

# BOLETÍN DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

- Dimensiones foliares y fotosíntesis de *Rhizophora mangle* en áreas estuarinas bajo condiciones hidrológicas contrastantes.**  
*Flora Barboza y Ernesto Medina*..... 158
- Unpublished species of aquatic beetles of the genus *Anacaena* in the Upper Apure, Venezuela (Hydrophilidae: Chaetarthriinae: Anacaenini).**  
*Mauricio García Ramírez y Alfredo Briceño*..... 174
- Tasa de fagocitosis en las especies de *Acanthamoeba* provenientes de aguas subterráneas. Parte 2.**  
*Silvana Pertuz, Miroslav Macek y Elisabeth Ramírez*..... 201
- Notas científicas.*
- Contribución al conocimiento de la actividad pesquera artesanal del Cangrejo azul *Callinectes sapidus* (Brachyura: Portunidae) en dos áreas geográficas del Municipio Cabimas, Venezuela.**  
*Helimar Vásquez y Edison Pascal*..... 222
- Plantas utilizadas por la tribu Kariña en Pueblo Nuevo de Caris, estado Anzoátegui, Venezuela.**  
*Wilmer Díaz y Raúl Rivero*..... 238
- Instrucciones a los autores**..... 247
- Instructions for authors**..... 257

**Vol. 58, N<sup>o</sup> 2, Pp. 158-266, Julio-Diciembre 2024**  
UNA REVISTA INTERNACIONAL DE BIOLOGÍA PUBLICADA  
POR  
LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA, MARACAIBO, VENEZUELA



## Tasa de fagocitosis en las especies de *Acanthamoeba* provenientes de aguas subterráneas. Parte 2.

\*Silvana Beatriz Pertuz Belloso<sup>1</sup>, Miroslav Macek<sup>2</sup> y Elisabeth Ramírez Flores<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fundación Bchemokines Molecules and Therapies, Pachuca de Soto, Estado de Hidalgo, México.

<sup>2</sup>Laboratorio de Microbiología Ambiental. Unidad Interdisciplinaria de Investigación en Ciencias de la Salud y Educación de la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México. ORCID ID: 0000-0002-0663-2987.

\*Autor para correspondencia: Correo electrónico: [silvanapertuz@autlook.com](mailto:silvanapertuz@autlook.com). Página web. <https://www.researchgate.net/profile/Silvana-Pertuz-2>. Dir. Privada: AV. Universidad 1900. Ed. 30. Int. 403. Col. Oxtopulco Universidad. Ciudad de México. México. Cp. 04350.

### RESUMEN

La fagocitosis es el mecanismo de toma de partículas sólidas por células eucariotas jugando, por ende, un rol muy importante en la ecología. El objetivo de este trabajo fue analizar la fagocitosis de las especies de *Acanthamoeba* aisladas de aguas subterráneas del Valle del Mezquital (Hidalgo, México), y su impacto biológico. Para esto fue elaborado un modelo matemático que permitió analizar la fagocitosis; determinando las tasas de fagocitosis, formación de vacuolas, limpieza y de adherencia de las especies de *Acanthamoeba*. La tasa de fagocitosis fue  $\geq 50$  a  $250 \text{ bac ame}^{-1} \text{ h}^{-1}$  en ambas especies, al mismo tiempo que la formación de vacuolas fue  $\geq 20$  a  $80 \text{ vac. ame}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . La tasa de limpieza de bacterias osciló de  $100.000 \text{ bac}^{-1} \text{ mm}^2 \text{ cels}^{-1} \text{ h}^{-1}$  en *Acanthamoeba griffini* y hasta  $1.200.000 \text{ bac}^{-1} \text{ mm}^2 \text{ cels}^{-1} \text{ h}^{-1}$  en *Acanthamoeba castellanii*. La tasa de adhesión fue  $\geq 500.000 \text{ bac-ame}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ mm}^2$  por superficie membranar. El control del proceso de fagocitosis recayó sobre la tasa de adherencia bacteriana a la superficie amebiana, que presentó una correlación positiva con la tasa de fagocitosis. La fagocitosis, se concluye depende de las especies de *Acanthamoeba*, y de los factores celulares como la formación de vacuolas y adherencia bacteriana a la superficie amebiana. El impacto ecológico de *Acanthamoeba* quedó determinado por la tasa de limpieza bacteriana por ameba. En este trabajo se demostró no solo importancia

del mecanismo de fagocitosis, sino el rol que juegan las amebas de vida libre en la regulación bacteriana en el ambiente.

**Palabras clave:** Amebas de vida libre, *Acanthamoeba*, bacterias, vacuolas, membrana celular, adherencia, modelo matemático, impacto ecológico, vacuola.

## Phagocytosis rate in *Acanthamoeba* species from groundwater. Part 2.

### ABSTRACT

The phagocytosis is a mechanism of take of solid particles by eukaryotic cells, playing a role in the ecology. The objective of this work was analyzed the phagocytosis of *Acanthamoeba* species from groundwater of Mezquital Valley (Hidalgo State, Mexico), and their biology impact. For this, a mathematics model was elaborate for evaluated rates of phagocytosis, vacuole forming, clearing of bacteria, adherence and digestion for *Acanthamoeba* species. The phagocytosis rate was  $\geq 50$  a  $250 \text{ bac ame}^{-1} \text{ h}^{-1}$  both species; at the same time that the vacuole forming rate were  $\geq 20$  an  $80 \text{ vac. ame}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . The clearing rates were  $100.000 \text{ bac}^{-1} \text{ mm}^2 \text{ cells}^{-1} \text{ h}^{-1}$  for *Acanthamoeba griffini*, until  $1.200.000 \text{ bac}^{-1} \text{ mm}^2 \text{ cells}^{-1} \text{ h}^{-1}$  for *Acanthamoeba castellanii*. The adherence rate was  $\geq 500.000 \text{ bac}^{-1} \text{ ame}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ mm}^2$  by membrane superface. The phagocytosis process was regulated by the bacteria adherence rate on the amoebic superface, in positive correlation with the digestion rates. In conclusion the phagocytosis depended of *Acanthamoeba* species's and cellular factors as vacuole forming and bacterial adherence on the membrane superface of amoeba. The ecological impact of *Acanthamoeba* is determined by the clearing rate of bacteria by amoeba. In this work was demonstrated the importance of phagocytosis and the role of free living amoebae in the regulation of bacteria in the environmental.

**Key words** Free-living-amoeba, *Acanthamoeba*, bacteria's, cellular membrane, adherence, mathematical model, ecological impact.

**Recibido / Received:** 11-11-2024 ~ **Aceptado / Accepted:** 30-11-2024.

## INTRODUCCIÓN

La fagocitosis es un proceso antiguo y evolutivamente conservado, en el cual las células eucariotas unen, engullen y destruyen las partículas, mismas que de acuerdo a las definiciones clásicas pueden llegar a ser mayores de  $\geq 250$  nanómetros (nm) de diámetro, y que tras un complejo proceso celular son relocalizadas desde la superficie de la membrana plasmática a vesículas o vacuolas, y que luego de un mecanismo celular y molecular terminan siendo digeridas (Tollis *et al.* 2010).

Este mecanismo fue estudiado por primera vez para *Acanthamoeba* por Weisman y Korn (1967), los cuales definieron algunos de los parámetros que caracterizan la fagocitosis en este grupo, entre ellos, que la tasa de fagocitosis es una función lineal del tiempo y de la concentración de las células, del tamaño de las partículas (0.26-2.8  $\mu\text{m}$ ) y de la concentración de las mismas.

La toma de las bacterias induce la formación de copas durante la fagocitosis en las que se capturan bacterias en bloques de unos 1.5  $\mu\text{m}$  de radio y de unos 7  $\mu\text{m}$  de extensión de la membrana plasmática en *Acanthamoeba*, como fue demostrado por Pertuz *et al.* (2021).

En términos generales, el papel de los protozoarios en la ecología y en la regulación de las meta-poblaciones bacterianas, aún es tema de estudio, y su impacto en la ecología global y en el biocontrol de las meta-poblaciones bacterianas ha sido objeto de estudio por más de una década sin llegar a conocer totalmente estas funciones.

Las amebas de vida libre, por su parte, juegan un papel biológico importante tanto en los ciclos biogeoquímicos como en la depredación bacteriana y de otros protistas. Las especies de *Acanthamoeba* tienen papel ecológico muy importante como depredadores de bacterias de varios *Phyla*, principalmente: *Cyanobacteria* (Bacterias fotosintéticas, no-proteobacteria), *Proteobacteria* (Orden *Enterobacterales*) y bacterias Gram positivas (G+C baja, Orden *Bacillales*), No-Proteobacteria (del Orden *Bateroidales*), Gram positivas (G+C alto, Ordenes *Mycobacterales* y *Actinomycetales*), que habitan microbiomas específicos (Wright *et al.* 1981, Weekers *et al.* 1993, Rønn *et*

*al.* 2002, Prescott *et al.* 2002, Guillonneau *et al.* 2020, Amacker *et al.* 2022, Nasher y Wren 2024).

En modelos de estudio más recientes, como las biopelículas se observar el efecto de las de especies de *Acanthamoeba* sobre la composición y ecología de las mismas. El efecto de *A. castellanii* provenientes de suelo sobre bacterias aisladas de biopelículas formadas en sedimentos marinos, son un buen ejemplo de la fagocitosis de bacterias marinas anaeróbicas-no proteobacteria (Orden *Bateroidales*), que componen estos microbiomas (Guillonneau *et al.* 2020). Es en el modelo de *Acanthamoeba* que se ha definido una de las funciones ecológicas mejor estudiadas que es el biocontrol de las meta-poblaciones bacterianas por la ingesta vía deslizamiento o “pastoreo (Nasher y Wren 2024, Rønn *et al.* 2002, Amacker *et al.* 2022).

Desde el punto de vista taxonómico, *Acanthamoeba* es un grupo de protistas siempre en el tope de la investigación. *Acanthamoeba* tiene 12 subtipos o genotipos y alrededor de 53 cepas. Existen varios “morfotipos”, y asociaciones filogenéticas, complejos específicos de especies que incluyen a *Acanthamoeba castellanii* o *Acanthamoeba griffini* (Kong 2009); muy probablemente pertenecientes a “ecotipos” de acuerdo a Finlay (2004), que tienen un rol ecológico y existen por ese rol. Los protistas amebozoa se clasifican filogenéticamente como Lobosea y Vanosea, que en suelo llegan a tener más de 1. 399 ±77 metagenomas en este microbioma, y es en este dónde ejercen su impacto principal (Singer *et al.* 2021, Jamy *et al.* 2022).

Los objetivos de este estudio fueron: 1. Caracterizar en un modelo matemático, la fagocitosis de los aislados de *Acanthamoeba* de aguas subterráneas del Valle del Mezquital (México). 2. Cuantificar la cantidad de bacterias ingeridas a través del tiempo por especies de *Acanthamoeba* aisladas de aguas subterráneas del Valle del Mezquital (México). 3. Analizar la superficie como mecanismo de captación de bacterias por miembros de *Acanthamoeba*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Especies.

*Acanthamoeba culbertsoni* clave ATCC 30171; *Acanthamoeba castellanii*, y *Acanthamoeba griffini* aisladas de aguas subterráneas del Valle del Mezquital, *Klebsiella aerogenes* Clave ATCC-13048 (*Proteobacteria*, *Enterobacteria*).

### **Aislamiento, identificación taxonómica y mantenimiento de las especies.**

Cultivos de *Klebsiella aerogenes* -ATCC 13048 fueron repicados en agar inclinado a caldo nutritivo de cultivo de acuerdo a los métodos estándar y luego tratados para la tinción por fluorescencia según Pertuz *et al.* (2021).

Las especies de *Acanthamoeba* fueron aisladas y mantenidas en medios de cultivo de PGY (0,00075 mM de Peptona; 0,00075 de Extracto de Levadura, 0,00 15 mM de Glucosa, AD) a 30°C en todos los ensayos de fagocitosis de acuerdo a Pertuz *et al.* (2021).

### **Cuantificación de la fagocitosis en placas de cultivo.**

Los trofozoítos de *Acanthamoeba* fueron incubados en placas de cultivo (Costar de 12 pozos), conteniendo medio PGY (5ml por pozo) a 30°C y fueron observados por microscopía de inversión, durante 2 días, hasta su fase exponencial de crecimiento (Pertuz *et al.* 2021). Posteriormente, el medio PGY fue descartado y cada pozo fue sometido a varios lavados con solución salina de Ringer; para ajustando a  $1 \times 10^6$  amebas en 1 mL por pozo. Las bacterias marcadas con 1 mM fluorescencia DTAF (5-DTAF (5-(4,6-Diclorotriazinil) Aminofluoresceína) fueron homogenizadas y ajustadas a una concentración de  $1 \times 10^8$  cel/m de acuerdo a Pertuz *et al.* 2021. Luego las bacterias marcadas con DTAF (FLB) fueron dispensadas a una concentración estándar de  $1 \times 10^6$  por pozo e incubadas a 30°C por 1 h. La fagocitosis fue detenida cada 5 min con una solución Azida de Sodio fría (1,2 mM). Trascurridos los diferentes tiempos y parada la fagocitosis, cada pozo fue raspado con una varilla de vidrio con goma y la suspensión obtenida fue dispensada en el sistema de micro-filtración de 2 mm diámetro ensamblado con una membrana de policarbonato de poro de 2µm de diámetro de color negro. Luego cada muestra fue incubada con DAPI (Dihidrocloruro de 4',6-diamidino-2-fenilindol), 2 mM durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las más de 36 muestras por ensayo fueron fijadas y montadas luego observadas para su análisis por microscopía de fluorescencia de acuerdo a Pertuz *et al.* (2021).

### **Cálculos y modelo teórico**

**Condiciones experimentales.** El contenido vacuolar se escaneó para cuantificar las bacterias por vacuola y por número, usando microscopía de fluorescencia. En los aislados ambientales de *A. griffini*-Valle Mezquital y *A. castellanii*-Valle Mezquital se realizó el conteo de 50 trofozoítos por placa de cada condición. Estos experimentos se

hicieron siguiendo una cinética, y la fagocitosis se detuvo a los 5 min, 10 min, 30 min, 40 min y 60 min. En el caso de *A. culbertsoni*-ATCC 30171, se realizó el conteo de hasta 100 trofozoítos por placa y condición, bajo las condiciones establecidas. Para los conteos de las bacterias adheridas a la superficie amebiana se realizaron sobre *A. griffini*-Valle Mezquital y *A. culbertsoni* -ATCC 30171, respectivamente. Para los conteos solo del contenido vacuolar se realizaron experimentos con la técnica de apagamiento bajo las condiciones señaladas, por triplicado y con las tres cepas probadas de acuerdo Pertuz *et al.* (2021).

### Construcción de la matriz de datos

Las bacterias cuantificadas en el interior de las vacuolas se designaron arbitrariamente como  $n\text{FLB}_x \text{ cels}^{-1}$  (*n* Fluorescence Label bacteria). Se calcularon los parámetros que definen el impacto ecológico y la fisiología de las especies probadas de *Acanthamoeba*, usando las fórmulas mostradas a continuación:

**Tasa de formación de vacuolas** es igual a  $n\text{Vac} \times \text{cels}^{-1} / \text{h}$ .

Donde:

**Vac**= número de vacuolas

**Cels<sup>-1</sup>** = número de células

**h**=hora.

**Tasa de fagocitosis de bacterias** es igual a  $U$  (*Uptake*)=  $n\text{FLB}/t$ .

Donde:

**nFLB** =Número de bacterias

**t**=Tiempo en minutos

Y se calculó como:  $n[\text{FLB}_{\text{DTAF}}] + n[\text{FLB}_{\text{DAPI}}] \times n[\text{FLB}_i] \times \text{h} \times \text{mm}^2$ .

**Impacto de las amebas sobre las metapoblaciones bacterianas** o tasa de limpieza bacteriana o *clearing*.

Y se calculó como:

**Tasa de limpieza bacteriana**=  $n\text{FLB}/[\text{FLB}] \times t$  (h)  $\times$  [Ameba] por  $\text{mm}^2$ .

Y se calculó como:  $n\text{FLB} \text{ cels} \cdot \text{h}^{-1}$  por  $\text{mm}^2$ .

Donde:

**nFLB**: Número de bacterias ingeridas

**t**= Tiempo

**h**= hora

**Número de bacterias adheridas** sobre la superficie amebiana se cuantificó y designó como  $nFLB_{sup}$  (FLB cells<sup>-1</sup> superficie).

**Tasa de adherencia bacteriana**=  $nFLB_{adh} \times t$ .

Y se calculó como:  $n[FLB_{adh}] \times h$ .

Donde:

**FLB<sub>adh</sub>**= Numero de bacterias adheridas.

**h**= Hora

**Índice de fagocitosis de las amebas que consumieron bacterias y que formaron un número determinado de vacuolas.**

Y se calculó como:

**Índice de Fagocitosis**=  $N_{ameba} / \Sigma N = N_{ameba} / 100 \times 100$ .

### **Análisis estadístico**

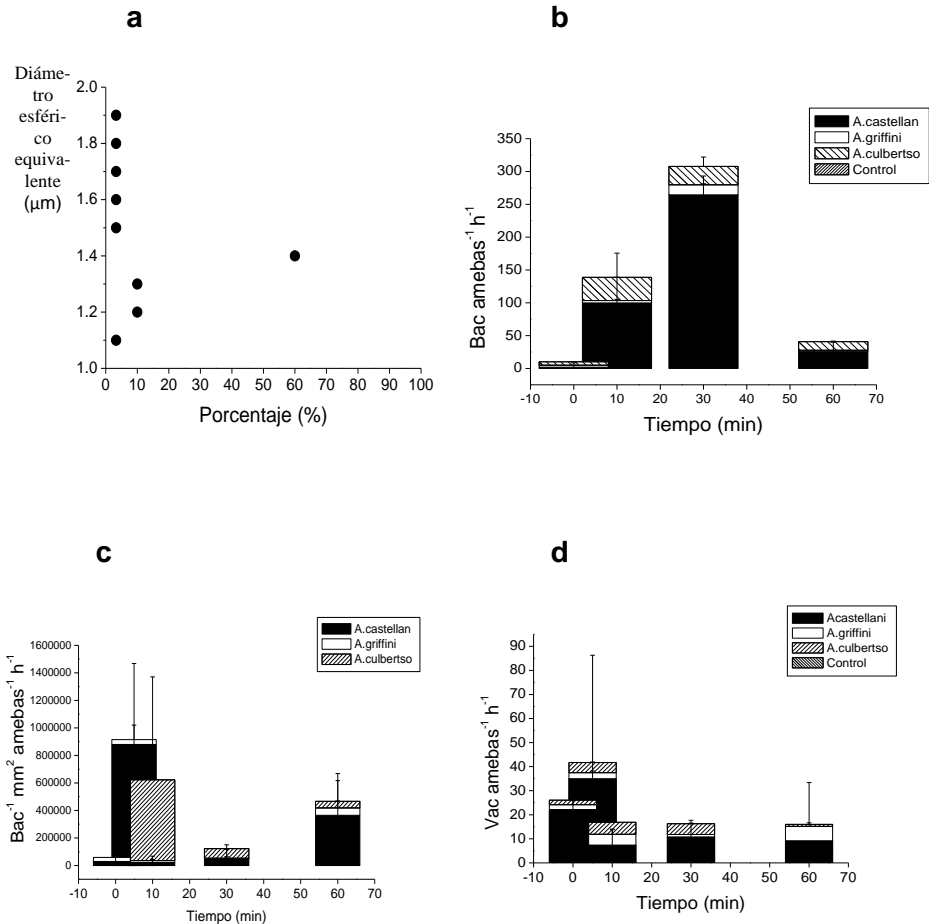
Los valores promedios se obtuvieron por cada parámetro calculado como fue descrito anteriormente y se compararon por tiempo, por triplicado y una  $p \leq 0.08$  entre especies. El análisis de correlación lineal se realizó entre la tasa de adherencia de bacterias y de la fagocitosis de las mismas, usando herramientas de estadística-versión 5 para ANOVA del *software* de Origin Lab (Oringin Pro 2024).

## **RESULTADOS**

Este sistema experimental de fagocitosis uso como presa una enterobacteria, *K. aerogenes* de un diámetro esférico promedio de 1.5  $\mu\text{m}$ , en *stock* bacteriano marcado fluorescentemente (Fig. 1 a), y se usaron cepas de *Acanthamoeba* identificadas taxonómicamente determinándose que los asilados del Valle del Mezquital fueron *A. castellanii* y *A. griffini*, de acuerdo a las características fisiológicas y morfológicas, principalmente el análisis morfológico de los quistes, como fue descrito en Pertuz *et al.* (2021).

La fagocitosis en las especies estudiadas de *Acanthamoeba* presentó un patrón en el que hubo una mayor fagocitosis en los primeros 5 min seguido de un aumento en el número de vesículas y en tasa de limpieza bacteriana (Fig. 1d y Fig. 1 c). En las especies estudiadas, la fagocitosis fue mayor desde los primeros 5 min, siendo el punto importante del proceso a los 30 min en donde se observó un consumo máximo, y hasta los 60 min, punto en el cual ya no había consumo de la presa (Fig. 1 b).





**Figura 1.** Tasas fisiológicas y ecológicas calculadas para los aislados de *Acanthamoeba* de aguas subterráneas del Valle de Mezquital.

- a. Diámetro promedio de la presa *Klebsiella aerogenes* en los ensayos de fagocitosis. Diámetro determinado de acuerdo a materiales y métodos. Media (Y): 1,5 µm; y Error estándar: Er±0,09; N=9.
- b. Tasas de fagocitosis. Ensayos realizados por triplicado y de acuerdo a materiales y métodos. Barra negra: *A. castellanii*. Barra Blanca: *A. griffini*. Barra con entramado. *A. culbertsoni*. Barra con entramado denso. Control sin fagocitosis. \*, \*\*p≤ 0,08.
- c. Tasas de formación de vacuolas. Ensayos realizados por triplicado y de acuerdo a materiales y métodos. Barra negra: *A. castellanii*. Barra Blanca: *A. griffini*. Barra con entramado. *A. culbertsoni*. [\*,\*\* Diferencias significativas (p≤0,08)]. Barra con entramado denso. Control sin fagocitosis.
- d. Tasas de limpieza e impacto sobre las bacterias. Ensayos realizados por triplicado y de acuerdo a materiales y métodos.[F= 4.08; p≤0.07\*, \*\* diferencias significativas]. Barra negra: *A. castellanii*. Barra Blanca: *A. griffini*. Barra con entramado. *A. culbertsoni*
- e. Claves: A. castellan: *Acanthamoeba castellanii*. A. culbertso: *Acanthamoeba culbertsoni*. A. griffini: *Acanthamoeba griffini*. Control: Sin fagocitosis.
- f. Claves gráficos: Bac: Bacterias. H: Horas. Vac: Vacuolas.

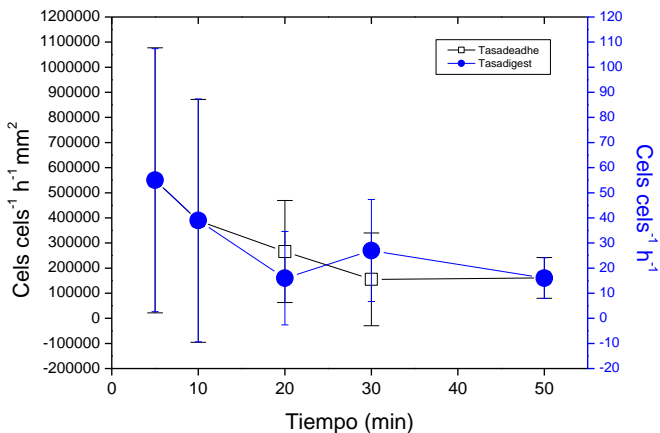
La tasa de fagocitosis de *A. griffini*-Valle Mezquital fue de 14 bacamebas<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> por mm<sup>2</sup> a los 30 min, en promedio (Fig. 1b). Esta tasa osciló de 2 bacamebas<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> por mm<sup>2</sup> desde los primeros 10 min hasta 14 bacamebas<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> por mm<sup>2</sup> a los 30 min, decreciendo a 0 bacamebas<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> por mm<sup>2</sup> a los 60 min, estas diferencias fueron estadísticamente significativas a  $p \leq 0.08$  ( $F = 3,329$ ;  $p = 0,06599$ ) (Fig. 1 b). *A. castellanii*-Valle Mezquital, por otro lado, presentó un patrón de fagocitosis semejante a *A. griffini*-Valle Mezquital, siendo la cantidad de bacterias fluorescentes capturadas mucho mayor. A los 10 min. *A. castellanii*-Valle Mezquital consumió más de 50 bacamebas<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> por mm<sup>2</sup>, incrementando 250 bacamebas<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> por mm<sup>2</sup> a los 30 min y decreciendo a menos de 50 bacamebas<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> por mm<sup>2</sup> a los 60 min, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 1 c) ( $n = 5$ ;  $F = 1.49$ ;  $p = 0.27$ ). *A. culbertsoni*-ATCC 30171 siguiendo el mismo patrón, presentó una alta tasa de fagocitosis a los 5 a 10 min de 35.25 bac mm<sup>2</sup> h<sup>-1</sup> y se redujo a 28.07 bac mm<sup>2</sup> h<sup>-1</sup> a los 30 min disminuyendo hasta 12.93 bac mm<sup>2</sup> h<sup>-1</sup>, estas diferencias tampoco fueron estadísticamente significativas ( $F = 0.52$ ;  $p = 0.6$ ).

En la Figura 1 c se observa la tasa de formación de vesículas osciló entre 0 a los 5 min hasta más de 25 vesículas por hora. *A. griffini*-Valle Mezquital presentó una tasa de formación de vacuolas que oscilaron de 0 vacameba<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a los 5 min hasta más de 10 a 25 vacameba<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> por hora. *A. castellanii*-Valle Mezquital, en cambio, presentó una rápida formación de vesículas desde los primeros 5 min alcanzando hasta 80 vacameba<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, tiempo después del cual este parámetro decreció a 20 vac. ameba<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $F = 1.28$ ;  $p = 0.23$ ). *A. culbertsoni*-ATCC30171, presentó una tasa de formación de vacuolas de 5 vacameba<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en promedio. Hay que destacar que la tasa de formación de vacuolas se redujo casi hasta cero vacameba<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> del proceso de fagocitosis, estas diferencias fueron estadísticamente significativas a  $p \leq 0.08$  ( $F = 4.46$ ;  $p = 0,06$ ).

El rol ecológico de las cepas de *Acanthamoeba* se observa en la figura 1 d, mostrando que *A. griffini*-Valle Mezquital presentó un consumo constante de bacterias durante el tiempo de incubación en los ensayos de fagocitosis; oscilando de 100.000 a 200.000 bac<sup>-1</sup> mm<sup>2</sup> cels<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> desde los primeros 5 min hasta más de 100.000 a 300.000 bac<sup>-1</sup> mm<sup>2</sup> cels<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a la hora. *A. castellanii*-Valle Mezquital, en cambio, presentó una mayor tasa de limpieza bacteriana que osciló de 800.000 a 1.200.000 bac<sup>-1</sup> mm<sup>2</sup> cels<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en los primeros 5 min, disminuyendo a cero bac<sup>-1</sup> mm<sup>2</sup> cels<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a partir de los 10

min. Estas diferencias interespecíficas de las tasas de limpieza bacteriana fueron estadísticamente significativas a  $p \leq 0.08$  ( $F = 4.08$ ;  $p = 0.07$ ). *A. culbertsoni*-ATCC30171, consumió hasta de 600.000 bacterias por  $\text{mm}^2$  desde los primeros 10 min decreciendo a los 30 min hasta la mitad del consumo inicial (Fig. 1 d). *A. culbertsoni*-ATCC30171, a diferencia de las cepas ambientales, presentó una actividad fagocítica inferior.

Entre los factores que definen la fagocitosis de *Acanthamoeba* se encontró una relación entre la adherencia bacteriana a la superficie amebiana y la ingestión de las bacterias. Hubo una relación inversa entre la tasa de adhesión de las bacterias a la superficie amebiana y la tasa de fagocitosis (Fig. 2), esta relación se puede ver a los 20 minutos de incubación de la presa con las amebas. Es así, como se puede observar que existe una alta tasa de fagocitosis y una reducción de la adhesión bacteriana. Desde los primeros 5 min, se presentaron más de 500.000  $\text{cels} \text{cels}^{-1} \text{h}^{-1}$  de superficie pudiendo ser de hasta de un millón de  $\text{cels} \text{cels}^{-1} \text{h}^{-1}$  por  $\text{mm}^2$ . El conteo de bacterias en la superficie amebiana disminuye a partir de los 10 min y así se mantuvo hasta los 60 min con una cantidad de bacterias en superficie menor a 500.000  $\text{cels} \text{cels}^{-1} \text{h}^{-1}$  (Fig. 2). La tasa de fagocitosis oscilo entre 70  $\text{cels} \text{cel}^{-1} \text{h}^{-1}$  a los 5 min disminuyendo a 30  $\text{cels} \text{cel}^{-1} \text{h}^{-1}$  a partir de los 10 min y hasta los 60 min (Fig.2); estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $F = 49.56419$ ;  $p \leq 0.001$ ).

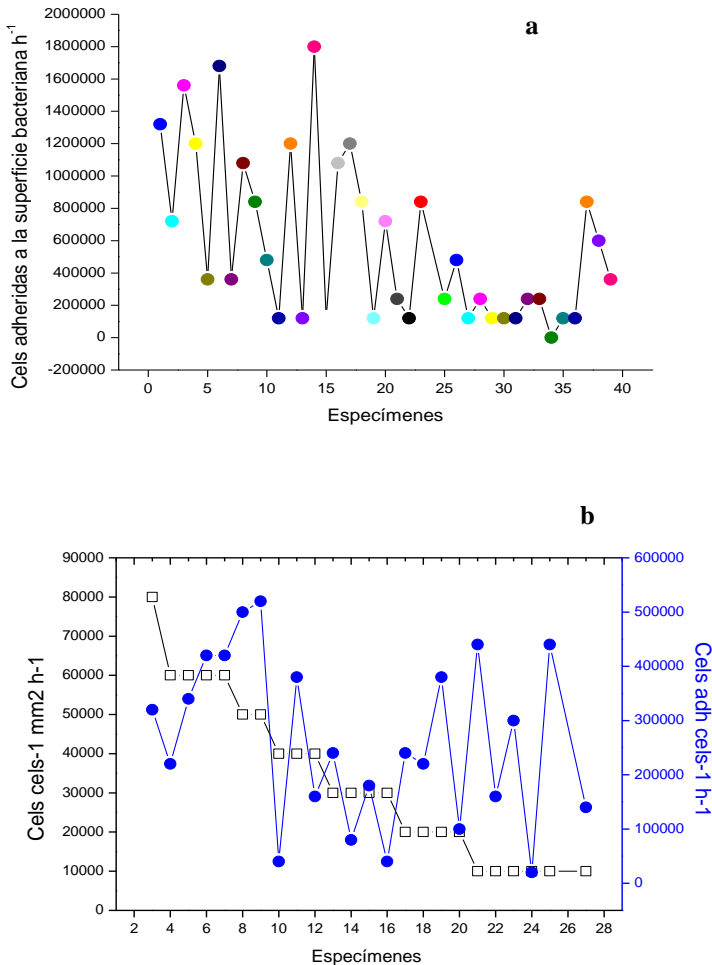


**Figura 2.** Adherencia bacteriana a la superficie amebiana en *Acanthamoeba griffini* aislada del Valle del Mezquital.

Cada uno de los parámetros fue calculado como se especificó en materiales y métodos.  $F= 10.09$ ;  $p \leq 0.001$ , altamente significativo  $p \leq 0,08$ , para la tasa de adherencia bacteriana a la superficie amebiana.  $F= 63.80893$ ,  $p \leq 0.001$ , altamente significativo  $p \leq 0.08$ , para la tasa de fagocitosis.

El número de las bacterias adheridas a la superficie amebiana fue desde 500.000  $\text{bac}^{-1}$  superficie amebiana  $\text{h}^{-1}$ , en algunos de los especímenes, hasta más de 1.500.000  $\text{bac}^{-1}$  superficie amebiana  $\text{h}^{-1}$ , en otro de los especímenes, a los 5 min, tiempo en el cual la tasa de fagocitosis fue de cero, así como la tasa de formación de vacuolas y de limpieza bacteriana, respectivamente (Fig. 3 a).

El mecanismo para atrapar bacterias por parte de las amebas de vida libre fue la adhesión bacteriana, que fue mucho mayor que la tasa de fagocitosis (Fig. 3 b). Las bacterias adheridas fueron de 500.000  $\text{cels} \text{cels}^{-1} \text{h}^{-1}$  a la superficie amebiana en los primeros 30 min por espécimen, existiendo especímenes con más de 1.2.000.000  $\text{cels} \text{cels}^{-1} \text{h}^{-1}$  en superficie amebiana y otros especímenes con menos de 400.000  $\text{cels} \text{cels}^{-1} \text{h}^{-1}$ . En cambio, la tasa de fagocitosis por espécimen fue una magnitud constante, en la cual, las amebas consumieron menos de 100.000  $\text{cels} \text{h}^{-1}$  por espécimen, y la tasa de limpieza bacteriana fue de 24.490  $\text{cels} \text{cels}^{-1} \text{h}^{-1}$  para la cepa de *A. griffini*-Valle Mezquital, siendo este un patrón también observado en *A. culbertsoni*. Las diferencias estadísticas entre la adherencia y la fagocitosis fueron altamente significativas, denotando un proceso regulado a nivel celular ( $F= 10.09$ ;  $p= 1.22345\text{E-}4$ ;  $n= 50$ ). De la misma manera, la tasa de adherencia bacteriana a la superficie amebiana presentó diferencias altamente significativas ( $F= 49.56419$ ;  $p= 8.27194\text{E-}10$ ). Los análisis de correlación lineal mostraron que hay una relación directa entre la tasa de adherencia bacteriana y la tasa de fagocitosis bacteriana por las amebas ( $F= 25.88$ ;  $p= <0.0001$ , tomando en cuenta que  $\text{Prob}>F$ ). La fagocitosis fue alta desde los primeros 5 min, en donde se observa que la adherencia bacteriana es menor. En algunos de los especímenes la tasa de fagocitosis de las bacterias fue constante de 6000  $\text{cels} \text{cels}^{-1} \text{h}^{-1}$ , mientras que la adherencia bacteriana fue de 8000  $\text{cels} \text{cels}^{-1} \text{mm}^2 \text{h}^{-1}$ . En otros especímenes se puede observar que cuando la tasa de fagocitosis baja, la tasa de adherencia fue alta. Hay especímenes en donde la tasa de fagocitosis baja a 1000  $\text{cels} \text{cel}^{-1} \text{h}^{-1}$ , mientras que la adherencia fue alta en varios de los especímenes. Hay que destacar que el tiempo de incubación fue de 30 min mostrando un contraste con los especímenes con incubación inicial, en donde la tasa de adherencia es alta y no ha ocurrido la fagocitosis (Fig. 3 b).



**Figura 3.** Adhesión bacteriana a la superficie amebiana por espécimen.

- Proporción de bacterias adheridas por espécimen. Inferior. Tabla con parámetros calculados.  $n=3$ .  $F=10.09$ ;  $p \leq 0.0001$ . Parámetros.  $t=0$ ; tasa de fagocitosis ( $\text{Cels cells}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) = 0; tasa de formación de vacuolas ( $\text{Vac cells}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) = 0; Tasa de limpieza bacteriana ( $\text{Cels cells}^{-1} \text{mm}^{-2}$ ) = 0.
- Relación entre las bacterias adheridas por superficie amebiana y la tasa de eliminación bacteriana. Proporción de bacterias adheridas por espécimen. Inferior. Tabla con parámetros calculados en promedio. Análisis de correlación lineal:  $F=25,88$ ;  $p < 0.0001$ , tomando en cuenta que  $\text{Prob} > F$ . Parámetros.  $t=30$ ; tasa de fagocitosis ( $\text{Cels cells}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) = 300; tasa de formación de vacuolas ( $\text{Vac cells}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) = 20; Tasa de limpieza bacteriana ( $\text{Cels cells}^{-1} \text{mm}^{-2}$ ) = 24490.

## DISCUSIÓN

La primera parte de este trabajo mostró que las amebas de vida libre del género *Acanthamoeba* forman copas fagocíticas, en las cuales se toman flóculos o bloques de bacterias, a este evento le siguen la formación de las vacuolas, que incorporan las bacterias; y que como se corroboró en este modelaje, estas vacuolas conteniendo bacterias entran en proceso de digestión y este contenido desaparece por completo, llegando a presentarse cero en tasas de formación de vacuolas.

En esta segunda parte de este trabajo demostró que la fagocitosis de los aislados ambientales de *Acanthamoeba* capturan y fagocitan bacterias desde los primeros 5 min; tiempo en el cual se alcanzó la mayor tasa de fagocitosis, indicando la capacidad y el control vacuolar de los compartimientos intracelulares en este género. De las cepas de *Acanthamoeba*, *A. castellanii*-Valle Mezquital presentó la de mayor actividad fagocítica con respecto a las otras cepas, siendo este proceso muy rápido y tan solo en 10 minutos las vacuolas entran en digestión del contenido.

El control de la fagocitosis por el sistema vacuolar ha sido descrito previamente por Bowers *et al.* (1981). Los compartimientos vacuolares tienen que digerir o expulsar el material no digerible después de transcurrido el tiempo de “digestión”.

El tiempo en el que transcurre la fagocitosis fue estudiado también por Oates y Touster (1976), los cuales encontraron enzimas de fagolisomas implicadas en la digestión del material ingerido. Stewart y Weisman (1972), encontraron que después de 2 horas ocurre un proceso de exocitosis o expulsión del material no ingerible, explicando así el declive de la fagocitosis.

Resultados similares a los mostrados en este trabajo en cuanto a la cinética de la fagocitosis fueron presentados por Avery *et al.* (1995). Estos investigadores encontraron, que ya a los 5 min había una alta fagocitosis de perlas de látex, usadas como presa; con la limitante que las presas fueron artificiales. Avery *et al.* (1995), en *A. castellanii* observaron que los trofozoítos empiezan a expulsar las perlas de látex desde los 20 min. El número de perlas de látex no es comparable con el número de bacterias que puedan ingerir las amebas de vida libre durante la fagocitosis, usando presas digeribles. No obstante, la tendencia encontrada en este trabajo es similar al pa-

trón de fagocitosis encontrado en los aislados de *Acanthamoeba* del Valle del Mezquital. Shaheen y Ashbolt (2021), encuentran también que la fagocitosis es un evento que ocurre muy rápidamente, ya desde los primeros 5 min de interacción entre las especies de *Acanthamoeba* y la presa comienza la internalización y los procesos de digestión del material ingerido, con sus excepciones; corroborando las observaciones de este trabajo.

En este trabajo se encontró que la fagocitosis depende de la tasa de formación de vacuolas, como fue mostrado en los resultados para las diferentes presas probadas en este estudio. *A. castellanii* en el proceso de fagocitosis presentó más de 40 vacuolas conteniendo bacterias fluorescentes por amebas por hora, la máxima tasa de formación de vacuolas que se encontró para estas especies, tomado en cuenta que el diámetro de la presa fue de 1.4  $\mu\text{m}$  en promedio del cultivo de *Klebsiella aerogenes*. Las otras especies de *Acanthamoeba* no fueron tan competitivas, y sus tasas de formación de vacuolas estuvieron por debajo de 10 vacuolas por amebas por hora. De esta misma manera, la cantidad de bacterias fluorescentes consumidas por *A. castellanii*-Valle Mezquital fue de hasta 1.2 millones por ameba por hora. Hay que destacar que tanto las tasas de fagocitosis como de formación de vacuolas no habían sido estudiadas para este género de amebas de vida libre, constituyendo un aporte de este trabajo a la biología de las amebas de vida libre.

Similarmente, Korn y Weisman (1967), encontraron vesículas fagocíticas, usando microscopía electrónica, que pueden contener perlas de látex de entre 0.68 a 2.68  $\mu\text{m}$  bajo condiciones saturadas de perlas de látex y de amebas de libre en el orden de 1 millón, parecido a las condiciones usadas en los ensayos de este trabajo.

Las tasas de limpieza de las diferentes cepas de *Acanthamoeba* del Valle del Mezquital presentaron diferencias significativas, con lo cual se corrobora que la fagocitosis tiene un impacto sobre las metapoblaciones bacterianas en el ambiente y que este depende de las especies de la *Acanthamoeba* que se trate, y como vimos anteriormente depende totalmente de la formación de las vacuolas. En este parámetro en particular, la tasa de limpieza alcanzó hasta 300 mil bacterias por  $\text{mm}^2$  por ameba por hora en *A. griffini* hasta 1.2 millones de bacterias por  $\text{mm}^2$  por ameba por hora en *A. castellanii*. Las tasas de limpieza de la cepa de referencia no fueron diferentes a lo observado con los aislados ambientales, siendo entonces una de las características intraespecíficas y fisiológicas de las especies de *Acanthamoeba*.

Weekers *et al* (1993), realizando estudios sobre la producción de nitrógeno a partir de la biomasa bacteriana, encontraron el aumento de amonio y el crecimiento amebiano, corroborando en parte la idea de que las amebas de vida libre “consumen” bacterias para establecer el crecimiento y la liberación de nitrógeno, que contribuye importantemente en la ecología de los ensamblajes microbianos.

Similarmente a los resultados de este trabajo, Weekers *et al.* (1993) establecieron que hay especies de amebas de vida libre fueron más exitosas; tal es el caso de *Hartmanne llaveriformis* que presentó una alta tasa de crecimiento, con la presa de Enterobacterias, *E. coli* K-12, y *K. aerogenes*. Otras amebas de vida libre, como la misma *A. castellanii* y *A. polyphaga* presentaron comportamientos semejantes a *H. vermiformis*. La producción de amonio fue también mayor con enterobacterias, como se presentó, también, en este trabajo con el modelo de *A. castellanii* y *A. graffini* del Valle del Mezquital y la presa de *K. aerogenes*, una enterobacteria. La preferencia por algunas de las especies bacterianas que encontramos aquí en este trabajo también fue determinada por Weekers *et al.* (1993), siendo las enterobacterias las más consumidas.

Otras especies probadas por Weekers *et al.* (1993), habitantes comunes de los ensamblajes microbianos en suelo, *Agrobacterium tumefaciens*, *Arthrobacter simplex*, y *Pseudomonas fluorescens* son presas que también soportan el crecimiento amebiano y la producción de amonio. Otras potenciales presas fueron medidas también para fagocitosis, tal es caso de *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), y *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), todas cepas patogénicas para el hombre, todas las cuales fueron ingeridas, excepto *S. aureus*, que, aunque fue fagocitada no fue ingerida, indicando que hay un tipo de presa que es favorable para las especies de *Acanthamoeba*.

Un ejemplo del impacto ecológico que tiene *A. castellanii* es el de biopelículas formadas en lentes de contacto y que está basado en la interacción con *Xanthomonas maltophilia* (*X. maltophilia*), *Pseudomonas paucimobilis*, *Flavobacterium breve*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, en las cuales se encontró una alta tasa de crecimiento de las amebas de vida en estos ambientes (Bottone *et al.* 1992).



La interacción de las amebas de vida libre del género *Acanthamoeba* con microorganismos de ensamblajes microbianos diversos fue también analizada por Wright *et al.* (1981), usando un método clásico, en el cual, los trofozoítos de *A. castellanii* fueron incubados en placas de agar inoculados con cianobacterias (Bacterias Gram negativas fotosintéticas, no proteobacterias); encontrando que los trofozoítos de *A. castellanii* fagocitaban cianobacterias de las especies *Gleocapsa alpicola*, *Anacystis nidulans*, *Anabaena flas-aquae*, y *Anabaena cylindrica*, al formar placas en la superficie del agar, indicando con ello que son también importantes reguladores de bacterias, tanto en ambientes acuáticos como en el suelo.

Es evidente que las especies de *Acanthamoeba* presentan una gran preferencia por las enterobacterias. Los resultados de este trabajo muestran que las especies del género de *Acanthamoeba* probadas en este estudio fagocitaron todas una enterobacteria, *K. aerogenes*. Similarmente, Shaheen y Ashbolt (2021), encontraron que *A. Polyphaga* y *H. vermiformis* “consumen” con preferencia a *E. coli* sobre *Legionella pneumophila*, que sin embargo es fagocitada, pero no digerida.

Hallazgos muy importantes de este trabajo fueron sobre la adherencia de las bacterias a la superficie amebiana y la digestión como reguladores de la fagocitosis amebiana y su impacto en la tasa de limpieza bacteriana.

La importancia de la superficie amebiana fue analizada por Rogerson *et al.* (1996). Estos investigadores, usando también el marcaje de la presa con fluorocromos y amebas aisladas de sedimentos marinos de diferentes morfotipos, lograron calcular el volumen de las amebas marinas, estableciendo que las amebas más pequeñas tenían más de  $50 \mu\text{m}^3$  y consumen  $10 \text{ bac}^{-1} \text{ h}^{-1}$  por ameba, a medida que aumentaba el volumen de las amebas hasta  $61.021 \mu\text{m}^3$ , aumentaba el consumo de las bacterias hasta  $1.400 \text{ bac}^{-1} \text{ h}^{-1}$  por ameba.

La extensión de la membrana también fue observada por Bowers *et al.* (1981), mediante microscopía electrónica. Estos autores encontraron que el volumen celular aumenta 5% y la membrana plasmática se extiende, durante los primeros 5 min de fagocitosis, siendo el diámetro de la membrana de menos de  $0.5 \mu\text{m}^3$ . El diámetro de las vacuolas fue de  $3 \mu\text{m}$ , y el sistema vacuolar formado, en *A. castellanii*, fue de 15-20 vacuolas por ameba, encontrando hasta 40 cels-1 por ameba. *A. castellanii* presentó también una relación proporcionar entre la extensión de la superficie de la membrana plasmática de 1 unidad logarítmica hasta 1.8 unidad logarítmica y el volumen total va-

cuolar aumenta de 0.2 unidad logarítmica a 0.8 unidad logarítmica, un proceso que tiene que ver directamente con la fagocitosis, al ocurrir el vaciado de las vacuolas disminuye la superficie de la membrana plasmática.

Los resultados de este trabajo establecen el hecho de que al aumentar superficie de la membrana plasmática amebiana se incrementa la posibilidad de la captura de más bacterias. En el caso de *Burkholderia pseudomallei* ( $\beta$ -proteobacteria) fue observado a nivel de microscopía electrónica una modificación de parches de la membrana plasmática en forma de una proyección que permite que las bacterias queden atrapadas en la membrana plasmática, provocando la fagocitosis de las bacterias en una vacuola por *A. astronyxis*, corroborando los resultados de este trabajo (Inglis *et al.* 2000).

La capacidad de fagocitosis y el impacto de las especies de *Acanthamoeba* en el ambiente es alta. Inglis *et al.* (2000) encontraron  $3.6 \times 10^6$  bacterias en el medio de recuperación, luego del proceso de sonicación del cultivo amebiano, evidenciando la importancia que tienen las amebas de vida libre del genero *Acanthamoeba* en el biocontrol de las bacterias en el ambiente.

De acuerdo al tipo de bacteria se inducen los cambios en la superficie de la membrana amebiana. Así, en la interacción de *L. pneumophila* con *A. castellanii* se forma unseudópodo superenrollado que permite la fagocitosis de esta bacteria (Bozue y Johnson 1996).

Las especies de *Acanthamoeba* no solo despliegan la estrategia de aumentar su superficie celular, sino que también se ha observado en biopelículas formadas en lentes de contacto a partir de bacterias *Xanthomonas*, *Pseudomonas* y *E. coli*, la formación de una matriz en la superficie amebiana, que contribuye a aumentar la posibilidad de que se atrapen más bacterias (Bottone *et al.* 1994).

La importancia que tiene la superficie amebiana en la biología de las amebas de vida libre, fue observada por Bottone *et al.* (1994) a nivel de microscopía electrónica que *X. maltophila*, interaccionaron con “pockets” en los cuales se adhieren estas bacterias a la superficie amebiana en el caso de *A. polyphaga*, en lo que se reconoce como el *glicocalix* de la superficie amebiana. Los resultados obtenidos en este trabajo, en los cuales se observó que la superficie amebiana es una plataforma de interacción con las bacterias, y que es la estructura celular que mayor importancia tiene en la fago-

citosis de bacterias y el papel que juegan en la ecología de las amebas de vida libre.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se encontró que la fagocitosis es regulada por procesos celulares, siendo la superficie de *Acanthamoeba* un mecanismo de captura de bacterias, que depende también de procesos celulares. Por último, se encontró que el impacto de *Acanthamoeba* es importante en la depredación de las bacterias y por supuesto juegan un papel importante en la regulación de las meta-poblaciones bacterianas en el ambiente, especialmente suelo, en donde presentan la mayor abundancia y biodiversidad.

## AGRADECIMIENTOS

A Rosario Sánchez de Vázquez por su asesoría técnica en el análisis por microscopia de fluorescencia de las muestras y el estudio de la adhesión bacteriana.

Al Comité Editorial de esta revista quienes revisaron este trabajo, y gracias a los cuales se construyó una mejor versión del mismo.

## LITERATURA CITADA

AMACKER, N., Z. GAO, J. HU, ALC. JOUSSET, GA. KOWALCHUK y S. GEISEN. 2022. Protist feeding patterns and growth rate are related to their predatory impacts on soil bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol.* 98: 1-11. DOI: 10.1093/femsec/fiac057. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35524686/>.

AVERY, S.V., D. LLOYD y J. L. HARWOOD. 1995. Influence of plasma membrane fluidity on phagocytotic activity in *Acanthamoeba castellanii*. *Biochem. Soc. Trans.* 23: 409S. DOI: 10.1042/bst023409s. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8566297/>

BOTTONE, E. J., A. A. PERE, R. E. GORDON, M. N. QURESHI. 1994. Differential binding capacity and internalization of bacterial substrates as factors in growth rate of *Acanthamoeba* spp. *J. Medical Microbiology.* 40: 2 148-154. DOI: 10.1099/00222615-40-2-148. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8107064/>

BOTTONE, E. J., R. M. MADAYAG, y M. N. QURESHI. 1992. *Acanthamoeba keratitis*: synergy between amebic and bacterial co-contaminants in contact lens care systems as a prelude to infection. *Journal of clinical microbiology.* 30: 2447-2450. DOI: 10.1128/jcm.30.9.2447-2450.1992. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1401013/>

BOWERS, B., T. E. OLSZEWSKI y J. HYDE. 1981. Morphometric analysis of volumes and surface areas in membrane compartments during endocytosis in *Acanthamoeba*. J. Cell. Biol. 88: 509-515. DOI: 10.1083/jcb.88.3.509. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7217201/>

BOWERS, B. y T. E. OLSZEWSKI. 1983. *Acanthamoeba* discriminates internally between digestible and indigestible particles. J. Cell. Biol. 97: 317-322. DOI: 10.1083/jcb.97.2.317. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6350315/>

BOZUE, J. A. y W. JOHNSON. 1996. Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. Infect Immun. 64: 668-673. DOI: 10.1128/iai.64.2.668-673.1996. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8550225/>

FINLAY, B. J. 2004. Protist taxonomy: an ecological perspective. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 359: 599-610. DOI: 10.1098/rstb.2003.1450. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1693346/>

GUILLONNEAU, R., C. BARAQUET y M. MOLMERET. 2020. Marine bacteria display different escape mechanisms when facing their protozoan predators. Microorganisms. 8: 1-25. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121982>

INGLIS, T. J. J., P. RIGBY, T. A. ROBERTSON, N. S. DUTTON, M. HERDERSON y B. J. CHANG. 2000. Interaction between *Burkholderia pseudomallei* y *Acanthamoeba* species results in coiling phagocytosis, endamebic bacterial survival, and escape. Infection and Immunity. 68: 1681-1686. DOI: 10.1128/IAI.68.3.1681-1686.2000. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10678988/>

JAMY M., C. BIWER, D. VAULOT, A. OBIOL, H. JING, S. PEURA, R. MASSANA y F. BURKI. 2022. Global patterns and rates of habitat transitions across the eukaryotic tree of life. Nat Ecol Evol. 6: 1458-1470. DOI: 10.1038/s41559-022-01838-4. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35927316/>

KONG, H. H. 2009. Molecular phylogeny of *Acanthamoeba*. Korean J. Parasitol. 47: 21-8. DOI: 10.3347/kjp.2009.47.S.S21. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2769217/>

KORN, E. D. y R. A. WIESMAN. 1967. Phagocytosis of latex beads by *Acanthamoeba*. II. Electron Microscopic study of the initial events. The J. Cell Biology. 34: 219-227. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2107219/>

NASHER, F. y B. W. WREN. 2024. Unravelling mechanisms of bacterial recognition by *Acanthamoeba*: insights into microbial ecology and immune responses. *Front Microbiol.* 15: 1-10. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1405133. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39247694/>

OATES, P. J. y O. TOUSTER. 1976. In vitro fusion of *Acanthamoeba* phagolysosomes. I. Demonstration and quantitation of vacuole fusion in *Acanthamoeba* homogenates. *The Journal of Cell Biology* 9: 319-338. DOI: 10.1083/jcb.68.2.319. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1245550/>

ORINGIN PRO. 2022. Windows. Northampton, USA: Origin Lab Corporation.

PERTUZ B. S. B., D. MATUZ M., E. CAMPOY, M. MACEK y E. RAMÍREZ F. 2021. Tasa de fagocitosis en las especies de *Acanthamoeba* provenientes de aguas subterráneas. Parte I. *Bol. Centro Invest. Biol.* 55:1-28. DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.5027538>.

PRESCOTT, L. M., J. P. HARLEY y D. A. KLEIN. 2002. *Microbiology*. Fifth edition. McGraw-Hill Higher Education. 1222p.

ROGERSON, A., F. HANNAH y G. GOTHE. 1996. The grazing potential of some unusual marine benthic amoebae feeding on bacteria. *European Journal of Protistology* 32: 271-279. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(96\)80026-5](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(96)80026-5).

RØNN, R., A. E. MCCAIG, B. S. GRIFFITHS y J. I. PROSSER. 2002. Impact of protozoan grazing on bacterial community structure in soil microcosms. *Applied and environmental microbiology.* 68: 6094-6105. PMID: 12450833. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC134433/>

SHAHEEN, M. y N. J. ASHBOLT. 2021. Differential bacterial predation by free-living amoebae may result in blooms of *Legionella* in drinking water systems. *Microorganisms* 9: 1-25. DOI: 10.3390/microorganisms9010174.

SINGER, D., C. V. W. SEPPEY, G. LENTENDU, M. DUNTHORN, D. BASS, L. BELBAHRI, Q. BLANDENIER, D. DEBROAS, G. A. DE GROOT, C. DE VARGAS, I. DOMAIZON, C. I. DUCKERT, IZAGUIRRE, I. KOENIG, G. MATALONI, M. R. SCHIAFFINO, E. A. D. MITCHELL y S. GEISEN, E. 2021. Lara. Protist taxonomic and functional diversity in soil, freshwater and marine ecosystems. *Environ Int.* 46: 106262. DOI: 10.1128/msystems.00316-22. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9426515/>

STEWART, J. R. y R. A. WEISMAN. 1972. Exocytosis of latex beads during. The encystment of *Acanthamoeba*. *The Cell Biology*. 52: 117-130. DOI: 10.1083/jcb.52.1.117. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2108685/>

TOLLIS, S., A. E. DART, G. TZIRCOTIS y R. G. ENDRES. 2010. The zipper mechanism in phagocytosis: energetic requirements and variability in phagocytic cup shape. *BMC Systems Biology* 4: 1-17. DOI: 10.1186/1752-0509-4-149. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21059234/>

WEEKERS, P. H., P. L. BODELIER, J. P. WIJEN y G. D. VOGELS. 1993. Effects of Grazing by the Free-Living Soil Amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on Various Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2317-9. PMID: 16349000. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC182275/>

WEISMAN, R. A. y E. D. KORN. 1967. Phagocytosis of latex beads by *Acanthamoeba*. I. Biochemical properties. *Biochemistry*. 6: 485-497.

WRIGHT, S. J. L., K. REDHEAD y H. MAUDSLEY. 1981. *Acanthamoeba castellanii*, a predator of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 125: 293-300.

ISSN2477-9458

**BOLETIN**  
**DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS**  
AN INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGY  
PUBLISHED BY THE UNIVERSITY OF ZULIA, MARACAIBO, VENEZUELA  
Vol. 58, N° 2, Pp. 158-266, July-December 2024

<b>Leaf Dimensions and photosynthesis of <i>Rhizophora mangle</i> in estuarine areas under contrasting hydrological conditions.</b> <i>Flora Barboza y Ernesto Medina</i> .....	158
<b>Inéditas especies de escarabajos acuáticos del género <i>Anacaena</i> en el Alto Apure, Venezuela (Hydrophilidae: Chaetarthriinae: Anacaenini).</b> <i>Mauricio García Ramírez y Alfredo Briceño</i> .....	174
<b>Phagocytosis rate in species <i>Acanthamoeba</i> from groundwater. Part 2.</b> <i>Silvana Pertuz, Miroslav Macek y Elisabeth Ramírez</i> .....	201
<i>Scientific Notes.</i>	
<b>Contribution to the knowledge of the artisan fishing activity of the Blue crab <i>Callinectes sapidus</i> (Brachyura: Portunidae) in two geographical areas of the Cabimas Municipality, Venezuela.</b> <i>Helimar Vásquez y Edison Pascal</i> .....	222
<b>Plants used by the Kariña tribe in Pueblo Nuevo the Caris, Anzoátegui, Venezuela.</b> <i>Wilmer Díaz y Raúl Rivero</i> .....	238
<b>Instrucciones a los autores</b> .....	247
<b>Instructions for authors</b> .....	257