

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

CARACTERIZACION ULTRAESTRUCTURAL Y FISIOLÓGICA
DE UNA BACTERIA DEPREDADORA DE Chromatium minus

SANTIAGO SANCHEZ FERRER

1985

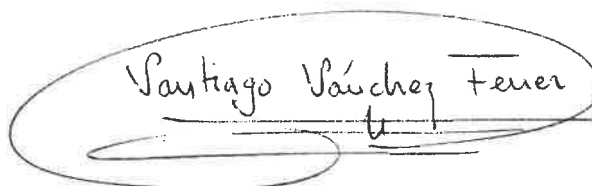


UNIVERSIDAD AUTUNOMA DE BARCELONA-FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

CARACTERIZACION ULTRAESTRUCTURAL Y FISIOLOGICA
DE UNA BACTERIA DEPREDADORA DE Chromatium minus

Tesina de Licenciatura de la
Facultad de Ciencias, Sección
de Biológicas, de la Universidad
Autónoma de Barcelona, por

Santiago Sánchez Ferrer



Visto Bueno
el Director de la Tesina

Bellaterra, junio de 1985

RICARD GUERRERO I MORENO, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE
MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD
AUTONOMA DE BARCELONA,

CERTIFICO, que los trabajos experimentales que han llevado a
la redacción de la presente Tesina de Licenciatura sobre
"CARACTERIZACION ULTRAESTRUCTURAL Y FISIOLÓGICA DE UNA
BACTERIA DEPREDADORA DE Chromatium minus" han sido realizados
íntegramente en este Departamento desde Febrero de 1984 hasta
Junio de 1985

Y para que así conste, firmo el presente certificado en
Bellaterra, a

RESUMEN

1. INTRODUCCION.....	1
<u>Bdellovibrio</u>	6
<u>Vampirovibrio</u>	9
<u>Vampirococcus</u>	14
<u>Bacteriófagos</u>	16
2. MATERIAL Y METODOS.....	21
2.1 Cepas bacterianas utilizadas.....	21
2.2 Descripción del habitat.....	21
2.3 Medios de cultivo y disoluciones tampón.....	23
2.4 Reactivos y aparatos.....	26
2.5 Métodos de aislamiento y recuentos.....	28
2.5.1 Técnicas de enriquecimiento.....	28
2.5.2 Detección de <u>Daptobacter</u> sobre fil- tros.....	28
2.5.3 Recuentos.....	30
2.5.4 Observación de las calvas de lisis mediante la técnica de la doble capa de agar.....	31
2.5.5 Filtros de barrera.....	31
2.6 Microcultivos.....	33
2.6.1 Desarrollo y preparación de un micro- cultivo	33
2.6.2 Seguimiento fotográfico.....	35
2.7 Métodos para la utilización del microscopio electrónico.....	35
2.7.1 Tinción negativa.....	36
2.7.2 Sombreado de platino.....	36

2.7.3	Secciones ultrafinas.....	37
2.7.4	Preparación de muestras para el micros- copio electrónico de barrido.....	40
2.7.5	Punto crítico.....	41
2.7.6	Técnicas fotográficas.....	42
3.	RESULTADOS.....	43
3.1	Observaciones efectuadas mediante microscopía óptica.....	43
3.1.1	Morfología y tinción de <u>Daptobacter</u>	43
3.1.2	Análisis de las muestras mediante micros- copía de epifluorescencia.....	44
3.1.3	Aplicación de la microscopía de contraste de fases al seguimiento de un microcultivo.....	45
3.2	Actividad bacteriolítica de <u>Daptobacter</u>	46
3.2.1	Detección sobre filtros de membrana de <u>Dap- tobacter</u>	46
3.2.2	Recuento de calvas mediante la técnica de la doble capa de agar.....	47
3.2.3	Margen de hospedador.....	48
3.3	Aplicación del microscopio electrónico de barrido al análisis de muestras.....	49
3.3.1	Observación de muestras de campo.....	49
3.3.2	Observación de muestras enriquecidas.....	51
3.3.3	Análisis directo de las calvas de lisis.....	53
3.4	Aplicación del microscopio electrónico de transmi- sión.....	53
3.4.1	Caracterización morfológica de <u>Daptobacter</u>	55

3.4.2	Flagelos.....	55
3.4.3	Envolturas celulares.....	57
3.4.4	Caracterización ultraestructural.....	58
3.5	Ciclo infectivo de <u>Daptobacter</u>	59
3.5.1	Contacto primario.....	59
3.5.2	Ataque.....	60
3.5.3	Penetración.....	61
3.5.4	Multiplicación.....	62
3.5.5	Liberación.....	62
3.6	Crecimiento independiente.....	63
3.6.1	Características morfológicas y colonia- les.....	63
3.6.2	Características ultraestructurales.....	64
3.6.3	Características metabólicas.....	64
3.6.4	Cinética de crecimiento.....	65
3.7	Papel ecológico de los microorganismos depredadores de <u>Chromatium</u>	68
3.7.1	Habitats que favorecen la proliferación de microorganismos depredadores de <u>Chromatium</u>	69
3.7.2	Recuentos totales en aguas dulces.....	70
3.7.3	Recuentos de células viables de <u>Daptobacter</u> a partir de muestreos efectuados en distintas capas de agua de la laguna de Cisó.....	71
4.	DISCUSION.....	90
5.	CONCLUSIONES.....	107
6.	BIBLIOGRAFIA.....	110

A mi familia

RESUMEN

En el presente trabajo se ha realizado la caracterización morfológica, ultraestructural y fisiológica de una bacteria depredadora de Chromatium aislada del lago Grande de Estanya y a la que se ha designado con el nombre de Daptobacter.

Para obtener elevados títulos de Daptobacter para el empleo de las técnicas de microscopía electrónica se tuvieron que realizar previamente cultivos de enriquecimiento, por pases sucesivos de material procedente de las calvas líticas, en cultivos axénicos de Chromatium.

Mediante la utilización de la microscopía electrónica de transmisión (principalmente) y de barrido, así como con la utilización del microscopio de contraste de fases, se pudieron determinar las características morfológicas que a continuación se enumeran: forma, tamaño, flagelos, envolturas celulares, así como analizar la ultraestructura celular.

Daptobacter es un microorganismo Gram-negativo de morfología bacilar, y provisto de un flagelo polar que le confiere movilidad. Su ultraestructura muestra una pared celular típica Gram-negativa y unas especiales estructuras polares todavía indeterminadas.

La microscopía (tanto electrónica como óptica) jugó un papel relevante en el estudio del ciclo infectivo de Daptobacter. Para este análisis se realizaron microcultivos que permitieron la descripción del ciclo infectivo.

El ciclo infectivo de Daptobacter comprende diferentes fases o etapas que incluyen, un " contacto inicial " de duración no determinada en la que la bacteria depredadora colisiona con la célula hospedadora, una fase de " penetración " en el interior del citoplasma bacteriano de la célula hospedadora, una fase de " multi-

plicación " del depredador, y finalmente una fase de " liberación " seguida de la lisis completa de la célula hospedadora.

Para la detección de la actividad bacteriolítica se emplearon técnicas específicas (como la de la doble capa de agar) que permitió la observación de calvas líticas sobre sedimentos celulares de la bacteria hospedadora. Como sedimentos celulares se utilizaron diferentes especies de microorganismos fototróficos con el fin de determinar el margen de hospedador de Daptobacter; el cual forma calvas líticas sobre sedimentos celulares de diferentes especies de la familia Chromatiaceae.

Uno de los objetivos principales en la realización de este trabajo fue la obtención de cultivos axénicos del microorganismo depredador. Una vez obtenidos se estudió su morfología, ultraestructura y metabolismo a la vez que se provó su capacidad infectiva. Mediante los cultivos axénicos se determinaron las propiedades metabólicas. Daptobacter es un microorganismo anaeróbico facultativo, con una importante actividad fermentadora y proteolítica .

Finalmente también se realizaron estudios del papel ecológico de los microorganismos depredadores de Chromatium en hábitats naturales. Para ello se efectuaron recuentos de viables de la laguna de Cisó así como recuentos totales de muestras pertenecientes al lago Grande de Estanya. Estos últimos recuentos permitieron la cuantificación (a distintas profundidades) del número de células de Chromatium infectadas y sin infectar, y del número de depredadores por célula; señalándose por primera vez, dado el elevado número de microorganismos depredadores (10^5 cel/ml), su importancia en hábitats acuáticos.

1.-INTRODUCCION

El objetivo del presente trabajo ha sido el aislamiento y la caracterización morfológica, estructural y fisiológica de una bacteria depredadora de Chromatium minus procedente de muestras de agua del lago Grande de Estanya (Huesca) (Avila et al., 1984), y a la que se la ha designado de forma provisional con el nombre de Daptobacter.

Los primeros estudios realizados a partir de muestras obtenidas del lago Grande de Estanya tuvieron como finalidad la obtención de cultivos axénicos de otra bacteria depredadora descrita en nuestro laboratorio en 1981. Las pruebas realizadas para su detección pusieron de manifiesto la existencia de una nueva bacteria con actividad endoparasítica y con un espectro bacteriolítico más amplio. Esta bacteria ha sido el objeto de estudio del trabajo que a continuación se expone.

Primeramente se realizó el enriquecimiento de Daptobacter con el propósito de obtener calvas de lisis en sedimentos celulares de la bacteria hospedadora, a partir de los cuales pudiera efectuarse el aislamiento y la purificación en cultivos axénicos. De los cultivos, tanto de enriquecimiento como axénicos, se efectuaron estudios morfológicos y estructurales, a la vez que se realizaron diferentes pruebas bioquímicas con el fin de determinar las principales características metabólicas de Daptobacter.

Finalmente se ensayaron diferentes dinámicas de infección entre Daptobacter y la bacteria hospedadora, realizándose un seguimiento fotográfico mediante microscopía de contraste de fases y microscopía electrónica de transmisión con el propósito de determinar diferentes estadios de la interacción depredador-presa.

En la presente memoria se recoge en primer lugar una revisión bibliográfica sobre los casos conocidos hasta la actualidad de parasitismo bacteriano.

En el apartado de Material y Métodos se describen, además de los medios de cultivo y disoluciones, las técnicas básicas empleadas así como los aparatos utilizados.

A continuación se hace una relación de los Resultados obtenidos a partir de los objetivos anteriormente citados incluyéndose finalmente una Discusión general del trabajo realizado, exponiéndose las Conclusiones extraídas.

Por último se cita la bibliografía utilizada tanto para el desarrollo de la revisión como para la labor experimental.

Para acabar, quisiera agradecer al Dr. Ricardo Guerrero por haberme permitido formar parte del Departamento de Microbiología de la U.A.B. así como por asignarme la realización de este trabajo.

Muy especialmente quisiera hacer constar la gran importancia que ha tenido la colaboración, apoyo y amistad de la Dra. Isabel Esteve para la finalización de este trabajo; sus conocimientos y explicaciones me han permitido adquirir una mejor comprensión de la microbiología.

A Núria Gaju por su colaboración en algunos de los estudios de laboratorio realizados y por la ayuda constante que me ha proporcionado. Al equipo de microscopía electrónica de esta universidad formado por Nofre Castells, Francesc Bohils y Angel Noguera que me asesoraron en mis primeros pasos en el mundo de la microscopía electrónica, soportando con gran paciencia y afabilidad las mil preguntas que les formulé.

A Pep Gasol por facilitarme los recuentos totales que se realizaron del lago Grande de Estanya y que han sido objeto de estudio de esta memoria.

A los compañeros del Departamento de los cuales he aprendido

mucho y bueno.

Para finalizar quisiera agradecer a mis familiares Paco y Pepe su importante colaboración en el mecanografiado de esta tesina y así mismo a mis compañeros de carrera y amigos Dolors, Mariona, Berta, Josep, Ferran, Xavi y a mi novia Silvia por su sacrificio, paciencia y amistad en los momentos de elaboración final de este trabajo. A todos ellos gracias, con mi más profundo agradecimiento.

Tipos de depredación en bacterias

Hasta la década de los 60 en que por primera vez fue descrita una bacteria capaz de atacar y lisar los cultivos celulares de diferentes microorganismos Gram-negativos, no se sospechaba que pudieran existir otros mecanismos de nutrición bacteriana que no fuera la directa absorción de nutrientes del medio.

La bacteria fue denominada posteriormente Bdellovibrio. La primera cepa de este microorganismo fue aislada por Stolp (1961) y descrita por Stolp & Petzold (1962).

Los microorganismos que pertenecen a este género son pequeños vibrios de $0.35 \times 1.2 \mu\text{m}$ provistos de uno, a veces varios flagelos polares, y que ocupan (una vez han colisionado y penetrado en la célula hospedadora) el espacio periplasmático. Posteriormente se reproducen por división binaria liberando un gran número de células hijas capaces cada una de ellas de iniciar un nuevo ciclo infectivo.

Bdellovibrio se caracteriza además por presentar calvas de lisis (semejantes a las de los virus) sobre cultivos confluentes de célula hospedadora, y portener un amplio espectro bacteriolítico.

El descubrimiento de Bdellovibrio representó un notable avance en el conocimiento de la evolución de la forma de vida bacteriana, y añadió un nuevo eslabón en la cadena trófica dentro del campo de la ecología.

Hasta hace pocos años, los únicos sistemas depredador-presa que se conocían en el mundo microbiano eran los existentes entre los bacteriofagos y las bacterias, y entre las especies del género Bdellovibrio y diferentes bacterias Gram-negativas. Ambos sistemas han sido ampliamente estudiados, y las diferentes etapas de sus ciclos infectivos están perfectamente establecidas.

Posteriormente, en 1972 Gromov & Mankaeva describieron un nuevo microorganismo predador capaz de lisar los cultivos celulares del alga, Chlorella vulgaris, al que designaron Bdellovibrio chlorellavorus. Una revisión más completa (Corder & Starr, 1978) separó este microorganismo del grupo de los bdellovibrios principalmente por su incapacidad de penetrar en el espacio periplasmático de la célula hospedadora, característica esencial del género Bdellovibrio.

Recientemente la nueva especie descrita aparecía clasificada como Vampirovibrio chlorellavorus (Gromov & Mankaeva, 1980) citándose sus principales aspectos morfológicos y su naturaleza ectoparásita, aunque se ignorase por completo las diferentes etapas de su ciclo infectivo.

Los estudios que nuestro Departamento viene efectuando desde hace algunos años sobre organismo fototróficos, pusieron de manifiesto la existencia de un microorganismo depredador de Chromatium sp aislado de hábitats acuáticos y de características muy similares a Vampirovibrio, excepto por su morfología de pequeño coco (Esteve et al., 1983).

Con el fin de completar el estudio sobre esta nueva especie se efectuaron nuevos análisis de muestras de agua procedentes del lago Grande de Estanya y se iniciaron los cultivos de enriquecimiento que permitieron la detección de nuevas calvas líticas. El resultado fue la detección de una nueva bacteria depredadora con un amplio espectro de actividad lítica y de naturaleza endoparásita.

La revisión bibliográfica y temática que a continuación se expone es un intento de recoger los datos que hasta el momento se conocen sobre el parasitismo entre bacterias, por este motivo los bacteriófagos son brevemente tratados y tan solo se citan sus principales características.

Bdellovibrio

Es un género formado por microorganismos Gram-negativos de forma de vibrio y de 0.2 - 0.5 μm de diámetro y 0.5 - 1.4 μm de longitud. Su tamaño puede variar según las características de la cepa, tipo de nutrición y del estado o fase del desarrollo en el que se encuentre.

Bdellovibrio se caracteriza por ser un microorganismo móvil y por la posesión de flagelación polar. Habitualmente tiene un solo flagelo, aunque en ocasiones se han observado microorganismos que presentaban un número mayor. Una particularidad del flagelo de Bdellovibrio es que es envainado, por lo que presenta un grosor superior al de los flagelos normales. La vaina es una continuación de la pared celular de la bacteria (Abram & Davis, 1970).

En el polo opuesto existen apéndices o extrusiones de 4.5 - 5.5 μm de diámetro y de 0.8 μm de grosor a los que se les atribuyó un papel en los procesos de ataque y penetración en la célula hospedadora (Starr & Huang, 1972), aunque otros autores los consideran como artefactos producidos durante la fijación y tinción de las células.

La estructura de la pared celular de los bdellovibrios es la típica de bacterias Gram-negativas. El aspecto de la membrana plasmática en secciones ultrafinas presenta partículas regularmente distribuidas de 6-10 nm de diámetro (Abram & Davis, 1970).

La región nuclear está situada en una posición central y según Starr & Baigent (1966) ocupó las dos terceras partes del área total citoplasmática.

Dentro del género Bdellovibrio se encuentran actualmente clasificadas tres especies:

- Bdellovibrio bacteriovorus
- Bdellovibrio starrii
- Bdellovibrio stolpii

cuyas principales características se presentan en la tabla 1.1 . No obstante, se han descrito también otras cepas que presentan importantes diferencias metabólicas con las anteriormente citadas (Seidler & Starr,1971).

Estudios genéticos han revelado la diversidad molecular existente entre las distintas cepas de Bdellovibrio. El DNA es altamente homogéneo y tiene un contenido del 43-51 % de GC (Seidler et al.,1971)(Torrella et al.,1978)

Los bdellovibrios dependientes de hospedador tienen actividad lítica sobre varios grupos de bacterias Gram-negativas, estando perfectamente determinada la capacidad de algunas cepas de parasitar a un amplio espectro de microorganismos, mientras que otros se caracterizan por su especificidad (Burnham et al.,1968).

El ciclo infectivo de Bdellovibrio se inicia con las fases de contacto primario y ataque de la célula hospedadora, seguida de una penetración por parte del depredador en el espacio periplasmático y posterior multiplicación y liberación de la descendencia. El contacto primario puede producirse entre uno o más Bdellovibrios y la célula hospedadora, no estando todavía muy definido el mecanismo por el cual se produce la colisión.

Bdellovibrio penetra en el interior del espacio periplasmático de la célula hospedadora mediante la formación de un poro de entrada a nivel de la pared celular. El crecimiento de Bdellovibrio continúa entre la pared celular y la membrana plasmática (Burger et al.,1968).El parásito se elonga unidi

Tabla 1.1 Características diferenciales del género Bdellovibrio

Características	<u>B. bacteriovorus</u>	<u>B. stolpii</u>	<u>B. starrii</u>
% G+C	50.4	42	43.5
Morfología	vibrio	vibrio	vibrio
Tamaño	0.35-1.2	0.35-1.2	0.35-1.2
Motilidad	+	+	+
Flagelación polar	+	+	+
Aeróbico	+	+	+
Test de la oxidasa	+	+	+
Test de la catalasa	+	+	-
Capacidad fermentadora	-	-	-
Reducción de nitratos	-	+	-
Gelatinasa	+		
Crecimiento dependiente	+	+	+
Crecimiento independiente	+	+	+
Formación de calvas de lisis	+	+	+

reccionalmente adoptando una forma espiral, cinco o diez veces superior al de la célula primitiva, que posteriormente se escinde en varias células hijas. Estas, una vez separadas, forman un flagelo envainado y degradando la célula hospedadora son liberadas e inician un nuevo ciclo (Burnham et al., 1970).

El número de células hijas por Bdellovibrio que infecta varía en relación a la célula infectada siendo de 6 a 30 en Pseudomonas fluorescens, 5 a 12 en E.coli (Scherff et al., 1.966) y 20 en Spirillum serpens (Stolp, 1967).

La figura 1.1 muestra el ciclo lítico y el crecimiento saprofítico de Bdellovibrio publicado por Burnham et al. (1970)

Vampirovibrio

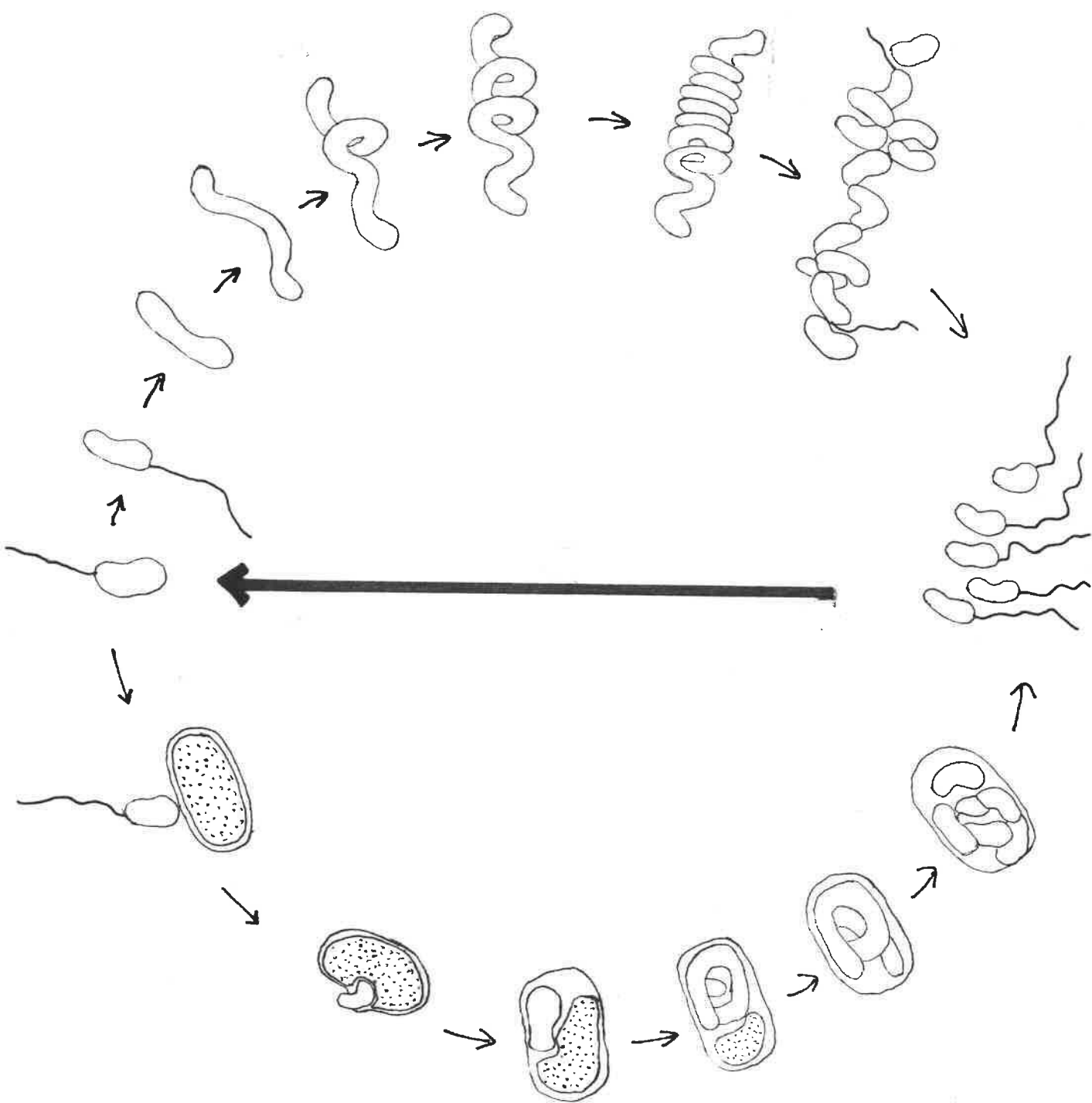
Microorganismo parásito descubierto por Gromov & Mankae va (1972) en cultivos celulares de un alga eucariota Chlorella vulgaris, y en un principio clasificado dentro del género Bdellovibrio con el nombre de Bdellovibrio chlorellavorus, aunque posteriores estudios indicaron diferencias notables con Bdellovibrio por lo que fue clasificado como un nuevo género, Vampirovibrio chlorellavorus.

Vampirovibrio es un microorganismo pleomórfico que adopta una forma vibrilar en estado libre con un tamaño de 0.3-0.5 μm de anchura, y presenta en cambio cuando se encuentra parasitando morfología de vibrio (de aproximadamente 0.4 μm de anchura) o de coco (de 0.6 μm de diámetro).

La pared celular es la usual de bacterias Gram-negativas.

Vampirovibrio presenta dos tipos de apéndices extracelulares:

- 1) gruesos filamentos parecidos a "pili" que al ser



observados mediante tinción negativa revelan una estructura fibrilar (6.5 μm de anchura por fibra) y a los que se les asignó una función de ataque.

- 2) un flagelo polar no envainado (Bdellovibrio siempre presenta el flagelo con vaina) sumamente frágil (a menudo suele aparecer roto o deteriorado) y de una anchura de 15 nm.

A nivel metabólico se sabe que Vampirovibrio es incapaz de crecer en cultivos microbiológicos tanto líquidos como sólidos, e incluso sobre células de Chlorella muertas por diversos métodos. Esto ha supuesto la imposibilidad de aislarlo en cultivo axénico.

Molecularmente el DNA de este microorganismo contiene 50 mol % G+C valor muy semejante al que tiene el DNA de las diferentes especies de Bdellovibrio.

El ciclo infectivo de Vampirovibrio se inicia con la adhesión del parásito a la pared celular del alga mediante una estructura electrodensa de 245 nm de anchura y 36 nm de grosor, cuya composición es desconocida. La textura y densidad de dicha estructura de ataque varía con el plano de la sección (secciones ultrafinas) observándose en unas ocasiones como difusa y fibrosa, y en otras como electrodensa y estratificada. El parásito parece por sí solo capaz de sintetizarlo.

Coder & Starr (1978) sugirieron que dicha estructura no era un engrosamiento de la capa externa de la pared bacteriana y apoyaron su hipótesis en otros mecanismos conocidos de adhesión de bacterias mediados por biopolímeros bacterianos extracelulares, lo cual condiciona una modificación o disolución sustancial de la pared (Harri & Michell, 1973).

Ante el ataque bacteriano se produce la formación de agregados por parte del alga, lo cual no se produce en cultivos axénicos de Chlorella (Coder & Starr, 1978). Estudios de esta fase efectuados mediante el microscopio de contraste de fases permitieron la observación de bacterias y algas embebidas en una matriz hialina que tenía el aspecto de una red fibrosa. En la actualidad aún no está clara la causa de la formación de dicha matriz pudiendo corresponder al metabolismo del alga o al de la bacteria, o ser un producto de la interacción de ambos.

Los estudios efectuados sobre la capacidad depredadora de dicha bacteria demuestran que Vampirovibrio es capaz de atacar y parasitar 25 cepas distintas de Chlorella en crecimiento activo, pero no se produce crecimiento bacteriano en diferentes cultivos bacteriológicos, tampoco en otros tipos de algas eucariotas o cianobacterias ni sobre 24 especies diferentes ensayadas de bacterias Gram-negativas en las que Bdellovibrio causa lisis.

Nunca se ha observado una penetración completa del parásito en el interior de Chlorella vulgaris (siendo ésta una de las causas fundamentales para excluirlo del género Bdellovibrio).

Aunque la asociación alga-bacteria es esencialmente extracelular, Coder y Starr (1978) sugirieron (tras estudios realizados por microscopía electrónica) la existencia de un estilete de material electrodensito de naturaleza desconocida, que penetraba a través de la pared del alga y que presionaba la membrana citoplasmática siendo su función ignorada.

Vampirovibrio se divide por escisión binaria, y ésta se produce únicamente cuando se encuentra adherido a la pared celular de la célula hospedadora.

Los efectos que produce el ataque de Vampirovibrio sobre el alga son:

a) pérdida del contenido citoplasmático, presentando estructuras membranosas (restos de orgánulos) y grandes zonas vacuoladas.

b) destrucción celular, después de un lapso de 5-7 días de iniciarse la infección (tras incubación en la oscuridad a una temperatura entre 15°C y 37°C)

Vampirococcus

En el año 1982 se realizaron diferentes estudios en el lago Grande de Estanya con el fin de caracterizar los microorganismos existentes, y su relación con los parámetros físico-químicos del medio.

Las botellas planas que se utilizaron para trasladar las muestras procedentes de distintas profundidades, presentaron calvas de lisis en los sedimentos espontáneos formados por una bacteria, en aquel momento dominante, Chromatium sp.

En 1983 Esteve et al. descubrieron un nuevo caso de parasitismo bacteriano, al estudiar el material procedente de dichas calvas líticas. En un principio, el tiempo tardío de aparición de las calvas líticas, así como su crecimiento continuo, hicieron suponer que no se trataba de bacteriófagos. Posteriores estudios mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido, confirmaron la hipótesis al comprobarse que dichas calvas de lisis eran producidas por unas peque-

ñas bacterias con forma de coco de un tamaño de 0.6 μm de diámetro.

Los estudios microscópicos permitieron la observación de la estructura de su pared, típicamente Gram-negativas y envuelta en una densa cápsula.

Todavía en la actualidad es desconocido el método de aproximación de la célula epibionte a la bacteria hospedadora. El parásito se une a Chromatium minus por una estructura electrodensa. La infección puede ser múltiple en cuanto al número de células infectantes y producirse al mismo tiempo en distintos puntos de la pared celular.

En el hábitat natural la infección se produce en un mayor porcentaje en células que se encuentran en condiciones limitantes de luz, lo cual indujo la hipótesis del carácter oportunista de esta especie. Esta idea quedó reforzada con los resultados obtenidos de recuentos celulares que se hicieron de las poblaciones en el campo, y en los que pudo apreciarse un número mayor de células epibiónticas a partir de las muestras de agua obtenidas de las capas más profundas (laguna de Cisó y lago Grande de Estanya).

Vampirococcus nunca penetra en el interior de la célula infectada como hace Bdellovibrio. Una vez se ha producido la unión del parásito con la célula hospedadora, crece y se divide dando un máximo de filamentos de tres células.

En ningún caso se observan células del epibionte en división cuando éste no se encuentra unido a la bacteria hospedadora. La forma y tamaño celular varía durante la división, el parásito adopta una morfología de pequeño vibrio y un tamaño de 0.3 x 0.6 μm .

Posteriormente a la división, la célula ectoparásita se desprende de Chromatium minus, liberándose la descendencia que presenta una forma esférica u oval típica de las células libres.

Como resultado de la infección Vampirococcus-Chromatium pueden observarse variaciones ultraestructurales importantes en la célula hospedadora:

- a) degradación del aparato fotosintético.
- b) degradación de los glóbulos de azufre.
- c) aparición de zonas líticas en el citoplasma.

Una característica a resaltar es que dichas alteraciones no comportan nunca la lisis celular como es característico en los anteriores casos descritos.

Los ensayos efectuados con Vampirococcus y otras especies de microorganismos fototróficos (Thiocapsa roseopersicina, Rhodopseudomonas capsulata y Chlorobium vibrioforme) tanto de laboratorio como de campo demuestran que esta bacteria es incapaz de infectar o lisar los cultivos celulares de dichas bacterias fototróficas, observándose por tanto una cierta especificidad de infección.

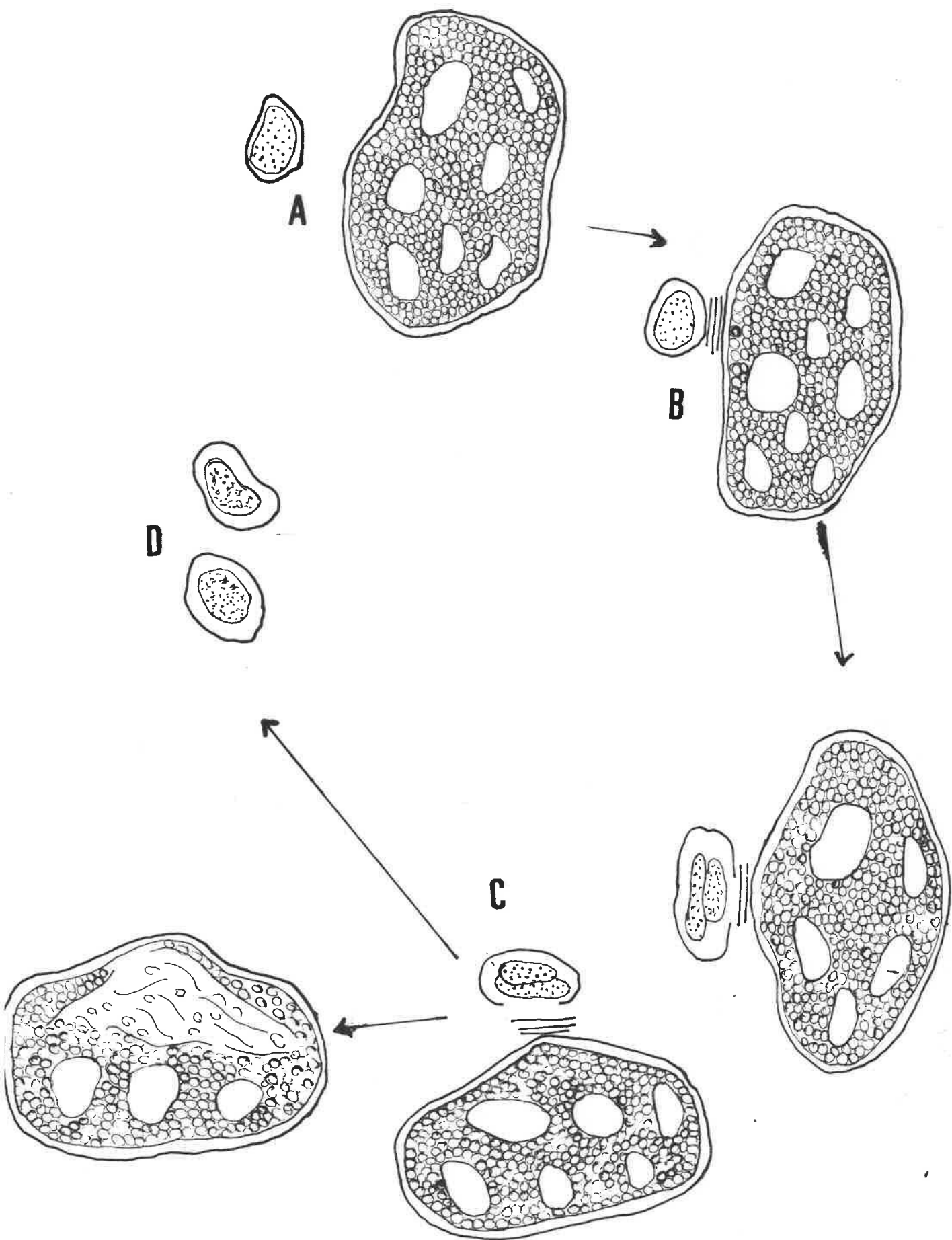
En la figura 1.2 se muestran diferentes estadios infectivos de Vampirococcus sobre Chromatium minus (Esteve, 1981).

Bacteriófagos

Aunque los bacteriófagos constituyen uno de los sistemas depredador-presa mejor estudiados, capaces de atacar a un gran número de microorganismos procariotas, los intentos de aislar algunas formas parásitas de microorganismos fototróficos han dado hasta la actualidad escasas satisfacciones

Fig. 1.2

Diferentes etapas del ciclo infectivo de Vampro-
coccus; A, células libres de Vampro-
coccus y Chro-
matium; B, adhesión de la bacteria depredadora a
la pared celular de la célula hospedadora; C, di-
visión de Vampro-
coccus y degradación parcial del
citoplasma de Chromatium; D, liberación de la des-
cendencia.



Unicamente hasta hoy en día ha sido posible aislar bacteriófagos de un grupo de bacterias fototróficas, las *Rhodospirilla* ceae (bacterias rojas no sulfurosas), y aún así fue necesario enriquecer en el laboratorio el título de dichos fagos para poder alcanzar niveles detectables.

El primer virus descrito de bacterias fototróficas fue el de *Rhodopseudomonas palustris* (Freund-Mölbart et al., 1968) (Bosecker et al., 1972) pero desafortunadamente esta cepa vírica se perdió.

El año 1974 supuso el descubrimiento del resto de bacteriófagos de microorganismos fototróficos conocidos hasta el presente, de los cuales el RS 1, el R Ø 1 y el R S 2 son específicos de *Rhodopseudomonas sphaeroides* y uno de ellos el RC 1 de *Rhodopseudomonas capsulata*.

Puesto que el objetivo de la presente revisión bibliográfica se centra básicamente en las bacterias depredadoras, no se hace especial referencia a los ciclos infectivos de dichos bacteriófagos, aunque sí se han recogido diferentes datos sobre su morfología, tipo de ácido nucleico y otras características que se reseñan en la tabla 1.2 .

Tabla 1.2 Características principales de los bacteriófagos de microorganismos fototróficos.

Características	RS1	RS2	RC1
Acido nucleico	ds-DNA	SD	ds-DNA
Bacteria hosp.	R*sphaeroides	R. sphaeroides	R. capsulata
Ciclo	lítico	lisogénico	lítico
Clasificación según Bradley	Grupo C	Grupo B	Grupo A
Contenido de G C	45%	SD	SD
Peso molecular	3-3.5x10 ⁷	SD	SD
Existencia de mutantes	No	Si	No
Referencia bibliográfica	Abeliovich et al. (1974)	Mural et al. (1974)	Abeliovich et Schmidt et al. (1974)

Símbolos * Rhodobacter
SD, sin datos

2.- MATERIAL Y METODOS

2.1.-Cepas bacterianas utilizadas

Para la realización del presente trabajo se utilizaron diferentes microorganismos autotróficos y heterotróficos, cuyas características tanto de procedencia como de referencia bibliográfica se señalan en la tabla 2.1

2.2.-Descripción del hábitat

Laguna de Cisó

Pequeña masa de agua anaerobia sulfurosa, que se encuentra situada al oeste del lago de Bañolas (Gerona). Sus coordenadas son $42^{\circ} 08' N$ $2^{\circ} 45' E$. La laguna tiene un área de $400 m^2$, con un volumen de 2.234 metros cúbicos y su máxima profundidad es de 7 m.

La entrada de agua se da por el fondo de la laguna, produciéndose el drenaje por un pequeño canal o acequia artificial que corre paralela a la "Ribera Castellana".

La laguna de Cisó es holomíctica y se encuentra situada sobre yacimientos oceánicos ricos en sulfato cálcico, que al ser disueltos por las aguas freáticas hace que el agua sea altamente sulfatada (Guerrero et al., 1978) (Guerrero et al., 1980)

Lago Grande de Estanya

El lago Grande de Estanya está situado a unos 13 Km. de Benarre (Huesca), y a una altura de 670 m sobre el nivel del mar. Sus coordenadas geográficas son $42^{\circ} 02' N$ $0^{\circ} 32' E$.

El lago tiene forma de ocho con dos cubetas de 12 y 20 m de profundidad máxima separadas por una franja en la que la profundidad es normalmente de 2 ó 3 m.

Dicho lago no recibe ningún afluente por la superficie a excepción de una conexión con un lago pequeño adyacente, por lo

Tabla 2.1 Cepas utilizadas en el presente trabajo

Microorganismos	Cepa	Procedencia
<u>Rhodopseudomonas palustris</u>	Laguna de Cisó	J. Turet
<u>Rhodobacter capsulatus</u>	SB-1003	B. Marrs
<u>Rhodobacter sphaeroides</u>	Laguna de Cisó	J. Turet
<u>Chromatium minus</u>	Laguna de Cisó	E. Montesinos
<u>Chromatium vinosum</u>	UA-6002	H. Van Gemerden
<u>Chromatium minutissimum</u>	DSM-6003	H. G. Trüper
<u>Thiocapsa roseopersicina</u>	UA-6003	J. Turet
<u>Thiocystis gelatinosa</u>	DSM-200	N. Pfennig
<u>Chlorobium phaeobacteroides</u>	Laguna de Cisó	E. Montesinos
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	ATCC-15442	
<u>Escherichia coli</u>	AB-1157	M. Blanco
<u>Salmonella typhimurium</u>	LT2	J.L. Ingraham
<u>Bacillus subtilis</u>	ATCC-6633	
<u>Staphylococcus aureus</u>	ATCC-2593	

que se deduce que tiene que haber entradas por el fondo que compensen las pérdidas sufridas por la evaporación (Avila et al., 1984).

2.3.- Medios de cultivo y disoluciones tampón

Los medios de cultivo que a continuación se exponen fueron utilizados para el crecimiento de los microorganismos fototróficos y para el enriquecimiento y aislamiento de Daptobacter.

Las disoluciones tampón se emplearon básicamente en la preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión y de barrido.

Medio NB

Medio líquido rico utilizado para el crecimiento del endoparásito en forma libre (Stolp et al., 1963). Es el medio base del NB-10.

- Difco nutrient broth	8g
- Difco casaminoacids	5g
- Difco yeast extract	1g
- Agua destilada	1l

El pH se ajusta a 7.2 con Na OH.

Medio NBA (NB agar)

Se preparó con medio líquido NB al que se añadió agar a una concentración final de 1.5%. Utilizado en la preparación de placas para la obtención de colonias de Daptobacter.

Medio NB-10

Se empleó para el crecimiento axénico del endoparásito,

Como medio de enriquecimiento (Seidler et al., 1969 a). Se preparó diluyendo NB diez veces en agua destilada. El pH se ajustó al valor de 7.3 - 0.1 con Na OH 1 N. El medio, una vez preparado, se esterilizó en la autoclave y posteriormente se le adicionó una disolución de Ca^{2+} (29.39 g/l) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y otra de Mg^{2+} (60.96 g/l) $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ esterilizadas previamente por filtración y con una concentración final de 0.002 M de ion Ca^{2+} y 0.003 M de Mg^{2+} .

Medio PYE

Utilizado para el crecimiento independiente de Daptobacter (Seidler et al., 1969 b).

Este medio es una modificación del medio HP de Stolp y Petzold (1962).

- Bacto peptona	10g
- Difco yeast extract	3g
- Tris-ClH 1M (pH 7.5)	10ml
- Agua destilada	1.000ml

El pH final se ajustó al valor de 7.5-0.2 con Na OH.

Medio PYE-agar

Utilizado para la determinación de la morfología colonial de Daptobacter. Se prepara con 1.5% de agar.

Medio para microorganismos fototróficos

Este medio ha sido utilizado para el crecimiento de los microorganismos fototróficos susceptibles de infección por Daptobacter, con el fin de determinar el margen de hospedador (Van Gernerden et al., 1982). Se prepara mezclando varias disoluciones.

Un volúmen de 1.000 ml de agua destilada contiene :

NH ₄ Cl	300mg	
K ₂ HPO ₄	300mg	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	200mg	
MgCl ₂ ·6H ₂ O	200mg	
ó		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250mg	
KCl	200mg	
Disolución de oligoelementos	10ml	
Na ₂ CO ₃	2.100mg	20mM
ó		
NaHCO ₃	1.700mg	20mM
Na ₂ S ₉ H ₂ O	100-700mg	0.4-3mM
Na ₂ S ₂ O ₃	0-500mg	0.3mM
Acetato sódico	0-250mg	0.3mM
Vitamina B ₁₂	20ug	
pH	6.8-7.5	

Disolución de oligoelementos de Pfennig y Lippert (1966)

Disoluciones tampón

Tampón de cacodilato

Utilizado en el lavado de las muestras preparadas para la obtención de cortes ultrafinos y en la preparación de las mismas para el microscopio electrónico de barrido (Sabatini et al., 1962).

Cacodilato sódico 0.1M	2.14g/100 ml de H ₂ O
Acido clorhídrico 0.1N	4-8.5ml/100 ml de H ₂ O

Estos lavados se realizan para eliminar los posibles restos de

solución fijadora en la que se sumergen las muestras en ambos procesos.

2.4 .- REACTIVOS Y APARATOS

1.-Reactivos

Los productos químicos utilizados para el tratamiento de las muestras por microscopía electrónica procedían de las siguientes casas comerciales:

a) Glutaraldehído: (laboratorios TAAB)

glutaraldehído(25% solución acuosa)	1 ml
tampón cacodilato	15 ml
agua destilada	20 ml

fijación al 1% durante el período de 1 a 2 horas.

b) Tetraóxido de Osmio (OsO₄): (Laboratorios Sigma)

Tetraóxido de Osmio	1g
disolución tampón	40 ml
agua destilada	60 ml

c) Acido fosfotúngstico (PTA): (Laboratorios Merck)

Es soluble en todos los agentes deshidratantes. Se prepara en solución al 1% en alcohol al 70%. Utilizado en la tinción de flagelos y en la caracterización de Daptobacter por microscopía electrónica de transmisión.

d) Acetato de Uranilo (AU): (Laboratorios Merck)

Utilizado para la tinción de cortes ultrafinos y en la caracterización de Daptobacter por microscopía electrónica de transmisión. Se prepara en solución al 1% en alcohol al 70%. Es estable.

e) Citrato de plomo:

Se utilizó para la tinción de cortes ultrafinos con la finalidad de contrastar paredes y membranas. Se preparó disolviendo en 30g de agua 1.33g de nitrato de plomo $Pb(NO_3)_2$, y 1.76g de citrato sódico $Na_3(C_6H_5O_7)_2 \cdot H_2O$. Después de 30 min de agitación constante se añadió 8ml de NaOH 1N y se enrasó hasta 50ml con agua.

f) Aralditas: (Laboratorios Fluka)

Se utilizan en la inclusión de las muestras, para la obtención de cortes ultrafinos. Se preparan mezclando cuatro componentes (Glauert & Glauert, 1958):

Araldita C ₄ 212	10ml
H ₄ 964 (DDSA)(endurecedor)	10ml
DY 064 (DMP 30)(acelerador)	0.3ml
Dibertil ftalato(plastificador)	1ml

Polimeriza en 48 h si se mantiene la temperatura a 80° C.

2.- Aparatos

Se utilizaron los siguientes aparatos:

Piramidotomo C.Reichter TM 60

Knife maker LKB type 7801 B

Ultramicrotomo LKB ultratome III type 8802 A

Microscopio electrónico de transmisión Hitachi HU-12A

Microscopio electrónico de barrido ISI Super III-A

Metalizador Polaron E.2 SEM coating unit E-5000

Preparador de punto crítico Polaron E-3000

Evaporador Hitachi HUS-4

Centrifugadora Sorvall RC2-B

Espectrofotómetro PYE Unicam SP 1803

Ampliadora (35 mm) Kaiser VP 6000

Ampliadora (9 x 12) Dust Laborator 1200

Microscopio de contraste de fases Olympus BHB

2.5 .- Métodos de aislamiento y recuentos

La técnica utilizada tanto para enriquecimiento de Daptobacter, como para su crecimiento independiente y posterior readaptación al parasitismo se muestran en la figura 2.1

2.5.1 Técnicas de enriquecimiento

Muestras del lago Grande de Estanya fueron filtradas a través de un filtro Nuclepore de 0.2 μm de diámetro de poro (según la técnica descrita en el apartado 2.5.4) con el fin de detectar calvas de lisis que demostraran la presencia de Dap-
tobacter.

Para incrementar el título del microorganismo endoparásito se resuspendía el material procedente de los filtros, en cultivos puros de Chromatium minus repetidas veces. En cada uno de los pases se preparaban nuevos filtros para el recuento de viables y un filtro control de la célula hospedadora.

2.5.2 Detección de Daptobacter sobre filtros

Cultivos puros de la célula hospedadora fueron filtrados (esterilmente) sobre filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/F) para formar una capa homogénea de bacterias. Seguidamente se filtraba a su vez un volumen conocido de muestras perteneciente a viales que contenían el microorganismo endoparásito enriquecido. Sobre el sedimento celular previamente obtenido se favorecía la detección de nuevas calvas de lisis.

Fig 2.1

I. Métodos de enriquecimiento y de crecimiento independiente de Daptobacter.

1. Recolección de muestras del habitat natural
 2. Dejar sedimentar las muestras en botellas planas, en anaerobiosis y privadas de la luz
 3. Detección de calvas de lisis sobre los sedimentos (tiempo de aparición de 15 días aun mes).
 4. Resuspender el sedimento, centrifugar y decantar el sobrenadante
 5. Resuspender el "pellet" en cultivo axénico de Chromatium
 6. Filtrar diferentes volúmenes del cultivo mixto sobre sedimentos celulares de Chromatium minus, mediante la técnica de la doble capa de agar.
 7. Detección de calvas de lisis sobre filtros (tiempo de aparición 10 días aproximadamente).
-

Fig 2.1

II. Métodos de enriquecimiento y de crecimiento independiente de Daptobacter.

Enriquecimiento

1. Resuspender el filtro (obtenido en el punto 7) en cultivo axénico de Chromatium
2. Repetir el proceso varias veces (aproximadamente cada tres días la lectura es positiva)
3. Hacer recuentos, y controles de Chromatium en cada pase

Crecimiento independiente

1. Resuspender el filtro (obtenido en el punto 7) en medio NB
2. Analizar las distintas colonias obtenidas
3. Ensayar cada colonia en cultivo puro
4. Filtrar diferentes volúmenes del cultivo puro sobre sedimentos de Chromatium
5. Seleccionar el cultivo procedente de la colonia que dió resultado positivo

Readaptación al crecimiento dependiente

6. Reinocular el cultivo axénico (obtenido en el punto 5) en cultivo axénico de Chromatium
 7. Centrifugar y resuspender varias veces en cultivos de Chromatium, haciendo controles cada vez.
 8. Tiempo aproximado de readaptación, 2 meses.
-

2.5.3. Recuentos

Con el fin de cuantificar la incidencia del microorganismo endoparásito en hábitats naturales se realizaron recuentos de dos tipos:

a) Recuento de viables

Muestras de diferentes profundidades pertenecientes a la laguna de Cisó se filtraron sobre filtros de 0.22 μm de diámetro de poro aplicándoseles la técnica de la doble capa de agar (ver apartado 2.5.4) e incubándose a continuación a 25°C y tiempos variables dependiendo de la cepa indicadora utilizada.

Se calculó el número de microorganismos por mililitro mediante la siguiente ecuación :

$$\frac{\text{n}^{\circ}\text{de placas de lisis}}{\text{volumen filtrado}} = X \text{ microorganismos/ml}$$

en la cual se tenía en cuenta el número de calvas de lisis aparecidas, la dilución efectuada, y el volumen de líquido filtrado.

Esta técnica fue utilizada para determinar el incremento en el título del microorganismo endoparásito en los experimentos de enriquecimiento.

b) Recuentos totales

Puesto que la técnica anteriormente descrita permitió tan solo el cálculo de microorganismos viables, se efectuaron recuentos paralelos para la determinación de números totales.

Para la realización de este recuento se utilizó el anaranjado de acridina, colorante fluorescente que tiene como propie

dad característica la de su fácil combinación con los ácidos nucleicos. De esta forma, las células que han incorporado el colorante, al ser iluminadas con luz ultravioleta, presentan fluorescencia, por lo que es fácil distinguirlas de las partículas de detritus. La técnica utilizada ha sido una variante de la de Zimmermann & Meyer-Reil (1974).

2.5.4. Observación de las calvas de lisis mediante la técnica de la doble capa de agar

La preparación de los filtros se hizo de igual forma que la descrita en el apartado 2.5.2. Los filtros se colocaron posteriormente en una placa de Petri que contenía una capa base de agar (15g/l) y se recubrieron con otra capa de agar (15g/l) con el fin de obtener bajas concentraciones de oxígeno necesario para la supervivencia de la célula hospedadora; de esta forma se evitó también el desarrollo de microorganismos aeróbicos. Se incubaron los filtros a 25°C, dependiendo del tipo de célula hospedadora. Los tiempos fueron variables, 3 días para los microorganismos fototróficos no formadores de cápsulas, y tiempos superiores (hasta 10 días) para los microorganismos capsulados.

El crecimiento de las calvas de lisis se siguió de forma periódica para poder determinar su tamaño máximo.

Los filtros fueron utilizados para el enriquecimiento de Daptobacter y en los trabajos de microscopía electrónica de transmisión y de barrido (ciclos infectivos).

2.5.5. Filtros de barrera

Esta técnica fue escogida para el aislamiento y purificación de Daptobacter. Dado que éste se presenta asociado a la célula hospedadora y en forma libre, y que en este úl

timo caso sus características morfológicas, de pequeños bacilos de $0.4 \times 1.5 \mu\text{m}$, no es diferenciable de otros microorganismos contaminantes, se utilizaron series de filtraciones a través de filtros de diámetro de poro distintos. Filtros de 3μ de diámetro retuvieron en primer lugar las células de Chromatium minus (de un tamaño de $2.5-3 \mu\text{m}$) que pudieran presentar células parásitas adheridas a su pared celular. Estos filtros se utilizaron con doble finalidad :

a) el examen de las células mediante microscopía electrónica de barrido.

b) para la infección posterior de cultivos puros de cepa hospedadora.

Posteriormente, los cultivos infectados se filtraron nuevamente sobre filtros de $3 \mu\text{m}$ de diámetro de poro con el fin de retener las células de Chromatium minus. El líquido filtrado se pasó a su vez sobre filtros de $0.22 \mu\text{m}$ de diámetro, para obtener exclusivamente las células endoparásitas en su estado libre. Este proceso fue repetido varias veces para alcanzar un título elevado.

Procedimiento :

a.-Filtración de 20 ml de la muestra a través de un filtro de membrana de $3 \mu\text{m}$ de diámetro de poro.

b.-Infección de un cultivo puro de Chromatium minus con los microorganismos retenidos.

c.-Nueva filtración a través de un filtro de $3 \mu\text{m}$ para retener las células de Chromatium minus.

d.-Paso del filtrado anterior a través de un filtro de $0.22 \mu\text{m}$.

Finalmente, se preparó una muestra para el microscopio elec

trónico de barrido para comprobar el resultado del método.

2.6 Microcultivos

2.6.1. Desarrollo y preparación de un microcultivo

Con el fin de observar el proceso infectivo de diferentes células hospedadoras por Daptobacter, se preparó un microcultivo según la técnica desarrollada por y posteriormente modificada según el modelo expuesto en la figura 2.2 y que reuniera las condiciones ideales que a continuación se exponen :

- 1º permitiera la movilidad de los microorganismos.
- 2º mantuviese bajas concentraciones de oxígeno.
- 3º su manejo fuese sencillo.

En primer lugar se utilizó el modelo representado en la figura 2.2 (a), preparado de la siguiente forma : un porta cubierto por una fina capa de agar duro en el cual se hizo un pocillo con el sacabocados, se llenó en su totalidad con una muestra (igual volumen) de célula hospedadora y de Daptobacter. Para evitar que hubiese oxígeno en la cámara, se selló el pocillo con un cubre y parafina.

La utilización de este sistema no resultó satisfactorio por las siguientes razones :

- a) la parafina derretía el agar
- b) se ensuciaba con facilidad de polvo
- c) el agar se reseca al no estar protegido
- d) fragilidad.

Acto seguido se utilizó el modelo de la figura 2.2 (b). En placas de Petri con una gruesa capa de agar duro (aprox. 30g/l), se practicaron nuevamente pocillos, colocándose las

Figura 2.2 Diferentes modelos diseñados para el
desarrollo y preparación de un micro-
cultivo.

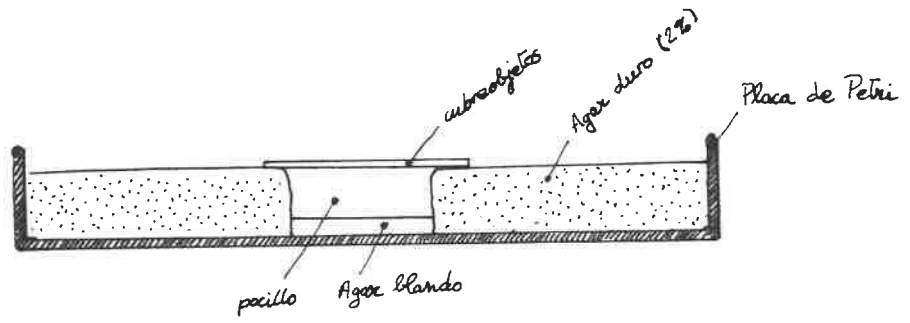


Fig b

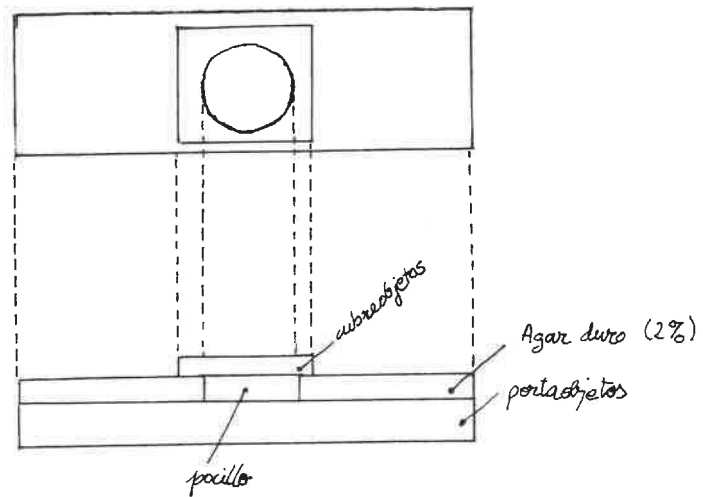


Fig a

muestras de igual forma que en la técnica anteriormente descrita, se cubrió el pozo con un cubre evitando, siempre que fuese posible, la formación de burbujas de oxígeno. Para impedir que los microorganismos se adheriesen al fondo del pozo (plástico de la placa de Petri) se cubrió este con una base de agar blando.

Una vez preparado el microcultivo, se pasó a la observación periódica de intervalos de 30 min mediante la utilización del microscopio de contraste de fases.

2.6.2 Seguimiento fotográfico

Se realizaron series fotográficas de las diferentes fases del ciclo infectivo de Daptobacter mediante una cámara marca Olympus acoplada al microscopio de contraste de fases utilizándose tiempos de exposición variables.

Las fotografías obtenidas fueron ampliadas, seleccionándose las células de Chromatium que presentaban infección simple, múltiple o efectos degradativos, de acuerdo con los dibujos efectuados previamente en cada observación.

2.7 Métodos para la utilización del microscopio electrónico

Los métodos que a continuación se señalan comprenden diferentes técnicas para la preparación de muestras tanto para microscopía electrónica de transmisión como de barrido.

Los primeros apartados hacen referencia a la obtención negativa de imágenes y a la preparación de muestras para la ultramicrotomía, mientras que los últimos instruyen sobre la preparación de las muestras para microscopía electrónica de barrido. Finalmente, se señalan algunas técnicas fotográficas seguidas en ambos procesos.

2.7.1 Tinción negativa

Esta técnica ha sido utilizada para la caracterización morfológica de Daptobacter y para el análisis de los flagelos (modificado Dawes, 1971).

Sobre una rejilla de cobre de 400 mesh cubierta con película de formvar se depositó una gota del material biológico (células suspendidas en medio líquido NB) dejándose sedimentar. Transcurridos 15-30 min se retiró el exceso de líquido y se tñieron las células con acetato de uranilo o ácido fosfotúngstico al 0.5 y 1% respectivamente durante 20 minutos.

Tanto para el proceso de sedimentación como el de tinción, se ensayaron diferentes tiempos. Para el análisis de los flagelos se tuvo especial precaución en la preparación de las muestras ya que cualquier proceso de agitación comporta la rotura de estos.

2.7.2 Sombreado de platino

Utilizado para el estudio de estructuras bacterianas y en especial en la caracterización de los flagelos.

Para ello la muestra se deposita en una rejilla cubierta por una película soporte y se coloca en condiciones de vacío (10^{-5} - 10^{-6} torr) aplicándosele un metal pesado por evaporación. Para dar uniformidad al sombreado, el material es inclinado en varios ángulos y se somete a una rotación de aproximadamente 100 rpm durante la evaporación.

El material no conductible eléctricamente es sombreado con una fina capa conductible, previo al examen al microscopio electrónico, lo cual previene el daño por exceso térmico y cualquier variación de la estructura eléctrica del material.

El grosor de la capa conductora es importante, siendo direc

tamente proporcional a la cantidad de metal colocada en el filamento, e inversamente proporcional al cuadrado de la distancia del filamento a la muestra.

Para calcular la cantidad de metal necesario para obtener un grosor definido, Pfefferkorn (1972) dió la siguiente fórmula:

$$m = 4/3 \frac{TR^2 P^4 \pi 10^4}{\text{Cos } \theta}$$

T = grosor de la capa de sombreado en μm

m = masa de material en mg de densidad (P) en $\text{g} \times \text{cm}^{-3}$

R = distancia de la fuente de emisión a la muestra en cm

θ = ángulo entre la normal y la situación del material

2.7.3 Secciones ultrafinas

Protocolo utilizado en la caracterización estructural de los diferentes microorganismos fototróficos ensayados, y de Daptobacter, así como en el proceso de la dinámica de infección.

Para la obtención de las secciones ultrafinas un paso previo fue el tratamiento de las muestras según su procedencia.

a) muestras de campo

Muestras procedentes del lago Grande de Estanya (véase apartado 2.2) a diferentes profundidades fueron fijadas con glutaraldehído a una concentración final del 1%, conservadas en nevera y privadas de la luz, para su posterior análisis en el laboratorio.

b) cultivos puros

Muestras de los diferentes microorganismos fototróficos

obtenidos a partir de un crecimiento exponencial en medio Van Gernerden a 25° C y recibiendo una iluminación de 60 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fueron fijadas con glutaraldehído al 1%.

En ambos procesos se siguió el siguiente tratamiento de la muestra :

1º) centrifugación de la muestra a 8.000 rpm durante 10 min e inclusión del sedimento obtenido en agar al 2% a 45° C para la obtención de pequeños cubos de 1 mm³ manejables durante el resto del proceso.

2º) Lavados. Con el fin de retirar los restos de fijador, se sumergieron los cubos de agar en tampón cacodilato sódico 0.2 M por un período de 15 min. Fue muy práctica la utilización de tubos de centrifuga ependorff que por su pequeño tamaño evitan el gasto excesivo de solución, así como por su bajo coste que permite que, tras su uso, puedan ser desechados.

3º) Postfijación con tetróxido de osmio. Después del lavado se realizó una segunda fijación con OsO₄ en tampón cacodilato durante 24 horas a 4° C.

4º) Lavado. Nuevamente se lavaron los bloques en tampón cacodilato para eliminar por completo el fijador.

5º) Deshidrataciones y tinción con acetato de uranilo. Para eliminar el agua retenida en la muestra, se introdujo ésta en gradientes de etanol o acetona a las concentraciones de 30%, 50%, 70% durante 15 min en cada paso; en este punto se paró la deshidratación. La muestra fue teñida con acetato de uranilo en disolución alcohólica al 70%, el tiempo de tinción fue de 24 horas a 4° C.

Una vez teñida la muestra, se continuó el proceso de deshidratación sumergiendo el material biológico en alcohol o ace

tona al 100% (15 min) y posteriormente en óxido de propileno al 100% (30 min). El óxido de propileno fue utilizado como disolvente intermedio entre el alcohol y la resina epoxi (Luft, 1.961).

6º) Inclusión en aralditas. Diferentes proporciones de óxido de propileno y aralditas fueron utilizadas como paso previo a la inclusión:

2/3	óxido de propileno	1/3	araldita (I)
1/2	" " "	1/2	"
1/3	" " "	2/3	"

Cada fase tuvo un tiempo de duración de 30 min.

A continuación se sumergieron los bloques en araldita I (24 h en una estufa a 50° C). Es más satisfactorio hacer varios cambios en araldita I para eliminar totalmente el óxido de propileno.

La etapa final del proceso es la inclusión de la muestra en araldita II, dejándola por espacio de 30 min en la estufa de 50° C y 48 h a 80° C para su correcta polimerización.

7º) Piramidado de los bloques. Una vez polimerizadas las muestras, éstas eran pulidas por medio del piramidotomo (véase aparatos) como paso previo a la obtención de secciones ultrafinas.

8º) Elaboración de cuchillas. Mediante el aparato corta-cuchillas, anteriormente citado, se prepararon éstas y utilizando cinta scotch y cera se elaboraron las balsas de agua.

9º) Ultramicrotomía. Finalmente, los bloques piramidados fueron cortados en secciones ultrafinas y depositados en rejilla

llas de 400 mesh.

10º) Tinción con citrato de plomo. Para obtener un mejor contraste de las paredes celulares, las rejillas fueron teñidas con una solución de citrato de plomo y lavadas repetidamente con agua destilada para su total eliminación.

2.7.4 Preparación de muestras para el microscopio electrónico de barrido

Utilizado para el estudio morfológico de los microorganismos fototróficos ensayados y en la caracterización de Daptobacter(Hayat,1975).

Las muestras, primeramente, fueron fijadas con glutaraldehído en la proporción del 1% durante un período de 2 horas a 4° C. Seguidamente se hizo pasar un volumen de muestra a través de un filtro Nuclepore de 0.2 µm de diámetro de poro, (que permitió la retención de microorganismos de muy pequeño tamaño), evitando el completo secado de este en el proceso de filtración. A continuación, las muestras se lavaron en tampón cacodilato con el fin de retirar todo resto de fijador.

Para poder manejar cómodamente los filtros a lo largo del proceso, se utilizaron pequeñas bolsas de papel de aluminio en cuyo interior se depositaron estos, mecanismo que favoreció el contacto de las muestras con las soluciones utilizadas.

Posteriormente las deshidrataciones se efectuaron por flotación de las bolsas en una serie de alcoholes (etanol) de grado creciente, 30%, 50%, 70%,100% durante 15 min.

Finalmente se sustituyó el etanol por acetato de isoamilo

de forma creciente y según las siguientes proporciones:

1/3 acetato de isoamilo	2/3 etanol
1/2 " " "	1/2 "
2/3 " " "	1/3 "
Acetato de isoamilo	

Cada fase de la sustitución tuvo una duración de 15 min. Una vez sometidas las muestras al proceso de punto crítico (técnica explicada detalladamente en el siguiente apartado), los filtros fueron directamente sombreados con oro.

2.7.6 Punto crítico

Fue introducido por Anderson (1951) para evitar los efectos de la tensión superficial y preservar las estructuras impidiendo la reducción de volumen de las células individuales.

El método está basado en la propiedad de que cuando un líquido dado, en equilibrio con su vapor es calentado en un espacio confinado, la temperatura alcanza un valor sobre el cual es imposible licuar el vapor a menos que se aplique presión. Esta temperatura es la "temperatura crítica". Como la presión se incrementa durante el calentamiento, la densidad de vapor incrementa hasta la "presión crítica" en la que la presión de las fases líquido/vapor son iguales.

La conjunción de presión y temperatura crítica, "punto crítico", da como resultado que la tensión de superficie sea igual a cero. El gas puede entonces ser sustituido, es decir, el dióxido

do de carbono líquido se transforma en gas sin pasar por una fase límite. La condensación del gas no ocurre durante la liberación del mismo mientras que la temperatura sea mantenida sobre la temperatura crítica que es de 35°C.

El dióxido de carbono no se mezcla directamente con el agua y por tanto es necesario hacer sustituciones sucesivas con alcohol y acetato de isoamilo.

2.7.7 Técnicas fotográficas

Generalmente se utilizó papel Agfa profesional número 3 speed, para la mayoría de las fotografías realizadas. Para los negativos fuertemente contrastados se reveló con papel Negra suave que evita los contrastes y da uniformidad a la fotografía. Al contrario, para negativos poco definidos se utilizó papel Agfa profesional nº 4 speed (papel duro) que hace resaltar las zonas claras del negativo de las más oscuras.

El tiempo de revelado de los papeles Agfa (speed) es de 1 min y 15 sg y el del papel Negra varía según la intensidad de tono deseado para la fotografía.

Se realizaron fotografías de las secciones ultrafinas correspondientes a los microorganismos empleados en este trabajo así como de sus ciclos infectivos (MET y microscopio de contraste de fases).

3. RESULTADOS

3.1. Observaciones efectuadas mediante microscopía óptica

Las primeras observaciones sobre Daptobacter, se efectuaron mediante la técnica de microscopía óptica, esencialmente de contraste de fases y posteriormente de epifluorescencia.

La microscopía de contraste de fases permitió inicialmente una primera caracterización morfológica y se utilizó también para la reconstrucción mediante secuencias fotográficas del ciclo infectivo del parásito.

La microscopía de epifluorescencia resultó especialmente útil en el examen de muestras directas del campo, por ser una técnica que permite separar las células vivas del resto de contaminantes orgánicos.

Ambos tipos de microscopía tienen la ventaja de permitir el análisis inmediato de las muestras tanto de enriquecimiento como de cultivos axénicos, siendo además sencilla su preparación.

El principal inconveniente de su utilización radica en su inferior poder resolutivo con respecto al microscopio electrónico, lo que comporta una menor información

3.1.1. Morfología y tinción de Daptobacter

El examen directo de las calvas de lisis aparecidas sobre sedimentos celulares de la célula hospedadora mediante microscopía óptica de contraste de fases, reveló la presencia de células de tamaño grande (2,5x3µm) de Chromatium muy móviles y que presentaban glóbulos de azufre refringentes en su citoplasma, y de células de morfología de pequeño bacilo, también móviles en algunos casos en estado libre y en otro con apariencia de estar infectando las células de Chromatium produciéndose dicha infección en número variable.

La preparación de frotis de alicutas de dichas muestras sobre portaobjetos, y posterior tinción de Gram, dió una clara tinción rojiza para ambos tipos de células, por lo que los pequeños bacilos fueron determinados como microorganismos Gram-negativos (Véase fig. 3.1)

3.1.2. Análisis de las muestras mediante microscopía de epifluorescencia

Muestras procedentes del lago Grande de Estanya, se prepararon para una tinción de epifluorescencia. Mediante esta técnica los microorganismos presentes en la muestra quedan retenidos con una coloración anaranjada fluorescente sobre un fondo oscuro que permite una clara identificación.

La técnica fue utilizada para los recuentos celulares así como para determinar la incidencia del microorganismo parásito sobre células de Chromatium. Se dió como resultado positivo de infección, todos aquellos casos en que la célula hospedadora se encontraban microorganismos adheridos, pero el método propuesto fue insuficiente para determinar si la infección era producida por Vamprococcus (una bacteria depredadora ectoparásita) o por Daptobacter. Aunque la morfología de la primera es esférica y la de la segunda bacilar no es posible descartar mediante esta técnica la posibilidad de un estado intermedio de infección de Daptobacter, es decir de parcial penetración (observación terminal de la forma bacilar, que podría dar apariencia de coco).

Al igual que en la utilización de microscopía electrónica de barrido, puede darse la posibilidad de precipitación de unas células sobre otras por el mismo hecho de la filtración, paso indispensable en la preparación de las muestras.

En la figura 3.2, se presenta el aspecto de una muestra del lago Grande de Estanya obtenido por este procedimiento,

mientras que los recuentos efectuados de las distintas capas de agua para conocer la incidencia del parásito, se cita en el apartado 3.7.2.

3.1.3. Aplicación de la microscopía de contraste de fases al seguimiento de un microcultivo

Inóculos procedentes de un cultivo de enriquecimiento de Daptobacter y de Chromatium minus (cultivo axénico) se emplearon para la realización de microcultivos (Ver material y métodos 2,6) con el fin de conseguir series fotográficas que correspondieran a los diferentes estadios del ciclo infectivo de Daptobacter sobre Chromatium minus. La figura 3.3 corresponde a un cultivo infectado de cero horas.

Las células de Chromatium minus presentan un aspecto morfológico normal, y se mantienen todavía móviles. Alternando con las células hospedadoras, se observan bacilos rectos de Daptobacter muy móviles. Pocas células de Chromatium presentan síntomas de infección por el microorganismo parásito.

La figura 3.4 muestra el mismo microcultivo a las veinte horas de infección; en ella se muestran células de Chromatium minus con pequeños bacilos adheridos a su pared celular. Esta fase corresponde con el segundo estadio de contacto primario, el cual pudo ser mucho mejor observado mediante la utilización de secciones ultrafinas por microscopía electrónica de transmisión.

Es importante resaltar en esta fase, el constante movimiento rotatorio que presentan las células de Daptobacter (mientras se encuentran adheridas a la pared celular de Chromatium minus) y que recuerda enormemente al que presenta Bdellovibrio en esta misma fase de infección.

Finalmente la figura 3.5 corresponde a una fase tardía de infección (cien horas); la mayoría de las células de Daptobacter se encuentran libres y el aspecto de Chromatium se encuentra muy alterado. Es frecuente ver células deformes

con zonas líticas totalmente desprovistas de movimiento. El porcentaje de células infectadas en esta fase es bajo.

3.2. Actividad bacteriolítica de Daptobacter

Muestras del lago Grande de Estanya, que se habían dejado sedimentar en botellas planas y en las cuales aparecieron las primeras calvas de lisis, se resuspendieron en cultivos puros de Chromatium minus. Posteriormente este proceso se efectuó repetidas veces con el fin de incrementar el título de Daptobacter (Ver figura 2.1 de Material y Método), y conseguir cultivos enriquecidos con los que ensayar la actividad bacteriolítica de Daptobacter sobre diferentes cultivos axénicos.

3.2.1. Detección sobre filtros de membrana (del microorganismo endoparásito)

Primeramente se ensayaron diferentes clases de filtros para comprobar cual de ellos formaba un sedimento celular más homogéneo, y que no presentara discontinuidades que pudieran ser causa de confusión al interpretarse como calvas líticas. Los filtros ensayados fueron Nuclepore, Sartorius y Whatman, siendo este último el que dió resultado más satisfactorio por lo que fue el utilizado en todos los experimentos de este trabajo.

La detección de Daptobacter, se realizó según la técnica descrita en el apartado de Material y Métodos (2.5.2), por filtración directa de éste sobre Chromatium minus, observándose la aparición de calvas líticas a los tres días de incubación a 25°C (en la oscuridad).

Las calvas de lisis sobre sedimentos celulares aparecieron primero esféricas de bordes regulares y puntiformes (0.15 cm) pero incrementaron en los días sucesivos su tamaño, llegando a alcanzar un diámetro máximo de 0.5 cm a los cinco días de su aparición.

El aspecto de la calva lítica era claro y se contrastaba fuertemente con el sedimento de la bacteria hospedadora, que en el caso de Chromatium minus era de un intenso color rojo.

El tiempo transcurrido hasta la aparición de las calvas de lisis varió atendiendo a si las muestras filtradas procedían de cultivos de enriquecimiento (de tres a diez días), o si correspondían a muestras de campo (laguna de Cisó) de ocho a quince días. En la figura 3.6 se muestran las calvas de lisis antes mencionadas sobre un sedimento celular obtenido por filtración de una muestra de agua de la laguna de Cisó sobre filtro Whatman.

El objetivo siguiente fue el enriquecimiento del microorganismo parásito mediante pases sucesivos del material arrastrado directamente del filtro en cultivos axénicos de Chromatium minus. El resultado final fue la obtención de 10^6 células/ml de Daptobacter, número si no ideal, apropiado para el estudio morfológico ultraestructural.

3.2.2 Recuento de calvas mediante la técnica de la doble capa de agar

Paralelamente, y dado que la técnica anteriormente expuesta se mostró idónea en cuanto a la detección de calvas de lisis, pero ofrecía el inconveniente en cuanto al recuento de estas en un espacio limitado (área del filtro), se efectuaron diluciones sucesivas de los cultivos enriquecidos y se sembraron en placas de Petri utilizando cultivos de Chromatium minus como cepa indicadora mediante la técnica de la doble capa de agar.

Los resultados fueron favorables en lo que respecta a los recuentos, pero el sedimento de la célula hospedadora ofrecía un menor contraste que en el método de los filtros

por lo que se descartó la utilización de esta técnica al no poder emplearse el trifeniltetrazolio como colorante de contraste (sólo es posible su utilización en el caso de microorganismos con metabolismo respiratorio).

3.2.3. Margen de hospedador

Con el fin de comprobar la capacidad infectiva de Daptobacter sobre otros microorganismos, se inoculó un cultivo enriquecido con el microorganismo endoparásito sobre cultivos axénicos de diferentes microorganismos fototróficos y heterotróficos. Los primeros experimentos se realizaron con bacterias fototróficas de distintos géneros debido a que inicialmente Daptobacter había sido detectado sobre Chromatium minus.

De la familia Rhodospirillaceae se ensayaron las especies Rhodopseudomonas capsulata, Rhodopseudomonas palustris, y Rhodopseudomonas gelatinosa obteniéndose un resultado negativo en las tres especies.

Por el contrario las especies de la familia Chromatiaceae que se utilizaron (Chromatium minus, Chromatium vinosum, Thiocapsa roseopersicina, Chromatium minutissium y Thiocystis Sp.) como sedimentos celulares presentaron al infectarse con Daptobacter zonas líticas nítidas siendo su tiempo de aparición variable. Las tres últimas especies tardaron un periodo de tiempo superior a las tres primeras en presentar infección. Este hecho se interpretó como probablemente debido a la posesión de cápsulas o limos que dificultaron la acción del parásito.

Se ensayaron otros microorganismos no fototróficos (Bacillus subtilis, Escherichia coli, Salmonella typhimurium y Staphylococcus aureus) sin que se obtuviera ningún resultado positivo.

De estos resultados se deduce que no hay especificidad respecto a la célula hospedadora a nivel de género, aunque sí parece darse a nivel de familia, ya que todas las Rhodospirillaceas ensayadas dieron resultado negativo, y todas las Chromatiaceae positivo.

La tabla 3.1 registra todos los microorganismos usados y los tiempos de aparición de las calvas de lisis en cada uno de los cultivos infectados.

3.3 Aplicación del microscopio electrónico de barrido al análisis de muestras

La utilización del microscopio electrónico de barrido (SEM) permitió un estudio rápido de las muestras, centrado primordialmente en la morfología celular y en la observación de las interacciones entre la bacteria hospedadora y el parásito.

Debido al bajo poder de resolución de este microscopio con respecto al de transmisión, las fotografías obtenidas de esta interacción nunca presentaron una nitidez completa. Otro inconveniente radicó en la imposibilidad de diferenciar entre si la degradación celular de la bacteria hospedadora era debida a la infección del parásito (Daptobacter), o a posibles interacciones motivadas por la técnica de deshidratación empleada durante la preparación de la muestra, por lo cual estas se procesaron también en cada caso por microscopía electrónica de transmisión.

3.3.1. Observación de muestras de campo

Muestras pertenecientes al lago Grande de Estanya de distintas profundidades se prepararon (Ver Material y Métodos 2.7.5) convenientemente para su observación al SEM. El estudio de las preparaciones sirvió para conocer los diferentes

Tabla 3.1 Tiempo de aparición de calvas de lisis sobre sedimentos celulares de la bacteria hospedadora

Familia	Especie	Test
Rhodospirillaceae	<u>Rhodobacter capsulatus</u>	-
	<u>Rhodopseudomonas palustris</u>	-
	<u>Rhodocyclus gelatinosus</u>	-
Chromatiaceae	<u>Chomatium minus</u>	+ (3 dias)
	<u>Chromatium vinosum</u>	+ (3 dias)
	<u>Chromatium minutissimum</u>	+ (7 dias)
	<u>Thiocapsa roseopersicina</u>	+ (10 dias)
	<u>Thiocystis sp.</u>	+ (7 dias)
Enterobacteriaceae	<u>Escherichia coli</u>	-
Bacillaceae	<u>Bacillus subtilis</u>	-
Pseudomonadaceae	<u>Pseudomonas sp</u>	-
Micrococcaceae	<u>Staphylococcus aureus</u>	-
Símbolos - Negativo		
+ Positivo		

tipos morfológicos y esclarecer, mediante la comunidad bacteriana existente y el análisis de los parámetros físico-químicos, las características ecológicas que determinan la mayor incidencia de microorganismos depredadores.

En la figura 3.7 pueden observarse los tipos morfológicos descritos, mientras que en la tabla 3.2 se muestran sus principales características.

El Objetivo primordial de la microscopía electrónica de barrido fue la detección del microorganismo depredador sobre células de Chromatium para determinar algunas de sus características morfológicas.

El microscopio electrónico de barrido presenta el mismo inconveniente que el de epifluorescencia en el sentido de que al analizar las muestras se da una superposición celular debido a la propia filtración que hace que los resultados sean de difícil interpretación, por ello se trabajó con muestras muy diluidas con el fin de obtener células aisladas de Chromatium sobre las que se pudiera estudiar de manera real la incidencia de Daptobacter.

La figura 3.8 muestra una célula de Chromatium rodeada de algunas células de Daptobacter.

Las imágenes obtenidas por esta técnica no permiten un esclarecimiento sobre el tipo de infección y hacen difícil la separación entre Vampirococcus y Daptobacter. La utilización del MET fue importante para la determinación de ambas formas.

3.3.2. Observación de muestras enriquecidas

Alícuotas de estados progresivos del proceso de enriquecimiento del microorganismo endoparásito fueron preparadas para el microscopio electrónico de barrido.

La observación de dichas muestras revelaron un estado de la superficie celular de Chromatium minus muy rugoso, en el que la mayoría de las células se encontraban agregadas por muc

Tabla 3.1 Tipos morfológicos de microorganismos pertenecientes al Lago Grande de Estanya determinados mediante técnicas de microscopía electrónica de barrido

Microorganismo	Morfología	Tamaño
<u>Chromatium okenii</u>	bacilo ovalado	1.3x5.5
<u>Chromatium vinosum</u>	bacilo ovalado	1.7x4.3
<u>Chromatium minus</u>	ovoidal	2.5x5
<u>Thiocystis</u> sp	esférica, formando agregados	0.6
<u>Thiospirillum</u> sp	espirilo	1.7x21.7
Algas	células bacilares en filamentos envainados	3.5x6.5
Género no determinado	bacilos alargados fusiformes	0.25x1.5
<u>Vampirococcus</u>	coco	0.6

lago (aspecto típico de los microorganismos de esta especie ante condiciones desfavorables) lo que dificultó enormemente la valoración de si los efectos eran debidos al estado fisiológico de la célula hospedadora o al efecto del microorganismo depredador. Fue necesario la inclusión de dichas muestras para su observación en secciones ultrafinas que permitieran la correcta interpretación.

En la figura 3.9 se muestra el aspecto de dichos agregados y rodeados de limos.

3.3.3. Análisis directo de las calvas de lisis

Para la observación de las calvas líticas (mediante microscopía electrónica de barrido) se prepararon directamente filtros que las presentaban. Se intentó analizar concretamente la zona lítica, con resultado negativo, debido a que al ser necesaria la utilización de un gran número de aumentos, los filtros se rompían debido a la alta intensidad electrónica que calentaba en exceso la muestra. Se ensayaron diferentes filtros para comprobar su resistencia. El filtro ideal para este tipo de examen fue el filtro Nuclepore, pero éste es inadecuado para la formación de calvas líticas, por lo que no se pudo realizar el análisis.

3.4. Aplicación del microscopio electrónico de transmisión

La utilización del microscopio electrónico de transmisión (MET) ha sido fundamental para la realización de este trabajo. Con él se ha podido estudiar la morfología y la ultraestructura celular tanto de la bacteria depredadora (cultivos axénicos y cultivos enriquecidos) como de las bacterias presas. Además, ha permitido seguir los diferentes estadios del ciclo infectivo.

El principal inconveniente en la preparación de las muestras para el microscopio electrónico de transmisión surgió en el proceso de preinclusión de aquellas en agar.

Usualmente, las suspensiones bacterianas son centrifugadas para la obtención de un "pellet" que pueda ser incluido en agar para su tratamiento posterior.

En el caso de los cultivos de enriquecimiento, la detección de calvas de lisis se efectuaba sobre filtros. Al resuspender material procedente de éstos, parte del agar que cubría el propio filtro, así como restos de éste, eran resuspendidos también por lo que se hacía imposible la obtención de un "pellet" por centrifugación. Para corregir este defecto se ensayaron dos técnicas:

- a) La inclusión completa del filtro en agar
- b) La reinoculación directa del material procedente del filtro en placas de Petri con agar duro fundido, que al solidificar dejaba el material perfectamente incluido.

La primera técnica tuvo que deshecharse debido a que el grosor del filtro era muy fino, y era realmente costoso identificar las zonas bacterianas (teñidas con OsO_4 como pequeños puntos oscuros) para la ultramicrotomía. Por todo ello se optó por la segunda técnica que aunque laboriosa, fue la única que permitió la inclusión de un número de células suficiente como para que pudiera ser reconocible la muestra en los bloques de araldita.

Esta disyuntiva no se produjo en los cultivos axénicos, en los que se pudo utilizar la técnica habitual.

3.4.1. Caracterización morfológica del microorganismo endoparásito

La caracterización morfológica de Daptobacter, se efectuó partiendo de fotografías ampliadas de imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido y de transmisión.

Previamente la muestra tuvo que ser filtrada para retener células de Chromatium minus que por su gran tamaño colmataban las rejillas de cobre usadas como soporte, dificultando la observación. El líquido filtrado fue observado mediante tinción negativa.

La microscopía de barrido fue deshechada como técnica de caracterización debido a la reducción del volumen celular que comporta la preparación de las muestras.

Daptobacter es un pequeño bacilo recto de 0.5 μm de anchura y de 1.5 μm de longitud.

Cuando se examinan las células por microscopía electrónica de transmisión no se observa la presencia de ningún tipo de limo o cápsula envolvente que pueda recordar los bdellocistos que forma Bdellovibrio cuando parasita células de Rhodospirillum rubrum.

Daptobacter es una bacteria móvil provista de un(a veces varios) flagelo polar.

En la tabla 3.3 se señalan las principales características tanto coloniales, o de aspecto de las calvas, como morfológicas individuales.

3.4.2. Flagelos

Para la caracterización de los flagelos se utilizó tanto la técnica de tinción negativa, como la de sombreado de platino por microscopía electrónica de transmisión.

Tabla 3.3 Principales características individuales y coloniales de Daptobacter

Característica	Aspecto de la colonia en NB agar	Aspecto de las calvas de lisis	células individuales
Morfología	Redondeada de bordes regulares	Esférica de bordes irregulares	Pequeños bacilos rectos
Pigmentación	Borde translúcido con coloración amarillenta central	Color claro sobre fondo rojo	
Tamaño	3mm-1cm	0.15-0.5 cm	0.5x1.5-1.2µm

Daptobacter posee un flagelo polar de longitud estimada de 2.49 μm y 15 nm de diámetro (figura 3.10).

Cuando la tinción se realizó en muestras procedentes de cultivos axénicos, algunos bacilos presentaban en uno de sus polos un penacho constituido por 4 ó 5 flagelos (figura 3.11) mientras otros poseían un solo flagelo polar. El flagelo no parece tener vaina como es característico en el género de Bdellovibrio. En este último las fotografías electrónicas obtenidas mediante tinción negativa muestran una clara continuidad entre las envueltas celulares y el inicio del flagelo, siendo estas de un grosor anormalmente grande. Por su parte esta continuidad se aprecia muy bien en algunas imágenes de cortes ultrafinos.

En contraposición en ninguna de las células examinadas pudo observarse la presencia de una vaina flagelar, hecho que además corrobora su pequeño diámetro.

3.4.3 Envolturas celulares

El estudio de las envueltas celulares de Daptobacter se enfocó de modo comparativo al realizado con las especies del género Bdellovibrio, ya que éstas presentan formas de resistencia características cuando la bacteria hospedadora Rhodospirillum rubrum es infectada por él. Debido a la proximidad de ambos parásitos en cuanto a lo que hace referencia al margen de hospedador (en este caso concreto) se pensó en la posibilidad de que Daptobacter realizase un proceso similar.

Estudios por microscopía electrónica de transmisión no reportaron ningún resultado sobre la hipótesis anteriormente citada. Daptobacter no presenta cápsulas o envueltas celulares (figura 3.12), aunque en ocasiones las células individuales aparecían rodeadas de una envuelta celular procedente de la pared celular de la bacteria hospedadora.

3.4.4. Caracterización ultraestructural

Los métodos expuestos en los anteriores apartados han permitido la caracterización morfológica de Daptobacter, pero únicamente con el examen de secciones ultrafinas de cultivos de enriquecimiento ha sido posible determinar su estructura interna.

Daptobacter es una bacteria Gram-negativa. En las fotografías electrónicas puede apreciarse la estructura típica de pared y membrana citoplasmática característica de este tipo de bacterias.

El citoplasma celular presenta diferentes tipos de inclusiones; algunas de ellas identificables por métodos específicos, y otras todavía ahora en vías de valoración.

En primer lugar y distribuidos homogéneamente por todo el citoplasma bacteriano se encuentran los ribosomas, pequeños orgánulos de 0.0 μm de diámetro y muy densos a los electrones. Igualmente pueden apreciarse otros tipos de inclusiones de reserva, de distribución y número variable. Dependiendo de las condiciones fisiológicas de la bacteria parásita se identifican los siguientes orgánulos:

- a) Gránulos de glucógeno de un tamaño mayor que los anteriores, de 0. μm de diámetro también muy densos a los electrones y que se presentan con un margen de variación por célula de 1-15.
- b) Gránulos de poly- β -hydroxybutirato (PHB), sólo los presentan pocas células; se trata de gránulos poco densos a los electrones de 0. μm de diámetro.
- c) Unas inclusiones todavía no determinadas de especial disposición. Se trata en este caso de orgánulos

nulos muy poco densos a los electrones y de disposición polar (uno en cada extremo de la célula) y que a veces se presenta en posición central, en la zona de formación del septo de división. Su naturaleza es por ahora desconocida, aunque se ha propuesto la hipótesis de que, dada su peculiar disposición, tal vez su función esté relacionada con la producción de enzimas líticos necesarios en el proceso de infección.

En la figura 3.13 se aprecian las estructuras anteriormente citadas. Restos de la célula hospedadora pueden también observarse en esta imagen.

3.5. Ciclo infectivo de Daptobacter

Los primeros ensayos para el seguimiento continuo del ciclo infectivo de Daptobacter se efectuaron utilizando la técnica de los microcultivos (descrita en Material y Métodos, apartado 2.6) y mediante el microscopio de contraste de fases.

A causa del bajo poder de resolución de este tipo de microscopio no se pudo hacer una diferenciación clara de las fases en que estaba constituido el ciclo infectivo, pero sí sirvió de gran ayuda para esbozar y completar los resultados que posteriormente aportaría el empleo del microscopio electrónico de transmisión en el procesado de muestras correspondientes a diferentes etapas del desarrollo de microcultivos.

3.5.1. Contacto primario

Las observaciones de microcultivo con el microscopio de contraste de fases demostraron que puede producirse contacto entre uno o más (aprox. 5 el máximo) parásitos y la célula hospedadora.

Daptobacter al igual que hace Bdellovibrio colisiona físicamente por uno de sus polos con la superficie celular de la bacteria hospedadora. La colisión se produce gracias al rápido movimiento rectilíneo que le proporciona su flagelo polar. Todavía se desconoce si dicho contacto se produce de una forma aleatoria o por la existencia de un reconocimiento químico.

En esta fase la célula hospedadora utilizada, Chromatium minus, mostraba un aspecto metabólico normal no apreciándose ninguna alteración en la pared y membrana citoplasmática. El citoplasma bacteriano presentaba glóbulos de azufre, gránulos de poly- β -hydroxybutirato (PHB), glucógeno (G) y vesículas fotosintéticas (V) (figura 3.14)

3.5.2. Ataque

Una vez efectuado el contacto primario, Daptobacter inicia un movimiento rotatorio alrededor de su eje longitudinal (durante un tiempo no medido pero prolongado). Este proceso fue observado mediante microscopía de contraste de fases.

Alícuotas de muestras correspondientes a esta fase fueron examinadas en el microscopio electrónico de transmisión. En las imágenes obtenidas a partir de las secciones ultrafinas se distinguió en primer lugar y en la zona de contacto de ambos microorganismos, la invaginación de la pared y de la membrana citoplasmática de Chromatium minus por parte de Daptobacter y que termina posteriormente con la rotura de ambas membranas. En la figura 3.15 puede observarse una célula de Daptobacter en el momento de iniciarse la penetración en una célula de Chromatium minus. En ella se observa la formación de un abultamiento por parte de la célula hospedadora en la zona de reconocimiento.

El examen ultraestructural de Chromatium minus, demuestra que no existe en esta fase ningún otro tipo de alteración en el citoplasma bacteriano, tan solo el inicio de la rotura de pared y membrana citoplasmática que se hace claramente patente en la fase siguiente de infección.

A lo largo del presente trabajo se ha podido constatar que Chromatium es más vulnerable a la infección cuando se encuentra creciendo en condiciones fisiológicas no ideales. En estas condiciones, el azufre intracelular es utilizado por lo que no se observan este tipo de inclusiones; o de presentarse dichos glóbulos, se encuentran parcialmente degradados. Obsérvese en la figura 3.16, la presencia de limos envolviendo células de Chromatium.

3.5.3. Penetración

En esta fase se produce la rotura definitiva de la pared celular y de la membrana citoplasmática de Chromatium.

Daptobacter penetra en el espacio citoplasmático de la bacteria hospedadora. El mecanismo de entrada parece ser similar al propuesto para Bdellovibrio, con una fase primaria en la que se produce una perforación mecánica de la pared celular, y una etapa secundaria, no demostrada, de probable producción enzimática que facilite la entrada del parásito.

En las figuras 3.17 y 3.18 pueden observarse dos ejemplos gráficos de dicha penetración. En la figura 3.17, Daptobacter atraviesa materialmente la célula hospedadora. Dada la longitud del parásito, parte de éste emerge por ambos polos de Chromatium con rotura de envolturas celulares. En la figura 3.18 se muestra una célula de Chromatium con infección múltiple por tres células de Daptobacter. Obsérvese la clara disposición citoplasmática de las células parásitas, y la lisis celular que producen en su entorno, detectables como zonas claras

(sin contenido citoplasmático). La imagen corresponde en este caso a un corte transverso.

Las alteraciones más notables de esta fase corresponden a la bacteria hospedadora. En primer lugar la rotura de la pared y membrana citoplasmática es evidente en diferentes puntos. Dichas envueltas se observan en estas imágenes circularizadas provocando la retracción del citoplasma bacteriano. Este, por su parte presenta grandes zonas de lisis que se aprecian especialmente alrededor de las células parásitas; así mismo las vesículas fotosintéticas presentan un tamaño variable debido a la rotura.

3.5.4. Multiplicación

Daptobacter se divide en el interior del citoplasma bacteriano de la célula hospedadora por división binaria, no habiéndose observado en ninguna ocasión más de dos células en cada división. Las figuras 3.19 y 3.20, son dos ejemplos característicos de la división de Daptobacter. La bacteria hospedadora aparece degradada casi por completo, lo que puede correlacionarse con la disminución del número de células de Chromatium por campo que se observó en los estudios efectuados con microcultivos, mediante el microscopio de contraste de fases.

3.5.5. Liberación

Finalmente la descendencia queda libre debido a la lisis completa de la bacteria hospedadora. Cada célula hija tiene capacidad infectiva y puede comenzar un nuevo ciclo. En las figuras 3.21 y 3.22 puede observarse la fase final del ciclo infectivo. En ambas imágenes la lisis celular de la bac-

teria hospedadora es bien patente, mostrándose restos del citoplasma bacteriano de Chromatium, así como estructuras circularizadas de su pared que alternan con secciones transversas de varias células de Daptobacter en fase de liberación.

3.6. Crecimiento independiente

Con el fin de aislar el microorganismo endoparásito en cultivos axénicos se ensayó el crecimiento en medios microbiológicos. Primeramente se hicieron siembras directas en placas de NB, a partir de muestras de calvas de lisis inoculadas previamente en medio líquido (véase la figura 2.1).

Se aislaron por este procedimiento diez tipos diferentes de morfologías coloniales. Cada una de estas colonias se separó en cultivos axénicos efectuándose previamente una tinción de Gram de cada una de las distintas morfologías coloniales.

Las colonias formadas por pequeños bacilos Gram-negativos se ensayaron nuevamente sobre sedimentos celulares de la bacteria hospedadora (Chromatium minus) para comprobar su capacidad infectiva. Únicamente un sólo tipo de colonia dió una lectura positiva (formó calvas de lisis).

3.6.1. Características morfológicas y coloniales

Daptobacter crece en placas de medio NB, desarrollando unas colonias de bordes redondeados regulares que incrementan de tamaño hasta un máximo de 0.5 cm. La colonia tiene un halo periférico traslúcido y presenta una coloración amarillenta central.

En el mismo medio y en crecimiento en anaerobiosis (jarra anaeróbica Gaspak) se presenta el mismo tipo de morfología, aunque el crecimiento en anaerobiosis es mucho más lento.

El examen por microscopía óptica de un frotis colonial, mostró microorganismos de morfología bacilar algunos en división binaria y Gram-negativo.

Los bacilos observados mediante la técnica de la gota pendiente presentaban una gran movilidad debido a la posesión de uno o varios flagelos polares (véase la figura 3.10).

3.6.2. Características ultraestructurales

El análisis al microscopio electrónico de transmisión de cultivos axénicos de Daptobacter permitió un estudio fino de su ultraestructura.

En las figuras 3.23 y 3.24 quedan resaltadas la pared celular y la membrana citoplasmática propias de las bacterias Gram-negativas. A nivel citoplasmático presenta abundantes estructuras muy electodensas (ribosomas) y escasas inclusiones de glucógeno (de un tamaño mayor). Es de destacar la ausencia de inclusiones grasas. Una característica importante a mencionar es la ausencia de las estructuras polares descritas con anterioridad y que pudieran tener una posible imputación en la actividad lítica de la bacteria hospedadora.

3.6.3. Características metabólicas

Cultivos axénicos de Daptobacter fueron inoculados en una gran variedad de pruebas bioquímicas con el fin de conocer las características metabólicas principales.

Inicialmente se ensayaron las pruebas básicas de oxidasa y catalasa, dando ambas resultado positivo. Así mismo la prueba de crecimiento en O/F dió afirmativa para las dos pruebas. por lo que el microorganismo se definió como anaeróbico facultativo y capaz de metabolizar la glucosa fermentativamente.

Otras pruebas bioquímicas como la utilización de citratos como única fuente de carbono, y la posesión de determinados enzimas como la triptófano-desaminasa y la nitrato-reductasa dieron igualmente resultado positivo. Tan sólo la prueba de la urea dió negativa. La actividad proteolítica del parásito se ensayó en la gelatina, la lectura fue positiva.

Daptobacter tiene un metabolismo claramente fermentativo; una larga lista de azúcares: glucosa, galactosa, maltosa, manosa, fructosa, ramnosa, sacarosa y almidón entre otros, fueron ensayados con resultado positivo y algunos de ellos con fuerte producción de gas. La utilización de aminoácidos se probó con arginina, lisina y ornitina; el resultado confirmó la utilización de los tres.

Finalmente fueron ensayados diferentes alcoholes, pero de todos ellos sólo el manitol fue utilizado.

En resumen, de los resultados se deduce que Daptobacter es una bacteria anaeróbica facultativa, con importante actividad proteolítica y un metabolismo de azúcares elevado. En la tabla 3.4 se indican las diferentes pruebas bioquímicas realizadas y los resultados obtenidos.

3.6.4. Cinética de crecimiento

Para poder determinar la temperatura óptima de crecimiento, y el tiempo de duplicación de Daptobacter, cuando crece en cultivos axénicos, se hicieron estudios de su cinética de crecimiento a distintas temperaturas (25° C, 30 y 37° C). El medio seleccionado por dar mejores resultados fue el NB. En la figura 3.25 se ha dibujado la curva de crecimiento correspondiente a cada una de las temperaturas indicadas.

De las diferentes lecturas (efectuadas con el espectrofotómetro) del cultivo en crecimiento se hizo un tratamiento

Tabla 3.4 Características bioquímicas de Daptobacter

Pruebas bioquímicas	Resultado
<u>1) Generales</u>	
oxidasa	+
catalasa	+
O/F	+ +
nitratos	+
citratos	+
gelatina	+
ureasa	+
utilización tiosulfato(H ₂ S)	+
<u>2) Metabolismo de azúcares</u>	
glucosa	+ (x)
galactosa	+ "
maltosa	+ "
manosa	+
fructosa	+
ramnosa	-
sacarosa	+
arabinosa	+
lactosa	+
trealosa	+
rafinosa	+
ribosa	+
almidón	+
<u>3) Utilización de aminoácidos</u>	
arginina(arginina deshidrolasa)	+
lisina(lisina descarboxilasa)	+
ornitina(ornitina descarboxilasa)	+
triptófano desaminasa	+
<u>4) Utilización de alcoholes</u>	
manitol	+
inositol	-
xilitol	-

Fig. 3.25

Curva de crecimiento de Daptobacter a distintas temperaturas; (●) 25° C , (▲) 30° C y (■) 37° C, en medio NB.

A₅₅₀

1.5

0.5

0.1

1

2

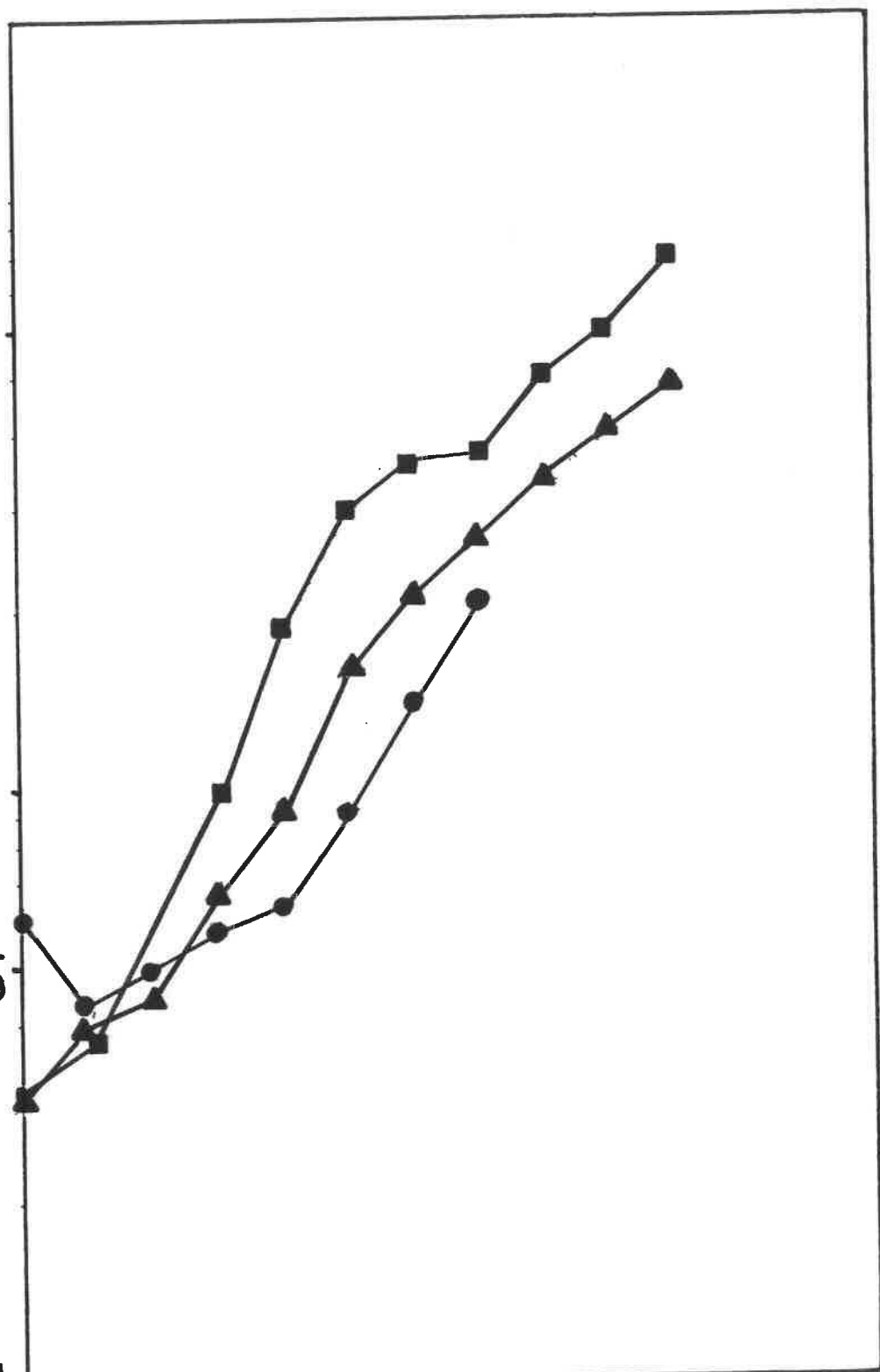
3

4

5

6

Tiempo (h)



matemático, consistente en una recta de regresión, que nos sirvió para el cálculo de la velocidad de crecimiento correspondiente a cada temperatura. También se calculó el tiempo de generación para cada una de las cinéticas estudiadas. Los resultados obtenidos fueron:

37°C	64.11 min
30°C	69.10 min
25°C	77.78 min

Estos datos confirmaron que la temperatura óptima de crecimiento (para el medio NB) es de 37°C.

3.7. Papel ecológico de los microorganismos parásitos de Chromatium

En los apartados anteriores se han descrito las diferentes características morfológicas y fisiológicas de Daptobacter en estudios efectuados en nuestro laboratorio. En este apartado se pretende resaltar la importancia ecológica de los microorganismos depredadores en general, en los medios acuáticos así como correlacionar determinados parámetros físico-químicos con el ciclo de vida de dichos microorganismos.

También se hace un estudio de las características principales que presentan los habitats naturales en los cuales se ha detectado la presencia de microorganismos depredadores de Chromatium, y se estudia su incidencia bajo un punto de vista cuantitativo.

En dichos habitats tanto Daptobacter como Vamprococcus necesitan de otras bacterias Gram-negativas (de la familia Chromatiaceae) para poder multiplicarse. Aunque en nuestro laboratorio se ha conseguido aislar una cepa variante de este microorganismo, capaz de crecer y multiplicarse en ausencia de bacteria hospedadora, no se tienen evidencias de la existencia de estas cepas en la naturaleza.

3.7.1. Habitats que favorecen la proliferación de microorganismos parásitos de Chromatium sp

Tanto la laguna de Cisó como el lago Grande de Estanya, descritos con anterioridad, constituyen ambientes naturales con ciertas características comunes que favorecen a lo largo del año el crecimiento de microorganismos fototróficos.

Ambos lagos se encuentran en sistemas cársticos donde la disolución de sulfatos del medio sirve de sustento a microorganismos anaeróbicos del género Desulfovibrio. Estas especies obtienen energía de la reducción de los sulfatos proporcionando importantes cantidades de sulfhídrico al medio, que difunde a lo largo de la columna de agua creando diferentes gradientes de concentración, en los que proliferan diversas poblaciones de bacterias fototróficas.

La luz es otro factor limitante, y que a su vez selecciona las poblaciones naturales.

La combinación de ambos parámetros determina el establecimiento de capas de agua estratificadas (en verano) en las que proliferan diferentes especies de microorganismos fototróficos. Su presencia es reconocida por la coloración que toman las aguas, ya que estas bacterias contienen pigmentos carotenoides (en el interior de vesículas fotosintéticas) que utilizan para la captación de luz.

Otro factor que condiciona enormemente el establecimiento de especies bacterianas es la presencia de oxígeno en el medio. Las condiciones existentes en la laguna de Cisó y en el lago Grande de Estanya son muy similares para los tres parámetros citados con anterioridad:

Habitat	Luz	SH ₂	O ₂	Profundidad de la capa bacteriana
Lago Grande de Estanya	1μE	1mM--0mM	8.7mg/1	12m
Laguna de Cisó	1μE	1mM--0mM	8.7mg/1	2m

La concentración de sulfhídrico difunde a lo largo de la columna de agua. A doce metros de profundidad en el lago Grande de Estanya y a dos metros en la laguna de Cisó, donde se encuentra la capa bacteriana, la concentración de sulfhídrico está comprendida entre 1mM y 0 mM.

La luz que incide sobre la capa de bacterias es de 1μE, que aunque no es la óptima deseable para las Chromatiaceae, éstas tienen que sobrevivir con estos índices de iluminación, ya que por encima de los 12 y de los 2m (lago Grande de Estanya y laguna de Cisó respectivamente) la concentración de sulfhídrico es nula y la de oxígeno elevada.

3.7.2. Recuentos totales en aguas dulces

También se determinó el tanto por ciento de células infectadas por microorganismos depredadores, así como el número de microorganismos parásitos por célula infectada.

El análisis se efectuó a diferentes profundidades:

5, 10, 12, 12.25, 12.5, 13, 15 y 20 m

con el fin de comprobar si determinadas capas de agua favorecían de forma más selectiva la incidencia de parásitos. El examen por microscopía de epifluorescencia permitió reconocer por su morfología, como bacteria predominante a Vampirococcus sp., aunque no es posible descartar por este método la presencia de Daptobacter en parcial o completa penetración.

Los resultados obtenidos se señalan en la tabla 3.5. Del análisis de los resultados puede apreciarse que el máximo de las dos especies de Chromatium se sitúa entre 12 y 12.5 m. Por su parte el número de células infectadas en la primera especie aumenta con la profundidad hasta alcanzar el máximo a los quince metros (93%). Por el contrario, la segunda especie registra un máximo de células afectadas en la misma capa bacteriana (12.25m) y se mantiene constante al incrementar la profundidad.

En cuanto al número de células depredadoras detectadas por célula infectada, incrementa con la profundidad en Chromatium minus, y se mantiene estable con ligeras variaciones en las distintas profundidades para Chromatium vinosum.

Los resultados expuestos en la tabla 3.5 nos permiten dar una valoración aproximada de células depredadoras en las distintas capas de agua, considerando el número de células de Chromatium por mililitro, el tanto por ciento de células infectadas y el número medio de células depredadoras por microorganismo hospedador.

Estos valores son máximos a 12.25m, calculándose en 7.4×10^5 el número de células depredadoras en estado infectivo. El número total comprenderá también las células libres no valoradas, por lo que debe ser superior al descrito.

3.7.3. Recuentos de células viables de Daptobacter a partir de muestreos efectuados en distintas capas de agua de la laguna de Cisó

Volúmenes conocidos de agua obtenidos de distintas profundidades de la laguna de Cisó, fueron filtrados y prepa-

Tabla 3.5 Recuentos totales de la incidencia de microorganismos depredadores de Chromatium del Lago Grande de Estanya

		<u>Chromatium minus</u>		<u>Chromatium vinosum</u>		
Profundidad (m)	Recuentos cel.ml ⁻¹	% células atacadas	número depredado-res/cél.	Recuentos cél.ml ⁻¹	% células atacadas	Número depredado-res/cél.
5	0	--	--	0	--	--
10	0	--	--	0	--	--
12	1.9x10 ⁵	38.3	1.39	5.6x10 ⁵	21.7	1.0
12.25	1.9x10 ⁵	67.7	2.16	1.1x10 ⁶	44.6	1.14
12.5	4.3x10 ⁴	85.0	3.78	2.4x10 ⁵	35.0	1.24
13	5.8x10 ⁴	77.5	2.71	8.7x10 ⁴	40.0	1.44
15	8.8x10 ³	93.5	3.14	2.6x10 ⁴	40.0	1.38
20	1.9x10 ⁴	80.0	3.50	2.6x10 ⁴	13.3	1.00

rados mediante la técnica de la doble capa de agar con el fin de efectuar un estudio del número de células viables de Daptobacter existentes en este habitat natural.

Los resultados obtenidos son expuestos en la tabla 3.6 El análisis de dichos recuentos(20-3-85) informan de que el máximo número de células de Daptobacter por mililitro de agua filtrada, está situado en la misma profundidad a la que se encuentra estratificada la capa bacteriana de Chromatium minus y decrece con la profundidad. El muestreo efectuado en el mes de Mayo(15-5-85) situa el máximo de células viables de Daptobacter en la capa bacteriana. El número elevado de p.f.u./ml correspondiente a 5 m de profundidad solamente es justificable por la sedimentación de células infectadas de las capas superiores.

Tabla 3.6 Recuentos de células viables de Daptobacter pertenecientes a distintas capas de agua de la Laguna de Cisó

Profundidad	20.3.85	15.5.85
0.25 m	621	--*
0.75 m	62	--
1.00 m	120	--
1.50 m	633	--
1.75 m	--	80
2.00 m	1060	280
2.25 m	--	960
2.50 m	--	888
3.00 m	276	872
5.00 m	--	2744
7.00 m	66	--

Símbolos * pfu/ml

1 no se dispone de datos

Figura 3.1 Tinción de Gram de células de Chromatium minus y Daptobacter en estado libre e infectivo (x1066)

Figura 3.2 Tinción con anaranjado de acridina de una muestra de agua del lago Grande de Estanya (x2000)

Figura 3.3 Microcultivo de Daptobacter y Chromatium minus a las cero horas de infección. Obsérvese la ausencia de células infectadas. (x2000)

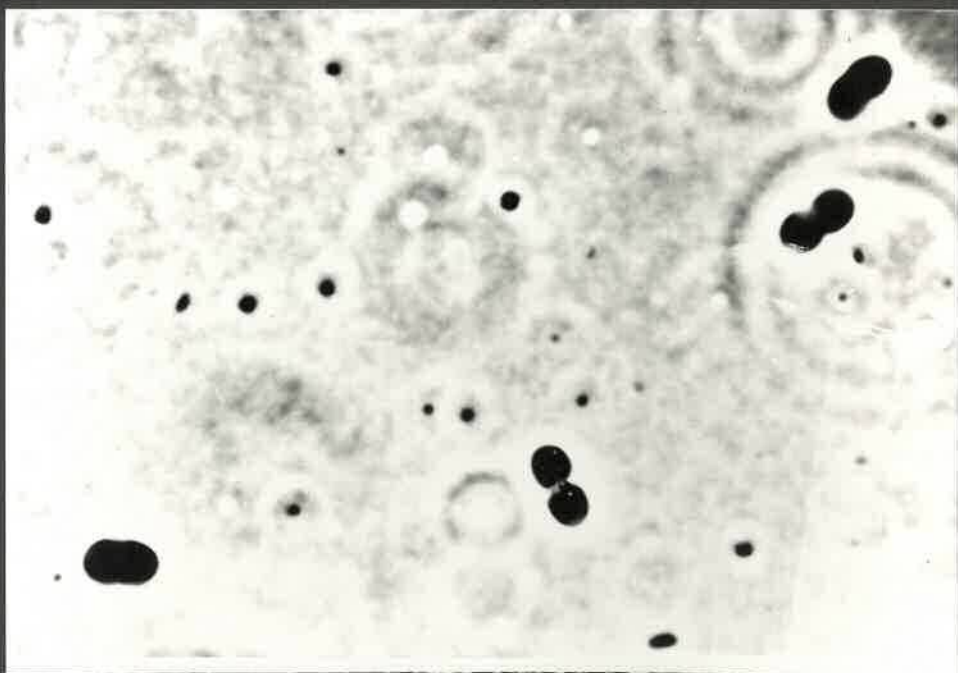
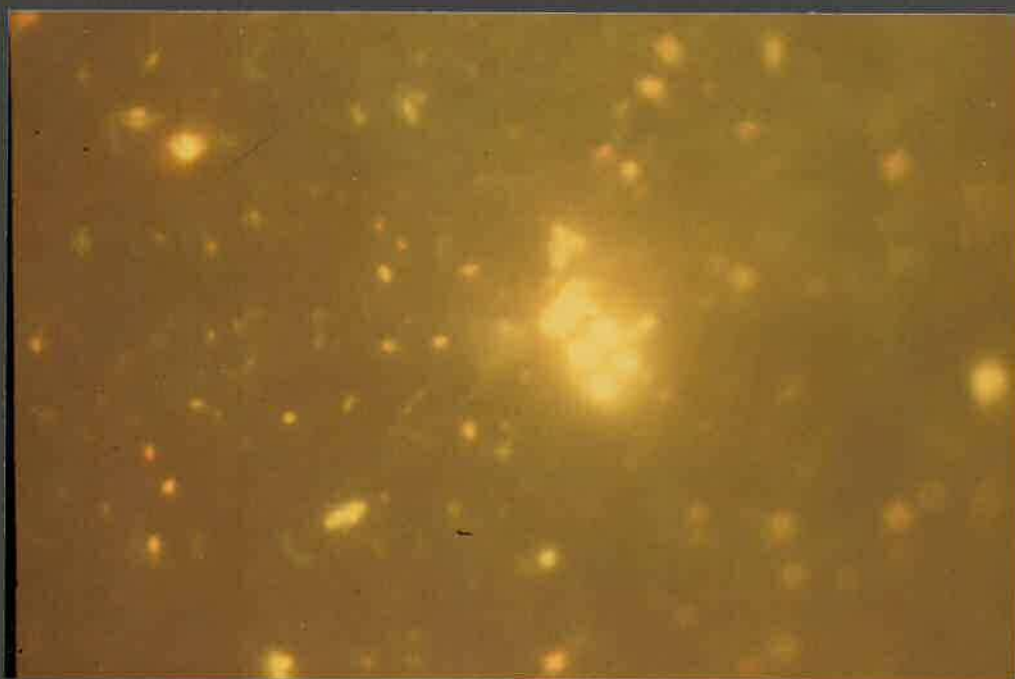
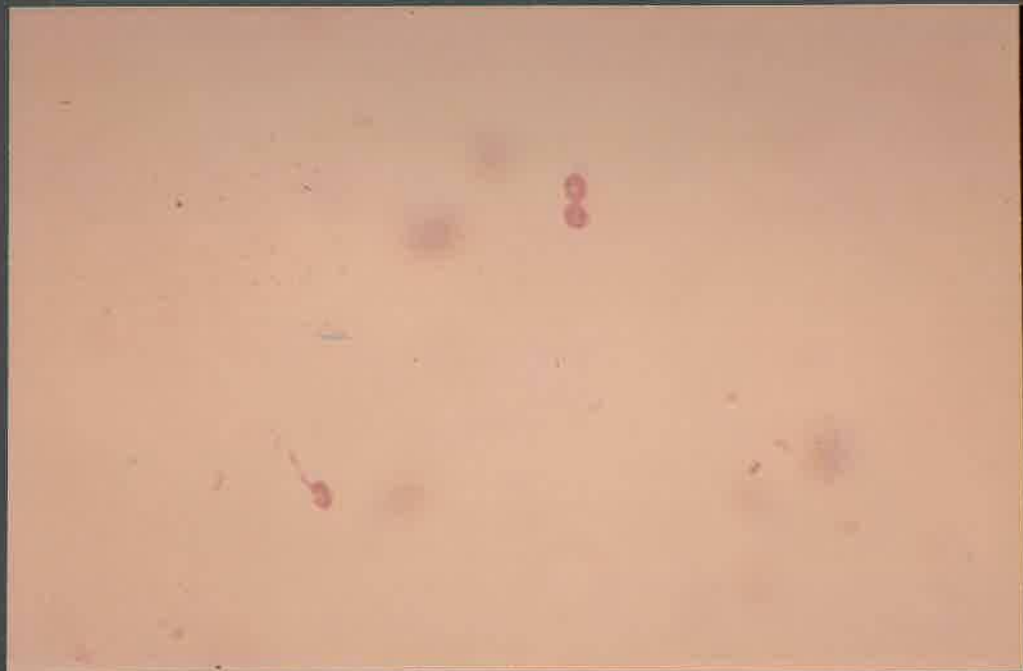


Figura 3.4

Microcultivo de Daptobacter y Chromatium minus a las veinte horas de infección. Obsérvese una célula de Chromatium minus presentando múltiple infección (x3000)

Figura 3.5

Microcultivo de Daptobacter y Chromatium minus a las cien horas de infección. La célula de Chromatium minus se encuentra muy degradada y muy pocas células presentan infección (x2000)

Figura 3.6

Calvas de lisis producidas por Daptobacter sobre sedimentos celulares de Chromatium minus.

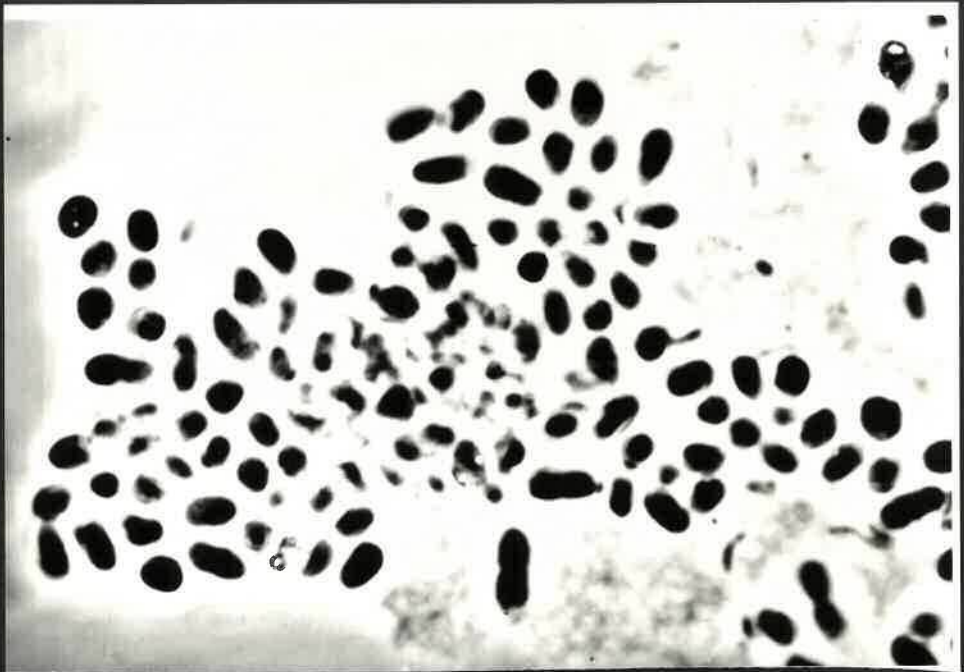
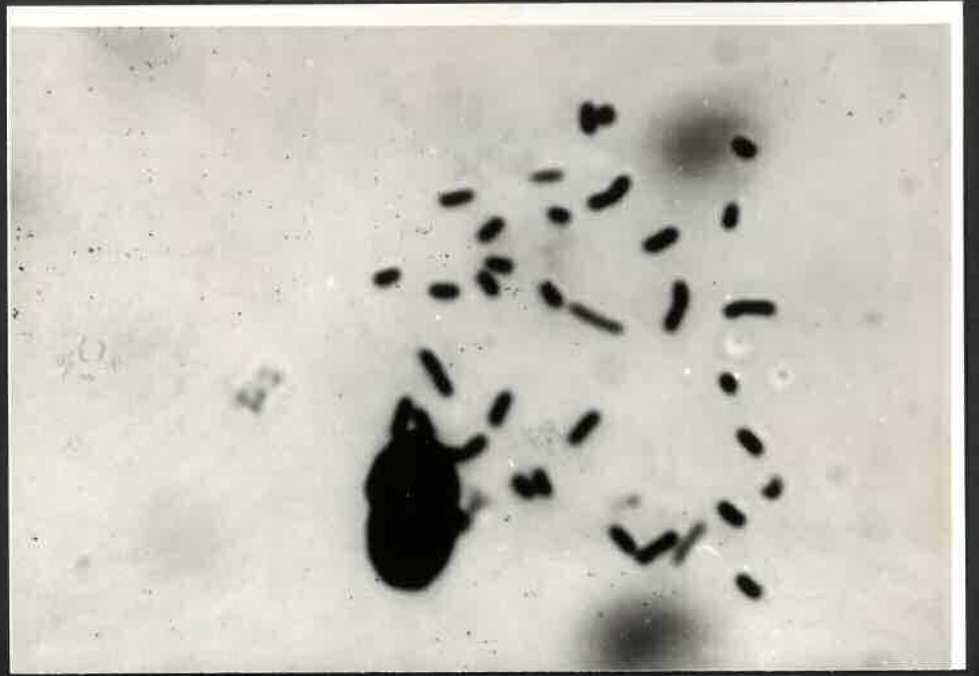


Figura 3.7

Fotografía de Scanning de una muestra obtenida del lago Grande de Estanya. Población mixta (12-10-84). (Barra representa $1\mu\text{m}$)

Figura 3.8

Fotografía de Scanning mostrando una célula de Chromatium minus infectada por varias células parásitas. (barra representa $1\mu\text{m}$)

Figura 3.9

Muestra del lago Grande de Estanya sedimentada en botellas planas en las cuales aparecieron calvas líticas. Obsérvese el aspecto muy degradado que presentan las células de Chromatium minus. (Barra representa $1\mu\text{m}$)

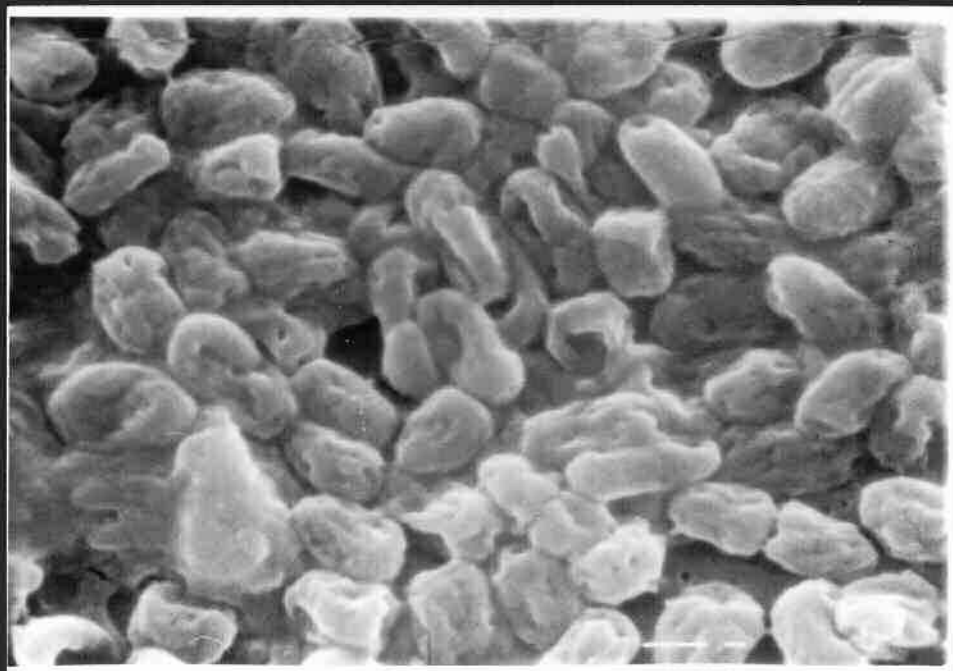
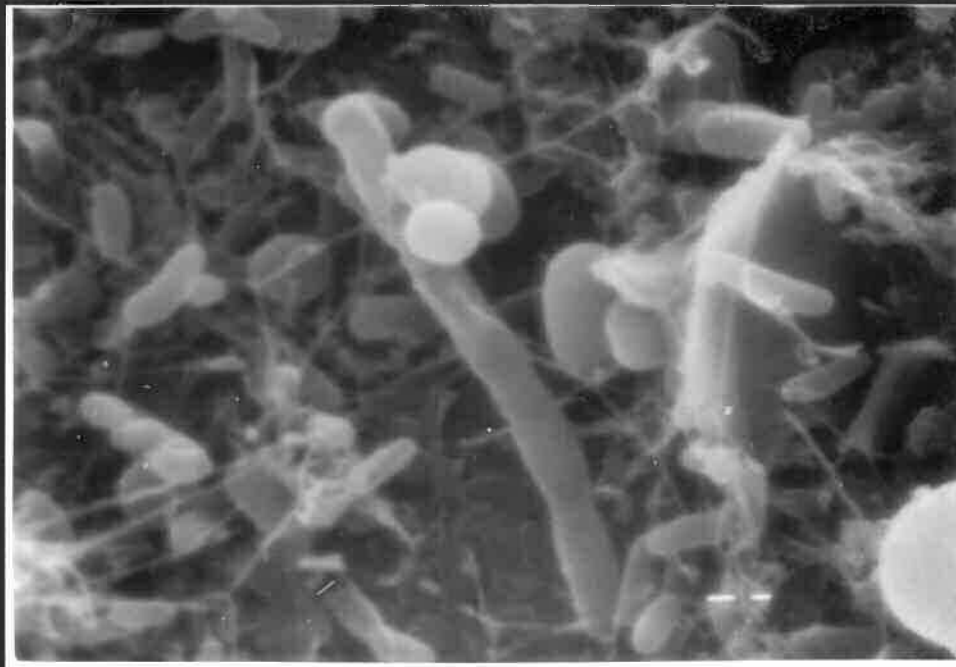


Figura 3.10

Aspecto del flagelo de Daptobacter. Tinción negativa (x36477)

Figura 3.11

Penacho de flagelos de una célula de Daptobacter perteneciente a un cultivo axénico. Tinción negativa (x87500)

Figura 3.12

Corte transversal de una célula de Daptobacter. Obsérvese la ausencia de cápsula (x84000)

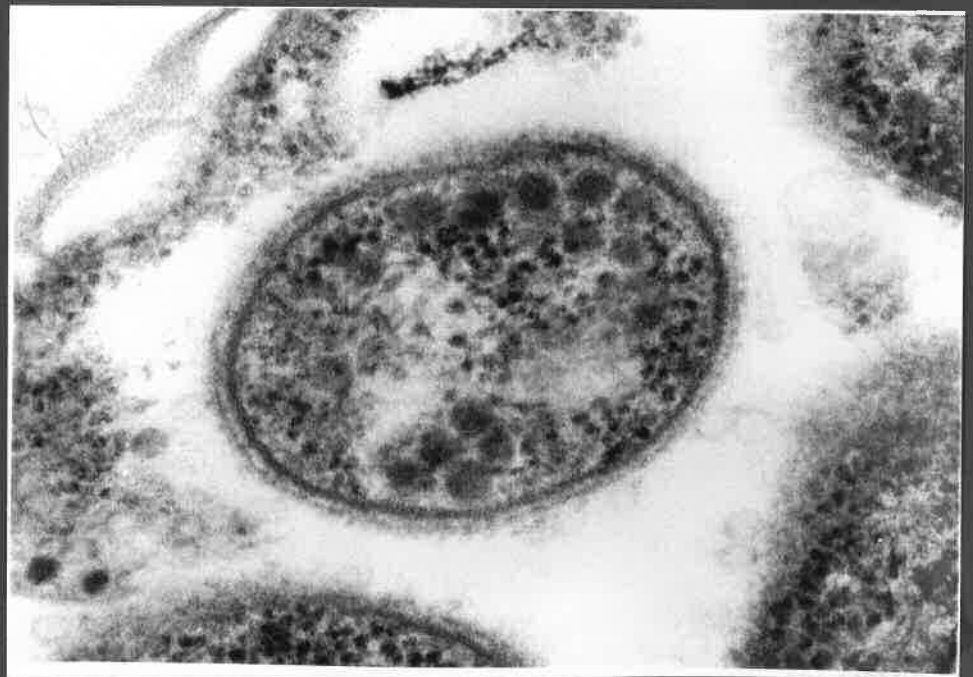
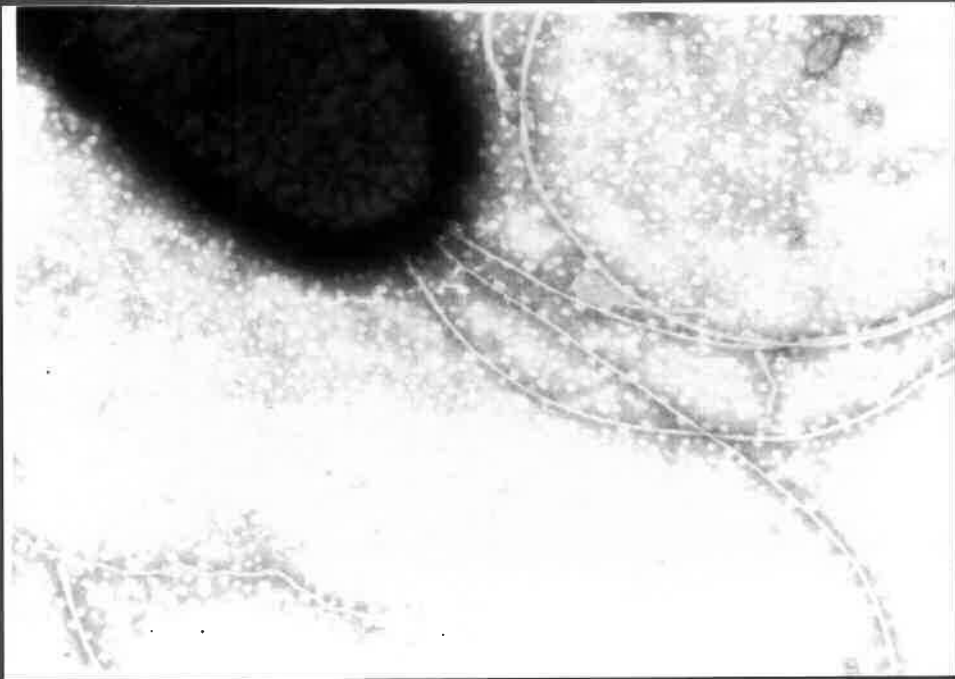
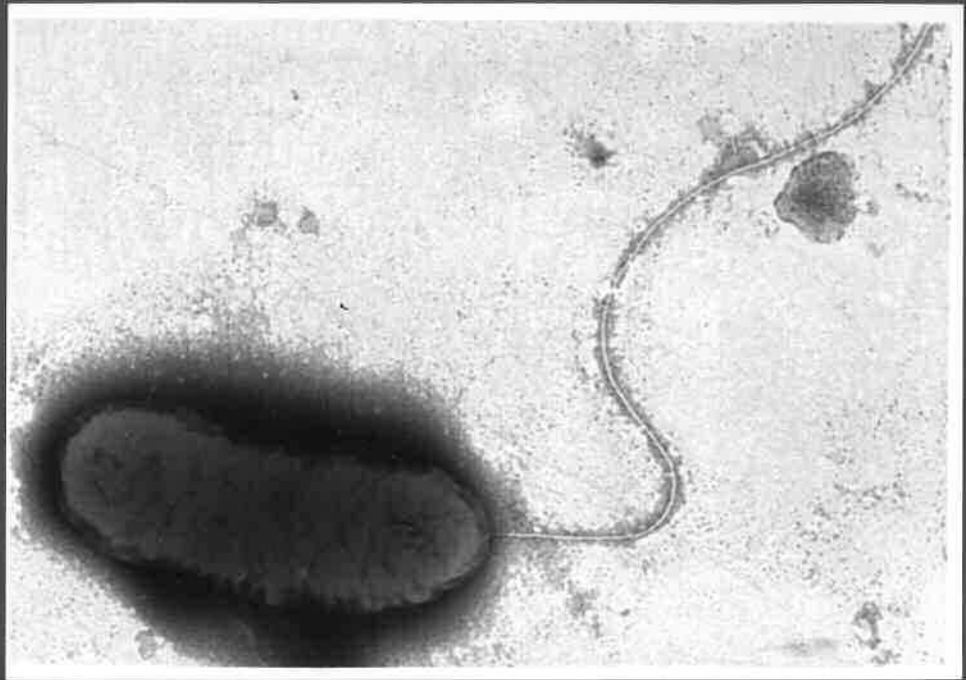


Figura 3.13

Corte longitudinal de una célula de Daptobacter mostrando pequeños gránulos electrodensos: ribosomas(R); gránulos de mayor tamaño electrodensos; glucógeno(G); estructuras poco densas a los electrones y de disposición polar de naturaleza desconocida(L) (x5850)

Figura 3.14

Ultraestructura de una célula de Chromatium minus. El citoplasma bacteriano presenta glóbulos de azufre(S), gránulos de poly- β -hydroxybutirato(PHB), glucógeno(G) y vesículas fotosintéticas(V) (x2640)

Figura 3.15

Sección ultrafina de una célula de Daptobacter penetrando en una célula de Chromatium (x50.000)

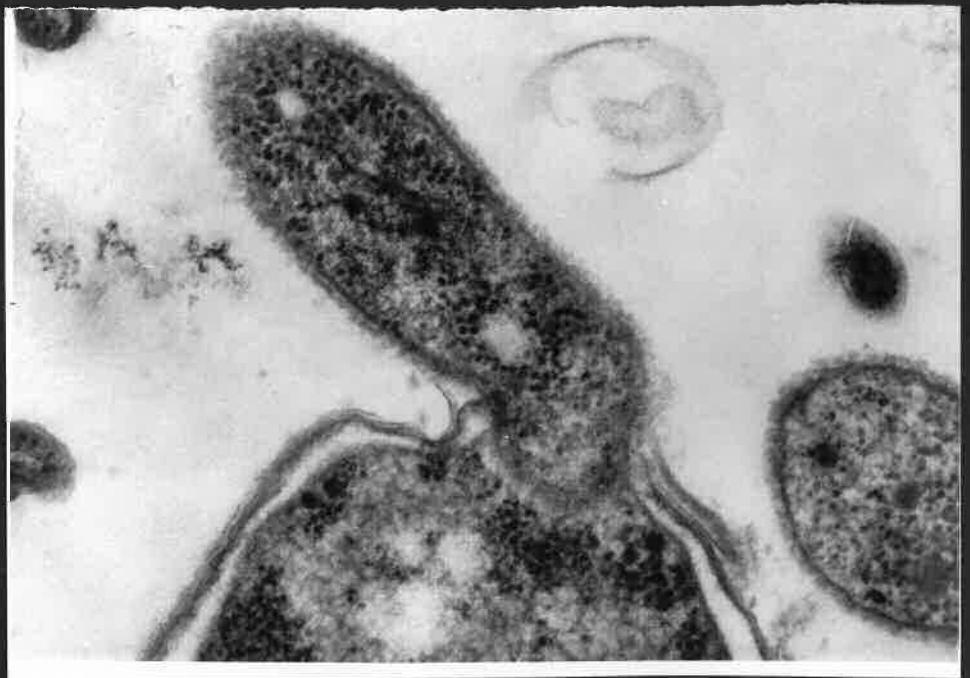
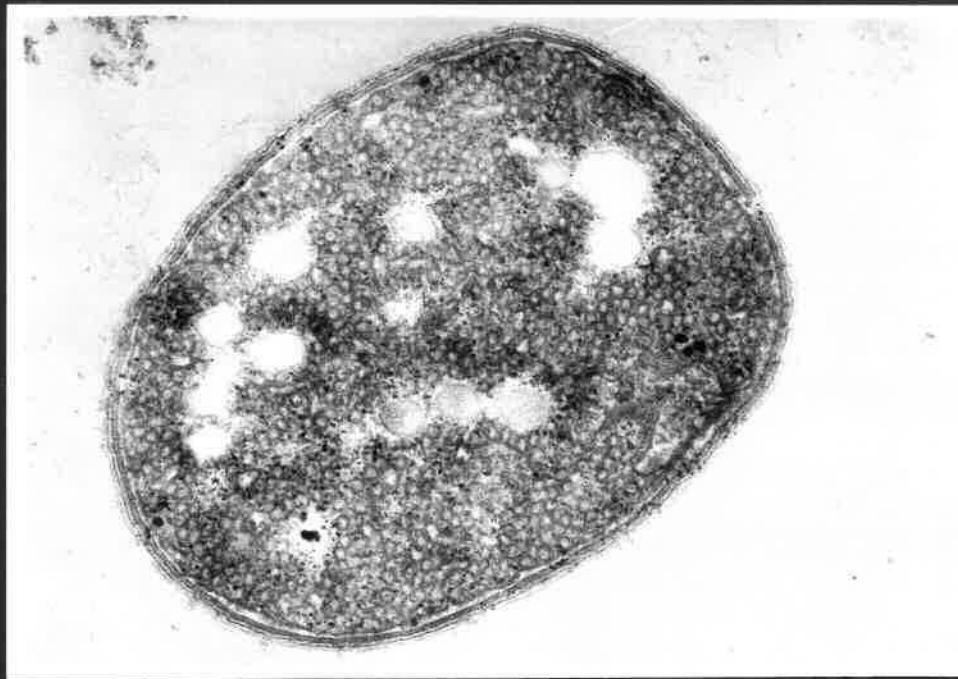


Figura 3.16

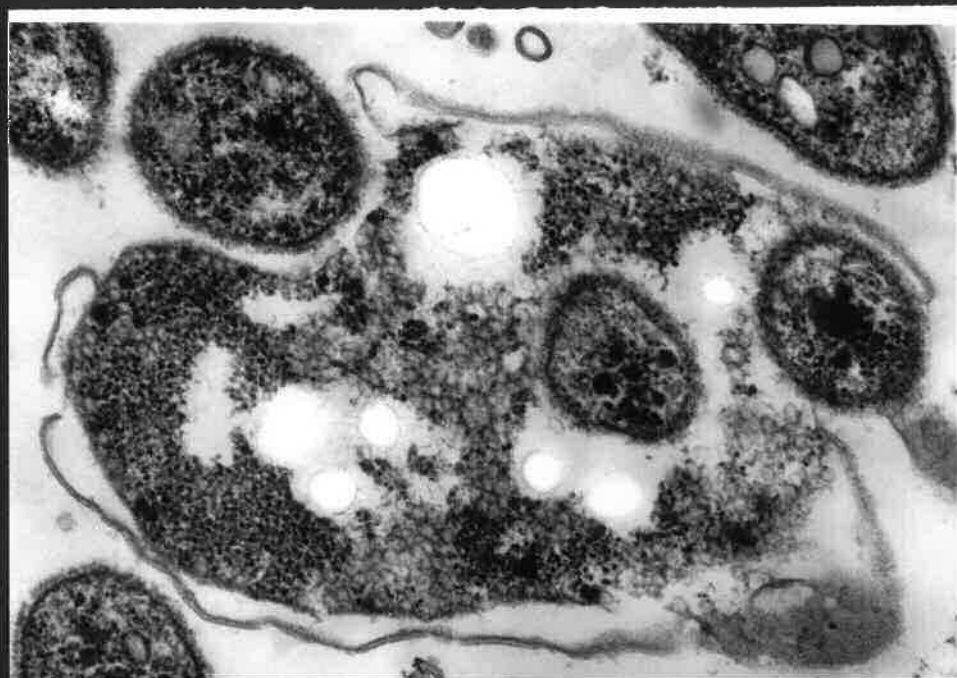
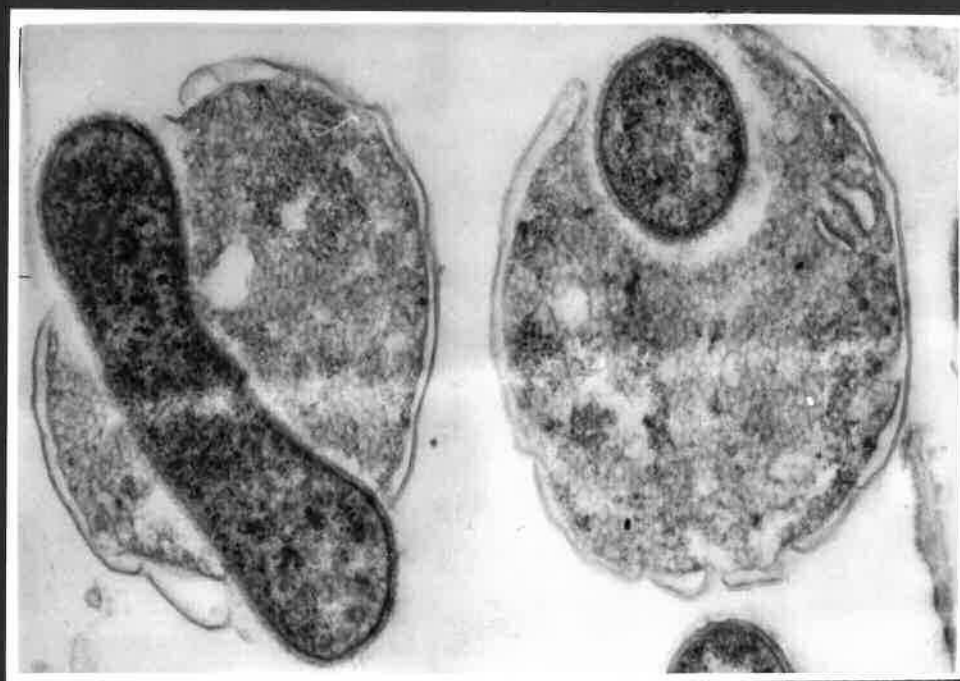
Ultraestructura de agregados de Chro-
matium con limos envolventes (x27894)

Figura 3.17

Sección ultrafina de células de Chro-
matium minus infectada por células
de Daptobacter. Nótese la localización
citoplasmática del parásito. Corte lon-
gitudinal y transversal. (x36000)

Figura 3.18

Sección ultrafina de una célula de
Chromatium en la cual se aprecia in-
fección múltiple. El citoplasma de la
célula hospedadora se encuentra degra-
dado fuertemente en torno a las célu-
las de Daptobacter



Figuras 3.19 y 3.20

Ultraestructura de células de Daptobacter en división binaria, infectando células de Chromatium
(x30.000) y (x40.000)

Figura 3.21

Etapa final del ciclo infectivo. Liberación de células de Daptobacter
(x36.000)

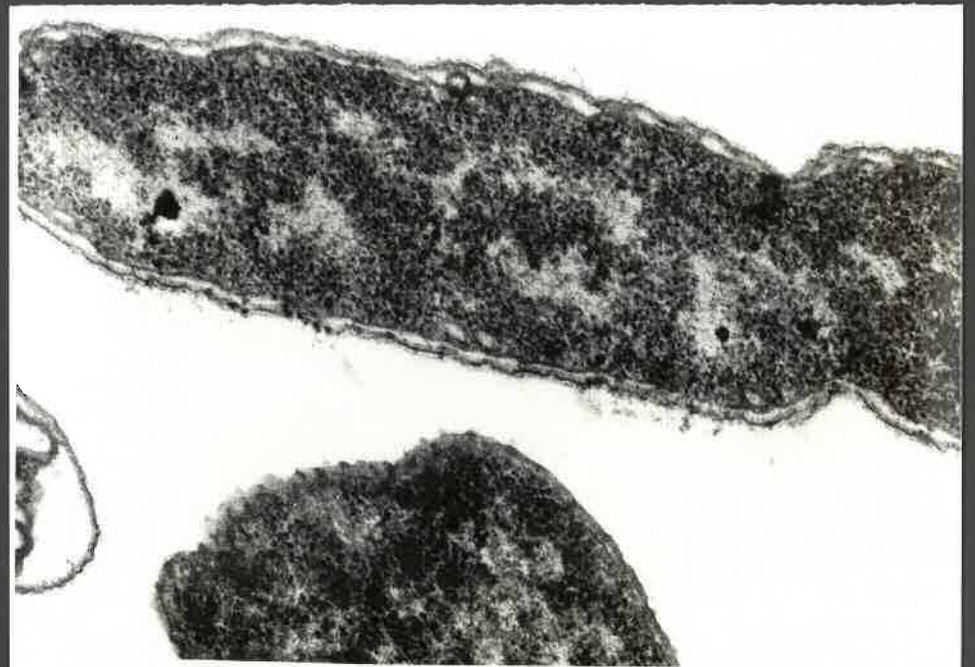


Figura 3.22

Sección ultrafina de Chromatium
después del proceso infectivo. Células de Daptobacter libres (x44000)

Figuras 3.23 y 3.24

Secciones ultrafinas de células de Daptobacter procedentes de un cultivo axénico.



4. DISCUSION

El aislamiento e identificación de Daptobacter ha supuesto un descubrimiento importante para la ecología microbiana por ser el único microorganismo bacteriano anaeróbico facultativo, capaz de realizar un proceso de parasitismo (penetran-do en el citoplasma de la bacteria hospedadora) sobre otras bacterias, conocido en la actualidad.

La detección de Daptobacter se consiguió gracias a la utilización de técnicas específicas que han tenido un papel fundamental en este trabajo. Estas técnicas tuvieron que ser modificadas en algunos aspectos con el fin de obtener mejoras en los resultados finales. Los problemas técnicos que se presentaron, así como sus soluciones se discuten a continuación.

Discusión de los métodos

La primera dificultad fue la necesidad de obtener títulos elevados de Daptobacter que permitieran poder realizar los estudios morfológicos, ultraestructurales mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido.

Un aspecto muy positivo que contrarrestó en parte la baja concentración de Daptobacter fue el lugar de estudio. Tanto la laguna de Cisó como el lago Grande de Estanya han sido masas de agua ideales para este tipo de análisis ya que favorecen el crecimiento masivo de poblaciones fototróficas, especialmente de especies del género Chromatium (Guerrero et al., 1980) a las que Daptobacter parasita.

Un nuevo problema fue la elección del tipo de filtro que se empleó para la realización de la técnica de la doble capa

de agar; primeramente se utilizaron filtros Nuclepore similares a los que habían sido escogidos para la preparación de muestras para el SEM, observándose que dichos filtros no eran adecuados para esta técnica pues las calvas de lisis que aparecían sobre los sedimentos celulares de la bacteria hospedadora no se remarcaban con nitidez, lo que hacía que su recuento fuese difícil y por tanto poco práctico.

El siguiente filtro ensayado fue el Whatman GF/F (de fibra de vidrio) con el cual sí se consiguieron los resultados esperados de nitidez del contorno de las calvas de lisis.

Durante la realización de este trabajo también se tuvo que modificar la técnica usual del procesado de muestras para microscopía electrónica de transmisión. La causa de esta modificación fue la imposibilidad de obtener un sedimento al centrifugar los filtrados celulares en los que se habían detectado calvas líticas. Conjuntamente a la suspensión bacteriana también aparecían trozos de fibra de vidrio del filtro y pequeños restos de la capa de agar; la modificación realizada consistió en incluir sobre agar fundido (a una temperatura cercana a la de solidificación) parte del sedimento celular con la ayuda de una espátula, intentando concentrar la muestra en un mismo punto para facilitar el piramidado y la obtención de secciones ultrafinas. Una vez solidificado el agar se cortó en cubitos de 1 mm aproximadamente y se realizó el procedimiento normal de preparación.

En los estudios ecológicos de hábitats naturales, es importante destacar el papel de los microorganismos depredadores sobre determinadas poblaciones bacterianas. Tan sólo la microscopía en sus distintas modalidades permite cuantificar la incidencia y el porcentaje de dichos microorganismos.

Se seleccionó para este tipo de estudios la microscopía de epifluorescencia, y pese a las ventajas que en otros aspectos pudieran presentar la microscopía electrónica de transmisión y de barrido, tuvieron que ser desechadas para este tipo de análisis por los inconvenientes que a continuación se exponen :

a) Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

El principal inconveniente de la utilización de esta técnica para efectuar recuentos, propuesta con éxito por Caldwell & Tiedje (1975) y Watson (1977) fue el tamaño de la célula hospedadora Chromatium minus, que cubría completamente (por su facilidad de formar agregados) la rejilla de cobre impidiendo la detección del microorganismo parásito.

En el caso de las secciones ultrafinas la información obtenida era escasa debido a que una misma serie de cortes podían estar referidos a la misma célula examinada, precisándose en este caso un número muy elevado de cortes para que los datos fueran significativos.

b) Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Esta técnica fue igualmente desechada ya que en anteriores trabajos pudo comprobarse el efecto que las deshidrataciones (indispensables en la preparación de muestras) ejercían sobre la reducción de los volúmenes celulares, especialmente en los microorganismos fototróficos en los que eran fuertemente extraídos los pigmentos fotosintéticos (Montesinos et al., 1983).

La técnica había sido propuesta para estudios similares por Bowden (1977) que comparó la microscopía electrónica de barrido

do y la microscopía de epifluorescencia para los recuentos celulares, resaltando los aspectos positivos de esta última técnica.

También la microscopía de barrido dificulta el proceso de contaje en los casos de formación de limos, y en los de presencia abundante de material detrítico.

c) Microscopía de epifluorescencia (anaranjado de acridina)

Con la utilización de esta técnica se consiguió diferenciar el material biológico (gracias a la tinción del material genético) de la materia orgánica existente en las preparaciones (supone una mejora con respecto al SEM).

Otra característica a resaltar fue el número elevado de células que pudieron ser observadas en cada preparación (muy superior en comparación al MET).

El único punto negativo que existe al emplear esta técnica, es el cansancio visual que reporta la prolongada observación en el microscopio de contraste de fases de cada una de las muestras.

Estudio comparativo de los microorganismos depredadores

Daptobacter supone una nueva aportación dentro del ámbito de los mecanismos de depredación bacteriana.

Hasta la fecha muy pocos son los microorganismos parásitos de bacterias conocidos. Los únicos géneros que pueden ser considerados como tales son Bdellovibrio, Vamprococcus y Daptobacter. Puesto que Vamprovibrio parasita a un alga eucariota

del género Chlorella y tanto los protozoos como los bacteriófagos, responsables de la mayoría de procesos depredatorios de estos microorganismos, no pertenecen al tipo celular procarionte, se excluyen de la comparación.

Entre los tres géneros anteriormente citados Bdellovibrio, Vampirococcus y Daptobacter existen notables diferencias en las características tanto morfológicas como en las que hacen referencia a su ciclo infectivo, aunque también es cierto que en algunos aspectos concretos presentan ciertas similitudes (Guerrero et al., 1985).

Las siguientes páginas están enfocadas a comparar los tres géneros citados.

Vampirococcus difiere del género Daptobacter sobre todo en los aspectos morfológicos de motilidad, y principalmente en la posición que ocupan ambos parásitos en el momento de su infección sobre la bacteria hospedadora. Vampirococcus es un depredador ectoparásito mientras que Daptobacter es un endoparásito. Como principal similitud hay que destacar el hecho de que ambos microorganismos son capaces de infectar a una misma especie bacteriana, Chromatium minus. Vampirococcus lo hace de forma específica mientras que Daptobacter presenta un margen de hospedador más amplio.

Dado que Daptobacter tiene muchas características similares al género Bdellovibrio, y puesto que la información que se tiene sobre este último es exhaustiva, se establece a continuación una comparación entre ambos géneros (Esteve et al., 1985).

Las principales características morfológicas y bioquímicas

cas de Daptobacter se señalan en la tabla 4.1 en comparación con las de los géneros Bdellovibrio y Vamprococcus, pero por los motivos anteriormente expuestos se compararán únicamente los dos primeros géneros citados.

a) Morfológicamente, los dos microorganismos son distintos. Bdellovibrio, tiene forma de vibrio y Daptobacter es un bacilo recto. Ambos parásitos son muy similares en su tamaño, el cual es de 0.35 x 1.2 μm para Bdellovibrio y de 0.5 x 1.5 μm el de Daptobacter.

Los dos géneros presentan motilidad proporcionada por un único flagelo polar que en Daptobacter carece de vaina y tiene un grosor de 15 nm de diámetro. En contraposición, el flagelo de Bdellovibrio está envainado y alcanza un valor de 28 nm (Seidler & Starr, 1967, 1968). Este último se encuentra constituido por una cubierta de 7.5 μm de grosor que rodea al eje central de 13 nm de diámetro, y que es una continuación de la pared celular (Abram & Davis, 1970).

b) Otra característica común de los dos microorganismos comparados es la capacidad de producir calvas de lisis sobre sedimentos celulares de bacterias hospedadoras. A este nivel el margen de hospedador conocido de Daptobacter se limita exclusivamente a especies del género Chromatium mientras que muchos Bdellovibrios estudiados tienen actividad sobre enterobacterias y pseudomonas, (Starr & Huang, 1972) y (Starr & Seidler, 1971), habiéndose descrito también bdellovibrios capaces de atacar otras especies bacterianas como Azotobacter chroococcum (Sullivan & Casida, 1968), Rhizobium spp., Agrobacterium tumefaciens (Parker & Grove, 1970) y Sphaerotilus natans (Venosa 1.975).

Tabla 4.1 Características comparativas entre Bdellovibrio, Daptobacter y Vampirococcus

Características	<u>Bdellovibrio</u>	<u>Daptobacter</u>	<u>Vampirococcus</u>
Morfología	vibrio	bacilo recto	coco
Motilidad	Móvil, por un flagelo	Móvil por un flagelo-	--*
Localización en la célula hospedadora	Espacio citoplasmático	Citoplasma	Adosado a la pared celular
Formación de calvas líticas	+	+	+
Margen hospedador	Muchas Gram-negativas	<u>Chromatium</u> sp	<u>Chromatium minus</u>
Tolerancia al oxígeno	aeróbico	facultativo	anaeróbico
Oxidasa	+	(no todas las sp) +	--
Catalasa	+	(no todas las sp) +	--
Capacidad fermentativa	-	+	--
Utilización NO ₃ ⁻	+	(no todas las sp) +	--
Gelatinasa	+	+	--
Símbolos * indeterminado			

c) La comparación de sus características metabólicas aporta una nueva diferencia entre las dos especies.

Bdellovibrio es un microorganismo aeróbico estricto y Daptobacter es anaeróbico facultativo.

Por otra parte muchas de las cepas de Bdellovibrio se ha demostrado que no son capaces de utilizar carbohidratos (Starr & Seidler, 1971), en cambio Daptobacter es capaz de realizar un metabolismo de azúcares importante. Las restantes pruebas bioquímicas ensayadas (véase tabla 4.1) dieron los mismos resultados para los dos parásitos.

El comportamiento de Daptobacter frente a diferentes aminoácidos y alcoholes han sido expuestos en la tabla 3.4 de Resultados.

d) Puesto que ambos géneros han podido ser ensayados en cultivos puros de laboratorio que han permitido determinar las diferentes etapas de sus ciclos infectivos, el aspecto más importante a resaltar en esta comparación son las diferentes etapas de dichos ciclos remarcando de forma especial sus semejanzas y diferencias.

La primera fase que se ha denominado "contacto primario" entre Daptobacter y Chromatium demuestra, como se señala en los Resultados, que Daptobacter colisiona físicamente al igual que Bdellovibrio con la superficie celular de la bacteria atacada. En ambos casos puede producirse el contacto de uno o más parásitos con la célula hospedadora. Este proceso ha sido especialmente estudiado en Bdellovibrio por Scherff et al., (1966). Esta fase durante sus primeros estadios tiene un carácter reversible pudiendo tanto Bdellovibrio como Daptobacter separarse y atacar otra célula.

Nada sabemos hasta el momento acerca del mecanismo por

el cual Daptobacter interacciona con la célula, pero de Bdellovibrio existen diferentes teorías sobre si dicho proceso se produce de forma aleatoria, o por un reconocimiento químico (quimiotaxis).

Algunos investigadores como Straley & Conti (1974) encontraron quimiotaxis positiva de Bdellovibrio hacia algunos extractos de levaduras, aminoácidos (La Marre et al., 1977) y una gran variedad de otros componentes (Straley et al., 1979). Otros experimentos han resultado contrarios, demostrando que en suspensiones de Bdellovibrio junto con Escherichia coli o Pseudomonas fluorescens, no se produce respuesta quimiotáctica. Debido a estas observaciones finalmente se ha supuesto que Bdellovibrio no localiza la célula mediante quimiotaxis (Straley & Conti, 1974).

e) Los estudios realizados no han permitido esclarecer aún la naturaleza del ataque en Bdellovibrio, mientras que en Daptobacter no ha sido todavía analizado. En el primero parece ser que no existen lugares específicos de recepción o sustancias receptoras como las normalmente encontradas en los bacteriófagos, aunque ha podido comprobarse mediante imágenes de microscopía electrónica que Bdellovibrio presiona en el centro de la protuberancia formada por la célula hospedadora en el lugar de reconocimiento con el parásito, hasta romper la pared bacteriana (Burnham et al., 1968) (Lapine et al., 1972). Cuando el ataque es irreversible la bacteria hospedadora pierde su movilidad y sufre drásticos cambios en su permeabilidad (Rittenberg & Shilo, 1970).

f) Daptobacter penetra en el interior del espacio citoplasmático de la célula hospedadora mediante rotura de la pared y membrana citoplasmática, mientras que Bdellovibrio se sitúa en el interior del espacio periplasmático del microorganismo.

mo hospedador mediante la formación de un poro de entrada a nivel de la pared celular de la célula invadida. El mecanismo de entrada de Bdellovibrio se cree que puede ser debido a dos mecanismos:

- 1) perforación mecánica de la pared celular.
- 2) digestión enzimática de la pared celular.

La primera hipótesis de mecanismo de penetración está apoyada por estudios como el realizado por Stolp (1967) que consistió en observaciones cinematográficas de alta velocidad que revelaron que durante el ataque el parásito rota por encima de 100rps/sg alrededor de su eje longitudinal.

Las observaciones efectuadas mediante microscopía de contraste de fases, apoyan un mecanismo similar en Daptobacter al propuesto para Bdellovibrio, apreciándose en el primero un movimiento giratorio alrededor de su eje longitudinal, después de haberse producido el contacto primario. Se desconoce la velocidad de giro, puesto que no se han podido utilizar los aparatos necesarios para realizar esta técnica.

Stolp (1973) sugirió en Bdellovibrio un proceso combinado de ambos mecanismos, en el que el comienzo de la perforación sería debido a una acción mecánica mientras que la formación del poro en la pared celular se produciría por la acción de diversos enzimas (acción enzimática regulada). Esta idea fue confirmada por Varan & Shilo, (1968).

Este mecanismo enzimático probablemente también lo posee Daptobacter. Los enzimas líticos podrían estar contenidos en unas estructuras poco electrodensas que se encuentran situadas en los polos de la bacteria depredadora, cuando está en su forma parásita. no encontrándose nunca ninguna estructura similar cuando se encuentra creciendo en cultivo axénico en medio NB.

El tiempo requerido por Daptobacter para penetrar en la célula hospedadora, no ha sido exactamente determinado, aunque s

puede afirmarse que el mínimo tiempo necesario es superior a los 5 minutos.

Estudios efectuados en Bdellovibrio por diferentes investigadores han permitido determinar el tiempo de penetración en las células que parasita, siendo este de 5 a 20 minutos (Stolp, 1967

g) Una vez realizada la penetración Daptobacter se divide en el interior del espacio citoplasmático (veanse las figuras 3.19 y 3.20). La división del parásito es binaria, produciéndose un máximo de dos células.

Por el contrario Bdellovibrio se sitúa en el interior de la célula hospedadora, en su espacio periplasmático (Burger et al., 1968) (Seidler & Starr, 1969) y se elonga polar y unidireccionalmente adoptando una forma espiral (tanto en su forma parásita como cuando crece en cultivos axénicos) (Patinkin, 1975).

Por otra parte Kessel & Shilo (1976) demostraron la existencia de una correlación entre el área de la célula hospedadora y la longitud de Bdellovibrio en crecimiento. El filamento una vez madurado se segmenta de forma asimétrica a nivel de la membrana plasmática (Burnham et al., 1970) en unidades con forma de vibrio presumiblemente por constricción.

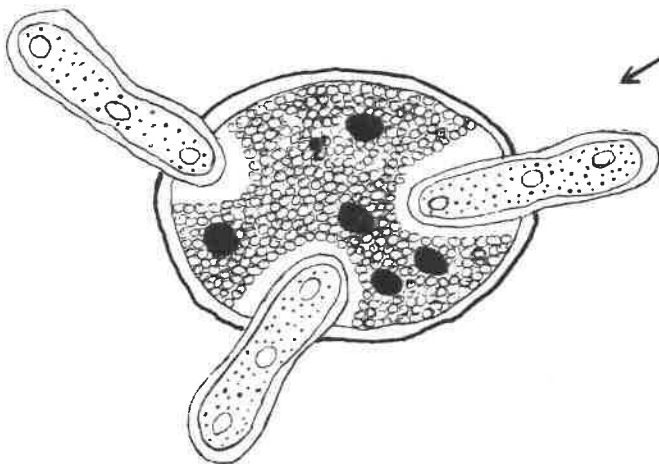
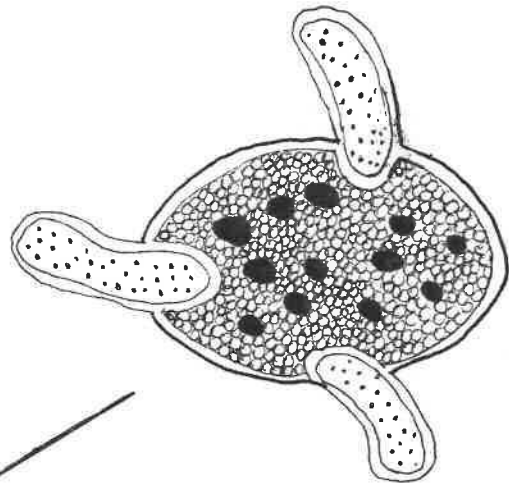
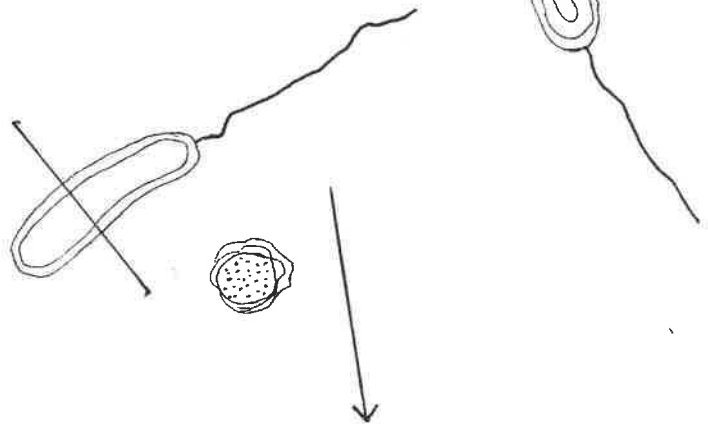
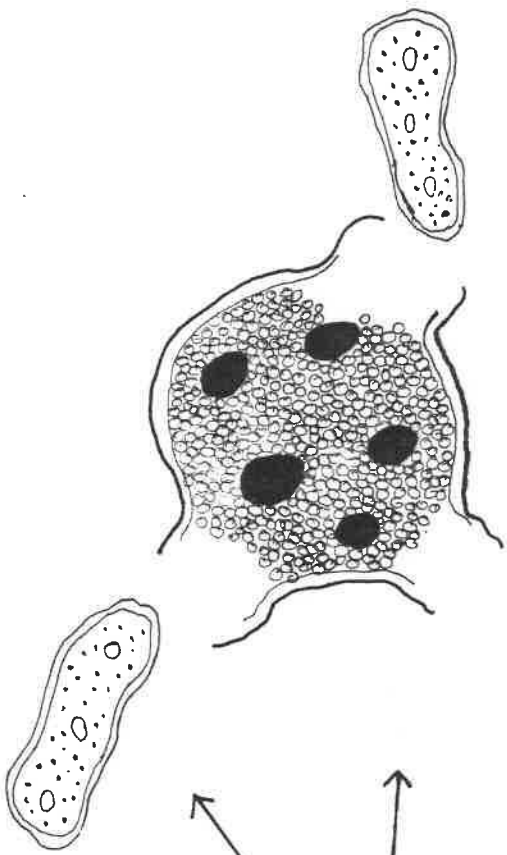
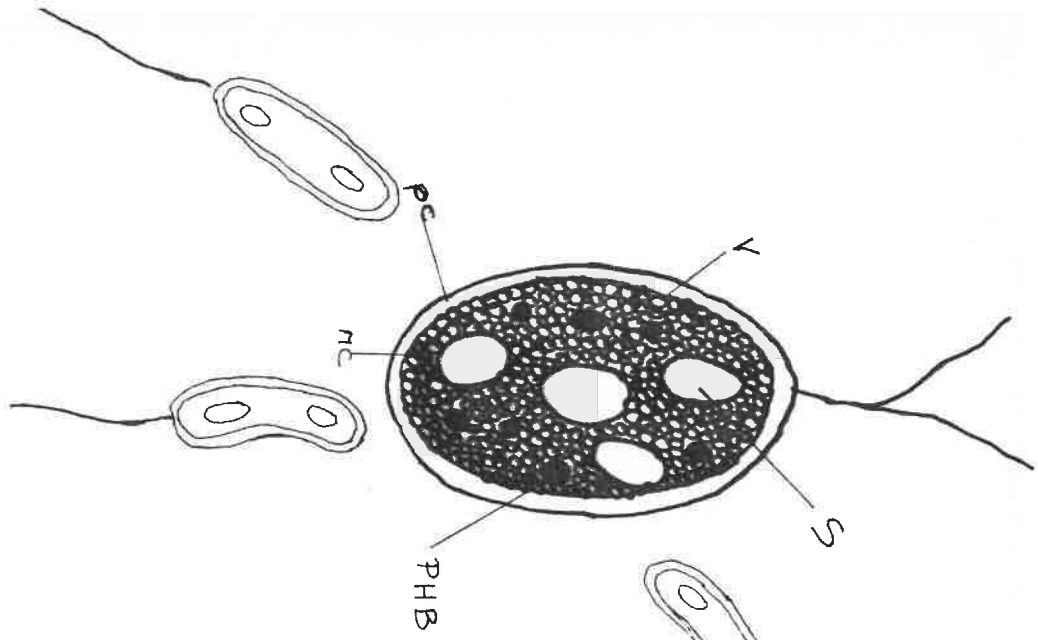
Los aspectos genéticos del proceso de división celular de Bdellovibrio fueron estudiados por Eksztejn & Varon, (1977).

h) Finalmente se produce en ambos procesos una desorganización progresiva y disolución de la célula hospedadora que permite la liberación de la descendencia. En Daptobacter el número de células hijas liberadas es de dos, mientras que en Bdellovibrio este número es variable (Scherff et al., 1966). En la figura 4.1 se presenta un modelo del ciclo infectivo de Daptobacter.

Fig. 4.1

Modelo del ciclo infectivo de Daptobacter.

A, células de Daptobacter rodeando células de Chromatium; B, Daptobacter penetrando en el interior del citoplasma de Chromatium; C, aparición de zonas líticas alrededor de las células depredadoras en fase de división; D, lisis de Chromatium y liberación de la descendencia.



Discusión sobre el papel ecológico que representan los microorganismos depredadores en ambientes naturales

Los estudios efectuados en Bdellovibrio sobre la incidencia de este microorganismo en hábitats naturales así como el papel selectivo que puede ejercer sobre poblaciones naturales, ha sido estudiado por diferentes autores (Torrella, 1976)(Torrella et al., 1978) (Varon & Shilo, 1980). En todas las referencias bibliográficas pueden extraerse las mismas conclusiones, la incidencia de esta bacteria depredadora en hábitats naturales es muy baja, usualmente no superior a las 200 cel./ml.

Tan solo los cultivos de enriquecimiento y el posterior aislamiento de estas cepas en cultivos axénicos de laboratorio han permitido la extensa información de que actualmente se dispone, sobre el comportamiento y actividad de Bdellovibrio.

El hecho de que masas de agua tan especiales como la laguna de Cisó o del lago Grande de Estanya (anteriormente descritos) reúnan las condiciones necesarias para el crecimiento de densas masas poblacionales de bacterias fototróficas, ha permitido el descubrimiento de nuevos microorganismos depredadores, que registran en la naturaleza números elevados (superiores a las 10^5 cel./ml)

Vamprococcus fue la primera bacteria depredadora observada, se trataba de un microorganismo ectoparásito que causaba lisis en los sedimentos celulares de Chromatium.

Los primeros ensayos de laboratorio demostraron que se trataba de un microorganismo probablemente oportunista ya que el máximo número de calvas líticas aparecían en las muestras que se mantenían en ausencia de luz durante un tiempo prolongado. Las células hospedadoras en este caso mostraban un aspecto fi

siológico alterado y eran más vulnerables al ataque del parásito (Esteve et al., 1983).

La hipótesis de laboratorio quedó confirmada con los recuentos efectuados en el lago Grande de Estanya expuestos en la tabla 3.5 en la que puede apreciarse un incremento notable en el número de células de Chromatium infectadas dependiendo de la profundidad.

Por debajo de la capa bacteriana (12-12.5m) el tanto por ciento de luz incidente decrece debido al propio sombreado biológico, ello comporta que las células de Chromatium que crecen por debajo de este nivel se encuentran en condiciones limitantes de luz y obteniendo energía por crecimiento endógeno (Van Gemerden, 1968). Paralelamente el número de células parásitas incrementa en estas condiciones alcanzando un máximo a 15m de profundidad con un 93% de células infectadas.

Los valores aproximados sobre la incidencia de microorganismos parásitos dan un número superior a 10^5 cel./ml, lo que supone un papel importante de estos microorganismos en la naturaleza.

En el caso de Daptobacter los escasos recuentos efectuados no permiten extraer conclusiones tan claras, aunque por los experimentos efectuados en el laboratorio parece ser evidente que en este caso no se trata de un microorganismo oportunista ya que los recuentos viables en doble capa de agar, de muestras de agua de la laguna de Cisó dieron el máximo de calvas líticas en las capas de agua donde Chromatium registraba también su máximo número de células, y disminuía en profundidad. Como trabajo posterior a esta memoria sería conveniente un estudio continuado de la incidencia del parásito a lo largo de su ciclo anual y a diferentes profundidades.

Tal vez la baja incidencia de Bdellovibrio con respecto a Vampirococcus o Daptobacter se deba al hecho en estos últimos, de encontrarse en capas de agua en las que las posibles células hospedadoras alcanzan números similares a los obtenidos en cultivos axénicos de laboratorio mientras, que las especies susceptibles de infección por Bdellovibrio tienen una incidencia muy inferior en hábitats naturales (Torrella et al., 1978).

Aspectos evolutivos del parasitismo

Los resultados que se tienen hoy en día de estudios realizados en distintos campos de la ciencia, sugieren que debido a la compleja organización de las células eucarionte, esta apareció posteriormente a la procarionte.

Para explicar como se produjo el paso entre los dos tipos de organización celular en los seres vivos, hay dos teorías: Una es la llamada teoría autógena propuesta por los investigadores canadienses Taylor (1976) y Dodson (1979) que estipula la aparición de la célula eucariota por la formación progresiva en el seno del citoplasma de compartimentos especializados.

La otra teoría denominada endosimbiótica pretende explicar el origen de la célula eucariota como un fenómeno dado por la integración de comunidades microbianas coevolucionadas (Maygalis, 1981). Esta teoría puede tener en Daptobacter una fuente de estudio interesante. La teoría endosimbiótica se basa en las observaciones de que tanto las mitocondrias como los plastos tienen a grosso modo unas dimensiones parecidas a las de bacterias (John, 1975) (Lewin & Whithers, 1975). Además estos orgánulos contienen DNA, RNA mensajero, ribosoma y RNA transferente por lo que pueden multiplicarse independie.

temente del núcleo y sintetizar al menos algunas de sus proteínas bajo el control de sus propios genes.

También se supone que después de revertir el parásito a simbiote existió una transferencia de genes del DNA de los antecesores de los plastos y mitocondrias al DNA de la bacteria hospedadora (Jean, 1972).

El principal problema para la aceptación de esta teoría radica en el hecho de que entre microorganismos procariotas no se conocen fenómenos de fagocitosis ni pinocitosis, mecanismos indispensables para explicar la localización interna de estos microorganismos.

Como solución alternativa a esta laguna del saber científico y basándose en el poder de penetración de Bdellovibrio (localizado en el espacio periplasmático de forma análoga a la de una mitocondria) y de la situación citoplasmática de Daptobacter (análoga a undulipodia) se podría establecer una comparación entre estas dos formas especiales de parasitismo y el origen de la célula eucariota por simbiosis.

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones extraídas a lo largo del presente trabajo son las siguientes:

- 5.1 Daptobacter es una nueva bacteria depredadora de otras bacterias capaz de (a) producir calvas líticas sobre los sedimentos celulares obtenidos espontáneamente de diferentes especies de Chromatiaceae, (b) de crecer facultativamente en presencia y ausencia de oxígeno y (c) de infectar a la célula hospedadora invadiendo el espacio citoplasmático y destruyendo su contenido.
- 5.2 El recuento inicial de Daptobacter a partir de muestras de agua del lago Grande de Estanya dió título insuficiente para su caracterización al microscopio electrónico. El principal objetivo para su estudio morfológico y ultraestructural ha sido el enriquecimiento del depredador, lo que se logra por pases sucesivos de filtros que contienen calvas líticas (técnica de la doble capa de agar) sobre cultivos axénicos de Chromatium minus.
- 5.3 Las primeras observaciones del efecto del depredador sobre Chromatium se efectuaron mediante la técnica de microcultivo. Los mejores resultados se obtuvieron con microcultivos practicados como pequeños pozos en placas de agar duro, en las que se inocularon simultáneamente células de Daptobacter y Chromatium, siendo posteriormente sellados.
- 5.4 Para la caracterización ultraestructural, el problema presentado por la difícil obtención mediante centrifugación de sedimentos bacterianos para el proceso de la inclusión se solucionó mediante una variación de la técnica, consistente en concentrar en un mismo punto un número alto de

células (extraídas de filtros) en agar fundido.

- 5.5 Daptobacter es una bacteria bacilar recta, Gram-negativa, de 0.5 μm de anchura y de 1.5 μm de longitud desprovista de capsula y con un flagelo polar. El citoplasma presenta inclusiones de glucógeno y unas especiales estructuras polares poco densas a los electrones de naturaleza desconocida.
- 5.6 Daptobacter es un microorganismo anaeróbico facultativo, oxidasa positivo y catalasa positivo, capaz de utilizar los nitratos, y los citratos como única fuente de carbono, y que también presenta una importante actividad proteolítica.
- 5.7 Daptobacter es capaz de realizar un metabolismo fermentativo sobre un amplio espectro de azúcares, alguno de ellos con una fuerte producción de gas. Así mismo puede utilizar diferentes aminoácidos y algunos alcoholes.
- 5.8 Daptobacter es una bacteria capaz de crecer en medio rico de forma independiente. Las colonias que presenta en medio NB son redondeadas con una pigmentación amarillenta central y borde translucido. Las células individuales poseen uno o varios flagelos polares y la ultraestructura celular difiere de las formas originarias de los habitats naturales, en la ausencia de las estructuras polares que aquellos presentan.
- 5.9 Daptobacter posee un movimiento rectilíneo que le permite colisionar físicamente con la célula presa, iniciando a continuación un movimiento rotatorio alrededor de su eje longitudinal; esta fase del ciclo es reversible. Cada célula presa puede ser atacada por más de una célula (normal-

mente entre 1 y 5) a la vez.

- 5.10 Una vez fijado el depredador sobre la pared celular de Chromatium, se produce la rotura de la pared y membrana citoplasmática de la célula atacada, produciéndose la incipiente penetración de Daptobacter en el citoplasma de la bacteria presa.
- 5.11 La etapa final del ciclo infectivo supone la degradación completa de la bacteria y la liberación de la descendencia de Daptobacter. En esta fase es posible observar células depredadoras que muestran envueltas celulares procedentes de la pared celular de la célula presa después de su degradación, y que no deben considerarse propias de Daptobacter.
- 5.12 Los recuentos de células viables (en doble capa de agar) de muestras de agua procedentes de la laguna de Cisó dieron el máximo número de calvas líticas en la capa de agua donde Chromatium registraba su máxima densidad celular (1×10^3 células de Daptobacter/ml) a 2 m de profundidad, siendo la concentración de Chromatium en esta capa de

6. BIBLIOGRAFIA

- ABELIOVICH, A. and KAPLAN, S. (1974) Bacteriophages of Rhodopseudomonas spheroides: Isolation and Characterization of a Rhodopseudomonas spheroides bacteriophage. *J. Virol.* 13: 1392
- ABRAM, D. and DAVIS, BK. (1970) Structural properties and features of parasitic Bdellovibrio bacteriovorus. *Jour. Bacteriol.* 104: 948-965
- ANDERSON, T.F. (1951) Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscopy. *Trans. N.Y. Acad. Sci.* 13: 130-135
- AVILA, A., BRUNEL, J.L., DOMINGO, A., FERNANDEZ, E., GODALL, V, LLOPART, J.M. (1984) Limnología del Lago Grande de Estanya (Huesca). *Oecología Aquatica* 7: 3-24
- BOSECKER, K., DREWS, G., and TANSCHER, H.D. (1972) Untersuchungen zur adsorption des Bacteriophagen RP1 an Rhodopseudomonas palustris 1e5. *Arch. Mikrobiol.* 87: 139
- BOWDEN, W.B. (1977) Comparison of two direct-count techniques for enumerating aquatic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 1229-1232
- BURGER, A., DREWS, G., and LADWING, R. (1968) Wirtsbereich und infektionscyclus eines neu isolierten Bdellovibrio bacteriovorus stammes. *Arch. Mikrobiol.* 61: 261-279
- BURNHAM, J.C., HOSHIMOTO, T. and CONTI, S.F. (1969) Electron microscopic observations of Bdellovibrio bacteriovorus into Gram-negative bacteriol. host. *Journal of Bacteriol.* 96: 1366-1381
- BURNHAM, J.C., HOSHIMOTO, T. and CONTI, S.F. (1970) Ultrastructure and cell division of a facultatively parasitic strain of Bdellovibrio bacteriovorus. *Journal of bacteriology* 101: 997-1004

- BURNHAM, J.C., STETAK, T. and LOCHER, G. (1976) Extracellular lysis of the blue-green alga Phormidium luridum by Bdellovibrio bacteriovorus. Journal of phycology 12: 306-313
- CALDWELL, D.E. & TIEDJE, J.M. (1975) A morphological study of anaerobic bacteria from the hypolimnia of two Michigan lakes. Can. J. Microbiol. 21: 362-376
- CODER, D.M. & STARR, M.P. (1978) Antagonistic association of the Chlorellavirus bacterium ("Bdellovibrio" chlorellavirus) with Chlorella vulgaris. Current Microbiology 1: 59-64
- DAWES, C.J. (1971) Biological techniques in electron microscopy. Barnes & Noble Internat. New York
- DODSON, E.O. (1979) Crossing the procaryote-eucaryote border: endosymbiosis or continuous development? Can. J. Microbiol. 25: 652-674
- EKSZTEJN, M. & VARON, M. (1977) Elongation and cell division in Bdellovibrio bacteriovorus. Archives of Microbiology 114: 175-181
- ESTEVE, I. (1981) Caracterización morfológica y ultraestructural de poblaciones de bacterias fotosintéticas planctónicas. Tesis doctoral
- ESTEVE, I., GUERRERO, R., MONTESINOS, E. y ABELLA, C. (1983) Electron microscope study of the interaction of epibiotic bacteria with Chromatium minus in natural habitats. Microbial ecology 9: 57-64
- ESTEVE, I. and GUERRERO, R. (1985) A new predatory microorganism attacking phototrophic bacteria. Letters to Nature. En prensa.
- FREUND-MÖLBERT, E., DREWS, G., BOSECKER, K. & SHUBEL, B. (1968) Morphologie und wirtskreis eines neu isolierten Rhodospseudomonas palustris Phagen. Arch. Mikrobiol. 64: 1

- GLAUERT, A.M. & GLAUERT, R.H. (1958) Araldita as an embedding medium for electron microscopy. *J. Biophys-Biochem. cytol* 4: 409-414
- GUERRERO, R. & ABELLA, C. (1978) Dinámica espacio temporal de las poblaciones fotosintéticas en una laguna anaeróbica de aguas sulfurosas.
- GUERRERO, R., MONTESINOS, E., ESTEVE, I. y ABELLA, C. (1980) Physiological adaptation and growth of purple and green sulfur bacteria in a meromictic lake (Vilá) as compared to a holomictic lake (Cisó). In M. Dokulil, H. Metz & P. Jewsan (eds) *Shallow lakes. Contribution to their limnology*.
- GUERRERO, R., PEDROS-ALIO, C., ESTEVE, I., MAS, J., MARGULIS, L. CHEASE, D. (1985) Predatory prokariots.
- GROMOV, B.V., MAINKAYEVA, K.A. (1972) Electron microscopic examination of Bdellovibrio chlorellavorus parasitism on cells of the green alga Chlorella vulgaris. *Tsitologiya* 14:256-260.
- GROMOV, B.V., MAMKAYEVA, K.A. (1980) Proposal of a new genus Vampirovibrio for chlorellavorus bacteria previously assigned to Bdellovibrio. *Mikrobiologiya* 49:165-167.
- HARRIS, R.H. & MITCHELL, R. (1973) The role of polymers in microbial aggregation. *Annual Review of Microbiology* 27: 27-50.
- HAYAT, M.A. (1975) Principles and techniques of scanning electron microscopy.
- JEAN, K.W. (1972) Development of cellular dependence in infective organism: microsengical studies in amoebes. *Science* 202:635-637.
- JOHN, P. & WHATLEY, F.R. (1975) *Paracoccus denitrificans* and the evolution of mitochondria. *Nature* 254:995-998.

- KERSEL, M. & SHILO, M. (1976) Relationship of Bdellovibrio elongation and fission to host cell size. Journal of bacteriology Oct 128:477-480
- LAMARRE, A.G., SHALEY, S.C. and CONTI, S.F. (1977) Chemotaxis towards aminoacids by Bdellovibrio bacteriovorus. Journal of bacteriology 131:201-207
- LEPINE, R.M., GUELIN, A., SISMAN, J. and LAMBLIN, D. (1967) Etude au microscope electronique de la lyse de Salmonella par Bdellovibrio bacteriovorus. Compt. Rend. 264: 2957-2960
- LEWIN, R.A., and WITHERS, N.W. (1975) Extraordinary pigment composition of a prokaryotic alga. Nature 256: 735-737
- LUFT, J.H. (1961) Permanganate- a new fixative for electron microscopy. J. Biophys. Biochem Cytol 2:799-803
- MARGULIS, L. (1981) Symbiosis in cell evolution. Life and its environment on the early earth. W.H. Freeman and Company. San Francisco (California)
- MONTESINOS, E., ESTEVE, I. and GUERRERO, R. (1983) Comparison Between Direct Methods for Determination of Microbial Cell Volume: Electron Microscopy and Electron Particle Sizing. Appl. Environ. Microbiol. 45(5): 1651-1658
- MURAL, R.J. and FRIEDMAN, D.I. (1974) Isolation and Characterization of a temperate bacteriophage specific for Rhodospirillum rubrum. J. Virol. 14:1288
- PATINKIN, D. (1975) Sizing of Bdellovibrio during growth. Journal of bacteriology 124: 564-566
- PARKER, C.A., and GROVE, P.L. (1970) Bdellovibrio bacteriovorus parasitizing Rhizobium in Western Australia. Journal of Applied Bacteriology 33: 233-235
- PFEFFERKORN, G.E., GRUTER, H., and PFAUTSCH, M. (1972) Observations on the prevention of specimen charging. In: Proc. 5th Ann. SEM Symp., p. 147. IITRI, Chicago
- RITTENBERG, S.C. & SHILO, M. (1970) Early host damage in the infection cycle of Bdellovibrio bacteriovorus. Journal of bacteriology 102: 149-160

- STOLP, H. (1961) Comunicación personal al Dr. Ricardo Guerrero.
- STOLP, H. (1967) Bdellovibrio bacteriovorus (Pseudomonadaceae) Parasitische befall und lysis von Spirillum serpens. Institut für den Wissen-Film E-1314. Göttingen: schafttichen film
- STOLP, H. (1973) The bdellovibriosis: bacterial parasites of bacteria. Annual Review Phytopatol. 11: 53-76
- STOLP, H. and PETZOLD, H. (1962) Untersuchungen über einen obligat parasitischen Mikroorganismus mit lytischer Aktivität für pseudomonas-bakterien. Phytopathology z 45: 364-390
- STOLP, H. & STARR, M.P. (1963) Bdellovibrio bacteriovorus gen et. sp. n., a predatory, ectoparasitic, and bacteriolytic microorganism. Ant. van Leeuwenhoek 29: 217-248
- STRALEY, S.C. and CONTI, S.F. (1974) Chemotaxis in Bdellovibrio bacteriovorus. Journal of Bacteriology 120(1): 594-551
- STRALEY, S.C., LAMARRE, G.A., LAWRENCE, J.L. and CONTI, S.F. (1979) Chemotaxis of Bdellovibrio bacteriovorus toward pure compounds Journal of Bacteriology 140: 634-642
- SULLIVAN, C.W. and CASIDA, L.E.(jr) (1963) Parasitism of Azotobacter and Rhizobium species by Bdellovibrio bacteriovorus. Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology 34: 188-19
- TAYLOR, F.J.R. (1976) Antigenic theories for the origin of eukaryotes. Taxon 25: 377-390
- TORRELLA, F. (1976) Estudio ecológico de las bacteria del grupo Bdellovibrio y de los bacteriófagos en las aguas dulces. Caracterización morfológica, bioquímica y genética de Bdellovibrio s. Tesis doctoral.
- TORRELLA, F., GUERRERO, R. and SEIDLER, R.J. (1978) Further taxonomic characterization of the genus Bdellovibrio. Canadian journal Microbiology 24: 1387-1394
- VAN GEMERDEN, H. (1968) On the ATP generation by Chromatium in darkness. Arch. Mikrobiol. 64: 118-124
- VAN GEMERDEN, H. and BEEFTINK, H. (1982) Ecology of phototrophic bacteria (Appendix: cultivation methods). En: Ormerod J.G. (dir.) The phototrophic Bacteria. Anaerobic life in the light. Studies in Microbiology Vol-4. Blackwell Scientific Publications: 179-185

- VARON, M. and SHILO, M. (1968) Interaction of Bdellovibrio bacteriovorus and host bacteria. I kinetic studies of attachment and invasion of E. coli B by Bdellovibrio bacteriovorus. Journal of Bacteriology 95: 744-753
- VARON, M. and SHILO, M. (1980). Ecology of aquatic bdellovibrios. Adv. Aquat. Microbiol. 2: 1-48
- VENOSA, A.D. (1975) Lysis of sphaerotilus natans swarn cells by Bdellovibrio bacteriovorus. Applied Microbiology 29: 702-705
- WATSON, S.W., NOVITSKY, T.J., QUIRBY, H.L. and VALOIS, F.W. (1977) Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. Appl. Environ. Microbiol. 105: 207-216
- ZIMMERMANN, R. and MEYER-REIL (1974) A new method for fluorescence staining of bacterial populations an membrane filters. Kiel. Meeresforsch 30: 24-27