



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIÓLOGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**ECOLOGÍA**

**“Efecto de la depredación de *Colpoda* sp. en la fijación de nitrógeno en bacterias de vida libre”.**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**CARLOS MANUEL MARTÍNEZ REYES**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:**

**Dr. SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA**

Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

**COMITÉ TUTOR:**

**Dr. ALEJANDRO ALARCÓN.**

Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo

**Dra. NATHALIE ROBERTE CHANTAL CABIROL**

Facultad de Ciencias, UNAM.

México, Ciudad de México. Octubre 2019



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.







**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIÓLOGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**ECOLOGÍA**

**“Efecto de la depredación de *Colpoda* sp. en la fijación de nitrógeno en bacterias de vida libre”.**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**CARLOS MANUEL MARTÍNEZ REYES**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:**

**Dr. SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA**

Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

**COMITÉ TUTOR:**

**Dr. ALEJANDRO ALARCÓN.**

Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo

**Dra. NATHALIE ROBERTE CHANTAL CABIROL**

Facultad de Ciencias, UNAM.

México, Ciudad de México. Octubre 2019

OFICIO CPCB/926/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de mayo de 2019, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **MARTINEZ REYES CARLOS MANUEL**, con número de cuenta 308262449, con la tesis titulada "**Efecto de la depredación de *Colpoda* en la fijación de nitrógeno en bacterias de vida libre**". realizada bajo la dirección del **DR. SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA**:

Presidente: DRA. IRMA AURORA ROSAS PÉREZ  
Vocal: DR. MIROSLAV MACEK  
Secretario: DR. ALEJANDRO ALARCON  
Suplente: DRA. MARIA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA  
Suplente: DR. VICTOR MANUEL LUNA PABELLO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 2 de septiembre de 2019.



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

**COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**UNIDAD DE POSGRADO**  
Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria  
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX  
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>



# AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.

---

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por aceptarme dentro del programa de becas nacionales con el número de CVU 815229. Este fue un apoyo fundamental para la realización y conclusión de la presente tesis.

A nuestra máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, pilar en mi formación como estudiante y como individuo.

Agradezco a los miembros del comité tutor Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza (tutor principal), Dra. Nathalie Roberte Chantal Cabirol y Dr. Alejandro Alarcón, por sus todos los consejos y apoyo durante la realización de este proyecto.



# AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL.

---

Agradezco al Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza por instruirme académicamente y haberme integrado como un miembro más a su equipo de trabajo, por todas esas charlas. Al profesor Víctor Ramón Moreno Torres por encontrar en él buenos consejos tanto en lo profesional como en la vida. Gracias al Dr. Alejandro Alarcón y a la Dra. Nathalie Cabirol por su respaldo intelectual y técnico en la realización de este proyecto. A todos mis compañeros y amigos del laboratorio de ecología microbiana, no hubo persona en ese laboratorio con quien no consultara alguna duda o pidiera de su ayuda.

A las doctoras Irma Aurora Rosas Pérez, María Del Pilar Ortega Larrocea y a los doctores Miroslav Macek, Víctor Manuel Luna Pabello. Miembros de mi jurado, por sus estupendas observaciones para mejorar la presente tesis.

# DEDICATORIA.

---

A aquellos que han sido la guía a lo largo de mi vida; mis padres Carlos y Laura, sin su infinito apoyo y amor no lo hubiera logrado ¡muchas gracias! A mis hermanas Brenda y Martha, mis mayores referentes de éxito profesional, mis mejores amigas con quien siempre puedo contar, ¡las quiero hermanas! A mi mamá Rufina, mamá Martha y papa Chico, pilares en mi vida.  
Siento un profundo privilegio de contar con esta gran familia.

# INDICE.

---

1. Abstract	1
2. Resumen	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. HIPÓTESIS	6
5. OBJETIVO GENERAL	6
5.1 Objetivo General.	
5.2 Objetivo Particular.	
6. Material y Métodos.	7
6.1 Obtención y caracterización de ciliados.	
6.2 Cuenta de Protozoos.	
6.3 Obtención y Cultivo de bacterias.	
6.4 Preservación de cultivos aislados.	
6.5 Ensayos de preferencia alimenticia.	
6.6 Crecimiento bacteriano con y sin depredador.	
6.7 Actividad reductora de acetileno.	
6.8 Espectrometría de masas (MS).	
6.9 Modelo matemático del crecimiento bacteriano con y sin depredador.	
6.10 Cálculo del impacto de la depredación.	
7. Resultados	15
7.1 Aislamiento de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno	
7.2 Aislamiento de <i>Colpoda</i> e identificación	
7.3 Crecimiento poblacional de bacterias con y sin depredador.	
7.4 Relación depredador-presa.	
7.5 Preferencia alimenticia de <i>Colpoda</i> sobre bacterias.	
7.6 Reducción de Acetileno-etileno.	
8. Discusión	25
9. Conclusión.	28
10. Literatura Citada	29
11. Anexos.	3

# 1. RESUMEN.

---

La fijación biológica del nitrógeno está dada por un número restringido de procariontas, que incluyen a bacterias diazótropas de vida libre. No obstante, dentro de las comunidades bacterianas la depredación por protozoos juega un papel importante en la formación de biomasa bacteriana y a su vez, en los procesos de mineralización del nitrógeno. Este estudio evaluó el efecto de la depredación en la fijación biológica de nitrógeno durante el crecimiento población de bacterias de vida libre. Se usó a *Colpoda* sp. y a *Azospirillum lipoferum* como modelo depredador-presa, además de incluir a una bacteria silvestre (UTO D) de la cual se desconocía su capacidad fijadora. Para establecer si ambas bacterias eran depredadas, se hicieron pruebas de preferencia alimenticia. Además, se calcularon los principales parámetros poblacionales, así como las fases de crecimiento poblacional de cada bacteria en presencia y ausencia de depredación. Con la finalidad de conocer el potencial de la depredación en la fijación de N atmosférico, se estimó la actividad de la nitrogenasa a través de la prueba de reducción de acetileno en etileno. Esto se hizo antes y durante la fase exponencial de cada bacteria, en presencia y ausencia de depredación. *Colpoda* sp. no mostró diferencias significativas en la selección de sus presas bacterianas. La depredación disminuyó significativamente las abundancias de sus presas. Sin embargo, el depredador incrementó la formación del número de generaciones de presas, así como la velocidad específica de crecimiento en ambas poblaciones bacterianas. De acuerdo con el índice de impacto de depredación, *Colpoda* sp. tiene un efecto positivo en la formación de nueva biomasa bacteriana. Además, la depredación promovió una mayor actividad de la nitrogenasa en *A.lipoferum* y la UTO durante la fase lag (0.34nM y 0.38nM) seguida de la fase exponencial (0.27 nM y 0.17 nM). Lo anterior propone que *Colpoda* sp estimula la tasa de crecimiento bacteriano, al mismo tiempo que estimula la fijación de nitrógeno de *A lipoferum* y la UTO D.

## 2. ABSTRACT.

---

The biological fixation of nitrogen is given by a restricted number of prokaryotes, which include free-living diazotrophic bacteria. However, within the bacterial community's predation by protozoa plays an important role in the formation of bacterial biomass and in turn, in the processes of nitrogen mineralization. This study evaluated the effect of predation on the biological fixation of nitrogen during the population growth of free-living bacteria. *Colpoda* sp. and *Azospirillum lipoferum* were used as a predator-prey model, in addition to including a wild bacterium (UTO D) whose binding capacity was unknown. To establish whether both bacteria were predated, food preference tests were performed. In addition, the main population parameters were calculated, as well as the phases of population growth of each bacterium in the presence and absence of predation. In order to know the potential of predation in atmospheric N fixation, nitrogenase activity was estimated through the acetylene reduction test in ethylene. This was done before and during the exponential phase of each bacterium, in the presence and absence of predation. *Colpoda* sp. showed no significant differences in the selection of its bacterial prey. Predation significantly reduced the abundance of their prey. However, the predator increased the formation of the number of generations of prey, as well as the specific growth rate in both bacterial populations. According to the predation impact index, *Colpoda* sp. it has a positive effect on the formation of new bacterial biomass. In addition, predation promoted increased nitrogenase activity in *A.lipoferum* and UTO during the lag phase (0.34nM and 0.38nM) followed by the exponential phase (0.27 nM and 0.17 nM). The foregoing proposes that *Colpoda* sp stimulates the bacterial growth rate, while stimulating the nitrogen fixation of *A lipoferum* and UTO D.

### 3. INTRODUCCIÓN.

---

La actividad microbiana desempeña un papel activo en la fertilidad del suelo ya que es la fuerza motriz en los ciclos del carbono y el nitrógeno (Delgado y Follet, 2002), además de ser responsable de los procesos de descomposición y mineralización que aportan la mayor parte del flujo energético y las transformaciones que sufren los diferentes nutrientes. Estos procesos son necesarios en la mayoría de los ecosistemas para el crecimiento y el desarrollo de otros organismos (Wiegert y Owen 1971, Dominy y Haynes, 2002).

El nitrógeno es el elemento más abundante de la atmósfera terrestre y, sin embargo, es un nutriente muy escaso. Esto se debe a que el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) es inerte y no puede ser aprovechado por la mayoría de los seres vivos, únicamente se incorpora a los sistemas biológicos cuando ha sido fijado en su estado reducido u oxidado (Fernández De María, 2002). Dicha fijación biológica del nitrógeno, está dada por un número restringido de grupos de procariotas, que pueden asociarse a través de nódulos a la zona de raíces de algunas plantas, generando un mecanismo eficaz en la incorporación de nitrógeno disponible en los suelos, promoviendo una continua movilización y mineralización de nitrógeno orgánico como resultado de la lisis celular, de la formación de nueva biomasa microbiana y de la descomposición de otros componentes nitrogenados (Woldendrop, 1981), haciendo que casi por definición, la fijación biológica de  $N_2$  sea sinónimo de sostenibilidad (Kennedy y Tchan, 2006). De igual manera existe un rango diverso de especies bacterianas de vida libre que tienen la capacidad de fijar nitrógeno sin asociarse a alguna especie vegetal (Mulder y Brotonogoro, 1974), entre los que se incluyen a bacterias diazótrofes (fijadoras de nitrógeno) del género *Azospirillum* (Postgate 1982; Bailey y Ollis, 1986; Atlas y Bartha, 1993).

Dicha capacidad permite a estos organismos ser pioneros en la colonización de nichos pobres en nitrógeno, además de que dentro de los ecosistemas proveen de manera indirecta un aporte del nitrógeno que fijan una vez que mueren y son descompuestos (Kennedy y Tchan, 2006).

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso que consume mucha energía por lo que se ve limitado por la baja concentración de materia orgánica que pueda estar disponible para las bacterias (Klucas et al., 1991). Además, el amoníaco, así como nitratos y nitritos en altas concentraciones inhiben el complejo de la nitrogenasa (responsable de la conversión del nitrógeno molecular en amonio), tanto en los niveles de actividad transcripcional como enzimática (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). Una vez que los compuestos nitrogenados se agotan, las bacterias pueden crecer fijando nitrógeno molecular ( $N_2$ ) con ayuda de su complejo enzimático (Tsagou y Aggelis, 2006. Kefalogianni y Aggelis, 2002), denominado como nitrogenasa, la cual es responsable de la fijación de  $N_2$ . Asimismo, dicha maquinaria enzimática puede reducir acetileno ( $C_2H_2$ ) a etileno ( $C_2H_4$ ) (Dilworth, 1996), lo cual proporciona un ensayo útil y sensible en la cuantificación de la actividad reductora de dicha enzima.

Por otro lado, las comunidades microbianas están influenciadas por las interacciones entre sus individuos, tal es el caso de la depredación que tiene un potencial significativo en la estructura de las comunidades bacterianas, donde estas últimas son la principal fuente alimentaria de los protozoos heterotróficos de vida libre (Fenchel, 1987). A su vez, los protozoos son significativamente importantes en los procesos de mineralización del Nitrógeno en condiciones de suelo donde este nutriente es limitante (Elliott, 1978). Mostrando, por ejemplo, que la presencia de protozoos estimula la mineralización de nitrógeno orgánico del suelo y eleva en 40% su posterior absorción por las plantas, comparado con sistemas sin protozoos (Kuikma et al., 1990).

Si bien los protozoos son capaces de alimentarse de una amplia variedad de bacterias, también muestran un grado de preferencia hacia ciertas cepas bacterianas (Vargas y Hattori, 1990). La selectividad se basa en la facilidad con que las bacterias lleguen a ser digeribles (Vargas y Hattori, 1990), al valor nutricional que éstas presenten, y a diferencias bioquímicas más finas como son el contenido de ácidos grasos, pequeños cambios en la estructura de la pared celular, producción de toxinas, inhibidores o formación de moco (Mitra y Flynn, 2005). Además, los protozoos pueden mostrar selectividad al tamaño de las presas (Hahn y Höfle, 2001). Otros rasgos bacterianos, como la motilidad y la

forma, también pueden generar diferencias en la depredación de bacterias por protozoos (Hahn y Höfle, 2001. Jürgens y Güde, 1994, Matz y Jürgens, 2002). En ese sentido, la depredación por protistas es un factor que modifica la estructura de las poblaciones (Hahn y Höfle, 2001. Miki y Jacquet, 2008), la cual ejerce una presión disminuyendo drásticamente las abundancias bacterianas en poco tiempo. De este modo, los depredadores generalmente reducen la abundancia de sus presas provocando que disminuyan la misma abundancia del depredador por la falta de recursos tróficos para éste. Posteriormente, cuando las presas dejan de sufrir un ramoneo intenso, se promueve que nuevamente su abundancia incremente, seguido por la abundancia del depredador, dando como resultado oscilaciones entre depredadores y presas (Paisie et al., 2014).

Sin embargo, la reducción en el número de bacterias durante la depredación no está necesariamente acompañada por una reducción en el nivel de la actividad de las poblaciones de bacterias sobrevivientes (Wright et al., 1995). Como lo demuestran observaciones en entornos dedicados al tratamiento de aguas residuales, donde se sabe que los depredadores no necesariamente reducen el rendimiento general de sus poblaciones presa (Dolinsek et al., 2013). Las explicaciones para este efecto contraintuitivo son el desarrollo de una resistencia transitoria de las presas a la depredación (Shemesh y Jurkevitch 2014) y la adaptación constante de las bacterias que les confiere ventaja reproductiva (Otto et al., 2017), ya que, en los microentornos, los organismos dentro de una relación presa-depredador deben adaptarse y evolucionar constantemente para sobrevivir y reproducirse (Lythgoe y Read 1998. Matz et al., 2004). La actividad metabólica de las presas bacterianas también se ve afectada por la humedad y la porosidad del suelo. En este último caso Wright et al. (1995), reportaron que la mayor actividad metabólica surge de la liberación de nutrientes por parte del depredador y de la mayor accesibilidad de las bacterias a los nutrientes en los poros más grandes.

Por su parte, Güde (1985) sugiere que la depredación conduce a una liberación de nutrientes que habían sido inmovilizados en las células bacterianas, existiendo evidencias de que el amonio o el nitrógeno orgánico (Hunt et al., 1977 y Kuikman et al., 1990) y el fósforo (Cole et al., 1978) son liberados durante la depredación por protozoos. Es así como se incrementan los niveles de nutrientes



disponibles en el suelo (Wright et al., 1995), los cuales son esenciales para completar el ciclo celular bacteriano, al menos en una medida que se compense el consumo de presas por parte del depredador (Šimek et al., 2003). De esta manera se promueve que el impacto de la depredación en las poblaciones bacterianas se atenué incluso bajo una intensa presión de depredación ya que algunas poblaciones bacterianas desarrollan tasas de crecimiento extremadamente altas (Šimek et al., 2003).

Cabe señalar que la tasa de crecimiento es la velocidad con que nacen nuevos individuos. Por ello, la tasa de multiplicación o velocidad de crecimiento será constante cuando la fisión binaria ocurra a intervalos regulares por lo que el incremento de la biomasa celular se efectuará de manera exponencial (Elseth y Baumgardner, 1981) Por lo que en el presente estudio se plantea la siguiente pregunta: ¿Cuál es el efecto de la depredación de *Colpoda sp.* en la fijación de nitrógeno por *Azospirillum Lipoferum* y una unidad taxonómica operativa diazótrofa aislada del suelo?

## 4. HIPÓTESIS.

---

Si la depredación de *Colpoda* sp. estimula la velocidad de crecimiento en bacterias diazótrofes, entonces aumentará la fijación de nitrógeno de bacterias de vida libre durante la etapa exponencial de su crecimiento poblacional.

## 5. OBJETIVOS

---

### 4.1 Objetivo General.

- Evaluar el efecto de la depredación de *Colpoda* sp. en la fijación de nitrógeno en bacterias de vida libre.

### 4.2 Objetivos Particulares.

- Determinar la preferencia alimenticia de *Colpoda* sp. sobre bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno.
- Determinar la actividad reductora de acetileno-etileno en bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno, en presencia y ausencia de depredador.

# 6. MATERIAL Y MÉTODOS.

---

## 6.1. Obtención y caracterización de ciliados.

Los protozoos se obtuvieron a través del método del suelo húmedo, pero no inundando de Bamforth (1992) de un suelo de cultivo de maíz. Se depositó una alícuota en cajas de cultivo celular para obtener un cultivo mixto de protozoos. Los cultivos fueron observados en el microscopio invertido marca Olympus (CK2). Posteriormente con ayuda de una micropipeta de 50 µl se extrajeron los protozoos del género *Colpoda*, se aislaron en cajas de cultivo celular por medio de diluciones diarias de 100 µl con el objetivo de obtener cultivos monoxénicos y mantenerlos en su forma activa (trofozoíto) en cajas de Petri con medio salino LB, 1:100 (ver anexo) y finalmente, se dejaron en agitación constante. La identificación se hizo de acuerdo con la clave de Foissner et al. (1992).

Por otro lado, la identificación de los protozoos se apoyó mediante las observaciones de las estructuras internas. Para ello, las células se concentraron en un volumen de 30 ml de medio LB y se dejaron en agitación constante por 24 h. Se filtraron de 5 a 10 ml a través de una membrana de nitrocelulosa con apertura de poro de 0.22 µm previamente teñida con colorante Negro de Clorazol. Posteriormente se tiñeron con DAPI (Porter y Feig, 1980) y se observaron las células de *Colpoda* con ayuda de un microscopio de epifluorescente marca Olympus.

## 6.2. Conteo de Protozoos.

El conteo de ciliados para la inoculación de los tratamientos con una concentración conocida de células por mililitro se obtuvo mediante diluciones llevadas a cabo en cajas de cultivo celular de 24 pozos; se inocularon 10 µl del cultivo monoxénico en 1000 µl de medio LB estéril hasta completar una dilución de 10<sup>2</sup>. Posteriormente se mantuvieron en agitación constante por 24 h. Después se cuantificaron los microorganismos a partir de un conteo directo con ayuda de un microscopio invertido, no obstante, debido a la rápida movilidad de los

organismos en su forma de trofozoíto se promovió su enquistamiento con solución 10 mM de Cloruro de Calcio para la contabilización de quistes.

### **6.3. Obtención y cultivo de bacterias.**

De los cultivos monoxénicos en medio líquido de *Colpoda*, se tomaron 4 µl para inocularlos en cajas de petri con medio de cultivo Rennie (1981). el cual es un medio específico para bacterias cultivables fijadoras de nitrógeno de vida libre. Para el aislamiento y purificación de las cepas se hicieron siembras continuas por estría hasta obtener la presencia de un solo tipo de colonia (cultivo monoxénico). Cada cepa mantenida en cultivo puro se caracterizó de acuerdo con su morfología colonial (forma, tipo de elevación y borde de la colonia). Con la tinción de Gram se observó el tipo de pared celular, así como la identificación de formas básicas de las células bacterianas (cocos, bacilos y bacterias filamentosas). De esta manera se obtuvieron cuatro cepas bacterianas potencialmente fijadoras de nitrógeno, de las cuales se seleccionó la más abundante y que se denominó como UTO D.

La cepa de *Azospirillum lipoferum* fue proporcionada por el laboratorio de Microbiología de Suelos del Colegio de Postgraduados y se mantuvo en medio selectivo Rojo Congo (ver anexo), hasta su posterior uso.

### **6.4. Preservación de cultivos aislados.**

\*Ciliados.

Se tomó una alícuota de 1 ml del medio líquido LB donde se encontraban aislados los ciliados y se concentró por centrifugación a 100 x g durante 5 minutos. Se retiraron 900 µl de sobrenadante para luego agregar 900 µl del mismo medio de cultivo, se suspendió la pastilla y de nuevo se centrifugó a 1000 x g durante 5 minutos. Este proceso se repitió 4 veces. Finalmente, se tomaron 20 µl para depositarlos en viales de 2 Dram que contenían perlas de sílica estéril (SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) y se conservaron a 4 °C.

\*Bacterias.

Se tomó una azada del cultivo bacteriano crecido en medio Rennie y se suspendió en 1 ml del mismo medio, pero ahora líquido; 24 h después se tomaron 24  $\mu$ l para depositarlos en viales de 2 Dram que contenían perlas de silica estéril ( $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ ) como medio de preservación y se conservaron a 4 °C.

### 6.5. Ensayos de preferencia alimenticia.

Se prepararon cajas de Petri con agar bacteriológico a las cuales se les colocó un molde fabricado con resina en forma de asterisco. Una vez que el medio gelificó dichos moldes fueron retirados. Estos moldes constaban de una cavidad central la cual estaba interconectada (por medio de canaletas adyacentes de 5 mm de largo) a cuatro cavidades laterales (Herrera, 2013) (figura 1).

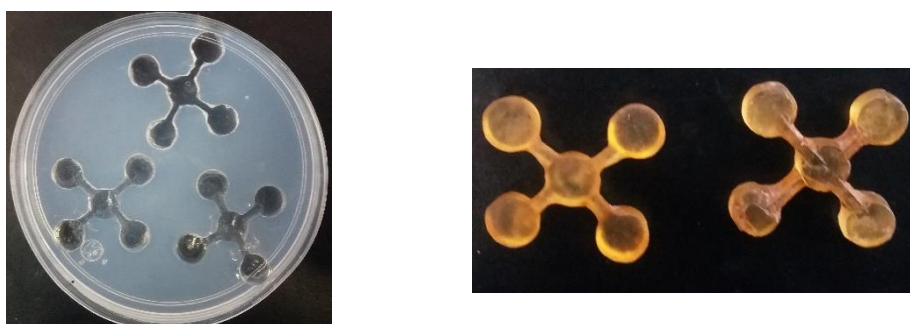


Figura 1. Molde de resina los cuales funcionaron como una impresión en gel de agarosa.

Por otro lado, de los cultivos de ciliados previamente aislados, se depositó una alícuota de 1 ml en cajas Petri que contenían 10 ml de medio LB y se mantuvieron en agitación constante por 48 horas. Posteriormente, al cultivo se le adicionó 1 ml de Cloranfenicol a concentración de 5 mg/mL con la intención de eliminar a las bacterias extrañas del cultivo polixénico y 24 horas después se tomó una alícuota de 1 ml del cultivo y se concentró por centrifugación a 1000 x g durante 7 minutos. Se retiraron 900  $\mu$ l del sobrenadante la pastilla se suspendió en tubos Eppendorf que contenían 900  $\mu$ l de medio LB estéril. Nuevamente se agregó 1  $\mu$ l de Cloranfenicol y se dejó en agitación constante durante 1 hora. Esto con el objetivo de eliminar bacterias extrañas que pudieran intervenir en el estudio (Herrera 2013). Finalmente, se contabilizó el número de células y se inocularon

alrededor de 200 células de *Colpoda* sp. en 50 µl en el pozo central de las cajas Petri con los moldes previamente grabados en el agar. Cada una de las canaletas se inundó con medio LB estéril para así tener un medio de difusión y desplazamiento para que los depredadores llegaran a las bacterias en suspensión. Cada uno de los pozos laterales fueron inoculados con 200 µl de bacterias ( $1 \times 10^6$  UFC) *A. lipoferum*, la UTO D, la combinación de ambas y un pozo control el cual únicamente contenía el medio de cultivo antes descrito. Una vez inoculadas las bacterias y los ciliados se dejaron sobre una superficie plana, a temperatura ambiente y sin ningún tipo de movimiento durante 3 horas. Transcurrido este tiempo la muestra se fijó con Lugol al 4 % (v/v) para contar los quistes como los trofozoítos en cada uno de los pozos laterales utilizando el microscopio invertido (Olympus CK2) a 40x (Herrera 2013).

Para determinar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos de cada uno de los pozos se realizó una prueba de ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ). Posteriormente se hizo la prueba *post hoc* de Tukey para saber cuáles de las medias eran diferentes.

### **6.6. Crecimiento bacteriano con y sin depredador**

De cada una de las 2 bacterias aisladas (UTO D y *A. lipoferum*.) en medio de cultivo sólido Rennie, se tomó una azada y se suspendió en un tubo de ensaye que contenía 10 ml del mismo medio, pero en fase líquido. Posteriormente, los tubos se incubaron a 32 °C por 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se tomó por triplicado un mililitro ( $5 \times 10^6$  UFC, aproximadamente) de cada tubo para ser inoculado en matraces que contenían 60 ml de medio Rennie previamente esterilizado. A los tratamientos que incluían al depredador, se les adicionó 400 µl (500 células) de cultivo de *Colpoda* sp. aislado en medio LB

Se registró la absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. Previamente el instrumento se calibró en unidades de porcentaje usando un blanco del mismo medio de cultivo ajustando a una transmitancia a 100% T, y con absorbancia a 0% A. Para identificar la cinética de crecimiento poblacional de bacterias solas y con depredador, se hicieron mediciones continuas con 7 diferentes intervalos de tiempo (3, 5, 7, 26, 52, 78, 102 h).

De forma paralela a las mediciones en el espectrofotómetro, se realizaron cuentas de las unidades formadoras de colonias de la concentración de bacterias contenidas en el inóculo, las cuales consistieron en una serie de microdiluciones desarrolladas en cajas de cultivo celular de 96 pozos. Para ello se depositaron en el primer pozo 200 µl de agua destilada estéril y 60 µl tomados de los tubos en donde previamente se inocularon las bacterias; considerado a este como la dilución cero. Posteriormente con ayuda de una micropipeta se mezcló la dilución y se trasladaron 60 µl al pozo siguiente en el cual previamente ya habían sido depositados 140 µl de agua destilada estéril. Se repiten estos pasos hasta alcanzar la dilución  $10^{-8}$ . De las diluciones de  $10^{-7}$  se inocularon 20 µl por triplicado en cajas de Petri con medio sólido Rennie para el conteo de unidades formadoras de colonias.

Finalmente, para determinar la existencia de diferencias significativas en las abundancias poblacionales entre los diferentes tratamientos con y sin depredador, se realizó la prueba de ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ). Posteriormente se hizo la prueba *post hoc* de Tukey para conocer cual o cuales de las medias eran diferentes.

### **6.7. Actividad reductora de acetileno.**

Se utilizaron frascos viales con capacidad de 40 ml, los cuales contenían 20 ml de medio Rennie y 1 ml de bacterias ( $2 \times 10^7$  ufc/ml aproximadamente). Los tratamientos en presencia de depredación se les adicionaron 200 µl de *Colpoda* (55 células/ml aproximadamente). Cada uno de los tratamientos constó de 4 réplicas. La medición de la actividad reductora de acetileno se midió en siete diferentes intervalos de tiempo. Estos intervalos se establecieron en función de la cinética de crecimiento de ambas cepas bacterianas, de las 2 horas a las 102 h de incubación. Se consideraron 3 grupos control libres de microorganismos: medio de cultivo con acetileno, medio de cultivo con etileno, y medio de cultivo solo.

Se sustituyeron los tapones de algodón por tapones de plástico flexible con la finalidad de cerrar herméticamente los tubos con los diferentes tratamientos. Se reemplazaron 4 ml (10% v/v del volumen total del vial) de la atmósfera interna de

los viales por 4 ml de acetileno. Posteriormente se tomó una muestra de 7 ml de la mezcla de gases en un tubo de vacío, de acuerdo con los diferentes intervalos (3,5,7,26,52,78,102) de tiempo en los que se establecieron las etapas del crecimiento poblacional, también se extrajo el gas perteneciente al grupo control considerando únicamente el medio Rennie en ausencia de cualquier tipo de organismo (González, 2008). La mezcla de gases de cada tratamiento y el gas puro del grupo control se analizaron con espectrometría de masas para identificar las moléculas de acetileno y de etileno

### **6.8. Espectrometría de masas (MS).**

Se utilizó un espectrómetro de masas marca Agilent Technologies modelo 5975 inert XL. Los espectros de masas se obtuvieron mediante ionización por impacto electrónico a 70 eV, para la identificación se compararon los espectros de masas obtenidos para cada compuesto, con una base de datos (HP Chemstation-NIST 05 Mass Spectral search program, versión 2.0d), además de la comparación con un estándar (Ethylene, No. de catálogo 00489-11L, Sigma-Aldrich) analizado bajo las mismas condiciones.

### **6.9. Modelo matemático del crecimiento bacteriano con y sin depredador.**

Este modelo se calcula en la fase de crecimiento exponencial, donde la fisión binaria de bacterias ocurre a intervalos regulares y de manera rápida (Mandelstam y MacQuillen, 1973). Bajo condiciones exponenciales se describe como:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1)$$

Donde:

$X =$  Concentración de materia orgánica en  $\frac{g}{l}$  ó en células/l

$t =$  tiempo

$\mu =$  *tasa específica de crecimiento/h*

$$\int \frac{dX}{X} = \int \mu dt$$



$$X_t = X_0 e^{\mu t} \quad (2)$$

$X_t$  = es la concentración final de microorganismos en g/l en tiempo  $t$

$X_0$  = es la concentración inicial de microorganismos en g/l

$e$  = es la base de logaritmo natural

$\mu$  = velocidad específica de crecimiento en  $h$

\*Si la tasa específica de crecimiento es constante:

$$\ln X_t = \ln X_0 + \mu t \quad (3)$$

La ecuación (3) puede ser resuelta para el caso en el cual  $D_t = t_d$  el tiempo requerido para  $X_2 = 2X_1$ .

\*Si  $t_d$  es igual al tiempo de generación entonces:

$$\mu = \frac{\ln 2}{g} = \frac{0.693}{g}$$

Al intervalo de tiempo requerido para duplicarse el número de microorganismos o masa de una población se le denomina tiempo generacional y se determina como

$$g = \frac{\ln(X_t - X_0)}{t - t_0}$$

**$g$  = tiempo de generación, tiempo que tarda en duplicarse la población**

$t$  = tiempo inicial

$t_0$  = tiempo final

Finalmente, el número de generaciones se calculó como:

$$n = \frac{t - t_0}{g}$$

**$n$  = número de generaciones**

$t$  = tiempo inicial

$t_0$  = tiempo final

## 6.10. Cálculo del impacto de la depredación.

Para evaluar el impacto de la depredación (ID) de *Colpoda* sp. sobre la presa, se calculó adoptando un enfoque descrito con anterioridad por Fox (2002), en donde el impacto de la depredación sin unidades varía entre 0 que es el equivalente a no tener efecto de depredación y 1 que equivale a una completa extinción de presas. Si la depredación conlleva a una mayor abundancia de presas el valor de ID se vuelve negativo.

$$ID = \frac{Kbac - R}{Kbac}$$

*Kbac* = concentración final de bacterias en ausencia de depredador

*R* = concentración final de bacterias en presencia de depredador.

## 7. RESULTADOS.

### 7.1. Aislamiento de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno.

A partir de los cultivos polixénicos en medio líquido de *Colpoda* sp. se obtuvieron cuatro Unidades Taxonómicas Operativas las cuales fueron caracterizadas de acuerdo con su morfología colonial y tinción de Gram (ver Tabla 2 y anexos). No obstante, en el presente estudio únicamente se consideró en los diferentes tratamientos experimentales a la cepa más abundante durante la estandarización del estudio. Además de contar con *Azospirillum lipoferum* como cepa de referencia con capacidad de fijar N<sub>2</sub>.

	Forma Colonial	Elevación	Borde	Color	Gram -	Forma celular	Tamaño
<b>UTO D</b>	Circular  (Martínez 2017)	Plana	Enrollado	Traslucido	X	ovoide  (Martínez 2017)	2-4µm
<b>A. lipoferum.</b>	Circular  (Martínez 2017)	Plana	Entero	Escarlata En medio de cultivo rojo-Congo	X	Vibroide  (tomado de la red)	2-5µm

Tabla 2. Bacterias aisladas y crecidas en medio de cultivo Rennie, donde se pueden apreciar las características morfológicas.

## 7.2 Aislamiento de *Colpoda* sp e identificación.

*Colpoda* sp presentó un tiempo de duplicación de aproximadamente 24 h y se observó que de una célula madre (A) puede dividirse en dos células hijas (B) o en cuatro células hijas (C), además de que todas pueden contar con diferente número de núcleos celulares (figura 2).

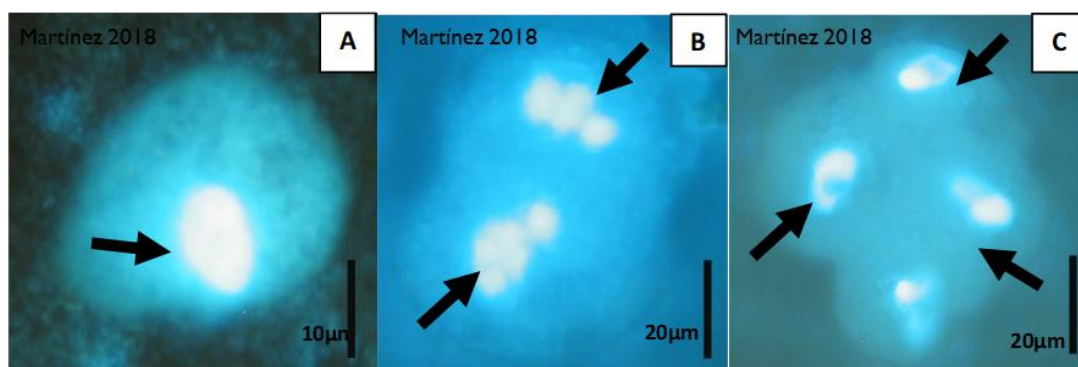


Figura 2. Tinción de DAPI en la que se observan los núcleos de *Colpoda* señalados con flechas y el número de células en las que puede llegar a dividirse.



Figura 3. Células de *Colpoda* sp: estructuras de resistencia, quistes (A), células activas, trofozoíto (B) y quiste dividiéndose en tres células hijas.

Por otro lado, la población de *Colpoda* sp. comenzó a crecer hasta después de 24 h de inocularse en el medio donde se desarrolla junto con *A. lipoferum* y la UTO D. Junto a esta última, la tendencia de crecimiento de *Colpoda* sp. se mantuvo incluso después de 125 h de haber sido inoculada. En contraste, *Colpoda* sp. se enquistó a las 102 h de inocularse en el cultivo de *A. lipoferum* después de haber tenido un ligero crecimiento poblacional en las horas previas. Por otro lado, el crecimiento de *Colpoda* sp. en la mezcla de ambas cepas

bacterianas es intermedio entre lo que se observa con cada una de las dos cepas cultivadas por separado. También tiende a enquistarse después de 102 h. Ninguno de los tratamientos respecto al crecimiento de *Colpoda* sp. presentó diferencias significativas ( $p=0.05$ ). (Figura 4).

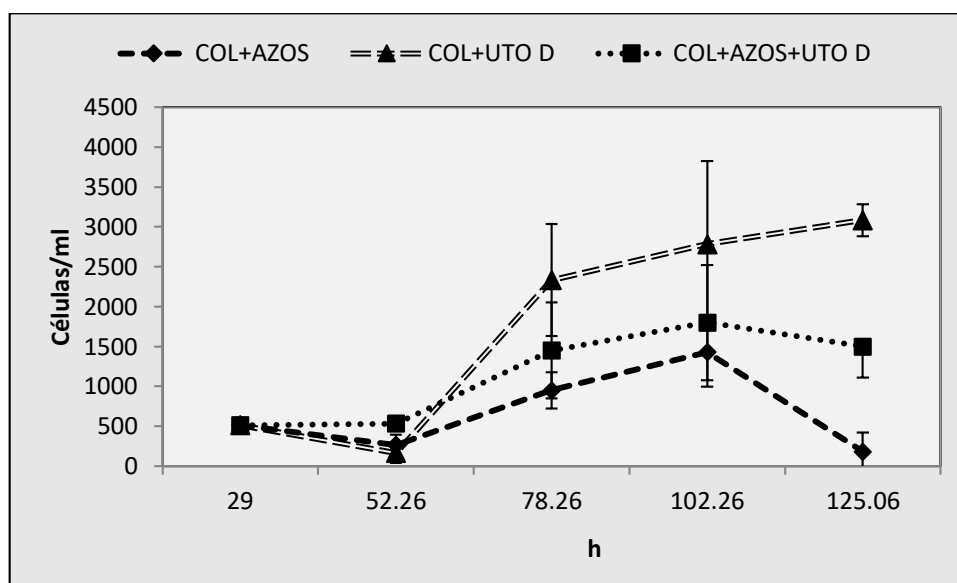


Figura 4. Crecimiento poblacional de *Colpoda* sp cultivados en presencia de *Azospirillum lipoferum*. (COL+AZOS), en presencia de la UTO D (COL+UTO D) y en presencia de ambas bacterias (COL+AZOS+UTO D). N=3

### 7.3. Crecimiento poblacional de bacterias con y sin depredador.

Se observó que *A. lipoferum* y la UTO D, ambas en ausencia de depredador presentaron una fase Lag de 26 h. Después de 26 h se observó que *A. lipoferum*, triplicó sus abundancias de  $8.25 \times 10^5$  ufc/mL a  $2.6 \times 10^6$  ufc/mL, mientras que la UTO D duplicó sus abundancias de  $1.02 \times 10^6$  ufc/mL a  $2.37 \times 10^6$  ufc/mL. En los intervalos de tiempo subsecuentes, las abundancias de ambas poblaciones transcurren a lo largo de la fase exponencial que duró al menos 100 h (Figuras 5 y 6).

Por otro lado, la depredación no influyó en el tiempo necesario para iniciar la fase exponencial de ambas cepas de bacterias, ya que al igual que en ausencia de *Colpoda* sp. ambas poblaciones bacterianas comenzaron su etapa exponencial después de 26 h. No obstante, la depredación disminuyó las abundancias de ambas poblaciones bacterianas lo largo de todo el experimento, haciendo que fueran estadísticamente diferentes respecto a las poblaciones libres de

depredación. También, se observó que cuando inicia la fase exponencial, la abundancia de *A. lipoferum*, en presencia de depredador se incrementan en 2.7 veces más, la cual cambia de  $3.8 \times 10^6$  ufc/mL a  $1.05 \times 10^7$  ufc/mL, mientras que la UTO D incrementa su abundancia en 4.5 veces más, creciendo de  $2.7 \times 10^5$  ufc/mL a  $1.2 \times 10^6$  ufc/mL. Por otro lado, en las dos poblaciones de bacterias con y sin depredador el incremento de las abundancias fue oscilatorio a lo largo de la etapa exponencial.

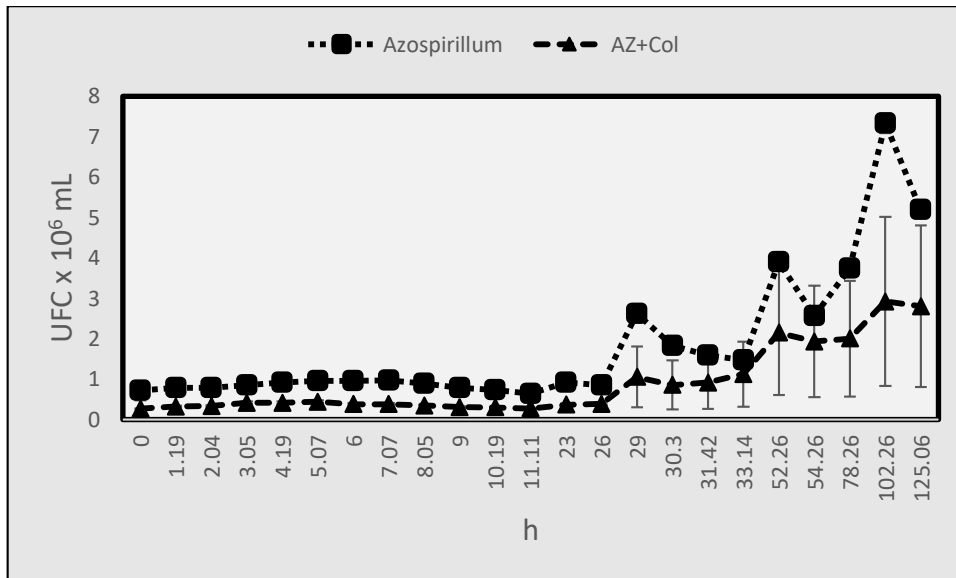


Figura 5. Crecimiento poblacional de *Azospirillum Lipoferum* en ausencia (líneas punteadas) y presencia (línea discontinua) de depredador. N=3

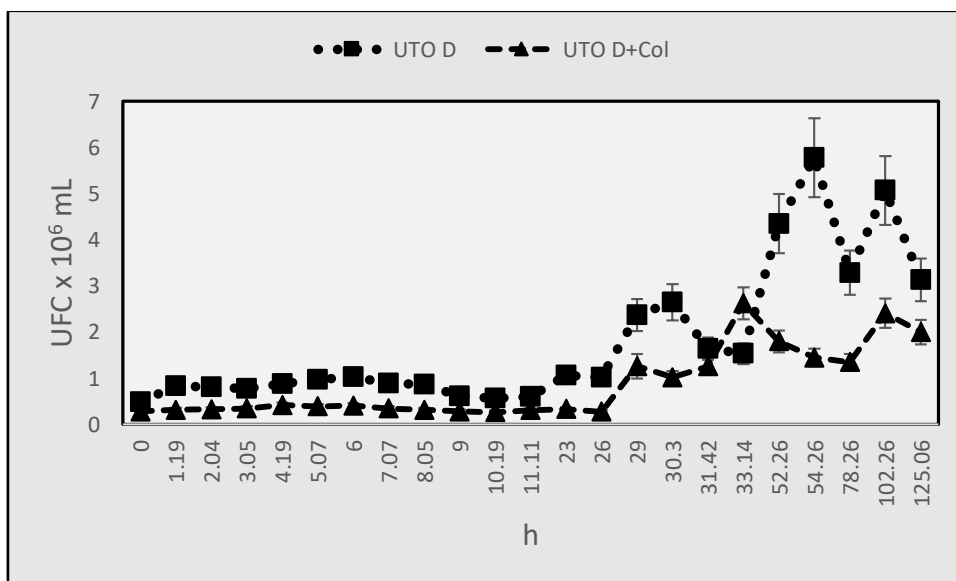


Figura 6. Crecimiento poblacional de la UTO D en ausencia (líneas punteadas) y presencia de depredador (línea discontinua). N=3

#### 7.4. Relación depredador-presa.

La abundancia de *A. lipoferum* fue 95% mayor que la abundancia de la UTO D durante la fase exponencial (Figura 7). No obstante, no tuvieron diferencias significativas entre la cantidad de células. Sin embargo, se observó que la UTO D fue más depredada ya que tuvo menor abundancia y a su vez promovió que la cantidad de depredadores activos fuera mayor y se mantuviera reproduciendo hasta las 125 horas del experimento (figura 8).

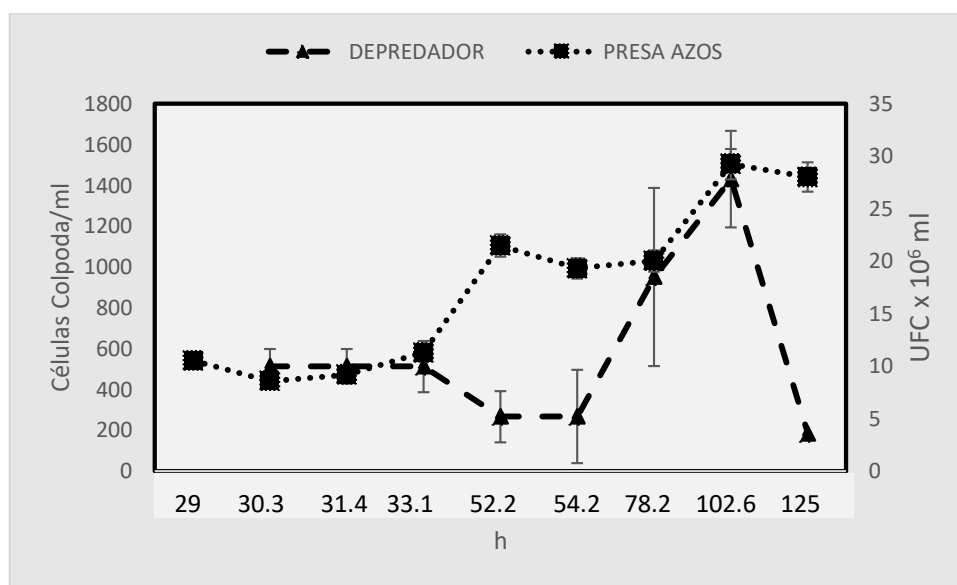


Figura 7. Crecimiento población de *Colpoda* sp. en presencia de *Azospirillum lipoferum*. La cantidad inicial aproximada de depredadores inoculados en el tiempo cero fue de 500 células/ml, siendo nuevamente contabilizadas 24 h después. N=3

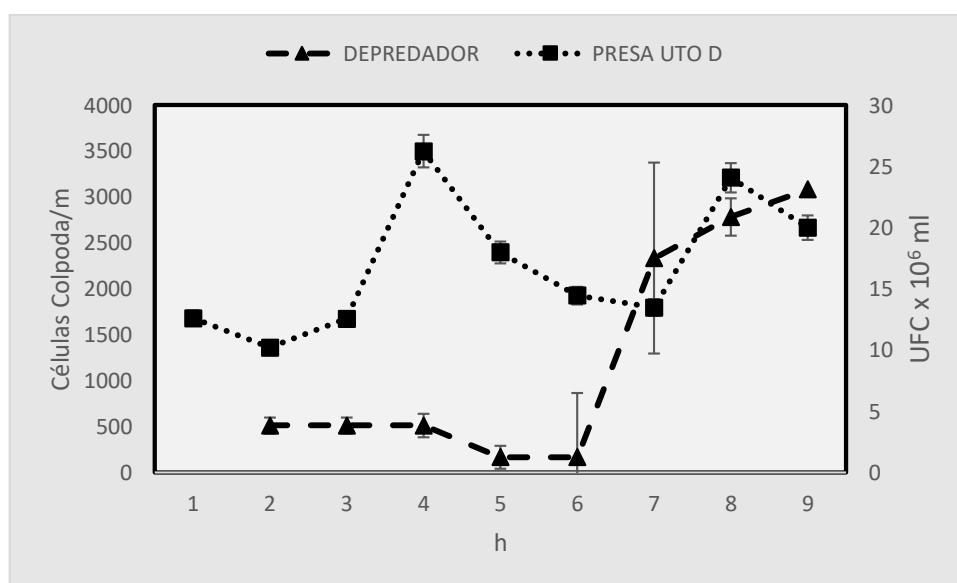


Figura 8. Crecimiento poblacional de *Colpoda* sp. en presencia de la UTO D. La cantidad inicial aproximada de depredadores inoculados en el tiempo cero fue de 500 células/ml, siendo nuevamente contabilizadas 24 h después. N=3

Por otro lado, durante la fase exponencial *A. lipoferum* en ausencia de depredador tuvo 25 generaciones, y con depredación tuvo 24; con un tiempo medio entre cada generación sucesiva de 3.79 h y 3.02 h, respectivamente. Por su parte, la UTO D, en ausencia y presencia de depredador tuvo 24 y 23 generaciones con un tiempo medio de 4.27 y 3.12 h, respectivamente. Además, la depredación aumentó la velocidad específica de crecimiento en ambas presas, promoviendo mayor velocidad en la UTO D que con la cepa *A. lipoferum*. Por lo anterior con el índice de impacto de depredación, se pudo corroborar que *Colpoda* sp. tiene un efecto positivo en la formación de biomasa bacteriana (tabla 3)

	<b>G (h)</b>	<b><math>\mu</math></b>	<b>n</b>	<b>ID</b>
<b><i>A. lipoferum</i></b>	3.79	0.18	25	0.43
<b><i>A. lipoferum</i> + <i>Colpoda</i> sp</b>	3.02	0.22	24.1	
<b>UTO D</b>	4.27	0.16	24.2	0.23
<b>UTO+<i>Colpoda</i></b>	3.12	0.22	23.3	

Tabla 3. Principales parámetros del crecimiento poblacional de ambas cepas bacterianas en presencia y ausencia de depredación. Simbología: g= tiempo medio entre dos generaciones sucesivas expresado en horas,  $\mu$ =tasa intrínseca de crecimiento, n=número de generaciones transcurridas durante el crecimiento exponencial, ID=Impacto de depredación: valores de 0 equivalen a no tener efecto de depredación, 1 equivale a una completa extinción (efecto negativo en la población de presas) y valores negativos significa que la depredación estimula el crecimiento de presas (efecto positivo en la población de presas). N=3. La presencia de depredador no generó diferencias significativas en la velocidad de crecimiento ( $p=0.05$ ).

## 7 Preferencia alimenticia de *Colpoda* sp. sobre bacterias.

*Colpoda* sp. mostró un desplazamiento y formación de trofozoítos significativamente menor en el grupo control con que con la UTO D y con *A. lipoferum*, así como en la mezcla de UTO D+ *A. lipoferum* ( $\alpha=0.05$ ). Se observó



que el depredador creció mejor en presencia de la UTO D que sobre sobre *A.lipoferum* (3013 y 2093 células trofozoítos/mL respectivamente), incluso cuando se le presentaron en una mezcla de ambas (1093 células trofozoítos/mL) (Figura 9). En todos los tratamientos inoculados con bacterias, hubo un número significativamente mayor de trofozoítos que de quistes ( $\alpha=0.05$ ).

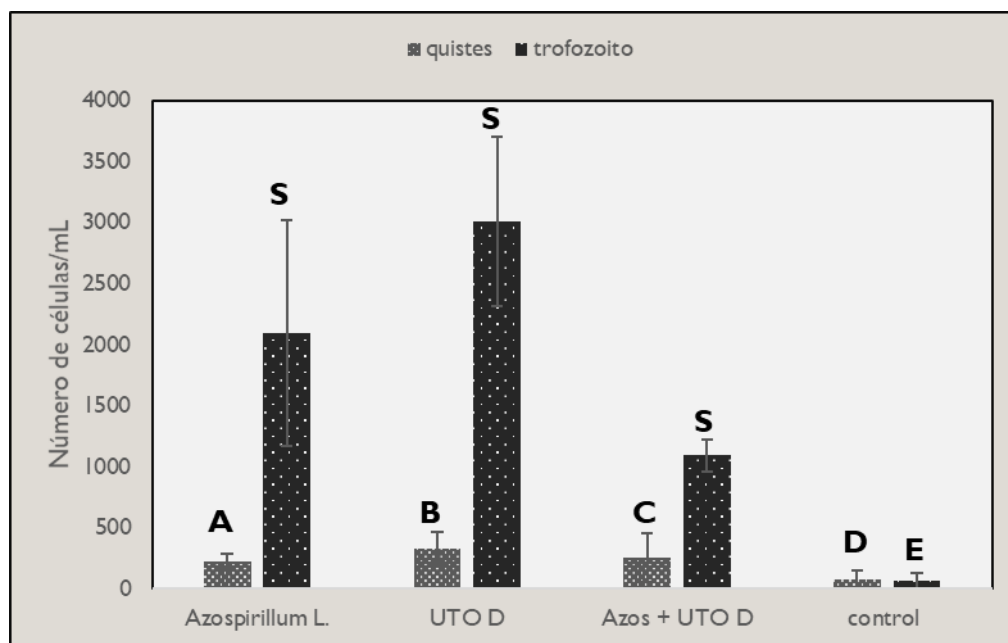


Figura 9. Conteo de trofozoítos y quistes de *Colpoda* sp en presencia de *A.lipoferum* y la UTO D., inoculadas de manera aislada o en conjunto. Las barras con letra diferente indican tratamientos con diferencias significativas. Las líneas en las barras representan la desviación estándar. N=5.

### 7.6. Reducción de Acetileno-etileno.

Con ayuda de los estándares de acetileno ( $C_2H_2$ ) (Figura 10) y de etileno ( $C_2H_4$ ) (Figura 11) se determinó la identidad de ambas moléculas y a partir de estos, se monitoreó la presencia y abundancia de los iones que le confieren la “huella digital” dentro de una mezcla de gases para identificar la presencia o ausencia de las dos moléculas en cuestión.

Ambas poblaciones bacterianas mostraron actividad enzimática de la nitrogenasa después de 4 h de incubación. Se observó que durante la fase lag la presencia de acetileno es mayor que la de etileno. (Figuras 12). Por otro lado, después de 24 h de incubación, se observa que ambas bacterias produjeron

mayor cantidad de etileno con respecto al acetileno provisto. No obstante, hasta 102 h después incubación hubo remanentes de acetileno. (Figura 13).

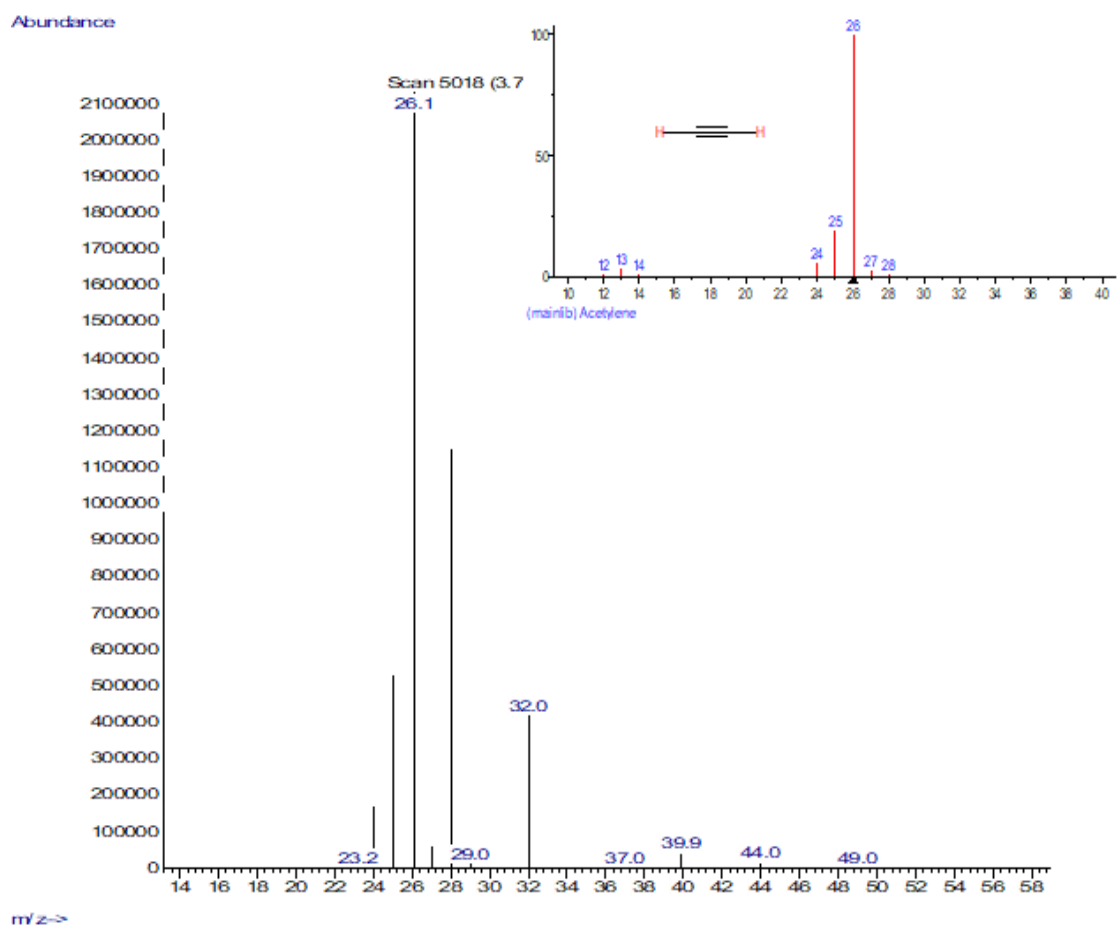


Figura 10. Estándar de **Acetileno**, la identidad de la molécula se la confieren la abundancia y proporción entre los iones **26 y 28**. La imagen reducida representa la misma molécula, pero tomada de la base de datos.

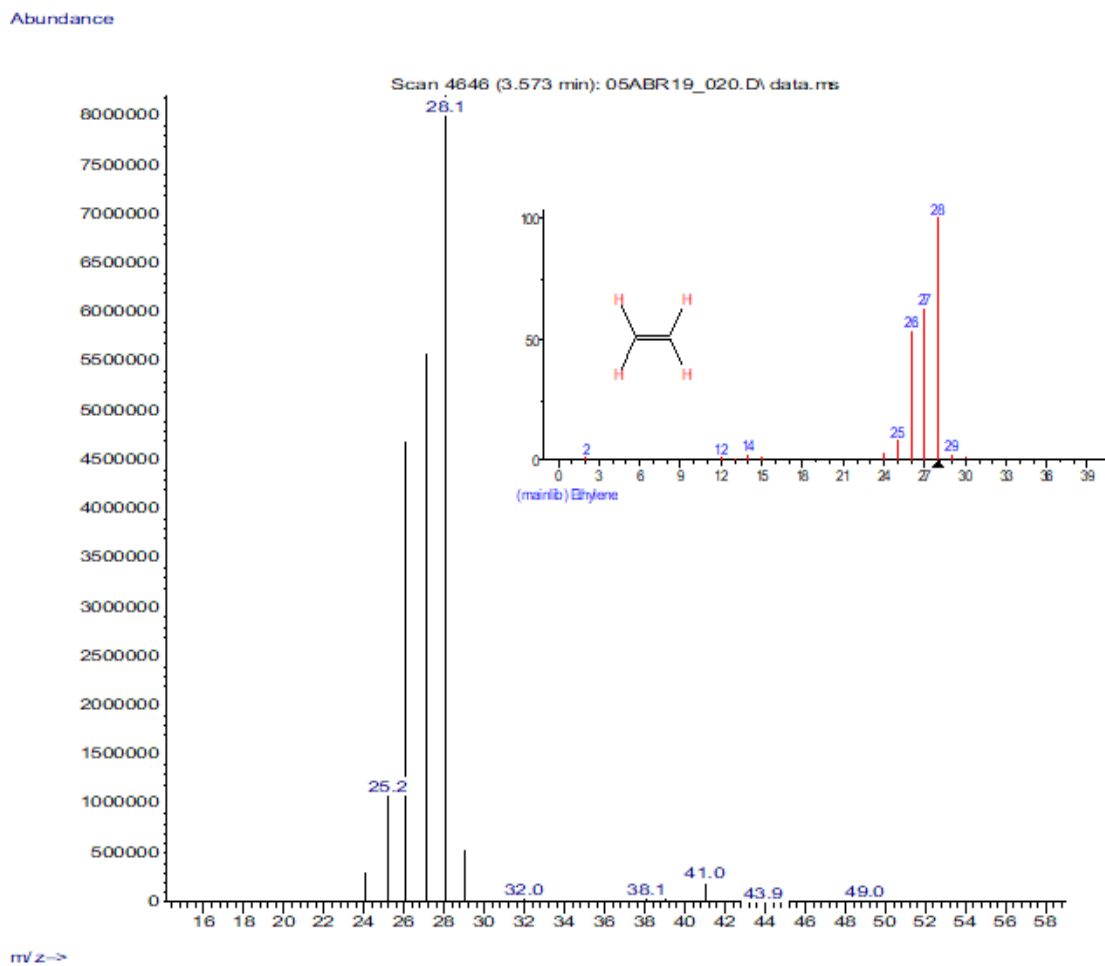
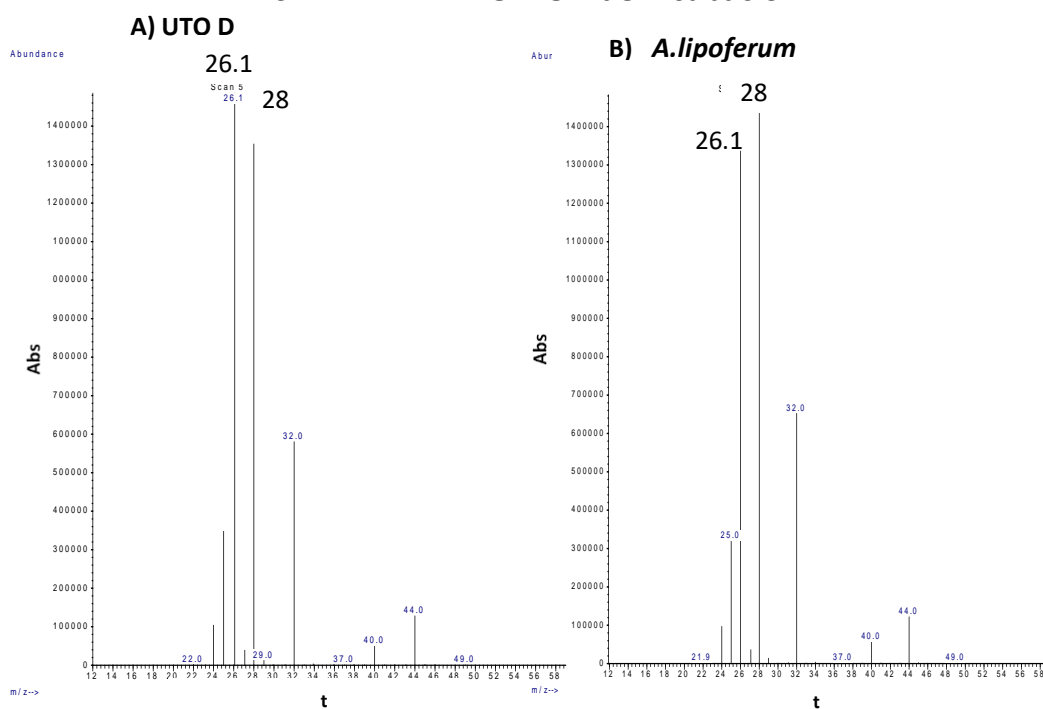


Figura 11. Estándar de **Etileno**, la identidad de la molécula se la confieren los iones **28** y **26** justo en esa misma proporción respecto a la abundancia. La imagen reducida representa la misma molécula, pero tomada de la base de datos.

### SIN DEPRDADOR. 8 h de incubación



### CON DEPRDADOR. 8 h de incubación

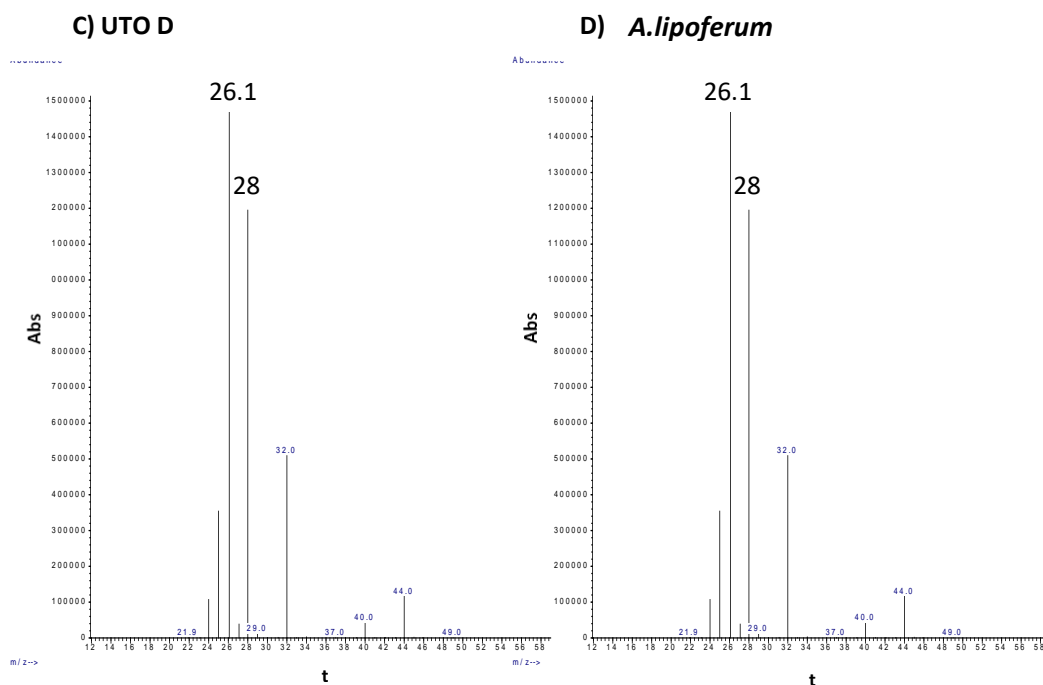


Figura 12. Detección de acetilino-etileno en muestras de crecimiento de dos cepas bacterianas diazotróficas en ausencia de depredador (A, B) y presencia de depredador (C, D), durante 8 horas de incubación

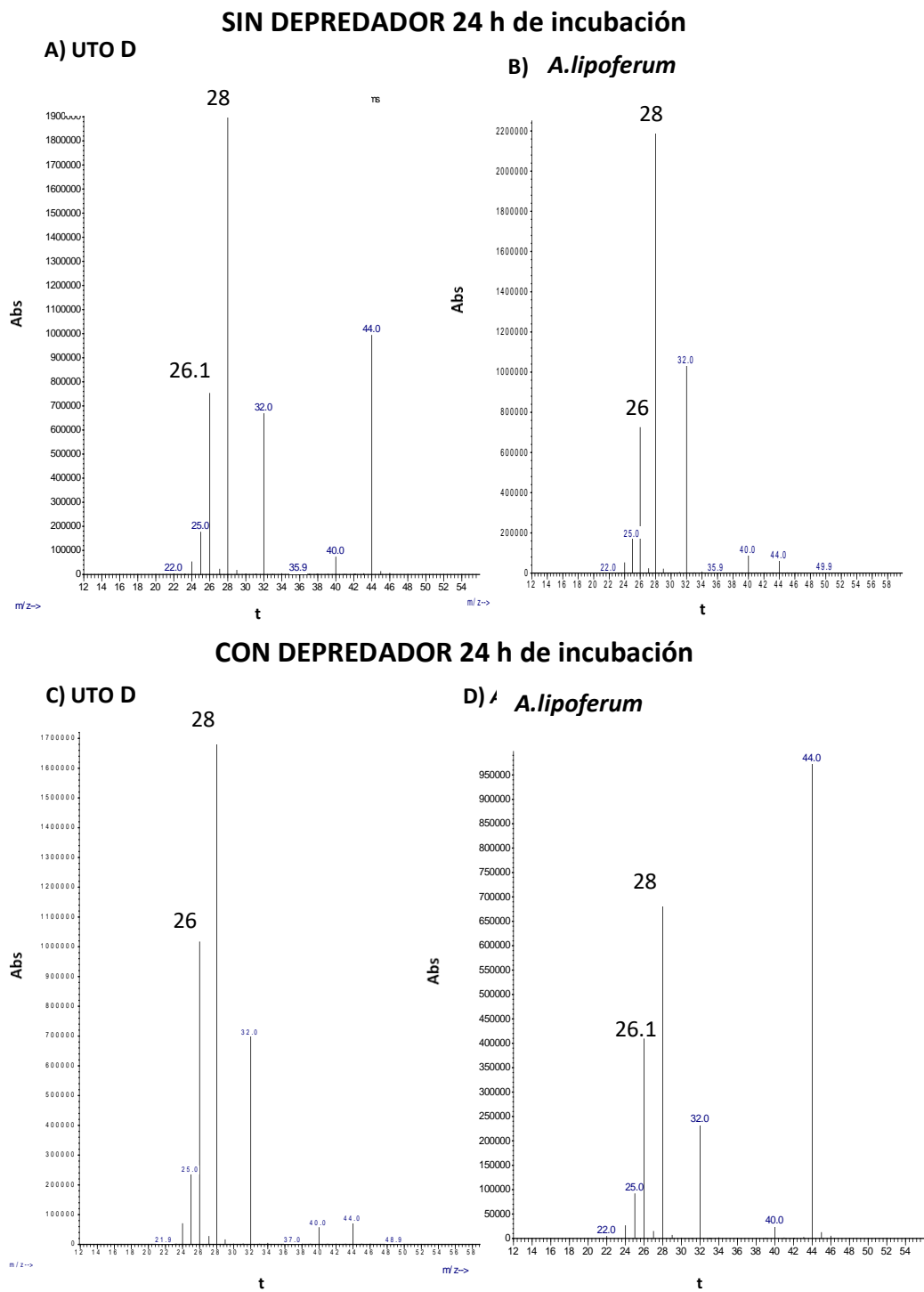


Figura 13. Detección de etileno en muestras de crecimiento de dos cepas bacterianas diazotróficas en ausencia de depredador (A, B) y presencia de depredador (C, D), durante 24 horas de incubación

Por otro lado, se determinó la tasa de fijación de acuerdo con la cantidad de nonomoles de etileno por unidad de bacteria. Fue así como, se observó una mayor actividad de la nitrogenasa en las dos bacterias en presencia de depredador, durante la fase lag del crecimiento bacteriano, (figura 14). Por su parte, en la fase exponencial se presentaron los rendimientos más bajos de fijación por unidad de bacteria. Sin embargo, se determinó qué en el desarrollo de ambas poblaciones, la síntesis de etileno por unidad de bacteria fue mayor en presencia de depredador en todos los tratamientos, excepto en la UTO D que se mantuvo igual durante la fase exponencial. (tabla 4).

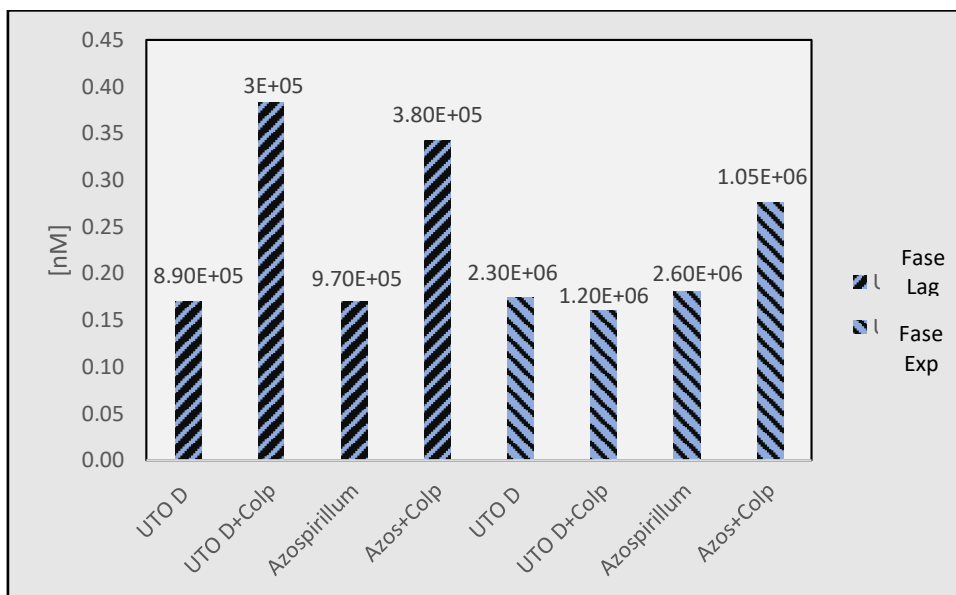


Figura 14. Actividad de la nitrogenasa, cada barra indica la tasa de fijación a concentración nano molar. Por encima de las barras se observa la abundancia de bacterias en UFC/mL. La presencia del depredador con cada una de las dos bacterias no generó diferencia significativa en la producción de etileno ( $p=.0.05$ ).

Tratamiento	Fase de crecimiento	UFC/mL	Tasa de fijación [nM]/UFC
<b>UTO D</b>	Lag.	8.90E+05	0.17
<b>UTO D+Colpoda</b>	Lag.	3.40E+05	0.38
<b>UTO D</b>	Exponencial.	2.30E+06	0.17
<b>UTO D+Colpoda</b>	Exponencial.	1.20E+06	0.17
<b><i>Azospirillum</i></b>	Lag.	9.70E+05	0.17
<b><i>Azos+Colp</i></b>	Lag.	3.80E+05	0.34
<b><i>Azospirillum</i></b>	Exponencial.	2.60E+06	0.18
<b><i>Azos+Colpoda</i></b>	Exponencial.	1.05E+06	0.27

Tabla 4. Muestra la concentración nM de etileno reducido en cada una de las bacterias con y sin depredador, durante la fase Lag y la exponencial del crecimiento poblacional bacteriano. Además, muestra la tasa de fijación N de por unidad de bacteria expresada en nM, se observa que *Colpoda* sp. Junto a la UTO D en crecimiento exponencial promueve una mayor tasa de fijación de N.

## 7. DISCUSIÓN.

---

La depredación por parte de *Colpoda* sp hace que las abundancias de *A. lipoferum* y la UTO D sean significativamente menores a las que presentaron cuando se cultivan sin depredador. No obstante, la presencia de *Colpoda* sp aumentó la tasa intrínseca de crecimiento de las dos poblaciones bacterianas durante la etapa exponencial de su desarrollo poblacional. Este efecto contra intuitivo podría atribuirse al desarrollo de una resistencia transitoria a la depredación por parte de las poblaciones de las presas (Shemesh y Jurkevitch 2004) y a una selección hacia las bacterias que se reproducen en corto tiempo, lo que les confiere ventaja reproductiva (Otto et al., 2017), observada dentro de los microentornos, en una relación presa-depredador (Lythgoe y Read 1998. Matz et al., 2004).

Todos los cultivos bacterianos con y sin depredación presentaron una fase lag de por lo menos 26 horas seguida de una fase exponencial. Sin embargo, la depredación no influyó en el tiempo de inicio de dicha fase para ambas poblaciones bacterianas, aun cuando a través de la depredación existe un reciclado de nutrientes el cual es importante en un sistema oligotrófico, como lo es el medio de cultivo Rennie. De este modo se incrementan los niveles de nutrientes en el medio (Wright et al., 1995), y pese a que la depredación haya disminuido comparativamente las poblaciones de presas con respecto a las que crecieron solas, el impacto de la depredación en ambas poblaciones bacterianas se vio atenuado con dicha disponibilidad de nutrientes, al menos para compensar el consumo de presas por parte de depredador (Šimek et al., 2003). Asimismo, se ha propuesto para bacterias estimuladas bajo depredación dentro de un sistema de aguas residuales, que existe un consumo selectivo de células menos activas, permitiendo que las bacterias que no están siendo depredadas tengan una mayor concentración de recursos, logrando que su división sea más factible (Thomas et al, 2002. Shapiro et al., 2010).

En el presente estudio, se observó que la población de la UTO D fue menor que la población de *A. lipoferum*. Esto se reflejó en el crecimiento poblacional de



*Colpoda* sp. donde la presencia de la UTO D mantuvo la formación de trofozoítos del depredador hasta las 125 horas de haber sido inoculados. Mientras que en presencia de *A. lipoferum*, el depredador disminuyó el número de trofozoítos a las 102 horas de inoculación. Si bien *Colpoda* sp. fue capaz de reproducirse en presencia de ambas presas, la duplicación poblacional del depredador no fue constante, ya que se observó una disminución en su crecimiento después de 31 horas de haber sido inoculado, para posteriormente volver a aumentar a las 54 horas. Paralelamente, se observó un incremento en la reproducción de *A. lipoferum* y la UTO D después de 31 horas. (Figuras 7 y 8). Estos patrones variables en la abundancia indican una dependencia del depredador a la disponibilidad de presas que actúan como principal recurso para éste. Es así como los depredadores generalmente reducen la abundancia de presas, los que puede, a su vez, afectar la abundancia de depredadores y dar como resultado oscilaciones entre depredadores y presas (Paisie et al., 2014).

De acuerdo a los ensayos de preferencia alimenticia, *Colpoda* sp. mostró un desplazamiento y formación de trofozoítos significativamente menor en el grupo control (libre de bacterias) respecto a los tratamientos con bacterias aisladas, así como en la mezcla de ambas. Sin embargo, el depredador creció mejor en presencia de la UTO D que sobre *A. lipoferum* (3013 y 2093 células/ml respectivamente), incluso cuando se le presentaron en una mezcla de ambas (1093 células/ml) (Figura 2). Tanto *A. lipoferum* como la UTO D son bacterias de tipo Gram negativas lo que implicaría una digestibilidad similar entre ellas según lo reportado en otros trabajos (Griffiths, 1996. Darbyshire, 1972. Drake. Tsuchiya, 1977). Por ello, en este estudio el tipo de pared celular no fue un factor determinante para la preferencia de presas. Por otro lado, diferentes estudios muestran que el tamaño de la presa es quizás la característica fundamental y claramente influye en la selección e ingesta (Andersen et al., 1986. Fenchel, 1986. Epstein y Shiaris, 1992). Al respecto, las células de la UTO D presentaron formas ovoides casi de cocos con un tamaño de 2-4  $\mu\text{m}$  de diámetro y las células de *A. lipoferum* son de tipo vibroide con 2-5  $\mu\text{m}$  de largo. Por lo tanto, es posible que para *Colpoda* sp. la UTO D haya sido un mejor recurso trófico en función del tamaño y forma de la bacteria.

El índice de impacto de la depredación ejercida en *A. lipoferum* y la UTO D (0.43 y 0.23 respectivamente) tuvo un impacto positivo en la reproducción de ambas poblaciones bacterianas, durante su fase exponencial. A pesar de que se observó que la depredación no influye de manera importante en el número de generaciones transcurridas durante la etapa exponencial (ya que la diferencia respecto a las bacterias crecidas en ausencia de depredador es únicamente de una generación), se observó que el depredador acorta el tiempo medio entre dos generaciones sucesivas de ambas presas. Además, el depredador modificó la tasa intrínseca de crecimiento bacteriano, aumentando la velocidad de crecimiento de ambas presas.

De este modo, se atribuye a la depredación por protozoos un efecto estimulante en el metabolismo bacteriano que no se restringe a las condiciones en cultivo continuo, Hunt et al, (1997), puesto que *Colpoda* sp no sólo aumentó la tasa a la que se reproducen las células bacterianas, si no que la depredación estimuló que ambas bacterias presentaran actividad enzimática de la nitrogenasa desde las 4 h de incubación (figura 12), además se observó la síntesis de etileno ( $C_2H_4$ ) a partir de acetileno ( $C_2H_2$ ), aún en los tratamientos donde la presión de depredación disminuyó las abundancias de ambas presas bacterianas de manera significativa ( $\alpha=0.5$ ). Cabe resaltar que, durante la fase lag la presencia de acetileno fue mayor que la de etileno. (Figuras 13). No obstante, de acuerdo con la tasa de fijación, es en esta fase de crecimiento donde se registró la mayor actividad de la nitrogenasa; tanto en la UTO D (0.38nM) como en *A. lipoferum* (0.34nM), ambas en presencia de depredador. Mientras que en la fase exponencial del crecimiento bacteriano se registraron menores tasas de fijación en presencia de depredador para la UTO D (0.17 nM) así como para *A. lipoferum* (0.27 nM). Sin embargo, al igual que en la fase lag, *Colpoda* sp hizo que la fijación de N por *A. lipoferum* y la UTO D fuera mayor que en los tratamientos en ausencia de depredador.

Por su parte Hernández (et al., 2003), encontraron actividad de la enzima nitrogenasa en aislamientos de bacterias asociadas a la rizosfera de frijol, con valores de fijación de N, que fluctuaba entre 0.0033 a 19 nmoles en un tiempo medio de 24 h de incubación. Asimismo, en un estudio de fijación biológica en plantas no leguminosas se ha reportado para *Azospirillum brasilensis* valores

entre 0.2 y 0.4 nmoles, medidos en una hora después la colonización (Kennedy y Tchan, 1992). Lo anterior resalta la importancia de la depredación por protozoos en la fijación de nitrógeno en bacterias de vida libre. Ya que los resultados del presente estudio respecto a la actividad de la nitrogenasa, son similares a la fijación de N reportado por dichos autores. Además, *A. lipoferum* y la UTO D demostraron la capacidad de fijar nitrógeno sin asociarse a alguna especie vegetal, lo cual de acuerdo con Kennedy y Tchan, (1992), las hace potencialmente pioneras en la colonización de nichos pobres en nitrógeno, además de que dentro de los ecosistemas al ser depredadas se promueve de manera indirecta un aporte del nitrógeno que fijan una vez que mueren y son descompuestas (Kennedy y Tchan, 1992).

Lo anterior propone que la depredación mantuvo a la UTO D y a *Azospirillum lipoferum* más activas metabólicamente. Ya que se incrementó la tasa de crecimiento bacteriano y promovió la fijación de nitrógeno.

## 8. CONCLUSIÓN.

---

La depredación estimuló la fijación de nitrógeno durante la fase exponencial del crecimiento poblacional de bacterias de vida libre. Se observó que hubo una mayor actividad de la nitrogenasa en *Azospirillum lipoferum* y la UTO durante la fase lag (0.34nM y 0.38nM) seguida de la fase exponencial (0.27 nM y 0.17 nM), respetivamente. Por otro lado, *Colpoda* sp. no mostró diferencias significativas en la selección de sus presas como un recurso trófico, además disminuyó significativamente las abundancias de ambas poblaciones bacterianas. Sin embargo, el depredador sí aumentó la tasa a la que se reproducen las células de *Azospirillum lipoferum* y la UTO D.

## 9. LITERATURA CITADA.

---

- ❖ Andersen, O.K., Goldman, J.C., Caron, D.A., Dennett, M.R. (1986). Nutrient cycling in a microflagellate food- chain: III Phosphorus dynamics. *Mar Ecol Prog Ser* 31:47-55.
- ❖ Atlas, R.M., y Bartha, R. (1993). *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*, 3<sup>rd</sup> ed. Addison-Wesley, Reading, MA.
- ❖ Bailey, J.E., y Ollis D.F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2<sup>nd</sup> ed. McGraw- Hill Int., Singapore.
- ❖ Barsdate, R.J., Prentki, R. T., Fenchel, T. (1974) Phosphorus cycle of model ecosystems: significance for decomposer food chains and effect of bacterial grazers. *Oikos* 25: 239-251.
- ❖ Bamforth, S.S. (2001). Proportions of active ciliate taxa in soils. *Biol Fertil Soils*. 33: 197-203.
- ❖ Cole, C. V., Elliot, E. T., Hunt, H. W., Coleman, D. C. (1978). Trophic interactions in the soil as they affect energy and nutrient dynamics. V. Phosphorous transformations. *Microb. Ecol.* 4: 381–387.
- ❖ Darbyshire, J.F. (1972). Nitrogen fixation by *Azotobacter chroococcum* in the presence of *Colpoda steinii*, the influence of temperature. *Soil Biology and Biochemistry*. 4:359-369.
- ❖ Delgado, J.A., y Follett, R.F. (2002). Carbon and nutrient cycles, J. *Soil Water Conserv.* 57: 455–464.

- ❖ Dilworth, M.J. (1966). Acetylene reduction by nitrogen fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Acta* 127:285-294.
- ❖ Dolinsek, J., Lagkouravdos, I., Wanek, W. (2013). Interactions of nitrifying bacteria and heterotrophs: identification of a micavibrio-like putative predator of nitrospira sp. *Appl Environ Microb.* 79: 2027-37
- ❖ Dominy, C.S., y Haynes, R.J. (2002). Influence of agricultural land management on organic matter content, microbial activity and aggregate stability in the profiles of two oxisols. *Biol. Fert. Soils.* 36: 298–305.
- ❖ Drake, J.F., y Tsuchiya, H.M. (1997). Growth kinetics of *Colpoda steinni* on *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 34: 18-22.
- ❖ Elliott, E.T. 1978. Carbon, nitrogen, and phosphorus transformations in gnotobiotic soil microcosms. Ph.D. Thesis. Colorado State University, U.S.A. 77p.
- ❖ Elseth, G., y Baumgardner, K. (1981). *Polution Biology*. D. Van Nostrand, New York. 623.
- ❖ Epstein, S.S., y Shiaris, M.P. (1992). Size selective grazing of coastal bacterioplankton by natural assemblages of pigmented flagellates, colourless flagellates and ciliates. *Microb Ecol.* 23:211-225.
- ❖ Fenchel, T. (1987). *Ecology of protozoa*. Madison, Wis. U.S.A. Science Tech. 197.
- ❖ Fenchel, T. (1986). Protozoan filter feeding. *Prog Protistol* 1:65-133.
- ❖ Fernández, P., De Maria, N., De Felipe, M. (2002). Fijación Biológica de Nitrógeno: factores limitantes. *Ciencia y Medio Ambiente.* 95-202

- ❖ Fox, J.W. (2002). Testing a simple rule for dominance in resource competition. *Am Nat.* 159: 305-19.
  
- ❖ Foissner, W., Berger, H., Kohmann, F. (1992). Taxonomische and Ökologische Revision der Ciliaten des Saprobien-systems Band: Cytophorida, Oligotrichida, Hypotrichia, Colpodea. Informationsberichte des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft.
  
- ❖ Gonzáles, R. (2008). Dinámica poblacional de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en suelo de dos terrazas aluviales con diferente nivel de deterioro del suelo en el Valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla (Tesis de doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México. México
  
- ❖ Griffiths, B.S. (1996). 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.
  
- ❖ Güde, H. (1985). Influence of phagotrophic processes on the regeneration of nutrients in two-stage continuous culture systems. *Microb. Ecol.* 11:193–204.
  
- ❖ Hernández, A.E., Ferrera-Cerrato, R., Rodríguez, V.R. (2003). Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico en rizósfera de frijol contaminado con queroseno. *TERRA Latinoamericana.* 21:81-89.
  
- ❖ Herrera, D.J. (2013). “Preferencia alimenticia del ciliado *Colpoda steinni* sobre seis especies de bacterias tolerantes al combustóleo (tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
  
- ❖ Hahn, M.W., y Höfle M.G. (2001). Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 35: 113–121.

- ❖ Hunt, H. W., Cole, C. V., Klein, D. A., Elliot, E. T. Coleman, D. C. (1997). A simulation model for the effect of predation on bacteria in continuous culture. *Microb. Ecol.* 3:259–278.
- ❖ Jürgens, K., y Güde, H. (1994). The potential importance of grazing-resistant bacteria in planktonic systems. *Mar Ecol Prog Ser.* 169-188.
- ❖ Kefalogianni., y Aggelis, G. (2002). "Modelling growth and biochemical activities of *Azospirillum* spp.", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 352-357.
- ❖ Kennedy, I y Tchan, Yao-Tseng. (1992). Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Recent advances. *Plant and Soil.* 141:93-118.
- ❖ Klucas, R.V., Dilworth, M.J., Glenn, A.R. (1991). Associative Nitrogen Fixation in Plants, In *Biology and biochemistry of nitrogen fixation*, Eds. Elsevier: Amsterdam.
- ❖ Kuikman, P. J., van Elsas, J. D., Jansen, A. G., Burgers, S. L. G., van Veen, J, A. (1990). Population dynamics and activity of bacteria and protozoa in relation to their spatial distribution in soil. *Soil Biol. Biochem.* 22:1063–1073.
- ❖ Lythgoe, K.A., y Read, A.F. (1998). Catching the Red Queen? The advice of therose. *Trends Ecol Evol.*13:473–4.
- ❖ Mandelstam, J., y McQuillen, K. (1973). *Biochemistry of bacterial growth.* Oxford : Blackwell Scientific. 582 p.
- ❖ Matz, C., y Jürgens, K. (2002). Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Ant Leeuwenhoek.* 81: 413-434.



- ❖ Maynard, P.V., Davies, C.J., Blamey, R.W., Elston, C.W., Jhonson, J., Griffiths, K. (1978). Relationship between oestrogen-receptor content and histological grade in human primary breast tumours. *Br J. Cancer.* 38: 745-748.
  
- ❖ Miki, T., y Jacquet, S. (2008). Complex interactions in the microbial world: underexplored key links between viruses, bacteria and protozoan grazers in aquatic environments. *Aquatic Microbial Ecology.* 51: 195-208.
  
- ❖ Mitra, A., y Flynn, K.J. (2005). Predator-prey interactions: is ecological stoichiometry sufficient when good food goes bad? *Journal of Plankton Reserch.* 27 (5): 393-399.
  
- ❖ Mulder, E.G., y Brotonegoro, S. (1974). Free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria. In the *Biology of Nitrogen Fixation.* Ed. Quispel. 37-85.
  
- ❖ Otto, S., Hauke, Harms., Lukas, Y. W. (2017). Effects of predation and dispersal on bacterial abundance and contaminant biodegradation. *FEMS Microbiology Ecology,* 93 (0): 1-7.
  
- ❖ Paisie, T.K., Miller, T.E., Manson, O.U. (2014). Effects of a ciliate protozoa predator on microbial communities in pitcher plant (*Sarraceniapurpurea*) Leaves. *Ploss one.* 10.1371.
  
- ❖ Porter, K.G., y Feig, Y.S. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*25: 943-948.
  
- ❖ Postgate, J.R. (1982). "*The Fundamentals of Nitrogen Fixation*", Cambridge University Press, London.
  
- ❖ Rennie R.J. (1981). A single medium for the isolation of acetylenereducing(dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Can. J Microbiol.* 27: 8-14

- ❖ Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor laboratory press. New York.
- ❖ Shapiro, O.H., Kushmaro, A., Brenner, A. (2010). Bacteriophage predation regulates microbial abundance and diversity in a fullscale bioreactor treating industrial wastewater. *ISME*.4:327-36.
- ❖ Shemesh, Y., Jurkevitch, E. (2004). Plastic phenotypic resistance to predation by *Bdellovibrio* and like organisms in bacterial prey. *Environ Microbiol*. 6:12-8.
- ❖ Šimek, K., Horňák, K., Mašín, M., Christaki, U., Nedoma, J., Weinbauer, M. G., Dolan, J. R. (2003). Comparing the effects of resource enrichment and grazing on a bacterioplankton community of a meso-eutrophic reservoir. *Aquat. Microb. Ecol*. 31: 123-135.
- ❖ Steenhoudt, O., y Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev*. 24: 487-506.
- ❖ Thomas, J.A., Soddell, J.A., Kurtboke, D.I. (2002) Fighting foam with phages? *Water Sci Technol*. 46:511–8.
- ❖ Tsagou, V. y Aggelis, G. (2006). "Growth dynamics of *Azospirillum lipoferum* at steady and transitory states in the presence of NH<sub>4</sub> +", *J. Appl. Microbiol*. 100: 286–295.
- ❖ Vargas, R., y Hattori, T. (1990). The distribution of protozoa among soil aggregates. *FEMS Microb. Ecol*. 38: 233-242
- ❖ Wiegert, R.G., y Owen, D.F. (1971). Trophic structure, available resources and population densities in terrestrial vs. aquatic ecosystems *J. Theoret. Biol*. 30:69-81.

- ❖ Woldendrop, J.W. (1981). Nutrients in the rhizosphere. In Colloquium International Potash Instituten (16., Bern, 1981). Agriculture yield potentials in continental climates. Bern, Swiss, Int. Potash Inst. 99-125.
  
- ❖ Wright, D.A., Killham, K., Glover, A., Prosser, J.I. (1995). Role of pore size location in determining bacterial activity during predation by protozoa in soil. *Applied and Enviromental Miccrobiology*. 61 (10): 3537–3543.

# 10.ANEXOS.

---

## **Tinción de Gram.**

Tinción de células con reactivos: violeta de genciana, Yodo-Lugol, etanol 96% y fucsina de Gram.

### **MEDIO SALINO LB, 1:100 (SAMBROOK, 1981)**


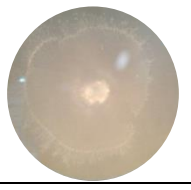
<b>REACTIVO</b>	<b>g/L</b>
Extracto de levadura	3 g
NaCl	5g

### **MEDIO DE CULTIVO CARBON COMBINADO (RENNIE, 1981)**

<b>Solución A</b>	<b>g/L</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
NaCl <sub>2</sub>	0.1 g
NaFeEDTA	0.028 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.025 g
Extracto de levadura	0.025 g
Manitol	5 g
Sacarosa	5 g
Lactato de Sodio (60% v/v)	0.5 ml
Agua destilada	900 ml
<b>Solucion B</b>	
MgSO <sub>4</sub> +7H <sub>2</sub> O	0.2 g
CaCl <sub>2</sub>	0.06 g
Agua destilada	100 ml
pH	7
Agar	15 g

<b>MEDIO DE CULTIVO ROJO CONGO ÁCIDO MÁLICO.</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>g/L</b>
Ácido málico	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extracto de levadura	0.5 g
FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O	0.015 g
KOH	4.8 g
Agar	20 g
Solución Rojo Congo (1:400)	15 m. (Esterilizado por filtración) ph 6.5

Bacterias aisladas y crecidas en medio de cultivo Rennie, donde se pueden apreciar las características morfológicas.

	<b>Forma colonial</b>	<b>Elevación</b>	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Gram +</b>	<b>Gram -</b>	<b>Forma Celular</b>
	Filamentosa	Elevada	Filamentoso	Blanco calcáreo	X		Filamentoso
	Circular	Plana	Enrollado	Traslucido mucosa	X		Bacilo
	Circular	Convexa	Entero	Durazno	X		Bacilo

Tinción de DAPI en la que se observan los núcleos de *Colpoda sp.*

