

**Universidad de Granada**  
**Facultad de Ciencias**



**Departamento de Microbiología**

**CONDICIONES PARA EL ESTABLECIMIENTO DE  
ENDOASOCIACIONES EXPERIMENTALES EN EL  
MODELO LEVADURA - BACTERIA**

**VOLUMEN 1**

Isabel Guerra Tschuschke

TESIS DOCTORAL

1989

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Ciencias

Fecha ~~26 FEB. 1990~~

SALIDA NUM. 241

FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

CONDICIONES PARA EL ESTABLECIMIENTO  
DE ENDOASOCIACIONES EXPERIMENTALES EN EL  
MODELO LEVADURA-BACTERIA

Isabel Marina Guerra Tschushcke

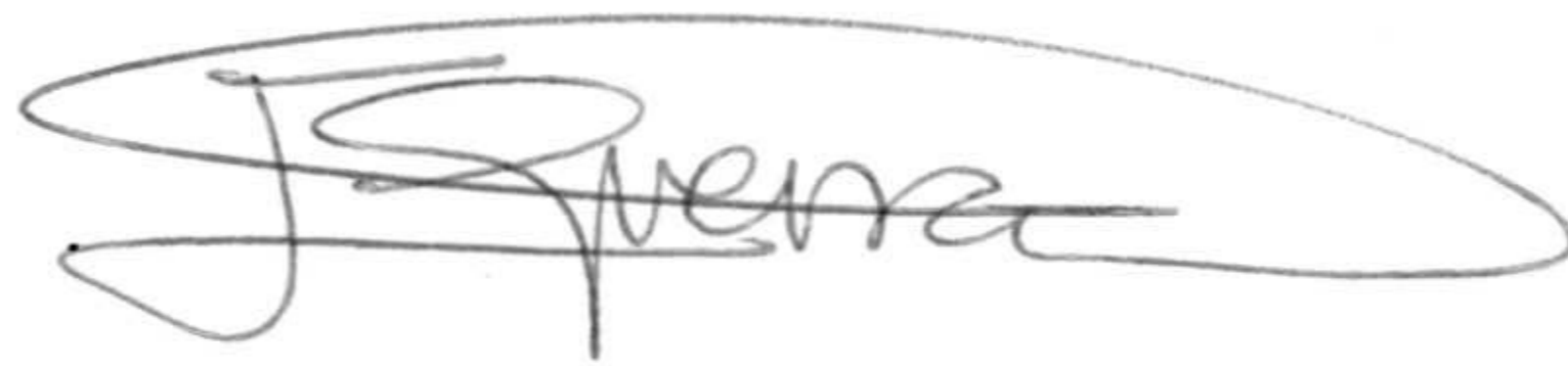
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
GRANADA	
N.º Documento	<u>613405391</u>
N.º Copia	<u>15333681</u>

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1.989

CONDICIONES PARA EL ESTABLECIMIENTO Y VIABILIDAD DE  
ENDOASOCIACIONES EXPERIMENTALES EN EL MODELO  
LEVADURA-BACTERIA

Memoria presentada para aspirar al grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

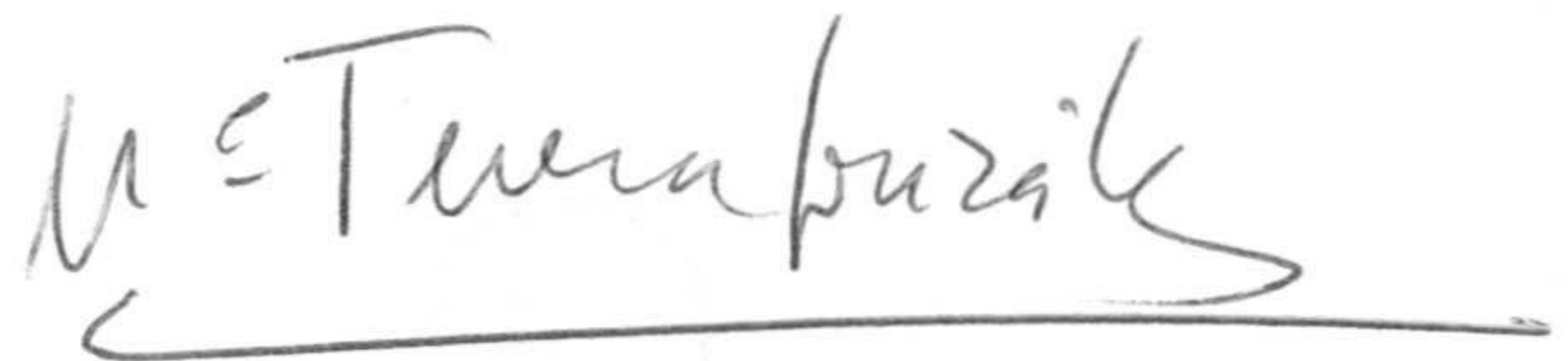


Fdo: Isabel Marina Guerra Tschuschke

Las Directoras



Inés Martín Sánchez



Ma Teresa González Muñoz

Profesoras Titulares del Departamento de  
Microbiología. Facultad de Ciencias.

Granada, Octubre de 1.989

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, con la colaboración de los Servicios Técnicos de esta Universidad.

Parte de los resultados de esta Memoria han sido presentados al XI Y XII Congresos de la Sociedad Española de Microbiología (Gijón, 1987; Pamplona, 1989), así como a la Reunión de las Sociedades Española y Portuguesa de Microscopía Electrónica, Iberem 88, Lisboa, 1988.

Mi agradecimiento a,

-Mi familia, por su cariño y comprensión, y especialmente a mi madre que siempre fué el "pepito grillo" que te hace reflexionar en los momentos difíciles.

-A las directoras Dras. Inés Martín Sánchez y Ma Teresa González Muñoz, tanto por la magnífica dirección del trabajo como por la sincera amistad y cariño y apoyo que me han demostrado durante la realización de éste.

-A Pirri, por sus fantásticas historias sobre "reposones" y "plásmidas" que tan buenos ratos nos han hecho pasar.

-A Antonio Gálvez, que durante la realización de este trabajo tuvo tiempo de ir a Estados Unidos y volver con nosotros y seguir siendo el mismo.

-A Alicia, que nos horroriza con sus amebas y nos deleíta con su presencia.

-A Ma José, por las "sesudas" conversaciones mantenidas entre rejilla y rejilla.

-A las Dras. Eva Valdivia y Mercedes Maqueda por su amistad y apoyo.

-A todos mis compañeros del Departamento de Microbiología, así como amigos personales, y entre ellos Concha, cuya ausencia aquí sería imperdonable.

-A Manuel, por sus cariñosas regañetas.

-Y finalmente al destino que tras numerosos avatares me permitió concluir esta Tesis Doctoral.

Los trabajos de ultramicrotomía, visualización de muestras y material reprográfico de esta tesis doctoral han sido realizados por el personal de Servicios Técnicos de esta Universidad, agradeciendo su colaboración , y en particular a M<sup>a</sup> José Martínez Guerrero y Concepción Hernández Castillo por su inestimable ayuda, asesoramiento y amistad.



a ANTONIO

INDICE



INTRODUCCION.....	14
Endosimbiosis.....	19
-Etapa de reconocimiento.....	20
-Modo de entrada.....	21
-Supervivencia.....	22
-Adaptación fisiológica.....	27
-Vía de transferencia.....	28
-Control y regulación del invasor.....	29
-Coevolución de hospedador y xenosoma.....	31
-Endosimbiosis experimentales.....	33
-Protoplastos y sus aplicaciones.....	36
-Técnicas de obtención de protoplastos.....	36
-Fusión de protoplastos.....	38
-Fusión de protoplastos como mecanismo de introducción de elementos genéticos y particulados.....	44
-Introducción de material genético.....	49
-Transferencia de orgánulos .....	50
-Transferencia de microorganismos.....	53
OBJETO DEL TRABAJO.....	60
MATERIAL Y METODOS.....	63
1.Microorganismos utilizados.....	64
2.Medios de cultivo.....	65
2.1.Medios de conservación y crecimiento.....	65
2.1.1. Medio YEPD.....	65
2.1.2. Medio CM.....	66

2.1.3. Medio LB.....	66
2.1.4. Medio LB con Antibióticos.....	67
2.2. Medios mínimos.....	67
2.2.1. Medios mínimos de levaduras y hongos.....	68
2.2.1.1. Medio mínimo 1 (MM-1).....	68
2.2.1.2. Medio mínimo 2 (MM-2).....	68
2.2.1.3. Medios mínimos suplementados.....	69
2.2.1.4. Medios mínimos con antibióticos.....	70
2.2.2. Medios mínimos de <i>Escherichia coli</i> .....	70
2.2.2.1. Medio M-9.....	70
2.2.2.2. Medio M-9 suplementado.....	71
2.3. Medios hipertónicos o de regeneración (MH).....	71
2.3.1. Medio OCM.....	72
2.3.2. Medios OMM-1 y OMM-2.....	72
2.4. Medios de regeneración con polímeros distintos del agar.....	73
2.4.1. Sobrecapas con carragenato.....	73
2.4.2. Sobrecapas con alginato.....	73
3. Técnicas empleadas en el estudio de los microorganismos empleados.....	74
3.1. Técnicas para comprobar los requerimien- tos auxotróficos de las estirpes emplea- das.....	74
3.2. Técnica para comprobar la resistencia a Antibióticos de las estirpes de <i>E. coli</i> .....	74
4. Determinación de las curvas de crecimiento de los microorganismos utilizados.....	75
5. Métodos de obtención de protoplastos.....	75
5.1. Protoplastos de levadura.....	75
5.1.1. Tratamientos con Novozyma 234.....	75
5.1.2. Tratamientos con enzimas de <i>Helix</i>	

<i>pomatia</i> .....	77
5.2.Obtención de protoplastos de <i>Aspergillus</i> <i>nidulans</i> .....	77
6.Técnica para inducir la captación.....	78
7.Inoculación y cultivo del sistema hongo- bacteria.....	79
8.Técnicas empleadas para la evaluación y seguimiento de los procesos de captación y mantenimiento de las asociaciones obtenidas.....	80
8.1. Tinción con DAPI.....	80
8.2. Técnicas de inmunofluorescencia indirecta.....	81
8.3. Técnicas de microscopía electrónica.....	83
8.3.1. Preparación de muestras.....	83
8.3.2. Observación de las muestras.....	84
EXPERIENCIAS Y RESULTADOS.....	86
1.Experiencias preliminares.....	87
1.1. Caracterización de los microorganismos.....	88
1.1.1. Elección de los microorganismos a utilizar.....	88
1.1.2. Comprobación de los marcadores auxo- tróficos.....	89
1.1.3. Comprobación de las resistencias a Antibióticos presentadas por las estirpes de <i>E.coli</i> .....	89
1.1.4. Curvas de crecimiento.....	90
1.2. Puesta a punto de las técnicas empleadas.....	90
1.2.1. Tinción con DAPI.....	93

1.2.2. Técnicas de inmunofluorescencia indirecta.....	94
1.2.3. Técnicas de microscopía electrónica.....	96
2. Obtención de protoplastos.....	100
3. Estudio del proceso de captación.....	102
3.1. Optimización del proceso de captación en levaduras.....	102
3.2. Estudio del mecanismo ultraestructural de captación.....	107
4. Crecimiento en medios mínimos.....	112
4.1. Experiencias realizadas con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 3.2 y <i>Escherichia coli</i> JC5466/pRD1..	113
4.2. Experiencias con <i>S.cerevisiae</i> DBY 746 y <i>E.coli</i> JC5466/pRD1.....	115
4.3. Experiencias realizadas con <i>S.cerevisiae</i> IV-PX2-1C y <i>E.coli</i> ATCC 13005.....	116
5. Estudio de la viabilidad y evolución de los sistemas levadura-bacteria.....	116
5.1. Seguimiento a microscopía electrónica.....	117
5.1.1. Experiencias previas.....	117
5.1.2. Visualización de las muestras.....	118
5.2. Medidas de densidad óptica.....	122
6. Estudios de estabilización de los sistemas levadura-bacteria obtenidos.....	123
6.1. Seguimiento a microscopía electrónica.....	123
6.1.1. Experiencias preliminares.....	123
6.2. Observaciones a microscopía electrónica.....	123
6.3. Crecimiento en medios mínimos.....	132
6.4. Aislamiento y estudio a microscopía	

electrónica de colonias crecidas en medios carentes de histidina.....	135
7.Experiencias con <i>A.nidulans</i> .....	135
7.1. Condiciones de captación.....	139
7.2. Crecimiento en medios completos y mínimos.....	140
7.3. Viabilidad y estabilización.....	141
7.3.1. Estudios a microscopía electrónica.....	141
7.3.2. Crecimiento en medios completos.....	143
7.3.3. Crecimiento en medios mínimos.....	145
7.4. Estudio a microscopía electrónica de las colonias aparecidas en medios carentes de adenina.....	145
DISCUSION.....	147
CONCLUSIONES.....	176
BIBLIOGRAFIA.....	179

INTRODUCCION

Las asociaciones entre organismos de distinta especie son conocidas desde antiguo, así las primeras descripciones datan del 1500 a de C y son atribuidas a Papyrus Ebers que describe al parásito intestinal *Ascaris lumbricoides*. Ya en nuestra Era, Alberto Magno describe la primera simbiosis parasitaria en vegetales, en el año 1200 y es Francesco Redi, científico considerado el padre de la Parasitología, quien en 1694 describe simbiosis parasitarias en peces, aves, mamíferos y humanos, siendo a partir de aquí innumerables las referencias en las que se citan asociaciones de distinto tipo aunque en la mayoría de

los casos son de naturaleza parasitaria.

H. Anton de Bary, primer autor, que en 1886, apuntó la naturaleza simbiótica de los líquenes gelatinosos, considerados hasta entonces como un organismo individual, acuña en 1879 el término "simbiosis" para describir el creciente número de asociaciones descubiertas, que aparece por primera vez en el artículo "Die Erscheinung der symbiose" (El fenómeno de la simbiosis), en el que De Bary define el término simbiosis en el más amplio sentido de la palabra, es decir, agrupa bajo este término a todos aquellos organismos de distintas especies que exhiben una forma de vida conjunta.

Tras el intento, en décadas pasadas, de agrupar bajo el término "simbiosis" sólo a aquellas asociaciones de carácter mutualista, actualmente se tiende de nuevo hacia una amplia concepción del mismo siguiendo el espíritu de De Bary. Así, hoy día se define como "Interrelación entre dos organismos, en la cual, los efectos de dicha relación pueden ser beneficiosos o perjudiciales", o bien como "asociación interespecífica en la que dos especies distintas de organismos dependen uno de otro en la alimentación o protección".

De acuerdo con el grado de beneficio o perjuicio que obtienen los participantes se subdividen tradicionalmente las relaciones simbióticas en tres categorías:

**-Comensalismo.-** Término acuñado por primera vez por P.J. Van Beneden en 1876 que agrupa aquellas asociaciones en las que uno de los dos simbiotes se beneficia mientras que el otro no obtiene ni beneficio ni



daño. Generalmente las ventajas obtenidas son de tipo nutricional o protector.

**-Mutualismo.-** Asociación simbiótica en la cual ambos participantes obtienen beneficios, que generalmente son de tipo nutricional.

**-Parasitismo.-** En este tipo de asociaciones uno de los participantes se beneficia a expensas del otro. Al igual que en el mutualismo, los beneficios suelen ser de tipo nutricional. Las simbiosis parasitarias varían dependiendo del grado en que se ve afectado el normal desarrollo del hospedador, definiendo en este sentido las relaciones patógenas como aquellas en las que las funciones vitales del hospedador son perturbadas por la continua presencia del huésped que, en este caso, sería denominado patógeno.

Sin embargo no siempre es posible incluir una relación simbiótica dentro de una de estas categorías, ya que frecuentemente estas relaciones no son estáticas y pueden derivar desde un tipo hacia otro, dependiendo de factores ambientales o influencias internas producidas por el propio desarrollo de la simbiosis. Así, una relación parasitaria puede derivar hacia un mutualismo o comensalismo; transición que constituye, además, el proceso evolutivo lógico hasta establecer relaciones simbióticas mutualistas.

Tradicional e independientemente de la subdivisión establecida en función de los beneficios obtenidos por los participantes, se han venido utilizando una serie de términos acuñados por distintos autores a fin de definir las distintas situaciones encontradas a medida

que se han ido conociendo nuevas relaciones simbióticas. Starr en 1975 desarrolla una clasificación de las relaciones simbióticas a fin de establecer una normalización en cuanto a la terminología empleada para definir los distintos aspectos de las relaciones simbióticas, ofreciendo aquí una modificación posterior de esta clasificación realizada por Ahmadijan & Aparecer, 1986, de acuerdo con los siguientes criterios:

-Localización de los simbioses, podemos distinguir entre:

\*Ectosimbiosis, en ella el huésped reside fuera del cuerpo celular del hospedador.

\*Endosimbiosis, en ella uno de los simbioses (que pasa a denominarse endosimbionte) reside en el interior de la o las células del otro participante, si bien en la mayoría de los casos el endosimbionte está rodeado por una membrana propia del hospedador que lo aísla del citoplasma. Cabe distinguir aquí entre endosimbionte citoplasmático y nuclear en función de la posición que adopte dentro de la célula hospedadora.

-En función de la dependencia entre ambos participantes cabe distinguir entre simbiosis obligadas y facultativas, dependiendo de la capacidad de los simbioses para desarrollar sus ciclos de vida de una forma independiente. Sin embargo es muy difícil apreciar cual es el grado de dependencia, ya que en muchos casos son capaces de desarrollar independientemente sus ciclos de vida pero no de colonizar los nichos ecológicos habitualmente ocupados en estado simbiótico.

-En función de la especificidad, encontramos desde organismos que pueden establecer relaciones simbióticas con una amplia gama de organismos, hasta otros en los que hay una elevada especificidad entre ambos simbiontes. En general el grado de la misma está relacionado directamente con el grado evolutivo de la relación simbiótica siendo más específica cuanto más evolucionada.

El establecimiento de relaciones simbióticas es un fenómeno común a los distintos reinos en los que se clasifican los seres vivos, pudiéndose considerar como tales relaciones desde aquellas que protagonizan los virus con huéspedes de organismos pertenecientes a cualquiera de los reinos, pasando por las que se establecen entre organismos pertenecientes a un reino con organismos situados en cualquiera de los otros, llegando incluso a postular como origen de los orgánulos eucariotas las relaciones simbióticas establecidas hace tres mil millones de años según la teoría de endosimbiosis seriada (SET) (Margulis, 1970, 1974, 1981).

## ENDOSIMBIOSIS

El estudio de los sistemas endosimbióticos se ha desarrollado poderosamente en las dos últimas décadas, tanto por su interés dentro del conjunto de las relaciones simbióticas como por la variedad de mecanismos que evolutivamente han desarrollado los organismos implicados en las mismas para posibilitar la colonización de un nicho ecológico extremadamente concreto como es el citocosmos (término acuñado por Taylor en 1983 para denominar el citoplasma de las células eucariotas), como así mismo por el papel evolutivo que han desempeñado en el origen de la célula eucariota (Taylor, 1976).

Este tipo de estudios se encuadra en un área de la biología celular que comenzó a ser conocida como "endocitobiología", término formalmente empleado por Schwemmer en 1980. La rapidez con que se han desarrollado ha provocado la aparición de un elevado número de términos para denominar a un mismo concepto. Así en las referencias bibliográficas aparecen las palabras simbiote intracelular, endosimbiote, endocitobionte, citobionte o xenosoma (en sentido estricto) cuando se hace referencia a la localización intracelular del simbiote. O bien simbiote nuclear, cuando es esta la ubicación adoptada por el mismo.

Corliss en 1985, en un intento de unificar criterios, propone el uso del término xenosoma, en sentido amplio, para definir aquellos organismos que viven, frecuentemente durante un largo periodo de tiempo, dentro del ambiente celular de otro organismo que se denomina hospedador.

Las características que ha de presentar un organismo o estructura para ser considerado xenosoma son las siguientes: debe ser una estructura que contenga DNA, rodeada al menos por una membrana y que espacial y fisiológicamente será capaz, después de un proceso de entrada satisfactorio, de vivir durante al menos un cierto tiempo dentro de una célula (que siempre será eucariota, unicelular o parte de un organismo pluricelular), así como ser capaz de reproducirse durante su asociación con el hospedador.

De acuerdo con esta definición, dentro de los xenosomas quedarían incluidos aquellos orgánulos citoplasmáticos cuyo origen se atribuye a relaciones simbióticas.

A partir de esta definición, el término endocitobiología podría ser sustituido por otro más amplio: "xenosomología", que incluiría los estudios de las interrelaciones entre citocosmos y xenosomas a todos los niveles.

En el establecimiento y mantenimiento de un xenosoma en la célula huésped, bien de forma temporal ó permanente, deben considerarse las siguientes etapas:

-Reconocimiento.

Generalmente es la etapa menos conocida. Presumiblemente el hospedador y/o el huésped deben ser sensibles a los atractivos de su posible hospedador y/o huésped. Por ello, y aunque en muchos casos permanecen desconocidos, deben existir mecanismos de reconocimiento o

bien interacciones superficiales que promuevan la entrada.

En el caso de las relaciones simbióticas que se establecen entre amebas y sus bacterias simbióticas, la captación está mediada por el uso de agentes quimiotácticos (Ahn & Jeon, 1979) o bien por la presencia de poly-L-Lisina unida a las superficies bacterianas de forma artificial, (Kim & Jeon. 1983). En el caso de las simbiosis rizobio-leguminosa ha sido demostrado el papel de las lectinas situadas en la superficie de los pelos radicales, que son capaces de unir polisacaridos presentes en la pared celular de la bacteria. En este mecanismo de unión reside la especificidad entre hospedador y huésped característica de estas relaciones, ya que sólo una determinada lectina puede unir a determinados polisacaridos (Bauer & Bluvaneswari, 1980).

#### Modo de entrada

Evidentemente, sin un proceso que posibilite la entrada del probable xenosoma, no se puede establecer temporalmente o de forma estable ningún sistema endosimbiótico. Evolutivamente, esta etapa sería previa a la del reconocimiento.

Tanto estructuralmente, debido a la presencia de paredes celulares, membranas etc, como fisiológicamente, los procesos de entrada son complicados.

Moulder establece en 1985 una clasificación y terminología de los modos de entrada de los parásitos intracelulares. De acuerdo con ella los parásitos pueden entrar bien por DIACITOSIS, mecanismo por el cual el parásito penetra realizando un agujero en la capa externa

de la célula hospedadora (Bdellovibrios, Microsporidios); o bien penetran via ENDOCITOSIS, alternativa en la cual no se destruye la continuidad estructural del hospedador, de esta forma el endosimbionte entraría rodeado por una membrana propia de su hospedador y derivada de la membrana citoplasmática de este mismo.

Este autor distingue dos tipos de endocitosis; en unas, el mecanismo está facilitado por una adaptación propia del huésped y en otras, por el hospedador, y dentro de ambas establece nuevas dicotomías dependiendo de la presencia o ausencia de estructuras especializadas en la unión y/o entrada.

Igualmente, en el resto de las simbiosis intracelulares de carácter no parasitario, el mecanismo más frecuente es la endocitosis. Ello, incluso, da origen a considerar a los protozoos como organismos preadaptados al establecimiento de endosimbiosis, dada su enorme capacidad para captar partículas via endocitosis (Stewart & Mattox, 1985).

#### Supervivencia.

La conversión de una célula en endosimbionte tras su captación depende de la capacidad de esta para evitar los procesos de digestión. Una vez superada esta etapa la supervivencia del endosimbionte dependerá de su capacidad para nutrirse en el interior y en ocasiones totalmente a expensas de su hospedador.

Tras la entrada vía endocitosis (mecanismo mayoritario de entrada) de una célula en un hospedador se desencadenaría la puesta en marcha de mecanismos de

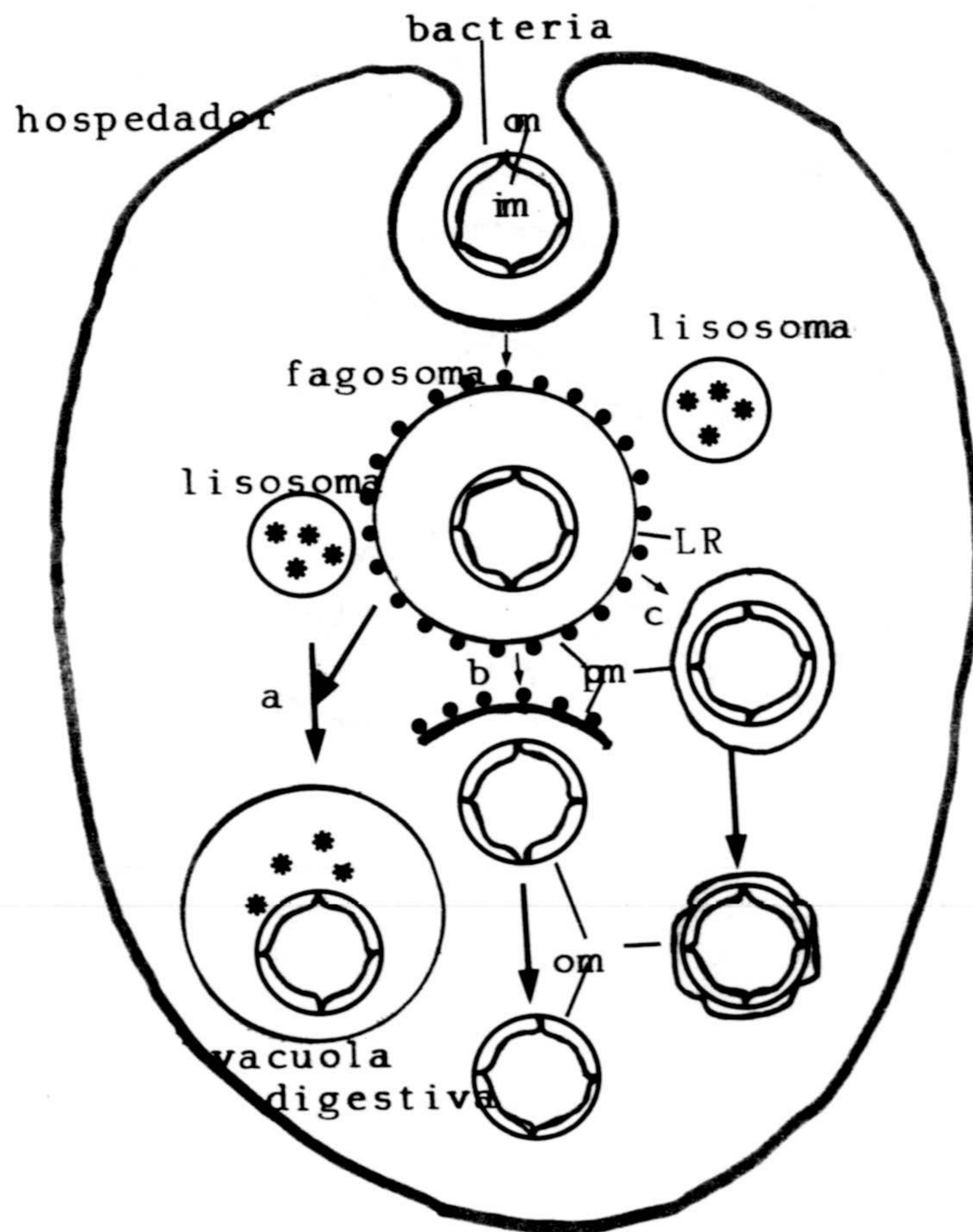
defensa. Así los lisosomas se unen por fusión con la vesícula que contiene al endosimbionte (fagosoma), vertiendo en ella hidrolasas ácidas (glucosidasas, lipasas y proteasas), en el caso de células especializadas poseen además enzimas como lisozima, lactoferrinas y proteínas catiónicas que también serían activadas. Este ataque enzimático provocaría la muerte del huésped, por ello el establecimiento de una relación simbiótica intracelular depende de la capacidad para eludir los procesos de digestión.

Una forma elegante de evitar dichos procesos por parte del endosimbionte es adoptar como hospedador células carentes de lisosomas. Este tipo de adaptación es la que presentan parásitos tales como especies del género *Plasmodium*, o como algunas especies pertenecientes a las familias *Bartonellaceae* y *Anaplasmataceae* (Haschen, 1975), que parasitan a eritrocitos maduros carentes, por tanto, de enzimas lisosomales. Sin embargo, en la mayoría de los casos estos parásitos desarrollan generalmente alguna etapa de su ciclo vital en otro tipo de hospedadores que sí contienen lisosomas, ó bien sus ancestros desarrollaron capacidades endosimbióticas en hospedadores con sistema lisosomal.

El papel desempeñado por este tipo de adaptaciones en la evolución de los mecanismos de supervivencia intracelular no ha debido ser importante.

Según Cavalier-Smith & Lee (1985), pueden considerarse principalmente tres tipos de estrategias para eludir los procesos de digestión. Esquema.1.





Esquema 1.-Estrategias propuestas por Cavalier-Smith & Lee en 1985 para eludir los procesos de digestión

*-Imposibilidad de los enzimas lisosómicos liberados en el fagosoma para digerir al endosimbionte.*

Esta vía es la elegida por muchos parásitos intracelulares tales como *Yersinia Pestis*, *Salmonella typhimurium*, *Coxiella burnetti* y especies del género *Leishmania*.

En la mayoría de los casos es desconocido el íntimo mecanismo por el cual eluden la acción enzimática. Es conocida, en cambio, la adaptación de *C. burnetti* a ambientes extremadamente ácidos como los del fagolisosoma incluso cuando, experimentalmente y por adición de agentes tales como la cloroquina, metilamina y cloruro amónico, se eleva el pH; en el fagosoma se inhibe la multiplicación de esta bacteria (Hackstadt et al. 1983).

Por parte de algunas especies del género *Leishmania* se evita la acción enzimática tanto por la secreción de grandes moléculas de carbohidratos con un elevado número de cargas negativas, como por un incremento del pH interno del fagosoma provocado por la extensa actividad proteásica que exhiben estos organismos: de estas dos formas inactivan los enzimas lisosomales (Alexander & Vickerman, 1975).

*-Rotura y pérdida accidental de la membrana del fagosoma, quedando libre el simbiote en el citoplasma, lo que impide la unión de las vesículas lisosómicas.*

Este tipo de especialización la presentan organismos tales como *Trypanosoma cruzi* y bacterias como *Rickettsia tiphy* y *R. tsutsugamushi*. El mecanismo por el cual escapan del fagosoma es desconocido, no obstante en el

caso de las especies citadas de *Rickettsia* se ha sugerido la implicación de la Fosfolipasa A en la disolución de la membrana (Winkler & Miller, 1984).

Igualmente, estos mecanismos se presentan en relaciones simbióticas no parasitarias tales como las protagonizadas por especies del género *Holospora* con *Paramecium*.

*-Pérdida accidental o inactivación de los receptores específicos que deben presentar las membranas del fagosoma, evitando de esta forma la fusión de los lisosomas.*

Este tipo de estrategia la presentan microorganismos tales como *Micobacterium tuberculosis*, *Chlamydia psittaci*, *Legionella pneumophila* y especies del género *Chlorella*.

Tanto en el caso de *C.psittaci* (Friis, 1972), como de *L.pneumophila* (Horwitz, 1983), la inhibición de la fusión de los lisosomas con el fagosoma que los contiene debe residir en ciertas estructuras aún sin identificar situadas a nivel de la pared celular. En cambio, en el caso de *M.tuberculosis* la habilidad para eludir la fusión lisosomal se debe a la excreción de los productos bacterianos, probablemente sulfátidos (Goren et al, 1974).

Los dos últimos mecanismos descritos son los más importantes, especialmente desde un punto de vista evolutivo para explicar el origen endosimbiótico de mitocondrias y cloroplastos.

## Adaptación fisiológica

Una vez superada la etapa de supervivencia referida estrictamente a procesos que evitan la destrucción del huésped por parte del hospedador, el paso siguiente sería la adaptación fisiológica que supone la colonización de un ambiente intracelular en cuanto a procesos de nutrición se refiere.

Esta etapa es una de las menos conocidas en términos generales, salvo en aquellas simbiosis especialmente interesantes en función de su importancia económica, como son las simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

Salvo en el caso de los virus que explotan los complejos macromoleculares de la célula que los alberga, el resto de los organismos protagonistas de endosimbiosis poseen, al igual que su hospedador, toda la maquinaria biosintética necesaria para la síntesis de macromoléculas, siendo por tanto la adaptación más generalizada, al menos en el caso de simbiosis de tipo parasitario, el aprovechamiento de la energía acumulada en los enlaces fosfato de ácidos nucleicos y nucleósidos fosfato de la célula hospedadora, como en el caso de *Chlamydiae* (Hatchet *et al*, 1982) donde hay una dependencia total del huésped, y especies del género *Rickettsiae* en las que la dependencia es parcial (Bovarnick *et al*, 1960).

En el caso, de las relaciones simbióticas de tipo mutualista el interés se centra principalmente en el estudio de los productos aportados al hospedador por el endosimbionte. En asociaciones protagonizadas por organismos fotosintéticos, como la establecida entre algas y grandes foraminíferos, es conocido el aporte al

hospedador por parte del huésped de compuestos orgánicos fruto de su actividad fotosintética, transfiriendo incluso fotosintato (Muller-Merz & Lee, 1974).

En cualquier caso es evidente que en las relaciones endosimbióticas debe existir un movimiento de metabolitos entre hospedador y huésped bien de forma uni ó bidireccional que, en el caso de estar el endosimbionte rodeado por una membrana propia del hospedador, dependerá en gran parte de la existencia de los canales de transporte adecuados.

#### Vía de transferencia.

Uno de los problemas que evolutivamente presenta una mayor complejidad es el cómo un organismo adaptado a un ambiente intracelular debido a su relación endosimbiótica, y transformado en xenosoma, puede infectar de nuevo a otros hospedadores.

Evolutivamente los organismos implicados en este tipo de relaciones han resuelto este problema de diferentes formas, que conllevan un mayor o menor grado de adaptación; así, se observan desde los casos más simples, que frecuentemente aparecen en las relaciones de tipo parasitario, en las que el endosimbionte abandona al huésped y es capaz de infectar a un nuevo individuo, hasta otros complicados mecanismos de adaptación desarrollados también por endoparásitos como Leismanias, Trypanosomas y los agentes etiológicos de la malaria, que necesitan del concurso de organismos vectores tales como insectos, con los que establecen relaciones que podrían ser calificadas como comensalismo.

Otro tipo de solución es la diferenciación que presentan determinados simbiosomas entre formas reproductoras e infectivas como *Bdellovibrios*, Clamidias, y especies de los géneros *Leishmania* y *Holospira*, en las que las formas reproductoras están especialmente adaptadas al ambiente intracelular.

En otros, casos el endosimbionte está tan adaptado a su citocosmos que es incapaz de abandonarlo, y se transmite de generación en generación, lo cual implica un cierto grado de sincronía entre hospedador y huésped en cuanto a la reproducción de ambos.

El caso extremo de adaptación lo constituiría la conversión a orgánulo celular, en cuyo caso la adaptación es tal que no pueden abandonar el citocosmos.

#### Control y regulación del invasor.

En determinadas condiciones (excepto en el caso de los parásitos extremadamente virulentos) y a fin de conseguir una estabilidad, al menos temporal, tanto el xenosoma como el hospedador deben mantener un cierto ajuste en cuanto a la sincronía de sus procesos de división. Por ello la tasa de división del endosimbionte es, probablemente, directamente proporcional al daño producido en las células hospedadoras, en el caso de simbiosis parasitarias (Moulder, 1985).

Todo ello lleva a la conclusión de que debe existir un cierto control, que es atribuido por los parasitólogos a adaptaciones del parásito para preservar su hábitat. Sin embargo, los estudiosos de las simbiosis de tipo mutualista sitúan estos mecanismos de control en el

hospedador, a fin de regular la proliferación del simbiote en su beneficio. Es difícil, no obstante, establecer los límites de una forma generalizada.

En estudios realizados infectando cultivos celulares de fibroblastos de ratón (células L) con *Chlamydia psittaci*, las monocapas aparecen totalmente destruidas después de unos días de rondas sucesivas de infección de la bacteria. Sin embargo, tras 2-4 semanas de incubación emergen colonias de células L que están infectadas con *C. psittaci*, muchas de las cuales pueden permanecer indefinidamente en estado de infección (Moulder *et al*, 1980). Este mecanismo constituiría una adaptación inteligente de un parásito para no destruir por completo su hábitat intracelular.

En el caso de la especie, de *Chlorella* que establecen relaciones simbióticas con el celentéreo *Hydra viridís*, existe una armonía en los procesos de división celular de ambas, de modo que el número de algas que colonizan las células de *H. viridís* varía dependiendo de las condiciones de cultivo del celentéreo. Así, bajo condiciones de iluminación, *H. viridís* contiene no menos de 25 algas en su interior; en cambio, sometidas a oscuridad, el mecanismo que previene la unión de los lisosomas con el fagosoma desaparece, albergando no más de tres células fotosintéticas, y el resto son digeridas o expulsadas sin daño alguno (Neckelmann & Muscatine, 1983). Igualmente puede variar el número de algas que posee este celentéreo en función de la concentración de iones sulfato (esenciales para la división del alga) lo que constituye otra vía por la cual el hospedador puede estimular o inhibir los procesos de división de *Chlorella* (McAuly, 1980). Esto constituiría una forma de control del huésped por el

hospedador mediada por una limitación de nutrientes. Sin embargo, autores como Moulder (1985) consideran que los hospedadores no pueden ejercer mecanismos de control sobre el huésped a través de una limitación de nutrientes.

En algunas asociaciones entre algas y ciliados tales como *Euplotes daidaleos* y *Stentor polymorphus*, se han observado procesos de digestión del alga, lo que supone presumiblemente una vía de regulación. Pero ¿cómo pueden acceder de forma limitada los enzimas digestivos del hospedador al fagosoma que contiene al huésped?, podrían explicarse estos hechos asumiendo cambios en la vacuola perialgal durante el periodo de vida de la misma, perdiendo así su capacidad protectora.

#### Coevolución de hospedador y xenosoma

Para que una relación simbiótica evolucione hacia una forma estable o permanente tras un desarrollo favorable de los procesos de reconocimiento y entrada, posteriormente deben desarrollarse una serie de ajustes entre ambos participantes; ello hace presumir la existencia de una presión selectiva sobre los dos componentes de la asociación, que llevará a un control genético ejercido por ambos, así como a una sincronía, al igual que ocurre en las interacciones de organismos en hábitats distintos del citocosmos. Finalmente y como consecuencia de esta coevolución, el xenosoma iría perdiendo paulatinamente su capacidad para sobrevivir fuera del huésped (Corliss, 1985).

Así, en la relación simbiótica entre *Paramecium bursaria* y especies de *Chlorella* se observan mecanismos de regulación del huésped mediados no ya por procesos de digestión, sino por mecanismos de regulación en función de



las condiciones ambientales al igual que ocurre en los ecosistemas. Es el tipo de regulación denominada "ecológica".

En este caso la población de algas que contiene el ciliado varía dependiendo de factores tales como la iluminación y la concentración de nutrientes; así, en condiciones de iluminación la cantidad de carbohidratos excretados por el huésped fotosintético incrementa la tasa de división del ciliado (Reisser *et al*, 1980). Bajo condiciones de oscuridad disminuye el número de algas alojadas por el paramecio, y la tasa de crecimiento del ciliado excede de la exhibida por el endosimbionte; el desfase en el crecimiento origina la aparición de paramecios libres del endosimbionte. Esta regulación constituiría un mecanismo de regulador de tipo estadístico (Reisser *et al*, 1985).

En otros casos, tanto de simbiosis nucleares (Bacteria-*Paramecium bursaria*) cómo de simbiosis citoplasmáticas (*Caedibacter taeniospiralis*-*Paramecium aurelia*), se ha podido demostrar como la tasa de crecimiento del endosimbionte es genéticamente dependiente del hospedador (Sonneborn, 1943; Gortz & Dieckmann, 1980).

El estudio de los mecanismos integrativos en los sistemas simbióticos permite la construcción de una tendencia evolutiva que llevaría finalmente a la transferencia de información genética entre ambos participantes (tal es el caso de las simbiosis *Rhizobium*-leguminosa) y cuyo último escalón evolutivo llevaría a la transformación del xenosoma en orgánulos celulares totalmente adaptados y dependientes de su hábitat, el "citocosmos".

## ENDOSIMBIOSIS EXPERIMENTALES

Hoy día uno de los principales objetivos en investigación, tanto básica como aplicada, se centra en la transferencia de nuevas capacidades metabólicas a organismos que no las poseen de forma natural.

Al amparo de esta corriente se han desarrollado un conjunto de técnicas enfocadas hacia la mejora de especies que en su mayoría consisten en la transferencia de material genético. Entre ellas destacan todas aquellas que se agrupan bajo el término "ingeniería genética", las cuales han alcanzado un importantísimo desarrollo en las últimas décadas.

En la naturaleza, la simbiosis de tipo mutualista representa, para un determinado número de organismos, una vía natural para adquirir nuevas capacidades a la vez que permite a los participantes la colonización de hábitats inaccesibles para ellos en otras circunstancias. Desde esta óptica, los estudios encaminados a la consecución de simbiosis experimentales (endosimbiosis), constituirían una vía "natural" para posibilitar la citada adquisición.

En este sentido cabe destacar los trabajos de Ahn y Jeon (1979) que aunque de una forma anacrónica, pueden considerarse como estudio puente en este terreno. Dichos autores establecen una relación endosimbiótica de forma experimental entre *Amoeba proteus* y una bacteria sin identificar aislada de otra estirpe de *A. proteus* que diez años antes había sido infectada espontáneamente por esta bacteria (Jeon & Lorch, 1967). *A. proteus* supera el efecto

nocivo del huésped, tornándose al cabo del tiempo en una relación simbiótica en la que incluso el hospedador se hace dependiente del huésped.

En estas experiencias la captación de la bacteria por la estirpe de *A. proteus* es inducida mediante la adición de extractos celulares de *Hydra viridis*.

La máxima captación (próxima al 100%) se obtiene utilizando concentraciones bacterianas iguales ó superiores a  $3 \times 10^8$  células/ml, encontrándose que cada ameba contiene aproximadamente unas 300 bacterias.

Los estudios a microscopía electrónica revelaron que tras la fagocitosis las bacterias se hallaban en vacuolas fagocíticas, y comenzaban a dividirse rápidamente hasta alcanzar un equilibrio tras 24 días, observando aproximadamente unas 42000 bacterias por ameba, muchas de las cuales mueren; detectándose que tras 18 meses se establecen relaciones de dependencia del huésped por parte del hospedador.

Estudios posteriores realizados en este sistema por el mismo grupo investigador (Ahn & Jeon, 1983) revelaron, a través de electroforesis bidimensionales, la presencia de un polipéptido de 29 kD de Pm en el citosol de la ameba, ausente en las estirpes de *A. proteus* libres de endosimbiontes, que identificaron como una proteína secretada por la bacteria al citosol del hospedador, aunque no ha podido ser determinado su posible efecto sobre el establecimiento y mantenimiento de la asociación.

Posteriormente (Lorch *et al*, 1985) detectaron la presencia de una proteína con peso molecular próximo a

200000 D, que inyectada en el citosol de estirpes no simbióticas de *A. proteus* provocaban en las mismas un efecto letal y, que a diferencia de la descrita anteriormente, es producida por la ameba infectada y no por el endosimbionte ni por amebas libres de los mismos, considerándose por tanto fruto del estado simbiótico.

Este tipo de experiencias son relevantes ya que las amebas simbióticas pueden servir como modelo para el estudio de las consecuencias genéticas de las relaciones simbióticas.

No obstante y desde un punto de vista económico, las asociaciones más interesantes serían aquellas en las que uno de los participantes fuese capaz de suministrar al otro algún nutriente limitante en la naturaleza, como es el caso de las asociaciones con microorganismos fijadores de nitrógeno ó bien fotosintéticos. Esto, fenotípicamente supondría la adquisición de capacidades relevantes desde un punto de vista aplicado, a la vez que transferir la información genética responsable de estas capacidades de una forma completa sin aislarla de su propio entorno genético.

Todo ello hace interesante los estudios encaminados a la obtención de simbiosis de forma experimental en vegetales y hongos. Sin embargo, y a diferencia de los protozoos que pueden considerarse como organismos preadaptados al establecimiento de endosociaciones dada su capacidad para captar partículas, las células vegetales presentan gruesas paredes celulares (Stainer, 1970), por ello estudios de este tipo sólo han podido ser realizados una vez desarrolladas y puestas a punto las técnicas de obtención y fusión de protoplastos,

que a continuación y de una forma concisa se describen, incidiendo en aquellos aspectos más interesantes en relación con el tema que nos ocupa.

### Protoplastos y sus aplicaciones

#### Técnicas de obtención de protoplastos

Salvo en algunas especies bacterianas en las que los protoplastos se obtienen de forma espontánea, normalmente es necesario inducir su formación.

Los protoplastos bacterianos habitualmente se obtienen bien por adición de antibióticos que inhiben la biosíntesis de la pared celular, ó bien mediante el uso de enzimas como la lisozima. En el caso de hongos y células vegetales se utilizan complejos enzimáticos dotados de distintas actividades. Estos complejos enzimáticos suelen ser producidos por microorganismos ó bien obtenidos a partir del jugo digestivo de animales tales como caracoles, generalmente pertenecientes al género *Helix*.

La elección del complejo enzimático depende de las distintas actividades enzimáticas que estos presenten en función de las paredes celulares sobre las que han de actuar (Villanueva, 1966; Villanueva & García Acha, 1966; Kuo y Yamamoto, 1975; Peberdy, 1976). En el caso de tratamientos sobre hongos comunmente se utilizan complejos enzimáticos con actividades quitinasa y celulasa, mientras que para células vegetales las quitinasas son sustituidas por pectinasas.

Dada la sensibilidad osmótica de los protoplastos, tanto durante el aislamiento de los mismos

como en posteriores manipulaciones, deben utilizarse medios con la adecuada tonicidad a fin de evitar la lisis osmótica de los mismos. Generalmente como estabilizadores osmóticos se utilizan soluciones de alta molaridad de sales como el KCl, CaCl<sub>2</sub> etc, ó azúcares como sorbitol, manitol, sacarosa y otros.

El rendimiento de los tratamientos enzimáticos es dependiente en gran medida del estado fisiológico de las células de partida en el caso de los hongos. Así influyen factores como el medio de cultivo (Davis, 1985) y la edad del cultivo, considerándose en general la fase exponencial de crecimiento el momento óptimo para la realización de estos tratamientos (Benitez et al, 1975; Peberdy et al, 1976).

Así mismo suelen realizarse pretratamientos con agentes tiólicos o detergentes, que facilitarán la posterior actuación de los enzimas. La duración de estos tratamientos depende tanto de la especie de microorganismo a tratar, como de la edad del cultivo (Davis, 1985).

Los protoplastos son capaces de regenerar la pared celular en medios osmóticamente adecuados, siendo muy importantes las condiciones del entorno. Así en levaduras gemantes, como por ejemplo *Saccharomyces* la regeneración de los protoplastos sólo tiene lugar cuando estos se encuentran embebidos en una matriz sólida, tal como agar, gelatina ó polietilen glicol (Nečas, 1962,; Svoboda, 1966; Svoboda & Piedra, 1983). En ausencia de estas matrices, los protoplastos producen únicamente redes fibrilares (Nečas, 1971). En el caso de otras especies de hongos no es necesaria la utilización de medios sólidos, aunque el uso de los mismos incrementa sensiblemente la tasa de

regeneración (García Acha *et al*, 1966; Fukui *et al*, 1969; Strunk, 1969).

### Fusión de protoplastos

Dentro del campo de la genética, el desarrollo de técnicas de fusión de protoplastos abre, en principio, una posibilidad de superar las restricciones que los mecanismos sexuales imponen al intercambio genético entre organismos separados evolutivamente.

Las primeras observaciones de fusión de protoplastos de forma espontánea fueron descritas en especies de *Bacteroides* por Mellon *et al*, 1925. Estos fenómenos que fueron atribuidos a las técnicas de preparación y tinción; sin embargo, observaciones posteriores realizadas "in vivo" pusieron de manifiesto la existencia de estos fenómenos de forma natural (Smith, 1944), confirmándose posteriormente con otros microorganismos tales como *Proteus vulgaris* (Stephen & Hutchinson, 1951), *Bacillus anthracis* (Staëlin, 1956), especies de *Saccharomyces*, *Candida* (Müller, 1965), *Polysticus versicolor* (Strunk, 1967) y *Fusarium culmorum* (Lopez Belmonte *et al*, 1966).

Paralelamente a las observaciones arriba citadas se intentaron reproducir estos procesos de forma artificial, así los primeros trabajos de fusión controlada de protoplastos fueron realizados con razas genéticamente marcadas de *Escherichia coli* F<sup>-</sup> por Ledeborg y StClair en 1958 resultando infructuosos, pero abrieron un nuevo camino para posteriores estudios.

La fusión de protoplastos tiene lugar cuando las membranas de los mismos se encuentran en íntimo contacto, y aunque esto puede ocurrir de forma espontánea, como ya se ha mencionado, lo hace con una probabilidad muy baja. Por tanto es necesario el uso de agentes que induzcan agregación celular, para elevar de este modo la frecuencia de fusión. Las primeras experiencias fueron realizadas utilizando la fuerza centrífuga como agente inductor y/o la aglutinación intensiva de protoplastos en frío (Ferenczy *et al*, 1972; 1974) Sin embargo tras el descubrimiento del polietilenglicol (PEG) como agente aglutinante y por tanto fusogénico en protoplastos vegetales (Kao & Michaylunk, 1974; Wallin *et al*, 1974) este polímero comenzó a utilizarse para fusionar protoplastos microbianos (Ferenczy *et al*, 1975; Anné y Peberdy, 1975; 1976), así como en fusiones de células de mamífero (Pontecorvo *et al*, 1975).

El efecto del PEG consiste en provocar una fuerte deshidratación, y por tanto la agregación necesaria para que la fusión de membranas se lleve a cabo. Este proceso se ve facilitado por la presencia de iones calcio.

Aunque el mecanismo molecular de la actuación del sistema PEG-Ca<sup>2+</sup> no es del todo conocida, los estudios realizados al respecto hacen pensar que tras la puesta en contacto de las membranas de los protoplastos, se produce una translocación de partículas protéicas intramembranas en las zonas de contacto, permitiendo una interacción entre los lípidos de membrana, lo que lleva a una reorganización de las mismas promovida por los iones Ca<sup>2+</sup>. Finalmente se produciría la fusión de pequeñas regiones de las membranas en contacto, con formación de pequeños puentes citoplasmáticos, que al ir ensanchándose provocarían la fusión de los protoplastos (Ahkong *et al*, 1975).



Más recientemente se han descrito procesos de fusión inducidos a través de descargas eléctricas, bien en presencia (Weber *et al*, 1981) ó en ausencia (Halfmann *et al*, 1982) del citado polímero.

El desarrollo de estas técnicas ha sido impulsado como ya ha sido mencionado anteriormente, por la posibilidad de obtener de esta forma híbridos somáticos entre organismos, independientemente de su posición taxonómica. Así desde las primeras experiencias descritas con resultados positivos (ya citadas) son innumerables los trabajos realizados con esta finalidad.

Dentro de este campo es posible establecer dos categorías atendiendo a la naturaleza intra ó interespecífica de los híbridos obtenidos.

#### -Fusiones intraespecíficas.-

Este tipo de fusiones en las que ambos participantes pertenecen a la misma especie ofrece grandes ventajas, principalmente en aquellos microorganismos que carecen o presentan con una frecuencia muy baja ciclos de reproducción sexual, como es el caso de numerosas especies de hongos. Los trabajos recogidos en la literatura científica en este terreno son innumerables y en ellos generalmente se utilizan estirpes auxotróficas, lo que posibilita la selección de los híbridos obtenidos tras el proceso de fusión (Ferenczy, 1985a).

Mediante esta técnica han podido aislarse razas superproductoras de cefalosporinas (Hamlyn & Ball, 1978), de celulasas (Toyama *et al*, 1984), de etanol (Farahnak *et al*, 1986) y de metionina (Brigidi *et al*, 1988), entre

otros.

Los procesos de fusión se utilizan así mismo como método de análisis genético y localización de genes en aquellos microorganismos que por carecer de ciclos de recombinación natural es imposible realizar un análisis de la segregación de caracteres en los descendientes.

#### -Fusiones interespecíficas.-

Este tipo de fusiones permitirían, en principio, la obtención de nuevas entidades fruto de las interacciones entre los genomas de diferentes especies de microorganismos.

En el campo de la micología los primeros ensayos en este terreno son los realizados con *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus fumigatus* (Ferenczy et al, 1977) en los cuales la frecuencia de complementación es mucho más baja que en el caso de fusiones intraespecíficas, lo cual parece indicar que los estados heterocarionte y diploide son letales en la mayoría de los casos, o cuando menos, altamente inestables. El grado de inestabilidad es directamente proporcional a la distancia taxonómica entre ambos participantes, ello hace especialmente interesante la realización de estudios de este tipo, con el fin de establecer las relaciones genético-taxonómicas entre microorganismos considerados como pertenecientes a especies distintas (Kevei & Peberdy, 1977).

Incluso han llegado a describirse fusiones intergenéricas, tal es el caso de las experiencias realizadas por Provost et al, 1978, que describe la aparición de complementación nutricional después de

fusionar protoplastos de *Candida tropicalis* y *Saccharomyces fibuligera*, exhibiendo los híbridos obtenidos espectros de asimilación distintos de los de las estirpes de partida, así como diferencias en cuanto al crecimiento y morfología celular, probablemente debido a que los híbridos son aloploides parciales.

Iguales resultados se obtienen en el caso de fusionar protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* (Tamaki, 1982). El análisis genético de una microcolonia obtenida demuestra la presencia del juego cromosómico completo de *S. cerevisiae* más un cromosoma procedente de la dotación genética de *Schz. pombe*.

En el campo de la mejora genética de especies vegetales los esfuerzos han ido dirigidos hacia fusiones entre células de leguminosa y no leguminosa, describiéndose la formación de heterocariontes entre cebada y soja (Kao *et al*, 1974), maíz y soja (Kao *et al*, 1974), zanahoria y guisante (Gamborg *et al*, 1975) entre otras. En todos ellos la formación de heterocariontes es visualizada a microscopía óptica, e incluso se observa la división de los mismos llegando en algunos casos a obtener agregados de más de 100 células, mientras que en los híbridos en los que la fusión de núcleos tiene lugar no se han observado procesos de división.

A pesar de estos resultados, que en principio pueden considerarse desalentadores, las perspectivas abiertas en este terreno son esperanzadoras.

La "audacia investigadora" ha llegado incluso más lejos, intentando transferir material genético a través de

fusión de protoplastos entre organismos situados en reinos distintos. En este sentido cabe destacar los trabajos de Kingsman *et al*, 1979, en que los autores transforman protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* con el plásmido híbrido pLC544 portado por *Escherichia coli* por fusión de protoplastos de ambos microorganismos, obteniendo una elevada frecuencia de transformación en el caso de utilizar protoplastos parcialmente lisados de *E.coli*, constatando igualmente la ausencia de transformantes en el caso de realizar la fusión con células bacterianas enteras.

En esta misma línea, aunque con posterioridad en el tiempo, Rassoulzadegan *et al* en 1982, transforman cultivos celulares de mamíferos mediante fusión con protoplastos de *Escherichia coli*, portadores de un plásmido derivado del pBR32 en el que han sido clonados los genes del virus SV40. Estos autores observan una frecuencia de transformación, con este método, muy superior a la obtenida por técnicas convencionales de coprecipitación con iones calcio. Así mismo destacan la importancia de utilizar protoplastos parcialmente lisados de la bacteria.

En células vegetales, concretamente protoplastos de *Vinca rosea*, Hasezawa *et al* en 1981, logran transferir el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* por fusión entre protoplastos del vegetal y de la bacteria.

En estos ensayos, si bien no se consiguen transferir capacidades propias de uno de los participantes, (a excepción de las experiencias realizadas por Hasezawa *et al*, 1981), si se logra introducir material genético vía fusión de protoplastos entre microorganismos taxonómicamente muy alejados, como lo son los pertenecientes a distintos reinos, ampliándose, así el rango de aplicación

de técnicas diseñadas, en principio, con objetivos menos ambiciosos.

#### Fusión de protoplastos como mecanismo de introducción de elementos genéticos y particulados

La captación, de forma espontánea durante los tratamientos que inducen la obtención de protoplastos, de pequeñas partículas como virus, macromoléculas orgánicas como ferritina, y partículas inertes tales como esferas de poliestireno, ha sido demostrada vía microscopía electrónica por numerosos autores (Cocking, 1965, 1966, 1970; De Leo & Cocking, 1967, Willison *et al*, 1971, Suzuki *et al*, 1977), llegando incluso a describirse la captación de microorganismos tales como *Rhizobium leguminosarum* por Davey & Cocking en 1972.

Al igual que en el caso de la fusión de protoplastos, estos mecanismos se producen de una forma espontánea con una bajísima frecuencia, dada la dificultad de mantener el íntimo contacto entre los participantes para que estos fenómenos tengan lugar. La rápida y fuerte agregación que se produce en los protoplastos cuando se ponen en contacto con PEG, llevó al estudio de este polímero como agente inductor de la captación de bacterias por protoplastos de células vegetales (Davey & Power, 1975), utilizando, como modelo, células de *Anacystis nidulans* y protoplastos de *Parthenocissus tricuspidata*, obteniendo excelentes resultados.

De esta forma sería posible introducir, mediante tratamientos de fusión de protoplastos, elementos genéticos aislados, orgánulos e incluso bacterias en el interior de protoplastos.

En cuanto al mecanismo de captación existen algunas discrepancias.

Así, en el caso de la captación de elementos de pequeño tamaño como moléculas de DNA, se propone (Hinen, 1985) la adhesión de las mismas a la superficie de los protoplastos (probablemente por efecto de los iones calcio), y como consecuencia de los procesos de fusión que tendrían lugar en presencia de PEG-Ca<sup>2+</sup> el DNA quedaría atrapado entre las membranas de dos ó más protoplastos, y por tanto liberado en el interior del citoplasma celular; este hecho ha sido probado por estos autores, utilizando razas de *Saccharomyces cerevisiae* haploides, observando que la mayoría de los transformantes presenta dotación diploide.

Este mecanismo de entrapamiento es aceptado por algunos autores como vía básica de captación de elementos de gran tamaño, tales como núcleos aislados (Ferenczy, 1985b).

Sin embargo los trabajos realizados por Davey & Cocking en 1972, ya citados anteriormente proponen un modelo semejante a los procesos de pinocitosis y endocitosis como vía de captación.

Yamada y Sakaguchi en 1981 realizaron un estudio más profundo del tema utilizando protoplastos de *S.cerevisiae* y células de *Anacystis nidulans*, observando que tanto el fenómeno del entrapamiento como el de la captación endocitotica tienen lugar.

La vía endocitótica constaría de tres etapas, que estos autores describen de la siguiente forma, Esquema 2:

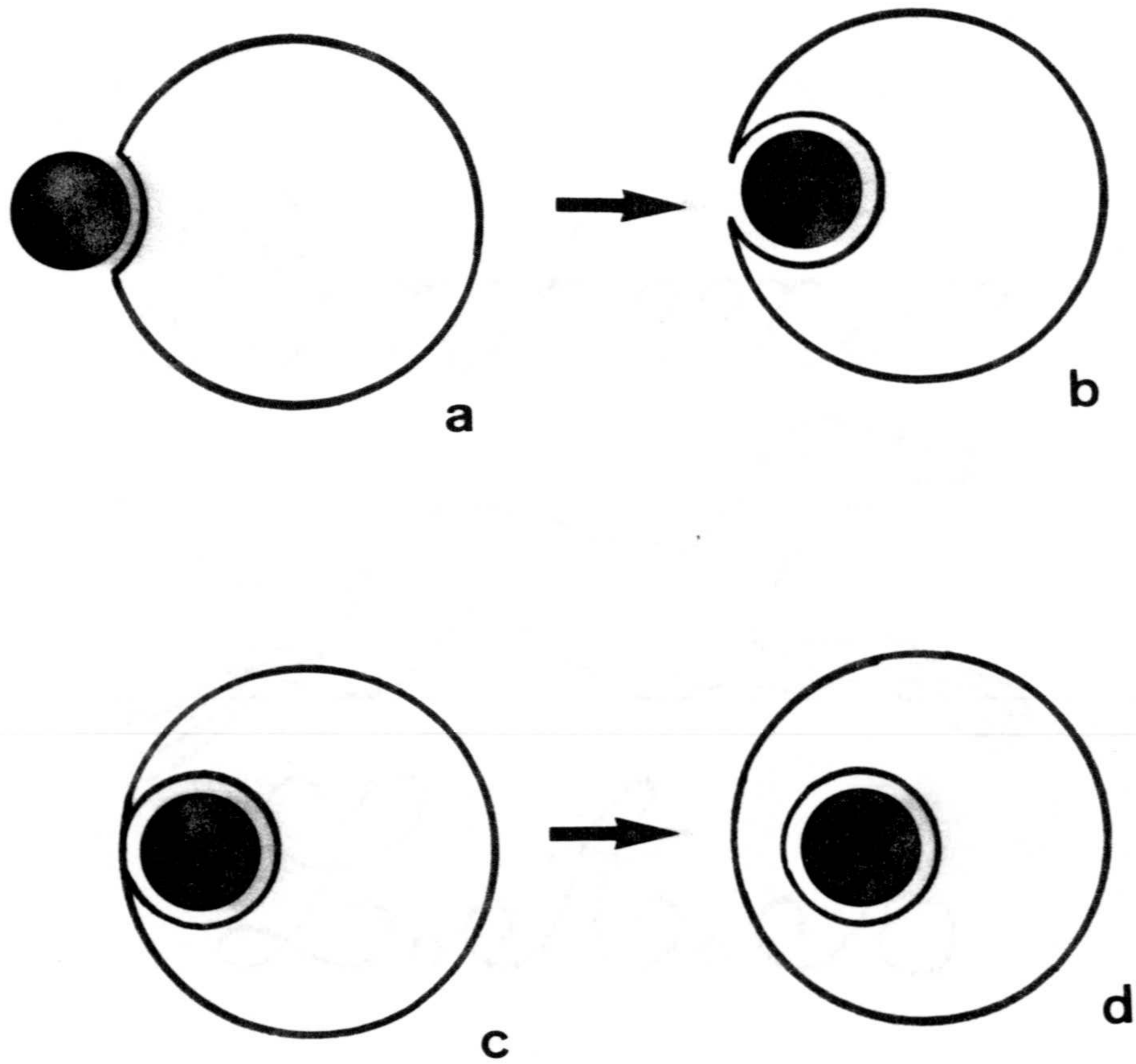
1.- En un primer estadio las células bacterianas se adhieren a la superficie de los protoplastos.

2.- A continuación se produce una depresión de las membranas que se transformará posteriormente en una profunda invaginación en cuyo interior se alojan las células.

3.- Durante la última fase se cierran las invaginaciones por fusión de los dos puntos más próximos de las membranas de los protoplastos, apareciendo como consecuencia, en el citoplasma de las mismas, vesículas membranosas en cuyo interior se encuentran las células de menor tamaño.

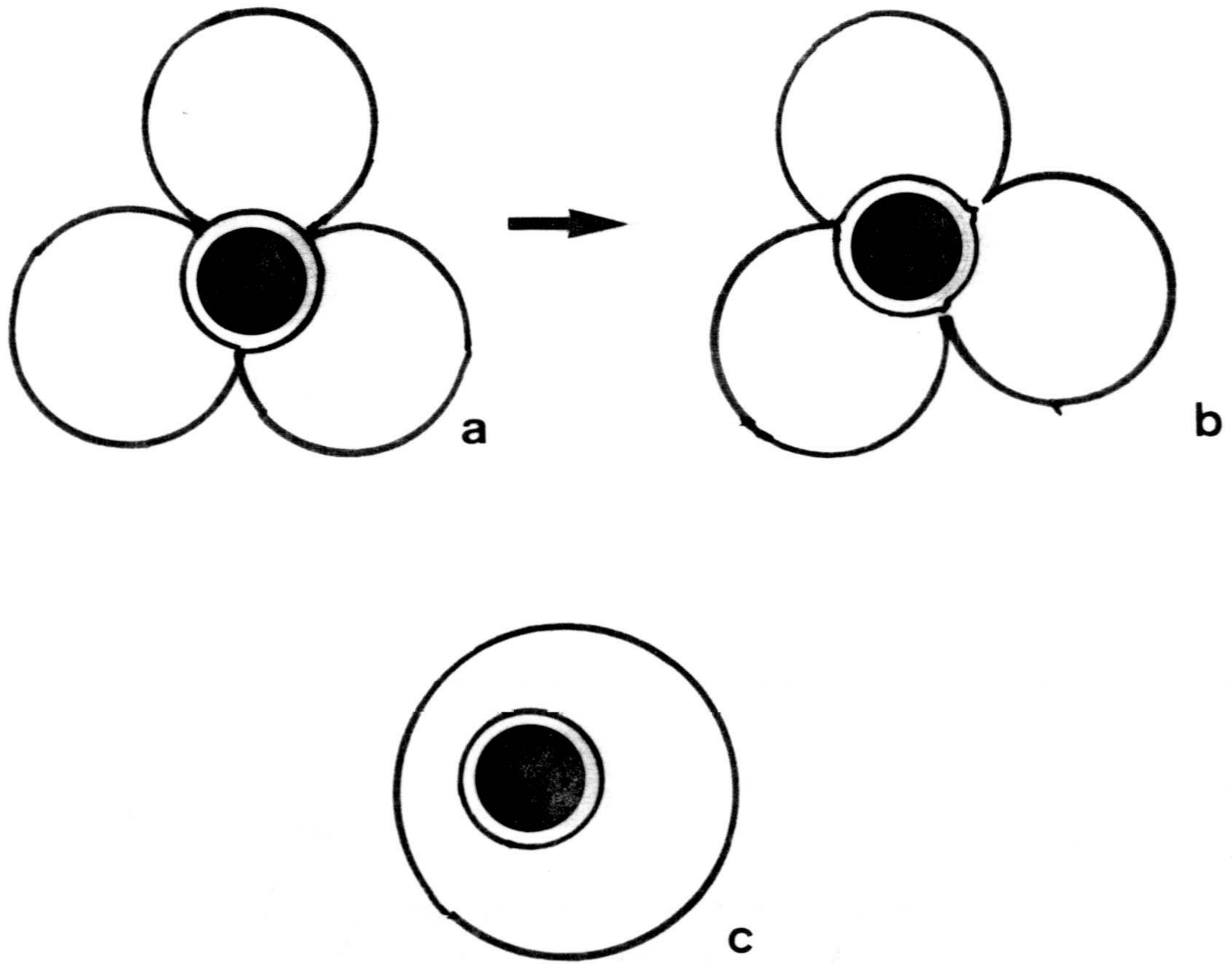
En cuanto a la vía de entrapamiento tendrá lugar cuando una ó más células bacterianas quedan "atrapadas" entre dos ó más protoplastos que se han adherido. Por fusión de las membranas de los mismos, estas células quedan atrapadas en el interior de vesículas membranosas alojadas en el citoplasma del protoplasto resultante. Esquema 3.

Estos mecanismos de entrada han sido confirmados para distintos sistemas; así Hasezawa *et al*, 1983, Matsui *et al*, 1982 y Matsui *et al*, 1984, describen respectivamente la introducción de esferoplastos de *Agrobacterium tumefaciens* y esferoplastos de *Escherichia coli* en protoplastos de *Vinca rosea* en ambos casos. Así mismo Tanaka *et al* en 1984 describen idénticos mecanismos en el caso de inducir la captación de esferoplastos de *E.coli* por protoplastos de *Neurospora crassa*.



Esquema 2.-Etapas del proceso de captación por endocitosis propuesto por Yamada y Sakaguchi en 1981.





Esquema 3.- Etapas del proceso de captación por entrapamiento propuesto por Yamada y Sakaguchi, 1981.

El uso de protoplastos bacterianos en estas experiencias demuestra que cuando existe una sensible diferencia de tamaño, los tratamientos con PEG-Ca<sup>2+</sup> no inducen la fusión de membranas sino que provocan la captación, por parte del participante de mayor tamaño, del menor.

Hasta el momento estos sistemas para inducir la captación de elementos por protoplastos se ha venido aplicando con distintos fines:

#### -Introducción de material genético

Dentro de este capítulo se encuadran todas aquellas experiencias de transformación mediadas por el uso del PEG, y que como ya ha sido citado en este mismo capítulo, debido al mecanismo íntimo de la captación están directamente relacionadas con procesos de fusión de protoplastos. No obstante, y dada la entidad propia de estas técnicas enmarcadas dentro de la "ingeniería genética", quedan fuera de las propias de "ingeniería celular" dentro de las cuales se centra el trabajo objeto de esta memoria.

Sin embargo, hay que citar de nuevo en este apartado, los trabajos realizados por Kingsman *et al*, 1979; Hasezawa *et al*, 1981 y Rassoulzadegan *et al*, 1982, descritos anteriormente como fusiones "interreinos" ya que también pueden ser consideradas como transformaciones mediadas por fusión de protoplastos entre dos entidades con acusada diferencia de tamaño, hecho que provoca una vía diferente de captación. Presumiblemente la posterior fusión entre las membranas de los protoplastos de ambos participantes provoca, finalmente, la liberación de

material genético en el citoplasma (hecho comprobado por Hasezawa *et al* 1982, Matsui *et al*, 1982 y Tanaka *et al*, 1983), lo cual lleva a considerar, en último extremo, dichas experiencias como transformaciones.

Igualmente hay que reseñar las experiencias llevadas a cabo por Szabados *et al* en 1981, en las que dichos autores inducen la captación de cromosomas aislados procedentes de trigo por protoplastos de maíz y trigo, observando la efectividad del sistema así como la preservación de la integridad estructural y morfológica de los cromosomas incluso, 3 horas después de la captación.

#### -Transferencia de orgánulos.-

Aunque no son muy numerosos los estudios realizados en este sentido, es evidente que el uso de estas técnicas permite la transferencia de orgánulos citoplasmáticos vía fusión de protoplastos. La realización de experiencias de este tipo permitiría un amplio conocimiento sobre las interacciones entre elementos genéticos nucleares y citoplasmáticos y haría posible la mejora de razas de marcado interés económico.

#### -Transferencia de mitocondrias.-

Dentro de este apartado se pueden realizar subdivisiones en función de la transferencia o no de otros elementos genéticos. Así, se habla de transferencia no selectiva o de transferencia selectiva. En el primer caso, además de estas, se transfiere la dotación genética nuclear y se realiza vía fusión de protoplastos utilizando estirpes con marcadores genéticos mitocondriales.

En la transferencia selectiva de mitocondrias hay que distinguir entre las experiencias en las que se realizan fusiones de protoplastos anucleados conteniendo material genético citoplasmática y las llevadas a cabo con suspensiones de mitocondrias aisladas. A este tipo de experiencias nos referimos seguidamente por tratarse de verdaderos procesos de captación.

Así mismo es posible distinguir, dentro de este grupo, transferencias de mitocondrias intra ó interespecíficas, dependiendo de la relación taxonómica existente entre donador y receptor de los orgánulos.

En el terreno de las transferencias intraespecíficas las primeras experiencias descritas corresponden a las realizadas por Gunge y Sakaguchi en 1979. Dichos autores transfieren a protoplastos de una estirpe *rho*<sup>o</sup> de *S.cerevisiae* mitocondrias resistentes a la oligomicina con una bajísima frecuencia ( $1/10^8$ ).

En este mismo sentido Yoshida en 1979 y Yoshida y Takeuchi en 1980 transfieren, igualmente, mitocondrias a estirpes *rho*- de *Saccharomyces cerevisiae* resistentes a antibióticos, detectando una frecuencia de transferencia en torno a  $1/10^7$ - $1/10^8$  y sugieren, además, que la captación tiene lugar tanto por entrapamiento de los orgánulos entre los protoplastos, como por vía endocitótica.

En trabajos posteriores realizados por Kucsera, Mink y Ferenczy en experiencias no publicadas, elevando la temperatura y disminuyendo el tiempo de los tratamientos con PEG- $Ca^{2+}$ , consiguen incrementar la frecuencia de transformación en más de dos órdenes de magnitud.

En el terreno de la transferencia interespecífica de mitocondrias, ha sido descrita la captación de mitocondrias procedentes de *Schizosaccharomyces pombe* y *Hansenula wingei* por protoplastos de *S.cerevisiae* rho-, obteniendo colonias rho+ con una bajísima frecuencia (Yoshida, 1979; Yoshida & Takeuchi, 1980).

-Transferencia de cloroplastos.-

La transferencia de capacidades fotosintéticas a organismos carentes de las mismas supondría la realización de uno de los "sueños dorados" de la biotecnología.

En la literatura científica hay recogidos algunos casos en los que se describe la consecución de asociaciones temporales con células de hongos. Así Vasil & Giles en 1979, describen la captación de protoplastos aislados de espinacas protoplastos de *Neurospora crassa*. Posteriormente Kawakami *et al* en 1980 ensayan la captación de cloroplastos aislados de la cianobacteria *Anabaena cylindrica*, así como del alga *Chlorella ellipsoidea* por protoplastos de *S.cerevisiae*, y aunque la captación tiene lugar, la presencia de tilacoides o protoplastos íntegros no pudo ser demostrada mediante microscopía electrónica. Sin embargo sí describen la capacidad de los protoplastos para albergar células enteras de *Chlorella ellipsoidea*, probablemente protegidas por su pared celular.

-Transferencia de núcleos aislados.-

En el terreno de la mejora de razas vegetales, ya en 1973 Potrycus & Haffmann describen la transferencia de núcleos aislados a protoplastos de *Petunia*. Estos trabajos provocaron el escepticismo de algunos autores en el sentido

de la imposibilidad física de captación de orgánulos de gran tamaño.

Sin embargo, en el terreno de la micología, y ya dentro de esta década, han sido descritos procesos de transferencia de núcleos aislados a células de *S. cerevisiae*, utilizando como donadores y receptores mutantes auxotróficos de esta levadura (Becher *et al*, 1982), obteniendo colonias complementadas con una frecuencia escasa pero reproducible. El análisis genético de estas colonias tras sucesivos subcultivos puso de manifiesto su carácter diploide. Estos autores asumen que estos orgánulos de gran tamaño no pueden ser captados por endocitosis, proponiendo el entrapamiento de núcleos entre dos ó más protoplastos como vía de captación.

#### Transferencia de microorganismos.-

La posibilidad de inducir la captación de entidades biológicas por parte de organismos eucariotas, proporciona una vía de transferencia de nuevas capacidades, bien mediante el establecimiento de nuevas relaciones simbióticas (que indudablemente conllevaría la necesidad de establecer cierto grado de sincronía entre ambos participantes, así como el mantenimiento de la entidad estructural del endosimbionte) o bien tras la degradación intracelular de la entidad biológica captada, su material genético quedaría libre en el citoplasma del eucariota incorporándose a la dotación genética del mismo. Adquiriendo así, en ambos casos, nuevas capacidades metabólicas.

Esta última hipótesis ha sido convenientemente recogida en anteriores apartados de este mismo capítulo,

ocupandonos en este momento de la primera hipótesis formulada.

La aplicación del sistema PEG-Ca<sup>2+</sup> como agente capaz de inducir la captación de bacterias por parte de protoplastos eucariotas, hace posible eludir los procesos de reconocimiento y entrada que constituyen la primera etapa en el establecimiento de endosimbiosis, etapa que se caracteriza por un alto grado de especificidad desarrollada a través del proceso evolutivo.

Una vez salvada esta primera barrera y en orden a establecer endosimbiosis estables hay que satisfacer al menos otros tres requisitos (Yamada y Sakaguchi, 1981):

- Suplementación de nutrientes y factores de crecimiento para el hospedador.
- División celular de ambos en armonía.
- Inofensividad del microorganismo huésped para el hospedador.

Tras las primeras experiencias que demuestran la eficacia del PEG para inducir la captación de los microorganismos (Davey & Power, 1975), se han descrito trabajos cuyo objetivo es el establecimiento de relaciones simbióticas artificiales.

Burgoon y Bottino en 1976 describen la captación del alga *Gleocapsa* por protoplastos de *Nicotiana tabacum* y razas albinas de *Zea mays* mediante observaciones a microscopía óptica y, a diferencia de lo descrito por los autores anteriores, no encontraron protoplastos de tabaco o

maíz que albergaran más de una célula del alga, extremo que es atribuido al gran tamaño de la misma.

El estudio de la viabilidad del sistema se reduce a un periodo de 14 horas tras la captación, observando durante este tiempo corrientes citoplasmáticas en aquellos protoplastos que contienen a la bacteria.

También en 1976 Giles y Whitehead describen la introducción de células del fijador de nitrógeno de vida libre *Azotobacter vinelandii* en protoplastos de *Rhizophogon* sp, hongo que es capaz de establecer relaciones simbióticas de tipo micorriza con *Pinus radiata*, obteniendo resultados espectaculares.

Tras el tratamiento con PEG, el exceso de bacterias es eliminado mediante sucesivos lavados y tratamiento con lisozima, inoculando posteriormente los protoplastos en medios carentes de nitrógeno combinado, comprobando que tras largos periodos de incubación, y con una bajísima frecuencia, aparecen colonias de hongo, cuya capacidad para fijar nitrógeno atmosférico fué demostrada a través de test de reducción de acetileno a etileno. Tras 17 días se obtiene un pico máximo de actividad que se repite a los 29 días de incubación; posteriormente decrece de forma paulatina, manteniendo no obstante cierta actividad tras 212 días.

Estas colonias mantienen su capacidad de crecimiento en medios carentes de nitrógeno combinado, e incluso en presencia de antibióticos tales como estreptomycin, tetraciclina y bencil-penicilina.



El estudio a microscopía electrónica de las hifas del hongo puso de manifiesto la existencia de cuerpos esféricos, de aproximadamente 0.5nm de diámetro, situados en el citoplasma del hongo que no aparecían en hifas no modificadas de *Rhizophogon*. Estas estructuras esféricas carecen de pared celular, pero están rodeadas de una membrana extra; presentan así mismo, estructuras lamelares e inclusiones que estos autores identifican como acúmulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato, típicos de formas vegetativas de *Azotobacter vinelandii*.

En trabajos posteriores identifican estas estructuras como células de la bacteria mediante técnicas de inmunotinción con anticuerpos frente a proteínas de membrana e intracelulares marcados con fluoresceína, y ensayados sobre cortes del hongo obtenidos mediante criomicrotomía (Giles & Whitehead, 1977a). Los autores describen, incluso, la reasociación del hongo con raíces de *Pinus radiata*, detectando la reducción de acetileno que demuestra que la actividad nitrogenasa se halla presente en las plantas asociadas con razas del hongo colonizadas por *A. vinelandii*. Así mismo se detectan niveles superiores de nitrógeno en estas raíces reasociadas que los encontrados en plantas asociadas con estirpes salvajes del hongo, crecidas en medios carentes de nitrógeno. (Giles & Whitehead, 1977b).

Estos resultados no han podido ser reproducidos por otros autores.

Aunque con resultados negativos Meeks *et al* (1978), describen la captación de razas auxotróficas de *Anabaena variabilis*, cianobacteria capaz de fijar nitrógeno, por parte de protoplastos de *Nicotiana tabacum*.

Estos autores optimizan el proceso de captación para este sistema estimando que el tiempo mínimo de actuación del sistema PEG-Ca<sup>2+</sup> es de 25 minutos, y la concentración óptima del PEG la sitúan en torno a un 30%. Así mismo, ponen de manifiesto que la cantidad de células captadas es independiente de la concentración de cianobacterias, siempre que esta sea 200 veces superior a la de protoplastos del vegetal. La captación se incrementa, no obstante, elevando la concentración de los protoplastos, estableciendo un máximo de obtención en valores del 7.6%, que se alcanza para concentraciones de 2x10<sup>5</sup> protoplastos/ml del vegetal.

En cuanto a la viabilidad del sistema, estos autores detectan un descenso paulatino en el número de eucariotas que contienen a la cianobacteria, de forma que, tras 5 días de incubación en medio líquido, menos de un 1% de los protoplastos presentan células bacterianas en su interior, debido fundamentalmente a la desintegración y muerte de los protoplastos.

En ningún caso se observaron procesos de división celular ni en los protoplastos ni en las bacterias. Hay que reseñar que todos estos estudios de cuantificación y visualización son realizados a microscopía óptica.

Yamada y Sakaguchi en 1981 realizan experiencias encaminadas tanto al esclarecimiento del mecanismo ultraestructural de la captación como a la optimización de las condiciones en las que esta tiene lugar, intentando igualmente establecer relaciones simbióticas entre *Saccharomyces cerevisiae* y *Azotobacter vinelandii*.

El estudio del mecanismo de captación lo realizan utilizando células de *Anacystis nidulans* en lugar del fijador de nitrógeno debido a la presencia, en la cianobacteria, de estructuras tilacoidales que facilitan su identificación mediante microscopía electrónica. Estos autores proponen las dos vías que ya han sido descritas con detalle en este mismo capítulo.

En cuanto a la optimización del proceso, proponen que el máximo de captación (2-3 bacterias por protoplasto) se obtiene utilizando PEG al 30% adicionado de  $\text{CaCl}_2$  60 mM, durante 30 minutos, a 30°C.

Para cuantificar la eficacia de los procesos de captación en las distintas condiciones ensayadas, así como la viabilidad de las asociaciones obtenidas, emplean células de *A. vinelandii* marcadas radioactivamente. Demostrando la inviabilidad del sistema, dada la rapidez con que desaparece la radiactividad cuando los protoplastos son incubados en medio de cultivo, inviabilidad atribuida a procesos heterofágicos ó bien a la desintegración de los protoplastos antes de comenzar a crecer, extremos que parecen confirmarse mediante microscopía electrónica.

Con posterioridad a este estudio las únicas referencia bibliográficas encontradas al respecto son los trabajos realizados por Hasezawa *et al*, 1982 (protoplastos de *Vinca rosea*-protoplastos de *Agrobacterium tumefaciens*), Matsui *et al*, 1982 (protoplastos de *Vinca rosea*-células ó protoplastos de *Escherichia coli*) y Tanaka *et al*, 1984 (protoplastos de *Neurospora crassa*-protoplastos de *Escherichia coli*).

Estos autores realizan estudios ultraestructurales que confirman los mecanismos de entrada propuestos por Yamada y Sakaguchi (1981) independientemente de la presencia o ausencia en el microorganismo captado de paredes celulares.

No obstante detectan, tras la captación, procesos de ruptura y desintegración de las vesículas que contienen al esferoplasto procariota. En ocasiones también observan protoplastos con signos de disrupción y liberación de los componentes celulares al citoplasma del eucariota.

OBJETO DEL TRABAJO

De todo lo expuesto en la introducción se deduce que los estudios encaminados al establecimiento de endoasociaciones de forma experimental entre organismos pro y eucariotas, además de escasos, se han realizado bajo perspectivas muy distintas.

Bien, centrando su objetivo en la determinación de los mecanismos de entrada, o bien, una vez inducida la misma, reconocer en el hospedador capacidades propias del huésped, presumiendo que el mero hecho de inducir la entrada conduce al establecimiento de relaciones

endosimbióticas. Es evidente que se obvia el estudio de los estadios intermedios.

Por ello el presente trabajo se ha centrado fundamentalmente en el estudio de estos estadios intermedios, cuyo conocimiento permitirá, tanto dilucidar la validez de este tipo de experimentos, como reproducir fenómenos, que con una gran probabilidad, han tenido lugar en algún momento de los procesos evolutivos que conducen al establecimiento de relaciones endosimbióticas. Todo ello independientemente de la consecución o no de una asociación estable, siendo estas las primeras investigaciones que se han abordado.

Ahora bien, el estudio propuesto requiere en primer lugar, la elección de un modelo procariota-eucariota, la optimización de los procesos de captación en el mismo y el desarrollo de técnicas de observación que permitan el estudio de las etapas indicadas.

MATERIAL Y METODOS



## 1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

En el desarrollo del presente trabajo se han utilizado las estirpes de bacterias y hongos que a continuación se detallan.

### *Escherichia coli*

\*JC5466/pRD1 Trp<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>, *recA56*, Lac<sup>-</sup>, AX74,  
Spc<sup>r</sup> / Apr<sup>r</sup>, Tcr<sup>r</sup>, Km<sup>r</sup>, His<sup>+</sup>.

Procedencia: Departamento de Microbiología. Fac. de  
Ciencias. Granada

\*ATCC 13005, CECT 877 Thr<sup>-</sup>, productor de L-valina.

Procedencia: ATCC, US pat 2975105

*Sacharomyces cerevisiae*

\*3.2 a, Ade<sup>-</sup>, Ura<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>.

Procedencia: Departamento de Microbiología. Fac. de Ciencias. Granada

\*IV-PX2-1C a, ura 3, trp 1, ilv 2-11.

Procedencia: J. Polaina. Calsberg Commun. 49 557-584

\*DBY 746 a, his 3 A1, leu 2-3, 2-112, ura 3A5, trp 1-289a.

Procedencia: L. Ferenczy. Colección Dpto. Microbiología Josef Attila University. Szeged. Hungría.

*Aspergillus nidulans*

\*1056 Ade<sup>-</sup>, Paba<sup>-</sup>, yellow

Procedencia: L. Ferenczy. Colección Dpto. Microbiología Josef Attila University. Szeged. Hungría.

## 2. MEDIOS DE CULTIVO

En este apartado se describe la composición de los medios de cultivo utilizados en la realización del presente trabajo.

Los procesos básicos de preparación y esterilización son los mismos en todos ellos, salvo las modificaciones adecuadas en cada caso.

### 2.1. MEDIOS DE CONSERVACION Y CRECIMIENTO

#### 2.1.1. Medio YEPD

Empleado para el cultivo y conservación de las estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas. Presenta

la siguiente composición:

-Extracto de levadura	10g
-Peptona	20g
-Glucosa	20g
-Agua destilada	1000ml
pH 4.5	

El correspondiente medio sólido va adicionado de 20g/l de agar.

#### 2.1.2. Medio CM

Empleado para el cultivo y conservación de las estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus nidulans* utilizadas, y cuya composición es la siguiente:

-Extracto de Levadura	5g
-Extracto de Malta	5g
-Glucosa	10g
-Agua destilada	1000ml
pH 4.5	

El correspondiente medio sólido va adicionado de 20g/l de agar.

#### 2.1.3. Medio LB

Empleado para el cultivo y conservación de las estirpes de *Escherichia coli* utilizadas, presenta la siguiente composición:

-Tryptona	10g
-Extracto de levadura	5g

-NaCl	5g
-Glucosa	1g
-Agua destilada	1000ml
pH 7.2	

El correspondiente medio sólido va adicionado de 20g/l de agar.

#### 2.1.4. Medio LB con Antibióticos

Empleado para asegurar el mantenimiento del plásmido pRD1 que porta la estirpe JC5466 de *Escherichia coli*, y que le confiere resistencia a los antibióticos Ampicilina, Tetraciclina y Cloramfenicol. Se prepara de igual forma que el medio LB, pero tras la esterilización en autoclave del medio, este se mantiene en baño a 45°C, y se le adicionan los antibióticos previamente esterilizados por filtración, a las siguientes concentraciones:

-Tetraciclina	10µg/ml
-Ampicilina	50µg/ml
-Cloramfenicol	50µg/ml

#### 2.2 MEDIOS MINIMOS

Los medios mínimos presentan en su composición los nutrientes indispensables que permiten el crecimiento de estirpes protótrofas.

No ocurre lo mismo con las estirpes auxótrofas, de ahí, la necesidad de suplementar el medio con los requerimientos que presentan dichas estirpes para hacer posible su crecimiento.

## 2.2.1. Medios mínimos de levaduras y hongos

### 2.2.1.1. Medio Mínimo 1 (MM-1)

Su composición es la siguiente:

-Glucosa	2g
-Solución YNB	5ml
-Agua destilada	95ml
-Agar purificado (Difco)	2g

La solución de YNB contiene la totalidad de vitaminas y sales minerales necesarias para el crecimiento de las levaduras (Wickerham, 1946). Se prepara disolviendo 13g de bacto yeast nitrogen base w/o aminoacids (Difco) en 100ml de agua destilada y se esteriliza por filtración, tras lo cual se conserva a 4°C hasta su uso.

Esta solución se añade una vez que han sido esterilizados el resto de los componentes en autoclave a 117 °C durante 20 minutos y enfriados hasta 45°C aproximadamente.

### 2.2.1.2. Medio mínimo 2 (MM-2)

Es una variante del anterior, su composición es la siguiente:

-Glucosa	2g
-(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.3g
-KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2g
-MgSO <sub>4</sub>	0.1g
-Solución de vitaminas	0.1ml
-Agua destilada	100ml

-Agar purificado (Difco) 2g

La solución de vitaminas presenta la siguiente composición:

-Biotina	20mg
-Pantotenato Cálcico	80mg
-Inositol	400mg
-Niacina	80mg
-PABA	40mg
-Piridoxina	80mg
-Tiamina	80mg
-Riboflavina	20mg
-Agua destilada	50ml

Esta solución se esteriliza por filtración y se conserva a 4°C hasta su uso. Puede añadirse al resto de los componentes antes de ser esterilizados.

### 2.2.1.3. Medios mínimos suplementados

Los medios mínimos pueden suplementarse con aminoácidos y/o bases púricas y pirimidínicas, posibilitando de esta manera el crecimiento de las estirpes auxótrofas para dichos requerimientos. Estos aminoácidos y bases normalmente se preparan en forma de soluciones 100 veces concentradas, esterilizándose por filtración ó autoclave, según su labilidad al calor y se adicionan a los medios mínimos una vez estos están estériles. Las concentraciones finales a las que se utilizan varían según el aminoácido ó base de que se trate, así como del microorganismo con el que se va a emplear.

Los correspondientes requerimientos se disuelven

en agua destilada a una concentración de 2mg/ml, excepto las soluciones de Leucina, Isoleucina y Valina que se preparan a una concentración de 3mg/ml, en el caso de los dos primeros y 15mg/ml en el caso del último.

#### 2.2.1.4. Medios mínimos con antibióticos

Tanto al medio MM-1, como al MM-2, como a sus variantes suplementadas, se les pueden adicionar antibióticos en caso de ser necesario, a fin de ejercer presiones selectivas. Estos antibióticos se adicionan esterilizados por filtración, una vez autoclavados los medios, y convenientemente enfriados hasta 45 °C.

#### 2.2.2. Medios mínimos de *Escherichia coli*

##### 2.2.2.1. Medio M-9

Presenta la siguiente composición:

-Mezcla de sales	10ml
-Glucosa 4%	10ml
-CaCl <sub>2</sub> 0.01M	1ml
-MgSO <sub>4</sub> 0.1M	1ml
-Citrato férrico 0.3%	0.02ml
-Agua destilada	78ml

La composición de la mezcla de sales es como sigue:

-Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6g
-KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3g
-NaCl	0.5g
-NH <sub>4</sub> Cl	1g

-Agua destilada

100ml

Todos los componentes del medio se esterilizan por separado y ya en estas condiciones, se realiza la mezcla correspondiente.

Cuando el medio va a ser utilizado en forma sólida se adiciona agar purificado (Difco) al 2% y se esteriliza junto con el agua.

#### 2.2.2.2. Medio M-9 suplementado

Este medio puede suplementarse con aminoácidos y/o bases púricas y pirimidínicas, posibilitando de esta manera el desarrollo de las estirpes auxótrofas.

Se le adicionan al medio una vez que este ha sido esterilizado. Estos requerimientos se preparan de la misma forma y se añaden a igual concentración, que para los medios mínimos de levaduras ya descritos.

En caso de presentar las estirpes resistencias a antibióticos, estos se pueden añadir a las concentraciones y condiciones que se citan en el apartado 2.1.3. de este mismo capítulo.

#### 2.3.MEDIOS HIPERTONICOS O DE REGENERACION (MH)

Los medios hipertónicos se utilizan para conseguir que los protoplastos de levaduras y hongos filamentosos reviertan a células normales. Es por ello que deben presentar en su composición estabilizadores osmóticos que impidan la lisis. Así mismo necesitan la existencia de un soporte sólido en el que se encuentren embebidos,



indispensable en el caso de las levaduras gemantes. Para ello, se utilizan polímeros como agar ó gelatina e incluso elevadas concentraciones de polietilenglicol (Necas, 1962; Svoboda, 1966; Svoboda & Piedra, 1983).

El soporte sólido es proporcionado inoculando los protoplastos en una sobrecapa mantenida en sobrefusión a 45°C y compuesta por agar al 2% y estabilizador osmótico que es Sorbitol 0.8M en el caso de las levaduras y KCl 0.7M en el caso de hongos filamentosos.

Los nutrientes necesarios para el crecimiento son aportados por una capa base, previamente dispuesta sobre cajas de Petri, cuya composición es variable y es la que da nombre a los distintos medios.

#### 2.3.1. Medio OCM

Presenta la misma composición que el medio CM descrito en el apartado 2.1.2. de este capítulo pero adicionado de Sorbitol 0.8M ó KCl 0.7M como estabilizador osmótico.

#### 2.3.2. Medio OMM-1 y OMM-2

Presentan la misma composición que el medio MM-1 y MM-2 respectivamente, pero suplementados con KCl 0.7M ó Sorbitol 0.8M como estabilizador osmótico.

Estos medios presentan también variantes derivadas de la adición de aminoácidos y/ó bases púricas y pirimidínicas, así como antibióticos en las mismas concentraciones que se indican en los apartados 2.2.1.3. y 2.1.4 respectivamente.

## 2.4.MEDIOS DE REGENERACION CON POLIMEROS DISTINTOS DEL AGAR

Presentan la misma composición en cuanto a los nutrientes adicionados en la capa base, difieren por tanto unicamente en el polímero que proporciona solidez a la sobrecapa.

### 2.4.1.Sobrecapas con carragenato

El carragenato es un polímero habitualmente utilizado como soporte sólido para el cultivo de células inmovilizadas (Tosa *et al*, 1979).

En lugar de agar al 2% se utiliza carragenato al 3% disuelto igualmente en el estabilizador osmótico, la gelificación de este polímero se produce al disminuir la temperatura en presencia de iones  $K^+$ , por ello una vez vertido sobre la capa base, se deja enfriar, y se vierte sobre la sobrecapa una solución fría de KCl 0.3M.

### 2.4.2.Sobrecapas con alginato

El alginato es otro polímero utilizado también para dar soporte sólido a cultivos de protoplastos inmovilizados (Scheurich *et al*, 1980).

Este polímero, líquido a temperatura ambiente, necesita para gelificar la presencia de iones  $Ca^{2+}$  adicionado a la capa base en forma de  $CaCl_2$  60mM.

Una vez vertida una fina sobrecapa sobre la capa base, se deja a  $T^a$  ambiente hasta que el calcio, por difusión, gelifica el alginato.

### 3. TECNICAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DE LOS MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Las técnicas que se describen han sido aplicadas para comprobar los genotipos de las especies utilizadas como paso previo a su utilización.

#### 3.1. TECNICA PARA COMPROBAR LOS REQUERIMIENTOS AUXOTROFICOS DE LAS ESTIRPES UTILIZADAS

Para comprobar el carácter auxótrofo de las estirpes empleadas se inocularon las mismas en medio MM-1 en el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, MM-2 en el caso de *Aspergillus nidulans*, y medio M-9 en el caso de *Escherichia coli*; incubándose durante 48 horas en el caso de los hongos y 24 horas en el caso de la bacteria. La temperatura fué de 28°C para levaduras y 37 °C para los restantes, de acuerdo con sus óptimos de crecimiento.

Las estirpes auxótrofas sólo crecen cuando se hallan presentes en el medio todos los nutrientes que necesitan.

#### 3.2. TECNICA PARA COMPROBAR LAS RESISTENCIAS A ANTIBIOTICOS DE LAS ESTIRPES DE *Escherichia coli*

Para comprobar la existencia de estas resistencias, se inoculan las estirpes en medio LB con los antibióticos adecuados a las concentraciones citadas en el apartado 2.1.3. de este capítulo. Sólo crecerán aquellas que sean resistentes a los antibióticos presentes en el medio.

#### 4. DETERMINACION DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS UTILIZADOS.

Las curvas de crecimiento de las estirpes se obtienen al representar graficamente las variaciones de densidad óptica debida al crecimiento del microorganismo con respecto al tiempo, durante un periodo de 24 horas.

Para ello se utilizan matraces para-nefelómetros, que contienen 30 ml del medio apropiado, inoculados con una dilución 1/100 de un cultivo en fase estacionaria de crecimiento.

Las medidas de densidad óptica se realizan a intervalos regulares de 1 hora y a una longitud de onda de 640nm, en un colorímetro-espectrofotómetro (Spectronic 20, Bauch & Lomb).

#### 5. METODOS DE OBTENCION DE PROTOPLASTOS

##### 5.1. PROTOPLASTOS DE LEVADURA

##### 5.1.1. Tratamientos con Novozyma 234

Esta técnica está basada en la descrita por Guerra et al en 1986. Ha sido empleada con las estirpes 3.2 y IV-PX2-1C de *Saccharomyces cerevisiae*. Se parte de un cultivo de levadura en fase logarítmica de crecimiento con una D.O. entre 0.3-0.5, que contiene aproximadamente entre  $1-5 \times 10^7$  células/ml, crecido en medio YEPD. Las células se lavan varias veces con agua destilada, a continuación se recogen por centrifugación a 4000rpm y se resuspenden hasta una densidad celular entre  $1-5 \times 10^8$  células/ml en Tampón MES-NaOH 100mM pH 6 adicionado de EDTA 100mM y DTT 5mM. Esta

suspensión se incubaba a 28 °C durante 20 minutos en condiciones de agitación. Posteriormente se recoge por centrifugación y se lava en el mismo tampón pero con Sorbitol 0.6M, recogién dose de nuevo y resuspendiendo en tampón Citrato-fosfato 0.01M con KCl 0.6M adicionado de DTT 5mM y Novozyma 234 (Novobiolabs) a una concentración de 1 ó 1.5mg/ml. Esta mezcla se mantiene durante 30 minutos en agitación a 28°C. Después del tratamiento se lavan una sola vez con este último tampón.

Para ver la eficacia del tratamiento enzimático es preciso relizar, paralelamente, controles que muestren el porcentaje de obtención de protoplastos referido al n° de células iniciales y el porcentaje de regeneración de los mismos. Para ello se llevan a cabo recuentos en los siguientes etapas:

1) Antes del tratamiento, inoculando placas de YEPD con las diluciones adecuadas para conocer el n° exacto de células de partida. Así mismo se realizan recuentos en cámara de Thoma.

2) Después del tratamiento, inoculando igualmente las diluciones apropiadas en medio YEPD, para conocer el n° de células que no se han convertido en protoplastos, y en medio hipertónico suplementado (MM-1), para saber el porcentaje de regeneración de protoplastos. Así mismo se realiza un recuento en cámara de Thoma para conocer el número de células (tanto enteras como protoplastos) que quedan después del tratamiento.

### 5.1.2. Tratamientos con enzima de *Helix pomatia*

Se parte de un cultivo de levadura en medio CM, que se encuentra en fase logarítmica de crecimiento (aprox.  $10^7$  células/ml. Se adiciona Mercaptoetanol al 1%, dejando actuar a T<sup>a</sup> ambiente durante 10 minutos. A continuación se recogen las células por centrifugación, y se resuspenden en la solución enzimática compuesta por Enzimas del jugo digestivo de caracol (Protoplast-forming enzyme, Boehringer, Biochemicals) 1%, disuelta en KCl 0.7M como estabilizador osmótico, y adicionada de Mercaptoetanol 0.1%, hasta una densidad celular nunca superior a  $10^8$  células/ml. Se deja actuar a 28 °C en agitación hasta la completa conversión en protoplastos, que es examinada periódicamente mediante microscopía óptica. Generalmente estas incubaciones no son superiores a 1.30 horas. Una vez obtenidos los protoplastos se recogen por centrifugación suave, 2000 rpm, durante 10 minutos y se lavan con Sorbitol 0.8M.

Se realizan igualmente los controles descritos en el apartado 5.1.1 de este mismo capítulo.

## 5.2.OBTENCION DE PROTOPLASTOS DE *Aspergillus nidulans*

Se parte de cultivos del hongo en medio sólido. Para ello, a partir de una suspensión de esporas en agua destilada, y por medio de un pincel, se depositan gotas de dicha suspensión sobre discos de celofán dispuestos sobre cajas de Petri que contienen MM-2, incubándose a 37 °C durante 20-22 horas.

Una vez que ha crecido el hongo, se recolectan los discos de celofán, se transfieren a cajas de Petri y se le adicionan 5ml de solución enzimática compuesta por

enzimas digestivas de *Helix pomatia* al 1% disuelta en KCl 0.7M; en ocasiones puede ir adicionada de Novozyma 234 a una concentración de 0.5mg/ml. A continuación se incuba a 28 °C hasta la formación de protoplastos; el tiempo de incubación varía en cada ocasión, sin embargo nunca suele ser inferior a 1.30 horas. A continuación se filtra la suspensión a través de placa porosa de vidrio G-2, al objeto de eliminar los restos de hifas, y se recoge por centrifugación a baja velocidad 2000 rpm, lavándose con KCl 0.7M.

## 6. TECNICA PARA INDUCIR LA CAPTACION

La técnica de captación está basada en la descrita por Yamada y Sakaguchi en 1981, que en el transcurso de este trabajo ha sido ampliamente modificada. Los cambios realizados son el resultado de diversas experiencias y por lo tanto serán descritos en el apartado correspondiente del capítulo de Experiencias y Resultados; mientras que en este apartado se detalla la técnica que sirvió de punto de partida.

Se parte de una suspensión de protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* en Tampón Tris-HCl 50mM, adicionado de CaCl<sub>2</sub> 60mM (TC) y Sorbitol 1M, con una densidad celular de  $1 \times 10^8$  protoplastos/ml. Los protoplastos se obtuvieron según se detalla en el apartado correspondiente de este capítulo.

De otra parte se recoge un cultivo en fase estacionaria de *Escherichia coli* crecido en medio LB, se lava en agua destilada y finalmente se resuspende en el mismo tampón hasta una densidad celular 100 veces superior a la densidad celular de la levadura.

A continuación se mezclan alícuotas de ambas suspensiones y se adiciona un volumen igual de Polietilenglicol (PEG) 4000 al 30% disuelto en tampón TC. Se deja incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, a continuación se lava varias veces en tampón TC adicionado de Sorbitol 1M (TCS), centrifugando a baja velocidad a fin de eliminar el exceso de bacterias. Finalmente se resuspende en sorbitol 0.8M.

Esta técnica se ha descrito para el caso de *Saccharomyces cerevisiae*. Para inducir la captación de bacterias por parte de protoplastos de *Aspergillus nidulans* la técnica es la misma que se ha descrito, modificada únicamente en cuanto a la densidad celular utilizada,  $5 \times 10^7$  protoplastos/ml así como en el estabilizador osmótico, KCl 0.8M cuando se adiciona al tampón TC (TCC), y 0.7M cuando se utiliza como solución final.

## 7. INOCULACION Y CULTIVO DEL SISTEMA HONGO BACTERIA

Una vez inducida la captación aplicando la metodología descrita en el apartado anterior, se inoculan alícuotas de la suspensión sobre cajas de Petri que contienen medio OMM-1 ó OMM-2 suplementados, que carecen de uno de los marcadores auxotróficos del eucariota y de al menos uno de los del procariota, según la metodología expuesta en el apartado 2.3 de este mismo capítulo.

A continuación se incuban a 28°C (*Saccharomyces cerevisiae*) y a 37°C (*Aspergillus nidulans*).

Por otra parte y como controles se inoculan



placas con protoplastos no tratados, en iguales concentraciones y condiciones que las aplicadas al sistema PEG-Ca<sup>2+</sup>, al objeto de controlar la reversión de los marcadores utilizados.

Para conocer la viabilidad de los protoplastos tras el tratamiento con PEG se inoculan las diluciones apropiadas en medio OCM.

## 8. TECNICAS EMPLEADAS PARA LA EVALUACION Y SEGUIMIENTO DE LOS PROCESOS DE CAPTACION Y MANTENIMIENTO DE LAS ASOCIACIONES OBTENIDAS.

La presencia de células bacterianas en el interior de los protoplastos, así como la evolución del sistema bacteria-protoplasto obtenido, sólo puede ser abordada de una forma inequívoca mediante técnicas de visualización e identificación.

### 8.1. TINCION CON DAPI

El DAPI (4-6 diamidino, 2 fenilindol) es un fluorocromo que se une específicamente al ADN, y que además es supravital cuando se usa a bajas concentraciones.

Este colorante ha sido utilizado por Hasezawa et al en 1983 para teñir protoplastos de *Agrobacterium tumefaciens*, y de esta forma cuantificar la captación de los mismos por protoplastos de *Vinca rosea*.

En este caso ha sido utilizado con el mismo propósito, teñir células de *Escheria coli* antes de la captación, e intentar detectarlas, tras el tratamiento con PEG, en el interior de los protoplastos, siguiendo

basicamente el método de los autores anteriormente citados.

Células de *Escherichia coli* recogidas por centrifugación a partir de un cultivo en fase estacionaria en medio LB son lavadas con agua destilada, posteriormente con Sorbitol 0.8M y finalmente, resuspendidas en una solución de DAPI 1µg/ml en Sorbitol 0.8M, manteniéndose a T<sup>a</sup> ambiente y en oscuridad durante 30 minutos. Seguidamente se lavan varias veces con Sorbitol 0.8M y finalmente, se resuspenden en la misma solución.

Con estas células así teñidas se lleva a cabo la inducción de la captación.

Las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia Leitz equipado con óptica epifluorescente usando un sistema de filtros compuesto por un filtro excitador de 270 nm a 380 nm, y un filtro barrera de 410nm a 580 nm.

## 8.2.TECNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

La presencia de los microorganismos puede ponerse de manifiesto mediante tinciones específicas con anticuerpos marcados.

La técnica elegida ha sido la de inmunofluorescencia indirecta, usando como marcador la fluoresceína.

La metodología utilizada está basada en la descrita por Haseck et al (1986), convenientemente modificada, y consta de las siguientes etapas:

#### \*a) Fijación y permeabilización

Las muestras son fijadas en suspensión en una solución de Paraformaldehído al 4% en tampón Fosfato potásico 0.1M pH 6.5, adicionado de  $MgCl_2$  1mM y EGTA 5mM, así como del estabilizador osmótico apropiado, si la fijación se realiza sobre protoplastos. Las muestras se incuban en esta solución a T<sup>a</sup> ambiente durante 80 minutos. A continuación se realiza una segunda etapa de fijación, en esta ocasión con Glutaraldehído al 1% en el mismo tampón durante 10 minutos. Se recogen las células por centrifugación, se lavan dos veces con tampón fosfato salino pH 7.2 (PBS) y se resuspenden en una solución de  $NaBH_4$  0.5mg/ml disuelto en agua, incubándose durante 20 minutos a 4°C. De nuevo se lavan las muestras, al menos tres veces con PBS, y se resuspenden finalmente en agua.

Se depositan gotas de esta suspensión sobre portaobjetos y se dejan secar a 37°C sometiéndolas a continuación a un tratamiento de permeabilización, que permita el paso de los anticuerpos. Para ello se sumergen en metanol y acetona durante 10 minutos y 30 segundos respectivamente, en ambos casos a -20°C.

Las muestras una vez procesadas pueden guardarse a T<sup>a</sup> ambiente hasta su uso.

#### \*b) Conjugación con los anticuerpos

En primer lugar las muestras son rehidratadas a través de una serie gradada de alcohol en agua, a continuación se lavan en PBS y posteriormente se incuban durante 20 minutos a T<sup>a</sup> ambiente en PBS con albúmina de suero bovino (BSA) al 1%.

El siguiente paso es la incubación con el anticuerpo primario que en nuestro caso es el obtenido en conejo frente al antígeno O de la pared de *Escherichia coli* (B O:127, Invesgen).

La incubación se realiza en cámara húmeda durante 24-48 horas a 4°C , con una dilución 1/20 del anticuerpo en tampón PBS con BSA al 1%.

Posteriormente las muestras se lavan con PBS durante 15 minutos y renovando tres veces el tampón. A continuación se incuban con el anticuerpo secundario marcado con isotiocianato de fluoresceína (Invesgen), a una dilución 1/50 en cámara húmeda a 22°C durante 30 minutos.

### 8.3.TECNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA

#### 8.3.1.Preparación de muestras

Las técnicas tradicionalmente empleadas en la preparación de muestras para su observación mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) están diseñadas para tejidos animales. Por otra parte apenas existen referencias sobre metodología específica para levaduras y hongos filamentosos y en la hallada, siempre se describen problemas en la fijación, derivados de la existencia en estos microorganismos de gruesas paredes celulares y de vacuolas.

Todo ello nos llevó a tomar como método de partida el tradicionalmente utilizado para tejidos animales, que se describe a continuación, y que ha sido

modificado en su mayor parte durante la realización de este trabajo.

**\*a) Fijación.-**

Se lleva a cabo con Glutaraldehído al 5% en tampón cacodilato sódico 0.2M, pH 7.6. Tras el lavado de muestras en el mismo tampón durante 2 horas con sucesivos cambios del mismo, procediéndose a continuación a una postfijación con OsO<sub>4</sub> al 2% en el mismo tampón durante 2 horas.

**\*b) Deshidratación.-**

Se realiza en una serie de acetona del 30% al 100%, y dos pases en óxido de propileno, previos a la inclusión.

**\*c) Inclusión.-**

Se realiza siguiendo la técnica de Spurr (1969).

**\*d) Seccionamiento y contrastado.-**

El seccionamiento de las muestras se lleva a cabo en un ultramicrotomo Reichert-Jung (Ultracut), en secciones de 500 Å de grosor. El contrastado de las mismas se realiza siguiendo la técnica de Reynolds (1963).

**8.3.2.- Observación de las muestras**

La observación de las secciones ultrafinas se ha llevado a cabo en un microscopio electrónico Zeiss EM 902 equipado con espectrómetro de pérdida de energía de

electrones que permite obtener una imagen elástica (ESI) por filtración de los electrones inelásticos, consiguiéndose así un mayor contraste y resolución.

Las imágenes fueron captadas en película DUPONT H-S7 y Kodak 7794 con un formato 8x10.

EXPERIENCIAS Y RESULTADOS

## 1. EXPERIENCIAS PRELIMINARES

El conjunto de experiencias que a continuación se detallan fueron realizadas con una doble finalidad, de una parte la correcta caracterización de los microorganismos a utilizar y de otra el ensayo y puesta a punto de las técnicas descritas en el apartado 8 del capítulo de material y métodos, con el objetivo de adecuarlas a este caso particular.



## 1.1 CARACTERIZACION DE LOS MICROORGANISMOS

### 1.1.1. Elección de los microorganismos a utilizar

La elección de las especies empleadas en el presente trabajo se realizó bajo el criterio de usar siempre aquellas que estuviesen bien caracterizadas, que fuesen ampliamente conocidas y de fácil manejo. Por ello, como eucariota se optó por *Saccharomyces cerevisiae* mientras que *Escherichia coli* fué el procariota elegido. Posteriormente y ante la conveniencia de ampliar el estudio a un hongo filamentoso, se eligió con esta finalidad la utilización de *Aspergillus nidulans*.

Estos microorganismos presentan las características anteriormente citadas, es decir, son de fácil manejo y los mejor conocidos dentro de su grupo.

Dado que el criterio de complementación nutricional había sido el elegido para forzar el establecimiento de relaciones fisiológicas entre los dos microorganismos participantes, se eligieron cepas que presentaban auxotrofías complementarias.

De acuerdo con este criterio, se establecieron las siguientes parejas de microorganismos:

- Saccharomyces cerevisiae* 3.2 y *Escherichia coli* JC 5466/pRD1.
- Saccharomyces cerevisiae* DBY 746 y *Escherichia coli* JC 5466/pRD1.
- Saccharomyces cerevisiae* IV-PX2-1C y *Escherichia coli* ATCC 13005.
- Aspergillus nidulans* 1056 y *Escherichia coli* JC

5466/pRD1.

### 1.1.2. Comprobación de los marcadores auxotróficos

El carácter auxótrofo de las estirpes de microorganismos empleadas se estudió siguiendo las técnicas que se detallan en el apartado 3.1 del capítulo de material y métodos.

Así se comprobaron las auxotrofías que caracterizan a las estirpes 3.2, IV-PX2-1C, DBY 741 de *Saccharomyces cerevisiae*; 1056 de *Aspergillus nidulans* y JC5466/pRD1 y 13005 de *Escherichia coli*.

En cuanto a la tasa de retromutación de los marcadores de las estirpes de levadura, hay que señalar que fué siempre inferior a  $1 \times 10^{-8}$  para cada uno de los marcadores de IV-PX2-1C y DBY 741, así como para los marcadores de 3.2 excepto en el caso de la adenina, que mostró una frecuencia de  $1 \times 10^{-6}$  siempre que los tiempos de incubación fuesen los habitualmente empleados, es decir 48-72 horas. Sin embargo en el caso del marcador histidina de la estirpe 3.2. y para tiempos de incubación superiores a 7 días, comienza a detectarse la aparición de crecimiento, lo cual lleva a caracterizar la estirpe como mutante de crecimiento lento para este marcador.

### 1.1.3. Comprobación de las resistencias a antibióticos presentadas por las estirpes de *Escherichia coli*

Mediante la técnica descrita en el apartado 3.2 del capítulo de material y métodos, se comprobó que la estirpe JC5466/pRD1 presenta resistencias a la tetraciclina, Kanamicina y Ampicilina, que le son

conferidas por el plásmido pRD1 que porta dicha estirpe.

#### 1.1.4. Curvas de crecimiento

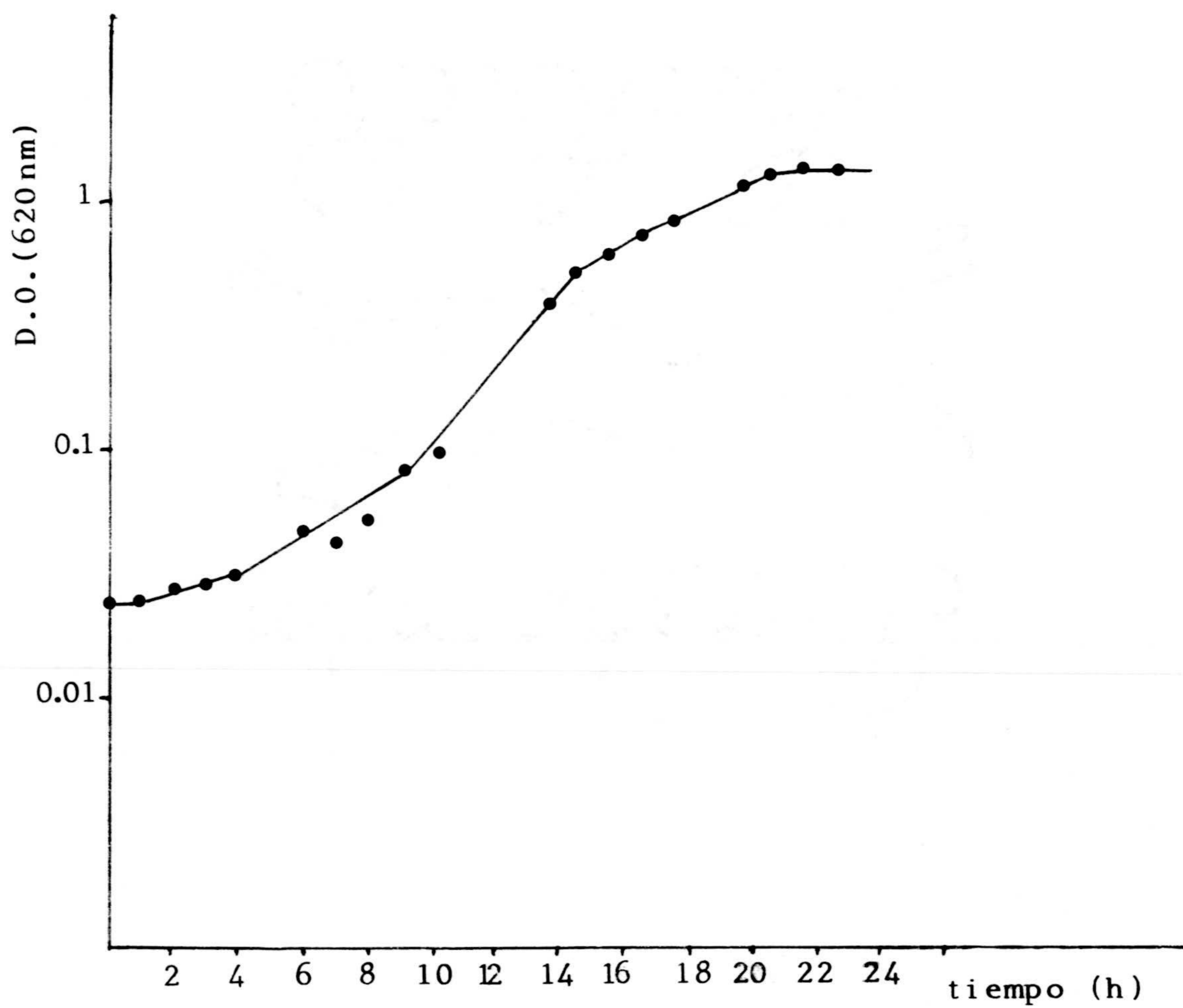
Como es sabido, la obtención de protoplastos de células de levadura mediante tratamiento enzimático, está directamente relacionada con el estado en que se encuentran los cultivos a tratar, alcanzándose un rendimiento máximo cuando dicho tratamiento se realiza sobre células en fase logarítmica de crecimiento. Por ello y a fin de conocer la dinámica del mismo se obtuvieron las curvas de crecimiento de las estirpes a utilizar.

Su confección es igualmente conveniente para poder determinar el número exacto de células que corresponden a unos valores concretos de densidad óptica.

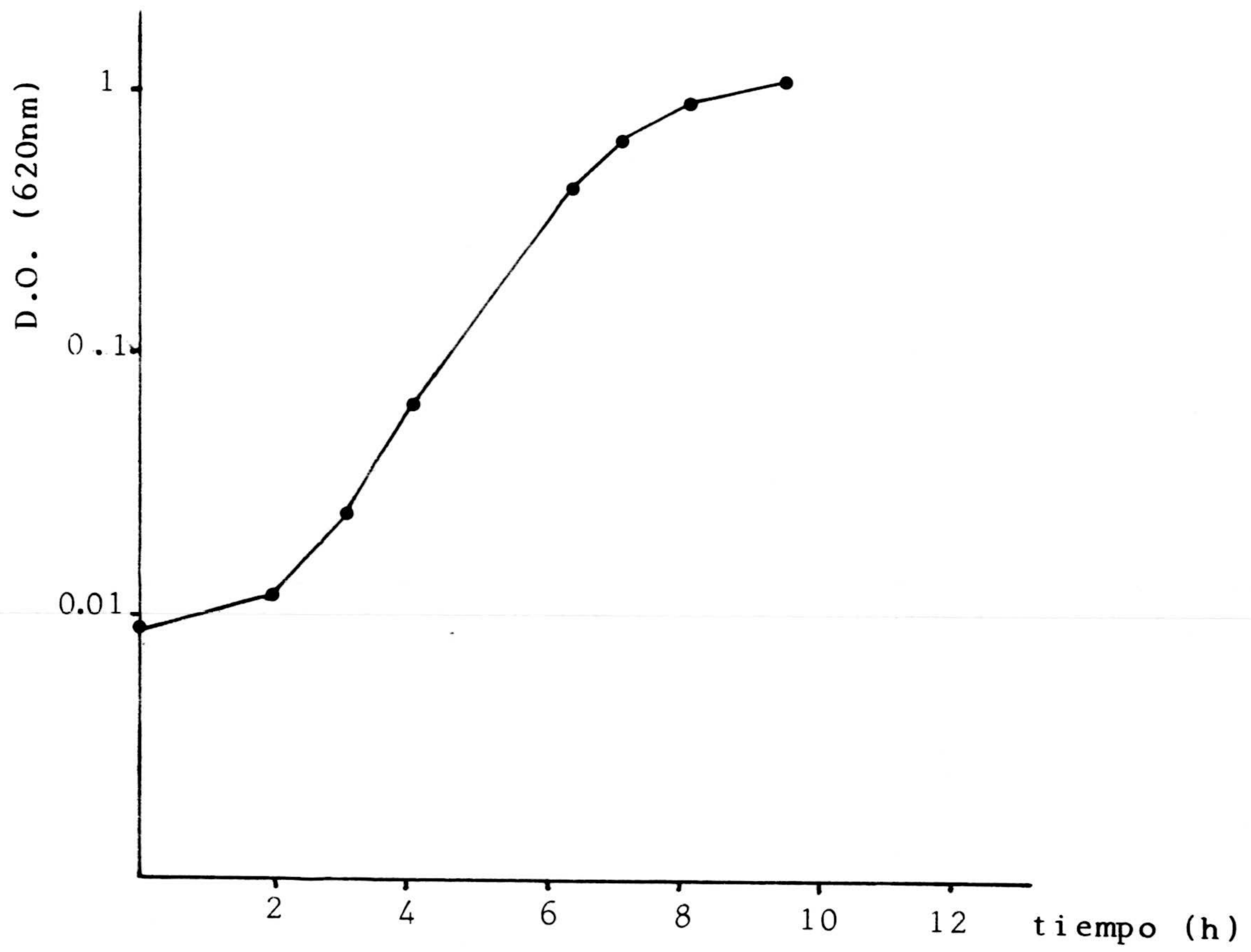
En gráficas las 1 y 2 se muestran las correspondientes a las estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* 3.2 y *Escherichia coli* JC5466/pRD1 que han sido realizadas siguiendo la metodología descrita en el apartado 4 del capítulo de material y métodos. Las curvas de crecimiento de las restantes estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli* empleadas presentaron el mismo patrón de crecimiento.

#### 1.2. PUESTA A PUNTO DE LAS TECNICAS EMPLEADAS

Las técnicas que se han seleccionado para el estudio del proceso de captación de células bacterianas por protoplastos de levadura y de su posterior evolución han sido utilizadas tradicionalmente en trabajos de muy distinta naturaleza y con especímenes muy diferentes de los que nos ocupan, de ahí la necesidad de ensayarlas sobre el



Gráfica 1.- Curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* 3.2.



Gráfica 2.- Curva de crecimiento de *Escherichia coli* JC5466/pRD1.

material objeto de este estudio y modificarlas si ello fuese necesario.

#### 1.2.1. Tinción con DAPI

Como ya se mencionó en el apartado 8.1 del capítulo de material y métodos, la tinción previa de las bacterias con DAPI permitiría una cuantificación del proceso de captación. Este método ha sido empleado por Hasezawa *et al* (1982) con igual propósito.

A diferencia de estos autores, en este caso, los resultados obtenidos siguiendo la técnica descrita por ellos y detallada en el citado apartado del capítulo de material y métodos, fueron insatisfactorios ya que, de una parte la intensidad de la tinción era claramente insuficiente y de otra un elevado porcentaje de las células bacterianas permaneció sin teñir.

Se procedió por tanto a modificar la técnica incrementando la concentración del fluorocromo en la solución tinción hasta 5µg/ml y el tiempo de incubación con el mismo hasta 1 hora.

Estas modificaciones no introdujeron cambios significativos respecto a los resultados obtenidos inicialmente.

Dado que el DAPI es un colorante supravital, se optó por adicionarlo al medio de cultivo (LB) en concentración de 1µg/ml. Las bacterias se hicieron crecer en este medio en las condiciones habituales, comprobándose que la presencia del fluorocromo no alteraba el patrón de crecimiento de las mismas. Por otra parte, la observación

mediante microscopía óptica de fluorescencia reveló una excelente calidad de tinción, tanto en la intensidad como en el porcentaje de células teñidas, que puede considerarse del 100% . Esta tinción permanecía inalterable tras varios lavados con agua destilada y Sorbitol 0.8M, lo cual, hacía óptimo el método para teñir las bacterias antes de ser utilizadas en los procesos de captación.

### 1.2.2. Técnicas de inmunofluorescencia indirecta

Otro método para detectar la presencia de *Escherichia coli* en el interior de los protoplastos, tanto en el momento de la captación como en posteriores etapas, es la tinción específica con anticuerpos marcados.

Tradicionalmente, la puesta a punto de las técnicas de inmunofluorescencia indirecta conlleva la elección de un fijador y el ensayo de las condiciones de incubación ( $T^a$ , tiempo y concentración tanto del antígeno como del anticuerpo) con los anticuerpos primario y secundario. Sobre esta base se ensayaron, con células de *Escherichia coli*, las modificaciones oportunas a la técnica de Haseck *et al* (1986), y que resultaría penoso describir con detalle por tratarse de procesos rutinarios de estandarización. Como resultado de estas experiencias se determinaron las condiciones óptimas, que son las descritas en el apartado 8.2 del capítulo de material y métodos. Las imágenes obtenidas pueden observarse en la Fig.1 a.

Una vez optimizada la técnica sobre muestras de la bacteria, era necesario su ensayo sobre muestras de protoplastos y células de levadura con el fin de determinar la existencia o no de reacciones cruzadas con los anticuerpos empleados.

Con este fin, se realizaron experiencias en estas condiciones obteniendo los siguientes resultados:

-Cuando se utilizan protoplastos es evidente la ausencia total de fluorescencia característica de la fluoresceína.

-Sin embargo, sobre muestras de células con pared aparecen zonas fluorescentes a nivel de la misma.

No obstante, esta fluorescencia no puede ser interpretada como resultado de una reacción cruzada, ya que aparece incluso en muestras control, es decir, en las que ha sido omitida la incubación con el anticuerpo primario. Es por ello que este fenómeno ha sido atribuido a un entrapamiento de los anticuerpos en la densa malla que constituye la pared celular de la levadura.

A fin de evitar la aparición de estas zonas fluorescentes, que pueden dificultar una correcta interpretación de los resultados, tras la fijación se ensayaron tratamientos con enzimas que degradan la pared celular. Esta técnica ha sido descrita para evitar fenómenos similares en células vegetales por Knox *et al* (1982). Para ello, y tras la etapa de fijación, las muestras se resuspenden en una solución de Novozyma 234 (5 mg/ml) en agua destilada, dejando actuar a T<sup>a</sup> ambiente durante un periodo de 30 min - 1h. A continuación las muestras son lavadas varias veces con agua destilada, siguiéndose posteriormente el tratamiento descrito.

La observación de las muestras así tratadas reveló que en la mayoría de los casos este tratamiento eliminaba la aparición de fluorescencia inespecífica,



debido a la degradación de la pared celular.

Otro problema a resolver era la aparición de una fluorescencia inespecífica, que de acuerdo con la bibliografía consultada aparece también en el caso de las muestras vegetales (Knox, 1982). Esta es debida a los procesos de fijación y aunque presenta una tonalidad dentro de la gama del verde diferente a la obtenida con la fluoresceína, dificulta no obstante, la visualización de las muestras. Para eliminar este fenómeno suelen utilizarse colorantes como el azul de Evans o verde Metileno. En este caso se ensayaron ambos, adicionándolos a la solución del anticuerpo secundario a una concentración 1/10000. Se encontró que el azul de Evans era el que eliminaba esta autofluorescencia, haciendo el papel de contratinción, y observándose, tras su excitación, en el rango del rojo.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1 b y c.

### 1.2.3. Técnicas de microscopía electrónica

La única vía para detectar inequívocamente la presencia de la bacteria en el interior de los protoplastos es su visualización mediante microscopía electrónica, proporcionando esta técnica, además, información sobre el mecanismo ultraestructural del proceso de entrada, así como de la evolución del mismo.

Como ya se apuntó en el apartado 8.3.1. del capítulo de material y métodos, las técnicas de preparación de muestras para su visualización a microscopía electrónica están muy desarrolladas en el caso de tejidos animales. En las referencias bibliográficas existentes sobre los

estudios realizados en hongos se describe la utilización habitual de técnicas de criofractura. No obstante, el procesamiento de las muestras para la obtención de cortes ultrafinos presenta múltiples problemas, debido fundamentalmente, a la presencia de gruesas paredes celulares, vacuolas, así como a un hialoplasma denso que dificulta la penetración de los fijadores (Kopp, 1975). Por ello se propone el uso de fijadores con un elevado poder de penetración, tales como la acroleína (sustancia que presenta altos niveles de toxicidad), o bien, fijadores como el dicromato potásico que provocan una drástica destrucción del contenido citoplasmático.

Por todo ello, se optó por comenzar utilizando las técnicas tradicionalmente empleadas en tejidos animales a fin de comprobar si la capacidad de preservación estructural obtenida permitía realizar los estudios objeto de este trabajo, el método de partida fué el descrito en el apartado 8.3.1 del capítulo de material y métodos.

Las muestras sobre las que se ensayó esta técnica fueron células de levadura, o protoplastos, mezclados con células de *Escherichia coli*. Estas se incluyeron en agar al 2% para conseguir una consistencia semejante a la que presentan los tejidos animales. La inclusión se llevó a cabo adicionando a una solución de agar al 4%, mantenido en sobrefusión (45°C), un volumen igual de una suspensión de levadura ( $1 \times 10^9$  células/ml), a continuación se sometió a centrifugación rápida a 15.000 rpm (Dra. Rico, comm. pers.), y el sedimento, una vez solidificado, se cortó en secciones de  $1 \text{mm}^3$  aproximadamente. Seguidamente estas secciones fueron procesadas de la forma habitual.

La observación de las muestras reveló, como se comprueba en las microfotografías, que el método era claramente ineficaz, proporcionando una escasa o nula preservación ultraestructural, que no mejoraba ni aún incrementando los tiempos de fijación. Fig.2.

A la vista de los resultados se optó por ensayar paralelamente distintos métodos de fijación que incidían tanto en la composición de las soluciones fijadoras como en los tiempos de fijación, e igualmente se realizaron fijaciones sobre muestras incluídas en agar de la forma ya descrita. Se intentó también la fijación de células en suspensión, hecho que conlleva la realización de sucesivas centrifugaciones de las muestras, hasta que comienza la etapa de rehidratación, al objeto de conseguir un alto grado de cohesión entre las células. Las centrifugaciones se realizan en cada uno de los pasos del proceso: antes, durante y después del tratamiento con OsO<sub>4</sub>, y cada vez que se realiza un cambio, siendo la última de larga duración (15 minutos) y a elevada velocidad (15.000 rpm). Con ello se consigue una cohesión progresiva entre las células, que es reforzada con la consiguiente deshidratación. Se obtienen así unos sedimentos sólidos que ya son tratados de la misma forma que las muestras incluídas en agar.

Las condiciones de fijación ensayadas son las que se describen a continuación:

-Fijación n°1:

Está basada en la técnica de fijación de muestras para tratamiento de inmunofluorescencia descrita por Haseck *et al* (1981). Esta se lleva a cabo en dos etapas. En la primera, las muestras se incuban en una

solución de Paraformaldehído al 4% durante 1 hora a T<sup>a</sup> ambiente, en una segunda etapa se incuban en una solución de Glutaraldehído al 5%. Esta segunda etapa se ha ensayado para tiempos de 1 y 23 horas a T<sup>a</sup> ambiente.

-Fijación n°2:

Consiste en la utilización de una solución fijadora que combina las propiedades de distintos aldehídos, al objeto de conseguir una elevada velocidad de penetración y un alto grado de preservación estructural. Presenta la siguiente composición:

Formaldehído 4%  
Acroleína 2%  
Glutaraldehído 4%

Los tiempos de incubación ensayados han sido de 2 y 24 horas.

-Fijación n°3:

La solución fijadora está compuesta por glutaraldehído al 12.5 % .El tiempo de incubación ensayado fué de 24 horas.

En todos los casos, el vehículo en el que van disueltos los fijadores es tampón fosfato sódico 0.1 M pH 6.5 , adicionado de EGTA 5mM y Mg<sub>2</sub>Cl 1mM, compuestos que han sido descritos como preservadores estructurales en levaduras y células vegetales (Knox, 1982). Así mismo, en el caso de ser protoplastos la muestra a fijar, va adicionado del estabilizador osmótico adecuado y en igual concentración a la utilizada antes de la fijación, a fin

de evitar fenómenos de retracción o hinchamiento de los mismos.

Tanto la fijación n°1 como la n°2 proporcionaron buenos resultados con tiempo de incubación de 2 horas, pero únicamente en el caso de protoplastos y cuando estos eran fijados en suspensión. Fig.3 a y b.

Estos resultados mejoraban con el uso de la solución fijadora 2 con un tiempo de fijación de 24 horas, haciéndose extensiva esta mejora a las muestras de células con pared. Fig.3 c,d,e y f.

Por otra parte, en el caso de muestras incluídas, aunque este método de fijación mejoraba sensiblemente la preservación, seguía siendo insatisfactoria, sobre todo en el caso de células enteras y no mejoraba ni aumentando las concentraciones de los fijadores al doble. Además, la obtención de cortes ultrafinos de estas muestras es prácticamente imposible debido a la heterogeneidad de las mismas.

Se optó por tanto por usar el método de fijación n° 2.

En cuanto a la postfijación con tetróxido de osmio, se ensayó en estas experiencias su uso a una concentración del 1% y un tiempo de incubación de 1 hora, obteniendo así mejores resultados. Por ello se mantienen estas condiciones para experiencias posteriores.

## 2.OBTENCION DE PROTOPLASTOS

La obtención de los protoplastos de las estirpes

objeto de este trabajo se llevó a cabo siguiendo las técnicas descritas en el apartado 5 del capítulo de material y métodos. Los niveles normales de obtención se situaron, en todos los casos en torno a un 95-100% y los porcentajes de regeneración de los protoplastos oscilaron entre un 10-30% en las distintas experiencias, dependiendo de las estirpes ensayadas.

### 3. ESTUDIO DEL PROCESO DE CAPTACION

#### 3.1. OPTIMIZACION DEL PROCESO DE CAPTACION EN LEVADURAS

Como ya se mencionó en el apartado 6 del capítulo de Material y Métodos, la técnica descrita por Yamada y Sakaguchi en 1981 para inducir la captación de células de *Azotobacter vinelandii* por protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae*, ha sido la utilizada como punto de partida en las experiencias objeto de este trabajo.

El primer objetivo a conseguir era la optimización del proceso de captación, así como el estudio del mecanismo citológico por el cual tiene lugar.

El proceso de optimización se centró en el estudio de la influencia de los siguientes factores:

- Relación entre el n° de protoplastos/ n° de células de *Escherichia coli*.
- Concentración de polietilenglicol (PEG) utilizada.
- Sistema de rehidratación o de eliminación del PEG.
- Efecto del vehículo de solución del PEG.

Los métodos a utilizar para valorar la influencia de estos factores son la microscopía electrónica de transmisión y la tinción previa con DAPI que permitirían, de una parte, la visualización y confirmación de la presencia de la bacteria en el interior de los protoplastos, y de otra, la valoración de la eficacia del proceso.

Hay que señalar que todas las experiencias que a continuación se detallan se han realizado con la cepa 3.2 de *Saccharomyces cerevisiae* y JC5466/pRD1 de *Escherichia coli*, y que las muestras fueron tomadas tras ser resuspendidas en sorbitol 0.8M.

En una primera experiencia, y como punto de partida, se ensayó la técnica citada sin modificación alguna. La observación de las muestras a microscopía electrónica reveló una bajísima frecuencia de captación, apenas detectable por este método. Las imágenes mostraron que había formación de agregados entre bacterias y protoplastos, pero que el grado de cohesión provocado por el poder deshidratante del PEG no era suficiente como para inducir la fusión de las membranas de los protoplastos y provocar la captación de las bacterias. Fig.4.

Por otra parte, mediante la observación a microscopía óptica de fluorescencia de muestras obtenidas en experiencias paralelas, y en las que las bacterias habían sido previamente teñidas con DAPI, no se detectó ninguna bacteria en el interior de los protoplastos, aunque a estos niveles de resolución es muy difícil distinguir entre bacterias adheridas a la superficie de los mismos ó internalizadas. Todo ello hacía imposible el uso de la microscopía óptica como único método de valoración, si bien no podía ser desechada en este momento dada la baja frecuencia de captación detectada en estas condiciones.

A la vista de los resultados obtenidos, se optó por introducir una modificación: adicionar la solución de PEG directamente sobre el sedimento tras centrifugar la suspensión de protoplastos y bacterias, a fin de aumentar la probabilidad de formación de agregados.



Se ensayaron concentraciones del 15 y 30% de PEG sobre estos sedimentos, ya que en las condiciones de partida el PEG se encontraba a una concentración final del 15% tras ser adicionado a la suspensión de células, determinar de esta forma si la ausencia de captación era debida también a una falta de poder deshidratante provocada por el uso de una baja concentración de PEG.

Simultáneamente se ensayaron distintas proporciones entre protoplastos y bacterias, dado que dicha proporción podía suponer igualmente un factor determinante a la hora de obtener valores óptimos de captación. Las proporciones ensayadas en ambos casos fueron 1/10, 1/100 y 1/1000.

La observación a microscopía electrónica de las distintas muestras obtenidas puso de manifiesto que la captación sólo era detectable cuando se utilizan concentraciones del 15% de PEG, incluso para proporciones celulares de 1/10, y que aumenta significativamente tanto el nº de protoplastos que han internalizado la bacteria como el nº de bacterias captadas por un protoplasto en el caso de 1/100, encontrando protoplastos que incluso contienen 3 bacterias. Para proporciones de 1/1000 la frecuencia de captación disminuye sensiblemente.

Para valores del 30% de PEG no pudo detectarse en ningún caso la presencia de la bacteria en el interior de la levadura.

En experiencias realizadas de forma paralela con bacterias teñidas con DAPI, la observación de las muestras reveló que este método es absolutamente ineficaz para seguir el proceso ya que sólo en aquellos casos en los que

a microscopía electrónica se había detectado una elevada frecuencia de captación fué observado algún protoplasto que contenía una célula bacteriana en su interior. La causa por la cual no pueden detectarse es desconocida, si bien podemos apuntar que dada la baja resolución conseguida a microscopía óptica, es imposible determinar si las bacterias se hallan en el interior ó adheridas a la superficie de los protoplastos. Fig 5 a,b,c,d y e. Por otra parte, hay que señalar que como consecuencia del tratamiento con PEG se forman agregados de gran tamaño entre los protoplastos y las células bacterianas en los que es imposible distinguir la posición relativa de cada uno de ellos, y que es, probablemente, en estos agregados donde la internalización se da con mayor frecuencia. Fig. 5 f. No obstante y a pesar de las razones expuestas, debían detectarse una gran cantidad de protoplastos con bacterias internalizadas, dada la facilidad con la que se observan a microscopía electrónica; ello lleva a pensar que por algún mecanismo desconocido una vez el procarionta ha sido captado la fluorescencia desaparece o se enmascara.

Así mismo se ensayaron, de forma paralela, técnicas de inmunotinción siguiendo el método que ha sido descrito en en el apartado 1.2.2 de este mismo capítulo, ya que si bien esta técnica había sido diseñada para la detección de las bacterias en etapas posteriores, era necesario comprobar su eficacia sobre muestras en las que a través de la visualización a microscopía electrónica había sido comprobada la presencia de la bacteria en el interior de los protoplastos.

En ninguna de las experiencias realizadas fué posible detectar bacterias internalizadas, no obstante sí era posible detectar, tanto las bacterias adheridas a los

protoplastos como aquellas que estaban libres, demostrando por tanto que el tratamiento con PEG no afectaba la antigenicidad de la bacteria. Fig.6.

Las únicas razones posibles eran las siguientes: los anticuerpos no son capaces de penetrar en los protoplastos a pesar de los tratamientos de permeabilización, o bien el azul de Evans provoca un efecto pantalla que impide la visualización de las bacterias. Una tercera razón lleva a pensar, que al igual que en el caso del DAPI y por alguna razón desconocida, una vez las bacterias han sido internalizadas no es posible detectar la fluorescencia.

Otro factor a tener en cuenta a la hora de optimizar el proceso de captación es, como ya se mencionó, el sistema de rehidratación de los protoplastos ó eliminación del PEG. A este respecto, Hasezawa *et al* (1982), describen procesos de captación entre protoplastos de *Vinca rosea* y *Agrobacterium tumefaciens*, destacando la importancia de eliminar el PEG, tras el tratamiento, de una forma paulatina diluyéndolo por adición de soluciones tamponadas de elevado pH y alta concentración de  $Ca^{2+}$ ; esto provoca una rehidratación lenta y escalonada de los protoplastos. En oposición, el método aplicado hasta el momento provoca una brusca rehidratación dado que el PEG es eliminado en un sólo paso por centrifugación y resuspensión del sedimento en tampón TCS.

A fin de valorar la influencia del método de rehidratación, se realizaron experiencias en las que tras los 30 minutos de tratamiento se adicionaban volúmenes de tampón TCS iguales a los de PEG empleados y a intervalos de 5 minutos, hasta obtener un volumen 4 veces superior al de

PEG utilizado. Seguidamente se centrifugaba y se continuaba de acuerdo con el protocolo habitualmente empleado.

La observación a microscopía electrónica de las muestras así tratadas reveló que esta rehidratación paulatina incrementa sensiblemente el n° de protoplastos de levadura que han internalizado la bacteria, por tanto se adoptó esta metodología para posteriores experiencias.

El último factor sometido a estudio fué el vehículo en el que va disuelto el PEG, y que hasta el momento en todas las experiencias citadas había sido tampón TC. Matsui *et al* (1982), Hasezawa *et al* (1982) y Tanaka *et al* (1984) utilizan una solución acuosa de PEG, reservando los tampones del tipo TC (elevado pH y alta concentración de  $Ca^{2+}$ ) para los lavados, como habitualmente se venía realizando en las experiencias anteriores.

La observación de muestras tomadas en experiencias paralelas utilizando PEG disuelto en agua y en tampón TC, reveló que la primera opción propiciaba un ligero incremento en la frecuencia de captación, si bien cabe señalar que este tratamiento provoca un elevado grado de lisis en los protoplastos.

### 3.2. ESTUDIO DEL MECANISMO ULTRAESTRUCTURAL DE CAPTACION

La optimización del proceso de captación era un paso previo y necesario para abordar el estudio ultraestructural del mismo, ya que era preciso obtener un número significativo de protoplastos que contuviesen bacterias en su interior a fin de determinar de una manera fiable los sucesos que tienen lugar durante y después de la captación.

Para realizar el estudio de los mecanismos citológicos por los que el PEG induce la internalización de las bacterias por parte de los protoplastos, se tomaron muestras en las distintas etapas del tratamiento: incubación, rehidratación y lavados que fueron procesadas para su visualización a microscopía electrónica.

La observación de las mismas puso de manifiesto lo siguiente:

- Durante la incubación con PEG: se observa la formación de agregados de gran tamaño, debido a la acción deshidratante de este polímero. Fig.7. En estos agregados se presentan dos situaciones diferentes:

1. Hay células bacterianas que se sitúan presionando la membrana citoplasmática de los protoplastos, provocando la formación de una invaginación que las rodea parcialmente, Fig 8 a y b.

2. Dos o mas protoplastos rodean a una célula bacteriana que queda atrapada entre ellos, Fig 8 c,d y e.

- Durante la etapa de rehidratación: los agregados celulares son de menor tamaño, observándose, con una baja frecuencia, una célula bacteriana rodeada total o parcialmente por dos o tres protoplastos. Las membranas de los protoplastos en contacto presentan zonas en las que parecen fusionarse. Fig 9 a y b.

No obstante, lo mas frecuente es observar bacterias que se alojan en depresiones de la membrana de

los protoplastos; el grado de internalización de las mismas es variable, desde aquellas que sólo parecen presionar debilmente el citoplasma, hasta otras que se hallan totalmente encerradas en una invaginación cuyos extremos están próximos a encontrarse. Otras bacterias ya han sido totalmente "englobadas" y aparecen situadas en el interior de una vacuola que se ciñe por completo a la pared celular de la misma, Fig. 9 c y d.

- Durante los sucesivos lavados con tampón TCS: en las imágenes observadas ya no es posible visualizar agregados, si bien aparecen protoplastos de muy distinto tamaño, independientemente de que contengan o no bacterias en su interior. Este hecho puede atribuirse a procesos de fusión entre los mismos. Se observa igualmente un elevado número de protoplastos que contienen una e incluso 2 o 3 bacterias. Fig 10 a.

Hay que señalar que en el citoplasma de las células que han captado al procariota se detecta con cierta frecuencia la aparición de vesículas de distintos tamaños y distinta electrodensidad, así como un sistema membranoso interno muy patente, que puede ser identificado como retículo endoplasmático y aparato de Golgi, Fig. 10 b y c.

Otros protoplastos presentan un contenido citoplasmático totalmente degenerado (ó degradado), mientras que, tanto la membrana como la bacteria, permanecen inalterados. Fig. 10 d.

-Finalmente, y de acuerdo a la metodología, tras los lavados en tampón TCS los protoplastosa son resuspendidos en una solución de Sorbitol 0.8M, a fin de devolver el nivel de osmolalidad habitualmente utilizado

para mantener las suspensiones de protoplastos.

La visualización de las muestras tomadas en este momento, puso de manifiesto que:

-Las vesículas que contienen a la bacteria son de mayor tamaño. Fig 11.

-Hay un incremento de la frecuencia de protoplastos que, conteniendo bacterias en su interior, presentan rasgos citológicos semejantes a los anteriormente descritos, pudiéndose observar, incluso, la unión de vesículas por fusión con la que encierra a la bacteria. Fig 12 a.

-Así mismo el número de protoplastos que presentan el citoplasma degradado es muy superior al observado en el momento anterior. Sólo un pequeño porcentaje presenta características semejantes a las observadas en aquellos protoplastos que no habían internalizado a la bacteria. Fig. 12 b y c.

Estos fenómenos de degeneración de los protoplastos una vez han captado la bacteria, que ya fueron mencionados en el apartado anterior de este mismo capítulo, no habían sido detectados, o al menos no con esta frecuencia, durante las experiencias de optimización del método en las que se utilizó el PEG disuelto en TC.

Este extremo fué nuevamente comprobado observando muestras tomadas en las distintas etapas del proceso, realizado en este caso con PEG disuelto en tampón. La visualización de las mismas reveló que durante las etapas de incubación con PEG y de rehidratación los fenómenos observados coinciden de forma inequívoca con los ya

descritos para el caso de emplear PEG en disolución acuosa.

Sin embargo, en las muestras correspondientes a los lavados con tampón TCS, aunque también se detectan características citológicas iguales a las ya descritas, estos fenómenos aparecen con una frecuencia considerablemente inferior, (Fig 13 a y b) observándose un gran n° de protoplastos que conteniendo a la bacteria presentan su aspecto citológico habitual, y en los que la vesícula que contiene a la misma aparece ceñida por completo a su pared celular. Fig. 13 c y d.

La visualización de las muestras cuando ya han sido resuspendidas en sorbitol 0.8M demostró que disminuye la frecuencia de protoplastos que presentan características citológicas habituales. En estos, las vesículas que encierran a las bacterias son de mayor tamaño que en la etapa anterior pero menores a las encontradas en el caso del tratamiento con disoluciones acuosas de PEG. Fig 14 a.

Así mismo se incrementa, tanto la frecuencia de los protoplastos con un elevado número de vesículas y retículo endoplasmático y complejo de Golgi patentes (Fig. 14 b) como el número de protoplastos en distintos estadios de degeneración, degeneración que no es extensiva a las bacterias. Fig. 14 c y d.

De todo lo expuesto se deduce que la presencia de *Esherichia coli* en el interior de los protoplastos provoca en los mismos un efecto degenerativo que es sensiblemente atenuado por la presencia de iones  $Ca^{2+}$  y valores de pH ligeramente básicos durante el tratamiento con PEG.



Este hecho se confirma igualmente por comparación entre las densidades ópticas de suspensiones mezcla de los protoplastos con la bacteria, tras el tratamiento con PEG disuelto en agua ó en tampón TC, que son superiores en este último caso, en torno a valores de 0.1.

#### 4. CRECIMIENTO EN MEDIOS MINIMOS

A fin de comprobar la posibilidad de establecer relaciones de complementación nutricional entre las distintas parejas de microorganismos seleccionadas, previa y simultáneamente a los estudios realizados a microscopía electrónica, se llevaron a cabo experiencias en las que tras la inducción de la captación y una vez resuspendidos los protoplastos en sorbitol 0.8M, según la metodología descrita en el apartado 7 del capítulo de material y métodos, se inocularon en medios hipertónicos de regeneración, tanto completos (OCM) al objeto de determinar la viabilidad de los protoplastos tras el tratamiento con PEG, como en medios mínimos (OMM-1, OMM-2) suplementados que carecen de uno de los marcadores auxotróficos de la levadura y de al menos uno de los de la bacteria. Así mismo en los casos en los que se utilizó la estirpe JC5466/pRD1 de *Escherichia coli*, se adicionó al medio ampicilina para asegurar el mantenimiento del plásmido pRD1 que porta dicha estirpe.

Los resultados obtenidos se describen a continuación de forma detallada.

4.1. EXPERIENCIAS REALIZADAS CON *Saccharomyces cerevisiae*  
3.2 Y *Escherichia coli* JC5466/pRD1

a.- En ausencia de histidina.

A pesar de ser la estirpe 3.2 un mutante de crecimiento lento para este marcador, como ya se ha descrito en el apartado 1.1.2 de este mismo capítulo, lo cual conlleva la aparición de pequeñas colonias tras largos periodos de incubación, se creyó conveniente realizar experiencias con esta estirpe aplicando presión selectiva para el marcador citado a fin de evitar un crecimiento rápido de la levadura. Un desarrollo rápido del eucariota inevitablemente impediría la evolución conjunta del sistema obtenido, eliminando así la necesidad de establecer un cierto grado de complementación nutricional entre los microorganismos participantes.

La utilización de esta estirpe hace necesario incluir controles paralelos inoculando, en las mismas condiciones, protoplastos tratados con PEG en ausencia de la bacteria, a fin de determinar diferencias en cuanto al tiempo de aparición de las colonias y aspecto y número de las mismas. Hay que señalar, no obstante, que ambas situaciones no son comparables, debido fundamentalmente a la diferencia de tamaño de los agregados que influirá en el número de unidades formadoras de colonias, así como a la desigual frecuencia con la que se producen procesos de fusión entre los mismos.

Para ello se inocularon alicuotas en medios mínimos hipertónicos carentes de histidina, así como adicionados de todos los requerimientos, tanto en el caso de los protoplastos que han sido incubados con la bacteria,

como aquellos sometidos al tratamiento con PEG en ausencia de la misma.

En medios adicionados de todos los requerimientos se observó la aparición de crecimiento tras 3-4 días de incubación. Los valores de regeneración encontrados tras el tratamiento, en el caso de protoplastos control, son los habituales para procesos de fusión de protoplastos, mientras que en el caso de los protoplastos en los que se ha inducido la captación, y a medida que el método de inducción de la misma iba siendo optimizado, la frecuencia de regeneración tras el tratamiento iba disminuyendo. A pesar de no ser comparables ambas situaciones (protoplastos tratados con PEG en presencia o ausencia de la bacteria), se estimó una disminución en la frecuencia de regeneración en torno a un 80-90% de los protoplastos que no han sido puestos en contacto con la bacteria, en el caso de inducir la captación con PEG en disolución acuosa, y algo inferiores (60-70%) en el caso de utilizar PEG disuelto en tampón TC.

En medios carentes de histidina, tras 14 días de incubación se comprobó la aparición de crecimiento en ambos casos, siendo imposible efectuar recuentos de forma fiable puesto que la aparición de las colonias se produce paulatinamente y a medida que incrementan los tiempos de incubación, incrementan igualmente tanto el número como el tamaño de las colonias.

Tampoco se encontraron diferencias significativas en cuanto al tamaño o número de las colonias aparecidas, si bien en el caso de protoplastos en los que la internalización ha tenido lugar, se detectó la aparición de colonias cuyas células presentaban una morfología

diferente, mostrando rasgos miceliales debidos a la presencia de túbulos y yemas que no se han separado.

b.-En ausencia de uracilo.

Se inocularon protoplastos tras la inducción de la captación en medios mínimos hipertónicos carentes de uracilo, marcador auxotrófico que es estable incluso tras largos periodos de incubación.

Tras 20 días de incubación no se detectó crecimiento alguno, mientras que en los medios adicionados del marcador aparecen colonias tras 3-4 días de incubación.

#### 4.2. EXPERIENCIAS CON *Saccharomyces cerevisiae* DBY 746 Y *Escherichia coli* JC5466/pRD1.

Igualmente se llevaron a cabo experiencias para inducir la captación tras las cuales los protoplastos se inocularon en medios mínimos de regeneración diferentes en cuanto al marcador del que carecen.

Tras largos periodos de incubación, alrededor de 20 días, no se detectó crecimiento alguno en ninguno de los casos, mientras que en los controles realizados en medio completo de regeneración, las colonias eran visibles tras 3-4 días de incubación.

Hay que señalar que las auxotrofías que presenta la estirpe DBY 746 están determinadas tanto por mutaciones puntuales como por deleciones.

#### 4.3. EXPERIENCIAS CON *Saccharomyces cerevisiae* IV-PX2-1C Y *Escherichia coli* ATCC 13005

La estirpe IV-PX2-1C presenta una mutación para un enzima común en la biosíntesis de los aminoácidos isoleucina y valina, como consecuencia de la cual presenta una doble auxotrofia. Por otra parte la cepa ATCC 13005 de *Escherichia coli* está catalogada como productora de valina.

Estas características harían idóneos a estos microorganismos para forzar una complementación auxotrófica de marcadores entre ellos.

Al igual que en los casos anteriores, tras inducir la captación, los protoplastos se inocularon tanto en medios mínimos carentes del aminoácido valina, como adicionados del mismo.

Tras 3-4 días de incubación apareció crecimiento en los medios adicionados de todos los nutrientes. Sin embargo tras 20 días de incubación, no se detectó la aparición de crecimiento en los medios carentes de valina. La observación mediante microscopía óptica reveló la presencia de protoplastos sin signos de gemación que indicasen crecimiento.

#### 5. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD Y EVOLUCION DE LOS SISTEMAS LEVADURA-BACTERIA

De acuerdo con los resultados descritos en el apartado anterior que indican la imposibilidad de establecer un sistema levadura-bacteria viable, era necesario determinar, a través de la visualización a microscopía electrónica, los fenómenos que tienen lugar

inmediatamente después de la inducción de la captación que por otra parte ya había sido optimizada y determinado el mecanismo por el cual tiene lugar.

Todas las experiencias que se describen a continuación fueron realizadas con la estirpe 3.2. de *Saccharomyces cerevisiae* y JC5466/pRD1 de *Escherichia coli* inhibiendo parcialmente el crecimiento mediante la inoculación en medios carentes de histidina, hecho que facilitaría el estudio de este proceso en condiciones de un metabolismo lento.

## 5.1. SEGUIMIENTO A MICROSCOPIA ELECTRONICA

### 5.1.1. Experiencias previas

Como es sabido, los protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae*, así como de otras especies de levadura, sólo son capaces de regenerar a células normales cuando se encuentran embebidos en una matriz sólida, representando este hecho un grave obstáculo para realizar el seguimiento del sistema levadura-bacteria mediante microscopía electrónica.

Como ya se indicó en el apartado 1.2.3 de este mismo capítulo, la preparación y visualización de muestras incluídas en agar presenta graves inconvenientes derivados tanto de la dificultad para su correcta fijación como de la inoculación de un número suficiente de protoplastos para su posterior procesamiento y visualización. Así mismo, la ultramicrotomía de este tipo de muestras es problemática.

De otro lado, cuando se inoculan protoplastos en medio líquido, estos, si bien no revierten a células

normales si son capaces de crecer dando lugar a formas ameboides, teniendo lugar incluso procesos de división nuclear (Neças, 1971)

Esta característica posibilitaría la realización de estudios de viabilidad inoculando alicuotas sobre medios líquidos, facilitando de esta manera la toma de muestras tras cortos periodos de incubación.

No obstante, era necesaria la realización de experiencias previas para determinar el tiempo que era posible mantener los protoplastos en estas condiciones sin que aparecieran signos de degeneración y estudiar igualmente las características citológicas de los mismos. Con tal finalidad, protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* fueron inoculados en medios de regeneración líquidos (OCM) e incubados a 28°C en reposo. Muestras de los mismos, tomadas a distintos tiempos, se procesaron para su observación a microscopía electrónica.

La visualización de las mismas puso de manifiesto que es posible mantenerlos en estas condiciones durante 24 horas sin que aparezca alteración alguna, ni a nivel citológico (Fig. 15) ni en cuanto a su viabilidad, extremo este comprobado mediante la inoculación en OCM sólido, transcurrido el tiempo de incubación en medio líquido.

#### 5.1.2. Visualización de las muestras

De acuerdo con los resultados descritos en el apartado anterior, y a fin de poder determinar fácilmente los eventos que tienen lugar en los primeros momentos, se inocularon alicuotas de las suspensiones de protoplastos tras la inducción de la captación con PEG disuelto en TC y

una vez resuspendidos en sorbitol 0.8M, tanto en medio OMM-2 líquido suplementado con adenina y uracilo, (carentes de histidina) como adicionado de los tres marcadores, que se incubaron a 28°C en reposo.

En ambos casos el medio va adicionado de ampicilina al objeto de asegurar el mantenimiento del plásmido pRD1 que porta la estirpe de *Esherichia coli* empleada.

A intervalos de tiempo de 15, 30, 60, 120 y 180 minutos y a las 21 horas de incubación, se tomaron muestras que fueron procesadas para su visualización a microscopía electrónica.

Para confirmar que la captación había tenido lugar, y como controles se tomaron muestras durante el último lavado en TCS y tras su resuspensión en sorbitol 0.8M. Así mismo y como controles frente a las muestras inoculadas en medio nutritivo, se tomaron alicuotas durante los lavados en TCS y Sorbitol 0.8M que fueron incubadas en estas soluciones a 28°C y en reposo, durante dos horas.

La visualización de las muestras puso de manifiesto lo siguiente:

En los controles se observan de nuevo las situaciones descritas en el apartado anterior.

En las muestras inoculadas en OMM-2 líquido adicionado de adenina y uracilo, ya en tiempos de incubación de 15 minutos, se observaron con una elevada frecuencia células degeneradas; dicha frecuencia se



incrementa a medida que se prolongan los tiempos de incubación (Fig.16) siendo cada vez más difícil encontrar protoplastos íntegros que contengan a la bacteria (Fig 17 a y b). Los protoplastos presentan progresivamente, y en función del tiempo, multitud de vesículas rodeadas de membrana (Fig 17 c y d), aparentemente vacías y alrededor de las cuales aparecen con frecuencia zonas en las que el citoplasma presenta una inferior electrodensidad. Fig.17 e y f.

A partir de los 120 minutos de incubación prácticamente todos los protoplastos que contienen bacterias en su interior están degenerados (Fig 18 a), sin embargo, en muestras correspondientes a 180 minutos de incubación fué posible encontrar algún protoplasto en crecimiento y sin signos de degeneración, que contenía una bacteria en su interior. Esta aparece rodeada por una membrana propia del hospedador que se ciñe a la pared celular de la bacteria de forma que en ciertos tramos de la misma es imposible diferenciarla de la membrana externa bacteriana. Hay que señalar la presencia de mitocondrias que se localizan próximas a la bacteria. Fig.18 b y c.

Tras 21 horas de incubación sólo se observaron células de *Escherichia coli* alojadas en repliegues membranosos de los protoplastos, pero no en su interior. Fig. 18 d.

En muestras inoculadas en OMM-2 líquido adicionados de adenina, uracilo e histidina, los procesos de degeneración son aún más marcados, de forma que ya a los 30 minutos es difícil localizar protoplastos en buen estado que contengan a la bacteria en su interior (Fig. 19 a, b y c), siendo las microfotografías mostradas las

correspondientes a los únicos encontrados en esta situación. Fig. 19 d.

A los 180 minutos de incubación se encontraron dos protoplastos que contenían a la bacteria en su interior. Cada uno de ellos mostraba características diferentes. Uno presentaba un aspecto semejante al descrito para las muestras inoculadas en OMM-2 carente de histidina para el mismo tiempo de incubación: la bacteria se halla situada en una vesícula de pequeño tamaño, pero su membrana no se ciñe a la pared celular bacteriana, sino que se prolonga adentrándose en el citoplasma. Fig. 20 a.

El otro protoplasto presenta en un extremo de su cuerpo celular una bacteria alojada en una gran vesícula, rodeada de una porción de citoplasma donde también se alojan las únicas mitocondrias detectadas en el cuerpo celular. Fig. 20 b y c.

En las muestras incubadas en TCS durante 2 horas se observó, que aunque hay un elevado número de protoplastos degradados, una gran parte de los mismos aún permanece integra, a diferencia de lo descrito cuando se incuban durante el mismo tiempo en medios nutritivos.

Dentro de los protoplastos que permanecen integros y que alojan a la bacteria en su interior se observan distintas situaciones. Así encontramos:

-Protoplastos que presentan características citológicas "normales" (ausencia de vesículas, no se distingue el retículo endoplasmático, etc). Dentro de este tipo podemos encontrar a la bacteria en dos situaciones diferentes:

1.-Alojadas en vesículas. Fig.21 a y b.

2.-Inmersas en el citoplasma del protoplasto, rodeadas por la membrana del mismo que se ciñe por completo a la pared celular de la bacteria. Fig. 21 c y d.

-Protoplastos que presentan en el citoplasma un gran número de vesículas de distinto tamaño que se fusionan tanto entre ellas como a la vesícula que aloja a la bacteria (Fig. 22 a y b), y alrededor de las cuales es frecuente encontrar zonas del citoplasma con menor electrodensidad. También aparecen un retículo endoplasmático y aparato de Golgi muy evidentes. Fig. 22 c y d.

Por otra parte en las muestras incubadas durante dos horas en sorbitol 0.8M se observó un elevado porcentaje de protoplastos totalmente degradados, encontrando con dificultad algunos intactos que contienen a la bacteria y que no presentan las vesículas descritas anteriormente (Fig. 23 a y b). Incluso se han observado protoplastos en los que es la bacteria quien presenta signos de degradación. Fig.23 c.

## 5.2.MEDIDAS DE DENSIDAD OPTICA

A la vista de los resultados obtenidos a microscopía electrónica se realizaron experiencias en las que tras la inducción de la captación se inocularon e incubaron protoplastos en las mismas condiciones y se determinaron las variaciones de densidad óptica en función del tiempo, a fin de confirmar los fenómenos de degradación

y lisis encontrados mediante visualización a microscopía electrónica.

Los resultados obtenidos se muestran en las gráficas 3 y 4.

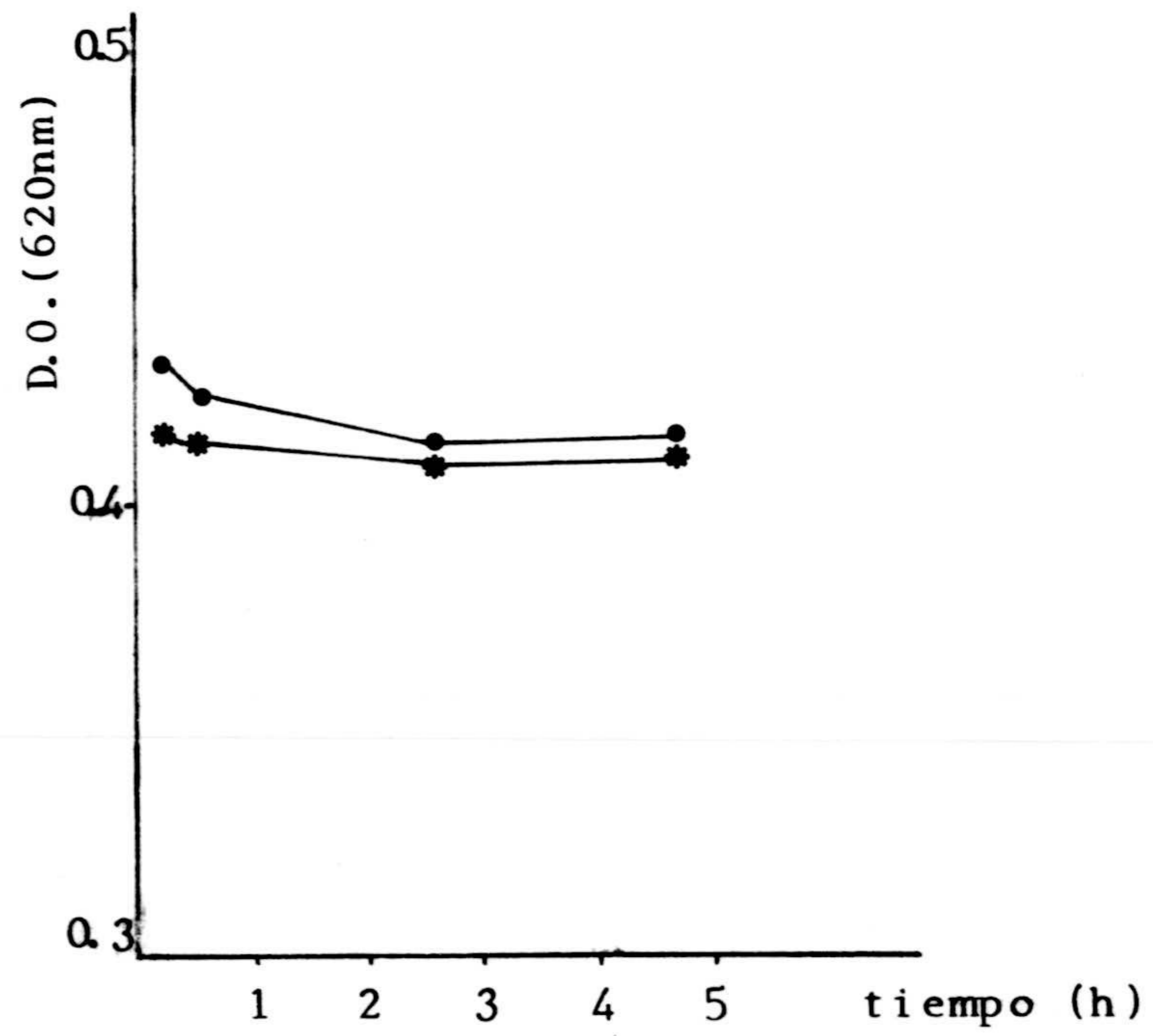
## 6. ESTUDIOS DE ESTABILIZACION DE LOS SISTEMAS LEVADURA BACTERIA OBTENIDOS

Una vez determinado el efecto positivo de las soluciones de pH básico y alta molaridad de calcio sobre la viabilidad de los sistemas levadura-bacteria obtenidos, tanto en el momento de la inducción de la captación como en etapas posteriores, era necesario realizar el estudio en estas condiciones.

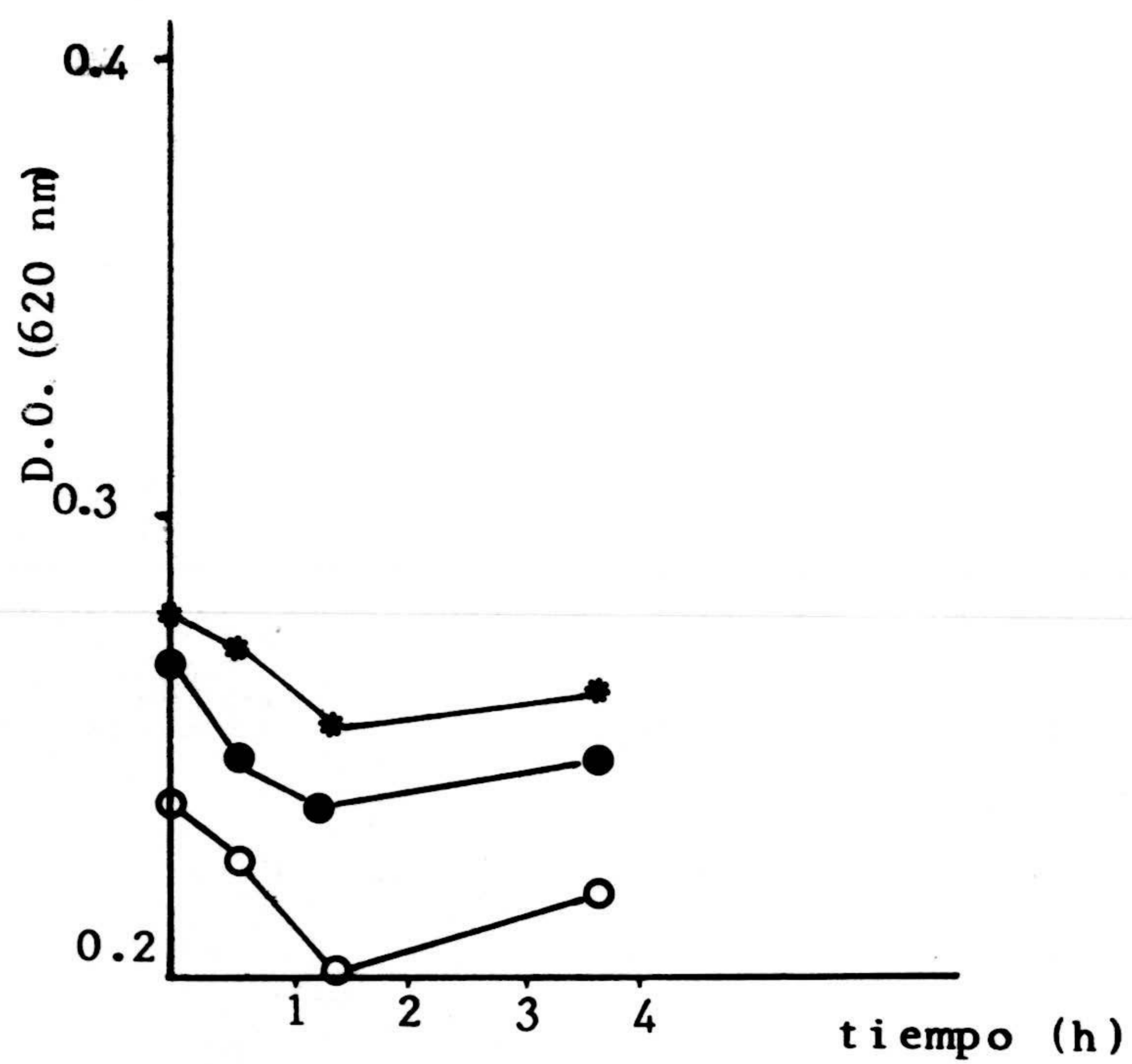
### 6.1. SEGUIMIENTO A MICROSCOPIA ELECTRONICA

#### 6.1.1. Experiencias preliminares

De acuerdo con todo lo expuesto en el apartado 5.1.1 de este mismo capítulo sobre las dificultades encontradas para visualizar a microscopía electrónica muestras procedentes de medios sólidos, y ante la necesidad de visualizar muestras correspondientes a tiempos de incubación superiores a 24 horas, se ensayaron polímeros tales como el carragenato y el alginato, habitualmente utilizados como soporte para cultivo de células inmobilizadas. Dichos polímeros presentan la ventaja de ser redisueltos tras su solidificación permitiendo la recuperación de las células tras los necesarios periodos de incubación. La utilización de estos polímeros permitiría, además, comparar los resultados con los obtenidos en medio líquido.



Gráfica 3.- Variación de la densidad óptica tras inducir la captación:  
( ●--● ) en Sorbitol 0.8M  
( \*--\* ) en Tampón TCS.



Gráfica 4.- Variación de la densidad óptica tras inducir la captación:

( \* -- \* ) en Sorbitol 0.8M.

( O -- O ) en OMM-2 carente de histidina.

( ● -- ● ) en OMM-2 adicionado de histidina.

En primer lugar era necesario comprobar si la reversión de los protoplastos a células normales ocurría con la misma frecuencia que utilizando agar. Para ello se inocularon, utilizando como soporte sólido de la sobrecapa tanto agar como carragenato y alginato, de acuerdo con la metodología expuesta en los apartados 2.3, 2.4.1 y 2.4.2. del capítulo de material y métodos.

Tras 3-4 días de incubación a 28°C las frecuencias de regeneración encontradas, tanto en alginato como en carragenato, fué la misma que la observada en el caso del agar.

A continuación era preciso comprobar la capacidad de redisolución de ambos polímeros. En el caso del carragenato se extrajo la sobrecapa y se depositó en un matraz con 150 ml de solución salina, incubando en agitación a 37°C durante 30 minutos-1hora; sin embargo la redisolución no fué completa, siendo preciso elevar la temperatura hasta 65°C para conseguirla.

En el caso del alginato, la redisolución se llevó a cabo incubando la sobrecapa en una solución de citrato sódico al 1% a T<sup>a</sup> ambiente. Agitando periódicamente se obtuvo una redisolución casi completa del polímero; a continuación se recogió el sedimento por centrifugación, y se volvió a lavar con la solución de citrato sódico repitiendo de nuevo la centrifugación, con lo que se obtuvo un sedimento de células en el que no se aprecian restos del polímero.

A la vista de los resultados se optó por utilizar el alginato como matriz sólida que permite recuperar las células para su posterior fijación en suspensión.

## 6.2.OBSERVACIONES A MICROSCOPIA ELECTRONICA

De acuerdo con los resultados obtenidos hasta el momento era patente el efecto degenerativo que sobre los protoplastos de levadura produce la internalización de las células de *Escherichia coli*, así como el efecto positivo de las soluciones de elevado pH y alta molaridad de calcio, observando incluso que tras dos horas de incubación en tampón TCS, en una gran parte de los protoplastos que han internalizado la bacteria, ésta se encuentra alojada en una vesícula cuya membrana se ciñe a la pared bacteriana, (situación semejante a la encontrada en los únicos protoplastos visualizados que contenían al procarionota que habían eludido los procesos degenerativo tras 3 horas de incubación en medios nutritivos), era necesario estudiar la estabilidad de los sistemas modificando la pauta seguida hasta el momento en los siguientes puntos:

-Eliminación de la etapa de resuspensión final de los protoplastos en sorbitol 0.8M tras el tratamiento con PEG.

-Introducción de una etapa de incubación a 28°C en tampón TCS.

-Incremento de la concentración del estabilizador osmótico (sorbitol) a 1M en los medios de cultivo e inclusión en la composición de los mismos de CaCl<sub>2</sub> 50mM.

Para ello, tras la captación (realizada nuevamente con las estirpes 3.2 de *Saccharomyces cerevisiae* y JC5466/pRD1 de *Escherichia coli*) y en las nuevas condiciones, se inocularon alicuotas de los mismos en medio



OMM-2 modificado, como ha sido descrito, tanto líquido como sólido, siendo en este caso el soporte sólido de la sobrecapa alginato al 2%. Se inocularon tanto en medios carentes de histidina como adicionados de la misma.

Tras 30 minutos, 2, 5 y 21 horas de incubación se procesaron muestras procedentes de medio líquido para su visualización.

En el caso de utilizar medio sólido, las muestras se tomaron tras 4 y 21 horas y 6 días de incubación. Tras ser recuperadas del alginato y ser lavadas y fijadas de la forma habitual, se incluyó una etapa de incubación con una solución acuosa de enzimas digestivos de *Helix pomatia* al 4% durante 3 horas para debilitar, en la medida de lo posible, la pared celular que se hubiera formado, facilitando de este modo una correcta postfijación con  $OsO_4$ .

Por otra parte, como controles se tomaron alícuotas de la suspensión en TCS, tras la captación, así como tras 2, 4 y 21 horas de incubación a 28°C en el mismo tampón.

La visualización de las muestras puso de manifiesto:

-En las tomadas a partir del último lavado en tampón TCS se observó, al igual que en las experiencias anteriores, tanto un elevado número de protoplastos que han internalizado a la bacteria y en los que esta se encuentra encerrada en una pequeña vesícula, como un pequeño porcentaje de protoplastos degenerados.

-En las muestras tomadas tras 2 horas de incubación a 28°C en el mismo tampón, y antes de ser inoculadas en las distintas modalidades de medio, se detectaron protoplastos en los que se observan distintos grados de degeneración, en mayor proporción que en el estadio anterior, pero sigue siendo mayoritario el número de protoplastos que contienen a la bacteria totalmente incluida en su citoplasma rodeada de una membrana propia del eucariota que se ciñe a la pared celular bacteriana; situaciones que ya fueron descritas en el apartado 5.1.2 de este mismo capítulo.

A los 30 minutos se observan células degeneradas con una frecuencia muy inferior a la detectada en las muestras correspondientes a iguales tiempos, incubadas en medio OMM-2 carentes de  $Ca^{2+}$  y Sorbitol 0.8M como estabilizador osmótico.

Lo más frecuente es encontrar protoplastos que contienen a la bacteria prácticamente incrustada en su citoplasma, presentando distintos grados de cohesión entre la membrana de la vesícula que la rodea y la membrana externa de la pared celular bacteriana, llegando a extremos en los cuales es imposible distinguirlos. Hay incluso células bacterianas que parecen estar incluidas en el citoplasma de la levadura sin envoltura propia del hospedador, Fig.24.

Así mismo se observan vesículas que se unen por fusión con la que contiene a la bacteria y que vierten su contenido a la misma. Fig. 27 a y b.

Tras 2.30 horas de incubación en el mismo medio (4.30 horas tras la captación), se observan protoplastos

con signos evidentes de crecimiento, en los que el procariota se aloja en una vesícula membranosa que emite prolongaciones que se adentran en el citoplasma. Destaca frecuentemente la presencia de mitocondrias con una localización próxima a la del procariota (Fig. 26 b, c y d). En otros casos, la bacteria sigue incluida en el citoplasma de la levadura sin estar rodeada por membrana alguna. Fig. 25 b.

Así mismo se observan con una bajísima frecuencia procesos de digestión de la bacteria. Fig. 27 c y d.

Tras 5 horas de incubación, tanto en muestras procedentes de medios sólidos como líquidos, se observan los mismos fenómenos. En unos casos se encuentra a la bacteria alojada en una vesícula grande e irregular, en la cual aparecen islotes de citoplasma de la levadura (Fig 26 e y f), ó bien está alojada en el cuerpo celular careciendo de una membrana que la aisle (Fig 25 d y e). En ambos casos se han detectado signos de división en el procariota. Figs. 25 c y 26 g.

Así mismo se observan, en ocasiones, bacterias alojadas en repliegues membranosos de localización externa. Fig. 26 h.

En las muestras correspondientes a 21 horas de incubación, provenientes tanto de medio líquido como de alginato, se observaron protoplastos que contienen un elevado número de bacterias que muestran signos patentes de división, y que ocupan gran parte del cuerpo celular; se observa así mismo una reducción en el tamaño de la célula bacteriana. Estas no se alojan en vesículas delimitadas por membranas. En muchos casos, protoplastos con estas

características presentan signos de degeneración. Fig. 25 f-o.

Es frecuente observar células bacterianas con una localización extracelular alojadas en repliegues membranosos. Fig. 26 i.

Hay que señalar que en todas la etapas aparecen protoplastos degenerados, siendo mayor la frecuencia con la que estos se presentan a medida que incrementan los tiempos de incubación, pero que siempre fueron inferiores a las detectadas en experiencias anteriormente descritas.

-En el caso de protoplastos incubados tras la captación en medios adicionados de histidina aparecen microfotografías con las mismas situaciones (Figs. 28 y 29). Si bien cabe señalar que los procesos de degeneración son mas frecuentes y más rápidos, haciéndose en cada etapa más dificultosa la búsqueda de protoplastos que contengan bacterias en su interior, correspondiendo en muchos casos las microfotografías mostradas a los únicos hallados en estas situaciones.

-En el caso de protoplastos incubados durante 6 días, tanto en medios carentes como adicionados del aminoácido histidina, no se detectó ninguna célula conteniendo a la bacteria en su interior, hallando en las muestras correspondientes a medios carentes del aminoácido un gran número de protoplastos degenerados.

-Por otra parte, en las muestras control correspondientes a periodos de incubación de 4.30 y 23 horas en tampón TCS, se observa para el primer caso un

menor número de protoplastos que contienen a la bacteria totalmente rodeada de una membrana de la levadura, y un aumento de aquellos, en los que se observan un gran número de vesículas y un retículo endoplasmático y complejo de Golgi patentes, siempre frente a las muestras incubadas durante dos horas en el mismo tampón. El número de protoplastos degenerados con respecto a las muestras correspondientes a iguales tiempos de incubación en medios nutritivos es siempre menor (Fig.30). Por otra lado, se observaron con cierta frecuencia protoplastos que contenían en su citoplasma estructuras que por su aspecto son muy semejantes a las bacterias, pero carecen de pared celular y presentan una electrodensidad inferior a la habitualmente mostrada por las mismas.

En las muestras correspondientes a 23 horas de incubación en el mismo tampón, es menor el número de protoplastos con células bacterianas visualizados, siendo más marcados los fenómenos descritos para 4.30 horas de incubación, aunque sin embargo no se observaron las estructuras carentes de pared celular descritas anteriormente. Fig.31.

### 6.3. CRECIMIENTO EN MEDIOS MINIMOS

A la vista de las observaciones realizadas a microscopía electrónica, descritas en el apartado anterior, que ponen de manifiesto una mayor estabilidad del sistema levadura-bacteria en las nuevas condiciones ensayadas, era conveniente determinar el efecto de las mismas sobre la frecuencia de regeneración tras el tratamiento, tanto en medios completos como carentes de uno de los marcadores auxotróficos de la levadura.

Estas experiencias fueron realizadas igualmente con las estirpes 3.2 de *Saccharomyces cerevisiae* y JC5466/pRD1 de *Escherichia coli*, en las que tras periodos de 0 y 2 horas de incubación en tampón TCS, se inocularon en medio completo de regeneración (OCM), y en dos tipos de OMM-2 modificado dependiendo del marcador auxotrófico del que carezca, bien histidina ó uracilo.

Así mismo y como controles, se inocularon en los mismos medios protoplastos tratados con PEG en ausencia de la bacteria, al igual que en las experiencias descritas en el apartado 4.1 de este mismo capítulo.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

1.- En medios completos de regeneración (OCM):

Se observó la aparición de crecimiento tras 3-4 días de incubación, comprobándose que en el caso de los protoplastos en los que no se ha inducido la captación no hay diferencias entre los distintos tiempos de incubación en TCS.

Por otra parte, en el caso de protoplastos en los que se ha inducido la captación, los valores de regeneración encontrados son inferiores a los obtenidos para el caso anterior, apareciendo además diferencias significativas entre las distintas variantes inoculadas, en función del tiempo de incubación en TCS.

Los resultados se muestran en la tabla I.

Tabla I.- Efecto de la incubación en tampón TCS tras el tratamiento con PEG. Crecimiento en medio completo (OCM)

T <sub>e</sub> de incubación	CONTROL		CAPTACION		
	n° ufc/ml	%-1	n° ufc/ml	%-1	%-2
0h	4.43x10 <sup>6</sup>	36%	1.43x10 <sup>6</sup>	11%	32%
2h	4 x 10 <sup>6</sup>	32%	2.43x10 <sup>6</sup>	19%	60%

ufc: Unidades formadoras de colonias.

%-1: n° de ufc tras el tratamiento con PEG/n° de ufc antes del tratamiento.

%-2: n° de ufc aparecidas en el control/n° ufc aparecidas tras la captación.

2.-En medios carentes de uno de los marcadores auxotróficos.

\*En ausencia de histidina.-

Tras 14 días de incubación apareció crecimiento en ambos casos, si bien en estas condiciones se apreciaron diferencias en cuanto al número de colonias aparecidas, siendo aún mayor en el caso de los protoplastos en los que se ha inducido la captación, que era aun superior en el caso de incubar durante dos horas en TCS previamente a la inoculación. Por el contrario en el caso de protoplastos tratados con PEG en ausencia de la bacteria se encontraron valores inferiores a los encontrados inoculando directamente tras el tratamiento.

Los resultados se muestran en la tabla II.

\*En ausencia de uracilo.-

No se detectó ningún crecimiento tras 20 días de incubación a 28 °C.

#### 6.4. AISLAMIENTO Y ESTUDIO A MICROSCOPIA ELECTRONICA DE COLONIAS CRECIDAS EN MEDIOS CARENTES DE HISTIDINA

De los medios carentes de histidina, inoculados tras dos horas de incubación en tampón TCS, y a la vista de los resultados obtenidos, se aislaron 25 colonias. Suspensiones de las mismas fueron observadas a microscopía óptica, apreciando en tres de ellas rasgos morfológicos diferenciales, dada la aparición de aspecto miceliar que era muy acentuado en una de ellas.



Tabla II.- Efecto de la incubación en tampón TCS tras el tratamiento con PEG. Crecimiento en medios carentes de histidina.

---

	CONTROL	CAPTACION
	-----	-----
Tº de incubación	nº de ufc/ml	nº de ufc/ml
-----	-----	-----
0h	8.64x10 <sup>2</sup>	1.14x10 <sup>3</sup>
2h	7.56x10 <sup>2</sup>	1.23x10 <sup>3</sup>

---

ufc: Unidades formadoras de colonia

Así mismo se observó la morfología de otras 25 colonias crecidas en iguales condiciones pero correspondientes a tratamientos con PEG en ausencia de la bacteria y en ninguna de ellas pudieron detectarse estas características morfológicas.

Las colonias seleccionadas por su morfología fueron aisladas y cultivadas de nuevo en medio MM-2 líquido adicionado igualmente de  $\text{CaCl}_2$  60mM y carente de histidina. Tras 48 horas de incubación en agitación a 28°C se observó un crecimiento notable de la cepa que presentaba rasgos miceliares más acentuados, mientras que en las otras dos el crecimiento fué menor.

Tanto de la cepa que presentaba rasgos miceliares muy marcados como de una de las otras dos se tomaron muestras procedentes de la colonia original, y tras el subcultivo, fueron procesadas alicuotas para su visualización a microscopía electrónica, introduciendo igualmente tras la fijación tratamientos con enzima del jugo digestivo de *Helix pomatia* en iguales condiciones a las ya descritas en el apartado 6.2 de este mismo capítulo. Los resultados de muestran en las Fig. 32 y 33.

En la primera las microfotografías corresponden a las muestras procedentes de las colonias originales, mostrando en a y b el aspecto de la colonia cuyas células presentan rasgos miceliares más marcados; c y d corresponden a la otra colonia.

La figura 33 corresponde a imágenes obtenidas tras el subcultivo de la colonia de aspecto micelilar, siendo imposible la visualización de muestras pertenecientes al otro clon, ya que el pequeño crecimiento

del mismo impidió la obtención de un sedimento procesable para MET.

## 7. EXPERIENCIAS CON *Aspergillus nidulans*

Simultáneamente a los estudios realizados en el sistema levadura-bacteria, se realizaron experiencias utilizando como posible hospedador, protoplastos de *Aspergillus nidulans*. Se ha incidido únicamente en aquellos aspectos que presentan mayor importancia en el sistema levadura-bacteria, con el fin de comparar los resultados obtenidos en ambos casos. Se aplicó siempre la metodología previamente puesta a punto para el caso de *Saccharomyces cerevisiae*.

Todas las experiencias descritas en este apartado han sido realizadas con la estirpe 1056 de *Aspergillus nidulans* y JC5466/pRD1 de *Escherichia coli*.

### 7.1. CONDICIONES DE CAPTACION

Dado que los protoplastos de *A. nidulans* presentan un tamaño 2 o 3 veces superior al mostrado por los de *S. cerevisiae*, se realizaron experiencias con el fin de establecer una posible relación entre el tamaño de los protoplastos y la concentración de PEG necesaria para obtener un óptimo de captación.

Con esta finalidad se ensayaron concentraciones, al igual que en el caso de levaduras, del 15 y 30% de PEG; en experiencias paralelas, aplicando la metodología determinada como óptima en las experiencias llevadas a cabo con *S. cerevisiae*.

Tras inducir la captación se tomaron muestras procedentes de los lavados en tampón TCC, que fueron

procesadas para su visualización a microscopía electrónica. La observación de las mismas puso de manifiesto la máxima captación tiene lugar para concentraciones del 15% de PEG, si bien se observan con cierta frecuencia protoplastos que han captado a la bacteria para concentraciones del 30%, a diferencia de lo encontrado para *S. cerevisiae*.

Hay que señalar así mismo, que el número de protoplastos degenerados es muy superior al encontrado en muestras correspondientes a la misma etapa de *S. cerevisiae*.

## 7.2. CRECIMIENTO EN MEDIOS COMPLETOS Y MINIMOS

Al igual que en el caso del sistema levadura-bacteria, se ensayó el posible establecimiento de relaciones nutricionales entre la estirpe 1056 de *A. nidulans* y JC5466/pRD1 de *Escherichia coli*. Para ello, tras inducir la captación y una vez resuspendidos los protoplastos en KCl 0.7M, se inocularon alicuotas de los mismo según la metodología descrita en el apartado 7 del capítulo de material y métodos. Los inoculos se realizaron tanto en medios completos (OCM) al objeto de determinar la viabilidad de los protoplastos de *A. nidulans* tras el tratamiento, como en medios mínimos (OMM-2) suplementados carentes de adenina y triptófano, requerimientos nutricionales que presentan las cepas 1056 de *A. nidulans* y JC5466/pRD1 de *E. coli* respectivamente.

Al igual que en el caso del sistema formado por *S. cerevisiae* 3.2 y JC5466/pRD1, se realizaron controles paralelos inoculando en iguales condiciones protoplastos tratados con PEG en ausencia de la bacteria.

Tras 48 horas de incubación a 37°C se observó crecimiento en medios completos, encontrando que en el caso de los protoplastos control, los valores de regeneración eran ligeramente inferiores a los habituales en los procesos de fusión; en torno a un 90%, frente al control, en el caso de inducir la captación con PEG disuelto en tampón TC. Estos resultados confirman los obtenidos en el sistema levadura-bacteria.

En medios carentes de adenina, tras 4 días de incubación se detectó, mediante la observación a microscopía óptica, la presencia de un pequeño crecimiento, tanto en las placas correspondientes a los protoplastos tratados con PEG en ausencia de la bacteria, como en los que se ha inducido la captación, si bien tras 7-10 días de incubación, en este último caso aparecieron microcolonias con una bajísima frecuencia. Un nuevo examen a microscopía óptica reveló que correspondían a una condensación laxa de hifas, de aspecto algodonoso, que tras períodos de incubación superiores (incluso 20 días), no alcanzaban mayor desarrollo.

### 7.3. VIABILIDAD Y ESTABILIZACION

#### 7.3.1. Estudios a microscopía electrónica

A la vista de los resultados obtenidos con *Saccharomyces cerevisiae* que apuntaban hacia un efecto positivo de la incubación en tampones de elevada concentración de iones calcio y pH alcalino, se optó por comprobar su efecto en el sistema hongo-bacteria.

Para ello, se incluyeron períodos de incubación, tras la captación en tampón TCC a 37°C en este caso,

previos al inóculo en medio mínimo (OMM-2) líquido, tanto carentes como adicionado de adenina, y siempre suplementado con  $\text{Ca}^{2+}$  50 mM. La concentración de KCl se llevó hasta 0.8M.

*Aspergillus nidulans* presenta la capacidad de regenerarse en medio líquido, lo que facilita la toma de muestras para su visualización a microscopía electrónica.

En estas condiciones se tomaron muestras correspondientes a tiempos de 30 minutos, 2, 5 y 21 horas de incubación.

Por otra parte y como controles se tomaron alícuotas de la suspensión en TCC, tras la captación, así como tras 2 horas de incubación a 37°C en el mismo tampón.

La visualización de las muestras puso de manifiesto que:

-En las muestras tomadas a partir del último lavado en TCC se observó un elevado número de protoplastos que han internalizado a la bacteria (Fig. 34 a, b, c y d), igualmente se detectaron protoplastos degenerados con una frecuencia muy superior a la encontrada para el sistema levadura-bacteria.

-En muestras tomadas tras 2 horas de incubación en iguales condiciones, aumentó el porcentaje de células degeneradas en detrimento de aquellas que conteniendo a la bacteria en su interior permanecían intactas. Fig. 34 e.

-En muestras correspondientes tanto a medios adicionados como carentes de adenina, ya a los 30 minutos de incubación fué imposible hallar algún protoplasto no degenerado siendo la imagen típica la que se muestra en la Fig. 34 e.

### 7.3.2. Crecimiento en medios completos

A pesar de la observaciones realizadas a microscopía electrónica, descritas en el apartado anterior, en las que se pone de manifiesto el insuficiente grado de estabilidad del sistema hongo-bacteria, se ensayó, al igual que en el de levadura-bacteria, el efecto de las nuevas condiciones sobre la frecuencia de regeneración tras el tratamiento tanto en medios completos como carentes de adenina.

En primer lugar se realizaron experiencias inoculando, de un lado alicuotas de protoplastos resuspendidos en KCl 0.7M en medio completo (OCM) no modificado (carente de  $Ca^{2+}$  y con KCl 0.7M) y de otro alicuotas de protoplastos que habian sido sometidos a un período de incubación de 2 horas en tampón TCC, en medio completo convenientemente modificado (adicionado de  $CaCl_2$  y KCl 0.8M).

Tras 48 horas de incubación se detectó la aparición de crecimiento, observando un ligero incremento del porcentaje de regeneración obtenido tras las 2 horas de incubación en TCC. Los resultados se muestran en la tabla III.

Posteriormente se realizaron experiencias con la finalidad de dilucidar la eficacia, en este caso, de las



Tabla III.- Efecto de la incubación en tampón TCC tras el tratamiento con PEG. Crecimiento en medio completo.

Solución de resuspensión	T° de incubación en TCC	n° ufc/ml	%
KCl 0.7M	0h	$6.6 \times 10^3$	0.079%
Tampón TCC	2h	$9.0 \times 10^3$	0.107%

ufc: unidades formadoras de colonias

%; n° de colonias aparecidas tras el tratamiento con PEG/  
n° colonias antes del tratamiento.

.pa

incubaciones en TCC. Para ello y tras la captación se inocularon en medios completos de regeneración (OCM) convenientemente modificados, alicuotas de las suspensiones en TCC previa y posteriormente al período de 2 horas de incubación.

Tras 48, horas el recuento de las colonias aparecidas arrojó iguales resultados en ambos casos.

### 7.3.3. Crecimiento en medios mínimos

De forma paralela, en ambas experiencias se inocularon alicuotas en medios carentes de adenina. Tras largos periodos de incubación 7-14 días, no se encontraron diferencias entre las distintas modalidades, observandose de nuevo la aparición de "colonias" atípicas del hongo, con una bajísima frecuencia y con las mismas características a descritas en el apartado 7.2 de este mismo capítulo.

## 7.4. ESTUDIO A MICROSCOPIA ELECTRONICA DE LAS COLONIAS APARECIDAS EN MEDIOS CARENTES DE ADENINA

Dado que de una parte era imposible recuperar las microcolonias de *Aspergillus nidulans*, de sobrecapas de alginato, en cantidad suficiente como para obtener un volumen de sedimento que permitiera el procesado para su visualización a microscopía electrónica, y de otra el hecho de que *A. nidulans* es capaz de regenerar en medio líquido, se inocularon alicuotas de suspensiones tras la inducción de la captación y posterior etapa de incubación en TCC, en medios carentes de adenina. Tras 4 días de incubación, se observó la aparición de pequeñas condensaciones de hifas, las cuales fueron fijadas y tratadas para su visualización, incluyendo, al igual que en el caso de

levaduras una etapa de digestión enzimática de la pared tras la fijación con aldehídos.

La observación de estas muestras no reveló, en ningún caso, la aparición de elementos citoplasmáticos inusuales en este microorganismo.

DISCUSSION

Los sistemas endosimbióticos han sido habitualmente estudiados desde la observación de los fenómenos y adaptaciones que aparecen en las diferentes endosimbiosis existentes en la naturaleza reconstruyendo, a partir de estas observaciones, modelos evolutivos en los que se establecen las distintas etapas del proceso. La imposibilidad de realizar estudios al respecto desde una óptica no retrospectiva, viene dada precisamente por el carácter evolutivo de estas asociaciones.

Como se mencionó en la introducción del presente trabajo, el objeto prioritario del mismo no es el establecimiento de un sistema endosimbiótico, sino el estudio de los sucesos que tienen lugar tras inducir artificialmente la entrada de un organismo procariota en un eucariota, intentando por tanto, reproducir de forma experimental, las interacciones que tendrían lugar en las primeras etapas de este tipo de relaciones que finalmente conducirán o no al establecimiento de una endoasociación.

Así pues, las técnicas de fusión de protoplastos brindan la posibilidad de reproducir fenómenos, que con una gran probabilidad han tenido lugar en algún momento del proceso evolutivo y que desembocaron sólo en algunos casos, en el establecimiento de una relación endosimbiótica.

En la bibliografía existente sobre el tema, recogida en la introducción, puede comprobarse que todos los trabajos realizados en este terreno van dirigidos a la obtención de una simbiosis artificial estable, en la que directamente se adquieran nuevas capacidades por parte del hospedador (principalmente el carácter fijador de nitrógeno). En todos ellos se obvia el estudio de los estadios intermedios que van desde el momento de la entrada hasta la obtención de un sistema funcional.

A diferencia de estos autores el presente trabajo se enfoca principalmente hacia el estudio de las etapas intermedias. El conocimiento de las mismas permitirá decidir sobre la posibilidad o no de inducir endoasociaciones de carácter simbiótico.

Bajo esta perspectiva se abordó el trabajo objeto de esta memoria.

Como hospedador se eligió *Saccharomyces cerevisiae*, por ser un eucariota de fácil manejo, rápido crecimiento y bien caracterizado, siendo posible además disponer de una gran variedad de cepas mutantes. Por otra parte, debido a la presencia de pared celular, no son habituales en él los procesos de fagocitosis, típicos de otros microorganismos, quedando por tanto excluido de la posibilidad de establecer relaciones endosimbióticas de forma natural, al menos por esta vía.

Todo ello unido a que, de una parte toda la metodología de obtención de los protoplastos está muy desarrollada en el caso de esta levadura, y de otra que autores como Yamada y Sakaguchi (1981) han descrito procesos de captación de bacterias por parte de *S. cerevisiae*, hacen idóneo a este microorganismo para llevar a cabo estas experiencias.

La conveniencia de ampliar estos estudios a otro eucariota con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos en *S. cerevisiae*, hizo que se eligiera para tal fin *Aspergillus nidulans*, hongo filamentoso de características semejantes a la levadura en cuanto a la facilidad en su manejo, variedad de cepas, presencia de pared celular y estar bien desarrollada la metodología de obtención de protoplastos.

Como huésped se eligió *Escherichia coli*, obviamente por ser el procariota y probablemente el organismo mejor conocido y caracterizado, y del que existe igualmente una gran variedad de cepas de las que disponer. Así mismo su carácter de bacteria Gram<sup>-</sup> la hace especialmente interesante dado que, de acuerdo con la Teoría endosimbiótica serial, los microorganismos

pertenecientes a este grupo son considerados como los ancestros de los orgánulos eucariotas (Cavalier-Smith & Lee, 1985).

Tanto para intentar forzar el establecimiento de relaciones nutricionales, como con el fin de evitar el crecimiento por separado de ambos participantes, se emplearon razas auxotróficas de los microorganismos; estableciéndose por tanto parejas en función de la complementación de marcadores.

Las auxotrofías mostradas por las estirpes utilizadas, se corresponden siempre con una detención del crecimiento en ausencia del requerimiento auxotrófico concreto, salvo en el caso de la estirpe 3.2 de *S. cerevisiae*, estirpe caracterizada como mutante de crecimiento lento, carente de fase logarítmica en ausencia de histidina.

El empleo de este tipo de mutantes, se consideró especialmente interesante ya que es posible mantener un cierto grado de crecimiento en ausencia del marcador, eliminando así la necesidad de establecer una complementación nutricional absoluta e impidiendo un rápido desarrollo del hospedador, que inevitablemente favorecería la independencia del mismo. Se trata pues de reproducir unas condiciones subóptimas en las que se podría armonizar en cierta medida el crecimiento de ambos participantes.

Una vez elegidos los microorganismos, la detección y seguimiento de las asociaciones podía realizarse de forma directa (visualización), o bien indirectamente. No obstante la utilización de métodos indirectos se descartó por las siguientes razones.



-Una detección mediante marcaje radioactivo de los cultivos bacterianos, previo a la captación (Yamada & Sakaguchi, 1981) no es idónea dada la imposibilidad de eliminar por completo la mayoría de las células bacterianas que no han sido internalizadas. Igualmente ocurriría si se tratase de detectar cualquier componente típicamente bacteriano.

-La detección de caracteres fenotípicos en el hospedador, propios del huésped (como la fijación de nitrógeno atmosférico), supone de entrada el establecimiento de relaciones funcionales, extremo este que sólo ha sido descrito por Giles y Whithead en 1976.

Por ello se decidió el empleo de técnicas de visualización como método fiable e inequívoco para detectar y seguir la evolución de los sistemas creados. Se eligieron 3 métodos con distinta finalidad.

-Tinción previa de la bacteria con DAPI, al objeto de cuantificar de forma rápida y fácil los procesos de captación.

-Tinción específica de la bacteria con anticuerpos mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta, a fin de determinar y cuantificar, en estadios más avanzados, la presencia o no de la bacteria en el interior del eucariota.

-Microscopía electrónica de transmisión (MET), aplicable en todo momento, para realizar estudios

ultraestructurales y verificar la validez y eficacia de los dos métodos anteriores. No obstante, esta técnica no permite una cuantificación de los resultados, presentando además inconvenientes derivados de los largos periodos de tiempo necesarios para la preparación y visualización de las muestras.

Previamente a su aplicación, esta metodología se puso a punto para nuestro material, etapa que no opuso serios inconvenientes en el caso de la tinción con DAPI ni con la inmunofluorescencia indirecta; hay que reseñar, sin embargo, las grandes dificultades encontradas para conseguir una buena calidad de preservación ultraestructural en levaduras.

Los problemas para conseguir una buena preservación ultraestructural en estos microorganismos, vienen dados por la extremada densidad citoplasmática que poseen, así como por la presencia de vacuolas, que al igual que en el caso de vegetales, dificulta la difusión de los fijadores. Es necesario usar fijadores mezcla de distintos aldehídos, a fin de combinar las características de elevada velocidad de penetración que presentan formaldehído y acroleína -debido a su bajo peso molecular-, con la elevada capacidad de preservación de acroleína y glutaraldehído. Los inconvenientes mencionados, se acentuaban por la presencia de pared celular y mejoraban con el incremento de los tiempos de fijación.

En las imágenes obtenidas tanto de células enteras como de protoplastos, el citoplasma aparece intensamente teñido, hecho que es aún más patente para el primer caso, dificultándose por ello el reconocimiento de

los distintos orgánulos citoplasmáticos, que en ocasiones recuerdan tinciones negativas (fig. 3f). Esta intensidad de tinción no mejora sensiblemente cuando se disminuyen la concentración y tiempo de tratamiento con el osmio, hecho que puede atribuirse, tanto a la gran densidad citoplasmática, más acusada en el caso de células con pared, como a que la presencia de la misma impida un correcto lavado del osmio. Puede tratarse también de un efecto combinado de ambos factores.

A fin de mejorar la correcta fijación de muestras correspondientes a células enteras se optó, durante el transcurso del trabajo, por incluir etapas de digestión de la pared celular, previas al tratamiento con osmio y posteriores a la fijación con aldehídos, de acuerdo con la metodología propuesta por Koop en 1975.

Todos los problemas descritos se refieren a células fijadas en suspensión. Para el caso de muestras incluídas en agar, nunca pudo obtenerse un grado de preservación satisfactorio. Teniendo que recurrir al uso de polímeros distintos del agar (alginato), como medio para poder recuperar protoplastos embebidos en medio sólido, dada la incapacidad mostrada por los protoplastos de *S. cerevisiae* para revertir a células con pared en medios líquidos.

Tanto la técnica de tinción supravital previa de la bacteria con DAPI, como la de inmunofluorescencia, ya habían sido puestas a punto sobre muestras de *S. cerevisiae* y *E. coli*, en las que no se había inducido la entrada, pero era preciso comprobarlas sobre protoplastos tras la captación. Estas experiencias se realizaron de forma paralela a los estudios de optimización del proceso de

entrada sobre alícuotas de muestras en las que se había detectado la presencia de bacterias internalizadas mediante MET.

Como se refleja en el capítulo de resultados, ambas técnicas se mostraron claramente insatisfactorias. La razón por la cual es imposible detectar fluorescencia en los protoplastos que han captado a la bacteria es desconocida, sin embargo cabe pensar que,

-En el caso de las tinciones bacterianas con DAPI: con PEG se forman agregados de bacterias y protoplastos de gran tamaño, en los que con toda probabilidad ocurre con mayor frecuencia la internalización, siendo imposible distinguir a estos niveles de resolución la posición relativa de los mismos (fig. 5f).

-En el caso de la inmunotinción: la imposibilidad de detectar bacterias mediante esta técnica puede ser atribuida bien a que los anticuerpos no sean capaces de penetrar en los protoplastos, a pesar de los tratamientos de permeabilización -causa improbable ya que ha sido descrita la detección de antígenos intracelulares en protoplastos de *S. cerevisiae*, por Haseck *et al* (1986) -o bien a que la tinción con Azul de Evans, utilizada para eliminar la autofluorescencia provoca un efecto pantalla que impide la visualización de la fluorescencia debida a la fluoresceína, a pesar de que esta técnica de contratinción ha sido empleada con éxito en células vegetales, Knox *et al* (1982).

La imposibilidad para aplicar estas técnicas impide, por tanto, la cuantificación de los resultados y la detección rápida de los individuos interesantes, quedando como única vía de detección, evaluación y seguimiento de estos procesos la MET, que sólo permite la realización de estudios cualitativos. El problema de la cuantificación se afronta en términos de determinar el fenómeno más frecuente en función de la repetitividad de las imágenes obtenidas.

La escasa frecuencia de captación detectada aplicando el método propuesto por Yamada y Sakaguchi (1981), se correspondía con una escasa formación de agregados. Esta falta de agregación puede ser atribuida a:

- Una baja concentración de PEG empleada (15%)

- Una baja probabilidad de formación de los agregados, dado que los tratamientos se efectuaban sobre suspensiones mezcla de los participantes.

Los resultados obtenidos en distintas experiencias en las que se ensayaron diferentes concentraciones de PEG y distintas proporciones protoplasto/bacteria -realizadas adicionando el polímero a sedimentos obtenidos tras centrifugar suspensiones mezcla de ambos participantes- ponen de manifiesto que la máxima captación tiene lugar para valores de concentración del 15%, confirmando por tanto la segunda hipótesis propuesta.

Las discrepancias encontradas entre nuestras experiencias y las realizadas por Yamada y Sakaguchi (1981), que señalan valores de captación del 100% en las condiciones determinadas por ellos como óptimas, pueden ser explicadas teniendo en cuenta que la cuantificación de la

entrada la realizan mediante técnicas de marcaje radioactivo, técnicas que por las razones ya expuestas en este mismo capítulo no son fiables.

Paradójicamente es imposible detectar protoplastos que contengan a la bacteria en su interior cuando se utilizan concentraciones superiores del agente fusogénico (30%). Este hecho puede interpretarse de acuerdo con las afirmaciones realizadas por Matsui *et al* (1982), que proponen que elevadas concentraciones de PEG provocan una extrema deshidratación que conlleva una gran disminución del volumen citoplasmático quedando una estrecha franja de citoplasma que rodea a una gran vacuola, franja cuyo diámetro es incluso menor al de la bacteria. Igualmente se pierde la plasticidad necesaria, también como consecuencia de la deshidratación, para permitir la formación de invaginaciones. Todo ello constituiría un impedimento físico para los procesos de internalización.

Esta hipótesis adquiere aún más relevancia a la vista de los resultados obtenidos con *Aspergillus nidulans*, que reflejan que si bien el máximo de captación tiene lugar para valores del 15% de PEG, para valores del 30% se detectan con elevada frecuencia, protoplastos que han internalizado a la bacteria. Se establece así una relación entre el tamaño, (y por tanto el volumen) de los protoplastos con la concentración de PEG utilizada.

La proporción óptima de levadura/bacteria encontrada es 1/100, si bien tanto para valores menores (1/10), como mayores (1/1000), también se detectan con una frecuencia considerable fenómenos de captación. No obstante el valor intermedio es el óptimo al permitir un grado adecuado de agregación entre bacterias y protoplastos.

Valores menores dificultan la puesta en contacto de ambos participantes favoreciendo los fenómenos de fusión entre los protoplastos, mientras que valores superiores provocarían un efecto antagónico al predominar situaciones de agregación bacteriana en torno a los protoplastos que impedirían la fusión entre ellos. Así mismo la presión ejercida en todas las direcciones dificultaría la posible vía endocitótica de captación.

En cuanto al mecanismo de rehidratación, los resultados obtenidos corroboran los descritos por Hasezawa *et al* (1982), que resaltan la conveniencia de eliminar el PEG por dilución paulatina con tampones básicos y con pH alcalino y elevada concentración de iones calcio. Se facilita así la progresión de las invaginaciones formadas como consecuencia del tratamiento con el polímero y se favorece la vía endocitótica de captación. Por el contrario la brusca rehidratación de los protoplastos puede provocar la eyección de las bacterias situadas en invaginaciones.

Las experiencias realizadas con el fin de determinar el mecanismo ultraestructural de la captación, confirman las vías de endocitosis y entrapamiento propuestas por Yamada y Sakaguchi (1981), reconociéndose igualmente las distintas etapas propuestas. No obstante estos autores no establecen la contribución específica de cada uno de los mecanismos, siendo por tanto interesante destacar, a la vista de las observaciones realizadas, que la vía mayoritaria de captación es la endocitótica. Esta sería favorecida igualmente en los agregados formados ya que al fomentar este estado la puesta en contacto de ambos participantes se promovería la formación de invaginaciones que evolucionarían hacia un proceso endocítico, en caso de no prosperar la fusión entre las membranas adyacentes;

fenómenos que por otra parte son menos frecuentes a las concentraciones de PEG determinadas como óptimas.

Así mismo las observaciones realizadas corroboran las propuestas formuladas para interpretar los datos obtenidos durante la optimización del proceso.

La pérdida de integridad de los protoplastos tras inducir la captación, y durante los posteriores lavados, que es constatada también por otros autores en otros sistemas (Meeks *et al*, 1978) y que se detecta tanto mediante MET como por recuento de células viables en medio OCM, así como por la disminución en la densidad óptica de suspensiones tanto en TCS como en Sorbitol 0.8M, puede atribuirse a fenómenos de lisis osmótica de los protoplastos, ya que si bien el PEG puede ser utilizado como estabilizador osmótico, concentraciones del 15% se consideran como el límite por debajo del cual no hay preservación frente a la lisis (Sbovoda & Piedra, 1983).

A favor de esta hipótesis estaría el hecho de que cuando se induce la captación con soluciones de PEG en tampon TC adicionado de  $\text{CaCl}_2$  60mM, la frecuencia de estos fenómenos es menor. Hecho que puede ser atribuido a una elevación de la osmolalidad promovida por la presencia de  $\text{CaCl}_2$ , disminuyendo por tanto los fenómenos de lisis.

Existen no obstante evidencias en contra de este supuesto:

-Esta lisis debería observarse ya durante la incubación con el polímero, extremo que nunca fué constatado mediante MET.



-Los valores de regeneración de los protoplastos obtenidos en tratamientos control en medio OCM (en ausencia de la bacteria) se corresponden con los niveles descritos como habituales en experiencias de fusión de protoplastos.

De ahí que se descarte la posibilidad de una lisis osmótica masiva de protoplastos debida a una baja concentración de PEG, indicando además que la pérdida de integridad se reduce selectivamente a aquellos protoplastos que han internalizado al procarionta.

No obstante, la pérdida de integridad, detectada con una frecuencia muy elevada tras la transferencia a soluciones de Sorbitol 0.8M desde tampón TCS (transferencia que supone una disminución en la osmolalidad del medio), puede ser atribuida a fenómenos osmóticos, toda vez que la captación de una bacteria supone una pérdida de membrana (alrededor de un 5%), que implica una reducción del volumen total que aloja el contenido citoplasmático, a la vez que un incremento de la concentración del mismo. Como consecuencia incrementaría la presión osmótica interna, siendo por tanto necesario el uso de medios de superior osmolalidad para evitar fenómenos de rotura por choque osmótico.

Sin embargo este probable incremento de la presión osmótica no puede considerarse como el único factor responsable de la disrupción de los protoplastos que han internalizado a la bacteria, ya que las observaciones realizadas a microscopía electrónica ponen de manifiesto que:

-La mayoría de los protoplastos que alojando a la bacteria se mantienen intactos, son de pequeño tamaño, a pesar de que en ellos la presencia de la bacteria provocaría un notable incremento de la presión interna.

-Las imágenes obtenidas no se corresponden con la imagen típica de una lisis, sino que las células mantienen una integridad estructural, donde no se detecta la pérdida de componentes intracelulares, y se mantienen intactas las estructuras membranosas, (fig 12 b y c, 14 c y d).

Por el contrario sí parece existir una relación entre la gran vacuolización que presentan los protoplastos y la pérdida de integridad de los mismos, ya que además de aparecer como fenómenos simultáneos, ambas situaciones son inhibidas, o al menos tienen lugar con menor frecuencia, en presencia de TCS.

Es conocido que en levaduras y hongos tienen lugar procesos endocitóticos de forma natural, habiéndose descrito la capacidad de captar sustancias como amarillo lucifer,  $\alpha$ -amilasa y partículas como virus (Makarow, 1985 a; 1985b; Riezman *et al*, 1986a). Así mismo es conocida la íntima relación existente entre los sistemas membranosos (Golgi y Retículo endoplasmático) y las vías endo y exocíticas, así como entre ellas, y que es la vacuola la que asume el papel desempeñado por los lisosomas en células animales (Riezman *et al*, 1985; Riezman *et al*, 1986b).

Teniendo en cuenta estos hechos, los fenómenos de vesiculización y proliferación tanto del aparato de Golgi como del retículo endoplásmico, que aparecen durante los

lavados, apuntan realmente hacia el disparo de un proceso heterofágico, lógico tras una endocitosis.

La rapidez con la que se desencadenan estos procesos es normal teniendo en cuenta que el tiempo medio que tarda una proteína con actividad lítica en su tránsito a través del sistema membranoso hasta la vacuola es aproximadamente de 5 minutos (Dr. Schwenke, com. pers.), siendo por tanto imposible reconocer estadios intermedios salvo en el caso de que estos, se encuentren parcialmente inhibidos, inhibición que como se apuntó anteriormente es propiciada por el tampón TCS, hecho que se ha constatado experimentalmente.

La inhibición de los procesos heterofágicos puede ser interpretada teniendo en cuenta que todos los compartimentos celulares en los que se desarrollan las vías endo y exocitóticas presentan un pH extremadamente ácido, pH regulado por la presencia de una bomba de protones asociada a ATP, que ha sido también identificada en levaduras (Mellman *et al*, 1986). Así mismo se ha descrito, en células animales, que la adición de bases débiles al medio incrementan el pH vacuolar entre 1 y 2 unidades transcurridos 1 ó 2 minutos tras su adición. Este incremento de pH en los compartimentos lisosomales promueve:

-Inhibición de las hidrolasas ácidas lisosomales.

-Perturbación del tránsito endosomal.

-Inhibición de las vías endo y exocitóticas.

-Inhibición de de los procesos de fusión de vesículas intracelulares.

La consecuencia más patente de estas alteraciones es una extrema vacuolización del citoplasma.

En virtud de todo ello, podría interpretarse que el tampón TCS promueve una basificación de los compartimentos lisosomales y provoca los efectos descritos, teniendo en cuenta que:

-El carácter básico del tampón es proporcionado por una base débil (Tris-hidroxi-aminometano).

-Que la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  podría inhibir las bombas de protones asociadas a ATP, al igual que sucede con otros cationes divalentes como  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , reforzando así el efecto del pH alcalino.

De acuerdo con estas consideraciones puede proponerse que el TCS promueve una inhibición de los procesos de heterofagia por basificación de los compartimentos lisosomales.

A este respecto hay que recordar que la basificación de los compartimentos lisosomales con el fin de evitar procesos de fusión de lisosomas al fagosoma, inhibir la hidrolasas ácidas e impedir los procesos heterofágicos, es una estrategia empleada por parásitos intracelulares tales como *Salmonella* (Carrol et al, 1979), *Yersinia pestis*, (Straley et al, 1984) , *Leishmania* (Alexander & Vickerman, 1975) y *Coxiella burnetti* (Haskstadt et al, 1983).

Los fenómenos de pérdida de integridad y muerte, de los protoplastos, cuya aparición es inhibida en presencia del tampón TCS pueden estar igualmente relacionados con estos procesos heterofágicos. En efecto teniendo en cuenta que el proceso de digestión no puede llevarse a cabo con éxito por carecer la levadura del equipo enzimático capaz de atacar el mucopéptido de la pared celular bacteriana, en el protoplasto se daría una sobreproducción de contenido lisosómico que finalmente sería liberado a su propio citoplasma, siendo este atacado por los enzimas y desembocando por tanto, en un proceso autofágico. Y de hecho procesos de rotura de las membranas lisosomales han sido descritos ante la captación de material lesivo y ante la imposibilidad de reciclarlo, (Holzman y Novikov, (1986).

Todo ello conduciría a elaborar una hipótesis según la cual la captación de *E. coli* provocaría un efecto letal, de tipo autofágico ó autolítico, como consecuencia de la imposibilidad para digerir a la bacteria.

Esta hipótesis es corroborada por los resultados obtenidos:

-Así, cuando se induce la captación en ausencia de tampón TC, incrementan sensiblemente tanto la rapidez como la frecuencia con que aparecen protoplastos degenerados y muertos, siendo más difícil reconocer situaciones intermedias de proliferación de retículo endoplásmico, Golgi y vesiculización, dada la rapidez del proceso; encontrando durante los lavados con TCS bacterias alojadas en vesículas de gran tamaño cuyo crecimiento sólo puede atribuirse a la fusión de vesículas con contenido lisosomal.

-Por otra parte, cuando la captación es inducida en presencia de Tampón TC disminuye la frecuencia de aparición de células muertas, en favor, tanto de estadios de vesiculización, como de células con un aspecto normal en las que la bacteria se encuentra alojada en una vesícula que se le ciñe por completo.

-En ambos casos la posterior resuspensión en soluciones de Sorbitol 0.8M provoca un incremento en el número de protoplastos degenerados o muertos, hecho que se corresponde con la restitución de un ambiente ácido.

A la vista de estos resultados, puede considerarse una contradicción el hecho de que sea precisamente en aquellas situaciones en las que se inhiben los procesos de digestión, donde pueden reconocerse mejor los estadios de proliferación del sistema lisosomal a partir del retículo vía aparato de Golgi, contradicción aparente dada la rapidez ya comentada con la que se producen estos fenómenos y que impediría la visualización de estas situaciones salvo que estén relentizados o detenidos en cierta medida por la presencia de algún tipo de inhibidor.

De otra parte, el efecto estabilizador sobre los protoplastos que contienen a la bacteria promovido por el tampón TC, estaría además favorecido por la acción estabilizadora del ión  $Ca^{2+}$  sobre todas las membranas celulares (Madshus, 1988), que evitaría en cierta medida la rotura y liberación de los enzimas lisosómicos al citoplasma.

La evolución de aquellos protoplastos que conteniendo a la bacteria no presentaban signos evidentes

de degeneración en medios nutritivos tanto carentes como adicionados de histidina, se realizó mediante la visualización de muestras correspondientes a distintos tiempos de incubación.

Los resultados obtenidos corroboraron la hipótesis planteada, detectando fenómenos de degeneración masivos ya a los 15 minutos de incubación, que ponen de manifiesto su relación con el metabolismo de la levadura y que son tanto más rápidos cuanto más rápido es el metabolismo, como se deduce de la mayor frecuencia y velocidad con que aparecen en medios adicionados de histidina. Así mismo, se confirman por el descenso de densidad óptica detectado en presencia de histidina, más acentuado que en el caso de medios carentes del marcador.

Igualmente se confirmó el efecto estabilizador que promueven las condiciones de alcalinidad y la presencia de iones calcio, dada la elevada frecuencia con que se visualizan, tras dos horas de incubación en TCS, protoplastos que conteniendo a la bacteria no presentan signos de vacuolización, y en los que la bacteria se aloja en una vesícula totalmente ceñida a su cuerpo celular, siendo a veces imposible reconocer la membrana del hospedador y la membrana externa del huésped como estructuras distintas. Así mismo pueden observarse una gran variedad de situaciones intermedias, en las que incluso es posible reconocer lo que pueden considerarse como los primeros estadios de degeneración (fig. 22c) en los que aparecen zonas de citoplasma parcialmente degeneradas con una menor electrodensidad, semejante a la observada en protoplastos degenerados.

Esta situación es diferente a la encontrada para iguales tiempos de incubación en Sorbitol 0.8M, donde es prácticamente imposible detectar células íntegras conteniendo a la bacteria, predominando situaciones de degeneración. En los únicos protoplastos "vivos" encontrados (fig.23) no se detectan situaciones de vacuolización, encontrándose la bacteria alojada en una pequeña vacuola (a y b) ó bien aparece ya en la vacuola en la que pueden apreciarse signos de digestión, que probablemente puede llevarse a cabo por presentar las bacterias puntos de rotura en su mucopéptido. Aparecen, así mismo, estructuras identificadas como retículo endoplásmico comunicado con la vacuola.

La diferencia entre ambas situaciones es constatada igualmente mediante la pérdida de densidad óptica detectada, más marcada en el caso de las incubaciones en Sorbitol 0.8M.

En los únicos protoplastos encontrados, tras períodos de incubación en medios nutritivos que conteniendo a la bacteria mantienen su integridad, la bacteria se encuentra alojada en una vesícula ceñida a su pared celular. Esta situación es semejante a la observada tras dos horas de incubación en TCS, aunque se dá con mayor frecuencia en este último caso.

Estas observaciones recuerdan los mecanismos propuestos por Cavalier-Smith & Lee (1985), como modelos evolutivos para el establecimiento de relaciones endosimbióticas, según los cuales bien por pérdida accidental de la membrana que rodea al posible xenosoma o bien por la inactivación de los receptores de la misma, es posible evitar el disparo de los procesos heterofágicos de



digestión que acabarían indiscutiblemente con la posibilidad de establecer una relación simbiótica.

Sobre esta base cabe reflexionar que también en estos sistemas artificiales y con una frecuencia bajísima pueden reproducirse aquellos estadios primarios en los que accidentalmente alguna bacteria podría sobrevivir en el entorno citoplasmático, y a partir de aquí encontrar el punto de partida hacia una relación simbiótica estable.

Las observaciones realizadas en periodos posteriores (21 horas) no mostraron situaciones semejantes a las descritas para tiempos inferiores (3 horas). Sin embargo ello no significaría que éstas no tengan lugar, sino que dada la bajísima frecuencia con que aparecen y la limitación en el número de individuos que pueden ser observados mediante MET, su detección es muy difícil.

Dado que situaciones semejantes se producen con una considerable frecuencia tras 2 horas de incubación en TCS, se atisbó una posibilidad de éxito o cuando menos una vía para continuar el estudio.

Ciertamente al estar inhibidos los procesos heterofágicos se posibilitaría el desarrollo de otro tipo de interacciones entre ambos microorganismos. Así cabe pensar que el íntimo contacto existente entre la membrana de la vesícula y la membrana externa de la pared celular de la bacteria, puede llevar hacia una fusión total o parcial de ambas, que puede estar facilitada a su vez por la presencia de iones  $Ca^{2+}$ . Tanto dentro de la vesícula - captados junto con la bacteria-, como en el medio. La interacción entre ambas membranas puede provocar la alteración de las mismas y finalmente podría llevar a la

modificación ó pérdida de los receptores impidiéndose por tanto un reconocimiento que llevaría a desarrollar un proceso heterofágico una vez devueltos a un medio nutritivo.

Con esta perspectiva se abordaron nuevas experiencias en las que se suprimió la etapa de resuspensión final en soluciones de Sorbitol 0.8M, introduciendo una etapa de incubación de dos horas en TCS previa a la inoculación en medios nutritivos; estos fueron modificados en lo referente a la adición de iones  $Ca^{2+}$  y a la concentración del estabilizador osmótico a fin de reproducir las condiciones del tampón, manteniendo, no obstante, el pH habitual de los medios (ácido) ya que las levaduras no pueden crecer en condiciones alcalinas.

Los resultados obtenidos mediante visualización de muestras correspondientes a distintos tiempos de incubación, tanto en medio sólido como líquido, y a través de recuentos efectuados en medios completos, ponen de manifiesto que efectivamente se consigue un cierto grado de estabilización, si bien siguen siendo frecuentes procesos de muerte.

Las imágenes observadas permiten reconocer tres vías diferentes en la evolución del sistema:

A) Protoplastos que contienen a la bacteria en los que ésta no parece estar rodeada por una membrana propia del hospedador. Con el transcurso del tiempo comienzan a detectarse, signos de crecimiento tanto en la levadura como en la bacteria, observándose incluso procesos de división en el procariota, así como la presencia de mitocondrias con una posición cercana a *E.coli*. Tras 21 horas de incubación

se encuentran con relativa facilidad células de levadura completamente invadidas por la proliferación de la bacteria, que ocupa la mayor parte del citoplasma del eucariota, el cuál, probablemente morirá víctima de un proceso semejante a una simbiosis parasitaria. (fig.25). Cabe resaltar que la bacteria aparece modificada tanto en su tamaño como en el grosor de su pared.

B)Protoplastos en los que la bacteria aparece rodeada de una membrana propia del hospedador, que va emitiendo proyecciones formando a modo de un camino en el citoplasma, que finalmente conecta con la membrana plasmática, abriéndose la vesícula al exterior en un proceso semejante a la exocitosis, (fig.26).

C)Con muy baja frecuencia se detectan fenómenos de digestión de la bacteria , cuyos restos son finalmente expulsados vía exocitosis. Esta tercera vía sólo sería posible en el caso de estar alterada la pared celular de la bacteria, hecho que se confirma observando la presencia en la vesícula de una estructura semejante a una pared celular bacteriana, rota sólo por un punto, (fig. 27).

Estas tres vías se corresponden con las observaciones realizadas en protoplastos incubados en medios carentes de histidina. En medios adicionados del marcador se reconocen estos mismos procesos (fig. 27 y 28), si bien es imposible reconstruir todas las etapas dado que estas situaciones aparecen con menor frecuencia y mayor rapidez, siendo mayor el número de protoplastos degenerados.

De las tres situaciones encontradas, la A es la única que podría evolucionar, teóricamente, en sentido

favorable hacia el establecimiento de una relación simbiótica, aunque siempre a partir de etapas previas a la proliferación masiva del procariota (fig 25 f y g). El hecho de no encontrar tras seis días de incubación protoplastos que contengan a la bacteria no excluyen esta posibilidad, ya que a medida que incrementan los tiempos de incubación disminuye la frecuencia con que aparecen células de levadura que la contienen y aumenta el número de células degeneradas, disminuyéndo por tanto la probabilidad de ser detectadas, más aún, dadas la limitación en el número de individuos que pueden ser visualizados mediante MET.

La vía B puede ser intrepredada como un fenómeno de exocitosis sin digestión, ruta alternativa que ha sido descrita en levaduras (Riezman, 1985), según la cual materiales captados pueden ser expulsados vía exocitois, sin que se le unan lisosomas primarios. Esta expulsión es factible siempre que tenga lugar antes de la regeneración de la pared celular, en caso contrario la eyección no sería posible, y la bacteria quedaría alojada en el espacio periplásmico.

Las imágenes obtenidas de muestras control incubadas durante 4 y 21 horas en tampón TCS, en las que es posible observar situaciones semejantes a las encontradas tras 2 horas de incubación en iguales condiciones (pero con menor frecuencia) eliminan la sospecha de que la proliferación bacteriana pueda darse sin el concurso metabólico de la levadura. Ello hace presumir el establecimiento de un intercambio nutricional, al menos en la dirección levadura-bacteria.

No obstante el establecimiento de relaciones de complementación nutricional bidireccional, quedan

descartadas dada la ausencia de crecimiento detectadas en medios mínimos carentes de uracilo.

En medios carentes de histidina, se detecta un incremento significativo del número de colonias en las nuevas condiciones -incubación en TCS e inóculo en medios modificados- frente, a las iniciales, cuando los resultados se contemplan en relación a los obtenidos en experiencias control realizadas en ausencia de la bacteria. Estos indican una cierta estabilización.

La observación a microscopía óptica de las colonias aparecidas en estos medios, puso de manifiesto la presencia, en algunas de ellas, de células con aspecto miceliar más ó menos marcado según los casos, característica que no fué detectada en colonias procedentes de experiencias control. Dos de ellas fueron aisladas y recrecidas en medio carente de histidina, mostrando distinta capacidad de crecimiento. Muestras tanto de las colonias originales como de los subcultivos en medio líquido, fueron visualizadas mediante MET.

En las células procedentes de la colonia que presentaban aspecto miceliar más marcado, se observaron estructuras que pueden ser identificadas como bacterias, dado que pueden reconocerse en ellas una envuelta semejante a la pared celular, aunque con menor grosor y un centro menos electrodensó que correspondería al nucleóide, pero que en su conjunto presentan un tamaño inferior al de una célula bacteriana normal. En este sentido caben destacar las alteraciones en cuanto a la disminución en el grosor de la pared celular, que se han descrito en el caso de cianobacterias endosimbióticas (Reisser & Wiessner, 1984).

Estas "bacterias" se encuentran inmersas en el citoplasma, siendo imposible detectar la presencia de una membrana celular que las rodee, y los protoplastos que las contienen presentan además un contenido vacuolar muy denso, con abundante presencia de membranas y corpúsculos.

Las características mostradas por estos clones, apuntan hacia un origen situado en estadios intermedios de la vía A, (fig. 25 f y g) en los que se habría conseguido un cierto grado de armonización entre el crecimiento de la bacteria y de la levadura.

Por el contrario, en las microfotografías obtenidas a partir de muestras obtenidas de la colonia cuyas células presentan una morfología miceliar menos acusada, parece reconocerse, en algunas, una célula bacteriana alojada en una vesícula (fig, 32 a y b) y cuyo origen puede situarse en células que han evolucionado hacia la vía B y en las que no ha podido completarse el proceso exocitótico, ya que al encontrarse en un medio sólido han regenerado la pared antes de completarse el proceso.

No obstante deben continuarse los estudios que confirmen las últimas situaciones planteadas.

Las experiencias realizadas con *Aspergillus nidulans* corroboran los resultados obtenidos en levaduras en cuanto a la reproducción de los fenómenos de vacuolización y autodigestión que se presentan tras inducir la captación de *E. coli*. No obstante en lo que se refiere a las condiciones de estabilización determinadas como óptimas para el sistema levadura-bacteria, en esta ocasión, sólo provocan una ligerísima estabilización, mostrándose claramente ineficaces, hecho que puede ser atribuido a la

extrema agresividad mostrada por estos microorganismos. El crecimiento detectado en medios líquidos carentes de adenina puede deberse al aprovechamiento de pequeñas cantidades de esta base nitrogenada provenientes liberadas como consecuencia de la disrupción masiva de protoplastos.

La imposibilidad de recuperar una cantidad suficiente de células que permitiese su preparación para MET, a partir de las condensaciones laxas aparecidas en medios sólidos, (en los que la difusión de pequeñas cantidades de nutrientes es más difícil), impidió detectar la presencia o no de la bacteria en su interior.

La correcta interpretación y comprensión de los resultados obtenidos en el presente trabajo sólo es posible teniendo en cuenta que:

-Al igual que en el proceso evolutivo hay que asumir, como un hecho lógico, el fracaso de un elevado número de individuos que no pueden superar los sucesivos estadíos que llevarían al establecimiento de la endosimbiosis, hecho que se correspondería con la disminución progresiva en la frecuencia con que aparecen en cada etapa, células de levadura que mantienen al procariota en su interior.

-La estabilización del sistema en un sólo individuo y su mantenimiento, dependería exclusivamente de que bien al azar o bien favorecido por determinadas circunstancias, algunos individuos no reconozcan la presencia del "extraño" en su interior, pudiendo desarrollarse interacciones que darían origen al establecimiento

de relaciones incipientes. Posteriormente y sólo en algunos casos terminaría por acompañarse el desarrollo de ambos participantes hasta llegar a una verdadera y estable relación endosimbiótica. El éxito evolutivo de un sólo individuo se puede hacer extensivo, por tanto, a toda la población, estribando la dificultad del estudio experimental de estos sucesos en la imposibilidad de reconocer individualidades con el fin de determinar ó no el éxito de los ensayos realizados.



CONCLUSIONES

- 1.-Se ha conseguido la captación de células de *Escherichia coli* por protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae*. La internalización se realiza mayoritariamente por endocitosis.
- 2.-La captación se da en condiciones óptimas cuando se utilizan soluciones de polietilen-glicol al 15% en tampón Tris-HCl pH 8 con CaCl<sub>2</sub> 60 mM, una proporción levadura-bacteria de 1/100 y una rehidratación progresiva tras el tratamiento.
- 3.-La presencia de la bacteria en el interior de los protoplastos induce generalmente fenómenos de muerte y degeneración de los mismos por autodigestión como consecuencia del disparo de mecanismos heterofágicos, que sólo ocasionalmente conducen a la digestión del procarionta. Estos fenómenos son parcialmente inhibidos por la presencia del tampón mencionado.
- 4.-Sólo en los casos en los que la levadura no desarrolla procesos heterofágicos el sistema evoluciona hacia una situación temporalmente estable.
- 5.-La ausencia de una membrana propia del hospedador que aisle a la bacteria conduce hacia una proliferación intracelular de la misma, que en la mayoría de los casos lleva hacia una desaparición total del citoplasma de la célula hospedadora.
- 6.-En situaciones en las que la bacteria se aloja en una vesícula se desencadena un mecanismo de exocitosis con la consiguiente liberación de la misma.

7.-Con muy baja frecuencia puede conseguirse el establecimiento de una asociación equilibrada, que permanece estable incluso tras un subcultivo en medios en los que el crecimiento está parcialmente inhibido.

8.-Se ha conseguido, igualmente, la captación de *Escherichia coli* por protoplastos de *Aspergillus nidulans*, coincidiendo el óptimo de captación con el determinado para el sistema levadura-bacteria, si bien las condiciones de estabilización de la asociación allí determinadas, se muestran claramente ineficaces en este caso.

BIBLIOGRAFIA

- Ahkong QF, Howell JI, Lucy JA, Safwat F, Davey MR & Cocking E (1975) Fusion of hem erythrocytes with yeast protoplasts induced by polyethylene-glycol. *Nature*, 255: 66-67.
- Ahmadijan J & Paracer S (1986) *Symbiosis An introduction to biological associations*, University Press of New England, Hanover, pp 1-12.
- Ahn TI, & Jeon W (1979) Growth and electron microscopic studies on a experimentally established bacterial endosymbiosis in amoebae. *J Cell Physiol* 98:49-58.
- Ahn TI & Jeon KW (1983) Strain specific proteins of simbiot-containing *Amoeba proteus* detected by two dimensional gel electrophoresis. *J Protozool* 30: 713-715.
- Alexander J & Vieckerman (1975) Fusion of host cell secondary lisosomes with the parasitophorus vacuoles of *Leishmania*-infected macrophages. *J Protzool* 22: 502-508.
- Anné J & Peberdy JF (1975) Conditions for induced fusion of fungal protoplast in polyethylene-glycol solutions. *J Gen Microbiol* 92: 413-417.
- Bauer WD & Bluwawari (1980) The possible role of the lectins in legume/*Rhizobium* symbiosis and other plant microorganism interactions. In recent advances in biological nitrogen fixation. Subba Rao NS & Arnold E (eds). New delhi and London. pp 344-359.
- Becher D, Conrad B & Böttcher f (1982) Genetic transfer mediated by isolated nuclei in *Saccharomyces cerevisiae*.

Benitez T, Ramos s & García Acha j (1975) Protoplasts from *Trichoderma viride*. Arch Microbiol 103: 109-203.

Bovarnick MR & Scheneider L (1960) The role of adenosine triphosphate in hemolysis of sheep erythrocytes by typhus ricketsiae. J Bacteriol 80: 344-354.

Brigidi P, Matteuzzy D & Faba F (1988) Use of protoplast fusion to introduce methionine overproduction into *Saccharomyces cerevisiae*. Apl Microbiol Biotechnol 28: 268-271.

Bugoon AC & Bottino PJ (1976) Uptake of nitrogen fixing blue-green algae *Gleocapsa* into protoplasts of tobacco and maize. J Hered 67: 223-226.

Carrol MEW, Jackett PS, Aber VR & Lowrie DB (1979) Phagolysosome formation, cyclic adenosine 3'-5' monphosfate and the fate of *salmonella typhimurium* within mouse peritoneal macrophages. J Gen Microbiol. 110: 421-429.

Cocking Ec (1965) Ferritin and tobacco mosaic virus uptake, and nuclear cytoplasmic relationship in isolated tomato fruit protoplasts. Biochem J 95: 28-29.

Cocking Ec (1966) An electron microscopic study of the initial stages of infection of isolated tomato fruit protoplasts by tobacco mosaic virus. Planta 68; 206-214.

Cocking EC (1970) Virus uptake, cell wall regeneration, and virus multiplication in isolated plant protoplasts.

Intern Rev Cytol 28: 89-124.

Corliss JO (1985) Concept, definition, prevalence, and host interactions of xenosomes (cytoplasmic and nuclear endosymbionts). *J Protozool* 32: 373-376.

Davey MR & Cocking EC (1972) Uptake of bacteria by isolated higher plant protoplasts. *Nature* 239: 455-456.

Davey MR & Power JB (1975) Polyethylene glycol-induced uptake of microorganism into higher plant protoplasts: An ultrastructural study. *Plant Sci Letters* 5: 269-274.

Farahnak, F, Seki T, Dewey D, Ryu R & Ogrydziak D (1986) Construction of a lactose assimilating and high-ethanol producing yeast by protoplast fusion. *Appl Environ Microbiol* 51(2): 362-367.

Davis B (1985) Factors influencing protoplasts isolation. In *Fungal protoplasts applications in Biochemistry and Genetics*. Ferenczy L and Peberdy J (eds) Marcel Dekker inc, New York, pp 45-71.

Ferenczy L (1985a) Protoplasts fusion in yeast. In *Fungal protoplasts applications in Biochemistry and Genetics*. Ferenczy L and Peberdy J (eds) Marcel Dekker inc, New York, pp 45-71.

Ferenczy L (1985b) Transfer of cytoplasmic elements by protoplasts fusion, In *Fungal protoplasts applications in Biochemistry and Genetics*. Ferenczy L and Peberdy J (eds). Marcel Dekker inc, New York pp 307-321.

Ferenczy L, Kevei F & Szegedi M (1985) High frequency fusion

of fungal protoplasts. *Experientia* 31: 1028-1030.

Ferenczy L, Kevei F & Zsolt J (1974) Fusión of fungal protoplasts. *Nature* 248: 793-794.

Ferenczy L & Pesti M (1982) Transfer of isolated nuclei into protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Microbiol* 7: 157-160)

Ferenczy L, Zsolt J & Kevei F (1972a) Interespecific protoplast fusion and complementation in *Aspergilli*. *Experientia* 33: 184-185.

Ferenczy L, Zsolt J & Kevei (1972b) Forced heterocarions in auxotrophic *Geotrichum* strains by protoplasts fusion. In third international protoplasts symposium on yeast protoplasts. October 2-5, 1972, Salamanca, Spain. Abstracts pp 74.

Friis RR (1972) Interactions of L-cells and *Chlamydia psittaci* entry of the parasite and host responses to its developement. *J Bacteriol* 180: 706-721.

Fukui K, Sagara Y, Yoshida N & Matsuoka T (1969) Analytical studies on regeneration of protoplasts of *Geotrichum candidum* by quantitative thin-layer agar plating. *J Bacteriol* 98: 256-263.

Gamborg OL, Constabel F, Kao KN & Ohyama K (1975) Plant protoplasts in genetics modifications and production of intergeneric hybrids. In Modification of their information content of plant cells. Second John Innes Symposium. Markham R (eds) North Holland/ American Elsevier, pp 181-196.



- García Acha I, Lopez Belmonte F, & Villanueva JR (1966) Regeneration of mycelial protoplast of *Fusarium culmorum*. J Gen Microbiol 45: 515-523.
- Giles KL & Whitehead H (1976) Uptake and continued metabolic activity of *Azotobacter* within fungal protoplasts. Science 193: 1125-1126.
- Giles KL & Whitehead H (1977a) The localization of introduced *Azotobacter* cells within the mycelium of a modified mycorrhiza (*Rhizophogon*) capable of nitrogen fixation. Plant Sci Letters 10: 367-372.
- Giles KL & Whitehead H (1977b) Reassociation of a modified mycorrhiza with the host plant roots (*Pinus radiata*) and transfer of acetylene reduction activity. Plant and Soil 48: 143-152.
- Goren MB, Brok O & Schaeffer WB (1974) Lipids of putative relevance to virulence in *Mycobacterium tuberculosis*: correlation of virulence with elaboration of sulfatides strongly acid lipids. Infect Immun 9: 142-149.
- Görtz HD & Dieckmann J (1980) Life cycle and infectivity of *Holospora elegans* a micronucleus-specific symbiont of *Paramecium caudatum*. Ehrenberg Protistologica 16: 591-603.
- Guerra I, Martín I, González MT & Montoya (1986) Endocytic uptake of *Escherichia coli* by *Saccharomyces cerevisiae* sphaeroplasts: complementation of yeast nutritional requirements. Microb Lett 32: 113-118.

- Gunge N & Sakaguchi K (1979) Fusion of mitochondria with protoplast in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Gen Genet 170: 243-247.
- Halfmann HJ, Röcken W, Eunis CC & Zimmermann U (1982) Transfer of mitochondrial function into a cytoplasmic respiratory deficient of *Saccharomyces* yeast by electrofusion. Curr Genet 6: 25-28.
- Hamlyn PF & Ball C (1974) Recombination studies with *Cephalosporium acremonium*. In Genetics of industrial microorganism. Sebeak OK & Lasking AL (eds) Washington, American society for microbiology pp 185-191.
- Haschen RJ (1975) Proteases in specific cell types. In Lysosomes in biology and pathology vol4. Dingle JT & Dean RT (eds) North Holland Publishing Co Amsterdam pp 252-264.
- Hasezawa S, Nagata T & Syöno K (1981) Transformation of *Vicia rosea* protoplasts mediated by *Agrobacterium* spheroplasts. Mol Gen Genet 182: 206-210.
- Haseck J, Svobodová J & Streibrová E (1986) Immunofluorescence of the microtubular skeleton in growing and drug-treated yeast protoplasts. European J Cell Biol 41: 150-156.
- Haskstadt T & Williams JC (1981) Biochemical stratagem for obligate parasitism of eucaryotic cells by *Coxiella burnetti*. Proc Natl Acad Sci USA 78: 3240-3244.
- Hatch TP, Al-Hossany E & Silverman JA (1985) Adenine nucleotide and lysine transport in *Chlamydia psittaci*. J

Bacteriol 150: 662-670.

Himen A (1985) Some aspects of yeast transformation. In fungal protoplasts applications in biochemistry and genetics. Peberdy JF & Ferenczy L (eds). Marcel Dekker inc, New York pp 323-335.

Holtzman E, Novikoff AB (1986) Organitos celulares. En Estructura y dinámica celular. Interamericana Ed. 3ª edición. CBS College Publishing, México pp 53-504.

Horwitz MA (1983) Formation of a novel phagosome by legionnaires disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. J Exp Med 158: 1319-1331.

Jeon KW & Lorch IJ (1967) Unusual intracellular bacterial infection in large free-living amoebae. Exp Cell Res 48: 233-240.

Kao KN, Constabel F, Michayluk MR & Gamborg OL (1974) Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells. Planta 120: 215-227.

Kao KN & Michayluk MR (1974) A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. Planta 115: 355-367.

Kawakami N, Tanaka H, Mondo H, Katamine S & Kawakami H (1980) Incorporation of algal thylakoid membrane and DNA in yeast protoplasts. In Advances in protoplasts research. Ferenczy L & Farkas GL (eds) Akademiai Kiadó Budapest, Pergamon press, Oxford pp 49-54.

- Kevei F, Peberdy JF (1977) Interspecific hibridation between *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* by fusion of somatic protoplast. J Gen Micro 102: 255-262.
- Kim HB & Jeon KW (1983) Cytosol proteins synthetised by intracellular symbionts. J Cell Biol 97: 79a
- Kingsman AJ, Clarke L, Mortimer RK & Carbon J (1979) Replication in *Saccharomyces cerevisiae* of plasmid pBR313 carrying DNA from the yeast trp 1 region. Gene 7: 141-152.
- Knox RB (1982) Methyods for locating and identifiying antigens in plant tissues. In Techniques in Immunocytochemistry. Vol 1. Bullock GR and Petrusz (eds) Academic Press, New York pp 205-238.
- Koop F (1975) Electron microscopy of yeast. In Methods in Cell biology Vol XI. Prescott DM (eds) Academic Press, New York, pp 23-45.
- Kuo SC & Yamamoto S (1975) Preparation and growth of yeast protoplast. In Methods in cell Biology Vol XI Prescot DM (eds) pp 169-183.
- Lederberg J & St Clair J (1958) Protoplasts and L-type growth of *Escherichia coli*. J Bact 75: 143-160.
- Lorch IJ, Kim HB & Jeon KW (1985) Symbiont induced strain specific lethal effect in amoebae. J Protozool 32(4): 745-749.
- Makarow M (1985a) Endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*: internazation of enveloped viruse into sphaeroplasts.

EMBO J 28(33): 1855-1861.

Makarow M (1985b) Endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*: internalization of  $\alpha$ -amilase and fluorescent dextran into cells. EMBO J 4 (7), 1861-1886.

Margulis L (1970) Origin of eucariotic cells. Yale University Press, New Haven.

Margulis L (1974) Five Kingdom classification and the origin and evolution of cells. Evol Biol 7: 45-78.

Margulis L (1981) Symbiosis in cell evolution: Life and its environment on the Early Earth WH Freeman, San Francisco.

Matsui C, Hasezawa S, Tanaka N & Syono K (1983) Introduction of *Escherichia coli* cells and spheroplasts into *Vinca rosea* protoplasts. Plant Cell Reports 2: 30-32.

McAuley PL (1980) Regulation in the green hydra symbiosis. In Endosymbiosis and cell biology: A synthesis of recent research. Schwemmler W & Schwenk HEA (eds), Walter de Gruyter, Berlin pp 241-148.

Meeks JC, Russell L & Wolk CP (1978) Uptake of auxotrophic cells of heterocyst-forming cyanobacterium by tobacco protoplast and the fate of their associations. Planta 139: 55-60.

Mellman I, Fuchs R & Helenius A (1986) Acidification of the endocytic and exocytic pathways. Ann Rev Biochem 55: 663-700.

- Mellon RE (1925) Studies on microbial heredity. In Observations on a primitive form of sexuality (Zigospore formation) in the colon typhoid group. J Bact 10: 81-501.
- Moulder JW (1985) Comparative biology of intracellular parasitism. Microbiol Revs 49: 298-337.
- Moulder JW, Levy NJ & Schurman LP (1980) Persistent infection of mouse fibroblast (L-cells) with *Chlamydia psittacci* evidence for a cryptic chlamydial form. Infect Immun 34: 285-291.
- Müller R (1966) Die Entstehung entwickungsfähiger Protoplasten aus Hefezellen und ihre Reversion. Wissenschaftliche Filme, n° THF659. Zentrallinstitut für Microbiologie und Experimentelle Therapie, Jena, East Germany.
- Müller-Merz E & Lee JJ (1976) Symbiosis in the larger foraminiferal algal symbiont system. J Foraminiferal Res 8: 35-41.
- Nečas O (1962) The mechanism of regeneration of yeast protoplasts. I Physical conditions. Folia Biol 8: 256-262.
- Nečas O (1971) Cell wall synthesis in yeast protoplast, Bacteriol Rev 35: 149-170.
- Neckelmann N & L Muscatine (1983) Regulatory mechanism maintaining the *Hydra-Chlorella* symbiosis. Proc R Soc London Ser B 219: 193-310.

- Peberdy JF (1976) Isolation and properties of protoplasts from filamentous fungi. In Microbial and Plant. Peberdy JF, Rose AH, Rogers HJ & Cocking EC. Academic Press, New York, San Francisco, pp 39-50.
- Pontecorvo G (1975) Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene-glycol treatment. Som Cell G 1: 397-400.
- Potrycus I & Hoffman F (1973) Transplantation of nuclei into protoplasts of higher plants. Z Pflanzenphysiol 69: 287-289.
- Provost A, Bourguignon C, Fournier P, Ribet AM & Heslot H (1978) Intergeneric hybridization in yeast through protoplast fusion. FEMS Microbiol. Lett. 3: 309-312.
- Rasoulzadegan M, Binetruy B & Cuzin F (1982) High frequency of gene transfer after fusion between bacteria and eucaryotic cells. Nature 295: 257-259.
- Reisser W, Meier R, Görzt HD & Jeon KW (1985) Establishment, maintenance and integration mechanisms of endosymbionts in Protozoa. J Protozool 32(3): 383-390.
- Reisser W, Meier R & Wiessner W (1980) Zytologische analyse der Endosymbioseernheit von *Paramecium bursaria* Ehrbg mit *Chlorella* spec I Der Einfluß des ernährungsreistandes algenfreier *Paramecium bursaria* auf den verlauf der Infection mit der aus grünen *Paramecium* isolierten *Chlorella* spec. Arch. Protistenkd 123: 326-332.
- Reisser W & Wiessner W (1984) Autotropic eukariotic freshwater symbionts, In Cellular interactions, Encyclopedia of Plant Physiology, New series cap 17.

Linskens, H E & Heslop-Harrison L, eds, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg and New York, pp 91-112.

Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208.

Riezman H (1985) Endocytosis in Yeast: Several mutants are defective in endocytosis. *Cell* 40: 1001-1009.

Riezman H, Chavatchko Y & Dulic V (1986a) Endocytosis in yeast. *TIBS* 11 (8): 325-328.

Riezman H, Chavatchko Y & Howald I (1986b) Endocytosis in yeast, relationship to other cellular pathways. *Yeast cell biology* 33: 443.

Scheurich P, Schanabel H, Zimmerman U & Klein J (1980) Immobilization and mechanical support of individual protoplasts. *Biophys acta* 598: 645-651.

Schwemmler W (1980) Endocytobiology: a modern field between symbiosis and cell research. In *Endocytobiology, endosymbiosis and Cell Biology, a synthesis of recent research*. Schwemmler W & Schenk H EA (eds), Walter de Gruyter, Berlin and New York 1: 943-967.

Smith WE (1944) Observations indicating a sexual mode of reproduction in a common bacteria 7: 417-418.

Sonneborn TM (1943) Gene and cytoplasm of the killer character in variety 4 of *Paramecium aurelia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 29: 329-338.



Spurr AR (1969) A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. 26: 31-43.

Stäelin H (1954) Über Osmotisches verhalten und fusion nacter protoplasten und *Bacillus anthracis*. Schweizerische Zeitschrift für allgemeine. Pathologie und Bakteriologie. 7: 296-310.

Stainer RY (1970) Some aspects of the biology of cells and their possible evolutionary significance. Sym Soc Gen Microbiol 20: 1-38.

Starr MP (1975) A generalized scheme for classifying organismic associations. In Symbiosis Symposia of the Soc for Experimental Biology. Jennings DH and Lee DL, Cambridge University press, Cambridge 29: 1-20.

Stephen H & Hutchinson WC (1951) The formation and development of large bodies in *Proteus vulgaris* Ox-19. I Bright phase contrast observations of living bacteria. J Bacteriol 61: 321-325.

Stewart KD & Mattox K (1975) Comparative cytology, evolution and classification of the green algae with some consideration of the origin of other organism with chlorophylls a and b. Bot Rev 41: 104-135.

Straley SC, Harmon PA (1984) *Yersinia pestis* grows within phagolysosomes in mouse peritoneal macrophages. Infect. Immun. 45: 217-248.

Strunk CH (1967) Protoplastentzung und reversion bei Basidomyceten (*Polysticus versicolor*). In Symposium Über Hefeprotoplasten. Müller R (eds), Berlin Akademie

Verlag, pp 213-215.

Strunk C (1969) Licht-und electronen mikroskopische unter-  
suchungen an regenerierenden protoplasten von *Polysticus*  
*versicolor*. Z Allg Mikrobiol 9 205-216.

Suzuki M, Takebe I, Kajita S, Honda Y & Matsui C (1977)  
Endocytosis of polystyrene spheres by tobacco leaf  
protoplasts. Exptl Cell Res 105: 127-135.

Svoboda A (1966) Regeneration of yeast protoplasts in agar  
gels. Exp Cell Res 44: 640-642.

Svoboda A & Piedra D (1983) Reversion of yeast protoplast in  
media containing polyethylene glycol. J Gen Microbiol  
129: 3371-3379.

Szabados L, Hadlaczky GY & Dudits D (1981) Uptake of isolated  
plant chromosome by oplant protoplasts. Planta 151: 141-  
145.

Tamaki H (1982) Genetic proprieties of abortive products  
resulting from protoplasts fusion in yeasts. Mol Gen  
Genet 187: 177-179.

Tanaka N, Fukunaga Y, hasezawa s, Syöno K & Matsui C (1984)  
Endocityc uptake of *Escherichia coli* sphaeroplasts by  
*Neurospora crassa* slime cells: An ultrastructural study.  
Appl. Microbial Biotechnol 19: 296-299.

Taylor DL (1976) Symbionticism revisited: a discusion of the  
evolutionary impact of intracellular synbiosis. Proc R  
Soc Lond B 204: 267-286.

- Taylor DL (1983) Some eco-evolutionary aspects of intracellular symbiosis. *Int Rev Plant Physiol* 30: 485-551.
- Tosa T, Mori T, & Chibata I (1979) Immobilization of enzymes and microbial cells using carrageenan as matrix. *Biotechnol Bioeng* 21: 1697-1709.
- Toyama H, Yamaguchi K Shimyo A & Okada H (1984) Protoplasts fusion of *Trichoderma reesei* immature conidia. *Appl Envir* 19: 363-368.
- Van Beneden PJ (1876) Animal parasites and messmates. D Appleton, New York 274 pp.
- Vasil IK & Giles KL (1975) Induced transfer of higher plant chloroplasts into fungal protoplasts. *Science* 190: 680.
- Villanueva JR (1966) Protoplast of fungi. In the fungi. Ainsworth GC & Sussman AS (eds), New York Academic press 2: 3-32.
- Villanueva jr & García Acha (1971) Product and use of fungal protoplasts. In *Methods in Microbiology* Both C (eds) New York Academic press pp 655-718.
- Wallin A, Glimelius K & Erickson T (1974) The induction and aggregation and fusion of *Daucus carota* protoplast by polyethylene glycol. *Z Pflanzenphysiol* 74: 64-80.
- Weber H, Förster W, Berg H & Jacob HE (1981) Paraxesual hybridization of yeasts by electric field stimulated fusion protoplasts. *Curr Genet* 4: 165-166.

Willison JH, Grout HM & Cocking EC (1971) A mechanism for the pinocytosis of latex spheres by tomato fruit protoplasts. *Bioenergetics* 2: 371-352.

Winkler HH & Miller ET (1984) Activated complex of L-cells and *Rickettsia prowazekii* N-ethyl maleimide intensive phospholipase. *A Infect Immun* 45: 577-581.

Yamada T & Sakaguchi K (1981) Polyethylene-glycol induced uptake to bacteria into yeast protoplasts. *Agric Biol Chem* 45: 2301-2309.

Yoshida K (1979) Interspecific and intraspecific mitochondria induced cytoplasmic transformation in yeast. *Plant Cell Physiol* 20: 851-856.

Yoshida K & Takeuchi IK (1980) Cytological studies on mitochondria-induced cytoplasmic transformation in yeast. *Plant Cell Physiol* 21: 497-509.