

ESTUDIOS DE DEPREDACIÓN BACTERIANA EN AMBIENTES LACUSTRES ANAERÓBICOS.
I. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA BACTERIA PRESA.

Mònica ALGUERÓ, Núria GAJU e Isabel ESTEVE

Departamento de Genética y Microbiología, e Instituto de Biología Fundamental. Universidad Autónoma de Barcelona. 08193 Bellaterra

Palabras clave: Lagunas anaeróbicas, bacterias fototróficas, depredación bacteriana

SUMMARY

BACTERIAL PREDATION STUDIES IN ANAEROBIC FRESHWATER HABITATS.

I. MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE PREY.

Key words: Anaerobic freshwater habitats, phototrophic bacteria, bacterial predation.

The use of Thiocapsa UA6062, a purple sulfur bacterium as a prey in studies of microbial predation in anaerobic freshwater systems is presented.

Thiocapsa UA6062 is easily attacked by Daptobacter, a predatory bacteria. The main carotenoid of Thiocapsa UA6062 is okenone, which gives a purple colour to lawns of sedimented Thiocapsa UA6062 cells. This contrasts clearly with lytic plates produced by the predatory bacteria on such lawns.

UA6062 cells are nonmotile and spherical-to-ovoidal in shape. They are single cells except under unfavorable conditions, when the cells aggregate. As a result of phototrophic metabolism, cells accumulate sulfur intracellularly, as well as PHB and glycogen. Photosynthetic pigments are located in a vesicular type system of membranes.

UA6062 has been used to test for the presence and abundance of predatory bacteria in Lake Cisó. Its characteristics improve counting efficiency even when natural prey in the environment are not abundant (even under 10^3 cells.mL⁻¹). Studies using this strain have shown that during stratification predatory bacteria are found to be in maximum abundance coincident with or slightly below the maximum density of natural prey cells in the upper part of the hypolimnion.

INTRODUCCIÓN

Las masas de agua anaeróbicas sulfurosas ofrecen un excelente medio de cultivo natural para el crecimiento de las bacterias purpúreas del azufre que se encuentran, en estas condiciones, formando densas masas poblacionales (Guerrero et al., 1978).

El efecto que los microorganismos depredadores o los bacteriófagos puedan ejercer en el control de estas poblaciones permanece todavía sin esclarecer. Ello puede interpretarse tanto por las dificultades inherentes al crecimiento de los microorganismos fototróficos como por las que presentan las técnicas de detección de la depredación en los trabajos de campo. La problemática radica básicamente en reconocer a los microorganismos depredadores, en determinar su efecto y en facilitar su recuento e incidencia sobre las poblaciones presa.

Vampirococcus y Daptobacter son dos bacterias depredadoras que se han aislado por primera vez de la laguna de Estanya (Huesca) y posteriormente en las lagunas de Cisó y Vilar en la zona cárstica de Banyoles. Daptobacter es una bacteria especialmente interesante debido a que presenta la particularidad de infectar y lisar cultivos celulares de distintas especies de bacterias fototróficas penetrando en el citoplasma bacteriano de la célula presa en el interior de la cual se reproduce (Esteve et al., 1983; Guerrero et al., 1986).

La continuidad de los estudios de depredación, tanto en las lagunas anoxigénicas como en cultivos de laboratorio, requiere de una metodología especial. Los microorganismos que se ensayan son anaerobios lo que hace que las técnicas normalmente utilizadas para ambientes aerobios no puedan ser aplicadas.

El objetivo principal de este trabajo ha sido, en primer lugar, la caracterización de una célula presa que presentase unas características idóneas para la infección por Daptobacter y que poseyera un pigmento carotenoides que contrastara intensamente la aparición de las placas líticas, y en segundo lugar la aplicación de esta bacteria presa para la detección de microorganismos depredadores en ambientes anóxicos naturales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diferentes cepas de microorganismos fototróficos y heterotróficos fueron ensayados como bacterias presa para Daptobacter (Tabla 1).

Técnica de filtración y doble capa de agar. Este método fue utilizado para detectar y determinar el título de Daptobacter. Para ello, de 6 a 10 mL de la bacteria presa se filtraron a través de un filtro Whatman GF/C con la finalidad de obtener una capa homogénea sobre la cual poder detectar las placas de lisis. A continuación se filtró un volumen determinado de la muestra que se quería titular. El filtro fue posteriormente colocado en una placa de Petri que contenía una base de agar al 3 % y se recubrió con otra capa de agar. Las placas se incubaron a 25°C durante tres días, transcurridos los cuales se procedió al recuento de placas líticas.

Técnicas microscópicas de observación. Para la observación de los microorganismos "in vivo" se utilizó microscopía de contraste de fases. Con el fin de obtener una inmovilización de las células para la realización de imágenes fotográficas se utilizó la técnica descrita por Pfennig y Wagener (1986). Para el estudio morfológico y ultraestructural se aplicaron técnicas de microscopía electrónica de barrido y de transmisión. En el primer caso las muestras se filtraron a través de un filtro Nuclepore de 0.2 μm de diámetro de poro y se fijaron con glutraldehído tamponado con cacodilato de sodio. Los filtros se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol y se trataron finalmente por el método del punto crítico (Anderson, 1951). En el segundo caso, el material se re-suspendió en 2.5% de glutaraldehído para una primera fijación efectuándose una postfijación en OsO_4 durante 24 horas (Ryter et al., 1958). A continuación se deshidrataron las muestras y se incluyeron en resina Epoxi. Las secciones ultrafinas obtenidas se tiñeron con citrato de plomo (Reynolds, 1963). Las imágenes fotográficas se realizaron con un microscopio de transmisión Hitachi 2A.

Técnicas de cultivo y caracterización fisiológicas. Para el crecimiento en anaerobiosis de las bacterias fototróficas se aplicó el medio descrito por Van Gernerden y Beeftink (1983). Los cultivos se incubaron a 28°C y a 60 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad de luz. Para determinar si la bacteria estudiada era capaz de fotoasimilar distintas sustancias en presencia de bicarbonato y con sulfhídrico como fuente de poder reductor, se preparó una serie de tubos conteniendo distintos substratos y un medio de cultivo al que previamente se había inoculado la bacteria. Los cultivos se incubaron y se midió la densidad óptica (D.O.) a 650 nm durante la fase estacionaria. Se consideraron substratos capaces de estimular el crecimiento los que presentaban valores D.O. superiores a los del control. Para comprobar si la sustancia ensayada era utilizada como fuente de carbono o de poder reductor se preparó una modificación del medio que, en lugar de sulfhídrico, tenía ascorbato a una concentración final de 0.02% como sustancia reductora. Los substratos ensayados en este último caso fueron los que en el experimento anterior habían dado positivo.

Tabla 1. Cepas utilizadas para determinar el margen de hospedador de *Daptobacter*.
Host range of *Daptobacter*

MICROORGANISMOS	CEPA	PROCEDENCIA
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Laguna de Cisó	J. Turet
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	SB-1003	B. Marrs
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Laguna de Cisó	J. Turet
<i>Chromatium minus</i>	Laguna de Cisó	E. Montesinos
<i>Chromatium vinosum</i>	UA-6002	H. Van Gernerden
<i>Chromatium minutissimum</i>	DSM-6003	H. Trüper
<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	UA-6003	J. Turet
<i>Thiocapsa</i> sp.	UA-6062	H. Trüper
<i>Thiocystis gelatinosa</i>	DSM-200	N. Pfennig
<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	Laguna de Cisó	E. Montesinos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC-15442	
<i>Escherichia coli</i>	AB-1157	M. Blanco
<i>Salmonella typhimurium</i>	LT2	J.L. Ingraham
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC-6633	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC-2593	

RESULTADOS

A) Caracterización de una bacteria presa para los estudios de depredación:

De todas las bacterias ensayadas, solo las pertenecientes a la familia Chromatiaceae se mostraron sensibles a la infección por Daptobacter. La cepa UA6062 fue la bacteria seleccionada para dichos estudios, ya que no forma agregados, contiene el pigmento fotosintético okenona y es fácilmente infectada por la bacteria depredadora.

Dado que esta bacteria no había sido estudiada previamente, el primer objetivo fue su caracterización morfológica, ultraestructural y fisiológica.

Al microscopio óptico (fig 1.a) la cepa UA6062 muestra una morfología esférica-ovoidal de 1.0-1.5 μm x 1.0-2.5 μm . Se trata de células inmóviles que únicamente en casos desfavorables de crecimiento muestran tendencia a formar agregados. La tinción de Gram es negativa. Dependiendo del estado fisiológico en que se encuentren las células pueden observarse glóbulos refringentes en su interior que corresponden a inclusiones de azufre, resultado del metabolismo fotosintético. Las secciones ultrafinas (fig. 1.b) permiten observar la estructura de membrana citoplasmática y pared celular característica de las bacterias gram-negativas. El sistema intracitoplasmático de membrana es de tipo vesicular formado por invaginaciones de la membrana plasmática. Las inclusiones intracitoplasmáticas que puede presentar son de glucógeno, poli- β -hidroxibutirato y azufre elemental. No presenta vacuolas de gas.

El espectro de absorción "in vivo" de una suspensión de células de dicha cepa muestra unos picos de máxima absorción a 370, 520 y 825 nm. El de 520 es el correspondiente al carotenoide okenona, mientras que los otros dos son máximos de absorción característicos de la bacterioclorofila a.

Las condiciones óptimas de crecimiento para este microorganismo son de 25°C a 30°C de temperatura, pH entre 7.1 y 7.3, y 100 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidad de luz.

La cepa UA6062 es una bacteria purpúrea del azufre capaz de crecer en condiciones fotolitoautotróficas utilizando sulfhídrico, tiosulfato, azufre elemental o polisulfuro como dador de electrones. En presencia de bicarbonato y sulfhídrico puede fotoasimilar glicerol, glucosa, fructosa, acetato, propionato, lactato, piruvato, succinato, malato y fumarato. Sin embargo no se observó crecimiento cuando el substrato suministrado fue etanol, formato, butirato, valerato, citrato, ascorbato y casaminoácidos. Los resultados obtenidos así como las concentraciones empleadas se encuentran en la tabla 2.

Como fuente de nitrógeno puede utilizar cloruro de amonio, peptona, casaaminoácidos y urea. Además requiere vitamina B₁₂ como factor de crecimiento. Las características anteriormente expuestas, y especialmente las que hacen referencia a inmovilidad, morfología y ausencia de vacuolas de gas nos permitió clasificar esta bacteria como perteneciente al género Thiocapsa.

Tabla 2. Utilización de diferentes fuentes de carbono y de poder reductor por la cepa UA6062.
Utilization of different carbon sources and electron donors by strain UA6062

SUBSTRATO	CONCENTRACIÓN	CRECIMIENTO CON NaHCO_3	
		con H_2S	sin H_2S
Sulfhídrico	0.03 %	Control	Control
Tiosulfato	5 mM	+	+
Azufre elemental	trazas	+	+
Polisulfuro	1 mM	+	+
Etanol	10 mM	-	N
Glicerol	10 mM	+	-
Glucosa	5 mM	+	-
Fructosa	5 mM	+	-
Casaaminoácidos	0.1 %	-	N
Formato	5 mM	-	N
Acetato	5 mM	+	-
Propionato	1 mM	+	-
Butirato	2.5 mM	-	N
Valerato	0.5 mM	-	N
Lactato	10 mM	+	-
Piruvato	10 mM	+	-
Succinato	10 mM	+	-
Malato	7.5 mM	+	-
Fumarato	10 mM	+	-
Citrato	5 mM	-	N
Ascorbato	0.0025 %	-	N

+ : Absorbencia a 650 nm superior a la del control
N : No determinado. Obsérvese que el crecimiento con H_2S ya fue negativo.

B) Aplicaciones de *Thiocapsa* sp en la detección de microorganismos depredadores de ambientes naturales.

Para los estudios de depredación en ambientes naturales se diseñó un método para la detección de las placas líticas producidas por *Daptobacter* sobre la célula presa. Para ello se utilizó la cepa *Thiocapsa* UA6062 que previamente se había caracterizado. Muestras de campo obtenidas de la laguna de Cisó se filtraban sobre filtros de fibra de vidrio que contenían como capa indicadora *Thiocapsa* y se incluía por el método descrito anteriormente de la doble capa de agar. Este método fue especialmente interesante en el caso de muestras en las que la población de Chromatiaceae de la laguna estudiada no era lo suficientemente elevada como para formar de manera natural una capa coloreada sobre la que fuera fácil detectar las calvas líticas. En la figura 1.c. se muestra el aspecto de las calvas de lisis obtenidas por el mencionado método.

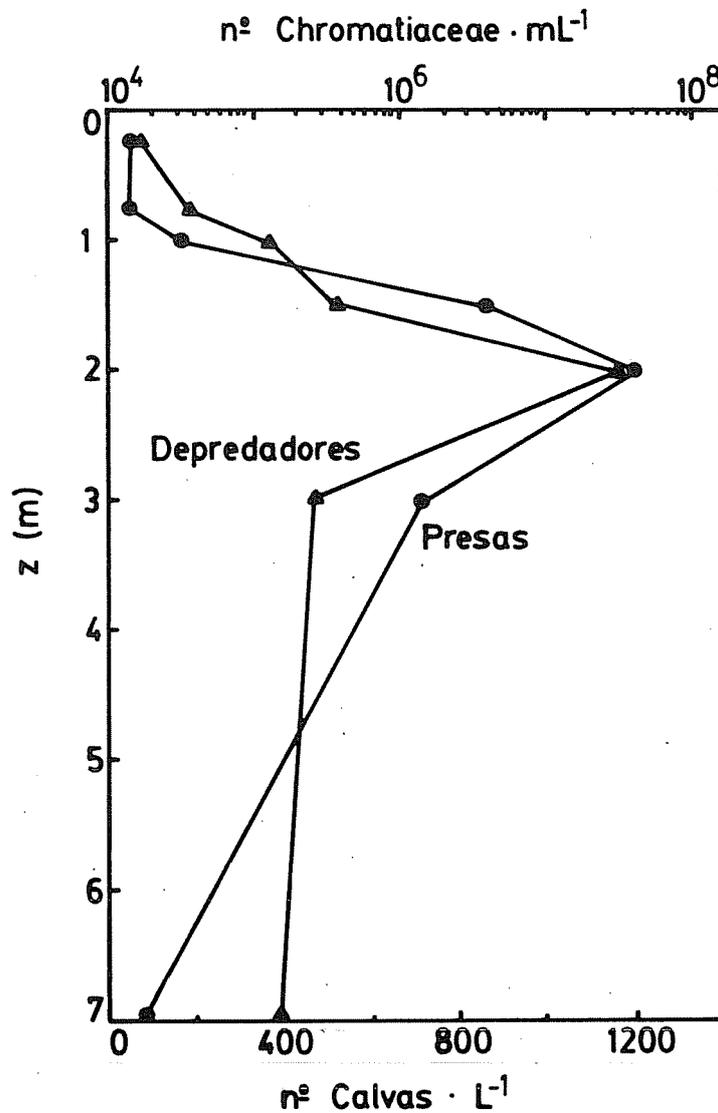
A partir de material procedente de las placas de lisis se efectuaron cultivos de enriquecimiento. Muestras obtenidas de dichos cultivos se procesaron por microscopía electrónica en secciones ultrafinas. La figura 1.d muestra células infectadas por *Daptobacter*, en la que se aprecia la rotura de la pared celular y la membrana citoplasmática, así como la

penetración de Daptobacter en el interior de la célula presa.

Para estudiar el papel de los microorganismos depredadores en ambientes naturales se utilizó dicho método a partir de muestras de agua obtenidas a distintas profundidades. Al mismo tiempo se efectuaron recuentos totales de Chromatiaceae. En la figura 2 se han representado los resultados correspondientes al análisis efectuado en la laguna de Cisó durante el período de estratificación (julio de 1985). En dicha figura puede observarse que el máximo de células depredadoras coincide con el máximo registrado de bacterias presa, a 2 m de profundidad.

FIGURA 2. Distribución vertical del número de bacterias depredadoras y presa en la laguna de Cisó (julio de 1985).

FIGURE 2. Vertical distribution of predatory and prey bacteria in Lake Cisó (1985 July).



DISCUSIÓN

Las características fisiológicas, así como las referentes a las etapas de los ciclos infectivos de Vampirococcus y Daptobacter ya han sido descritas con anterioridad (Esteve et al., 1983; Guerrero et al., 1986; Guerrero et al., 1987)). Sin embargo el inconveniente principal del estudio de dichos microorganismos consiste en aplicar la metodología adecuada, debido a las exigencias de crecimiento de las cepas utilizadas como presa (bacterias fototróficas). Los métodos ensayados con excelentes resultados para las bacterias depredadoras del género Bdellovibrio (Starr y Stolp, 1976) no son aplicables a los ambientes anaeróbicos.

Los recuentos de microorganismos depredadores en ambientes naturales conllevan problemas de interpretación debido al tratamiento al que han de someterse las muestras antes de ser observadas. El recuento del porcentaje de células que presentan epibiontes puede realizarse por técnicas de microscopía de epifluorescencia o microscopía electrónica de barrido. Ambos métodos requieren una filtración previa de las muestras sobre un filtro Nuclepore y por ello no son del todo fiables ya que células no depredadoras pueden quedar sobre las bacterias presa por el efecto mismo de la filtración.

Por otra parte, los recuentos de microorganismos viables basados en el recuento de placas líticas formadas sobre sedimentos celulares de microorganismos presa dan valores más fiables. Sin embargo, hay que tener presente que las placas líticas aparecidas pueden tener diversas causas, como, por ejemplo, la presencia de bacteriófagos (Abeliobich et al., 1974), la presencia de protozoos (Starr y Stolp, 1976) o incluso la presencia de otras bacterias con capacidad de excretar enzimas de naturaleza lítica (Guerrero et al., 1987). De todo ello se deduce que el recuento de dichas placas es un buen método para la detección de microorganismos depredadores pero las causas que lo provocan pueden ser múltiples y, por tanto, la interpretación de los resultados debe efectuarse con precaución.

En los recuentos de viables de Bdellovibrio se utilizan cultivos confluentes de células presa. Las placas obtenidas se contrastan con facilidad mediante la adición de una solución de cloruro de tetrazolio (Seidler y Starr, 1969), pero en el caso de Daptobacter no es posible efectuar un cultivo confluyente semejante ya que las células presa son anaeróbicas y requieren de sulfhídrico como fuente de poder reductor. Para evitar este problema se diseñó el método de filtración en doble capa de agar (véase material y métodos).

El punto más importante a considerar para la detección de bacterias depredadoras ha sido la elección de la bacteria presa adecuada. Aunque se ha comprobado que Daptobacter puede formar placas de lisis sobre sedimentos celulares de distintas bacterias purpúreas del azufre, la efectividad de infección es distinta dependiendo de la especie utilizada. Así, aquellas especies con tendencia a formar agregados o que presentan cápsulas son más difícilmente atacables por Daptobacter.

La bacteria ensayada en el presente trabajo se considera ideal en el estudio de la depredación porque es fácilmente infectable por Daptobacter, y porque contiene un pigmento carotenóide de tipo okenona que presen-

ta una coloración rojiza que contrasta vivamente las placas de lisis producidas. Su utilización en experimentos de laboratorio es ventajosa con respecto a otras Chromatiaceae que poseen pigmentos carotenoides que proporcionan menor contraste. En cuanto a los trabajos de campo, es especialmente indicada su utilización en aquellos muestreos en los que la población de microorganismos fototróficos presenta unos niveles inferiores a 10^3 células por mL, insuficiente para colorear los filtros y proporcionar la capa de contraste deseada. La utilización de esta cepa ha permitido poder representar los perfiles verticales de distribución de los microorganismos depredadores con respecto a los microorganismos presa.

La figura 2 nos muestra una estrecha correlación en la distribución de ambas poblaciones, dicha distribución es también paralela en invierno durante la holomixis (datos no presentados en el presente artículo).

El estudio periódico espacio-temporal de los parámetros físico-químicos (sulfhídrico, luz, etc.) y biológicos (concentración de microorganismos depredadores y presa) permitirá sin duda la determinación de las condiciones en que dicha depredación se produce, así como analizar las condiciones fisiológicas a las que debe estar sometida la bacteria presa para que ésta sea vulnerable a la acción del depredador.

El papel que Bdellovibrio pueda tener en el control de los microorganismos de ambientes acuáticos se encuentra limitado por la escasa concentración de las bacterias que utiliza como huéspedes. La laguna de Cisó en cambio, sustenta poblaciones con una concentración de bacterias fototróficas muy elevada lo que permite que pueda ser más fácilmente estudiado el papel que los microorganismos depredadores ejercen en el control de dichas poblaciones naturales.

- FIGURA 1.A. Células de Thiocapsa UA6062, algunas de las cuales presentan glóbulos de azufre intracelular. Fotografía de contraste de fases (1300x)
- B. Sección ultrafina de Thiocapsa UA6062 mostrando las vesículas intracitoplasmáticas que contienen los pigmentos fotosintéticos (55.000x)
- C. Placas de lisis producidas por Daptobacter sobre sedimentos celulares de Thiocapsa UA6062.
- D. Células de Daptobacter penetrando en el interior del citoplasma de las células presa (23.000x).
- FIGURE 1.A. Cells of Thiocapsa UA6062, some showing intracellular sulfur globules (phase contrast micrograph 1300x).
- B. Ultrathin sections of Thiocapsa UA6062 showing intracytoplasmic vesicles (55.000x).
- C. Lytic plaques formed by Daptobacter on sedimented cell lawns of Thiocapsa UA6062.
- D. Thin sections of Daptobacter cells penetrating in the cytoplasmic space of the prey cells (23.000x).

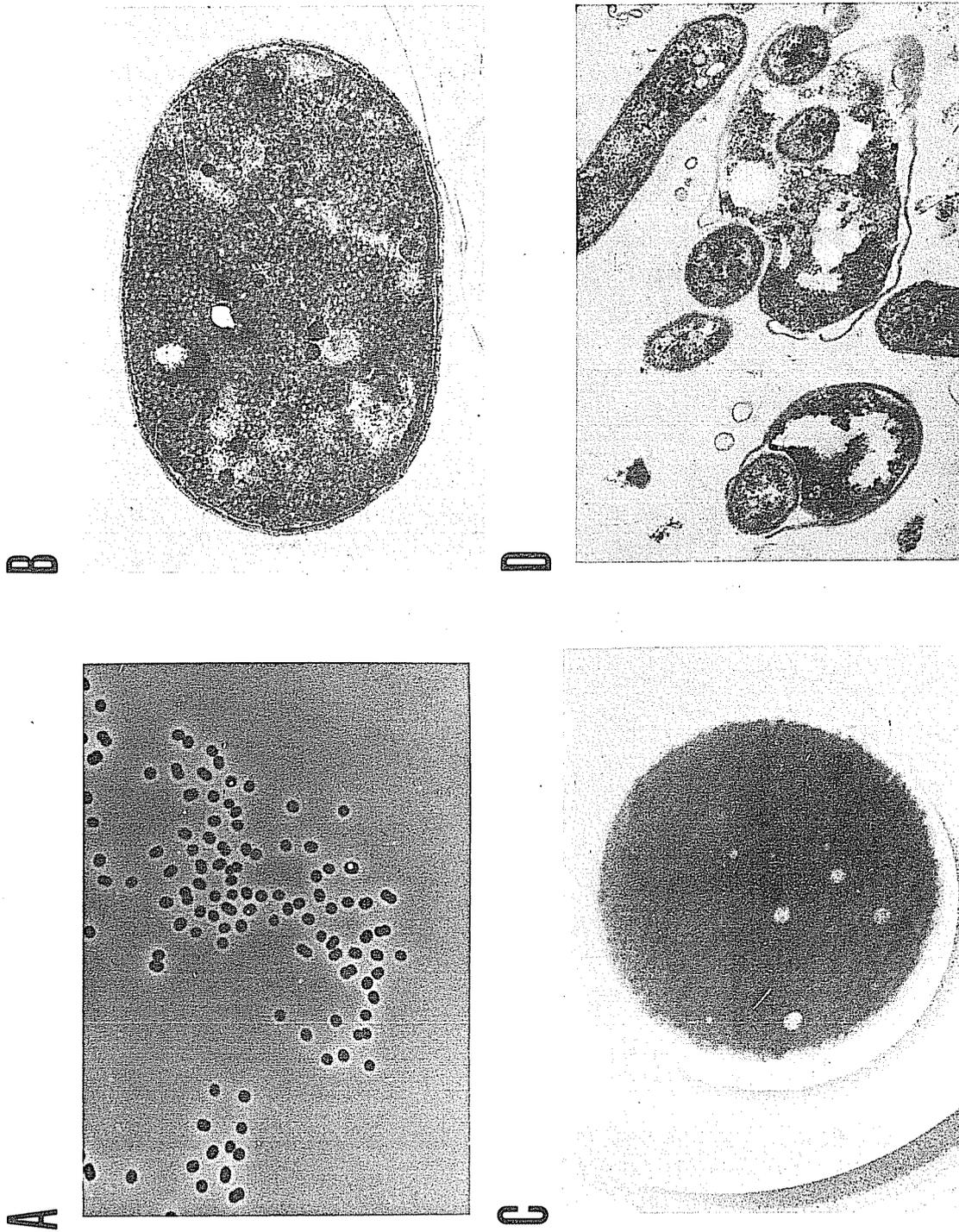


FIGURA 1

BIBLIOGRAFÍA

- ABELIOVICH, A. y S. KAPLAN, 1974. Bacteriophages of Rhodopseudomonas sphaeroides: isolation and characterization of a Rhodopseudomonas sphaeroides bacteriophage. *J. Virol.* 13:1392-1399.
- ANDERSON, T.F. 1951. Techniques for the preservation of threedimensional structure in preparing specimen for the electron microscope. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 13:130-135.
- ESTEVE I., R. GUERRERO, E. MONTESINOS y C. ABELLÁ. 1983. Electron microscope study of the interacion of epibiotic bacteria with Chromatium minus in natural habitats. *Microb. Ecol.* 9:57-64.
- GUERRERO R. y C. ABELLÁ. 1978. Dinámica espacio temporal de las poblaciones bacterianas fotosintéticas en una laguna anaeróbica de aguas sulfurosas. *Oecol. Aqua.* 3:193-205.
- GUERRERO R., C. PEDRÓS-ALIÓ, I. ESTEVE, J. MAS, D. CHASE y L. MARGULIS. 1986. Predatory prokaryotes: predation and primary consumption involved in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:2138-2142.
- GUERRERO R., I. ESTEVE, C. PEDRÓS-ALIÓ y N. GAJU. 1987. Predatory Bacteria in prokaryotic communities: the earliest trophic relationships. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (en prensa).
- PFENNIG N. y S. WAGENER. 1986. An improved method of preparing wet mounts for photomicrographies of microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 4:303-306.
- REYNOLDS E.S., 1963. The use of lead citrate at hight pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17:208-212.
- RYTER A., E. KELLENBERGER y J. SECHAND. 1958. Electron microscopy study of DNA containing plasmids II vegetative and nature phage DNA as compared with natural bacterial nucleoids in different physiological states. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4:671-682.
- SEIDLER R.J. y M.P. STARR. 1969. Isolation and characterization of host independent Bdellovibrio. *J. Bacteriol.* 100:769-785.
- STARR M.P. y M. STOLP. 1976. Bdellovibrio methodology. *Methods in Microbiol.* 9:219-243.
- VAN GEMERDEN H y H.H. BEEFTINK. 1982. Ecology of phototrophic bacteria (Appendix, cultivation methods) En: Ormerod, J.C. (ed). *The phototrophic bacteria: anaerobic life in the light.* Blakwell Scientific Publications. pp 179-185.