

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET) APLICADA A LA IDENTIFICACIÓN DE BACILLARIOPHYTAS.

TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY (TEM) APPLIED TO THE BACILLARIOPHYTAS IDENTIFICATION

SANDRA MORALES VELASCO¹, LIDA PATRICIA MOSQUERA SÁNCHEZ²,
SANDRA CARLINA RIVAS ZÚÑIGA³

PALABRAS CLAVE:

Bacillariophytas, microscopía electrónica de transmisión, identificación.

KEY WORDS:

Bacillariophytas, scanning electron microscopy, identification

RESUMEN:

Los detalles morfológicos que presentan el grupo de las Bacillariophytas generan errores en la identificación, donde la microscopía electrónica de barrido (MEB) ha sido una herramienta fundamental para la clasificación taxonómica, pero requiere esfuerzo de tiempo por la complejidad en la preparación de las muestras y altos costos que limitan la utilización de este instrumento. Por tal razón se evaluaron tres técnicas para microscopía electrónica de transmisión (MET) previa limpieza de los frústulos de las diatomeas: 1: sombreado en evaporador al vacío, 2: Fijación con vapores ósmicos, 3: Tinción con acetato de uranilo para 10 minutos de exposición y 4: Tinción con acetato de uranilo para 5 minutos exposición

ABSTRACT

The morphologic details present to the group of the Bacillariophytas, cause in many of the cases errors in the identification, this condition has constituted Scanning Electron Microscope (SEM) like a tool fundamental for classification, but require effort of time by the complexity in the sample preparation and stops costs that limit the use of this instrument. For such reason three techniques for Transmission Electron Microscopy (TEM) previous cleaning of the frústulos of the diatomeas to evaluated: 1: shaded in evaporator to the emptiness, 2: Fixation with osmic steam, 3: with acetate of uranilo (5 min) and 4: with acetate of uranilo (10 min).

Recibido para evaluación: Diciembre 18 de 2007. Aprobado para publicación: Febrero 14 de 2008

1 Facultad de Ciencias Agropecuarias – Universidad del Cauca.

2 Unidad de Microscopía Electrónica, Vicerrectoría de Investigaciones – Universidad del Cauca

3 Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación – Universidad del Cauca

INTRODUCCIÓN

Los organismos acuáticos presentan inconvenientes en la identificación taxonómica, debido al tamaño y a los detalles morfológicos, los cuales sólo pueden observarse bajo microscopio electrónico [1], como las estructuras rígidas que forman exoesqueletos, generalmente, simétricos y específicos de cada especie como se presentan en los radiolarios y Bacillariophytas. [2]

Esta variedad de ornamentaciones genera errores y confusiones en la tipificación de las especies, por lo que se ha utilizado con mayor frecuencia la microscopía electrónica de barrido (MEB) [3,4,5], herramienta fundamental para la identificación de diatomeas pero que requiere esfuerzo de tiempo por la complejidad en la preparación de las muestras y en algunos casos los altos costos limitan la utilización de este instrumento. Tal condición llevo a evaluar diferentes técnicas para utilizar microscopía electrónica de transmisión (MET) como una herramienta práctica en la determinación de individuos de la familia *Bacillariophyceae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar diferentes métodos de MET, se colectaron muestras de diatomeas en un recipiente de 50 ml, al que se le adicionó lugol-acético para la fijación de las células [6]. Se extrajo una alícuota de 10 ml, lavada con agua destilada con el fin de remover el preservante (agitar, centrifugar a 1500 rpm – 10 minutos y desechar el sobrenadante). El material concentrado fue sometido a un proceso de digestión ácida, que eliminó la parte orgánica de los frústulos [7], estabilizándose el pH, para mantener la estructura de las valvas de sílice [8].

Terminado el proceso, se prepararon las células usando tres métodos, como se menciona a continuación:

1. Se fijó una gota de la muestra con vapores ósmicos (tetróxido de ósmio al 2%) los vapores de esta solución fijan las células, durante un tiempo de exposición de 1 minuto sobre el portaobjeto, a la que se le adhirieron rejillas de cobre 200 mesh recubiertas por film-soporte (0,5 % en dicloroetano) para que las células se depositaran sobre él, realizando el proceso bajo la cámara de extracción de gases. [9]
2. A las rejillas resultantes del anterior proceso se les adicionó una gota de acetato de uranilo (2%) durante 5 y 10 minutos, se seco con papel filtro y se repitió el proceso hasta dejar evaporar completamente. [9]
3. El material proveniente del tetróxido de osmio fue sombreado con la ayuda de un evaporador al vacío (Jeol JEE- 4x). [10]

Posterior a este procedimiento cada una de las muestras procesadas se colocó en una grilla de cobre y fueron tomadas las fotografías en un Microscopio Electrónico de Transmisión marca Jeol model Jem 1200 Ex – 80.0 kv.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las características estructurales de las diatomeas son la base de la clasificación y descripción de las mismas, presenta una ventaja a nivel paleontológico puesto que la conformación en sílice mantiene las características, permitiendo la descripción de especies ya extintas [11], de acuerdo a esto y a las diferentes técnicas utilizadas se encontraron los siguientes resultados.

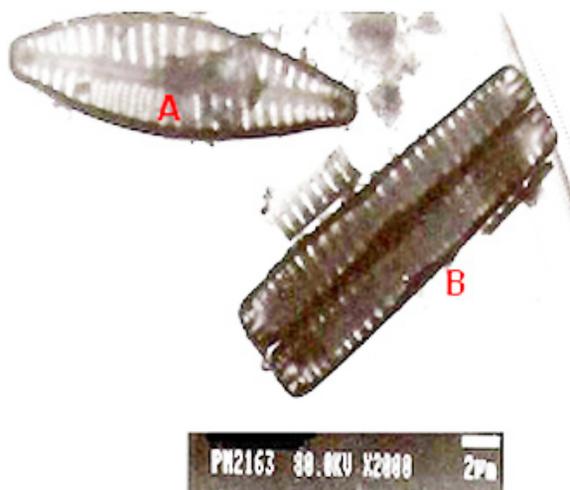
• Tratamiento: Evaporador de Carbono al vacío:

La figura 1, señala la pared celular o caparazón síliceo denominado frústulo, específicamente de una diatomea del genero Gomphonema, el cual esta dividido en dos partes rígidas y ornamentadas (tecas) que encajan una en la otra la más externa la epiteca y la más interna hipoteca, que en algunos casos son denominadas como parte valvar y pleural, respectivamente.

Es de anotar que el registro de la imagen no es el adecuado (figura 1), debido a las acumulaciones de carbono provenientes del sombreado, que no permiten distinguir otro tipo de estructuras diferenciales, para la identificación de la especie. [11]

Las células del genero Gomphonema (Ehrenberg), se distinguen por ser asimétricas en vista valvar y pleural. Las valvas son lanceoladas con un extremo más ancho (Figura 1), predominan en aguas eutróficas, denominándose estenoicas, especializadas en aguas con altos contenidos de materia orgánica proveniente de la descarga de efluentes que contienen heces fecales y sangre producto del sacrificio de cerdos [8]. Son

Figura 1. Diatomeas del género Gomphonema - Escala: 2µm



A: Vista valvar B: Vista pleural.

especies tolerantes a la contaminación, pero no pierden la calidad estenoica, debido a la característica nitrófila que estas presentan [12].

- **Tratamiento: Tetróxido de ósmio:**

Una característica determinante en la clasificación de las diatomeas, es la ornamentación presente en las valvas de los frústulos, que aparece con aspecto de estrías paralelas o entrecruzadas de una extrema finura. [13]

Estas estructuras se pueden apreciar en la figura 2, muestra tratada con Tetróxido de osmio, el cual fijó adecuadamente la célula y permite observar claramente los poros alineados en filas radiales en el caparazón de sílice, los cuales permiten el intercambio con el medio acuático para tomar de él las sustancias que necesita para el crecimiento, reproducción y respiración; estructuras de difícil identificación en un microscopio óptico. [13]

En la imagen (figura 2) se muestra la sección central de una Navicula (Bory de St. Vincent). La célula es simétrica, rafe recto, con un nódulo central bien definido, estrías finas y ligeramente radiadas.

Ecológicamente, el genero esta conformado en gran manera por especies generalistas (Navicula gregaria, Navicula cryptocephala), que presentan una amplitud en el hábitat, sin seguir un patrón estacional, sino que responde a la irregularidad hidrológica. Pueden considerarse como cosmopolitas y tolerantes a las fluctua-

ciones de conductividad, temperatura y concentración de nutrientes. [14]

En cuanto al sistema de clasificación de Diatomeas se basa en la realizada por Simonsen [8] y se complementa por Round (actualmente utilizada).

Se dividen en Orden Pennales y Centrales (llamado el Biddulphiales) estos últimos presentan una simetría radiada, la estructura de la valva está dispuesta en referencia a un punto central de la valva o en referencia a dos, tres o más puntos de manera que aparecen valvas biangulares, triangulares o poligonales no aparecen rafes (ni pseudo rafes). [13]

La figura 3, muestra claramente las particularidades de las especies agrupadas en el orden Pennales (disposición no radial). Los detalles expuestos en esta imagen, se lograron por la utilización del Tetróxido de osmio como reactivo fijador de la célula y sin el empleo de sustancias para la tinción de la misma.

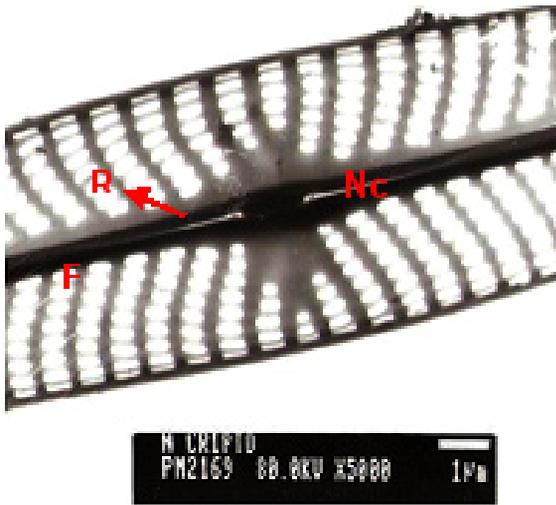
En la fotografía (figura 3) se observa las diferencias en el eje transversal de la estructura de la valva, dispuesta en referencia a una línea central que para este caso es nódulo terminal o en referencia a un punto sobre la valva, que podría ser el rafe.

Para tales efectos se dividió en dos ejes, uno longitudinal y otro transversal, señalando las estructuras anteriormente anotadas (figura 3).

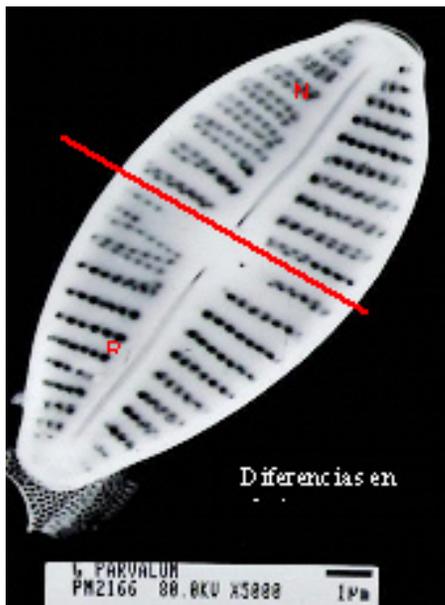
Las células de Gomphonema parvalum, son lanceoladas, con los extremos capitados, rafe levemente ondulado y estrías paralelas y punteadas (Figura 3). Se ha registrado en humedales eutróficos de México sensible a cambios bruscos y progresivos, provocados por la presencia de sólidos en suspensión, contaminantes del agua y se refleja en el incremento de la población. [18]

En la figura 4, se observa el ejemplar del género Pinnularia (Ehrenberg), presenta células lineo-lanceoladas con extremos redondeados a subcapitados. Las estrías transapicales son cortas, ligeramente radiadas, encargadas de realizar el intercambio osmótico de la célula.

Al igual que otros géneros (Cymbella, Gomphoneis, Amphora y Nitzschia, entre otros), Pinnularia presenta simetría bilateral a lo largo del eje longitudinal, pero no en transversal [11] (Figura 4).

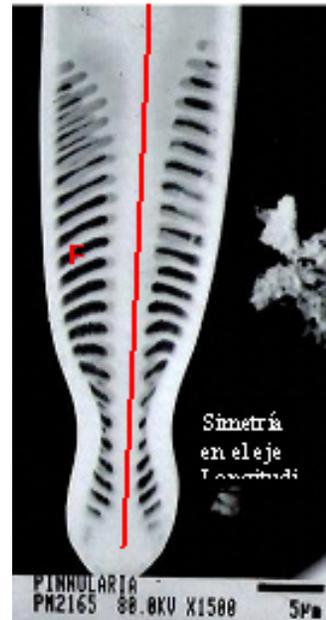
Figura 2. Diatomea del género *Navicula* - Escala: 1 μ m

Nc: Núcleo Central, R: Rafe y E: Estrías.

Figura 3. *Gomphonema parvulum* - Escala: 1 μ m

Nt: Nódulo Terminal. R: Rafe

Esta diatomea, muestra unas estrías radiadas y convergentes en los extremos, el área central presenta estauros amplio. Considerada como eurioica ampliamente tolerante [7], utiliza los aportes de materia orgánica alóctona procedente de la escorrentía y la degradación parcial de la materia orgánica adyacente a las lagunas;

Figura 4. *Pinnularia* sp. - Escala: 5 μ m

E: Estrías transapicales.

coincidiendo con su carácter eurusuátrico, pionero y con sus preferencias nitrófilas; es decir, se identifican con una amplia tolerancia ecológica [19]

- **Tratamiento: Tetróxido de ósmio y acetato de uranilo (2%) durante 10 minutos**

La figura 5, muestra los poros y el nódulo terminal de *Navicula cryptocephala*, la imagen se muestra un poco oscura y se tiene la sensación de fotografía movida o corrida, como consecuencia del prolongado tiempo de exposición a los reactivos utilizados para la fijación y tinción.

La célula, presenta un extremo redondeado, capitado a globoso, las estrías son paralelas y ligeramente radiadas y el nódulo terminal se dirige en dirección opuesta al nódulo central (Figura 5).

Ha sido descrita como diatomea heterotrófica facultativa, condición que favorece la reproducción en ecosistemas extremos, presentando variabilidad morfológica (tamaño, estrías y rafe) que dificulta su determinación taxonómica [15,16,17], por la cual, deberá tenerse precaución en la utilización de este tratamiento para no generar error en la identificación de las Bacillariophytas.

• **Tratamiento: Tetróxido de Osmio y Acetato de Uranilo (2%) 5 minutos**

La figura 6, exhibe el género *Eunotia* (Ehrenberg), asimétrico a los ejes longitudinales y apicales, hay poca definición en las estructuras del alga, a lo mejor por el poco tiempo de exposición a los reactivos utilizados para la tinción de la célula.

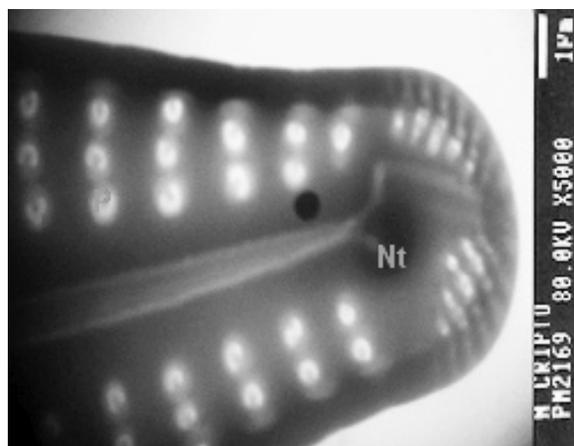
A pesar de la claridad de la fotografía, se pueden identificar las valvas finamente estriadas; las estrías son paralelas y se hallan dispuestas perpendicularmente al eje longitudinal recurvado.

El rafe es corto y poco visible en los nódulos polares ligeramente arqueadas, isopolares, ápices redondeados, margen ventral recto o ligeramente cóncavo, con nódulos polares pequeños. [20]

Se observa un ensanchamiento en el centro de la valva, cerca de la margen ventral las estrías se interrumpen a menudo formando una línea muy clara a lo largo de la valva.

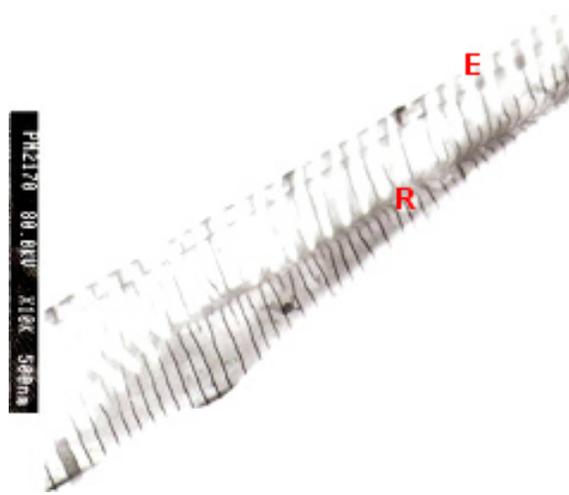
Eunotia, se halla relacionados con pH bajos, soportan ciertos incrementos en concentración de nutrientes y pueden acumular y almacenar en sus células fósforo soluble y particulado (detrito), para usarlo cuando su concentración en el agua sea menor algo similar ocurre con el suministro de nitrógeno combinado, el cual fijan del nitrógeno atmosférico y de esta forma no dependen de él. [20]

Figura 5. Diatomea *Navicula cryptocephala* - Escala: 1 μ m



P: Poros, Nt: nódulo terminal

Figura 6. *Eunotia* sp. - Escala: 50 μ m



E: Estrías paralelas trans apicales, R: Rafe

CONCLUSIONES

El tratamiento con Acetato de Uranilo (5 minutos), las estructuras no se tiñeron adecuadamente, dando como resultado unas fotografías claras o con alta luminosidad que pueden generar errores en la identificación de las especies.

El tratamiento durante 10 minutos Acetato de Uranilo, generó una imagen oscura pero que permite identificar las estructuras de la célula tratada, pero da la sensación de una fotografía movida, condición que puede generar error en la identificación de algunas especies.

El evaporador al vacío con carbono, tiñó la célula de tal forma que el registro obtenido fue oscuro y se encubren estructuras del alga fundamentales para su identificación.

Como se pudo observar el sistema de preparado de las células con vapor con Tetróxido de Osmio es una técnica eficiente que permite obtener la información y observar a través de la microscopía electrónica de transmisión (MET), las estructuras del alga.

Los procesos con Acetato de Uranilo y Evaporador con carbono, además de no generar imágenes claras, incrementan un paso más en el tratamiento de las células de Bacillariophytas, que se reflejan en incremento de los costos y sin beneficio para el trabajo de identificación.

RECOMENDACIONES

Se debe tener especial cuidado con el proceso de digestión ácida, con el fin obtener frústulos limpios y esto se refleje en la nitidez de las fotos.

En caso de tener una muestra muy densa o con muchas células de diatomeas, hacer la respectiva dilución y posterior a esto centrifugar durante 5 minutos a 2000 rpm

Sería de gran aplicación realizar ensayos con Acetato de Uranilo, para periodos comprendidos entre los 6 y 9 minutos.

AGRADECIMIENTOS

A la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad del Cauca.

REFERENCIAS

- [1] DIEZ MORENO B. 2001. Diversidad del Picoplancton Eucarita Mediante Metodos Moleculares. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. 2001. 169 pp
- [2] CORMA, F. REY, J. RIUS, M. J. SABATER, S. VALENCIA. 2004 : Nature, 431, 287–290, b) A. Corma, F. Rey, S. Valencia, ES Patent 2/245,588 2005
- [3] RIVERA, PATRICIO, CRUCES FABIOLA & VILA IRMA. 2003. *Cyclotella ocellata* pantocsek (Bacillariophyceae): Primera Cita En Chile Y Comentarios Sobre Su Variabilidad Morfológica. *Gayana Bot.* vol.60 no.2 Concepción 2003
- [4] VARGAS-MONTERO, M & FREER, E. 2004. Proliferaciones Algales De La Diatomea Toxigénica *Pseudo-Nitzschia* (Bacillariophyceae) En El Golfo De Nicoya, Costa Rica *Revista De Biología Tropical.* ISSN 0034-7744 Versión Impresa Rev. Biol. Trop V.52 Supl.1 San José Sep. 2004.
- [5] TAPIA, P.M., E.C. THERIOT, S.C. FRITZ, F. CRUCES & P. RIVERA. 2003. Distribution And Morphometric Analysis Of *Cyclostephanos Andinus* Comb. Nov., A Planktonic Diatom From The Central Andes. *Diatom Research* (En Prensa).
- [6] FERRARIO, E.C., ALVEAL K., E. OLIVEIRA. 1995. *Manual de Métodos Ficológicos.* Ed. Anibal Pinto S.A. Universidad de Concepción – Chile
- [7] SIMONSEN, R. 1974. The diatom plankton of the Indian Ocean Expedition of R/V "meteor" 1964–1965 . *Meteor Forsch Ergebnisse Reihe D.* 19:1 - 107
- [8] MORALES-VELASCO, S. 2006. Caracterización De Las Comunidades Del Perifiton En Tres Lagos De La Meseta De Popayán Y Su Uso Como Indicadores De Estado Trófico. Tesis de Maestría, Recursos Hidrobiológicos Continentales. Universidad del Cauca. 2006
- [9] BILLARD CHANTAL Y CHRETIENNOT-DINET. 1995. Métodos para el estudio de los fitoflagelados. Ed. Anibal Pinto S.A. Universidad de Concepción – Chile.
- [10] MOESTRUP, O & A.H. THOMSEN. 1980. Preparation of shadocast whole mounts. In E, Gantt (Ed) *Handbook of Phycological methods- Development and Cytological methods.* Cambridge Univ. Press. Cambridge: 385:390
- [11] LUQUE, R., RICO, R., LEÓN, Y. & ESTRADA, J. 2001. Algas Con Células Flageladas De Condición Heteroconta. Facultad De Ciencias-Universidad De Los Andes
- [12] SILVA-BENAVIDES, A.M. 1995. The use of water chemistry and benthic diatom communities for qualification of a polluted tropical river in Costa Rica Institute für Botanik, Universität Innsbruck. Sternwartestrasse 15, A-6020, Innsbruck, Austria. Current address: INBio, Sto. Domingo de Heredia, Heredia, Costa Rica. Rec. 7-IV-1994. Rev. 19-VIII-1994. Accep. 25-I-1995
- [13] ROUND, F.E, R.M. CRAWFORD & D.G. MANN. 1990. *The diatom. Biology and morphology of the genera.* Cambridge University Press. Great Britain. 747 pp
- [14] QUINTANA, X. D., SUÑER, L., TROBAJO, R., GAS-CÓN, S., & MORENO-AMICH, R. 2004. Nutrientes y renovación del agua en aiguamolls de l'Empordà (NE de la Península Ibérica). Uso potencial de agua residual para la inundación de zonas húmedas. *Limnetica* 16: 49-59.
- [15] TROBAJO, R., COX, E. J., & QUINTANA, X. D. 2004. The effects of some environmental variables on the morphology of *Nitzschia frustulum* (Bacillariophyta), in relation its use as a bioindicator. *Nova Hedwigia* (en prensa).
- [16] GIORGIO, P., VINOCUR, A.L., LOMBARDO, R.J., TELL, H.G. 1991. Progressive changes in the structure and dynamics of the phytoplankton community along a pollution gradient in a lowland river - A multivariate approach. *Hydrobiologia* 224: 129-154.

- [17] PALMER, C.M. 1969. A composite rating of algae tolerating organic pollution. *J. Phycol.* 5: 78-82
- [18] LICEA - DURÁN, S. 1990. Sistemática y distribución de diatomeas de la laguna de Agiabampo, Son., Sin., México. *Anal. Inst. Cien. Mar Limnol. UNAM.* 1: 99-156
- [19] JONES, C. LEWIN, P. 1996. Bioassessment of the BMP Effectiveness in Mitigating Stormwater Impacts on Aquatic Biota. In: *Effects of Watershed Development and Management on Aquatic Ecosystems.*
- [20] OLIVA-MARTINEZ, M.G, J.G. RAMIREZ-MARTINEZ., G. GARDUÑO-SOLORZANO, J. CAÑETAS-ORTEGA, 2005. Caracterización diatomológica en tres cuerpos de agua de los humedales de Jilotepec-Acthuaca, Estado de México, *Hidrobiológica* 15(1): 1-26