

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“PREFERENCIA ALIMENTICIA DEL CILIADO
Colpoda steinii SOBRE SEIS ESPECIES DE
BACTERIAS TOLERANTES AL COMBUSTÓLEO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

JORGE HERRERA DÍAZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉX. 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La vida en la Tierra es una historia tan interesante que uno no puede permitirse el lujo de perderse el principio. Desde la unidad más pequeña de vida -una simple célula bacteriana- que es un monumento de formas y procesos que no tiene rival en el universo tal como lo conocemos.

*Desde el punto de vista evolutivo, los humanos somos unos recién llegados. Plantas, hongos y animales surgieron todos del **microcosmos**. Por debajo de nuestras diferencias superficiales, todos somos comunidades andantes de microorganismos.*

Los microorganismos transformaron continuamente la superficie de la Tierra, la atmósfera y fueron los inventores, a escala reducida, del repertorio bioquímico para la vida, cosa que el ser humano está aún lejos de conseguir. Esta antigua y elevada biotecnología condujo al desarrollo de miles de mecanismos metabólicos, que hoy nos permiten alimentarnos, hacer ejercicio, etc. También fue la causa de diversas crisis de hambre, contaminación y extinción a escala planetaria.

*Ante todo, nos han mostrado la insensatez de considerar el ser humano como especial, distinto y supremo. El microscopio ha ido mostrando gradualmente la inmensidad del **microcosmos** y ahora nos proporciona una visión sobrecogedora de nuestro verdadero lugar en la naturaleza. Ahora parece ser que los microbios (llámeseles microorganismos, protozoos, bacterias gérmenes, según el contexto), además de ser los cimientos de la vida en la Tierra, ocupan un lugar indispensable en toda estructura viva y son necesarios para su supervivencia.*

No es disparatado decir que la misma consciencia que nos permite investigar el funcionamiento de nuestras células puede provenir de las capacidades coordinadas de millones de microorganismos que evolucionaron hasta convertirse en el cerebro humano.

La posibilidad de acceder a toda la información almacenada, familiarizándonos con sus misterios, conduciría a cambios tan sorprendentes que se encuentran más allá de nuestros conocimientos actuales. Los humanos no podremos apreciar la proeza de ingeniería genética de los microorganismos hasta que exploradores especiales traten de conquistar Marte o hagan habitables los satélites, que es lo que los microbios han venido haciendo en la Tierra a lo largo de toda su extensísima historia: el acondicionamiento del planeta entero. (...)

Manuel Calvo Hernando

Canto a Gaia, madre de todas las cosas, la antigua, firmemente asentada en sus fundamentos, que nutre todo cuanto hay de vivo en la tierra; lo que camina sobre el suelo y lo que avanza por el mar o vuela por el aire.

Himno homérico XXX

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Antecedentes.....	8
Justificación.....	9
Hipótesis.....	10
Objetivos.....	10
Objetivo general.....	10
Objetivos particulares.....	10
Materiales y Métodos.....	11
Resultados.....	17
Discusión.....	25
Conclusión.....	31
Literatura citada.....	32
Apéndice I.....	44
Anexo I.....	47

RESUMEN

Los protozoos junto con las bacterias son componentes importantes en las redes alimenticias microbianas, pero las formas y los criterios de como los protozoos seleccionan sus presas no se encuentran del todo entendidos. En este estudio, se determinó la preferencia alimenticia del ciliado *Colpoda steinii* sobre las cepas bacterianas *Pseudomonas aeruginosa*, *Cupriavidus necator*, *Agrobacterium tumefaciens*, cepa 79, cepa 74 y una cepa de Actinomiceto, por medio de dos ensayos. En el primer ensayo los resultados mostraron mayor cantidad de trofozoítos de *C. steinii* en la cavidad inoculada con *A. tumefaciens* mostrando diferencias significativas (*Tukey* $\alpha=0.05$) por encima de las otras bacterias del ensamble microbiano ensayado. Por otra parte *C. steinii* tuvo la mayor proporción de enquistamiento en la cavidad en la cual se inoculó la cepa de actinomiceto en el mismo ensayo. El segundo ensayo, consistió en parear las diferentes cepas bacterianas. Donde *P. aeruginosa* mostró diferencias significativas (*Tukey* $\alpha=0.05$) en el número de trofozoítos. Las dos cepas bacterianas presentan características morfológicas similares en cuanto a tamaño (3 μ m), forma (bacilo) y ambas presentan pared Gram-negativa, por lo que estas características podrían influir en la selección sobre las otras presas. Por lo tanto asumimos que en este caso *C. steinii* se alimenta indistintamente de estas dos presas. En contraste con las cepas de actinomiceto y la cepa 73 que presentan diferente morfología y composición de la pared siendo ambas Gram-positivas y mostraron los mayores índices de enquistamiento, comparadas con el resto de las bacterias del ensamble microbiano ensayado.

INTRODUCCIÓN

Las comunidades microbianas son muy diversas y presentan complejas interacciones entre los miembros que las componen. Engloban una gran cantidad de actividades metabólicas y son el principal flujo de nutrientes en el suelo, intervienen activamente en los diferentes ciclos biogeoquímicos del ecosistema: en la fertilidad del suelo, la protección de las plantas ante patógenos, la degradación de compuestos xenobióticos así como la transformación y degradación de la materia orgánica (MO) (Tan, 2010), por mencionar algunos de los principales procesos (Nogales, 2005; Odum, 1972).

Los protozoos son un grupo muy diverso de microorganismos que pueden habitar una gran gama de ambientes acuáticos y terrestres. Estos microorganismos son eucariontes unicelulares y se pueden clasificar morfológicamente en ciliados, flagelados, foraminíferos, radiolarios, amebas testadas, semitestadas y desnudas. Su tamaño puede oscilar desde 2 μm (nanoflagelados) hasta más de 600 μm (algunas especies de amebas) (Fenchel, 1987; Finlay y Fenchel, 1996).

Los protozoos son importantes componentes de las redes tróficas, por lo que la depredación selectiva sobre ciertas poblaciones bacterianas comprende un aspecto clave de su alimentación. Las modificaciones en respuesta a la depredación como cambios morfológicos, fisiológicos sobre las bacterias constituyen además un enlace muy importante en la mineralización y movilización de nutrientes, influyen tanto directa como indirectamente en la disponibilidad de elementos biogénicos esenciales como carbono (C), nitrógeno (N), fósforo (P), azufre (S) entre otros, lo cual es relevante para entender las transformaciones en los sistemas planta-suelo (Holtz *et al.*, 2003; Stout y Heal, 1972).

Pratt y Cairns (1985) clasificaron los hábitos alimenticios de protozoos de agua dulce en seis grupos: fotosintéticos autótrofos, bacterívoros detritívoros, saprófitos, mixótrofos, algívoros y omnívoros. Todos estos grupos pueden encontrarse en el suelo. Esta clasificación podría adaptarse adicionando el grupo micófago (Coûteaux y Darbyshire, 1998).

A pesar de que los protozoos son un grupo muy heterogéneo en sus hábitos de alimentación y pese a la gran diversidad de presas que consumen, los estudios se han enfocado mayoritariamente hacia los bacterívoros, ya que éstos son los depredadores más numerosos y más ampliamente distribuidos en el suelo. Estos depredadores son la unión entre diferentes niveles de las redes tróficas y funcionan como el motor en el reciclaje y transferencia de los nutrientes como el carbono (C), el fósforo (P) y el nitrógeno (N) que impulsan la productividad de los suelos, ya que dejan biodisponibles estos elementos en forma de compuestos y liberan los nutrientes fijados en la biomasa bacteriana. Los residuos de este proceso también son aprovechados por otros microorganismos e incluso por las plantas. A este proceso se le ha denominado circuito microbiano que es esencialmente un sistema de fertilización ecológica construida sobre un modelo depredador-presa (Paul y Clark, 1989; Casida, 1989; Ronn *et al.*, 2002; Bonkowski, 2004; Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007). La depredación de los protozoos sobre las comunidades bacterianas puede favorecer la mineralización de N y P, como lo demostró Griffiths (1986) quien observó un aumento en la mineralización del nitrógeno en presencia de un protozoo ciliado. Muchos protozoos también liberan el exceso de N en forma de ión amonio (NH_4) lo que también constituye una fuente de N al sistema. La excreción de N y P, producto de la depredación ejercido por los protozoos, se cree que es uno de los mayores mecanismos de regeneración de nutrientes inorgánicos (Clarholm, 1981; Vargas 1990; Jürgens y Massana 2008).

La depredación de los protozoos tiene un efecto importante en la regulación de la comunidad bacteriana, dando forma y estructura a ésta, ya que tienen el potencial de alterar su biomasa, así como la composición genotípica y fenotípica de las comunidades bacterianas que depredan (Stout y Heal, 1972; Griffiths *et al.*, 1999; Rønn *et al.*, 2002; Jürgens y Matz, 2002; Murase *et al.*, 2006), por lo que el impacto funcional en el sistema edáfico es muy grande (Dopheide *et al.*, 2011).

Aunque la importancia funcional del circuito microbiano se ha establecido en varios ambientes tales como los suelos (Coleman, 1994; Bonkowski y Brandt,

2002; Clarholm, 2005), hay pocos datos disponibles sobre si existen ciertas preferencias alimenticias de los ciliados en este ambiente, aun cuando este grupo constituye una parte importante de los microorganismos presentes en el (Sleigh 1979).

Muchas especies de protozoos muestran alta especificidad o preferencia en la selección de su presa basados en varios atributos de ésta, ya que algunas bacterias ingeridas les confieren en mayor o menor medida, el incremento de la biomasa celular del organismo ciliado en comparación con lo que les ofrecen otras especies de bacterias, dicho efecto depende de la digestibilidad y el valor nutricional de las presas (Vargas 1990; Martel 2009). Incluso hay estudios donde algunos protozoos pueden seleccionar bacterias vivas sobre bacterias muertas (Czarnecka y Chróst, 2003).

Los mecanismos por los cuales los protozoos identifican, seleccionan y se alimentan de diferentes presas carecen de claridad. Sin embargo, se han identificado ciertas señales químicas que podrían ser importantes para el reconocimiento y localización de las presas (Montagnes *et al.*, 2008).

El valor nutritivo de un tipo de presa varía según su status nutricional y por tanto con su contenido de C:N:P y también con las más finas diferencias bioquímicas como el contenido de ácidos grasos, por lo que pequeños cambios en la estructura o composición de la presa pueden estar asociados a cambios más significativos en la calidad de las mismas; por ejemplo, la producción de toxinas o inhibidores, moco, paredes más gruesas (Mitra y Flynn, 2005).

Se ha documentado que los protozoos bacterívoros seleccionan a sus presas basándose principalmente en atributos físicos tales como el tamaño de la célula y la morfología (Sherr *et al.*, 1992; Simek *et al.*, 1994), la estructura de la colonia de células, o si las células se encuentran libres o unidas en agregados (Caron *et al.*, 1987; Sibbald y Albright, 1988). La depredación puede tener efectos sobre la morfología de sus presas, estas exhiben un alto grado de “plasticidad morfológica” (es decir, propiedades de la superficie celular) y adaptaciones de comportamiento

(morfología de la colonia, liberación de toxinas u otros metabolitos extracelulares), que ayudan a protegerlas de los depredadores, ya que la captura de presas se ve afectada por su tamaño y las irregularidades en su forma, por lo que las bacterias filamentosas pueden ser demasiado grandes para poderlas ingerir y las bacterias demasiado pequeñas pueden eludir la captura. Las propiedades morfológicas individuales como la presencia de flagelos que proporcionarían mayor motilidad, la formación de biopelículas y conglomerados multicelulares también pueden reducir la depredación (Young, 2006; First *et al.*, 2012); así como la composición química de la célula, tales como el contenido de pigmentos o toxinas (Griffiths, 1994). En algunos casos las presas potenciales pueden producir sustancias que pueden llegar a ser tóxicas para los protozoos como el caso de los actinomicetos, por lo que estos últimos no forman un componente esencial en la dieta de los protozoos (Nisbet, 1984).

Algunos grupos de protozoos, como los ciliados edafícolas, son considerados como un grupo abundante, además de ser componentes importantes de la microfauna y juegan un papel importante dentro del reciclaje de la MO (Ferrera-Cerrato, 2007). Por lo que la depredación que ejercen sobre las comunidades bacterianas a través de diferentes mecanismos de búsqueda, captura y digestión tiene efectos indirectos sobre las condiciones para el crecimiento de las poblaciones de bacterias (por ejemplo, liberación de nutrientes y disponibilidad de sustrato) (Rønn, 2002).

Otro efecto indirecto importante de la depredación es mantener una alta proporción de bacterias fisiológicamente activas en la población. Los desechos producto de la alimentación sobre microorganismos vivos proporciona sustancias que estimulan el crecimiento y actividad bacteriana como la tasa de descomposición de la MO o compuestos xenobióticos, por lo que el reciclaje y la descomposición de elementos y residuos es más eficaz; además de que estos pueden estar funcionando como un control biológico al alimentarse de algunos microorganismos patógenos (Pussard *et al.*, 1994). Varios autores sugieren que la depredación ejercida por los protozoos podría ser no solo una forma de biocontrol,

sino que al estar depredando a ciertas poblaciones bacterianas estas produzcan y secreten mayor cantidad de metabolitos, que a su vez inhiben a otros organismos como hongos u otras bacterias que pudieran presentar un riesgo para las plantas; contribuyendo así a la salud de estas, lo cual podría ser usado en los sistemas de agricultura como alternativa a los agroquímicos (Jousset *et al.*, 2009; Müller 2013).

En estudios de microcosmos se ha encontrado un aumento en la descomposición de residuos orgánicos en presencia de protozoos bacterívoros que en los sistemas donde solo hay bacterias, como lo demostró el estudio realizado por Mattison y Haramaya (2000) con el flagelado *Heteromita globosa*, en el cual la tasa de degradación de tolueno fue más eficiente en presencia de este protozoo bacterívoros. Por lo que es preciso tener un mejor entendimiento de las preferencias alimenticias de los protozoos y los mecanismos por los cuales eligen a sus presas (Paul y Clark, 1989).

Por otra parte los ciliados del genero *Colpoda* se les considera organismos cosmopolitas distribuidos por todo el mundo encontrándolos en gran variedad de ecosistemas tanto acuáticos como terrestres, junto con los Hipotrichos son de los grupos más representativos en los ambientes terrestres, esto debido a que poseen una estrategia adaptativa en su ciclo de vida; la aparición de un quiste reproductivo en algunos protozoos del suelo (e.g., el ciliado *Colpoda steinii*) es también una adaptación a las variables temporales de su entorno (Bamforth, 2001; Foissner, 1999; Adl y Gupta, 2006; Fenchel, 1987). *C. steinii* así como otros miembros de la familia Colpodidae son abundantes y cosmopolitas en el suelo, éstos han sido utilizados como modelo de estudio por su gran resistencia y capacidad de adaptación en bioensayos de citotoxicidad y bioacumulación de metales pesados, plaguicidas como DDT, etc. (Forge *et al.*, 1993; Janssen *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 1997; Rogerson y Berger, 1983; Trielli, 2006). Además se han reportado con gran frecuencia en suelos contaminados por hidrocarburos (Mondragón-Camarillo 2007, 2011) lo cual da relevancia a este grupo, ya que al existir un evento de perturbación o contaminación en el suelo existe una selección de organismos que son capaces de tolerar, e incluso degradar estos agentes

contaminantes. Por lo tanto, este estudio está dirigido a establecer si existe preferencia alimenticia del ciliado *Colpoda steinii* sobre especies bacterianas aisladas de un suelo contaminado con combustóleo, debido a que es un microorganismo abundante en este tipo de suelo. Las consideraciones anteriores llevaron al planteamiento de la siguiente pregunta de investigación: ¿*Colpoda steinii* tiene preferencias alimenticias sobre especies bacterianas tolerantes al combustóleo?

ANTECEDENTES

Existen trabajos enfocados a evaluar y entender la preferencia alimenticia en protozoos, sobre todo en ambientes acuáticos, y si estos tienen efecto sobre las comunidades de bacterias, como el de Thurman *et al.* (2010) donde examinaron si los ciliados *Colpidium striatum* y *Tetrahymena pyriformis*, podrían diferenciar en una mezcla entre presas bacterianas del mismo tamaño, y si era así, cómo esta selectividad podría beneficiar a las poblaciones de ciliados. Encontraron que *Colpidium striatum* selecciono *Klebsiella aerogenes* sobre *Klebsiella ozaenae* que a su vez fue seleccionada sobre *Escherichia coli.*, mientras que *T. pyriformis* no mostró selectividad entre *K. aerogenes* y *E. coli* pero *K. aerogenes* fue seleccionada sobre *K. ozaenae* mientras que *E. coli* no lo fue. Los beneficios metabólicos de seleccionar *K. aerogenes* fueron identificados con un incremento en el biovolumen celular de *C. striatum* y *T. pyriformis*, respectivamente. Por otro lado Dopheide *et al.* (2011) contrastó las interacciones alimenticias de dos ciliados (*Tetrahymena* sp. y *Chilodonella* sp.), mediante el uso de biopelículas bacterianas genéticamente modificadas (*Pseudomonas costantinii* y *Serratia plymuthica*) para expresar proteínas fluorescentes. De acuerdo a la microscopia ambos ciliados consumieron fácilmente células de ambas biopelículas, observando que cada ciliado mostró una preferencia por la biopelícula de *P. costantinii*. Indicaron además que ambos ciliados usaron señales químicas para localizar las biopelículas y que *Tetrahymena* sp. tuvo un mayor impacto en la morfología de la biopelícula de *S. plymuthica* y redujo la biopelícula de *P. costantinii* a microcolonias aisladas resistentes a la depredación. La depredación de *Chilodonella* sp., resultó en el desarrollo de caminos menos definidos a través de la biopelícula de *S. plymuthica* y causó un esparcimiento homogéneo de células en la biopelícula de *P. costantinii*. Así mismo González *et al.* (1990) observó la selectividad alimenticia de ciliados y flagelados con presas de diferentes tamaños marcadas por fluorescencia (FLB). Mostrando que los ciliados tuvieron una preferencia por las presas de mayor tamaño, ingiriendo a un ritmo más acelerado una bacteria entérica Gram-positiva.

JUSTIFICACIÓN

Las interacciones entre los microorganismos que habitan en el suelo son complejas y reflejan la existencia de poblaciones muy dinámicas y heterogéneas. Una gran diversidad de bacterias ha mostrado capacidad para tolerar, degradar, descomponer y/o reducir diversos tipos de contaminantes, entre estos los hidrocarburos. La degradación de hidrocarburos y otros contaminantes en el ambiente puede ser optimizada por la inoculación de bacterias autóctonas seleccionadas, y aún más en presencia de un depredador (Vecchioli *et al.*, 1990; Tso y Thagon, 2006).

Los protozoos son los principales depredadores bacterianos, incluso en suelos que presentan cierto grado de contaminación o perturbación, son un enlace en el transporte de nutrientes entre diferentes niveles tróficos, estimulan gran cantidad de procesos bacterianos y liberan elementos fijos en la biomasa bacteriana contribuyendo así al ciclo del N y a la mineralización de la materia orgánica, lo cual hace que el reciclaje de nutrientes sea más eficaz. Ningún suelo arable, examinado hasta la fecha, se ha visto desprovisto de esta microfauna y la relación que puede haber entre estos microorganismos y las condiciones fisicoquímicas del suelo que sirven como indicadores del efecto de las perturbaciones, de la contaminación o sobre el estatus del mismo. Por lo tanto es preciso entender los procesos de depredación entre las comunidades de protozoos y bacterias, para así poder mejorar la recuperación o biodegradación que ocurre en suelos perturbados con hidrocarburos.

HIPOTESIS

Si *Colpoda steinii* presenta preferencia alimenticia por alguna de las especies bacterianas entonces habrá mayor cantidad de trofozoítos y menos formas quísticas en las colonias bacterianas de su preferencia.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe preferencia alimenticia de *Colpoda steinii* sobre seis cepas bacterianas tolerantes al combustóleo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar y cultivar al ciliado *Colpoda steinii* de un suelo contaminado con combustóleo.
- Aislar y cultivar cinco especies bacterianas de un suelo contaminado con combustóleo.
- Realizar ensayos de preferencia alimenticia en placas de agarosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de suelo se obtuvieron de microcosmos con planta (*medicago sativa*) contaminados con 50,000 ppm de combustóleo, a partir del protocolo de contaminación ya establecido por Cortés-Pérez (2009) y Mondragón-Camarillo (2011).

Aislamiento y Cultivo de ciliados.

Se tomaron tres muestras de 10 g de suelo contaminado las cuales se colocaron en cajas de Petri, las cuales se humedecieron posteriormente con extracto de suelo hasta llegar al 40% de su capacidad de campo, las muestras se incubaron a 27°C durante 3 días para el desarrollo de los microorganismos. Una vez transcurrido este tiempo se humedecieron con agua destilada estéril y se filtraron para la obtención de los protozoos (método del suelo húmedo de Bamforth, 1992) y se tomó una alícuota, la cual se llevó a cajas de cultivo celular para así obtener un cultivo mixto de protozoos. De esta forma se obtuvo un cultivo polixénico y de éste se identificó morfológicamente al ciliado *Colpoda steinii* por medio de la clave especializadas de Foissner *et al.* (1992), y la identificación fue corroborada por la Maestra en Ciencias Laura Mondragón Camarillo.

Una vez caracterizado, *Colpoda steinii* se aisló del cultivo polixénico, por medio de diluciones diarias de 100µl durante 12 días, usando cajas de cultivo celular para posteriormente obtener un cultivo monoxénico; el cual se conservó en una infusión de pasto adicionada con solución salina de Neff (Page 1983, Nerad y Daggett 1992), que fue inoculada con 20µl *Pseudomonas fluorescens*, la que fungió como fuente de alimento para los ciliados, y se mantuvo en agitación constante durante 3 días. Cumplido este periodo el cultivo se filtró para transferirlos a nuevo medio de cultivo que se incubó para su posterior observación a las 24 h. en el microscopio invertido marca Olympus (CK2).

Una vez establecidas las condiciones para el crecimiento de *C. steinii*, se realizaron tinciones siguiendo la técnica de Quantitative Protargol Stain (Skibbe 1994) utilizando el fijador Bouin en el laboratorio de Limnología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (Fig. 10).

Obtención y cultivo de bacterias

Para el aislamiento microbiano se tomó 1 g de suelo contaminado, el cual se procesó por medio de diluciones seriadas; se tomó una dilución de 10^{-3} que posteriormente se vertió en una placa de agar nutritivo para obtener el desarrollo de las diversas colonias bacterianas por incubación a 32°C durante 48 h. Posteriormente se realizó la tinción de Gram, para así seleccionar las cinco especies bacterianas, que sirvieron para los ensayos de preferencia, después se sembró por el método de estría para aislar las colonias y así obtener el cultivo puro de cada una de ellas, para su posterior identificación.

De la misma muestra se aisló también un actinomiceto, para lo cual se hizo un inóculo en una placa de agar Czapek que se incubó a 28.5 °C por 5 días, este actinomiceto fungió como control negativo en los ensayos.

Identificación de bacterias

- Caracterización morfológica

Extracción de DNA

Cada cepa aislada se inoculó en 10 ml caldo nutritivo y se incubó a temperatura ambiente en agitación orbital (100 rpm) durante 24 h. Posteriormente se tomó 1 mL del cultivo bacteriano y se centrifugó a 14000 x *g*. durante 5 min. La pastilla se recuperó y se realizó la extracción de DNA de las células utilizando el GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit según las instrucciones del fabricante. El DNA obtenido se guardó a -20 °C hasta su utilización.

Amplificación del gen rDNA 16S

El DNA obtenido se utilizó como templado para identificar a cada organismos por medio de la amplificación por la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) del gen rDNA 16S. La reacción se llevó a cabo con los iniciadores F27 y R1494. La amplificación se realizó en un PIKO Thermal Cycler (Thermo Scientific). El programa que se utilizó fue: temperatura de desnaturalización de 95° C por 40 seg., una temperatura de alineación de 55° C durante 30 seg. y finalmente una temperatura de extensión de 72° C durante un minuto y medio, durante 25 ciclos (Serrano-Vázquez *et al.*, 2013).

Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1% a 110 V durante 30 min, se tiñeron con GelRed y se observaron en un foto documentador 1D KODAK 3.5. El tamaño de los productos amplificados fue de aproximadamente 1500 pb.

Secuenciación y análisis *in silico* del gen rDNA 16S

Los productos de PCR se enviaron a la Unidad de Secuenciación, Laboratorio de Bioquímica Molecular, UBIPRO; de la FES-Iztacala, UNAM.

Las secuencias se editaron con el programa BioEdit y se compararon con secuencias encontradas en el NCBI-Blast.

Ensayos de Preferencia alimenticia y conteo de protozoos

Para los ensayos de preferencia se prepararon cajas de Petri con agarosa al 1% a las cuales se le colocó un molde fabricado de resina (Fig. 1), el cual se retiró una vez que el medio gelificó, el molde consistió de una cavidad central la cual esta interconectada por medio de canaletas a cuatro cámaras adyacentes que se encontraban a una distancia de 5 mm de la cavidad central (Fig. 1). Una vez retirado el molde las cajas se colocaron en la incubadora a 37 °C por 24 h como prueba de esterilidad.

Cada una de las bacterias aisladas fueron suspendidas en 10 ml de infusión de pasto para su crecimiento en agitación constante durante 24 h y en algunos casos por 48 h. Transcurrido el tiempo de crecimiento, se realizó una dilución de 10^{-5} y 10^{-7} de la que se tomaron 20 μ l que fueron colocados en una placa de agar

nutritivo para posteriormente contar las UFC y así tener la estimación del número equivalente de UFC. Posteriormente 100 µl fueron colocados en cada una de las oquedades laterales del molde que se establecieron a 5mm de la cavidad central. Se realizaron cuatro repeticiones por ensayo.

Para los ensayos se tomó como control positivo la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* donada por el laboratorio de ecología microbiana de la UBIPRO en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

El cultivo de ciliados se mantuvo en cajas de cultivo celular con 2 ml de infusión de pasto con .05g/ml de peptona y medio salino Neff al que se le añadieron 25 µl de bacteria muerta por calor, éste se incubó por 24 h a una temperatura de 28.5 °C. Después el cultivo se trató con Cloranfenicol (50 µg por ml) para eliminar a las bacterias del cultivo monoxénico y 12 h después se tomó una alícuota de 1ml del cultivo y se concentró por centrifugación a 1000 x g. durante 5 min. Posteriormente se retiraron 900 µl de sobrenadante para luego agregar 900 µl del medio antes mencionado, se suspendió la pastilla y de nuevo se centrifugó a 1000 x g durante 5 min. Se retiró nuevamente el sobrenadante y la pastilla fue suspendida en 900 µl y se transfirió a una caja de cultivo celular con medio nuevo añadiendo Cloranfenicol y se dejó en agitación constante durante 2 h. con el objetivo de tratar bacterias extrañas que pudieran intervenir en el estudio. Luego de este tiempo el cultivo fue nuevamente centrifugado a 1000 x g. durante 5 min. Y se transfirió a un nuevo pozo con 1ml. de la infusión antes descrita para ser utilizados inmediatamente después en los ensayos.

Se inocularon alrededor de 1000 células de *Colpoda steinii* en 50 µl del cultivo de ciliados en la oquedad central; las canaletas se inundaron con la infusión estéril para así tener un medio de difusión y desplazamiento para que los ciliados lleguen a las bacterias en suspensión. Una vez inoculadas las bacterias y los ciliados se colocaron en incubación a 28°C durante 3 horas. Transcurridas las 3 h se fijó la muestra con Lugol al 4%(v/v), para posteriormente contar tanto los quistes como los trofozoítos en cada una de las cavidades periféricas de los diferentes moldes usando el microscopio invertido (Olympus CK2) a 40x.

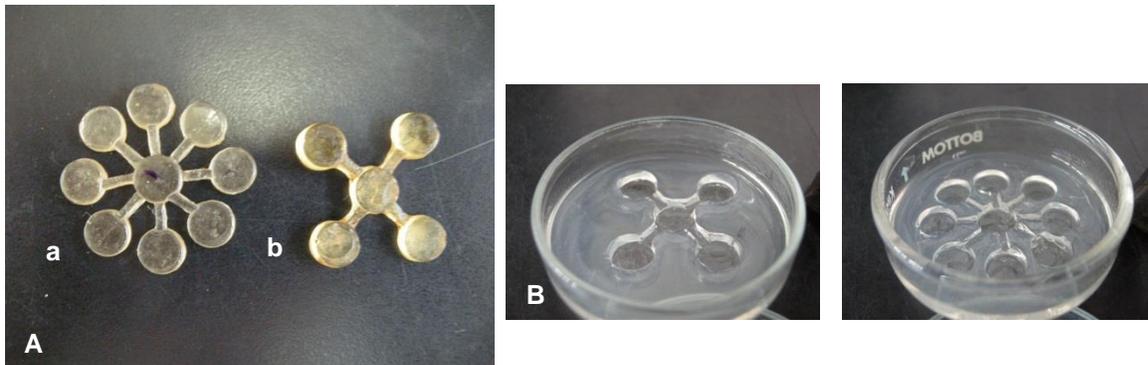


Figura 1. A. Moldes utilizados para los ensayos de preferencia alimenticia, a) Molde tipo I, b) Molde tipo II. B. Cajas utilizadas para el ensayo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en porcentaje fueron relativizados para su posterior análisis mediante la transformación del arco seno de la raíz cuadrada con la siguiente fórmula (McCune y Grace, 2002):

$$b_{ij} = \frac{2}{\pi} * \arcsin \left(\sqrt{x_{ij}} \right)$$

Una vez transformados los datos se hizo la prueba de ANOVA para determinar la existencia de diferencias significativas entre las diferentes combinaciones en los ensayos de preferencia alimenticia ($P < 0.05$).

Finalmente se realizó la prueba *post hoc* de Tukey para conocer cual o cuales de las medias eran diferentes.

RESULTADOS

❖ **Obtención y Cultivo de ciliados**

Se observó que el cultivo de *C. steinii* tuvo el mejor crecimiento en el medio que consistía en infusión de pasto, peptona biotriptasa y solución salina de Neff en comparación con los medios a base de soja o arroz. El primero permitió preservar el cultivo de ciliados durante una semana, cuando el medio se tornaba un poco más turbio, lo que permitió observar el cultivo con gran claridad. Los medios de cultivo a base de soja o arroz presentaron múltiples dificultades para el crecimiento de los ciliados, ya que al ser medios en extremo nutritivos para gran variedad de organismos como hongos y bacterias, éstas últimas al crecer muy rápido en el medio de arroz, inhibían el desarrollo del ciliado *C. steinii*.

Por otra parte, el medio a base de soja presentó problemas para el mantenimiento del cultivo ya que a las 24 h. se formaba una nata rodeada de espuma que abarcaba buena parte del pozo, en la caja de cultivo celular y no permitía observar claramente el crecimiento de la población, también, presentaba con una turbiedad excesiva en un lapso muy breve.

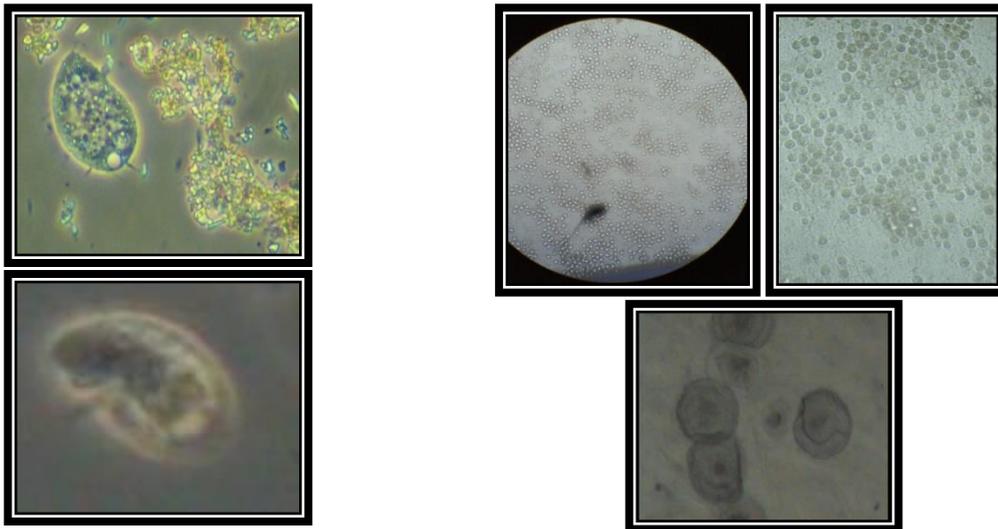


Figura 2. A. Trofozoíto de *Colpoda steinii* 40X, B. Estructura de resistencia vistos en el microscopio invertido y de contraste de fases a 20x y 40x.

❖ **Obtención, cultivo de bacterias**

Se aislaron un total de cinco cepas bacterianas del suelo contaminado con combustóleo. Con el propósito de caracterizarlas, se realizó la tinción de Gram la cual mostró que tres de las cepas (*A. tumefaciens*, *C. necator* y la cepa 79) presentan características Gram-negativas, mientras que el actinomiceto y la cepa 73 mostraron tener una pared Gram-positiva (Fig. 3., Tabla 1). Esta tinción también permitió observar la forma de las bacterias y realiza mediciones del tamaño celular. La forma que predominó en la mayoría de las cepas aisladas fue la de bacilo y solo la cepa 73 mostró forma de cocos.

Se logró un correcto aislamiento a la tercera resiembra por el método de estría, para así obtener colonias de bacterias totalmente uniformes, las cuales se caracterizaron morfológicamente (Fig. 3).

Los aislamientos fueron hechos en placas de agar nutritivo y para corroborar su tolerancia al hidrocarburo las bacterias fueron sembradas en agar extracto de suelo con un papel filtro impregnado con combustóleo que se pegó a la tapa de la caja de Petri. Los vapores de combustóleo son tóxicos e inhiben a las bacterias no tolerantes.

En el presente estudio también se caracterizó morfológicamente la cepa de *P. aeruginosa*, que fue utilizada como control positivo. Esta cepa de *Pseudomonas* mostró tener una pared Gram-negativa, forma de bacilo y fue la única cepa que produjo pigmentación.

Las cepas bacterianas aisladas presentaron crecimiento adecuado a las 24 h en el medio de cultivo de infusión de pasto...líquido, a excepción del actinomiceto que se desarrolló a las 48 h. para obtener así una concentración equivalente de CFU en todas las bacterias utilizadas en el presente estudio.

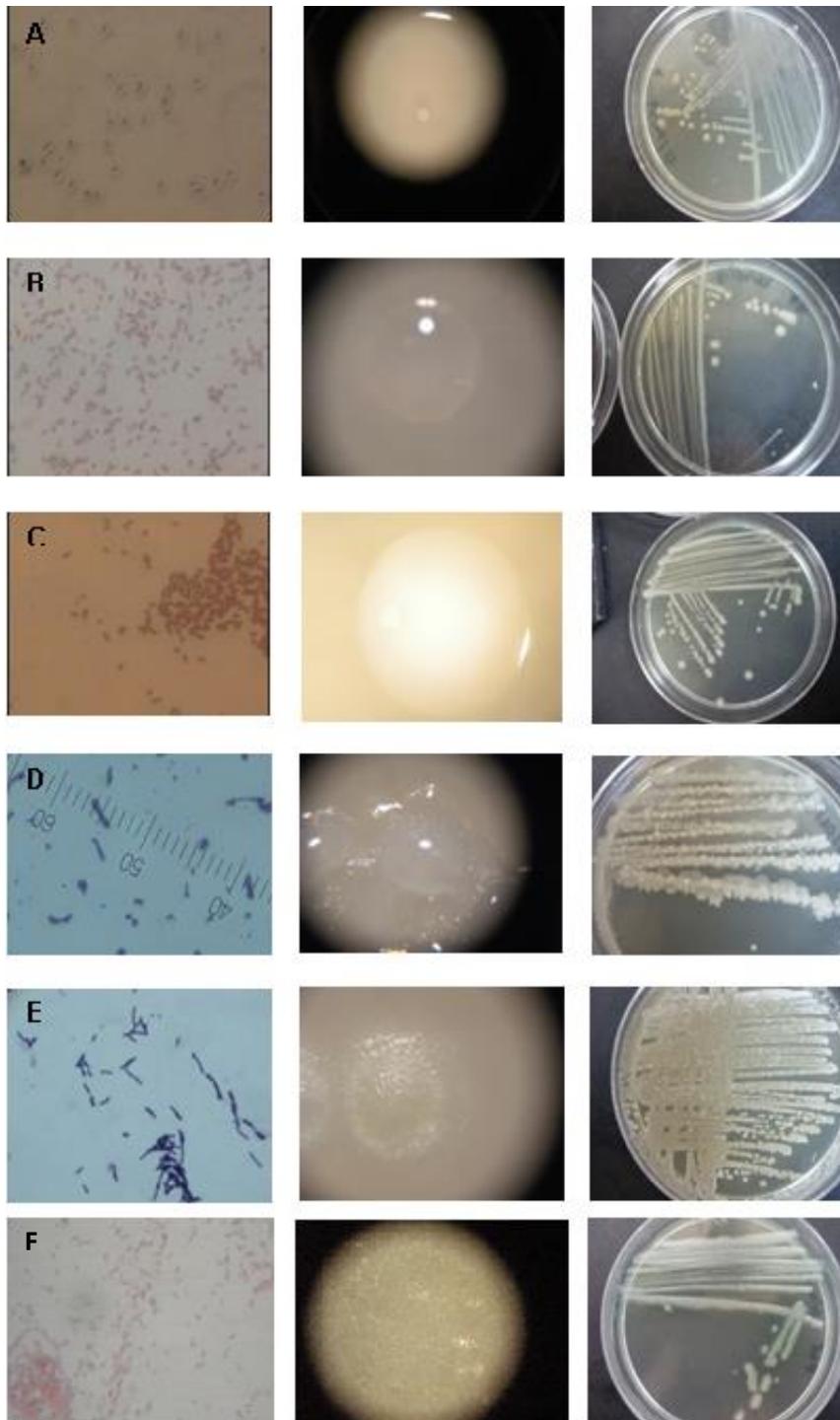


Figura 3. Primera columna de izquierda a derecha: Tinción de Gram, fotos de colonias bacterianas y crecimiento en agar nutritivo de las diferentes especies bacterianas **A)** *Cupriavidus necator*, **B)** cepa 79, **C)** *Agrobacterium tumefaciens*, **D)** cepa 73, **E)** Actinomiceto **F)** *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla 1. En la tabla se presenta la morfología de las colonias bacterianas aisladas, contemplando características como forma, borde, elevación, textura, color, luz reflejada entre otras.

	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color	Forma microscópica	Tinción Gram	Pigmentación
<i>Cupriavidus necator</i>	Puntiforme	Entero	Convexa	Blanda	Crema	Bacilo	-	-
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Irregular	Entero	Convexa	Mucosa	Traslucida	Bacilo	-	-
Actinomiceto	Puntiforme	Ondulado	Elevada	Dura	Crema	Bacilo	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Irregular	Entero	Convexa	Blanda	Beige	Bacilo	-	+
Cepa 73	Irregular	Lobulado	Monticular		Crema	diplococos	+	-
Cepa 79	Circular	Entero	Convexa	Blanda	Crema	Bacilo	-	-

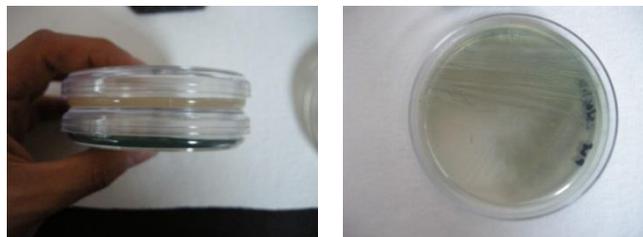


Figura 4. Pigmento producido por *P. aeruginosa*

❖ Ensayos de preferencia alimenticia de *C. steinii* sobre bacterias

Se realizaron ensayos sobre la preferencia alimenticia de *C. steinii* usando dos modelos de molde fabricados de resina. El primer molde (molde tipo I Fig. 1A) consistía en una oquedad interconectada por canaletas con 8 pozos donde fueron colocadas las diferentes bacterias, esperando la migración del ciliado en función de su preferencia bacteriana.

Trofozoítos de *Colpoda steinii* en ensayo tipo I

En este ensayo *Colpoda steinii* mostró diferencias significativas en la selección entre las diferentes sus presas bacterianas (ANOVA; $P=0.05$). La prueba *post hoc* de *Tukey* ($\alpha=0.005$) mostró diferencias entre las medias del número de trofozoítos en presencia *Agrobacterium tumefaciens*, la cepa de actinomiceto y las dos oquedades vacías. Siendo *A. tumefaciens* la especie bacteriana que presentó la mayor cantidad de trofozoítos de *C. steinii* con respecto a las otras especies utilizadas en los ensayos ($P = 0.05$; Fig. 5).

Por otra parte la cepa de actinomiceto y las dos oquedades vacías fueron las de menor cantidad de trofozoítos de *C. steinii*. Otras presas que mostraron valores altos de trofozoítos del ciliado sin ser significativos fueron las presas *Pseudomonas aeruginosa*, *Cupriavidus necator* y la cepa 73.

Quistes de *Colpoda steinii* en ensayo tipo I

En el caso de las estructuras de resistencia también se encontraron diferencias significativas (ANOVA; $P=0.05$). El mayor número de quistes de *C. steinii* se registró en las cavidades con actinomicetos, la cepa 73 y la cavidad vacía. La prueba de *Tukey* ($\alpha=0.05$) mostró que los promedios de quistes son diferentes en presencia de las presas *P. aeruginosa*, *C. necator* y el actinomiceto (Fig. 5). Siendo esta última especie bacteriana la que presentó el mayor número de quistes.

En cambio *P. aeruginosa* y *C. necator* fueron las cepas con menores proporciones de quistes observados siendo *C. necator* la que mostró la menor proporción de quistes de las dos.

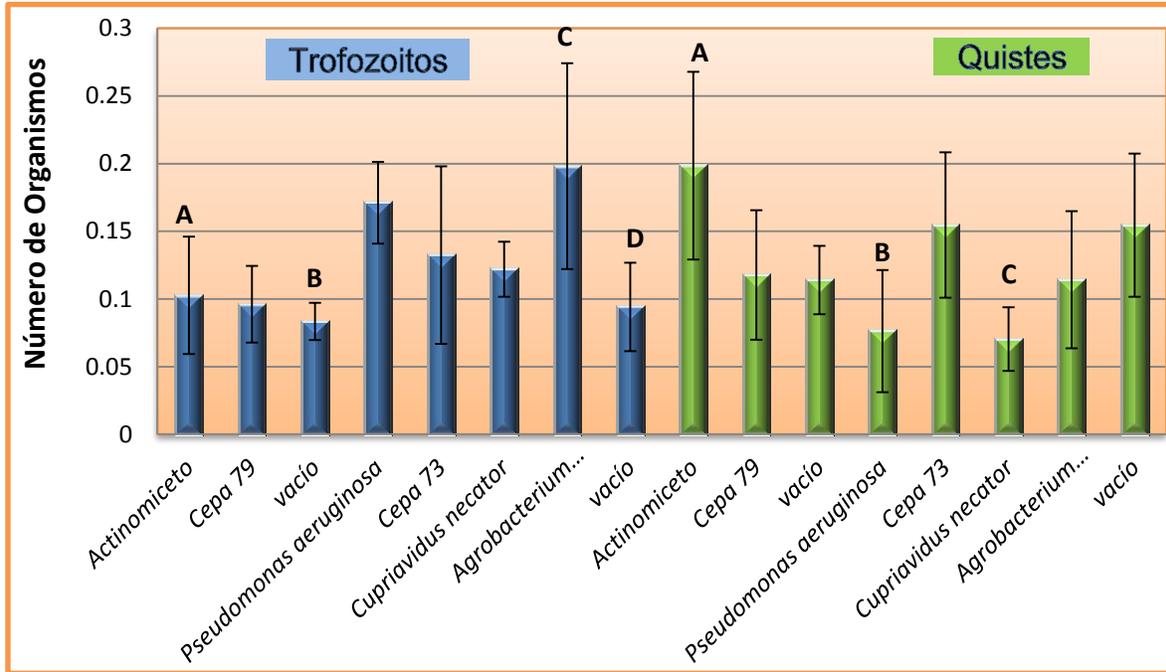


Figura 5. Conteo de trofozoítos y quistes de *C. steinii* en presencia de las seis presas bacterianas en el ensayo con el molde tipo I, las letras indican las presas que mostraron diferencia significativa $n=4$. Las líneas en las barras representan la desviación estándar.

Trofozoítos en ensayo de tipo II

Por otro lado, los ensayos con el molde de tipo II (Fig. 1B) que consistían de una cavidad central (donde se inocularon las células de *C. steinii*) con cuatro oquedades interconectadas por canaletas. Cada oquedad contenía un inóculo bacteriano distinto o en algunos la oquedad quedó vacía sin inóculo bacteriano. Para este ensayo se parearon las diferentes especies de bacterias realizando once posibles combinaciones.

En estas condiciones *C. steinii* mostró selectividad por *P. aeruginosa* que destacó como la bacteria con los conteos más altos de trofozoítos del ciliado en la mayoría de las combinaciones, manifestando diferencias estadísticamente significativas.

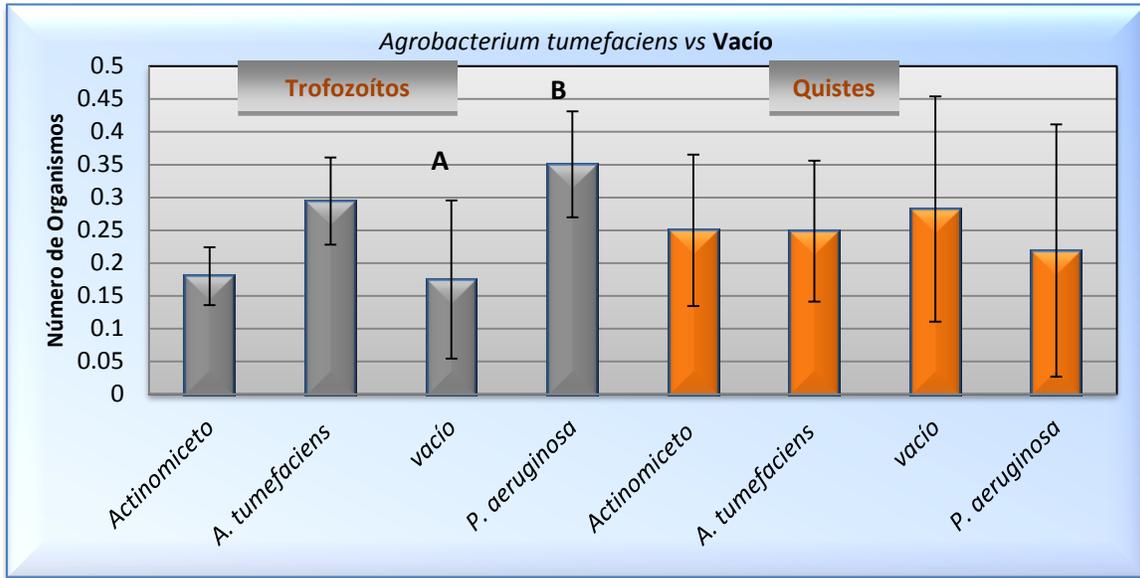


Figura 6. Combinación de *A. tumefaciens* vs vacío en el ensayo tipo II. Las letras indican las oquedades que mostraron diferencias significativas $n=4$. Las líneas en la barras indican la desviación estándar.

Además, en los ensayos pareados, se cuantificaron un número considerable de trofozoítos de *C. steinii* en la oquedad donde se inoculo *Cupriavidus necator* y *A. tumefaciens*; mostrando diferencias significativas en ambas presas.

Otra de las cavidades que mostró diferencias significativas en cuanto a los trofozoítos de *C. steinii* fueron las cavidades vacías teniendo los números de ciliados más bajos en todas las combinaciones.

Por otro lado en algunas combinaciones con la cepa 73 se contaron pocos trofozoítos del ciliado, pero en otras combinaciones se contabilizaron gran cantidad de trofozoítos, sobre todo en la combinación con la cepa 79 donde el mayor número de trofozoítos se contabilizó en la cepa 73 y en la combinación con la cavidad vacía donde el mayor número de trofozoítos se observó en la cepa 73.

Quistes de *Colpoda steinii* en ensayo tipo II

En las cavidades en donde se inoculó el actinomiceto y en donde no hubo inoculo bacteriano mostraron la mayor cantidad de estructuras de latencia de *C. steinii* mostrando diferencias estadísticamente significativas (*Tukey* $\alpha=0.05$). Además *C. steinii* también mostró un alto índice de enquistamiento con la cepa 73 en los diversos ensayos con los diferentes grupos bacterianos (Apéndice I).

Del mismo modo con la cepa 79, el ciliado presentó en algunas combinaciones un número de enquistamiento alto, pero sin ser significativo.

Por otra parte, *C. steinii* mostró pocas estructuras de resistencia especialmente con las presas *C. necator* y *P. aeruginosa* expresando diferencias significativas y teniendo los índices más bajos de enquistamiento en estas dos especies bacterianas (*Tukey* $\alpha=0.05$; Apéndice I).

Asimismo *C. steinii* mostró una proporción muy baja de enquistamiento con la presa *Agrobacterium tumefaciens* sin mostrar diferencias significativas en las pruebas pareadas.

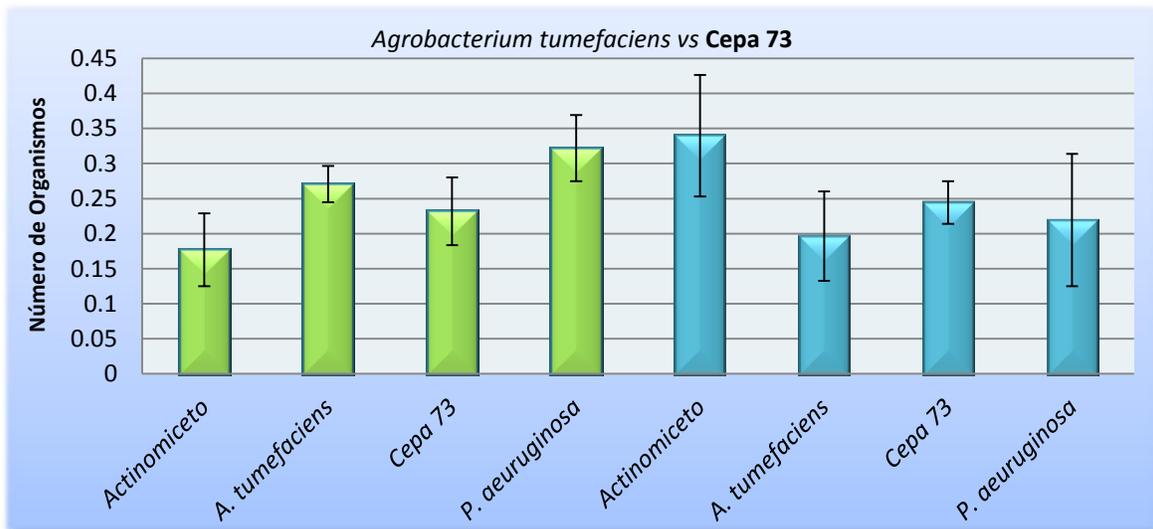


Figura 7. Combinación *A. tumefaciens* vs 73. Las líneas en la barras indican la desviación estándar. Las letras indican las oquedades que mostraron diferencias significativas $n=4$. Las líneas en la barras indican la desviación estándar.

DISCUSIÓN

Los estudios sobre la preferencia alimenticia en protozoos bacterívoros se han enfocado en la selección de la presa; basándose en sus atributos físicos tales como la forma y el tamaño de la célula, así como la composición de su membrana. Todas estas características están relacionadas con la discriminación de la presa así como la capacidad de digestión de la misma por el depredador (Fenchel, 1986; Young, 2006; Czarnecka y Chróst, 2003; Sherr y Sherr, 2002; González *et al.*, 1990; Thurman *et al.*, 2010; Šimek y Chrzanowski, 1992; Jürgens y Matz, 2002; Posch *et al.*, 2001). Algunos flagelados y ciliados tienen la capacidad de elegir células bacterianas grandes en comunidades bacterianas de diversos tamaños (Boenigk y Arndt, 2002; González *et al.*, 1990). Sin embargo, los mecanismos de selección son aún desconocidos.

Se ha observado que los ciliados tienen una preferencia por las bacterias de tipo Gram-negativas (Ayo, 2001). El ciliado *Colpoda steinii* es un protozoo bacterívoro y se ha observado que en condiciones de cultivo sus poblaciones pueden desarrollarse de manera eficiente teniendo como fuente de alimento a bacterias con características Gram-negativas, como *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter chroococcum* y *Escherichia coli* (Griffiths, 1986; Darbyshire, 1972; Drake y Tsuchiya, 1977; Kidder y Stuart, 1939)

En este estudio se utilizaron cuatro cepas bacterianas con características de pared Gram-negativa y forma de bacilo que fueron *Agrobacterium tumefaciens*, *Cupriavidus necator* y la cepa 79, además de *Pseudomonas aeruginosa*. Asimismo se aisló una cepa de actinomiceto con morfología de bacilo y la cepa 73 con morfología de cocos, ambas de características Gram-positivas (Fig. 3; Tabla 1).

La mayor cantidad de trofozoítos de *C. steinii* fue contabilizada en las oquedades donde se inocularon bacterias de características Gram-negativas, por lo que podemos decir que este ciliado prefirió las presas con esta característica. En contraste con las presas Gram-positivas mostraron bajos conteos de trofozoítos y altos índices de enquistamiento.

Las cepas con características Gram-positivas mostraron conteos bajos de trofozoítos y en contraste mostraron los valores más altos de enquistamiento. Este fenómeno sugiere que estas cepas bacterianas, aunque probablemente son depredadas, causan un efecto negativo produciendo el enquistamiento de *C. steinii*. En este caso la característica Gram podría ser un factor determinante en la selección de alimento. La baja “comestibilidad” de las bacterias Gram-positivas podría estar relacionada con la baja tasa de digestión de la pared celular que presentan, lo que podría permitir su supervivencia, además de que sus tasas de crecimiento son más bajas en comparación con las Gram-negativas (Montagnes, 2008). Estas características morfológicas que presentan tanto la cepa 73 y el actinomiceto, podrían volverlos presas poco atractivas para *C. steinii*. Resultados similares fueron reportados por Ayo *et al.*, (2001) quien mostró el consumo de *Klebsiella pneumoniae*, que es una bacteria Gram-negativa con forma de bacilo, presentó la tasa más rápida de depredación por nueve morfotipos de ciliados; en contraste con *Staphylococcus epidermidis* una bacteria Gram-positiva y con forma de cocos que presentó la menor tasa de depredación. Esto podría ser debido a la calidad del alimento (determinada por la proporción de C: N: P) que representa para el ciliado (Shannon *et al.*, 2007; Mitra y Flynn, 2005).

La condición de Gram se relaciona con la digestión de las bacterias, sin embargo esto no es un factor absoluto, ya que muchas Gram-negativas de ningún modo podrían ser comestibles, como aquellas con la capacidad de producir sustancias que son tóxicas para algunas especies de protozoos. Otros factores que afectan la resistencia a la depredación son; tamaño, morfología celular, motilidad y la formación de biopelículas de la presa (Ronn, 2002).

En el presente estudio, en el ensayo de tipo I, *C. steinii* mostró diferencias significativas al preferir a la presa *A. tumefaciens*, no obstante *P. aeruginosa* también presentó gran cantidad de trofozoítos pero no mostró diferencias significativas. Ambas presas con altas cantidades de trofozoítos del ciliado. Estas dos presas presentan forma de bacilo, el tamaño de estas oscila entre 3 y 5 μm (Krieg y Holt, 1984). Tanto *P. aeruginosa* como *A. tumefaciens* son bacterias de mayor tamaño comparadas con los cocos de la cepa 73 y más pequeñas que la cepa de actinomicetos. Por lo que el

tamaño de la presa puede ser un parámetro importante en la selección y captura cuando el depredador se encuentra en contacto directo con la presa. En el ensayo pareado con el molde tipo II también se observó una tendencia similar al contabilizar más trofozoítos de *C. steinii* en las oquedades donde se inoculó *A. tumefaciens* y *P. aeruginosa*. Lo que concuerda con los resultados mostrados en el ensayo con el molde de tipo I (Fig. 5). Manifestando una clara tendencia de *C. steinii* a consumir indistintamente estas dos presas (ver apéndice I) mostrando diferencias significativas por encima de las demás bacterias que componen el ensamble microbiano ensayado.

Asimismo, en los ensayos pareados, se cuantificaron un número considerable de trofozoítos de *C. steinii*, en la oquedad donde se inoculó *C. necator*, que es una bacteria con forma de bacilo. En el ensayo con el molde tipo I se cuantificó una menor cantidad de trofozoítos del ciliado con la presa *C. necator*, en comparación con los conteos en las cámaras que contenían las presas *P. aeruginosa* y *A. tumefaciens*. Sin embargo en la pruebas con el molde tipo II la cantidad de trofozoítos de *C. steinii* con la presa *C. necator* fue incluso mayor que *P. aeruginosa*, mostrando en algunas combinaciones diferencias significativas (Apéndice I).

Se ha observado que presas en rangos de tamaño grandes ($>5 \mu\text{m}$) no son seleccionadas *per se*, ya que si la presa es demasiado grande o demasiado pequeña ($<2 \mu\text{m}$) podría no ser depredada debido a otras características como la motilidad (Matz y Jürgens, 2005) representando un gasto energético mayor para el depredador. Esto influirá en la probabilidad de contacto, el tiempo y capacidad de captura de la presa, así como el valor nutritivo para el depredador (Montagnes, 2008; Fenchel, 1986).

Las presas con mayor número de trofozoítos del ciliado fueron aquellas que presentaron forma de bacilo que son células de mayor dimensión. Asimismo *C. steinii* no mostró preferencia por la cepa 73 la cual presentó morfología de cocos. Existen reportes sobre una clara preferencia por bacterias en rangos de tamaños de $2\text{-}5\mu\text{m}$ (Boenigk y Arndt, 2002, Tan, 2010; González *et al.*, 1990; Simek *et al.*, 1994). Como el estudio de Turley *et al.* (1986) que mostraron durante la alimentación de dos especies de ciliados bacterívoros, que estos removieron las bacterias grandes en forma de bacilo antes que bacterias pequeñas con formas de cocos. Por lo que si el

grado de preferencia está dado por esta característica, podría controlar el tamaño y la estructura de la comunidad de bacterias presentes en el suelo (Matz y Jürgens, 2003).

Por otro lado se ha reportado una consistente selección negativa de los ciliados por el grupo de las Actinobacterias (Jazbera, 2005). Incluso existen reportes de la completa resistencia a la depredación por protozoos convirtiendo a los actinomicetos en un grupo dominante en un sistema de cultivo continuo (Pernthaler *et al.*, 2001). Asimismo se ha reportado que algunos actinomicetos en cultivo inducen lisis sobre protozoos (Zaher *et al.*, 1953).

Los actinomicetos muestran pleomorfismo dependiendo del estadio, el medio en el que se encuentren, entre otros. Estos pueden presentarse como bacilos Gram-positivos, y generalmente la forma filamentosa produce micelios y esporas. En el presente estudio la cepa de actinomiceto utilizada presentó forma de bacilo, estos mostraban la característica de formar cadenas largas de células entrelazadas. Esta agrupación celular de la presa pudo ser determinante en la elección y alimentación del ciliado. Ya que aunque si se contabilizaron trofozoítos en la cavidad donde se colocó el actino, estos mostraron valores muy bajos con relación a las demás presas. Por lo que asumimos que *C. steinii* si puede llegar a alimentarse de este tipo de presas, pero estos no son un componente esencial de la dieta de este ciliado, ya que los afecta, como aquí fue el caso. El mayor índice de enquistamiento tanto en los ensayos de tipo I como tipo II se presentó con la cepa del actinomiceto mostrando diferencias significativas (Tukey $\alpha=0.005$; Apéndice I). Por lo que tanto las características morfológicas del actinomiceto así como los metabolitos producidos por estos, pudieron jugar un papel importante induciendo un estado de enquistamiento en *C. steinii*.

El tamaño y la forma son características predominantes para la selección e ingestión de la presa, pero además existen otros factores que influyen en la depredación; como la capacidad para producir compuestos tóxicos o inhibidores y las respuestas quimiosensoriales (Verity, 1991; Hamels *et al.*, 2004; Martel, 2006; Wootton *et al.*, 2007; Gruber *et al.*, 2009; Martel, 2009; Dopheide, 2011)

En general los actinomicetos y las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* producen diversas sustancias para inhibir la competencia o la depredación; entre estas sustancias encuentran toxinas, pigmentos y antibióticos. En particular *P. aeruginosa* es capaz de producir una gran cantidad de compuestos extracelulares como son los pigmentos (Liu, 1974; Liu y Nizet, 2009) entre estos las fenazinas, que pueden llegar a ser realmente tóxicos y causar la muerte de algunos protozoos, se ha reportado que hasta 64% de las cepas de *Pseudomonas* aisladas del ambiente natural producen sustancias tóxicas (péptidos y ácidos orgánicos), pero la pioverdina pigmento producido por la misma bacteria fue inefectivo sobre el ciliado *Colpidium campylum* (Pussard, 1994). Este mismo efecto se presentó con el ciliado *C. steinii* que incluso mostró ser selectivo a la cepa de *P. aeruginosa*. En el presente estudio la menor proporción de enquistamiento se observó con *P. aeruginosa* mostrando diferencias significativas (Tukey $\alpha=0.005$; Apéndice I) a pesar de que esta produjo metabolitos y mostró una pigmentación verde (Fig. 4). Por lo que asumimos que el pigmento producido por *P. aeruginosa* no tuvo un efecto tóxico sobre el ciliado. Esto podría conducirnos a que lejos de que los pigmentos generados por *P. aeruginosa* sean tóxicos para *C. steinii* pueden estar actuando como atrayentes e intensificar la señal química, por lo que la respuesta quimiosensorial beneficiaría al depredador reduciendo el tiempo de búsqueda de la presa (Tan, 2010).

Es de destacar que la selectividad de *C. steinii* por *P. aeruginosa* y *A. tumefaciens*, en este estudio, mostró diferencias significativas con el resto de las bacterias (Fig. 6 y 7). Se sabe que estas dos especies bacterianas de vida libre, tienen efectos patógenos para las plantas. Esto podría conducirnos a sugerir, que en efecto, *C. steinii* en este tipo de ambientes limitantes puede estar actuando como control biológico eligiendo bacterias que pudieran presentar un efecto negativo para la planta (Jousset *et al.*, 2009, Müller *et al.* 2013)

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se aislaron de un suelo contaminado con hidrocarburos. Los géneros *Pseudomonas*, *Cupriavidus*, *Agrobacterium*, y las *Actinobacterias* son importantes en áreas biotecnológicas. Existen reportes de su poder de reducción de compuestos contaminantes como los hidrocarburos y juegan un prominente rol en los estudios de biodegradación, por su fácil aislamiento, cultivo y

rápido crecimiento en laboratorio. Además se aisló de este mismo sitio el ciliado *C. stenii* que tiene la característica trófica de ser bacterívoro (Mondragón-Camarillo, 2011).

Los protozoos bacterívoros como *C. steinii*, afectan, por medio de la depredación, a las comunidades bacterianas. Sugiriendo que tienen un efecto significativo en la persistencia, adaptación y diversificación bacteriana (Matz y Kjellebers, 2005; Šimek *et al.*, 1997).

Los protozoos junto con los nemátodos son los más importantes depredadores de bacterias (Ronn 2012). Se han reconocido algunos efectos de la depredación que estos ejercen sobre las comunidades bacterianas contribuyendo al flujo de nutrientes en los diferentes ciclos biogeoquímicos principalmente en el del nitrógeno, carbono y fósforo (Griffiths, 1986; Darbyshire, 1972; Darbyshire, 1994; Clarholm, 2005).

Este tipo de estudios proveen información para entender mejor las relaciones de depredación de los microorganismos que habitan tanto en suelos perturbados como agrícolas, y de esta manera comprender de mejor forma los procesos que en ellos ocurren, para así entender el papel que podrían estar desarrollando en la economía general del suelo.

CONCLUSIÓN

Nuestros datos indican que existe un contraste en la preferencia alimenticia sobre presas con diversas morfologías, tamaños, características de pared, producción de pigmentos por parte del ciliado *C. steinii*.

El ciliado *C. steinii* mostró preferencia alimenticia por las presas *P. aeruginosa* y *A. tumefaciens*, mostrando la mayor cantidad de trofozoítos en las cavidades donde se inocularon estas dos presas, por lo que la forma y el tamaño de estas presas podrían influenciar su selección sobre las demás presas del estudio.

Así mismo, la cepa de actinomiceto utilizada en este estudio indujo la mayor proporción de enquistamiento del ciliado.

Por otro lado, *C. steinii* se alimentó principalmente de presas con características Gram-negativas. Las presas con característica Gram-positiva tuvieron un efecto negativo para el ciliado induciendo el enquistamiento del ciliado. Esto indica que la característica de la pared es un factor importante en la elección de las presas.

Se necesitan más estudios sobre la señalización química utilizadas por estos organismos para determinar su comportamiento alimenticio.

LITERATURA CITADA

- ❖ Adl, M. S. y Gupta V.V.S.R. (2006). Protist in soil ecology and forest nutrient cycling. Disponible en: <http://cjfr.nrc.ca>.
- ❖ Ayo, B., Santamaría, E., Latatu, A., Artolozaga, I., Azúa, I., Iriberrí, J. (2001). Grazing rates of diverse morphotypes of bacterivorous ciliates feeding on four allochthonous bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 33: 455-460.
- ❖ Bamforth, S. (1992). Sampling enumerating soil protozoa. En: *Protocols in Protozoology*. Editado por Lee J. y A. Soldo. Allen Press, INC. Kansas, EUA. Pág. B-5.1- B-5.3.
- ❖ Bamforth, S. S. (2001). Proportions of active ciliate taxa in soils. *Biol Fertil Soils*, 33: 197-203.
- ❖ Boenigk, J. y Arndt, H. (2002). Bacterivory by heterotrophic flagellates: community structure and feeding strategies. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81: 465-480.
- ❖ Bonkowski, M. (2004). Soil protozoa and plant growth: the microbial loop in soil revisited. *New Phytologist*, 162: 617-631.
- ❖ Bonkowski, M. y Brandt, F. (2002). Do soil protozoa enhance plant growth by hormonal effects? *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 1709–1715.
- ❖ Campbell, C.D., Warren, A., Cameron, C.M., Hope S. J., (1997). Direct toxicity assessment of two soils amended with sewage sludge contaminated

with heavy metals using a protozoan (*Colpoda steinii*) bioassay. *Chemosphere*, 34: 501-514.

- ❖ Casida, L. E. (1989). Protozoan response to the addition of bacterial predators and other bacteria to Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 1857-1859.
- ❖ Clarholm, M. (1981). Protozoan grazing of bacteria in soil. Impact and importance. *Microbial Ecology*, 7: 343-350.
- ❖ Clarholm, M. (2005). Soil protozoa: an under-researched microbial group gaining momentum. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 811-817.
- ❖ Coleman, D.C. (1994). The microbial loop concept as used in terrestrial soil ecology studies. *Microbial Ecology*, 28: 245-250.
- ❖ Cortés-Pérez, S. (2009). Cambio en la comunidad de amebas desnudas en suelo contaminado por combustóleo en el municipio de Jalacingo, Veracruz. Tesis Maestría. FES Iztacala, UNAM. 74 pág.
- ❖ Coûteaux, M. y Darbyshire J. (1998). Functional diversity amongst soil protozoa. *Applied Soil Ecology*, 10: 229-237.
- ❖ Czarnecka, M. y Chróst, R.J. (2003). Protozoans prefer large and metabolically active bacteria. *Polish Journal of Environmental studies*, 12: 325-334.
- ❖ Darbyshire, J. F., Davidson, M.S., Chapman, S.J., Ritchie S. (1994). Excretion of nitrogen and phosphorus by the soil ciliate *Colpoda steinii* when fed the soil bacterium *Arthrobacter* sp. *Soil Biology & Biochemistry*, 26: 1193-1199.

- ❖ Darbyshire, J.F. (1972) Nitrogen fixation by *Azotobacter chroococcum* in the presence of *Colpoda steinii*, the influence of temperature. *Soil Biology & Biochemistry*, 4: 359-369.

- ❖ Dopheide, A., Lear, G., Stott, R., Lewis, G. (2011). Preferential feeding by the ciliates *Chilodonella* and *Tetrahymena* spp. and effects of these protozoa on bacterial biofilm structure and composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 4564–4572.

- ❖ Drake, J.F. y Tsuchiya, H.M. (1977). Growth kinetics of *Colpoda steinii* on *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 34: 18-22.

- ❖ Fenchel, T. (1986). Protozoan filter feeding. *Progress in Protistology*, 1: 65-113.

- ❖ Fenchel, T. (1987). Ecology of protozoa. Science Tech, Inc. Madison, Wisconsin, USA. 197 pp.

- ❖ Ferrera-Cerrato, R. y Alarcón A. (2007). Microbiología Agrícola. Ed. Trillas, México. 568 pp.

- ❖ Finlay, B.J. y Fenchel T. (1996). Role of ciliates in the natural environment. En: Hausmann K., Bradbury P. C. (ed). Ciliates. Cells as organisms. Stuttgart: 417 pp.

- ❖ First, M. R., Park, N. Y., Berrang, M. E., Meinersmann, R. J., Bernhard, J. M., Gast, R. J., Hollibaugh, J. T. (2012). Ciliate ingestion and digestion: flow cytometric measurements and regrowth of a digestion-resistant *Campylobacter jejuni*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59: 12-19.

- ❖ Foissner, W., Berger H., Kohmann F., (1992). Taxonomische and ökologische revision der ciliaten des saprobiensystems band I: Cyrtophorida, Oligotrichida, Hypotrichia, Colpodea. - Informationsberichte des bayerischen landesamtes für wasserwirtschaft.
- ❖ Foissner, W. (1999). Soil protozoa as bioindicators: pros and cons, methods, diversity, representative examples. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 74: 95-112.
- ❖ Forge, T.A., Berrow, M.L., Darbyshire J. F., Warren, A. (1993). Protozoan bioassays of soil amended with sewage sludge and heavy metals, using the common soil ciliate *Colpoda steinii*. *Biol Fertil Soils*, 16: 282-286.
- ❖ González, J.M., Sherr, E.B., Sherr, B.F. (1990). Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 583-589.
- ❖ Griffiths, B. S. (1986). Mineralization of nitrogen and phosphorus by mixed cultures of the ciliate protozoan *Colpoda steinii*, the nematode *Rhabditis* sp. and the bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology and Biochemistry*, 18: 637-641.
- ❖ Griffiths, B. S. (1994). Microbial-feeding nematodes and protozoa in soil: Their effects on microbial activity and nitrogen mineralization in decomposition hotspots and the rhizosphere. *Plant and Soil*, 164: 25-33.
- ❖ Griffiths, B. S., Bonkowski, M., Dobson G., Caul S. (1999). Changes in soil microbial community structure in the presence of microbial-feeding nematodes and protozoa. *Pedobiologia*, 43: 297–304.

- ❖ Gruber, D. F., Tuorto, S., Taghon G. (2009). Growth phase and elemental stoichiometry of bacterial prey influences ciliate grazing selectivity. *J. Eukaryot. Microbiol*, 56: 466–471.

- ❖ Hamels, I., Mussche, H., Sabbe, K., Muylaert, K., Vyverman, W. (2004). Evidence for constant and highly specific active food selection by benthic ciliates in mixed diatoms assemblages. *Limnology and Oceanography*, 49: 58-68.

- ❖ Holtz, M.S., Ekelund, F., Rasmussen, L. D., Jacobsen, C. S., Johnsen, K. (2003). Prey-predator dynamics in communities of culturable soil bacteria and protozoa: differential effects of mercury. *Soil Biology & Biochemistry*, 35: 1175-1181.

- ❖ Janssen, M.P.M., Oosterhoff, C., Heijmans, G.J.S.M., Van der Voet, H. (1995). The toxicity of metal salts and the population growth of the ciliate *Colpoda cucculus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 54: 597-605.

- ❖ Jezbera, J., Horňák, K., Šimek, K. (2005). Food selection by bacterivorous protists: insight from the analysis of the food vacuole content by means of fluorescence in situ hybridization. *FEMS Microbiology Ecology*, 52: 351-363.

- ❖ Jousset, A., Rochat, L., Péchy-Tarr, M., Keel, C., Scheu, S., Bonkowski M. (2009). Predators promote defence of rhizosphere bacterial populations by selective feeding on non-toxic cheaters. *The ISME Journal*, 3: 666–674.

- ❖ Jürgens, K. y Massana, R. (2008). Protistan grazing on marine bacterioplankton. *Microbial Ecology of the Ocean*. Wiley-Liss, pp. 383-441.

- ❖ Jürgens, K. y Matz C. (2002). Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81: 413–434.

- ❖ Kidder, G.W. y Stuart, C.A. (1939). Growth studies on ciliates. II. The food factor in the growth, reproduction, and encystment of Colpoda. *Physiological Zoology*, 12: 341-347.

- ❖ Krieg, N. R. y Holt, J. G. (1989). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1*. Ed. Williams & Wilkins, USA, 410 pp.

- ❖ Liu, G.Y. y Nizet, V. (2009). Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends in Microbiology*, 17: 406-13.

- ❖ Liu, P.V. (1974). Extracellular Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Infectious Diseases*, Vol. 130, Supplement. Symposium on *Pseudomonas aeruginosa*, pp. S94-S99.

- ❖ Martel, C.M, (2006). Prey location, recognition, and ingestion by the phagotrophic marine dinoflagellate *Oxyrrhis marina*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 335:210–220.

- ❖ Martel, C.M. (2009). Conceptual bases for prey biorecognition and feeding selectivity in the microplanktonic marine phagotroph *Oxyrrhis marina*. *Microbial Ecology*, 57: 589-597.

- ❖ Mattison, R. y Haramaya, S. (2000). The predatory soil flagellate *Heteromita globosa* stimulates toluene biodegradaton by a *Pseudomonas* sp. *FEMS Microbiology Letters*, 194: 39-45.

- ❖ Matz, C. y Kjelleberg, S. (2005). Off the hook – how bacteria survive protozoan grazing. *Trends in Microbiology*, 13.
- ❖ Matz, C., y K. Jürgens. (2003). Interaction of Nutrient Limitation and Protozoan Grazing Determines the Phenotypic Structure of a Bacterial Community. *Microbial Ecology*, 45: 384-398.
- ❖ Matz, C., y K. Jürgens. 2005. High motility reduces grazing mortality of planktonic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 921–929.
- ❖ McCune, B. y Grace, J. B. (2002). *Analysis of Ecological Communities*. MjM, Glenden Beach, Oregon, USA.
- ❖ Mitra, A. y Flynn, K. J. (2005). Predator–prey interactions: is ‘ecological stoichiometry’ sufficient when good food goes bad? *Journal of Plankton Research*. Vol. 27, Num 5 p. 393-399.
- ❖ Mondragón-Camarillo, L. (2007). Efecto del combustóleo sobre la comunidad de ciliados y flagelados de un suelo de cultivo en Jalacingo, Ver. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 59 pp.
- ❖ Mondragón-Camarillo, L. (2011). Estructura Trófica de la Comunidad de Ciliados y Flagelados en un Suelo de Cultivo Contaminado con Combustóleo de Jalacingo, Veracruz. Tesis de maestría. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 56 pp.
- ❖ Montagnes, D.J.S., Barbosa, A. B., Boenigk, J., Davidson, K., Jürgens, K., Macek, M., Parry J.D., Roberts, E. C., Šimek, K. (2008). Selective feeding behaviour of key free-living protists: avenues for continued study. *Aquatic Microbial Ecology*, 53:83–98.

- ❖ Müller, M. S., Scheu S., Jousset A. (2013). Protozoa drive the dynamics of culturable biocontrol bacterial communities. *PLoS ONE* 8 (6): e66200. doi: 10.1371/journal.pone.0066200.

- ❖ Murase, J., Noll, M., Frenzel, P. (2006). Impact of protists on the activity and structure of the bacterial community in a rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 5436–5444.

- ❖ Nerad, T. A. y Dagget, P. (1992). Cultivation of selected colpodid ciliate. En: *Protocols in Protozoology*. Editado por Lee J. y A. Soldo. Allen Press, INC. Kansas, EUA. Pág. A-51.1- A-51.2.

- ❖ Nisbet, B. (1984). *Nutrition and Feeding Strategies in Protozoa*. Ed. Routledge. London. 280 pp.

- ❖ Nogales, B. (2005). La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas*, 14: 41-51.

- ❖ Odum, E.P. (1972). *Ecología*, Ed. Interamericana. México. 639 pp.

- ❖ Page, F.C. (1983). *Marine Gymnamoebae*. Institute of Terrestrial Ecology NERC. Cambridge, England Vol. 54 pp.

- ❖ Paul, E. y Clark, F. (1989). *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. Inc. San Diego California, USA. 275 pp.

- ❖ Pernthaler, J., Posch, T., Šimek, K., Vrba, J., Pernthaler, A., Glöckner, F.O., Nubel, U., Psenner, R. y Amann, R. (2001). Predator-specific enrichment of actinobacteria from a cosmopolitan freshwater clade in mixed continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2145–2155.

- ❖ Posch, T., Jezbera, J., Vrba J., Šimek, K., Pernthaler, J., Andreatta S., Sonntag B. (2001). Size selective feeding in *Cyclidium glaucoma* (Ciliophora, Scuticociliatida) and its effects on bacterial community structure: A study from a continuous cultivation system. *Microbial Ecology*, 42: 217-227.

- ❖ Pratt, J. y Cairns, J. (1985). Functional groups in the protozoa: role in differing ecosystems. *Protozool*, 32: 415-423.

- ❖ Pussard, M., Alabouvette, C. y Levrat., P. (1994). Protozoan interactions with the soil microflora and possibilities for biocontrol of plant pathogens. Pp. 123-146. En Darbyshire J.F. (ed). Soil protozoa. Cab International, London. 209 pp.

- ❖ Rogerson, A. y Berger J. (1983). Enhancement of the microbial degradation of crude oil by the ciliate *Colpidium colpoda*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 29: 41-50.

- ❖ Ronn, R., McCaig, A.E., Griffiths, B.S., Prosser, J.I. (2002). Impact of protozoan grazing on bacterial community structure in soil microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 6094–6105.

- ❖ Ronn, R., Vestergard M., Ekelund F. (2012) Interactions between Bacteria, Protozoa and Nematodes in Soil. *Acta Protozoologica*, 51: 223-235.

- ❖ Serrano-Vázquez, A., Pérez-Juárez, H., Hernández, A., Ayala, A., Antonio, I., Bazán-Cuenca, J., Tapia, M. A., Rodríguez-Zaragoza S., Vázquez-Cruz, C. y Rivera-Aguilar, V. M. (2013). Comunidades microbianas del suelo bajo el dosel de *Prosopis laevigata* en Tehuacán, Puebla. En el IV Congreso sobre manejo de ecosistemas y biodiversidad de la IX Convención Internacional sobre Medio Ambiente y Desarrollo. ISBN 978-959-300-034-5.

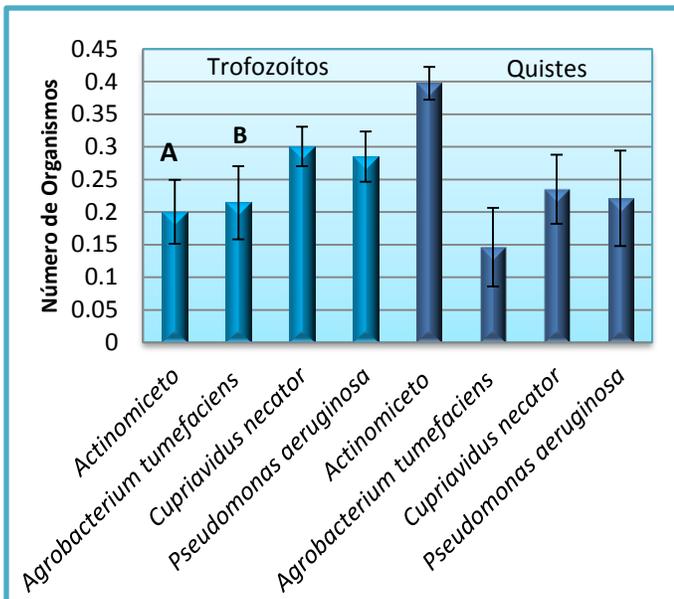
- ❖ Shannon, S. P., Chrzanowski, T., Grover, J. P. (2007). Prey food quality affects flagellate ingestion rates. *Microbial Ecology*, 53: 66–73.
- ❖ Sherr, B.F., Sherr, E.B., McDaniel, J. (1992). Effect of protistan grazing on the frequency of dividing cells in bacterioplankton assemblages. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 2381-2385.
- ❖ Sherr, E.B., y Sherr, B.F. (2002). Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81: 293-308.
- ❖ Sibbald, M.J. y Albright, L.J. (1988). Aggregated and free bacteria as food sources for heterotrophic microflagellates. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 613-616.
- ❖ Šimek, K. y Chrzanowski T. (1992). Direct and indirect evidence of size-selective grazing on pelagic bacteria by freshwater nanoflagellates. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 3715-3720.
- ❖ Šimek, K., Vrba, J., Hartman, P., (1994). Size-selective feeding by *Cyclidium* sp. on bacterioplankton and various sizes of cultured bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 14: 157-168.
- ❖ Šimek, K., Vrba, J., Pernthaler, J., Posch, T., Hartman, P., Nedoma, J., Psenner, R. (1997) Morphological and compositional shifts in an experimental bacterial community influenced by protists with contrasting feeding modes. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:587–595
- ❖ Skibbe, O. (1994). An improved quantitative protargol stain for ciliates and other planktonic protists. *Archiv für Hydrobiologie*. Pág. 339-347.

- ❖ Sleigh, M. (1979). The biology of protozoa. Contemporary biology. Ed. Edward Arnold, Great Britain. 315 pp.
- ❖ Stout, J.D. y Heal, O.W. (1972). Protozoa. In Soil Biology. Ed. By A. Burges and F. Raw. London, Academic Press. P. 149-189.
- ❖ Tan, L. S. (2010). Bacteria-Protozoan interactions in a mixed-species biofilm community. Tesis Doctoral. The University of New South Wales. Sydney, Australia.
- ❖ Thurman, J., Parry, J.D., Hill, P., Laybourn-Parry, J. (2010). The filter-feeding ciliates *Colpidium striatum* and *Tetrahymena pyriformis* display selective feeding behaviours in the presence of mixed, equally-sized, bacterial prey. *Protist*, 161: 577–588.
- ❖ Trielli, F., Chessa, M. G., Amaroli, A., Ognibene, M., Delmonte-Corrado, M.U. (2006). Effects of organophosphate compounds on a soil protist, *Colpoda inflata* (Ciliophora, Colpodidae). *Chemosphere*, 65: 1731-1737.
- ❖ Tso, S.F. y Taghon, G.L. (2006). Protozoan grazing increases mineralization of naphthalene in marine sediment. *Microbial Ecology*, 4: 460-9.
- ❖ Turley, C. M., Newell, R.C., Robins, D.B. (1986). Survival strategies of two small marine ciliates and their role in regulating bacterial community structure under experimental conditions. *Marine Ecology Progress Series*, 33:59-70.
- ❖ Vargas, R. (1990). Avances en microbiología de suelos: los protozoarios y su importancia en la mineralización del nitrógeno. *Agronomía Costarricense*, 14: 121-134.

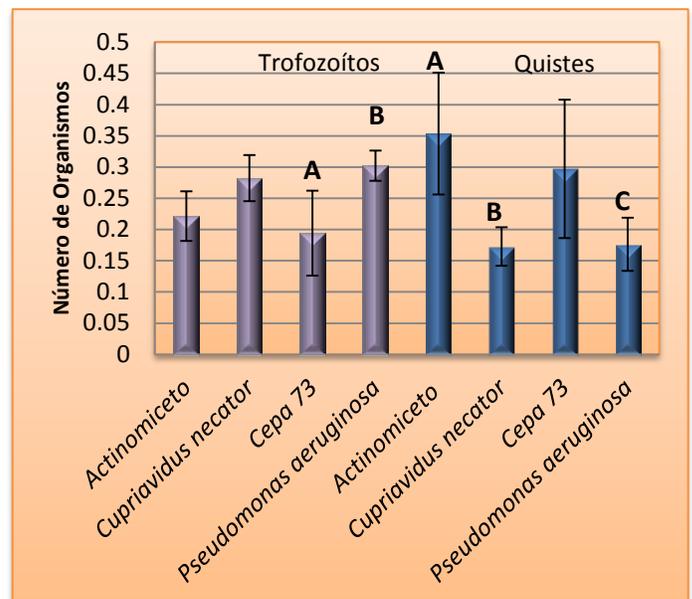
- ❖ Vecchioli, G.I., Del Panno, M.T., Paineira, M.T. (1990). Use of selected autochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in soil. *Environmental Pollution* 67:249-258.
- ❖ Verity, P. (1991). Feeding in planktonic protozoans: evidence for non-random acquisition of prey. *J. Protozoology*, 38: 69-76.
- ❖ Wootton, E.C., Zubkov, M.V., Jones, D.H., Jones, R.H., Martel C.M., Thornton, C.A., Roberts, E.C. (2007). Biochemical prey recognition by planktonic protozoa. *Environmental Microbiology*, 9: 216-222.
- ❖ Young, K. D. (2006). The selective value of bacterial shape. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70: 660–703.
- ❖ Zaher, F., Isenberg, H.D., Rosenfeld M.H., Schatz, A. (1953). The Distribution of Soil Actinomycetes Antagonistic to Protozoa. *The Journal of Parasitology*, 39: 33-37.

APENDICE I

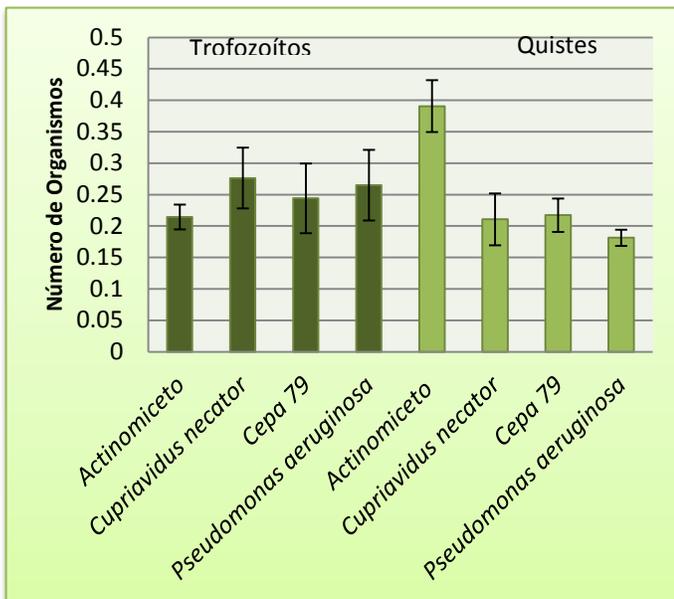
A



B



C



D

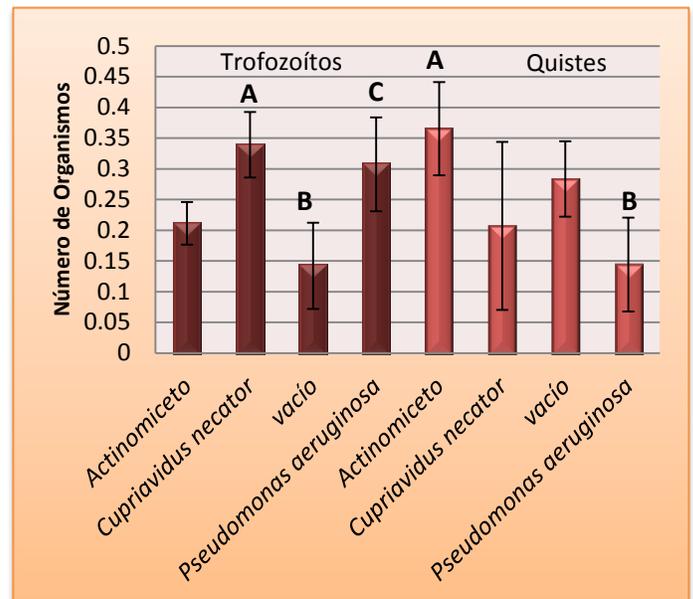


Figura 8. Conteo de trofozoítos y quistes en los ensayos pareados de las diferentes especies bacterianas con el molde de tipo II. Las letras en la gráfica indican las oquedades que mostraron diferencias significativas $n=4$. Las líneas en la barras indican la desviación estándar. **A)** *Agrobacterium tumefaciens* vs *Cupriavidus necator*, **B)** *Cupriavidus necator* vs Cepa 73, **C)** *Cupriavidus necator* vs Cepa 79, **D)** *Cupriavidus necator* vs Vacio.

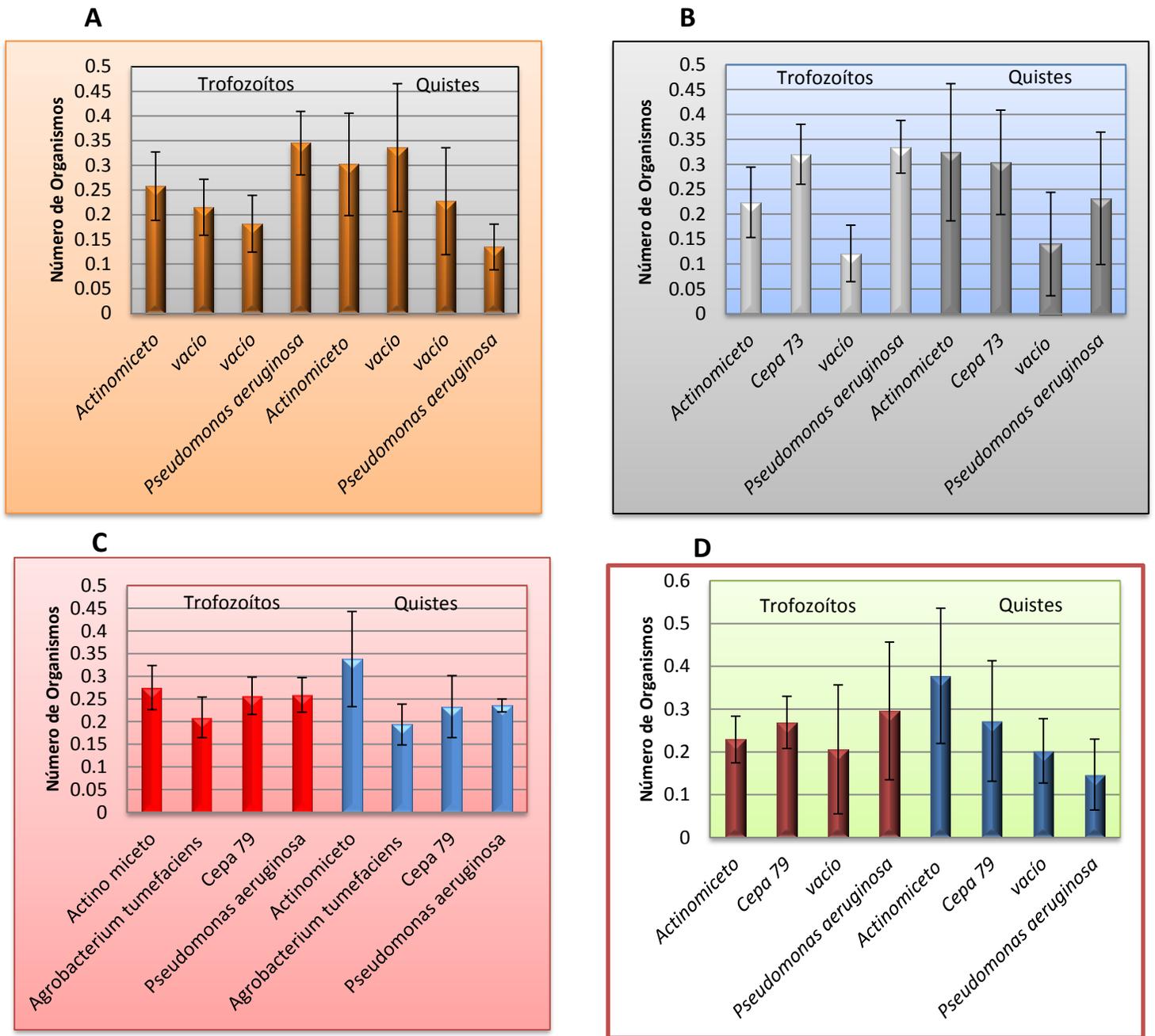


Figura 9. Conteo de trofozoítos y quistes en los ensayos pareados de las diferentes especies bacterianas con el molde de tipo II. Las letras en la gráfica indican las oquedades que mostraron diferencias significativas $n=4$. Las líneas en la barras indican la desviación estándar. **A)** Vacío vs Vacío, **B)** Cepa 73 vs Vacío, **C)** *Agrobacterium tumefaciens* vs Cepa 79, **D)** Cepa 79 vs Vacío.

E

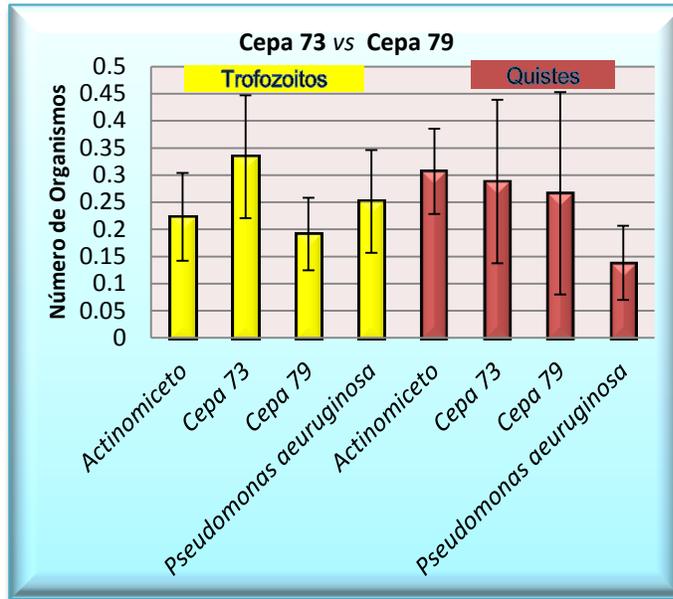


Figura 9. Conteo de trofozoítos y quistes en los ensayos pareados de las diferentes especies bacterianas con el molde de tipo II. Las letras en la gráfica indican las oquedades que mostraron diferencias significativas $n=4$. Las líneas en la barras indican la desviación estándar. **E)** Cepa 73 vs Cepa 79.

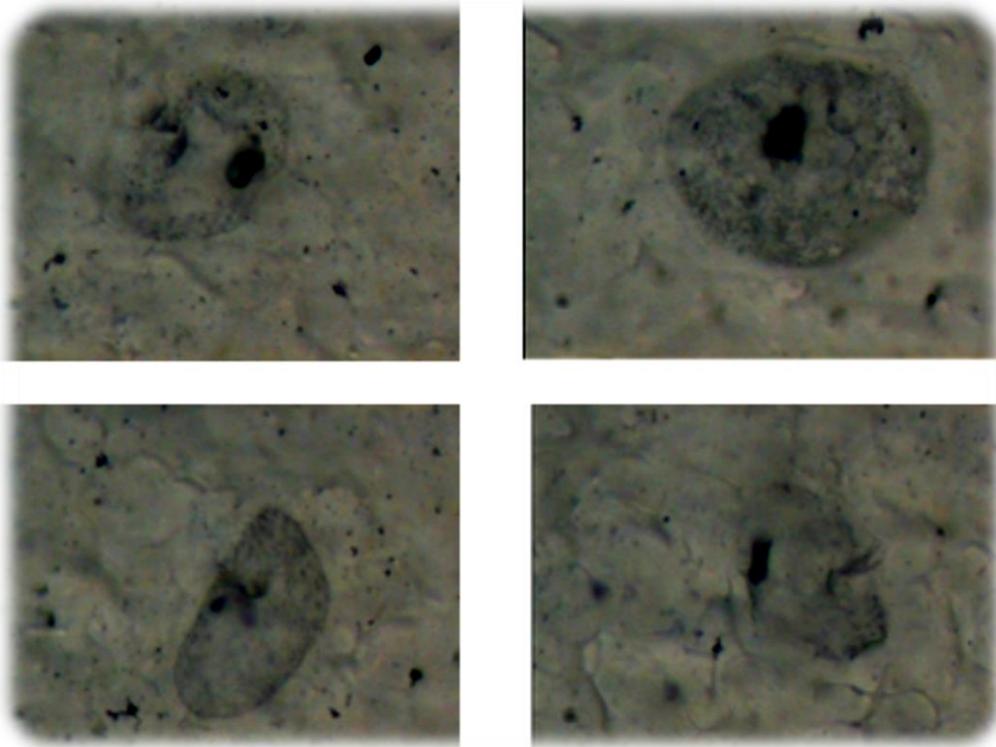


Figura 10. Tinciones con Proteinato de Plata (Protargol) de *C. steinii*

ANEXO I

Preparación de Medios de cultivo

Medio Agar Nutritivo

Componente	Cantidad
Extracto de carne	3 g
Peptona de carne	5 g
Agar-agar	12 g
Agua destilada	1000 mL

El pH se ajusta a 7 ± 2

Medio Agar Czapeck BD Bioxon

Componente	Cantidad
Sacarosa	30 g
Nitrato de sodio	3 g
Fosfato dipotásico	1 g
Sulfato de magnesio	0.05 g
Cloruro de potasio	0.5 g
Sulfato ferroso	0.01 g
Agar-agar	13 g
Agua destilada	1000 mL

El pH se ajusta a 7.3 ± 2

Medio Extracto de Suelo

Componente	Cantidad
Extracto de suelo	1000 mL
Agar-agar	13 g

El agar fue diluido en el extracto de suelo diluido 1:5

Soluciones, extractos, infusión

Gel de Agarosa Ultra PURE

Componente	Cantidad
Agarosa	1.0 g
Agua destilada estéril	100 ml

Calentar en microondas durante 1 minuto, agitar y vaciar.

Infusión de Pasto

Componente	Cantidad
Pasto	10 g
Agua destilada estéril	1000 mL
Peptona Biotriptasa	1 g

Se deja hervir por 5 minutos y posteriormente se le adiciona 1 g de peptona biotriptasa, se esterilizo y se refrigero para su posterior uso.

Solución de Neff

Componente	Cantidad
NaCl	1.20 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.04 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.04 g
Na ₂ HPO ₄	1.42 g
KH ₂ PO ₄	1.36 g
Agua destilada estéril	1000 mL

Hacer cada solución por separado en 100 ml

Extracto de Suelo

Componente	Cantidad
Suelo	200 g
Agua destilada	1000 mL

El suelo fue homogenizado y se colocó en baño María a 60 °C durante 2 h, se filtró a una temperatura aproximada de 40 °C, posteriormente se esterilizó y refrigeró para su posterior uso.