

**MÉTODO SIMPLIFICADO PARA EL ESTUDIO MORFOLÓGICO POR MICROSCOPIA ÓPTICA Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE ACTINOMICETOS HALÓFILOS.**

**A SIMPLIFIED METHOD FOR THE MORPHOLOGICAL STUDY OF HALOPHILIC ACTINOMYCETES BY COMBINING LIGHT MICROSCOPY WITH SCANNING ELECTRON MICROSCOPY.**

Serrano JA<sup>1</sup>, Sandoval AH<sup>2</sup>, Ramírez N<sup>2,3</sup>, Ventosa A<sup>3</sup>.

1. Grupo de Investigaciones de Actinomicetos Patógenos Humanos y del Suelo. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. E-mail: jacielo@cantv.net.
2. Departamentos de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, México DF. E-mail: hsandov@cueyatl.uam.mx.
3. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla, España. E-mail: ventosa@us.es.

**RESUMEN**

Se propone una técnica simplificada para el estudio, tanto por microscopía óptica como electrónica de barrido, de actinomicetos halófilos, aislados de ambientes hipersalinos del sur de México y de España. Los actinomicetos fueron cultivados en medio sólido para el cultivo de microorganismos halofílicos MH y mantenidos a 37°C durante una semana. Previamente a su incubación, fueron colocados fragmentos de cubre objetos estériles, que se introducían en un ángulo de 45° en el agar del medio. Luego eran retirados y eran prelavados con una solución de sales conteniendo 10% de NaCl y 2% de MgSO<sub>4</sub> y, en seguida, fijados en una solución con glutaraldehído al 2,5%, luego lavados y deshidratados en una serie de etanol (70 al 100%). A continuación las muestras eran, o bien coloreadas por técnicas como Gram o de Kinyoun para alcohol-ácido resistencia, o procesadas para ser observadas en un microscopio electrónico de barrido JEOL-JSM 6300. Con esta técnica simplificada se pudo observar detalles morfológicos tintoriales de estos microorganismos, así como su bien preservada morfología celular externa al microscopio de barrido, observándose las formas filamentosas con la presencia de sus adornos celulares externos, tales como esporas, y la presencia de unas estructuras cristalinas de diversas formas, arreglos y tamaños.

**ABSTRACT**

It is a simplified technique that proposes the morphological studies of Halophilic Actinomyces isolated from hypersaline environments in Southern Mexico and Spain, by combining light microscopy with scanning electron microscopy. For cultivating the halophilic microorganisms, the Actinomyces were inoculated onto a solid medium (MH), and incubated at 37°C for one week. Prior to incubation, fragments of sterile coverslips were introduced at 45° angle in the agar medium. Later, these coverslip fragments were retrieved and washed in a salt solution containing 10% NaCl and 2% MgSO<sub>4</sub>. Afterwards they were fixed in a 2.5% glutaraldehyde solution and then washed and dehydrated through an ethanol series (70 to 100%). These samples were stained by either Gram or Kinyoun methodology. Alternatively, some of the coverslip fragments were processed for observation using a Jeol-JSM 6300 scanning electron microscope. Through these simplified techniques, the tinctorial and morphological details were preserved. The cellular morphology was observed by scanning electron microscopy. By these methods, some details of the filamentous organisms were observed including external cellular components such as spores and unusual crystalline structures exhibiting different forms, arrangements and sizes.

**Palabras-clave:** Actinomicetos halófilos, microscopía electrónica de barrido, microscopía óptica.

**Servicios Personalizados**

Artículo

- Artículo en XML
- Referencias del artículo
- Como citar este artículo
- Traducción automática
- Enviar artículo por email

Indicadores

Links relacionados

Bookmark

| Otros

## INTRODUCCIÓN

Los actinomicetos son bacterias que se caracterizan por la variabilidad de su forma (5-6, 13). La morfología representa el último resultado de la adaptación a un ambiente específico, y por lo tanto representa un parámetro valioso para evaluar el proceso de desarrollo celular en diferentes hábitats (5-6). Es interesante resaltar que tanto en las células eucariotas como en las procariotas existe una muy cercana relación entre la forma y la bioquímica celular (8-9).

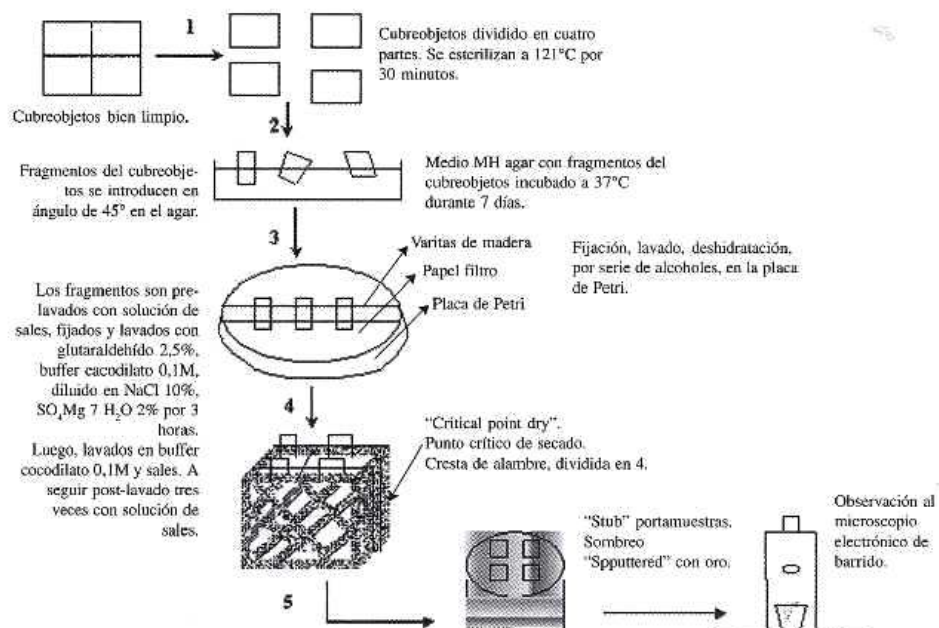
Los actinomicetos conforman un grupo de bacterias filamentosas, Gram-positivas, que producen filamentos ramificados. Algunas especies producen filamentos septados, los cuales, a lo largo de su ciclo de crecimiento fragmentan, produciendo células bacilares y cocoidales; otras especies producen filamentos no septados. A estos filamentos se les denomina micelio, por analogía al micelio que forman los hongos, pero en realidad tiene dimensiones de células bacterianas y composición química de su pared celular propia de organismos procariotes (4,13). Los actinomicetos son microorganismos de distribución cosmopolita, aunque prevalecen en áreas tropicales subtropicales. Algunos de ellos son patógenos para el ser humano y los animales, produciendo lesiones en diversos órganos, tales como el pulmón, el sistema nervioso central y riñones, entre otros, así como lesiones a nivel de la piel y el tejido subcutáneo (13). Algunas de las especies de actinomicetos tienen gran importancia biotecnológica, por su capacidad para producir diversos tipos de metabolitos útiles en la industria farmacéutica, tales como esteroides y antibióticos (13).

Aunque estos microorganismos han sido encontrados en diferentes tipos de hábitat, es sólo recientemente que han sido aislados de ambientes hipersalinos. (1-3, 11,16-17). Estos microorganismos, que son capaces de vivir en ambientes con ciertas concentraciones de sal, pueden ser agrupados dentro de los grupos de microorganismos halotolerantes o halófilos (14), los cuales poseen características morfológicas y bioquímico-metabólicas muy particulares que les permiten vivir en estos medios. Los microorganismos halofílicos son microorganismos muy útiles para el desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos, los cuales tienen diversas aplicaciones industriales (14). El presente trabajo se refiere a una técnica simplificada para el estudio morfológico de los actinomicetos halofílicos, tanto por microscopía óptica como por microscopía electrónica de barrido.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio morfológico fueron utilizadas cepas de actinomicetos halófilos, aisladas de ambientes hipersalinos localizados en el Sur de México (10) y en España. Las muestras fueron examinadas tanto por microscopía óptica como de barrido. Las mismas fueron cultivadas en medio (agar) para bacterias halófilas (MH) (15), e incubadas a 37°C, durante siete días. Para su observación morfológica se siguió la siguiente técnica preparativa ([ver diagrama 1](#)). Cubreobjetos bien limpios fueron cortados, usando para esto a un lápiz de diamante, en cuatro secciones; éstas fueron esterilizadas y, luego de ser esterilizadas, fueron colocadas en un ángulo de cuarenta y cinco grados, en el medio de agar MH y a continuación fueron incubados. En cada placa fueron introducidos unos seis pedazos de cubreobjetos estériles, esto con el objetivo de tomar muestras del crecimiento celular bacteriano a diferentes tiempos. En cada toma de muestras se retiraban dos secciones de cubreobjetos, las cuales eran enseguida procesadas para su preparación para el estudio morfológico.

**Diagrama 1. Metodología utilizada para la preparación de muestras de actinomicetos halófilos para su observación al microscopio electrónico de barrido.**

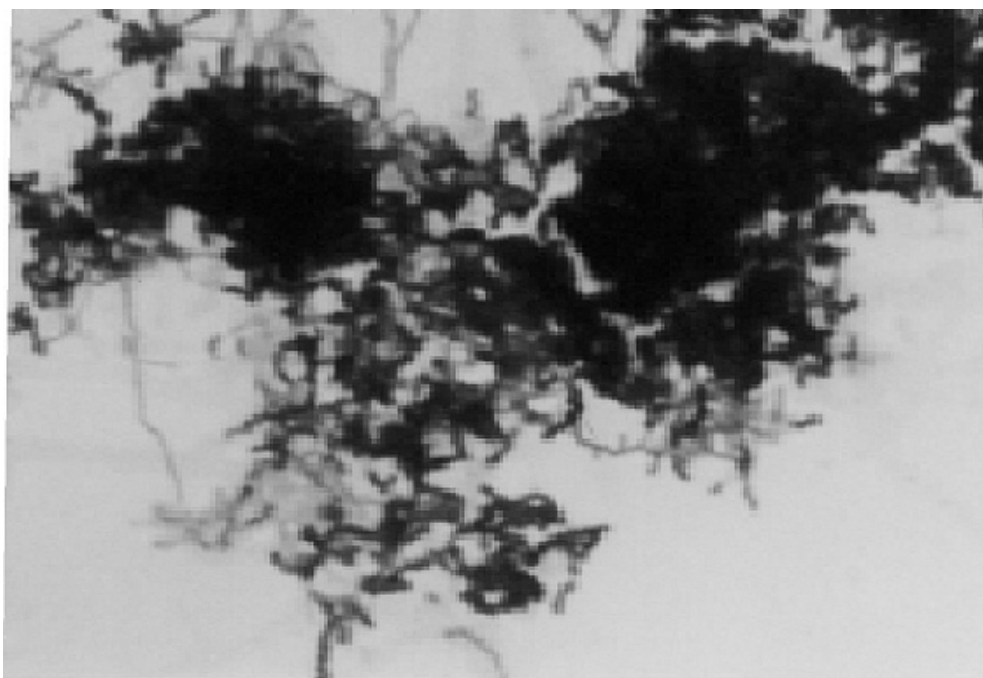
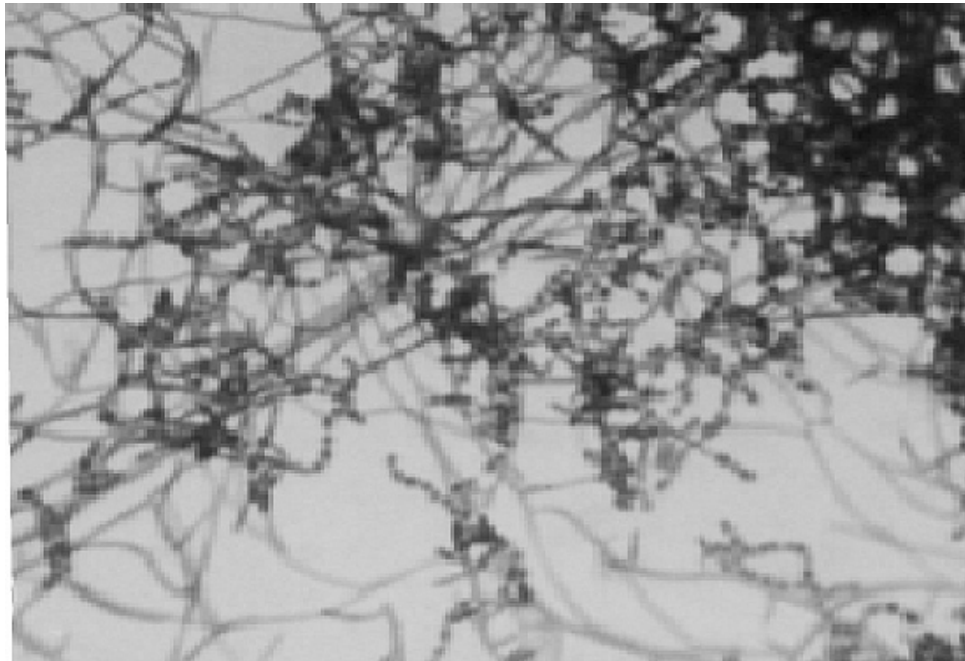


Luego de retirado del agar, la sección de cubreobjetos, con el crecimiento de la muestra, era colocada sobre un

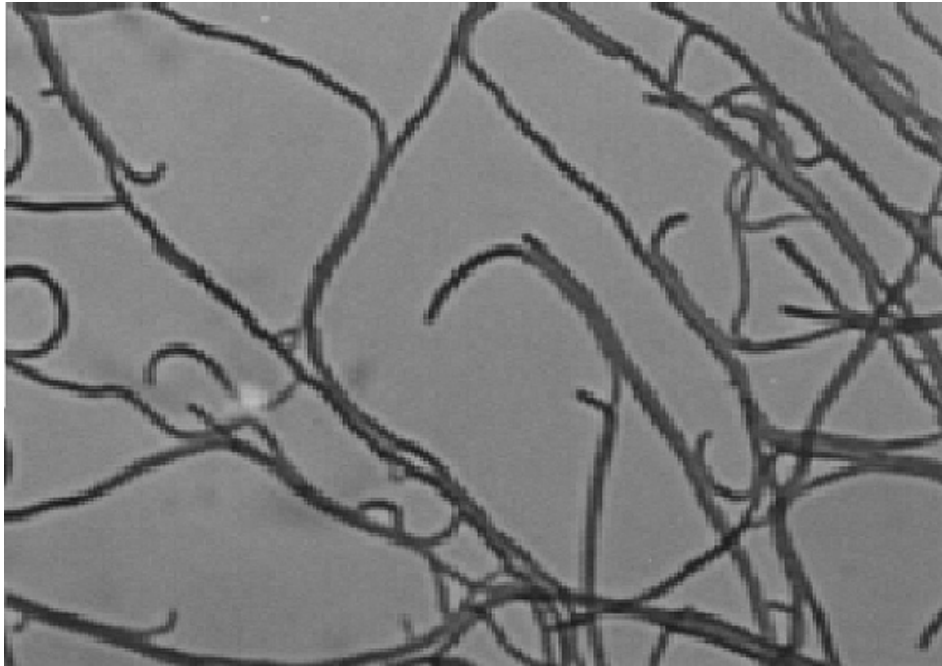
soporte hecho con dos pedazos de aplicadores de madera, colocados los mismos dentro de una caja de Petri. La superficie del fondo de la placa era recubierta con un papel filtro y luego se procedía a lavar las muestras usando una pipeta Pasteur, con una solución de tampón cacodilato al 0,1 M, conteniendo la misma, 10% de NaCl y 2% de  $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . A continuación, las muestras eran cubiertas con una solución de 2,5% de glutaraldehído, diluido en la misma solución usada para el lavado. Posteriormente, las muestras eran fijadas durante tres horas y luego lavadas con la solución de sales. De seguido, las muestras eran deshidratadas en series de etanol, del 70 al 100%, por 10 minutos en cada paso. Para la observación al microscopio óptico, las muestras fueron coloreadas por el método de Gram y el de Kinyoun para alcohol-ácido-resistencia. Para la observación al microscopio electrónico de barrido, las muestras fueron procesadas en un equipo de desecado (critical point dry), marca SAMDRI-780<sup>a</sup> de Tousimis Research Corporation, Rockville MD (EE UU). Luego de su desecación, las muestras fueron colocadas en un portamuestras metálico especial para uso en el microscopio de barrido (stub). Se colocaron cuatro muestras, las cuales eran adheridas al portamuestras usando pintura de plata. Luego, las muestras fueron sombreadas con oro, en un "sputter" Denton Vacuum DESK II (Unidad de Microscopía Electrónica del CINVESTAV, México). Las muestras recubiertas con oro fueron examinadas en un microscopio electrónico de barrido JEOL-JSM-6300, a una aceleración de voltaje de 10KV y aumentos de 5.000x a 25.000x del Departamento de Física del CINVESTAV, México.

## RESULTADOS

En las (figuras 1, 2 y 3) se pueden observar las cepas de actinomicetales halofílicos coloreadas por el método de Gram; éstas se observan como preparaciones muy limpias, sin precipitados, bien coloreadas y conservando sus estructuras, lo que permite una muy buena definición morfológica, tanto del micelio aéreo como de substrato; a mismo se pueden observar sus estructuras (adornos miceliales), tales como las esporas.

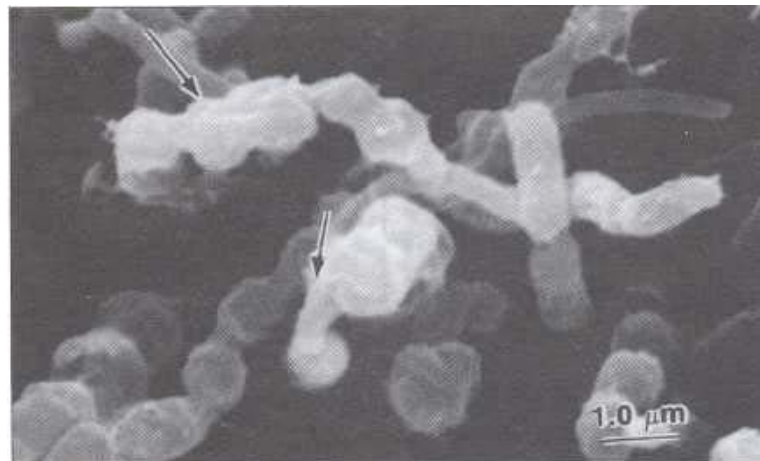


**Figuras 1 y 2: Coloración de Gram de cepa N° LRS4.74, de actinomiceto halófilo moderado, aislada en la Laguna El Rosario, Estado de Oaxaca, México.**

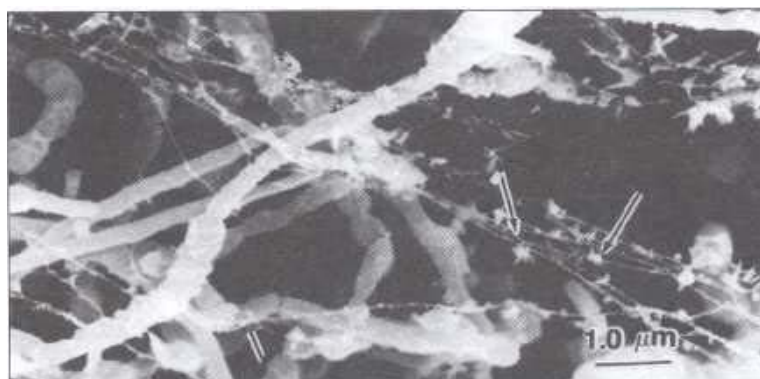


**Figura 3: Coloración de Gram de cepas LRS4.102 de actinomiceto halófilo débil, aislada en la Laguna El Rosario, Estado de Oaxaca, México.**

En las ([figuras 4, 5, 6 y 7](#)) se observan las cepas de actinomicetos halofílicos preparadas para su observación en microscopio electrónico de barrido. Se puede notar que el micelio celular está bien conservado, mostrando estructuras con una turgencia adecuada, lo que permite una buena observación de la morfología de estos microorganismos. La formación de las estructuras cristalinas, presente en la superficie de la célula, se puede observar con una buena definición morfológica, mostrando los diversos tipos de estructuras cristalinas presentes en superficie externa micelial.



**Figura 4: Cepa LRS4.74, vista al microscopio electrónico de barrido. Nótese las formaciones espiraladas (flechas) que adornan la superficie externa de las células filamentosas. 10.000 x.**

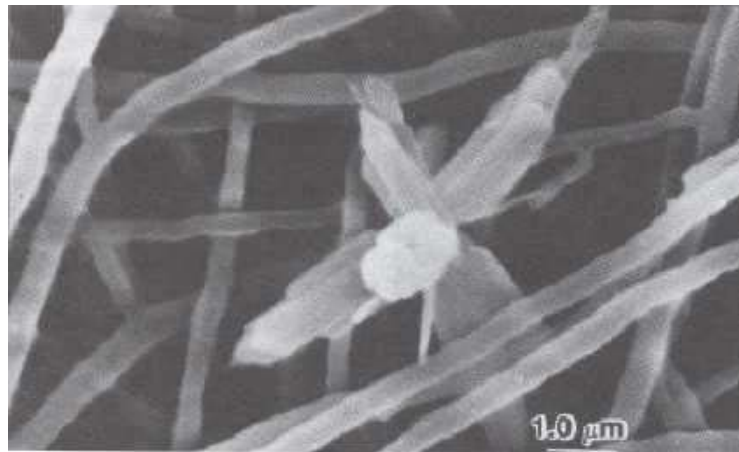


**Figura 5: Cepa LRS4.74, vista al microscopio electrónico de barrido. Nótese las formaciones filamentosas**

finas, como cordones adornados con pequeñas formaciones cristalinas (flechas). 5.000 x.



**Figura 6: Cepa LRS4.102, vista al microscopio electrónico de barrido. Nótese las formaciones filamentosas de las células, las cuales presentan formas cristalinas en su porción celular más externa (flechas). 5.000 x.**



**Figura 7: Cepa LRS4.102, vista al microscopio electrónico de barrido. Detalle a mayor aumento de una de las formas cristalinas que adornan las células filamentosas del actinomiceto halófilo. 10.000 x.**

## DISCUSIÓN

Las técnicas preparativas utilizadas para el estudio de organismos halofílicos extremófilos o halotolerantes generalmente requieren de un adecuado uso de soluciones debidamente balanceadas en su tonicidad, de manera de evitar los procesos de choque osmótico, los cuales introducen cambios muy drásticos en la preservación de la morfología de las células en estudio (3,16-17). La técnica preparativa, descrita en el presente trabajo, usada para estudio morfológico, tanto al microscopio óptico como electrónico de barrido, permite que las mismas se conserven tanto para las observaciones al microscopio óptico como en el de barrido, a diferencia de otros autores que utilizan bloques de agar para realizar sus preparaciones (16-17), las cuales no se pueden conservar para estudios de examen posterior.

Con el uso de esta técnica simplificada se pudo observar la morfología de los actinomicetos halófilos estudiados. Se pudo estudiar las estructuras del micelio, tanto aéreo como de sustrato, así como las características de las estructuras presentes en la superficie externa de la célula y adornos del micelio, tales como esporas únicas o múltiples, así como las estructuras cristalinas presentes en la superficie externa del micelio aéreo de estos actinomicetos. Estas raras formaciones cristalinas, encontradas en estos actinomicetos halófilos, fueron previamente reportadas por Sandoval y col. (12), las cuales, como se puede observar en las [figuras 4-7](#), se encuentran unidas a la capa externa de la pared celular de estos microorganismos. Llama la atención que estas formaciones cristalinas no son solubles en las soluciones tampón utilizadas en los procedimientos preparativos de las muestras para microscopía electrónica de barrido. Estos autores reportan que los cristales observados son ricos en sodio y en carbono orgánico, pero que no contienen cloruros. Según Sandoval y col. (12), estas formaciones cristalinas, con estas características químicas, podrían significar la forma con la que estos actinomicetos regulan el uso del cloruro de sodio, protegiendo así a las estructuras celulares de posibles efectos dañinos de esta sal.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Kouri, del Departamento de Patología del CINVESTAV, México, así como al personal profesional auxiliar y técnico de dicho departamento, por su apoyo logístico para la realización del presente trabajo. A la Auxilia Sra. Alicia Ramírez R., por su apoyo en los procesos técnicos y preparativos. A la Biól. María de Lourdes Rojas M por su apoyo en la preparación de las muestras para el microscopio electrónico de barrido. A la Ing. Ana Berta Sot del Departamento de Física del CINVESTAV, México, por su apoyo en las observaciones al microscopio electrónico

de barrido. A Aída (la pequeña), por su apoyo en la preparación de los medios de cultivo y técnicas microbiológica  
A Yosberlin Vergara, por su trabajo dactilográfico.

## BIBLIOGRAFÍA:

1. Al-Tai AM, Ruan J. *Nocardiopsis halophila* sp. Nov. a New Halophilic Actinomycete Isolated From Soil. International Journal of Systematic Bacteriology 1994; 44: 474-478. [ [Links](#) ]
2. Cui X-L, Mao P-H, Zeng M, Li-W JM, Zhang L-P, Xu L-H, and Jiang C-L. *Streptimonospora salina* gen. nov., s nov. a new member of the family *Nocardiopsaceae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2001; 51: 357-363. [ [Links](#) ]
3. Gochnauer MB, Leppard GG, Komarata P, Kates M, Novitsky T, Kushner DJ. Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. et. sp. Nov., an extremely halophilic actinomycete. Can J Microbiol 1975; 21: 1500-1511. [ [Links](#) ]
4. Goodfellow M, Isik K, and Yates E. Actinomycete Systematics: An Unfinished Synthesis Nova Acta Leopoldina 1999; NF 80, Nr. 312: 47-82. [ [Links](#) ]
5. Goodfellow M. Actinomycetes: *Actinomyces*, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Streptomyces* and related genera. In: Colwell JG, Fraser AG, Marmion BP & Simmons A (Eds) Mackie & McCartney Practical Medical Microbiology, Churchill Livingstone, Edinburgh UK 1996; pp 343-359. [ [Links](#) ]
6. Locci R. Developmental micromorphology of actinomycetes. In Arai, T. (Ed.): Actinomycetes: The Boundaries of Microorganisms, Tokyo: Toppan Co. Ltd 1976; pp 249-297. [ [Links](#) ]
7. Locci R. Micromorphological development of Actinomyces and related genera. Zentralbl. Bakt. I. Abt, Suppl 1976; 6: 173-180. [ [Links](#) ]
8. Morgan P, and Dow CS. Bacteria in Their Natural Environments (Fletcher M, and Floodgate GD. ed). Academic Press, London 1985; pp. 131-169. [ [Links](#) ]
9. Moss MO. The Ecology and Physiology of Fungal Mycelium (Jennings DH. and Rayner ADM. ed.), Cambridge Univ. Press, Cambridge 1984; pp. 127-142. [ [Links](#) ]
10. Ramírez N, Castro K, González A, Márquez MC, Sandoval H, and Ventosa A. Isolation of Actinomycetes from Hypersaline in the South of Mexico. In International Conference on Halophilic Microorganisms Sevilla España 2002. Abstract N° P11. [ [Links](#) ]
11. Ruan JI-Sheng, Al-Tai AM, Zhou Z-H, Qu Liang-Hu. *Actinopolyspora iraqiensis* sp. nov. a New Halophilic Actinomycete Isolated from Soil. International Journal of Systematic Bacteriology 1994; 44: 759-763. [ [Links](#) ]
12. Sandoval H, Serrano JA, Ramírez N, Ventosa A. Unusual Crystal Formation Found in Halophilic Actinomycete. Proceed. IUMS Congress (Paris), the World of Microbes. 2002, pp.195 [ [Links](#) ]
13. Serrano JA, Sandoval AH. (Eds) Manual de Laboratorio para el Estudio de los Actinomicetales Patógeno. Talleres Gráficos ULA Mérida, Venezuela 1992; pp. 27-256. [ [Links](#) ]
14. Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria, Microbiology and Molecular Biology Reviews 1998; 62: 504-544. [ [Links](#) ]
15. Ventosa A. Numerical Taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. J Gen. Microbiol 1982; 4:56-570 [ [Links](#) ]
16. Yassin AF, Galinski EA, Wohlfarth A, Jahnke KD, Schaal KP, Truper HG. A New Actinomycete Species *Nocardiopsis lucentensis* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 1993; 43: 266-271. [ [Links](#) ]
17. Yoshida M, Matsubara K, Kudo T, Horikoshi K. *Actinopolyspora mortivallis* sp. nov., a Moderately Halophilic Actinomycete. International Journal of Systematic Bacteriology 1991; 41: 15-20. [ [Links](#) ]

---

© 2014 Sociedad Venezolana de Microbiología.

Sociedad Venezolana de Microbiología  
Apartado 76635, El Marqués, Caracas - Venezuela



[vrodriguezlemoine@gmail.com](mailto:vrodriguezlemoine@gmail.com); [murrest@gmail.com](mailto:murrest@gmail.com); [finamaria09@gmail.com](mailto:finamaria09@gmail.com)