

Evaluación de la coloración diferencial de fluorescencia modificada en *Pseudomonas* spp. aisladas de suelo

*Evaluation of the Modified Fluorescence Staining Differential on *Pseudomonas* spp. Isolated From Soil*

Albarado Y., Luzmila y Flores F., Evelin

Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. Escuela de Ciencias,
Departamento de Bioanálisis, Laboratorio de Microbiología General y
Laboratorio de Histología. Cumaná, Venezuela.
E-mail: luzalv@gmail.com, luzalv@hotmail.com

Resumen

Se evaluó la coloración diferencial de fluorescencia modificada en *Pseudomonas* spp. aisladas de suelos de cultivos agrícolas del estado Sucre, a fin de observar eventos microscópicos relacionados con el ciclo celular. Cada especie de *Pseudomonas* identificada bioquímicamente se sembró en caldos incubados a temperatura ambiente, aerobiosis, durante 15, 20, 30 y 45 minutos, y 1, 24, 48 y 72 horas; luego, se elaboraron y colorearon los extendidos. En las 24 cepas de *Pseudomonas* identificadas, *P. mendocina* (41,67%), *P. aeruginosa* (37,50%) y *P. putida* (20,83%), se observaron variaciones de tinción en los diferentes tiempos de incubación como verde, amarilla y anaranjada, fluorescentes y de baja fluorescencia. La coloración emplea naranja de acridina que se intercala al ADN, provocando fluorescencia verde, e interactúa con el ARN provocando fluorescencia anaranjada; el decolorante remueve el naranja de acridina no unido al material genético y la fluoresceína de sodio produce color amarillo en bacterias que retienen suficiente cantidad de naranja de acridina. Las variaciones de tinción citoplasmática en *Pseudomonas* spp., están asociadas a la cantidad de ARN y ADN presente en la célula de acuerdo a la fase de su ciclo celular.

Palabras clave: *Pseudomonas* spp., coloración de fluorescencia modificada, naranja de acridina, fluoresceína, suelos.

Abstract

The modified fluorescence staining differential was evaluated using *Pseudomonas* spp. isolated from cultivated agricultural soils in the State of Sucre, in order to observe microscopic events related to the cellular cycle. Each species of biochemically identified *Pseudomonas* was inoculated into a broth and incubated at room temperature, aerobiosis, for 15, 20, 30 and 45 minutes and 1, 24, 48 and 72 hours; then, slides were made and stained. For the 24 identified strains of *Pseudomonas*, *P. mendocina* (41.67%), *P. aeruginosa* (37.50%) and *P. putida* (20.83%), staining variations such as green, yellow and orange, fluorescent and low fluorescence were observed for the different incubation times. The stain uses acridine orange that interacts with DNA by intercalation, causing green fluorescence; it interacts with RNA by electrostatic attraction causing orange fluorescence; the alcohol-acetone decolorant removes the acridine orange not united with the genetic material and sodium fluorescein produces a yellow color in bacteria that retain a sufficient amount of acridine orange. Cytoplasmic staining variations in *Pseudomonas* spp., are associated with the amount of RNA and DNA present in the cells according to the phase of their cellular cycle.

Key words: *Pseudomonas* spp., modified fluorescent staining, acridine orange, fluorescein, soils.

Introducción

El ciclo celular aborda la replicación y segregación de cromosomas y plásmidos, síntesis de componentes de membrana y pared, y división celular. En un principio, el conocimiento concerniente a la división celular, se obtuvo empleando modelos experimentales de bacterias Gram positivas y Gram negativas como *Escherichia coli*, *Caulobacter crescentus* y *Bacillus subtilis* (1). Actualmente, se han tratado de descifrar mecanismos de división celular en procariotas, aprovechando para ello nuevos modelos bacterianos que ayuden a esclarecerlo (2). Las células bacterianas crecen en longitud con pocos cambios en su diámetro, hasta alcanzar un tamaño crítico que es, generalmente, el doble de su longitud original. Luego, la división celular es iniciada en la mitad del diámetro de la célula, con la formación de un anillo contráctil largamente comprimido de proteína FtsZ (1, 2, 3). Recientes avances tecnológicos, han esclarecido el enlace entre la división celular y segregación de cromosoma, sugiriendo una compleja y gran organización de la célula bacteriana (4).

El estudio cromosómico se realiza por técnicas genéticas y físicas, su observación al microscopio óptico se puede realizar empleando el método histoquímico de Feulgen, microscopía electrónica, también por microscopía de contraste de fase y microscopía de fluorescencia, aplicando fluorocromos para ácidos nucleicos como el bromuro de etidio, 4',6'-diamidina-2-fenilindol (DAPI), naranja de acridina, entre otros (5, 6). Weart y Levin (3) usaron el fluorocromo DAPI para la visualización microscópica del material cromosómico bacteriano, como método complementario para el estudio del crecimiento celular.

La tinción con naranja de acridina es empleada, generalmente, en medios o muestras donde la visualización de bacterias es difícil, permitiendo detectar bacterias, sin embargo, no indica si son Gram positivas o Gram negativas. Originalmente, se ideó para observar bacterias en muestras de suelo, hoy en día es muy aplicada en el laboratorio de microbiología para detectar bacterias en frotis de líquidos y exudados; actúa tiñendo el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN) (7, 8).

Fazii y col. (9) idearon un método de coloración de fluorescencia para la diferenciación entre bacterias Gram positivas y Gram negativas, basada en el uso de naranja de acridina que interactúa con componentes de la pared celular, alcohol etílico-acetona para decolorar y fluoresceína de sodio que origina el sistema rojo/verde. Según los autores, el decolorante, tal vez, desestabiliza la membrana externa de las bacterias Gram negativas, removiendo parcialmente el naranja de acridina; de tal forma que al incorporar la fluoresceína, se produce un efecto de coloración diferencial, donde las bacterias Gram positivas se tiñen de amarillo fluorescente y las Gram negativas de verde fluorescente. Fazii y col. (9) y Ciancaglini y col. (10) emplearon la coloración diferencial de fluorescencia en hemocultivos y muestras de orina, obteniendo elevada sensibilidad en la detección de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

El colorante naranja de acridina es un colorante que ofrece un mejor contraste entre la bacteria y el material de fondo (11). Dubytska y col. (2), lo emplearon para evaluar el fenotipo bacteriano, en su estudio sobre el rol de la proteína FTsZ de *Borrelia burgdorferi* en la división celular.

En el presente estudio, el método diferencial de fluorescencia modificado, fue evaluado usando diferentes aislados de *Pseudomonas* spp. procedentes de suelos de cultivos agrícolas del estado Sucre, a fin de observar eventos microscópicos relacionados con el ciclo celular.

Metodología

Aislamiento e identificación de *Pseudomonas* spp.

Las especies de *Pseudomonas* estudiadas se aislaron de muestras de suelo, procedentes de diferentes zonas agrícolas del estado Sucre. Para el cultivo microbiológico, se

pesó 1 g de muestra y se colocó en 10 ml de buffer estéril de sulfato de magnesio (0,1 mol/l MgSO₄) con el propósito de disgregar las bacterias adheridas a las partículas de suelo. Luego, se realizaron diluciones seriadas en caldo Luria Bertani, LB, (Difco Laboratories, USA) desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁹; posteriormente, se colocó 1 ml de cada dilución en una placa de Petri estéril y se agregó agar LB fundido con 50 µg/ml de nistatina para inhibir el desarrollo de hongos, iniciando el proceso con la dilución 10⁻³, colocándolas a temperatura ambiente y aerobiosis durante 24 a 48 horas (12). La identificación de las colonias sugestivas de *Pseudomonas*, se realizó empleando pruebas bioquímicas según lineamientos sugeridos por Koneman y col. (7) y Forbes y col. (11). La evaluación de la caracterización bioquímica, se realizó utilizando las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Preparación de extendidos

A partir de las cepas identificadas del género *Pseudomonas*, se inocularon ocho (8) caldos tripticasa de soya (Difco Laboratories, USA) por cada especie, proporcionándole las siguientes condiciones: temperatura ambiente (27°C), atmósfera de aerobiosis (7), durante tiempos de incubación de 15, 20, 30 y 45 minutos, y 1, 24, 48 y 72 horas. Una vez cumplido el período de incubación, se procedió a elaborar por triplicado extendidos en portaobjetos limpios y desgrasados, dejándose secar al aire para luego ser fijados por calor.

Método de coloración diferencial de fluorescencia modificado

Se ensayó la tinción a una concentración de naranja de acridina doble sal hemi (Sigma-Aldrich, USA, N° cat. A 6014) de 0,05% en buffer acetato pH 4,0, ante una concentración de 0,002% de fluoresceína de sodio (Sig-

ma-Aldrich, USA, N° cat. F 6377), diluida en buffer acetato a pH 4,6.

Preparación de soluciones colorantes

Solución de naranja de acridina al 0,05%: se preparó en buffer acetato pH 4,0. Para un volumen de 100 mL de solución de naranja de acridina, se agregó 0,05 gramos de naranja de acridina doble sal hemi (cloruro de zinc) en 100 mL de buffer acetato pH 4,0. El buffer de acetato pH 4,0, se preparó mezclando 82 mL de ácido acético (0,2 mol/l) con 18 mL de acetato de sodio (0,2 mol/l) (9).

Decolorante: el decolorante alcohol-acetona se preparó como una solución 50%-50%. Para 100 ml de solución se mezclaron 50 ml de alcohol etílico y 50 ml de acetona (9).

Solución de fluoresceína de sodio al 0,002%: se preparó diluyendo 0,002 g de fluoresceína de sodio (9) en 100 ml buffer acetato pH 4,6. El buffer se obtuvo con 52 ml de ácido acético 0,2 mol/l y 48 ml de acetato de sodio 0,2 mol/l (9).

Procedimiento de coloración

Para cada una de las tinciones ensayadas se siguió el protocolo de coloración empleado por Fazii y col. (9). Se cubrió la lámina con la solución de naranja de acridina por dos minutos, una vez cumplido el tiempo se lavó con agua de chorro y se procedió a decolorar con alcohol etílico-acetona, exactamente por diez segundos, inclinando la lámina en un ángulo aproximadamente de 45, nuevamente se lavó con agua de chorro; posteriormente, la lámina fue cubierta con la solución de fluoresceína de sodio por dos minutos y al cabo de ese tiempo, se lavó con agua y se dejó secar a temperatura ambiente para su posterior observación microscópica.

Identificación microscópica

La observación microscópica se realizó empleando un microscopio de epifluorescencia marca Olympus BX 60, utilizando el filtro azul estándar (U-MWB2) del microscopio, el cual es un cubo que incluye un filtro de excitación de banda azul amplia de 450-480 nm, espejo dicromático de 500 nm y un filtro de barrera de 515 nm, recomendado por la casa comercial para los estudios con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y naranja de acridina. Las láminas se observaron con aumento de 1000X.

Resultados

Se identificaron 24 cepas correspondientes al género *Pseudomonas*, de las cuales 10 (41,67%) fueron caracterizadas como *P. mendocina*, 9 (37,50%) como *P. aeruginosa* y 5 (20,83%) *P. putida*.

La evaluación microscópica de los extendidos coloreados por el método diferencial de fluorescencia modificado, mostró que todos los aislados de *Pseudomonas* presentaron un comportamiento similar, observándose las mismas coloraciones e intensidades de fluorescencia en las bacterias para cada tiempo de incubación.

A los 15 minutos de incubación, se observó que todos los extendidos presentaron predominio de bacilos verdes no fluorescentes (Figura 1). El examen microscópico a los 20 minutos, mostró bacilos verdes de baja fluorescencia, apreciándose en algunas estructuras circulares de color verde fluorescente, dispuestas en los polos de la célula (Figura 2).

Los extendidos a los 30 minutos, presentaron abundante cantidad de bacilos verdes fluorescentes; asimismo, se observaron bacilos amarillos no fluorescentes y de baja fluorescencia en escasa cantidad, no observándose estructuras internas (Figura 3).



Figura 1. Fotomicrografía de *Pseudomonas aeruginosa* a los 15 minutos de incubación, mostrando bacilos verdes no fluorescentes. Coloración diferencial de fluorescencia modificada. 1000x.



Figura 2. Fotomicrografía de *Pseudomonas mendocina* a los 20 minutos de incubación, mostrando bacilos verdes de baja fluorescencia, con estructuras de material cromosómico ubicadas en los polos (flechas). Coloración diferencial de fluorescencia modificada. 1000x.

La evaluación microscópica a los 40 y 45 minutos reveló la presencia de bacilos de color amarillo fluorescentes y de baja fluorescencia en abundante cantidad, así como cúmulos de bacilos amarillos fluorescentes; también se observaron bacilos verdes de baja

fluorescencia con estructuras circulares en los polos de color anaranjado fluorescentes, y bacilos anaranjados fluorescentes en escasa cantidad (Figuras 4 y 5).

A la primera hora de incubación, se observaron bacilos de color verde de baja fluo-

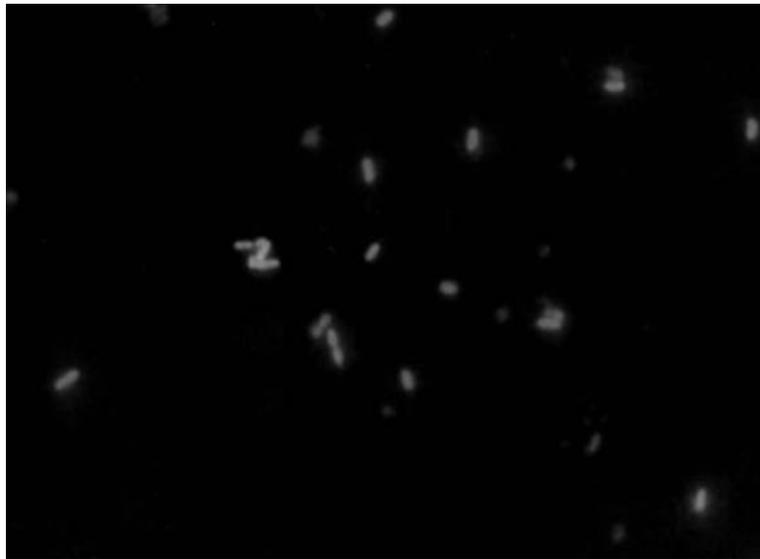


Figura 3. Fotomicrografía de *Pseudomonas aeruginosa* a los 30 minutos de incubación. a) bacilos verdes fluorescentes. b) bacilos amarillos de baja fluorescencia. c) bacilo amarillo no fluorescente. Coloración diferencial de fluorescencia modificada. 1000x.

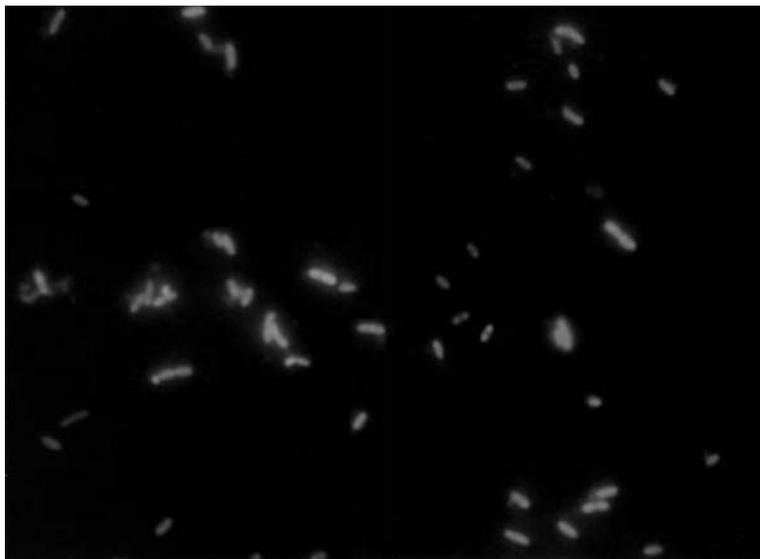


Figura 4. Fotomicrografía de *Pseudomonas aeruginosa* a los 40 minutos de incubación. a) bacilo amarillo de baja fluorescencia. b) bacilos amarillos fluorescentes. c) bacilos verde de baja fluorescencia con estructuras circulares en los polos de color verde fluorescente. d) bacilo verde de baja fluorescencia con estructuras circulares en los polos de color anaranjado fluorescente. e) bacilos anaranjados fluorescentes. Coloración diferencial de fluorescencia modificada. 1000x.

rescencia en abundante cantidad con estructuras circulares de color anaranjado fluorescente en los polos y en posición central, también presentes en cúmulos (Figura 6). A las

24 horas, se observó un predominio de bacilos verdes y anaranjados de baja fluorescencia, aislados y en cúmulos (Figura 7).

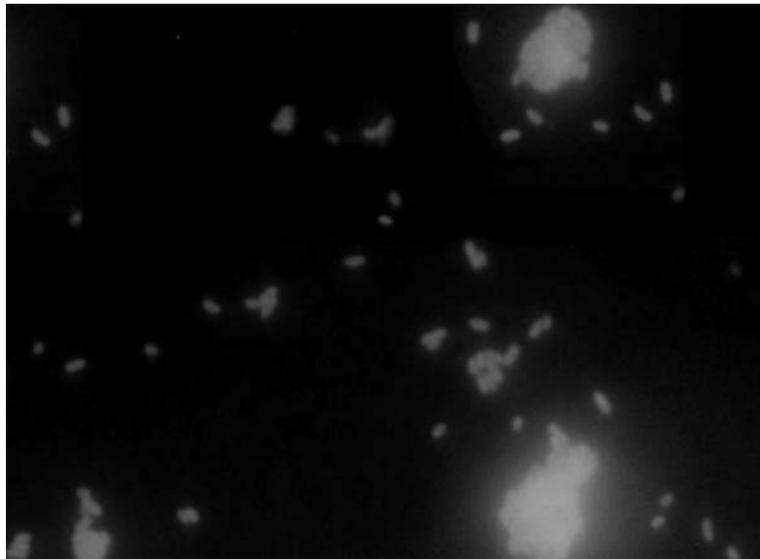


Figura 5. Fotomicrografía de *Pseudomonas aeruginosa* a los 45 minutos de incubación. a) cúmulo de bacilos amarillos de baja fluorescencia. b) bacilos amarillos de baja fluorescencia. c) cúmulo de bacilos amarillos fluorescentes. Coloración diferencial de fluorescencia modificada. 1000x.

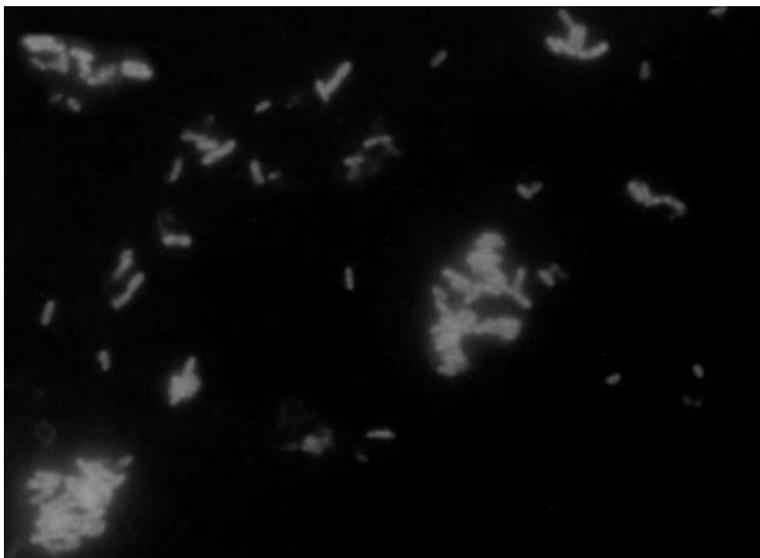


Figura 6. Fotomicrografía de *Pseudomonas putida* a la 1^{era} hora de incubación. a) bacilo color verde de baja fluorescencia con estructuras circulares de color anaranjado fluorescente en los polos y en posición central. b) bacilos anaranjado fluorescente en cúmulos. Coloración diferencial de fluorescencia modificada. 1000x.

Los extendidos a las 48 y 72 horas de incubación, mostraron bacilos con características similares, observándose un predominio

de bacterias con tinción anaranjada fluorescente (Figura 8).

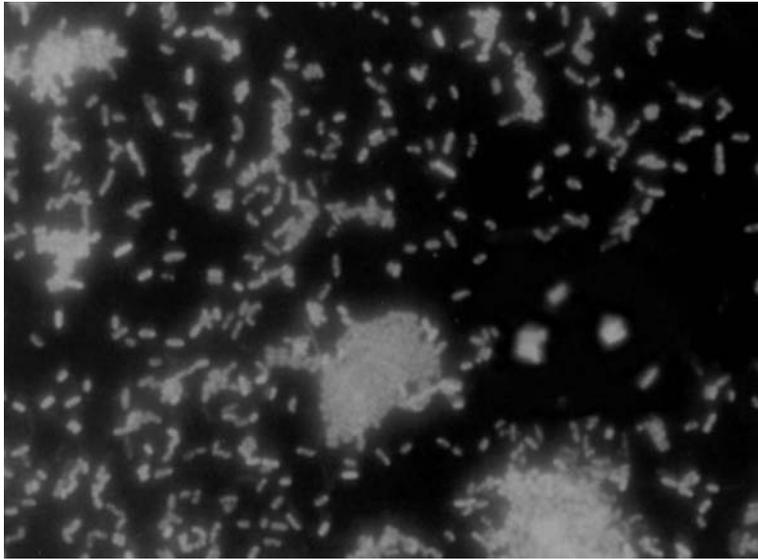


Figura 7. Fotomicrografía de *Pseudomonas mendocina* a las 24 horas de incubación. a) bacilos anaranjados de baja fluorescencia. b) bacilos anaranjados fluorescentes. c) cúmulo de bacilos amarillos de baja fluorescencia. Coloración diferencial de fluorescencia modificada. 1000x.

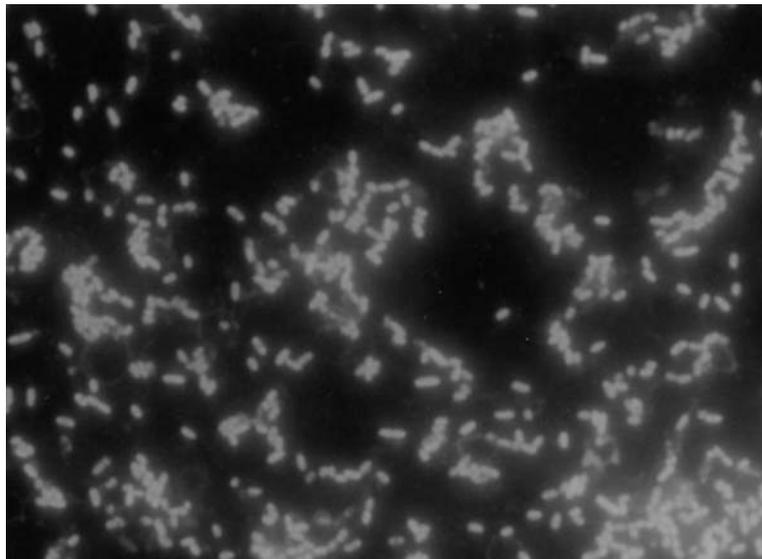


Figura 8. Fotomicrografía de *Pseudomonas aeruginosa* a las 48 horas de incubación, mostrando bacilos con tinción anaranjada fluorescente. Coloración diferencial de fluorescencia modificada. 1000x.

Discusión

Las bacterias se desarrollan en diversos hábitat naturales, representando los suelos uno de ellos, ya que su crecimiento es favore-

cido por las condiciones físicas, químicas y biológicas que allí encuentran. Del total de muestras de suelo analizadas, se identificaron 24 cepas correspondientes al género *Pseudomonas*, siendo *P. mendocina* la más

frecuente (41,67%), seguida de *P. aeruginosa* (37,50%) y *P. putida* (20,83%). Vale señalar, que Souza y col. (13) y Ownley y col. (14), han demostrado la presencia del género *Pseudomonas* como parte de la microbiota de suelo.

A través de la evaluación microscópica por el método de coloración diferencial de fluorescencia, todas las especies bacterianas presentaron las mismas características tintoriales, observándose variaciones en la tinción y en la intensidad de fluorescencia a los diferentes tiempos de incubación ensayados, mostrando tonalidades verde, amarillo y anaranjadas, fluorescentes y de baja fluorescencia, asimismo, se evidenciaron estructuras circulares verdes, amarillas y anaranjadas fluorescentes, ubicadas en los polos y en posición central.

El método diferencial de fluorescencia modificado, emplea bajas concentraciones de naranja de acridina (0,05%) y fluoresceína de sodio (0,002%); el fluorocromo naranja de acridina se intercala en el ADN, produciendo una fluorescencia verde, e interactúa con el ARN por atracción electrostática, manifestando un color anaranjado fluorescente (8,15). Este método, además requiere de una solución decolorante que ayuda a remover el naranja de acridina no adherido al material genético de la bacteria. El segundo fluorocromo utilizado, la fluoresceína de sodio, produce el color amarillo en bacterias que retienen suficiente cantidad de naranja de acridina, por la formación del sistema rojo/verde (9,10). Basados en estos hallazgos, se infiere que tales tonalidades en el color y fluorescencia, corresponden a las diferentes fases de crecimiento en el ciclo celular bacteriano.

El ciclo celular bacteriano comprende una secuencia de acontecimientos interconectados, iniciado con la formación de la célula y culminado con su división en dos células hijas. Este ciclo comprende la fase C, ca-

racterizada por la replicación del ADN cromosómico, una fase D determinada por el crecimiento celular, y por el control del ADN duplicado, que garantiza la seguridad del material cromosómico para comenzar el proceso de división, esta fase finaliza con la división celular; la tercera fase innominada, es el período en el que ocurre una activa síntesis de ARN y proteínas, además de otros componentes celulares (16).

Es probable que el color verde mostrado en las fases iniciales de 15 y 20 minutos de incubación, sea producto de la intercalación del naranja de acridina al ADN, pudiendo corresponder a la fase C del ciclo celular bacteriano.

La tonalidad amarilla de baja fluorescencia, observada en las bacterias a los 30, 40 y 45 minutos de incubación, puede representar a las fases D e innominada, ya que el efecto observado de las tonalidades amarillas se incrementa paulatinamente; a los 30 minutos, algunas bacterias presentan estructuras circulares amarillas de baja fluorescencia en los polos, pudiendo corresponder a los nucleoides donde se inicia el proceso de transcripción. Basándose en el hecho de que el naranja de acridina interactúa con el ARN, y tras la incorporación de la fluoresceína, después del proceso de decoloración, se deduce que esto origina el color amarillo, y además se intensifique el color a medida que aumenta la cantidad de ARN, acentuándose por consiguiente su fluorescencia, de tal forma que la célula adquiera completamente el color amarillo fluorescente.

La tonalidad anaranjada, que en principio aparece en los polos de la célula hasta cubrir completamente el citoplasma, probablemente, se deba a altas cantidades de ARN bacteriano que se combinan con el naranja de acridina, quedando saturada la célula por este fluorocromo, sin poder ser removido por el decolorante, por ende la fluoresceína de

sodio al 0,002% no actúa en el proceso de formación del sistema rojo/verde, y el primer colorante manifiesta su color anaranjado fluorescente. Esta característica tintorial, posiblemente, también forme parte de la fase innominada, por la activa síntesis de ARN.

Los modelos bacterianos mayormente caracterizados para el estudio del ciclo celular son *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*; estos modelos han proporcionado información sobre los procesos de replicación y división celular, y continúan revelando hallazgos sorprendentes (1). En la literatura consultada no se hallaron publicaciones sobre *Pseudomonas* como modelo para el estudio del ciclo celular.

Se ha demostrado que la síntesis de ADN, segregación de cromosomas y división celular se superponen, recientes avances en técnicas genómicas y de imagen celular han pavimentado el camino para el progreso en el entendimiento de la fisión en bacterias y organelas; sin embargo, los factores que dirigen las transiciones del ciclo celular aún no están claros (3, 17).

El método de coloración diferencial de fluorescencia modificado, ofrece la ventaja de ser sencillo, tiene buen efecto de contraste, evidencia microscópicamente material cromosómico, pudiendo ser empleado como una técnica complementaria en el esclarecimiento de los mecanismos moleculares que participan en el ciclo celular.

Se concluye que las variaciones de tinción citoplasmática en *Pseudomonas* spp. observadas por medio del método diferencial de fluorescencia modificado, están asociadas a la cantidad de ARN y ADN presente en la célula de acuerdo a la fase del ciclo celular en la que se encuentre.

Agradecimiento

Se agradece al Consejo de Investigación por el financiamiento de los proyectos CI-2-040102-1283/06 y CI-2-040102-1284/06.

Referencias Bibliográficas

- (1) Angert E. Alternatives to binary fission in bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3: 214-224.
- (2) Dubytska L, Godfrey H, Cabello F. Borrelia burgdorferi ftsZ plays a role in cell division *J Bacteriol.* 2006;188 (5): 1969-1978.
- (3) Weart R, Levin P. Growth rate-dependent regulation of medial FtsZ ring formation. *J Bacteriol.* 2003, 185(9):2826-2834.
- (4) Michie K, Lowe. Dynamic filaments of the bacterial cytoskeleton. *J. Annu Rev Biochem.* 2006; 75:467-492.
- (5) Midigan T., Martinko J., Parker J. Brock. *Biología de los Microorganismos.* Octava edición. Prentice-Hall.Madrid. 1998; p.80-83; 582.
- (6) Olympus. Instructions reflected fluorescence. Olympus Corporation, Japón. 2000; p.9
- (7) Koneman E, Allen S, Janda W. *Diagnóstico microbiológico.* Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 1999; p.90; 251-315.
- (8) Darzynkiewicz, Z. Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with acridine orange. *Meth Cell Biol.* 1990; 33:285-298.
- (9) Fazii P, Ciancaglini E, Sforza R. Differential fluorescent staining method for detection of bacteria in blood cultures, cerebrospinal fluid and other clinical specimens. *Eur J Clin Microb & Inf Dis.* 2002; 21 (5):373-378.
- (10) Ciancaglini E, Fazii P, Sforza G. The use of a differential fluorescent staining method to detect bacteriuria. *Clin. Lab.,* 2004; 50 (11-12):685-688.
- (11) Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Bailey & Scott. *Diagnóstico microbiológico.* Undécima edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 2004; p.130-131; 397-410.

- (12) Wollum, A. II. Soil sampling for microbiological analysis. In: Weaver R, Angle S, Bottomley P, Bezdick D, Smith S, Tabatabai A, Wollum A (ed). Methods of soil analysis part 2. Microbiological and biochemical properties. Book series no. 5. Soil Science Society of America. Madison, Wis. 1994; p.1-14.
- (13) Souza J, De Boer M, De Waard P, Van Beek P, Raaijmakers J. Biochemical, genetic and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. Appl Environ Microbiol. 2003; 69(12):7161-7172.
- (14) Ownley B, Buffy B, Weller D. Identification and manipulation of soil properties to improve the biological control performance of phenazine-producing. Appl Environ Microbiol. 2003; 69(6):3333-3343.
- (15) Nishiwaki H, Ogura Y, Kimura H, Kiryu J, Honda Y. Quantitative evaluation of leukocyte dynamics in retinal microcirculation. Investigative Ophthalmology & Visual science. 1995; 36:123-129.
- (16) Bipatnath M, Dennis PP, Bremer H. Initiation and velocity of chromosome replication in *Escherichia coli* B/r and K-12. Bacteriol. 1998; 180(2):265-273.
- (17) Margolin W. FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005; 6(11):862-871.