



Efecto de fijadores en diferentes bacterias estudiadas por Microscopia Electrónica de Transmisión y de Barrido

González Gallardo S¹, Llorente Bousquets A²

¹Laboratorio de Microscopía Electrónica UIM FESC. sofiagongallardo@gmail.com

²Laboratorio de Bioconservación 7 UIM FESC. llorente@unam.mx



Resumen

La microscopía electrónica de transmisión (MET) y de barrido (MEB), buscan obtener imágenes aumentadas con alta resolución y buen contraste, y esto se consigue, con colorantes de alto número atómico como el ácido fosfotúngstico, que resaltan mucho más las estructuras, esta tinción es llamada tinción negativa, así como la post-fijación con tetraóxido de osmio, son muy útiles en la observación de estructuras bacterianas como el Pili, el flagelo bacteriano, otras estructuras de la membrana bacteriana, así mismo, la estructura completa bacteriana y partículas virales.

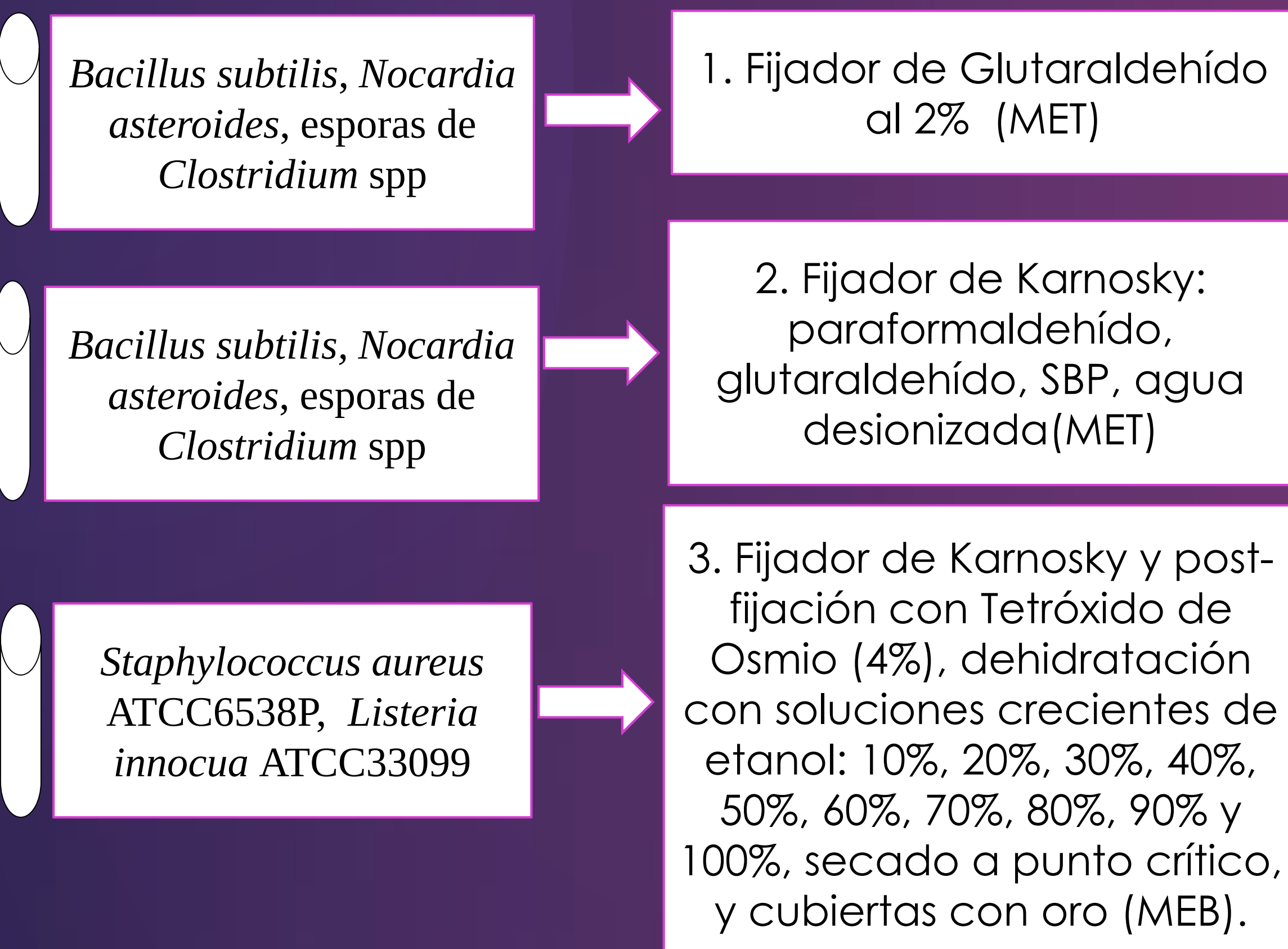
Objetivo

Comparar tres procesos de fijación de bacterias, para una mejor observación de estructuras, aplicando microscopia electrónica de transmisión y barrido (MET y MEB).

Metodología

Para este estudio, las muestras bacterianas (Bacterias Gram positivas) fueron obtenidas del cepario del laboratorio de docencia: *Bacillus subtilis*, *Nocardia asteroides* y esporas de *Clostridium spp.* y del Laboratorio de Bioconservación (UIM) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P y *Listeria innocua* ATCC 33099, y cultivadas en caldo BHI e incubadas a 37 °C durante 24-48 horas.

Se obtuvo 1 mL de cada cultivo y se ajustaron a D.O._{600nm} 0.5 (tubo 2 del nefelómetro de McFarland), fueron lavados con solución amortiguadora de fosfatos (SBP) pH=7.2. Las muestras así obtenidas fueron fijadas por tres métodos.



Observación de estructuras de bacterias Gram positivas al MET y de MEB



Microscopio Electrónico de Transmisión MET



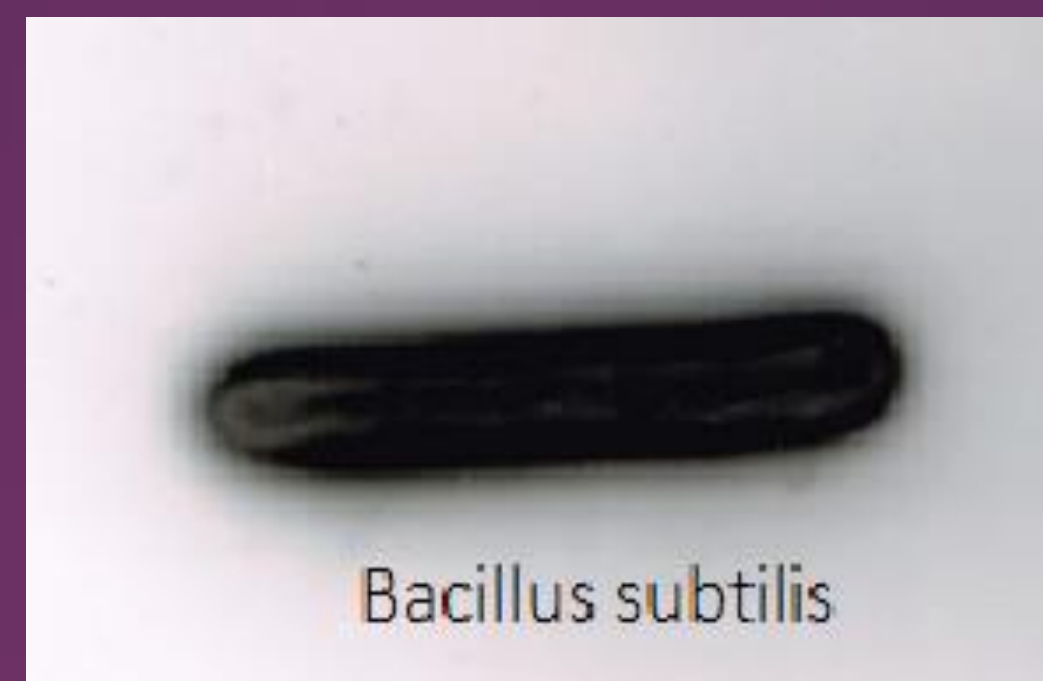
Microscopio electrónico de Barrido MEB

Agradecimiento: PAPIIT IN230820

Resultados

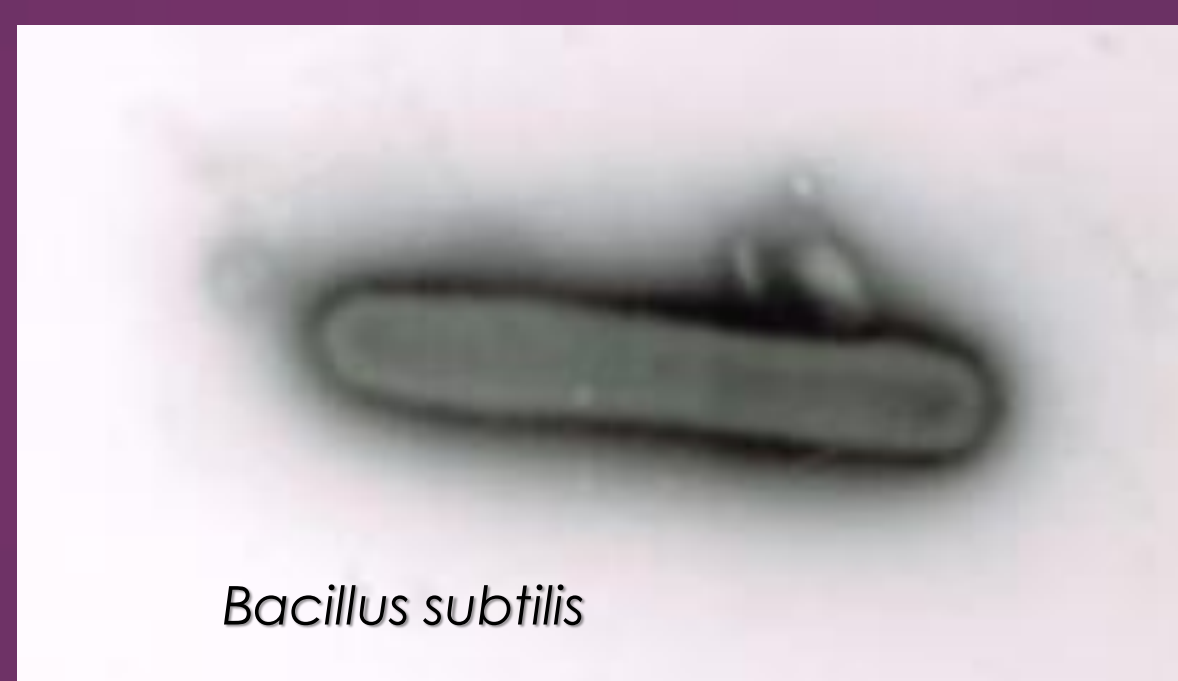
La aplicación de solución de Karnosky en bacterias: *Bacillus subtilis*, *Nocardia asteroides* y esporas de *Clostridium spp.* permitieron una mayor definición de la membrana celular de las mismas, al observarlas con el MET. En las bacterias: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P y *Listeria innocua* ATCC 33099 adicionalmente el uso de tetraóxido de osmio, favoreció poder identificar con el MEB, el daño producido en la pared celular. Los resultados más sobresalientes se presentan en las figuras siguientes.

1. Fijadas con glutaraldehído al 2% en SBP



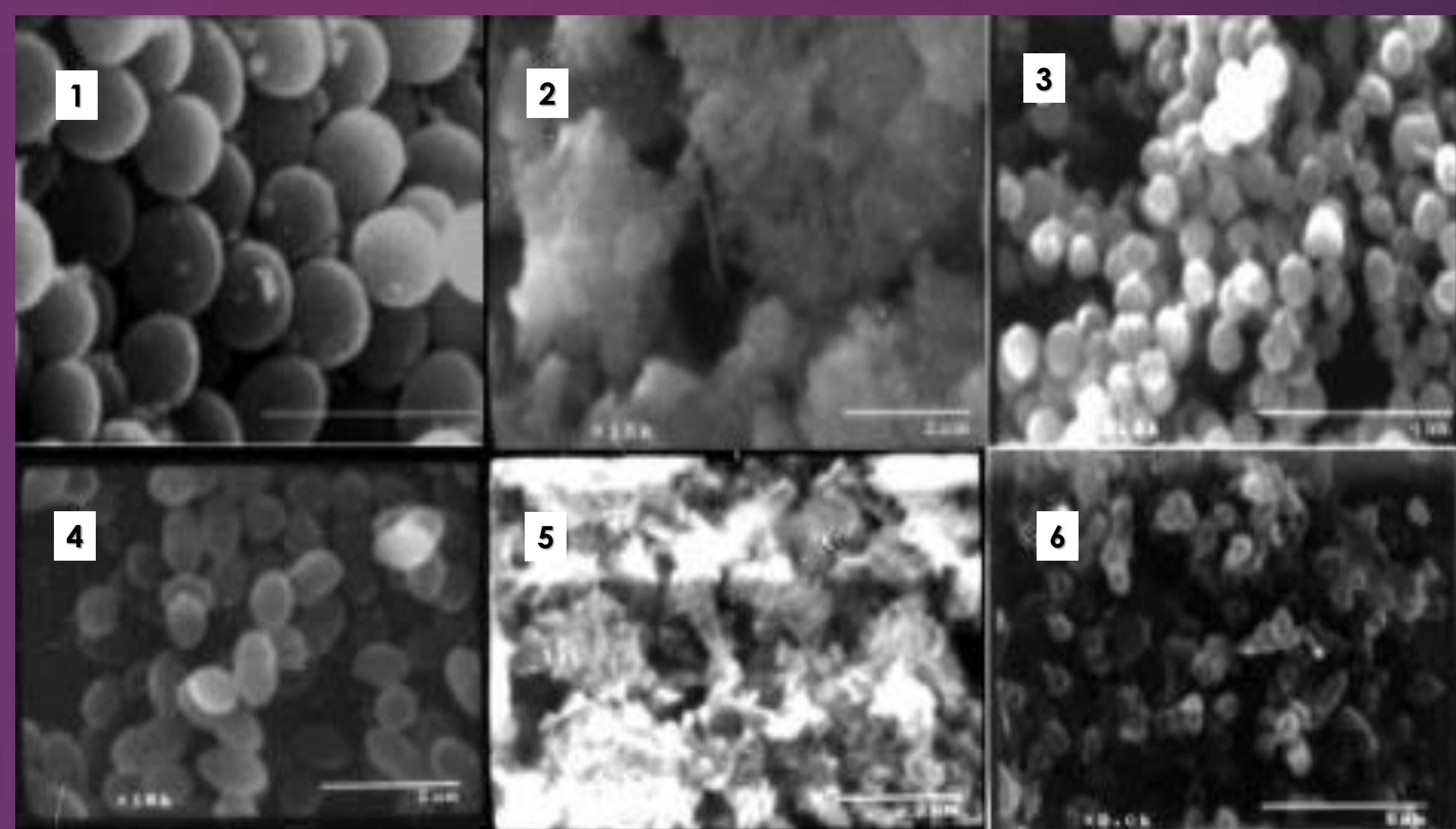
Las muestras fijadas con solución fijadora de glutaraldehído al 2%, en amortiguador de fosfatos, Muestran una buena fijación, aunque menor definición de la membrana bacteriana.

2. Uso adicional de solución de Karnosky



Aplicando adicionalmente, solución de Karnosky, se observan con mayor definición la membrana bacteriana y la espora de *Clostridium* (Biel SS, 1999).

3. Solución de Karnosky y post-fijación adicional con tetraóxido de osmio (4%)



Mayor definición de la membrana celular las bacterias y cambios estructurales producidos, al observarlas al MEB:

1. *S. aureus* y 4. *Listeria innocua* en BHI (control).
2. *S. aureus* y 5. *Listeria innocua* tratadas con sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici*
3. *S. aureus* y 6. *Listeria innocua* tratadas con una solución de Nisaplín 10 mg mL⁻¹

Conclusión

El proceso en la preparación de muestras bacterianas para su observación al Microscopio electrónico de transmisión (MET) o de Barrido (MEB), influyen en gran medida en la obtención de imágenes de alta definición. El uso de fijadores químicos favorece en gran medida la obtención de imágenes que permitan evidenciar claramente las estructuras de los microorganismos (2. Solución de Karnosky). La post-fijación con tetraóxido de osmio adicional, resalta el efecto o daño estructural producido, respecto del control.

Referencias

- Balzola JJ., Russel LD. (1999) Electron Microscopy: principles and techniques for biologists. Toronto Canada. Jones and Bartlett Pub.
- Biel SS, Gelderblom HR, (1999) Diagnostic electron microscopy is still a timely and rewarding. method. J. Clin. virol, 138 (1-2), 105-119.
- Federal Register. (1988) Nisin preparation: affirmation of GRAS status a direct human food ingredient. Fed. Register. 54:11247-11251.
- Ghuysen, J. M. and J. L. Strominger. (1963) Structure of the cell wall of *Staphylococcus aureus*, strain Copenhagen. I. Preparation of fragments by enzymatic hydrolysis. *Biochem.* 338:1110-1119.
- González S., Hernández B.E., (2003) Guía de Microscopía electrónica México (UNAM).
- Hayat. M. A. (2000). Principles and techniques of Electron Microscopy. Biological Applications. New York USA: Cambridge University Press.
- Llorente B. A. (2008) Caracterización de la actividad antibacteriana de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de Doctorado en C. Biológicas. FC-UNAM.
- Llorente-Bousquets, A., Pérez-Munguía, M. and Farrés, A. (2008) Novel extracellular proteolytic activity in *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Can J Microbiol* 54, 694– 699.
- Ojeda Sahagún JL. (1997). Métodos de microscopia electrónica de barrido en biología. Santander España: Universidad de Cantabria.