

RIQUEZA DE ESPECIES DE AMEBAS DESNUDAS Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS ENDOSIMBIOTES EN UN SUELO DESNUDO CONSERVADO DE ZAPOTITLÁN DE LAS SALINAS, PUEBLA

JOSÉ MAURICIO MARIANO HERRERA CUADRA

ASESOR: DR. SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA

Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. Tlalnepantla, Estado de México. C.P. 54090, México

Entrega de Reporte Preliminar: Abril 4, 2001

RESUMEN. Las amebas de vida libre (AVL) habitan una amplia gama de ambientes. Los géneros de amebas desnudas que más se reportan en los estudios sobre protozoarios del suelo son: *Naegleria*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia* y *Acanthamoeba*. Las AVL son capaces de establecer relaciones simbióticas con otros microorganismos. El caso más común y estudiado es el de *Legionella*, aunque se han identificado otras especies de bacterias endosimbiontes de AVL, tales como: *Pseudomonas*, *Chlamydia*, y *Rickettsia*. En este estudio, se propuso determinar la riqueza de especies de amebas desnudas presentes en un suelo desnudo conservado de la cuenca baja del Río Salado de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Al mismo tiempo, se propuso determinar la presencia de bacterias endosimbiontes de AVL, para describir el tipo de endosimbiosis que presentan, determinar su especie por métodos de cultivo, morfológicos, bioquímicos y moleculares. Por último, se propuso intentar determinar las posibles causas de la endosimbiosis en los suelos desnudos conservados de los ambientes semiáridos y su importancia ecológica. Hasta el momento, se han identificado varias especies de *Acanthamoeba* y una especie de *Echinamoeba*. Además, se han detectado 2 diferentes tipos de bacterias endosimbiontes, ambas con morfología colonial semejante a la de *Legionella* sp., pero con coloración ligeramente diferente entre ellas. También se detectó la presencia de DNA plasmídico en ambas cepas de bacterias, lo que sugiere la evaluación de fenotipos relacionados con la endosimbiosis bacteriana a las amebas.

PALABRAS CLAVE: Amebas de vida libre o AVL, endosimbiosis, *Legionella*, ambientes semiáridos..

INTRODUCCIÓN

El suelo es un sistema altamente dinámico, en donde se lleva a cabo la actividad biológica y el ciclamiento de los nutrientes, manteniendo a los ecosistemas terrestres. Aun en el suelo seco de los desiertos, donde el agua no está disponible, la humedad relativa de la atmósfera del suelo es más alta que la del aire circundante, haciendo posible la sobrevivencia de esporas, quistes, y otras estructuras de resistencia por largos periodos de tiempo (1).

Las amebas de vida libre (AVL) habitan en una amplia gama de ambientes muy diversos, sin embargo su estudio es complejo, debido a su tamaño y la escala de los ecosistemas. Las AVL están distribuidas mundialmente, pero la composición de especies específicas de un sitio particular depende grandemente del entorno en el que éstas se encuentran, cómo arribaron, en qué estado fisiológico ingresaron, las condiciones físicas y químicas del terreno y, como depredadores, la calidad del alimento del terreno (1).

El esparcimiento de cualquier especie depende de su capacidad para sobrevivir bajo condiciones adversas. Las AVL han desarrollado dos estrategias principales: la primera es formando quistes y la segunda es produciendo pequeños y más numerosos organismos para la búsqueda de alimento. Lo último puede observarse en especies que no forman quistes, tales como algunas amebas de los géneros *Mayorella* y *Amoeba*, y permite a las especies el tomar ventaja del acumulamiento temporal de alimento en ambientes de mosaico. Sin embargo, estos organismos pueden perecer en un tiempo relativamente corto si no encuentran alimento. Las AVL formadoras de quistes pueden sobrevivir mayores periodos de escasez de alimento, sin embargo, no pueden tomar ventaja de los ambientes de mosaico hasta que la cantidad de alimento sea suficiente para activar los procesos de exquistamiento (1).

Se ha pensado que las amebas desnudas (*Gymnameoba*) juegan un rol menor, basándose en su cantidad en el suelo, la cual raramente sobrepasa de 2×10^5 amebas por metro cuadrado. Aunque tal vez representen hasta el 50% del número total de protozoarios en ambientes edáficos. El alto número de AVL en los sistemas terrestres, comparados con los acuáticos, puede ser explicado por algunas características amebianas, tales como su movimiento flexible en superficies particuladas, lo que les permite alimentarse de colonias bacterianas que crecen en los agregados del suelo. También, la carencia de estructuras rígidas les permite moverse y alimentarse en las pequeñas películas que rodean a los agregados del suelo, aun en los poros del suelo de $2 \mu\text{m}$ donde la mayoría de los flagelados y ciliados no buscan presa debido a su rigidez celular. Estas características hacen a las AVL los más importantes depredadores de bacterias en el suelo (1).

Los estudios microbiológicos del suelo han dedicado poca o ninguna atención a las amebas desnudas, a las interacciones entre ellas y con los hongos, bacterias y algas. Aun cuando las AVL no son los únicos depredadores en los suelos, estas han sido reconocidas como los controladores principales del crecimiento poblacional bacteriano, debido a su rápida respuesta a los incrementos bacterianos. Como un grupo, las AVL pueden alimentarse de bacterias, hongos, algas y otros protozoarios, incluyendo a otras amebas. Sin embargo, los estudios sobre amebas desnudas están mayormente enfocados al consumo de bacterias. Se ha reportado que las bacterias no pigmentadas pueden apoyar el crecimiento de las amebas, mientras algunas especies son utilizadas únicamente en casos de emergencia y las bacterias pigmentadas son usualmente inconsumibles, debido a la presencia de compuestos tóxicos para las amebas (2).

Los géneros de amebas desnudas que más se reportan en los estudios sobre protozoarios del suelo son: *Naegleria*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia* y *Acanthamoeba*. Esto puede explicarse por la falta de énfasis en las AVL durante la primer mitad del siglo XX, y por el incremento de interés en las amebas patógenas para el ser humano, después del descubrimiento de la meningoencefalitis amebiana primaria. Su importancia ecológica puede haber sido menospreciada debido a la carencia de información sobre su diversidad, abundancia y preferencia de presas (2).

Las amebas están descritas como un grupo de organismos que ingieren células completas (principalmente bacterias) como su sustrato principal. Dependen de compuestos específicos presentes en sus especies presa como factores de crecimiento y requieren una dieta balanceada de aminoácidos y otras sustancias importantes. Sus sistemas de transporte y permeabilidad están bien desarrollados para sobrevivir en ambientes con fuentes reducidas de carbono y nitrógeno; usualmente tienen dietas muy flexibles (1).

Las AVL son capaces de establecer relaciones simbióticas con otros microorganismos. Se han observado bacterias, bacteroides, virus, viriones, y mixoplasmas dentro del citoplasma amebiano, pero su estudio ha sido escaso y limitado. Estas relaciones pueden llevar a la ameba a la muerte debido a la proliferación de microorganismos en su interior, o a tener una mejor oportunidad de sobrevivir. En algunas ocasiones, los endosimbiontes ocasionan que las amebas crezcan mejor en cultivos axénicos, cuando ha sido imposible cultivarlos libres de las amebas. Por ejemplo, *Acanthamoeba castellanii* puede dar abrigo a la bacteria *Legionella pneumophila*, que es causante de la "enfermedad de los Legionarios" y de la menos severa fiebre de Pontiac. La *Legionella* en realidad habita dentro de la ameba sin ser digerida (1). *L. pneumophila* llega a reproducirse en el interior de las amebas, pero se vuelve no cultivable cuando se aísla de la célula hospedera y se cultiva en el laboratorio (3); esto debido a que las amebas le proporcionan un ambiente más favorable que el de los medios de cultivo convencionales. Sin

embargo, esta puede ser reactivada al ser introducida nuevamente en *A. castellanii* (4). Puede ser que la ameba provea factores de crecimiento para que *Legionella* sobreviva; la bacteria puede crecer a bajo pH dentro del citoplasma y vacuolas digestivas del protozoario (1).

Se cree que la mayoría de los protozoarios sirven como células hospederas para la replicación intracelular de ciertas especies de *Legionella* (5). En los últimos años se ha incrementado el número de estudios *in vitro*, que documentan la ecología y patogenicidad por multiplicación intracelular de algunas especies de *Legionella* en AVL (6), tales como *Acanthamoeba* sp., *Naegleria* sp. y *Hartmannella* sp. (5, 7, 8, 9); además de otros protozoarios, tales como *Tetrahymena* sp. (10). Cabe destacar que a *L. pneumophila* se le ha considerado como patógena, no solo para las células humanas sino también para las amebas, debido a que estas se lisan como resultado de la replicación intracelular de la bacteria (5), una vez que ésta logra atravesar la membrana de las vacuolas digestivas y ha penetrado en el citoplasma de la ameba. También se ha estudiado la transmisibilidad de algunos endosimbiontes bacterianos entre clones de especies de *Acanthamoeba* (11). En algunas especies de *Legionella*, se ha llevado a cabo la multiplicación extracelular en agar amortiguado de carbón y extracto de levadura (agar BCYE); pero sin éxito en una variedad de medios de cultivo convencionales (5). La mayoría de las especies de *Legionella* estudiadas han sido aisladas del suelo, agua, sistemas de aire acondicionado y enfriamiento, regaderas y pacientes con neumonía (3).

En 1993, se reportaron algunas especies no descritas de *Legionella* que también son patógenas para las amebas de vida libre (5). Originalmente en 1991, se les dio el nombre de *Sarcobium lyticum* (3, 5), y posteriormente se describió este grupo como *Legionella*-Like Amoebal Pathogens (LLAP), debido a su capacidad de multiplicarse en el citoplasma de las amebas y su dificultad para ser cultivadas en medios diseñados para el crecimiento de *Legionella* sp.. Recientes análisis filogenéticos de la subunidad 16S del rRNA, sugirieron que estas bacterias pertenecen a la familia *Legionellaceae*, y que tal vez representen 5 nuevas especies del género *Legionella*. Recientemente, se propuso transferir a estas bacterias al género *Legionella* como *Legionella lytica* (5).

Cabe aclarar que se han identificado otras especies de bacterias endosimbiontes de AVL, tales como: *Pseudomonas*, *Chlamydia*, y *Rickettsia* (12, 13); aunque el caso más común y estudiado es el de *Legionella*.

JUSTIFICACIÓN

Las AVL se han estudiado principalmente debido a que en algunas ocasiones causan enfermedades humanas fatales. Desafortunadamente, la importancia ecológica de las AVL no ha sido estudiada adecuadamente. Los primeros estudios sobre su presencia demostraron que son organismos cosmopolitas, pero no se sabe realmente si las especies patógenas son capaces de desarrollarse en cualquier lugar en el ambiente, ni sus tamaños poblacionales en la naturaleza. La presencia de las AVL en la mayoría de los ambientes nos permite establecer su importancia ecológica como reguladores naturales del crecimiento poblacional bacteriano. Se necesitan estudios para determinar la selectividad de las presas, el valor nutricional de las presas, y las relaciones depredador-presa dentro del sistema edáfico. La preferencia por ciertas presas y su valor nutricional puede ayudarnos a entender como están ensambladas las comunidades de AVL en el ambiente.

La alta frecuencia de endosimbiosis bacteriana con las AVL (sobre todo por especies de *Legionella*) es de gran importancia, debido a que las amebas han actuado como un incubador evolucionario para la emergencia de patógenos de macrófagos alveolares. El hecho de que las bacterias endosimbiontes puedan lisar amebas y que exista la posibilidad de transmisión de estos entre diferentes especies de AVL, significa que estas bacterias también controlan en cierto modo la estructura de las comunidades de amebas en el ambiente.

OBJETIVOS

Objetivo General.

Determinar la riqueza de especies de amebas desnudas presentes en un suelo desnudo conservado de la cuenca baja del Río Salado de Zapotitlán de las Salinas, Puebla.

Objetivos Particulares.

- Determinar la presencia de bacterias endosimbiontes en las especies de amebas desnudas de un suelo desnudo conservado y describir el tipo de endosimbiosis que presentan ambos organismos.
- Caracterizar a las bacterias endosimbiontes por métodos de cultivo, morfológicos, bioquímicos y moleculares, para poder determinar su especie.
- Determinar las causas de la endosimbiosis en los suelos desnudos conservados de los ambientes semiáridos y su importancia ecológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del área de estudio.

La provincia florística del Valle de Tehuacán-Cuicatlán pertenece a la región xerofítica mexicana y se localiza en la parte sureste del estado de Puebla y noroeste de Oaxaca, entre los 17°39' y 18°53' de latitud norte y los 96°55' y 97°44' de longitud oeste, con una superficie aproximada de 10,000 km². Incluye varios valles, entre los que destacan Coxcatlán, Cuicatlán, Tehuacán, Tepelmeme y Zapotitlán, así como algunas barrancas y cañones como Morelos, Tomellín, Río Hondo, Río Grande y Río Salado, separados por numerosas serranías. Los principales límites orográficos del Valle son: al este y noreste la Sierra Madre oriental, llamada localmente Sierra de Zongolica, al norte la serranía de Tecamachalco y al sur la Sierra Juárez. En la región existe un clima semiárido, con temperatura alta y régimen de lluvias de verano. Las condiciones de aridez existentes se deben al efecto de sombra orográfica que produce la Sierra Madre oriental (Sierras de Juárez y Zongolica) y a la desecación paulatina de los mantos freáticos, principalmente en el Valle de Zapotitlán. Geológicamente, el Valle presenta afloramientos de diferentes edades y orígenes, por lo que la región es un mosaico heterogéneo de diferentes litologías que forman parte de la provincia geológica de Tlaxiaco. La zona centro-norte de Tehuacán presenta afloramientos del Cretácico Medio y la región centro-sureste de la zona, que comprende desde Tehuacán hasta la zona de Teotitlán del Camino, presenta afloramientos del Precámbrico, así como del Jurásico Inferior Marino. La franja comprendida por la Sierra de Juárez, que se encuentra al sur del valle de Tehuacán-Cuicatlán hasta Quiotepec, presenta afloramientos de rocas metamórficas del Paleozoico; en las partes más bajas afloran sedimentos del Terciario continental y del Cuaternario (14).

Muestreo del suelo desnudo conservado (SDC) y análisis fisicoquímicos.

El suelo fue colectado durante el trabajo de tesis de Licenciatura de Claudia Katia Reyes Quintanar en el mes de Abril de 1999. Se muestrearon al azar varios puntos de suelo desnudo en una zona no erosionada ubicada al sureste del Jardín Botánico de Zapotitlán de las Salinas, a una profundidad de 30 cm aproximadamente. Se mezclaron las muestras con el fin de que fueran representativas de la zona y que los resultados del análisis microbiológico dieran una visión general de la microbiota. El análisis fisicoquímico del suelo se realizó en el Laboratorio de Fertilidad de Suelos, del Colegio de Postgraduados-IRENAT, con los métodos normalizados (14).

Aislamiento inicial de las AVL.

Se elaboró extracto de suelo (ES) (se mezclan 100 g de SDC en 1 litro de agua destilada, se calienta en baño maría por 2 horas a 70°C, después se filtra con papel periódico y se esteriliza por autoclave) para igualar las condiciones fisiológicas del suelo y poner a disposición de los microorganismos de la muestra todos los compuestos solubles en agua. Se colocó 1 g de SDC en 10 ml de ES, se agitó en vortex y se dejó reposar por 1 hora, después se depositó el sobrenadante en una caja petri con agar no nutritivo (15)

g de agar/litro de H₂O). Se inclinó la caja y se dejó reposar por 2 horas y después se le recogió el exceso de agua con una pipeta Pasteur. Se incubó por 3 días a temperatura ambiente, y se hicieron observaciones con ayuda de un microscopio invertido (Olympus CK2) a $\times 100$ y $\times 200$ aumentos, para determinar la presencia de amebas.

Separación de las especies de amebas.

Utilizando un capilar afilado con ayuda de un mechero, se recogió un solo quiste (seleccionándolo por su morfología) y se traspasó a una caja petri con agar ES (15 g de agar/litro de ES). De este modo se clonaron las cepas y se pudieron separar por género o especie las amebas. Los cultivos fueron resembrados en nuevas cajas aproximadamente cada 2 semanas, seleccionando rectángulos de agar con gran concentración de trofozoitos y/o quistes, para así mantenerlos en óptimas condiciones.

Observación microscópica de las amebas.

Con ayuda del microscopio invertido, se buscaron en las cajas zonas con gran afluencia de amebas, las cuales fueron marcadas con un plumón. Se prepararon varios portaobjetos con suspensiones de amebas, colocando 3 gotas de ES en el área marcada de cada caja y con ayuda de un asa de siembra se frotaba el agar, procurando separar las amebas del mismo; al final, con ayuda de la misma asa, se traspasaba la suspensión de amebas a los portaobjetos y se colocaba un cubreobjetos. Se dejaron reposar las muestras por 3 minutos, para que las amebas se adhirieran al portaobjetos y se almacenaron en una cámara húmeda hasta su revisión. Las laminas se revisaron en un microscopio de contraste de fase (Nikon Labophot-2 AFX-DX con una cámara Nikon FX-35 DX) a $\times 100$, $\times 400$ y $\times 1000$ aumentos, para la determinar la especie y la presencia de bacterias libres en el citoplasma de las amebas. Asimismo se tomaron fotografías y video de las muestras.

Aislamiento de las bacterias endosimbiontes.

Se prepararon cajas petri con agar amortiguado de carbón y extracto de levadura (agar BCYE) a un pH de 6.9 ± 0.05 siguiendo la fórmula de Gerhardt *et al.* (15), omitiendo la adición de L-cisteína y Pirofosfato Férrico ($\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$), y sustituyendo el buffer ACES (ácido N-2-acetamido-2-aminoetanosulfónico) por buffer de Fosfatos de Sodio (Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4) a una concentración de 0.055 M (16). De las cepas en las que se detectaron bacterias libres en el citoplasma de las amebas, se selecciono un área de la caja con gran afluencia de amebas y bacterias, y con ayuda de un asa de siembra se recogió un pequeño inóculo, para resembrarlo en cajas con agar BCYE y otras con agar ES. Se incubaron las cajas a 37°C, y se espero a que hubiera crecimiento de bacterias por un periodo de 3 a 7 días. A los 4 días se revisaron estas cajas, y se detectó la presencia de colonias de bacterias de 2 diferentes tipos, ambos con morfología colonial semejante a la de *Legionella* sp., pero con coloración ligeramente diferente entre ellas. Estas bacterias se etiquetaron como B1 y B2. Se les aplicaron diversas pruebas para evaluar la posibilidad de que sean *Legionella* sp. y además se realizó un Miniprep para la detección de DNA plasmídico en cada una de las cepas.

Tinción de Gram y evaluación del tamaño.

Con ayuda de un asa de siembra, se tomó por separado un pequeño inóculo de cada una de las muestras de bacterias, se suspendió cada una en diferentes portaobjetos, a los cuales se les añadieron previamente unas gotas de fijador de alcohol-formol (17), se secaron las muestras con ayuda de un mechero. Se procedió a la tinción de Gram, extendiendo el tiempo de reacción con safranina a 2 minutos (18). Se revisaron las muestras teñidas en campo claro en un microscopio de contraste de fase (Nikon Alphaphot-2 YS2), a $\times 100$, $\times 400$ y $\times 1000$ aumentos. Estas observaciones también se utilizaron para medir el tamaño aproximado de las bacterias de las muestras.

Evaluación de la morfología colonial y autofluorescencia.

Se revisaron las cajas de B1 y B2, con ayuda de un microscopio de disección (Carl-Zeiss 475002), a $\times 16$ y $\times 40$ aumentos, iluminando por un lado con una lámpara a un ángulo de 10° aproximadamente (19), para poder analizar la morfología colonial y así detectar la apariencia interior a vidrio esmerilado (18).

También se colocaron las cajas sobre un transiluminador de luz UV (UVP TM-20), para detectar la autofluorescencia característica de algunas especies de *Legionella*.

Evaluación de la resistencia a antibióticos.

Con ayuda de un isopo estéril, se sembraron por separado y en masivo las bacterias B1 y B2 en cajas con agar BCYE, y se colocaron sensidiscos para bacterias gramnegativas. A los 5 días se revisaron los antibiogramas y se registraron los resultados.

Extracción de DNA plasmídico.

Se decidió determinar la presencia de plásmidos en ambas cepas de bacterias, como dato preliminar para evaluar fenotipos relacionados con la endosimbiosis bacteriana a las amebas. Para extraer el DNA plasmídico de B1 y B2 se utilizó el Miniprep Wizard Plus SV (Promega Corporation, Madison, WI, E.U.A.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después se corrió el DNA en un gel de agarosa a 100 V y 94 mA por 2 horas, colocando duplicados de cada muestra a diferentes temperaturas (carril 1: B1 a 65°C; carril 2: B1 a temperatura ambiente; carril 3: marcador λ Hind III; carril 4: B2 a temperatura ambiente; carril 5: B2 a 65°C) para descartar la presencia de estructuras secundarias en el DNA plasmídico en caso de detectarse. Se tomó foto del gel y se almaceno el resto de la muestra a 4°C.

RESULTADOS

Características físicoquímicas del SDC.

Los resultados del análisis físicoquímico del suelo son reproducidos del trabajo de tesis de Licenciatura de Claudia Katia Reyes Quintanar (14) y se presentan a continuación en la Tabla 1:

Tabla 1. Resultados del análisis físicoquímico del SDC.

pH 1:2 H ₂ O	CE 1:5 H ₂ O (dS/m)	Materia Orgánica (%) Walkley-Black	N* (%)	P Olsen mg/kg	K NH ₄ Oac1 N pH 7 meq/100g	Ca NH ₄ Oac1 N pH 7 meq/100g	Textura			Clasificación Texturial
							Arena ←	Arcilla (%)	Limo →	
8.8	1.15	4.8	0.24	9	0.4	25.0	13	36	51	Arcilla

* Estimado.

Determinación de las especies de AVL.

Se determinó la especie de algunas de las cepas clonadas utilizando la clave de Page (20). Se identificó una especie de *Echinamoeba* y varias diferentes de *Acanthamoeba*, de las cuales se observaron dos cepas que poseen bacterias endosimbiontes (las cuales se mueven con gran rapidez a través de todo el citoplasma, no dentro de vacuolas digestivas), una es de *Acanthamoeba culbertsoni* y la otra no ha sido determinada su especie.

Descripción de las bacterias endosimbiontes aisladas de las cepas de *Acanthamoeba*.

Las bacterias etiquetadas como B1 y B2 lograron crecer en las cajas con agar BCYE, mientras que en las cajas con agar ES no hubo crecimiento. Ambas cepas resultaron ser gramnegativas, y poseen un tamaño promedio de 0.3 a 0.9 μ m de ancho y de 2 a 5 μ m de largo, además de que presentan forma de cocobacilos cortos. En cuanto a la morfología colonial en el medio de cultivo, no se detectó la apariencia interna a vidrio esmerilado, sino que esta resultó ser bastante uniforme y brillante. Las colonias no presentaron autofluorescencia al ser expuestas a la luz UV. En cuanto a la resistencia a antibióticos, los resultados se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2. Inhibición del crecimiento de las bacterias endosimbiontes por antibióticos.

Antibiótico	B1	B2
Cefalotina (30 mg)	-	-
Trimetoprim-Sulfametoxazol (25 mg)	-	+ (16 mm)
Cefotaxima (30 mg)	-	-
Ampicilina (10 mg)	-	+ (16 mm)
Nitrofurantoina (300 mg)	+ (12 mm)	-
Carbenicilina (100 mg)	-	-
Amikacina (30 mg)	+ (7 mm)	+ (9 mm)
Gentamicina (10 mg)	+ (5 mm)	-
Cloranfenicol (30 mg)	+ (4 mm)	+ (4 mm)
Ácido Nalidíxico (30 mg)	-	-
Estreptomicina (10 mg)	-	-
Tetraciclina (30 mg)	+ (2 mm)	-

Detección de DNA plasmídico en las bacterias endosimbiontes.

Tanto en el carril 1 como en el carril 2 (B1 a 65°C y B1 a temperatura ambiente; respectivamente) se detectaron dos bandas de diferente peso molecular a las mismas distancias de migración entre carriles. En el carril 4 (B2 a temperatura ambiente) se observó una sola banda a la misma distancia que la banda de peso molecular mas bajo de los carriles 1 y 2. En el carril 5 (B2 a 65°C) se observaron nuevamente dos bandas de diferente peso molecular similares a las de los carriles 1 y 2 (Ver Foto 1).

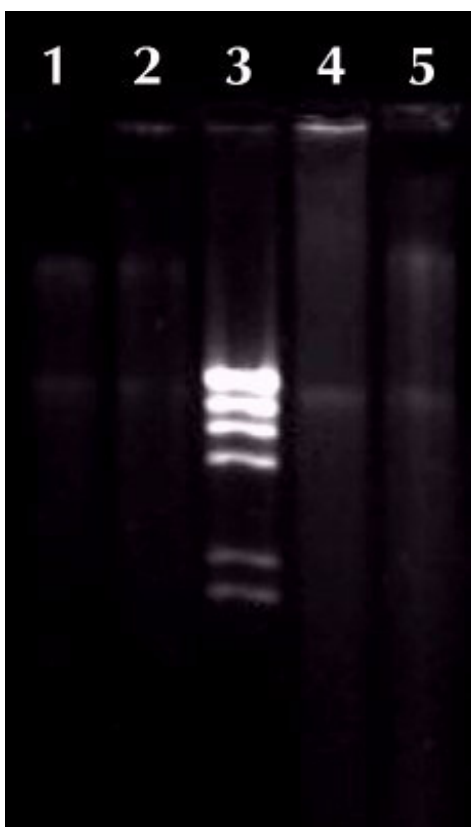


Foto 1. Patrón electroforético del DNA plasmídico extraído de las bacterias endosimbiontes B1 y B2. Carril 1: B1 a 65°C; carril 2: B1 a temperatura ambiente; carril 3: marcador λ Hind III; carril 4: B2 a temperatura ambiente; carril 5: B2 a 65°C.

DISCUSIÓN

El contenido de arcilla en el SDC beneficia el desarrollo de microorganismos del suelo debido a su capacidad de retención de agua, pero puede inmovilizar importantes cantidades de fósforo (P) (21). Una de las funciones más importantes de los microorganismos es transformar estos nutrientes a formas disponibles para su absorción. Esto indica que en este suelo hay mayor disponibilidad de nutrientes, en consecuencia a la cantidad de microorganismos. Conforme el contenido de arcillas aumenta, la capacidad de infiltración disminuye, esto favorece la pérdida del suelo por arrastre, especialmente en condiciones de lluvia muy intensa (21), aunque este proceso también ocurre cuando el suelo cuenta con escasa vegetación (22). Los residuos orgánicos en la superficie del suelo reducen el impacto de las gotas de lluvia y favorecen la infiltración lenta del agua. La escorrentía y la erosión se reducen, habiendo mayor cantidad de agua aprovechable para el mejor desarrollo de los microorganismos en general. La cantidad de materia orgánica se debe a la actividad de la microflora y microfauna del suelo. Entre la microfauna del suelo se encuentran los protozoarios, estos contribuyen a mantener mayor mineralización de la materia orgánica, a través de la depredación de bacterias (1).

En cuanto a las especies de AVL, los miembros del género *Acanthamoeba* constituyen una alta proporción de la riqueza de especies, tanto en ambientes perturbados como no perturbados (2). Cabe destacar la presencia de *Acanthamoeba culbertsoni*, no solo por su importancia médica (ya que es una especie patógena para el ser humano), sino para los objetivos de este estudio puesto que es portadora de una de las cepas de bacterias endosimbiontes. Se requiere una mayor revisión de las demás cepas de *Acanthamoeba* y la de *Echinamoeba*, tanto para determinar sus especies como para evaluar la presencia de bacterias endosimbiontes.

La identificación de bacterias endosimbiontes de amebas de vida libre se puede describir como: la presencia de gran cantidad de bacterias de alta movilidad en el citoplasma, las cuales se mueven independientemente de las corrientes citoplasmáticas normales, producen un redondeamiento de los trofozoitos, además de la pérdida de la infraestructura celular, y al momento de producir la lisis, pueden sobrevivir en el resto del citoplasma, aguardando el paso de una nueva ameba que infectar.

Se ha dicho que la replicación intracelular de las especies de *Legionella* no depende de un solo género de amebas, ya que estas bacterias se pueden adaptar a las especies autóctonas de amebas (23). El hecho de que estas bacterias no sean dependientes de L-cisteína lo podemos interpretar así: la dependencia de *Legionella* sp. a los aminoácidos para cumplir con sus requerimientos de carbono y nitrógeno, sugiere que otros microorganismos proveen los nutrientes esenciales para su crecimiento en ambientes acuáticos (9). Se ha comprobado que *Flavobacterium breve* y otras bacterias heterotróficas promueven el crecimiento de *Legionella* sp. en medios deficientes de L-cisteína (9). En cuanto a este estudio podemos decir, que si tomamos en cuenta que estas bacterias fueron aisladas de un cultivo de amebas en agar ES, estas amebas pudieron proveer de los nutrientes necesarios para su crecimiento, mientras que ambos organismos se adaptaban al cultivo *in vitro* con agar ES. Probablemente sea por esto que las bacterias aisladas solo crecieron en agar BCYE y no en agar ES. Además, en este estudio no se obtuvo un cultivo inicialmente puro, ya que al ser un aislamiento del ambiente, se presentaron numerosos microorganismos de otros grupos, tales como hongos, micobacterias y bacterias de otras especies, se logró la pureza de los cultivos hasta que se fueron separando las amebas por especie. Cabe destacar que algunas especies de *Legionella*, como *L. oakridgensis* solo necesitan L-cisteína durante el primer cultivo (18). Es bien sabido que la calidad en los medios de cultivo bacteriológicos, tiene efecto sobre la morfología colonial y el crecimiento de las bacterias de interés. Estudios realizados confirman que la calidad del agar BCYE depende del tipo o marca de agar con el que se elabore (24). También se ha comprobado que el buffer ACES provee un pH óptimo para el crecimiento de *Legionella* sp., sin producir la inhibición causada por algunos amortiguadores inorgánicos (16). Se ha evaluado la utilización de otros amortiguadores orgánicos para la elaboración del agar BCYE, tales como el MOPS (ácido 3-n-morfolino-propanosulfónico) y el MOPSO (ácido 3-n-morfolino-2-hidroxi-propanosulfónico), encontrando que estos no alteran la calidad del medio de cultivo, en comparación de aquel hecho con buffer ACES (16). Para este estudio no se contó con alguno de estos buffers, por lo cual se recurrió a un buffer inorgánico convencional, como lo es el buffer de fosfatos de sodio, al parecer éste no afectó en el

crecimiento de las bacterias aisladas, aunque tal vez a nivel de la morfología interna de las colonias (aparición de vidrio esmerilado) si pudiera haber producido cambios. Para finalizar este aspecto, cabe destacar que no todas las especies de *Legionella* crecen óptimamente en agar BCYE, esto depende de gran forma a la calidad de los ingredientes utilizados para la elaboración de este medio de cultivo (25).

El tamaño y forma de las bacterias aisladas es representativo del género *Legionella*, además de ser gramnegativas. La ausencia de autofluorescencia de los cultivos en agar BCYE, nos ayuda a descartar a las siguientes especies: *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. wadsworthii*, *L. birminghamensis*, *L. anisa*, *L. tucsonensis*, *L. cherrii*, *L. erythra*, *L. parisiensis*, *L. steigerwaltii*, y *L. rubrilucens* (18); aunque valdría la pena evaluar la calidad del medio de cultivo, ya que la autofluorescencia de las bacterias pudiera ser dependiente de este.

La detección de dos bandas de diferente peso molecular en el patrón electroforético del DNA plasmídico, pudiera indicar la presencia de estructuras secundarias en el DNA o la presencia de dos plásmidos diferentes en las bacterias B1 y B2. Se debe linealizar este DNA para así poder aseverar cualquiera de estas dos hipótesis, además de agregar un control negativo en el corrimiento.

Estas bacterias son diferentes fenotípicamente en cuanto a su patrón de resistencia a antibióticos, lo cual pudiera deberse a la interacción con las amebas, con otros microorganismos del suelo o a presiones de selección diferentes.

Otros aspectos que pudieran ayudar identificar a estas bacterias como integrantes de la familia *Legionellaceae* son los que siguen a continuación. Se han aislado algunos bacilos gramnegativos que poseen las características de crecimiento y la morfología colonial de las especies de *Legionella* en agar BCYE, con la diferencia principal de que estos forman esporas y además son termofílicos; es decir, que pueden desarrollarse a temperaturas mayores de 45°C, mientras que las especies de *Legionella* no lo hacen. El periodo extendido de incubación utilizado para el aislamiento de especies de *Legionella* (3 a 21 días), puede permitir el crecimiento de estos bacilos termofílicos a 35°C, aunque su temperatura óptima es cercana a los 55°C (26). Hasta el momento no se ha realizado esta prueba en las bacterias endosimbiontes B1 y B2. Tampoco se han realizado pruebas bioquímicas rutinarias para la identificación de especies de *Legionella*, tales como: serología, licuefacción de gelatina, motilidad del flagelo, hidrólisis de hipurato, entre otras (18). Se recomienda la prueba de inmunofluorescencia directa, con el uso de anticuerpos monoclonales específicos para ciertas especies de *Legionella* (18). Para la identificación taxonómica de los aislamientos de *Legionella* sp., se recomienda la utilización de transcriptasa inversa para la secuenciación y análisis de la subunidad 16S del rRNA (27), o el método por PCR desarrollado por Cloud *et al.* (28). Con este análisis es posible comparar su homología con otras especies de *Legionella* ya estudiadas (3, 5, 27), para así poder establecer su relación filogenética con respecto a las demás especies. Mediante un análisis de este tipo, se podría saber con exactitud que tipo de bacteria es la que se logró aislar, ya que pudiera tratarse de una especie endémica de *Legionella*, un LLAP, ó incluso un microorganismo endosimbionte no descrito anteriormente.

REFERENCIAS

1. **Rodríguez-Zaragoza, S.** 1994. Ecology of Free-Living Amoebae. *Critical Reviews in Microbiology*. 20, 225-241.
2. **Rodríguez-Zaragoza, S. y García, S.** 1997. Species Richness and Abundance of Naked Amebae in the Rhizoplane of the Desert Plant *Escontria chiotilla* (Cactaceae). *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 44, 122-126.
3. **Adeleke, A., Pruckler, J., Benson, R., Rowbotham, T., Halablab, M., y Fields, B.** 1996. *Legionella*-Like Amoebal Pathogens: Phylogenetic Status and Possible Role in Respiratory Disease. *Emerging Infectious Diseases*. 2, 225-230.
4. **Steinert, M., Emödy, L., Amann, R., y Hacker, J.** 1997. Resuscitation of Viable but Nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 2047-2053.

5. **Newsome, A. L., Scott, T. M., Benson, R. F., y Fields, B. S.** 1998. Isolation of an Amoeba Naturally Harboring a Distinctive *Legionella* Species. *Applied and Environmental Microbiology*. 64, 1688-1693.
6. **Kwaik, Y., Gao, L., Stone, B., Venkataraman, C., y Harb, O.** 1998. Minireview: Invasion of Protozoa by *Legionella pneumophila* and Its Role in Bacterial Ecology and Pathogenesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 64, 3127-3133.
7. **Berk, S., Ting, R., Turner, G., y Ashburn, R.** 1998. Production of Respirable Vesicles containing live *Legionella pneumophila* Cells by Two *Acanthamoeba* spp.. *Applied and Environmental Microbiology*. 64, 279-286.
8. **Neumeister, B., Schöniger, S., Faigle, M., Eichner, M., y Dietz, K.** 1997. Multiplication of different *Legionella* species in Mono Mac 6 Cells and in *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 1219-1224.
9. **Wadowsky, R., Butler, L., Cook, M., Verma, S., Paul, M., Fields, B., Keleti, G., Sykora, J., y Yee, R.** 1988. Growth-Supporting Activity for *Legionella pneumophila* in Tap Water Cultures and Implication of Hartmannellid Amoebae as Growth Factors. *Applied and Environmental Microbiology*. 54, 2677-2682.
10. **Barbaree, J., Fields, B., Feeley, J., Gorman, G., y Martin, W.** 1986. Isolation of Protozoa from Water Associated with a Legionellosis Outbreak and Demonstration of Intracellular Multiplication of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology*. 51, 422-424.
11. **Gautom, R., y Fritsche, T.** 1995. Transmissibility of Bacterial Endosymbionts between isolates of *Acanthamoeba* spp.. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 42, 452-456.
12. **Jeon K. W.** 1995. Bacterial endosymbiosis in amoebae. *Trends in Cell Biology*. 5, 137-140.
13. **Amann, R., Springer, N., Schönhuber, W., Ludwig, W., Schmid, E., Müller, K., y Michel, R.** 1997. Obligate Intracellular Bacterial Parasites of *Acanthamoebae* Related to *Chlamydia* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 115-121.
14. **Reyes, C.** 2000. *Estudio Microbiológico de la Rizosfera e Interrizosfera de Neobuxbaumia tetetzo y Prosopis laevigata*. Tesis Profesional.
15. **Gerhardt, P., Murray, R., Wood, W., y Krieg, N.** 1994. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. ASM Press.
16. **Edelstein, P., y Edelstein, M.** 1993. Notes: Comparison of Three Buffers Used in the Formulation of Buffered Charcoal Yeast Extract Medium. *Journal of Clinical Microbiology*. 31, 3329-3330.
17. **Lopez-Ochoterena, E.** 1997. *Manual de Técnicas Protozoológicas*. 1^{ra} Edición. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
18. **Murray, P., Baron, E., Pfaller, M., Tenover, F., y Tenover, R.** 1995. *Manual of Clinical Microbiology*. 6^{ta} Edición. ASM Press.
19. **Feeley, J., Gibson, R., Gorman, G., Langford, N., Rasheed, K., Mackel, D., y Baine, W.** 1979. Charcoal-Yeast Extract Agar: Primary Isolation Medium for *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology*. 10, 437-441.
20. **Page, F. C.** 1988. *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae*. Culture Collection of Algae and Protozoa. Freshwater Biological Association.
21. **Ruiz, F. R.** 1995. *Manejo de Suelos Arcillosos para una Agricultura Sustentable*. Universidad Autónoma de Chapingo. pp. 3-24.
22. **Evans, R.** 1980. *Soil Erosion*. John Wiley and Sons Ltd. pp. 109-125.
23. **Sanden, G., Morrill, W., Fields, B., Breiman, R., y Barbaree, J.** 1992. Incubation of Water Samples Containing Amoebae Improves Detection of Legionellae by the Culture Method. *Applied and Environmental Microbiology*. 58, 2001-2004.
24. **Edelstein, P., y Edelstein, M.** 1991. Comparison of Different Agars Used in the Formulation of Buffered Charcoal Yeast Extract Medium. *Journal of Clinical Microbiology*. 29, 190-191.
25. **Lee, T., Vickers, R., Yu, V., y Wagener, M.** 1993. Growth of 28 *Legionella* Species on Selective Culture Media: a Comparative Study. *Journal of Clinical Microbiology*. 31, 2764-2768.

26. **Thacker, L., McKinney, R., Moss, C., Sommers, H., Spivack, M., y O'brien, T.** 1981. Thermophilic Sporeforming Bacilli That Mimic Fastidious Growth Characteristics and Colonial Morphology of Legionellae. *Journal of Clinical Microbiology*. 13, 794-797.
27. **Fry, N., Warwick, S., Saunders, N., y Embley, T.** 1991. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae. *Journal of General Microbiology*. 137, 1215-1222.
28. **Cloud, J., Carroll, K., Pixton, P., Erali, M., y Hillyard, D.** 2000. Detection of *Legionella* Species in Respiratory Specimens Using PCR with Sequencing Confirmation. *Journal of Clinical Microbiology*. 38, 1709-1712.