



## Short note [Nota corta]

**MODIFIED STAINING FOR OBSERVATION OF FLAGELLA IN *Bacillus amyloliquefaciens* BY OPTICAL MICROSCOPY †**

**[TINCIÓN MODIFICADA PARA OBSERVACIÓN DE FLAGELOS EN *Bacillus amyloliquefaciens* POR MICROSCOPIA ÓPTICA]**

**Nancy Ley-López<sup>1</sup>, José Basilio Heredia<sup>1</sup>, Cesar San Martín-Hernández<sup>2</sup>, J. Ramón Ibarra-Rodríguez<sup>1</sup> and Saúl Raymundo García-Estrada<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>*Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Coordinación Culiacán (CIAD). Km 5.5 Carretera a Eldorado, Campo El Diez, CP. 80110. Culiacán, Sinaloa, México. E-mail: rsgarcia@ciad.mx*

<sup>2</sup>*Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Carretera México-Texcoco km 36.5., Montecillo, C. P. 56230, Texcoco, Estado de México, México.*

*\*Corresponding author*

## SUMMARY

**Background:** *Bacillus amyloliquefaciens* is a plant growth-promoting rhizobacterium and produces several secondary metabolites with antimicrobial activity. One of its most important morphological characteristics is the presence of flagella. Currently the existing staining techniques for bacterial flagellar visualization have limitations; as increased time requirement and unstable reactions of the reagents. **Objective:** Therefore, the objective of this study was to describe a modification in the flagellar staining methodology, to visualize flagella in *B. amyloliquefaciens* bacteria by light microscopy. **Methodology:** Mordant was used (80 mL of 25% tannic acid solution and 15 mL of 2.5% chromium trioxide, it was mixed and left to rest for 5 days at 4 °C) and crystal violet, in bacterial colonies of 16, 18, 20, 22 and 24 h of growth. **Results:** After a growth period of 20-24 h, in bacterial cells of *B. amyloliquefaciens*, the presence of peritric flagella was observed (flagella distributed on the surface of the bacteria), which was possible through the modified flagellar staining technique developed. **Implications:** The correct, fast and practical visualization of bacterial flagella is important for morphological identification. **Conclusion:** In this research it was possible to demonstrate the visualization of bacterial flagella, with a modified technique and less manipulation of the bacteria.

**Keywords:** Rhizobacteria; flagellar staining; peritrichous flagella; bacterial cells.

## RESUMEN

**Antecedentes:** *Bacillus amyloliquefaciens* es una rizobacteria promotora de crecimiento de plantas y produce varios metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. Una de sus características morfológicas más importantes es la presencia de flagelos. Actualmente las técnicas de tinción para la visualización flagelar bacteriana existentes presentan limitantes; como mayor requerimiento de tiempo y reacciones inestables de los reactivos. **Objetivo:** Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue describir una modificación en la metodología de tinción flagelar, para visualizar flagelos en la bacteria *B. amyloliquefaciens* mediante microscopía óptica. **Metodología:** Se utilizó mordiente (80 mL de solución de ácido tánico al 25% y 15 mL de trióxido de cromo al 2.5%, se mezcló y dejó en reposo por 5 días a 4 °C) y cristal violeta, en colonias bacterianas de 16, 18, 20, 22 y 24 h de crecimiento. **Resultados:** Después de un periodo de crecimiento de 20-24 h, en células bacterianas de *B. amyloliquefaciens*, se observó la presencia de flagelos peritricos (flagelos distribuidos en la superficie de la bacteria), lo cual fue posible mediante la técnica modificada de tinción flagelar desarrollada. **Implicaciones:** La correcta visualización, rápida y práctica de flagelos bacterianos, es importante para la identificación morfológica. **Conclusión:** En esta investigación fue posible demostrar la visualización de flagelos bacterianos, con una técnica modificada y una menor manipulación de la bacteria.

**Palabras clave:** Rizobacteria; tinción flagelar; flagelos peritricos; células bacterianas.

† Submitted December 10, 2020 – Accepted December 21, 2020. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License. ISSN: 1870-0462.

## INTRODUCCIÓN

Los flagelos bacterianos son orgánulos de locomoción complejos, capaces de impulsar a la célula bacteriana a través de superficies acuosas o viscosas; además, estos orgánulos desempeñan un papel importante en adhesión a sustratos, formación de biopelículas y participación en el proceso de virulencia en bacterias fitopatógenas (Zhu and Gao, 2020). El número y disposición de los flagelos en la superficie de una célula bacteriana, es una característica importante para clasificar bacterias en distintos grupos (Kodaka *et al.*, 1982; Merino *et al.*, 2006). La tinción de flagelos determina la morfología flagelar de las células bacterianas y se han reportado técnicas rápidas para la caracterización morfológica de bacterias, con las técnicas de tinción Gram y la tinción flagelar (Kodaka *et al.*, 1982; Goldman y Green, 2015), las cuales proporcionan características fenotípicas importantes para la clasificación taxonómica e identificación de las bacterias.

Existen distintos métodos para observar flagelos bacterianos mediante técnicas de tinción flagelar, los más utilizados son los métodos propuestos por Gray y Leifson (Gray, 1926; Leifson, 1951). En ambas tinciones se utilizan dos soluciones con distintos reactivos, una de ellas básica y otra ácida, respectivamente (Kodaka *et al.*, 1982). De acuerdo con Leifson; son métodos complejos de realizar, ya que se observa inconsistencia en los resultados, aun con dichas modificaciones y la dificultad del uso de éstas técnicas, es debido a que el mordiente utilizado no es estable por periodos prolongados y menciona que, a  $25 \pm 1$  °C es satisfactoria solo por unos días; por lo que, al almacenarlo sufre un cambio químico, principalmente en el ácido tánico, que es especialmente inestable en presencia de alcohol y el resultado es una tinción deficiente, impidiendo la visualización de los flagelos, (Leifson, 1951). Además, otro de los inconvenientes de estos métodos es que requieren limpieza especial para los portaobjetos y/o tratamiento térmico durante la tinción; así mismo, se requiere un cuidado especial de la solución de tinción y las células bacterianas (Leifson, 1951; Heimbrook *et al.*, 1989). Distintos autores proponen técnicas de mayor precisión, como la microscopía electrónica y el contraste de interferencia diferencial (DIC) (Ren *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2016). Sin embargo, dichas técnicas (microscopía electrónica y DIC) no siempre están disponibles en los laboratorios de docencia, diagnóstico o de caracterización morfológica de células bacterianas debido a su alto costo y al mayor requerimiento de tiempo.

En un trabajo previo por Ley-López *et al.* (2018), se observó el efecto de inhibición germinativa de zoosporas de *P. capsici* con el uso de *Bacillus* spp.;

así como la identificación de estos microorganismos antagonistas, la especie con mayor efecto inhibitorio del oomyceto se identificó como *Bacillus amyloliquefaciens* (KX953161.1), perteneciente a la familia *Bacillaceae*, cuyas características son aeróbica, ubicua, formadora de endoesporas, flagelos peritricos y Gram positiva (Pinto *et al.*, 2018; Afzal *et al.*, 2019), aislada de la rizósfera en campos agrícolas con cultivos de tomate y chile, en localidades geográficas de Sinaloa, actualmente perteneciente al cepario del Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Culiacán. Algunas especies pertenecientes a este género segregan compuestos que promueven el crecimiento de las plantas y producen metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (Ley-López *et al.*, 2018; Pirog *et al.*, 2019). La identificación de *B. amyloliquefaciens* (KX953161.1) se realizó a través de la caracterización morfológica, bioquímica y molecular; sin embargo, se observó que la técnica de tinción Leifson utilizada para la observación de flagelos, no se logró una visualización exitosa; por lo anterior, se realizó una modificación, la cual no ha sido reportada, y el interés de este trabajo es proporcionar una técnica de tinción flagelar con mayor eficacia. Por lo que el objetivo de este estudio fue modificar la metodología de la tinción flagelar, para visualizar flagelos en la bacteria *B. amyloliquefaciens* mediante microscopía óptica, rápida y práctica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

La cepa utilizada en este estudio *B. amyloliquefaciens* KX953161.1 (Ley-López *et al.*, 2018), fue aislada de la rizósfera en campos agrícolas de distintas localidades geográficas en Sinaloa, México. Esta cepa se cultivó en agar nutritivo (AN), se incubó a 27 °C durante cinco días y se preservó en buffer de fosfato a 4 °C hasta su uso. El microorganismo evaluado en este estudio fue proporcionado por el cepario del Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Culiacán, México.

### Procedimiento para visualización de flagelos bacterianos

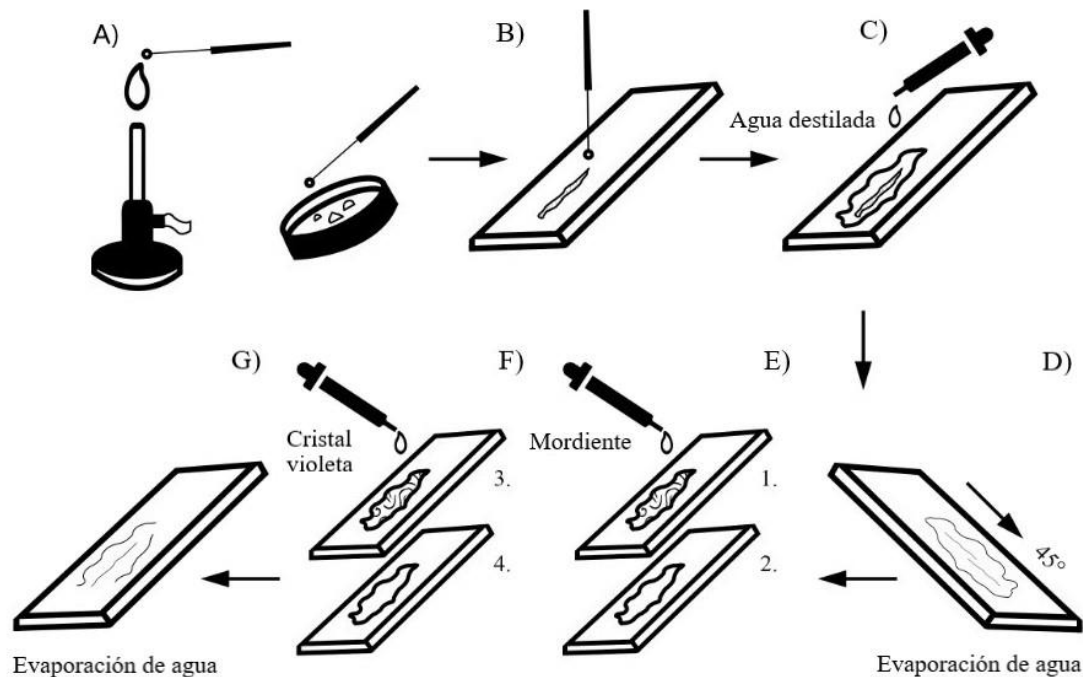
Para esta técnica se prepararon dos soluciones por separado. La primera fue el mordiente, la cual se preparó de la siguiente manera: 80 mL de solución de ácido tánico al 25% y 15 mL de trióxido de cromo al 2.5%, se mezcló y dejó en reposo por 5 días a 4 °C, posteriormente se homogenizó y filtró para eliminar partículas de tamaño no deseadas. La segunda fue una solución acuosa de cristal violeta al 1%. Considerando que el tiempo óptimo en crecimiento de

las colonias bacterianas de distintos géneros para la visualización flagelar es entre 18 y 72 h (Clark, 1976; Leifson, 1951; Heimbrook *et al.*, 1989), se tomaron colonias bacterianas de 16, 18, 20, 22 y 24 h de crecimiento en agar nutritivo (AN) a 27 °C, con la ayuda de un asa bacteriológica esterilizada por flama. Se colocó una línea con las células bacterianas en un portaobjeto previamente limpio y desengrasado (Figura 1). Se colocaron dos gotas de agua destilada estéril sobre la línea con células bacterianas sin movimientos bruscos o agitación, el portaobjeto se inclinó y se dejó evaporar el agua a temperatura ambiente sin exponer a corrientes de aire. Una vez evaporada el agua se agregó el mordiente sobre el portaobjetos por 15 min. Se lavó con agua destilada estéril y posteriormente se agregó cristal violeta 1% por 8 min. De nuevo se hace el lavado con agua destilada estéril. Posteriormente, el portaobjetos se deja inclinado en reposo hasta que el agua se evapore a 20-25 °C, se realizaron seis repeticiones de esta técnica. Las imágenes de los flagelos se observaron en un microscopio Carl Zeiss Imager A2 (Alemania) acoplado con una cámara AxioCam ERc5s, con el uso

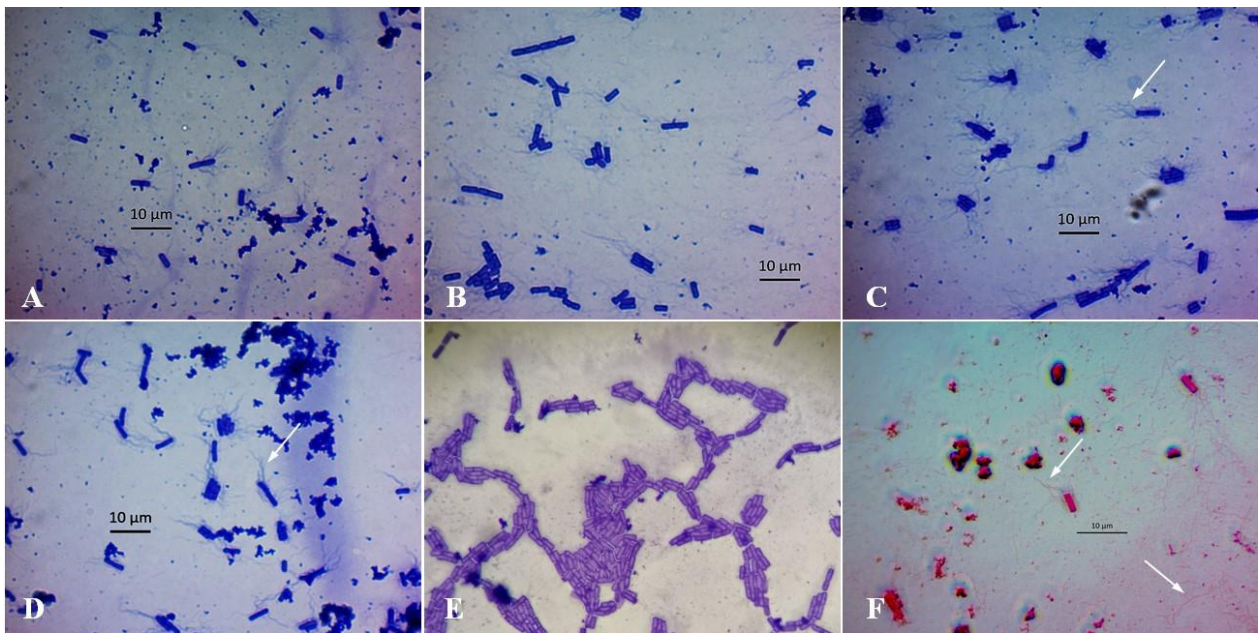
de aceite de inmersión con el objetivo de 100x (Figura 2). Además, se realizó la técnica de Leifson (Leifson, 1951) (Figura 2F), tomando en cuenta el mismo tiempo de crecimiento de las colonias bacteriana que se utilizó en la técnica modificada.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados en la visualización flagelar con la técnica modificada, es fácil de observar en un microscopio biológico compuesto con un objetivo de 100x con aceite de inmersión y el tiempo de crecimiento colonial de *B. amyloliquefaciens* para una observación exitosa está entre las 20 y 22 h (Figuras 2C y D). En dicho momento se visualizan las células bacterianas con flagelos peritricos (flagelos distribuidos en la superficie de la bacteria), siendo una característica importante en la motilidad de las células bacterianas pertenecientes a éste género (Heimbrook *et al.*, 1989; Bardy *et al.*, 2003). Distintos autores reportaron que el crecimiento óptimo para la visualización de flagelos



**Figura 1.** Bosquejo gráfico que ilustra el desarrollo de la técnica de tinción flagelar para la observación de flagelos de *B. amyloliquefaciens*. Se tomó una colonia bacteriana en crecimiento en AN con un asa bacteriológica previamente esterilizada con flama (A). Se colocó la colonia en forma lineal en el portaobjeto limpio y desengrasado (B). Se añade dos gotas de agua destilada estéril y el portaobjetos se inclina para que se distribuyan las células bacterianas (C). Dejar en reposo para que se evapore el agua a temperatura ambiente (D). Distribuir el mordiente de manera homogénea a lo largo de la superficie de las células bacterianas por 15 min (E1). Lavar con agua destilada estéril, inclinar y escurrir con cuidado (E2). Colocar el cristal violeta por 8 min (F1). Lavar con agua destilada estéril, inclinar y escurrir con cuidado (F2). Dejar en reposo hasta evaporar el agua a 20-25 °C (G). Para evitar la pérdida excesiva de flagelos se debe evitar la agitación.



**Figura 2.** Microscopía óptica con aceite de inmersión, en técnica de tinción flagelar para visualizar flagelos en células de *B. amyloliquefaciens*. Las imágenes (A-E) con la técnica propuesta. Células de la bacteria con 16 h de crecimiento (A), 18 h de crecimiento (B), 20 h de crecimiento (C), 22 h de crecimiento (D), 24 h de crecimiento (E). Técnica de Leifson en bacterias con 20 h de crecimiento (F). Barra de escala = 10 µm (100x).

es entre 18 y 72 h para distintos géneros bacterianos (Clark, 1976; Leifson, 1951; Kodaka *et al.*, 1982; Heimbrook *et al.*, 1989). Las células bacterianas durante las 16 y 18 h de crecimiento no mostraron con claridad las estructuras flagelares debido a la falta de tiempo para su desarrollo (Figuras 2A y B) y después de las 24 h se observó el desprendimiento de flagelos. Esto puede deberse, a los cambios en su entorno, tal es el caso de nutrientes limitados, como lo indican en estudios recientes Zhu and Gao (2020) quienes sugieren que las bacterias pueden eliminar sus flagelos bajo inanición de manera programada. Así mismo, los cuidados excesivos que requieren las técnicas de tinción, tratamientos a los portaobjetos de 24 h a 7 días, reacciones inestables del mordiente y manejo de las células bacterianas (Leifson, 1951; Bardy *et al.*, 2003). La técnica de Leifson permite la tinción de los flagelos, pero esta metodología podría estar provocando su pérdida por el manejo de las células bacterianas en el portaobjetos y mayor tiempo para realizarse (Figura 2F).

En la presente modificación a la técnica, se tiene una menor manipulación de la bacteria, esto evita la caída de los flagelos, también se ha observado que el mordiente es estable desde 24 hasta 48 meses a 20-25 °C; mientras que, el mordiente utilizado en la técnica de Leifson solo es estable por unos días a 25±1. La técnica propuesta, permite la correcta visualización en microscopio biológico compuesto de los flagelos de *B. amyloliquefaciens* a las 20 h de manera rápida y accesible.

## CONCLUSION

En este estudio fue posible visualizar flagelos bacterianos, con una técnica modificada, que requiere menor tiempo y una menor manipulación de la bacteria *B. amyloliquefaciens* y, por consiguiente, una menor pérdida de flagelos. Esta técnica otorga una mayor facilidad en la observación y distribución flagelar de las bacterias.

## Agradecimientos

**Financiamiento.** Esta investigación se realizó con apoyo financiero del centro de investigación en alimentación y desarrollo A.C.

**Conflicto de interés.** Los autores declaran que no existe conflicto de intereses relacionados con esta investigación.

**Cumplimiento de estándares de ética.** No aplica

**Disponibilidad de datos.** Datos disponibles si es necesario, puede contactar con el autor de correspondencia (rsgarcia@ciad.mx).

## REFERENCIAS

Afzal, I., Shinwari, Z.K., Sikandar, S., Shahzad, S. 2019. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiology*

- Research. 221: 36-49.  
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- Arboleda-Zapata, T., Diaz-Medina, A.R., Rios-Osorio, L.A. 2019. Biological control strategies used for the management of antracnosis caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in mango fruits: A systematic review. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 22: 595-611. urn:ISSN:1870-0462-tsaes.v22i3.2699
- Bardy, S.L., Ng, S.Y.M., Jarrell, K.F. 2003. Prokaryotic motility structures. *Microbiology*. 149: 295-304. <https://dx.doi.org/10.1099/mic.0.25948-0>
- Clark, W.A. 1976. A Simplified Leifson Flagella Stain. *Journal of Clinical Microbiology*. 3: 632-634. Disponible en: <https://jcm.asm.org/content/jcm/3/6/632.full.pdf>
- Goldman, E., Green, L.H. 2015. Identification of Gram-Positive Organism, Colaninno MP. In: *Manual of clinical microbiology* (ed.), 3rd ed. American Society for Microbiology. Washington DC. p. 66-76.
- Gray, P.H.H. 1926. A method of staining bacterial flagella. *Journal of bacteriology*. 12: 273. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC374901/>
- Heimbrook, M.E., Wang, W.L.L., Campbell, G. 1989. Staining Bacterial Flagella Easily. *Journal of Clinical Microbiology*. 27: 2612-2615. Disponible en: <http://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC267087&blobtype=pdf>
- Kodaka, H., Armfield, A.Y., Lombard, G.L., Dowell Jr, V.R. 1982. Practical procedure for demonstrating bacterial flagella. *Journal of clinical microbiology*. 16: 5. 948-952. DOI:10.1128/JCM.16.5.948-952.1982
- Leifson, E. 1951. Staining, shape and arrangement of bacterial flagella. *Journal of Bacteriology*. 62: 377-389. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC386144/pdf/jbacter00614-0040.pdf>
- Ley-López, N., Márquez-Zequera, I., Carrillo-Fasio, J.A., León-Félix, J., Cruz-Lachica, I., García-Estrada, R.S., Allende-Molar, R. 2018. Effect of biocontrol and germinative inhibition of *Bacillus* spp. on zoospores of *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 36: 215-232. <http://dx.doi.org/10.18781/r.mex.fit.1711-2>
- Merino, S., Shaw, J.G., Tomás, J.M. 2006. Flagelos laterales bacterianos: un sistema de flagelos inducible. *Cartas de microbiología FEMS*. 263 (2): 127-135. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00403.x>
- Pinto, C., Sousa, S., Froufe, H., Egas, C., Clément, C., Fontaine, F., Gomes, A.C. 2018. Draft genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain Fito\_F321, an endophyte microorganism from *Vitis vinifera* with biocontrol potential. *Standards in Genomic Sciences*. 13: 30. <https://doi.org/10.1186/s40793-018-0327-x>
- Pirog, T.P., Lutsay, D.A., Kliuchka, L.V., Beregova, K.A. 2019. Antimicrobial activity of surfactants of microbial origin. *Biotechnologia Acta*. 12: 1. <https://doi.org/10.15407/biotech12.01.039>
- Ren, J.H., Li, H., Wanga, Y.W., Ye, J.R., Yan, A.Q., Wua, X.Q. 2013. Biocontrol potential of an endophytic *Bacillus pumilus* JK-SX001 against poplar canker. *Biological Control*. 67: 421-430. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.012>
- Zhao, X., Wang, R., Shang, Q., Hao, H., Li, Y., Zhang, Y., Guo, Z., Wang, Y., Xie, Z. 2016. The new flagella-associated collagen-like proteins ClpB and ClpC of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 are involved in bacterial motility. *Microbiological Research*. 184: 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.004>
- Zhu, S., Gao, B. 2020. Bacterial flagella loss under starvation. *Trends in Microbiology*. 28: 785-788. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.05.002>