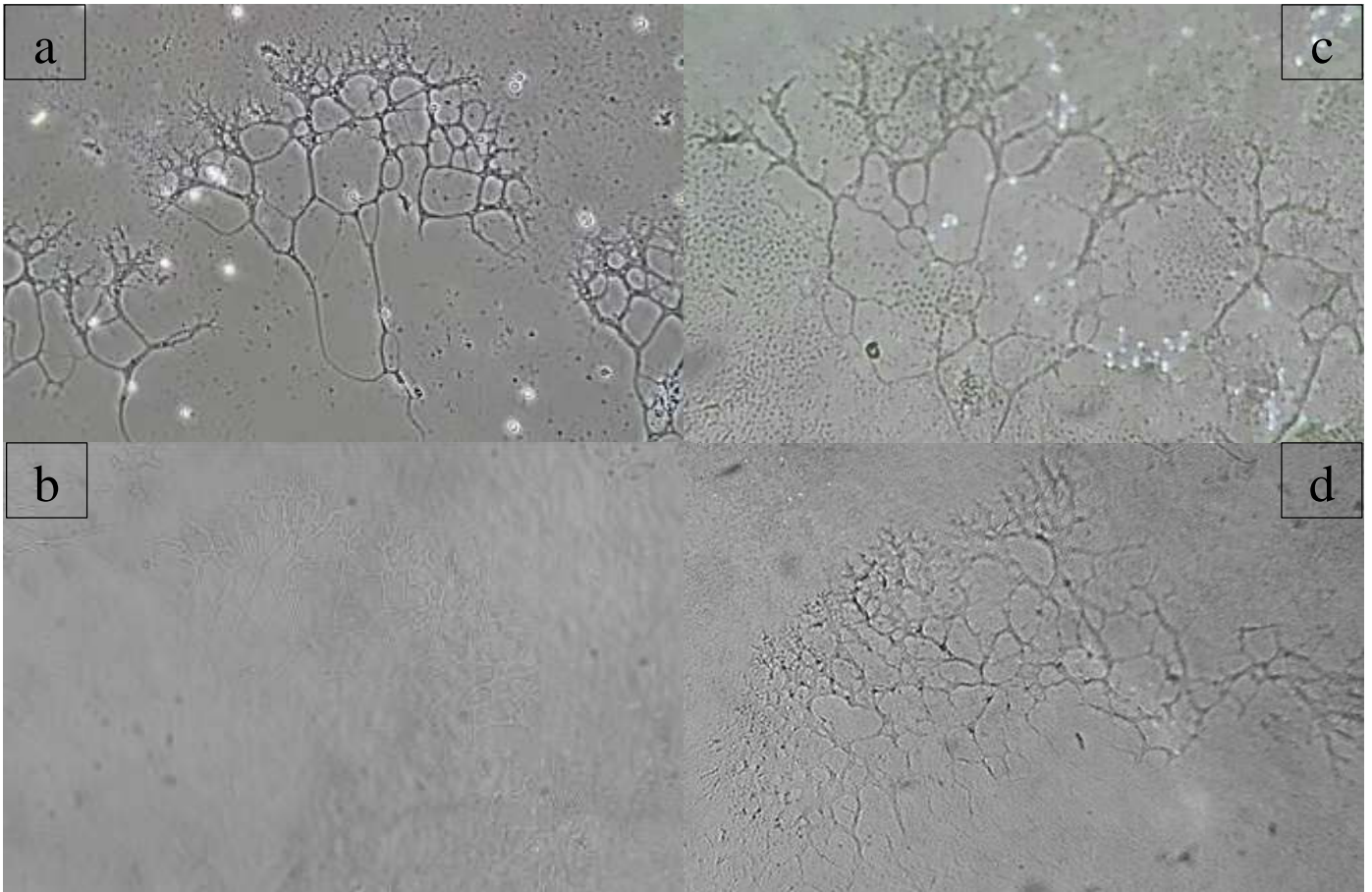


Figura 3: Las imágenes (a) fue tomada de la tesis doctoral: Soil Protists Diversity, Distribution and Ecological Functioning (Tesis doctoral) de Dr. Stefan Geisen. Es una *Arboramoeba reticulata*. En la website: <https://arcella.nl/visual-key-naked-amoebae/> también se puede encontrar la imagen (a). Las imágenes (b, c, d) nos muestran trofozoítos de *Arboramoeba sp* aislados en cultivo monoxénico. Visualización a 10X empleando microscopía óptica.

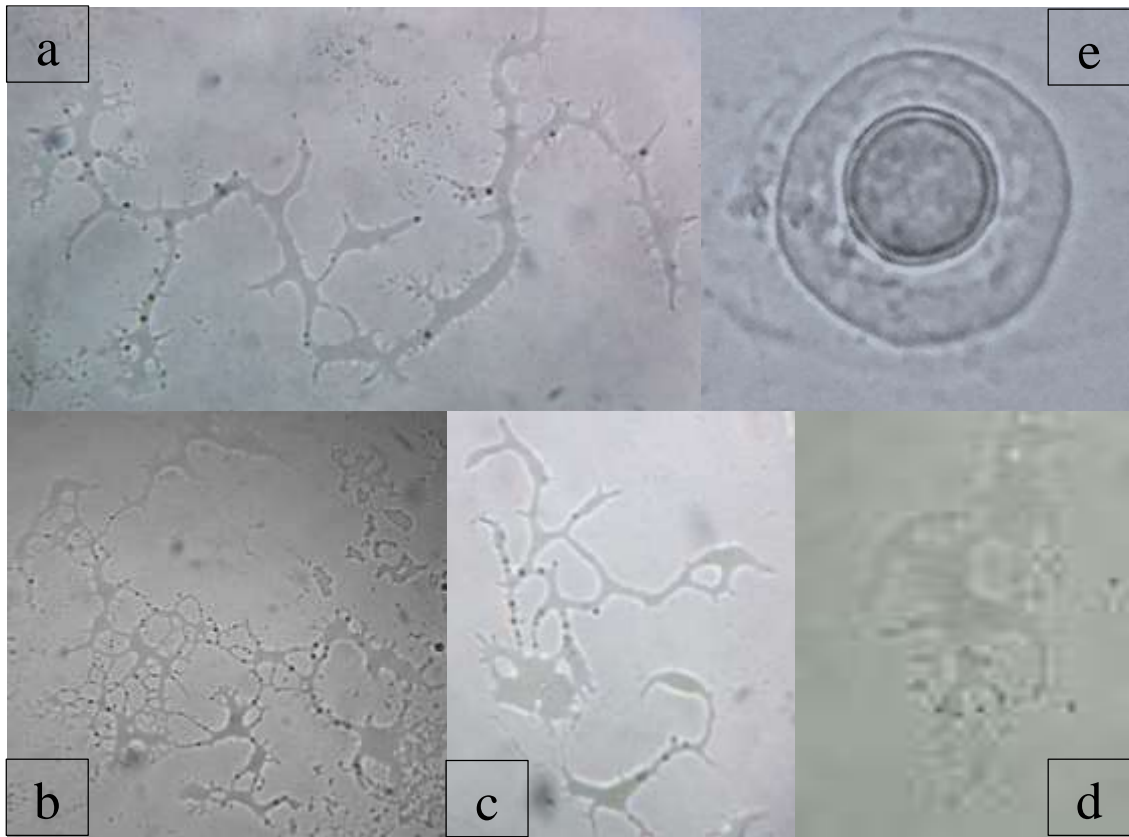


Figura 4: Trofozoito gigante de *Leptomyxa sp* en cultivo monoxénico. Visualización a 10X empleando microscopia óptica (a). Posible quiste de *Leptomyxa sp* (e). Trofozoitos de *Leptomyxa sp* aislado en cultivo monoxénico. Visualización a 10X empleando microscopia óptica (b, c, d).

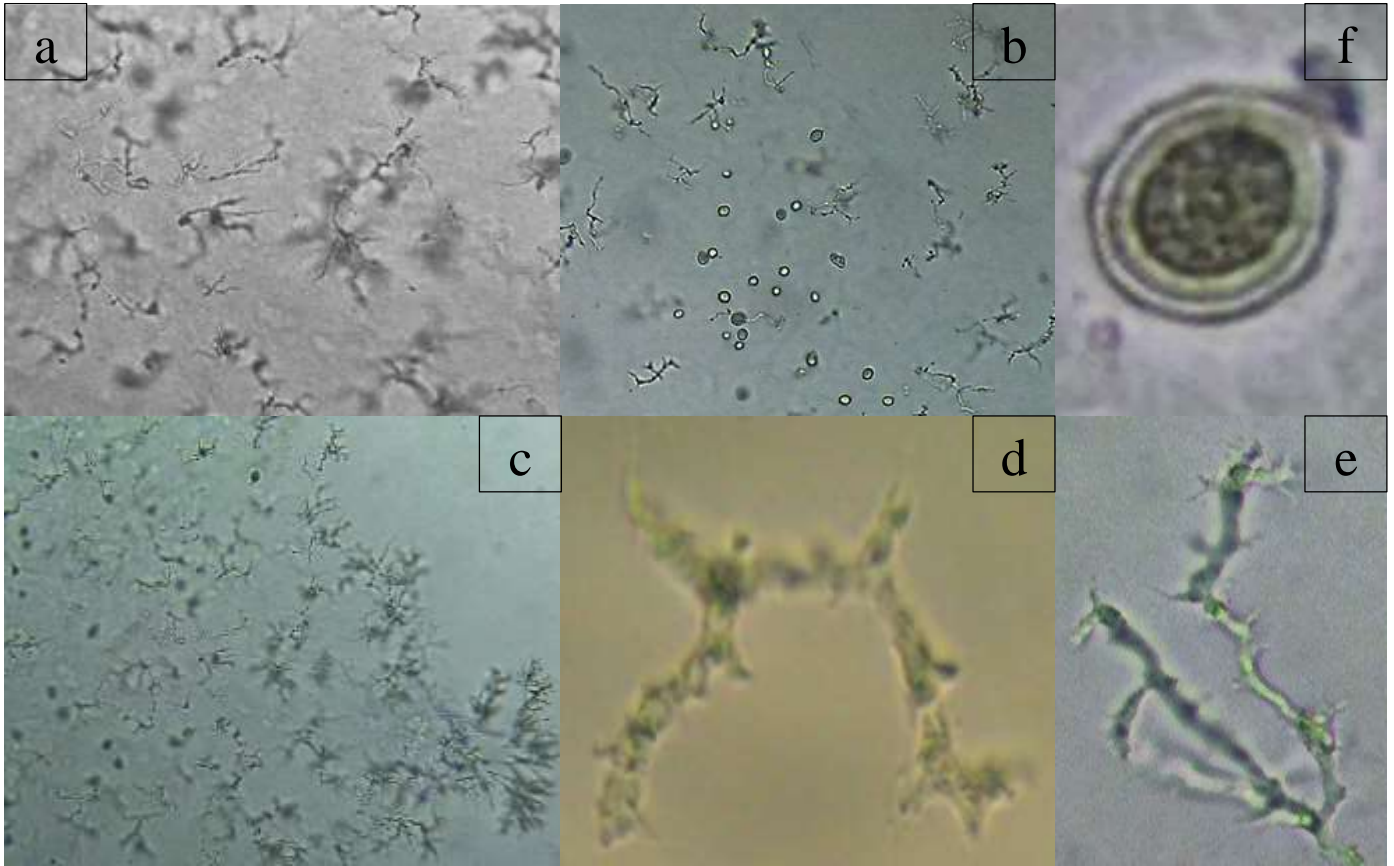


Figura 5: Trofozoitos de *Angulamoeba sp* aislado en cultivo monoxénico (crecimiento debajo del agar). Visualización con 10X empleando microscopia óptica (a, b, c). Trofozoito de *Angulamoeba sp* visualización a 100X empleando microscopia óptica (d, e). Posible quiste de *Angulamoeba sp* observada a 100X con microscopia óptica (f).



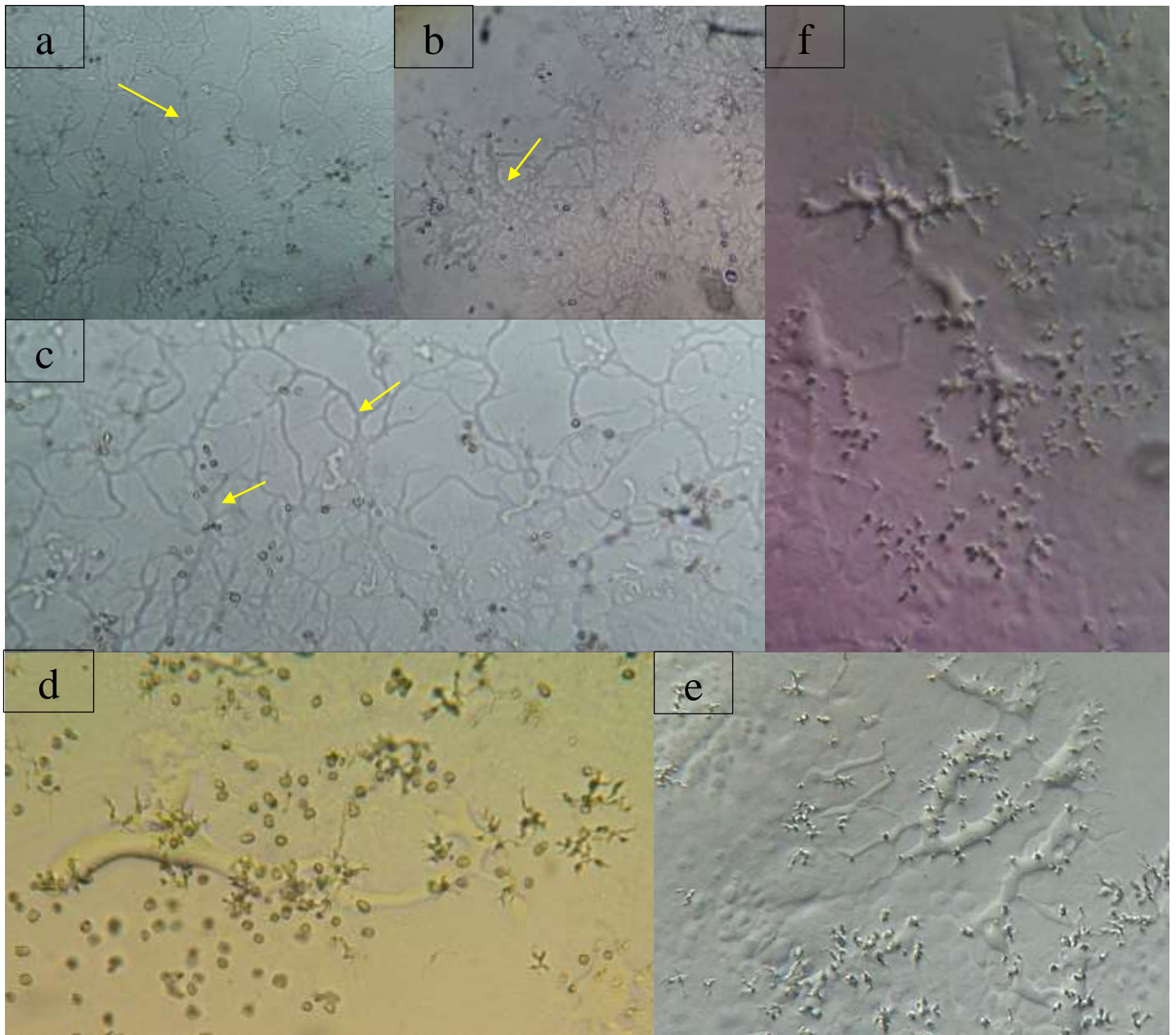


Figura 6: “Tracks” hechas por *Angulamoeba sp* aislado en cultivo monoxénico. Visualización a 10X empleando microscopia óptica. (a, b, c) (Ver flechas). Ataque de *Angulamoeba sp* sobre *Leptomyxa sp* (d, e, f).

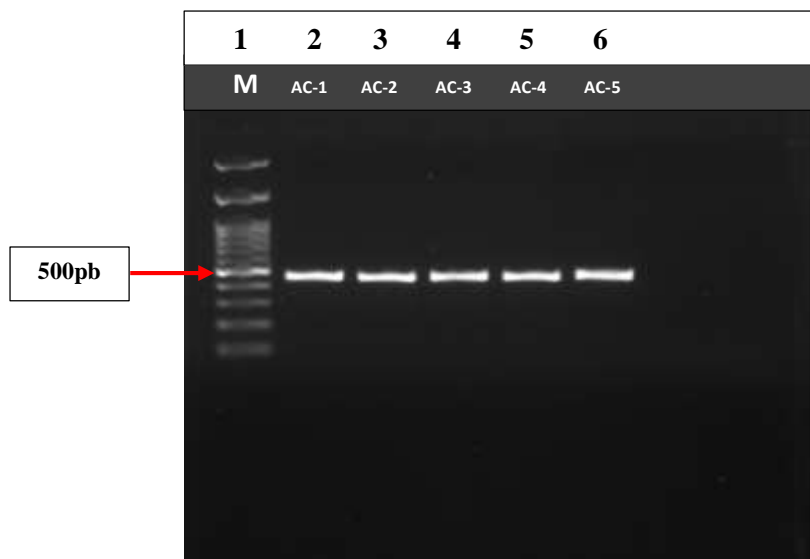


Figura 7: Amplificación por PCR de la región ASA.S1 del gen ARNr 18S. Carril 1 (M): Marcador de peso molecular 500pb. Carriles 2, 3, 4, 5 y 6: Cultivos de *Acanthamoeba sp* positivos.

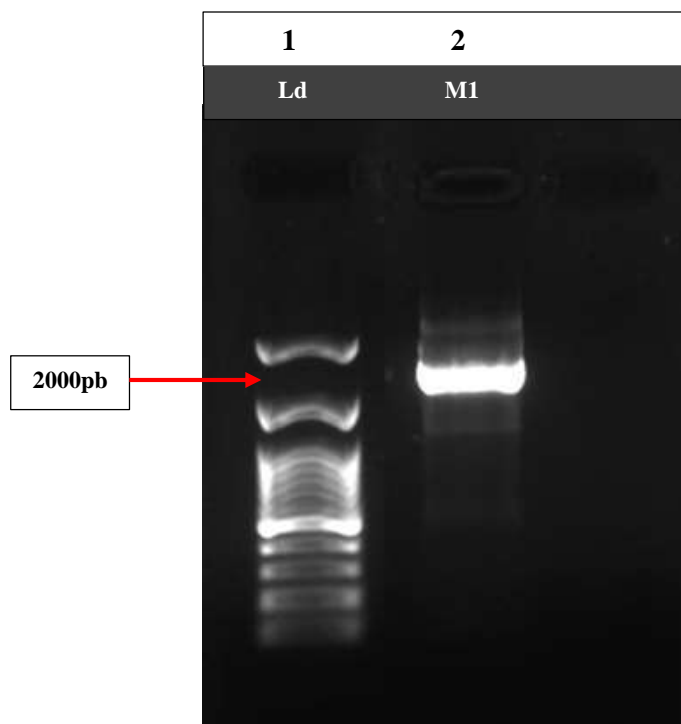


Figura 8: Amplificación por PCR de la región conservada del gen 18S rDNA de *Darbyshirella*. Carril 1; Lader (Ld): Marcador de peso molecular 100pb. Carril 2; M1: ADN del Cultivo de *Darbyshirella sp* positivo (n. **OP650266.1**).

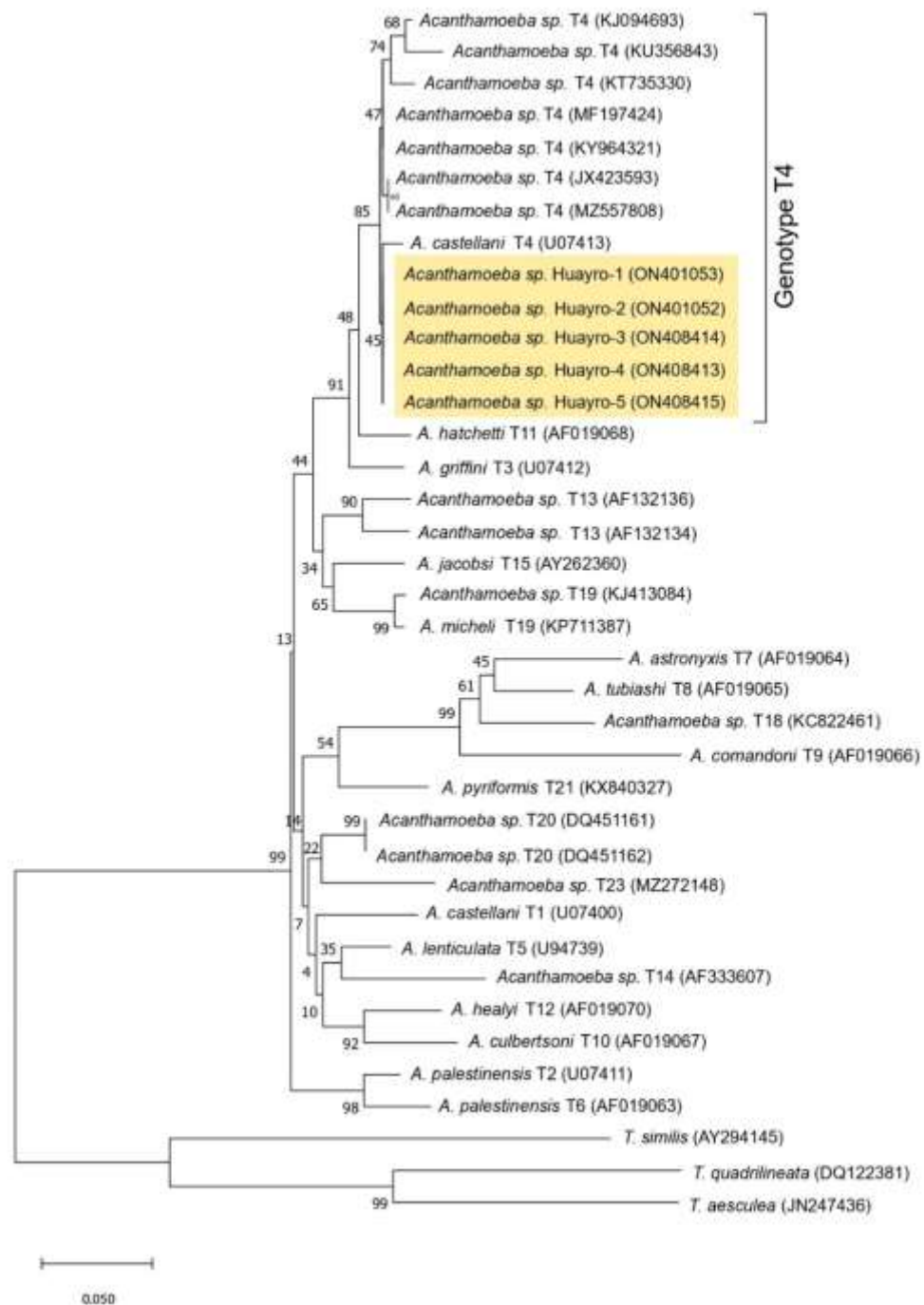


Figura 9: El algoritmo utilizado para la construcción del árbol filogenético fue el *Neighbor – joining* con el modelo Kimura-2-parameter y los valores 1000 bootstrap. El tamaño final del alineamiento fue: 599 bases, se empleó el Programa MEGA 7.0.



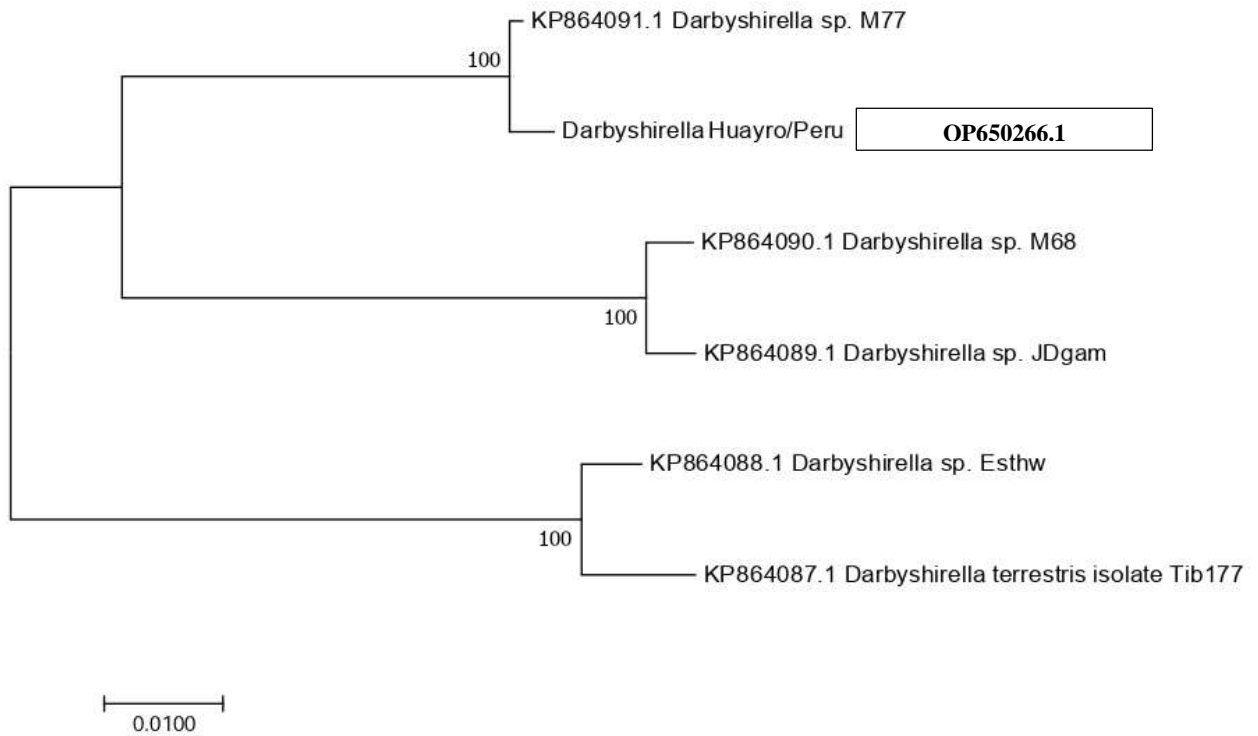


Figura 10: Árbol filogenético para *Darbyshirella* sp. El algoritmo utilizado para la construcción del árbol filogenético fue el *Neighbor – joining* con un modelo de sustitución empleando Kimura-2-parameter y los valores 1,000 bootstrap. Está basado en el gen del 18S ARNr. Se elabora la reconstrucción filogenética mediante el programa MEGA 7.0. cepa aislada en Perú (Huayro-Perú).