



00341  
2  
24.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**"Estudio morfológico-ultraestructural de una población  
de *Euplotes eurystomus* Wrzesniowski, 1870"**

**T E S I S I N A  
QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE  
ESPECIALIZACIÓN EN MICROSCOPIA  
ELECTRÓNICA APLICADA A LAS  
CIENCIAS BIOLÓGICAS  
P R E S E N T A  
BIOL. ROSA MARÍA PICASO HERNÁNDEZ**

**DIRECTORA DE TESIS : DRA. MA. ANTONIETA ALADRO LUBEL**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**El presente trabajo se desarrolló en los laboratorios de Protozoología bajo la dirección de la Dra. Ma. Antonieta Aladro Lubel, de Microscopía Electrónica con la Dra. Olga M. Echeverría Martínez de la Facultad de Ciencias y en el Instituto de Geología de la UNAM con la M. en C. A. Margarita Reyes Salas.**

**A mis padres:** José Antonio Picaso Ramos y Ma. del Refugio Hdez. de Picaso, por su cariño y apoyo incondicional para realizar todo lo que he querido hacer y que sin ellos hubiera sido imposible estar en donde estoy.

Los que siembran con lágrimas cosecharán con alegría.

**A mi hermano:** José Antonio, que ha sido un apoyo fundamental en mi vida.

Puede adquirirse todo en la soledad, excepto el carácter.

**A mi tío:** Rafael Hernández Velasco quien ha sido un ejemplo a seguir.

**A mi familia:** que siempre confió en ver la realización de este sueño.

**A la mejor amiga y hermana,** que pude tener, Lorena López Griego con quien he compartido los mejores años de mi vida, proyectos, alegrías y momentos difíciles.

## ***Agradecimientos***

**Gracias por haberme enseñado que ante todos los problemas y adversidades teniéndolo todo para perder, el darse por vencido nunca es la solución.**

**Deseo manifestar mi más profundo agradecimiento y gratitud a la Dra. Ma. Antonieta Aladro Lubel sin cuyo apoyo no hubiera sido posible realizar esta investigación, pero sobre todo por su invaluable paciencia, enseñanzas y su gran amistad durante todos estos años.**

**Agradezco y expreso mi reconocimiento a los miembros del jurado directores**

**Dra. Ma. Antonieta Aladro Lubel**

**Dra. Olga M. Echeverría Martínez**

**y sinodales de esta tesis,**

**Dra. Guadalupe T. Zavala Padilla**

**Dr. Luis Felipe Jiménez García**

**Esp. en Micros. Electr. Aplic. a las Cien.**

**Biol. Marco Antonio González Jiménez**

**por el valioso tiempo que dedicaron en las detalladas revisiones y los comentarios, gracias a los cuales el documento fue afinado, proporcionándole calidad.**

**La especial y personal atención de directores y sinodales tiene un enorme peso en la formación de un estudiante de posgrado, para que este adquiriera el nivel que se propone la Facultad de Ciencias.**

Hago una mención especial de agradecimiento a la M. en C. Margarita Reyes Salas con quien se desarrolló la técnica de procesamiento para protozoos para microscopía electrónica de barrido, al M. en C. Marco Antonio González Jiménez y Biol. Guillermina González Mancera quienes han brindado muchas horas de trabajo dedicado y su amistad, que han sido de gran valor para mi.

Al Dr. Jaime Dante Moran Zenteno, director del Instituto de Geología y al Dr. Joan Genescá Llongueras, Jefe del Departamento de Metalurgia de la Facultad de Química por las facilidades que me brindaron para la utilización de los microscopios electrónicos de barrido y la campana de evaporación al vacío.

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a todo el personal del laboratorio de Microscopía Electrónica y de Protozoología de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por su gran amistad y apoyo para lograr un ambiente de trabajo, cordial y dinámico sin el cual no es posible la realización de cualquier investigación.

Gracias a todos ustedes por estar conmigo, en los momentos mas importantes de mi vida y por el apoyo que siempre he sentido, aún sin decir una sola palabra, ya que colaboraron aún no sabiendolo, en este trabajo.

Nunca he encontrado a una persona de quien no haya aprendido algo.

# CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	
<b>Introducción</b>	
<b>Antecedentes</b>	<b>1</b>
<b>Descripción del género <i>Euplotes</i></b>	<b>5</b>
<b>Objetivos</b>	<b>7</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	
<b>Recolecta y cultivo</b>	<b>8</b>
<b>Microscopía fotónica</b>	<b>8</b>
<b>Microscopía electrónica de transmisión</b>	<b>9</b>
<b>Microscopía electrónica de barrido</b>	<b>11</b>
<b>Resultados</b>	
<b>Morfología externa</b>	<b>13</b>
<b>Morfología interna</b>	<b>20</b>
<b>Discusión</b>	<b>31</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>34</b>
<b>Literatura citada</b>	<b>35</b>

## **RESUMEN**

En el presente trabajo se muestra y describe la ultraestructura interna y externa de una población del ciliado hipotrico *Euplotes eurystomus*. Se emplearon técnicas de tinción e impregnación argéntica como la de Klein y la de protargol para microscopía fotónica y cortes semifinos teñidos con azul de toluidina con las cuales se determinó la especie estudiada. Se hicieron cortes ultrafinos contrastados con sales de plomo y de uranio para microscopía electrónica de transmisión para mostrar y describir la morfología interna como la ultraestructura de las mitocondrias microtubulares típicas de este género, las vacuolas digestivas, la vacuola contráctil, el retículo endoplásmico, endosimbiontes y la banda de replicación del macronúcleo. Al mismo tiempo se elaboraron preparaciones de microscopía electrónica de barrido para observar la morfología externa, principalmente de las estructuras corticales. Finalmente se realizó un estudio morfométrico que incluye varios caracteres que permiten una determinación más precisa del ciliado en estudio, según lo propuesto por otros autores, quienes mencionan que los caracteres taxonómicos tradicionales ya no son suficientes para realizar una determinación detallada y precisa del microorganismo.

# INTRODUCCIÓN

## Antecedentes

Durante las últimas décadas se ha incrementado el interés por el estudio de los protozoos, los cuales son microorganismos unicelulares que pertenecen al Reino Protista, Subreino Protozoa. Se encuentran en diversos ecosistemas, desde los acuáticos hasta los terrestres y varios de ellos están asociados a una diversidad de vertebrados e invertebrados.

Los ciliados son protozoos que conforman el Phylum Ciliophora; dentro de este se incluyen a los hipotricos, que son los más complejos de acuerdo con su morfología, fisiología, desarrollo y morfogénesis. Estos organismos forman parte de las comunidades planctónicas y bentónicas de los medios dulceacuícolas, salobres y marinos; presentan una nutrición heterótrofa, y se alimentan principalmente de bacterias, microalgas y detritus.

Las características morfológicas de este grupo de ciliados son: el de presentar un cuerpo ovalado, ovorectangular o alargado; aplanado dorsoventralmente y a menudo flexible; además se les distingue por presentar organelos ciliares compuestos, los cuales se denominan cirros cuya disposición resulta importante en la determinación genérica. Su función está relacionada con la locomoción, la alimentación y en algunas ocasiones con la adhesión al sustrato.

El aparato bucal se encuentra localizado en la región anterior izquierda, constituida por la cavidad bucal que contiene una zona adoral de membranelas (ZAM) y una o dos membranas parorales. El macronúcleo

de forma ovoide, ovalada o de banda, es poliploide, presenta gran cantidad de cromatina compacta, numerosos nucleolos y partículas ribonucleoproteicas semejantes a las que presentan los animales y plantas en sus estructuras, según Raikov (1976). En la interfase de los hipotricos el macronúcleo antes de la división se caracteriza por la presencia de las bandas de replicación, sitio en el cual se lleva a cabo la síntesis del ADN e histonas y algunas proteínas. Las bandas pueden migrar de ambos extremos del macronúcleo hacia el centro como en *Euplotes* o del centro hacia los extremos como ocurre en *Aspidisca*. En el caso de *Gastrostyla* que presenta cuatro elementos macronucleares, las bandas migran de un extremo al otro. Estas bandas de replicación, también se manifiestan en algunos otros ciliados, como en los géneros *Dysteria*, *Chlamydodon* y en algunos oligotricos como *Halteria*. También pueden presentar uno o más micronúcleos adyacentes o embebidos al macronúcleo. Los géneros *Euplotes* y *Aspidisca* presentan un caracter distintivo que es un sistema argentófilo en la superficie dorsal y ventral del organismo, conocido como argiroma del cual se hablará más adelante. La estomatogénesis puede ser para o apocinetal.

Los hipotricos han sido estudiados desde el siglo XVIII en diversas partes del mundo, sobresaliendo los trabajos de Müller (1773 y 1786 en Curds 1975); Ehrenberg (1838); Kahl (1932-1935); Borror (1972); Tuffrau (1960); Curds (1975); Wu (1975); Hill (1980) y Foissner (1982).

El género *Euplotes* es uno de los géneros más representativo de este grupo y ha sido objeto de diversos estudios taxonómicos y experimentales. Curds (1975) reconoce alrededor de 80 especies y variedades.

Durante muchos años los únicos caracteres taxonómicos utilizados fueron el tamaño y la forma del cuerpo, las "costillas" ventrales y dorsales y el arreglo de los cirros en la superficie ventral. La aplicación de técnicas argénticas como la de Chatton y Lwoff (1930) permitieron a Tuffrau (1954) el descubrimiento del sistema de líneas argénticas o argiroma considerado como un caracter taxonómico de gran importancia. Tuffrau (1954, 1960) fue el primero en sugerir que el número de las hileras de cilios dorsolaterales, la geometría del argiroma, el número de cirros frontoventrales y la forma del macronúcleo podrían usarse para diferenciar las especies del género *Euplotes*. La revisión realizada por Tuffrau (1960) ha sido la base de las revisiones realizadas posteriormente por Borrór (1962, 1963, 1968). Este autor publica en 1972 una lista de las especies que considera aceptables, basado en un criterio moderno y señala los probables sinónimos. Carter (1972) sugiere que la forma de la zona adoral de membranelas (ZAM), así como el número de esta podrían sumarse como caracter taxonómico en la separación de las especies.

Curds (1975) publica una guía de las especies de *Euplotes* de gran importancia que reúne buena parte de la información dispersa. Este autor hace énfasis en que de todos los caracteres taxonómicos utilizados, la geometría del argiroma es el único caracter que se mantiene constante y todos los demás varían en menor o mayor grado. Hill (1980) realiza una revisión especial de *Euplotes* sugiriendo la división de este en varios géneros.

La utilización de la microscopía electrónica en el estudio de los hipotricos se inicia en la década de los setenta. Entre algunos de estos trabajos mencionaremos a los de Murti (1976) quien emplea la microscopía

electrónica de transmisión (MET) para observar las hélices presentes en el macronúcleo de *Euplotes eurystomus*; Ruffolo (1976a) realiza un estudio sobre la estructura fina de la superficie dorsal y la película utilizando tanto la técnica de protargol para la microscopía fotónica como en el MET. Ruffolo (1976b) describe la morfogénesis cortical durante el ciclo de la división celular de *E. eurystomus* integrando observaciones a nivel de microscopía de luz, MET y microscopía electrónica de barrido (MEB). Hill (1980) elabora un estudio descriptivo de los géneros *Euplotes*, *Uronychia*, *Aspidisca* y *Euplotaspis* empleando la microscopía de luz para las técnicas argentícas de protargol y la MEB. Gates (1988) trabaja sobre la distribución de los cinetosomas en la superficie dorsal de varias especies marinas y dulceacuícolas del género *Euplotes* utilizando la microscopía electrónica de barrido.

La aplicación de la técnica de criofractura para la microscopía electrónica, la técnica de campo oscuro, así como la microscopía electrónica de interferencia han sido utilizadas en los últimos años. Bardele *et al.*, (1986) realizan un estudio de la superficie subpelicular de un ciliado, empleando diferentes técnicas de criofractura para MET y MEB. Kloetzel (1991) identificó una familia de proteínas que llamó *plateins* con anticuerpos monoclonales obtenidos de la superficie de *Euplotes aediculatus* utilizando inmunofluorescencia y criocortes.

Los ciliados en general, han sido considerados como modelos biológicos en diversos estudios citológicos y ecológicos por sus características morfológicas, su amplia distribución en los ecosistemas, su facilidad de cultivo y su bajo costo de mantenimiento en el laboratorio.

## **Descripción del género *Euplotes***

**Hábitat.** Este organismo se puede encontrar en medios dulceacuícolas, salobres y marinos e inclusive en asociación simbiótica con algunos invertebrados, *Euplotes balteatus* (Dujardin, 1841) y *E. tuffraui* (Berger, 1965), son comensales del erizo de mar.

**Morfología General.** Hipotrico generalmente de contorno ovalado, plano-convexo, aunque algunas especies pueden presentar costillas en la parte dorsal. Los cirros que representan la mayor parte de la ciliatura somática, se localizan en la parte ventral y su disposición nos permite reconocer tres grupos: a) los cirros frontoventrales se localizan en la parte anterior y media del lado derecho y su número varía de 8-10; b) los que se encuentran transversales se localizan en el último tercio del cuerpo y generalmente son 5 y c) los caudales que están situados en la región posterior terminal y su número va de 3-10. En la parte convexa presenta de 6-14 cinetias dorsolaterales, cada una presenta diferente número de cilios y en particular el número de cilios de las cinetias centrales es fundamental para la determinación de la especie. La cavidad bucal contiene a la ciliatura oral formada por las membranelas adorales que son un conjunto de policinétidas y por la membrana paroral. La disposición y el número de membranelas de la zona adoral es considerado como otro carácter taxonómico importante. El citoplasma es transparente con algunas granulaciones, vacuolas y en ocasiones pueden contener microalgas o zooclorelas; el macronúcleo en banda presenta una diversidad de formas y adyacente o embebido a éste se encuentra el micronúcleo. El argiroma dorsal está formado por las cinetias longitudinales y entre ellas por un sistema de conexiones

**subpeliculares dispuestas transversal y longitudinalmente, que conectados entre sí, en la mayoría de los casos forman polígonos que de acuerdo a su forma y disposición van a ayudar a la determinación de la especie; en tanto, el argiroma ventral tiene poco valor taxonómico.**

## **OBJETIVOS**

- 1. Mostrar y describir las estructuras corticales y la ultraestructura interna y externa del ciliado *Euplotes eurystomus*.**
- 2. Realizar un estudio morfométrico de una población dulceacuícola de la especie *Euplotes eurystomus* de una pequeña fuente de un jardín de la Ciudad de México.**

# MATERIAL Y MÉTODO

## Recolecta y cultivo

La muestra de agua utilizada para el presente estudio, fue obtenida de una pequeña fuente de un jardín de la Ciudad de México. Con la finalidad de aumentar el número de individuos del género *Euplotes* se realizaron varios cultivos utilizando como medios infusiones de granos de chícharo, trigo y arroz. Estos cultivos favorecieron también el desarrollo de varias especies de protozoos por lo que se procedió a la separación del género *Euplotes* bajo el microscopio estereoscópico utilizando para ello una micropipeta. Los individuos fueron colocados en tres cajas de Petri a temperatura ambiente, las cuales contenían los diferentes tipos de infusiones arriba señaladas.

## Microscopía fotónica

Se realizaron observaciones *in vivo* utilizando colorantes acuosos como el verde luz al 1% y el azul de toluidina al 1%, aplicando diferentes técnicas microscópicas de luz, en campo claro, contraste de fases (con filtro y sin filtro) y el campo oscuro.

Posteriormente se elaboraron técnicas argénticas para preparaciones permanentes como la de Klein (1926, 1958) y la de protargol (Curds *et al.*, 1983 y Lee *et al.*, 1985) para determinar la especie con la que se trabajó en esta investigación.

Para el estudio morfométrico se utilizaron individuos "*in vivo*" e impregnados con plata. En todas las mediciones realizadas, se utilizó el objetivo de 40x, a excepción de la distancia entre los cirros en que se empleó el objetivo de 100x.

Se tomaron fotografías del ciliado en estudio utilizando técnicas microscópicas como el contraste de fases, campo oscuro y para las preparaciones permanentes el campo claro, empleando un microscopio óptico marca Zeiss con un cuerpo de cámara de 35 mm, un adaptador y un exposímetro BEWI MICRO; las películas utilizadas fueron de color GOLD Kodak ASA100.

Una vez determinada la especie se seleccionaron las técnicas para los estudios de microscopía electrónica de transmisión y de barrido.

## **Microscopía electrónica de transmisión (MET)**

### **a) Fijación**

1. Concentrar en un tubo los organismos y centrifugarlos a 800 rpm durante cinco minutos para formar el botón.
2. Fijar con glutaraldehído al 2.5% al vacío, dejarlos en la cámara de vacío durante 5 minutos y completar la fijación hasta 90 minutos fuera de ella.
3. Agregar agar al 1% con un colorante azul, para cementar el botón, enfriar para su solidificación, posteriormente con la ayuda de un microscopio estereoscópico, eliminar el exceso de agar del botón y colocar los fragmentos en un frasco vial.
4. Lavar con buffer de fosfatos (pH 7.3, 0.16 M) tres veces para quitar el exceso de fijador.

## **b) Deshidratación**

- 5. Deshidratar con etanol al 70% , 80% , 96% dos cambios de 10 min cada uno y absoluto tres cambios de 15 minutos cada uno.**
- 6. Hacer tres cambios con óxido de propileno de 15 minutos cada uno.**

## **c) Inclusión**

### **7. Preinclusión lenta**

- En una solución de 1:2 de Epon y óxido de propileno, respectivamente, taparlos perfectamente y dejarlos a temperatura ambiente durante 24 horas.**
  - En una solución 1:1 de Epon y óxido de propileno durante 24 hrs y**
  - En una solución 2:1 de Epon y óxido de propileno durante 24 Hrs.**
- 8. Incluir en un molde para inclusión con resina Epon, colocando el botón en los extremos. Introducir en la estufa a 60 °C durante 24 hrs para que polimericen.**

## **d) Cortes**

- 1. Hacer una pirámide trunca con base trapezoidal con una navaja de un solo filo en el ultramicrotomo MT-2.**
- 2. Obtener cortes semifinos de 250 a 300 nm de grosor.**
- 3. Teñir dichos cortes con azul de toluidina al 1% y observarlos al microscopio de luz con campo claro para seleccionar un área adecuada y obtener los cortes ultrafinos de 60-90 nm de grosor.**
- 4. Montar los cortes en un portaobjetos anillo de Sjöstrand o bien rejillas de cuadros muy grandes y dejarlos secar sobre un bastidor con membrana de Formvar.**

5. **Contrastar con soluciones de metales pesados como acetato de uranilo al 3% y citrato de plomo al 0.3% (20 y 10 minutos respectivamente).**
6. **Lavar con agua destilada después de cada uno de los metales y dejarlos secar sobre un papel filtro.**

**e) Observaciones**

7. **Los cortes se analizaron al microscopio electrónico de transmisión y se fotografiaron las diferentes estructuras del organismo.**

**Se tomaron imágenes del ciliado en estudio para microscopía electrónica de transmisión empleándose los microscopios marca Zeiss modelos EM-10 y EM-9, utilizando una película de grano fino Kodak Electron Microscope Film 4489 (ESTAR Thick Base) de 7 x 7 cm y 8.3 x 10.2 cm respectivamente.**

## **Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

**a) Fijación**

1. **Concentrar en un tubo los organismos y centrifugarlos a 800 rpm durante cinco minutos para formar el botón.**
2. **Fijar con glutaraldehído al 2.5% al vacío, dejarlos en la cámara de vacío durante 5 minutos y completar la fijación hasta 60 minutos fuera de ella.**
3. **Lavar con buffer de fosfatos (pH 7.3, 0.16 M) tres veces para quitar el exceso de fijador.**

## b) Deshidratación

4. Deshidratar con etanol al 70%, 80%, 96% de 5 min cada uno y por último colocar en una mezcla de alcohol/acetona 1:1 durante 10 min e inclusive se puede dejar más tiempo en esta mezcla. Posteriormente se pusieron en un desecador de bióxido de carbono para llevarlo a punto crítico, colocando a los microorganismos sobre una cuarta parte de un cubreobjetos y este a su vez encima de un cilindro de metal.
5. En una campana de evaporación al vacío se recubrieron con oro (ya que es el metal más recomendado para el estudio de protozoos).
6. Añadir al mencionado cilindro un poco de carbono pulverizado sobre la superficie para un mejor recubrimiento y su observación al microscopio electrónico de barrido modelo Jeol jsm-35C con diferentes voltajes de 15 y 20 kV.

Así mismo también se tomaron micrografías, se utilizó una película marca Kodak Verichrome Pan ASA120, las cuales, fueron impresas en papel para el análisis morfológico.

Para la identificación de las estructuras se consultó a Tuffrau (1960), Curds (1975), Ruffolo (1976 a y b), Hill (1980), Small y Lynn (1985) y Foissner *et al.* (1991).

# RESULTADOS

## Morfología externa

En la Fig.1 se encuentran señaladas las estructuras de la especie estudiada, *Euplotes eurytomus*; la forma de este ciliado es ovalada, el cuerpo plano-convexo, con un tamaño de 113-175  $\mu\text{m}$  de longitud por 69.6-101.5  $\mu\text{m}$  de anchura (Figs. 2, 3 y 4). En la Tabla 1 se aprecia el detalle de los parámetros que fueron tomados en cuenta para la realización del estudio morfométrico, en el cual se hicieron mediciones de la longitud y la anchura total del cuerpo, así como de la zona adoral de membranelas (ZAM), la placa ventral, la membrana paroral, la distancia entre cirros de uno y de diferentes grupos, y la anchura máxima de la cavidad bucal; caracteres que fueron medidos con organismos procesados con las técnicas argentícas de Klein y de protargol en posición ventral, observándose en la Tabla 2 los resultados de estas mediciones. En la Fig. 5 con la técnica argentíca de Klein se muestra uno de sus caracteres típicos, el argiroma dorsal de "tipo eurytomus" perfectamente resaltado, formado por un sistema argentófilo de microtúbulos subpeliculares, que se encuentran conectados entre sí, tanto longitudinal como transversalmente y formando de esta manera rectángulos del mismo tamaño entre una y otra cinetia; el argiroma ventral es considerado de poco valor taxonómico (Fig.6). Los cirros que se encuentran en la parte ventral se aprecian in vivo preferentemente utilizando contraste de fases, así como con las técnicas argentícas de protargol y Klein y con el microscopio electrónico de barrido (MEB) (Fig.7).

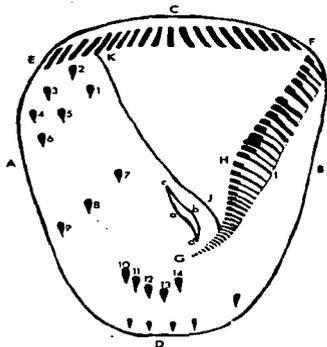


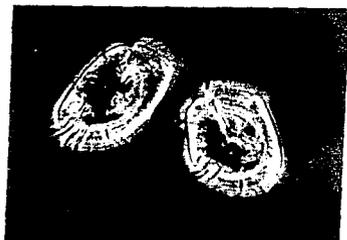
Fig. 1 Esquema de *Euplotes eurystomus* en posición ventral, mostrando las diferentes estructuras que se tomaron en cuenta para su medición.

Tabla 1. Lista de las mediciones realizadas en la parte ventral de *E. eurystomus*, de acuerdo con el esquema anterior.

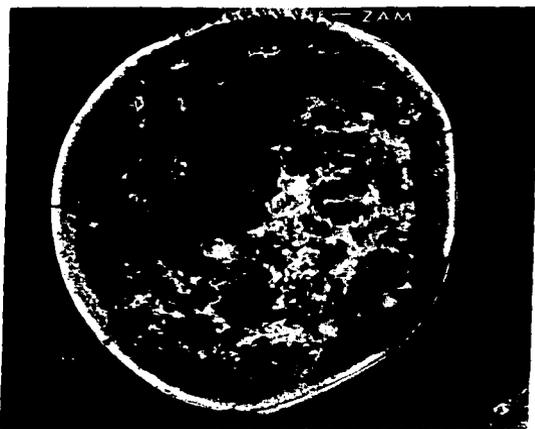
Medición	punto	punto	Descripción
1	A	B	anchura total del cuerpo del organismo <i>in vivo</i>
2	C	D	longitud total del cuerpo del organismo <i>in vivo</i>
3	A	B	anchura total del cuerpo en organismos fijados
4	C	D	longitud total del cuerpo en organismos fijados
5	E	F	anchura de la zona adoral de membranelas (ZAM)
6	F	G	longitud de la zona adoral de membranelas
7	H	I	parte más amplia de la zona adoral de membranelas
8	A	J	anchura máxima de la placa ventral
9	a	b	anchura total de la membrana paroral
10	c	d	longitud total de la membrana paroral
11	2	7	distancia entre los cirros 2 y 7 frontoventrales
12	7	14	distancia del cirro 7 frontoventral al cirro 14 transversal
13	3	5	distancia del cirro 3 al cirro 5 frontoventrales
14	5	13	distancia del cirro 5 frontoventral al cirro 13 transversal
15	4	6	distancia del cirro 4 al cirro 6 frontoventrales
16	6	12	distancia del cirro 6 frontoventral al cirro 12 transversal
17	8	11	distancia del cirro 8 frontoventral al cirro 11 transversal
18	9	10	distancia del cirro 9 frontoventral al cirro 10 transversal
19	1	14	distancia del cirro 1 frontoventral al cirro 14 transversal
20	2	13	distancia del cirro 2 frontoventral al cirro 13 transversal
21	7	6	distancia del cirro 7 al cirro 6 frontoventrales
22	3	7	distancia del cirro 3 al cirro 7 frontoventrales
23	10	14	distancia del cirro 10 al cirro 14 transversales
24	10	13	distancia del cirro 10 al cirro 13 transversales
25	C	13	distancia del extremo anterior del cuerpo al cirro 13 transversal
26	C	c	distancia del extr. ant. del cuerpo al extr. ant. de la membr. paroral
27	A	b	distancia del lado der. del cuerpo al lado izq. de la membr. paroral
28	K	F	anchura máxima de la cavidad bucal

**Tabla 2. Resultados morfométricos de la población de *Euplotes eurytomus*, A = Promedio total, B = Desviación estándar, C = Coeficiente de Variación, D = Máximo-Mínimo, E = Núm. de especímenes medidos.**

Parámetros	A	B	C	D	E
1	86.9235	12.0019	144.0462	133 - 59.5	100
2	142.4225	11.9273	142.2622	175 - 113.15	100
3	91.07778	12.04526	145.0884	133 - 66.5	45
4	137.9444	8.655905	74.92469	152.5 - 119	45
5	42.9955	8.0900	65.4484	63 - 35	100
6	78.17045	4.3090	18.5675	87.5 - 73	100
7	10.27	2.6290	6.9121	15.6 - 7.8	10
8	31.12	5.2365	27.4216	43.9 - 24.7	10
9	2.3	0.7056	0.498	3.5 - 1.3	10
10	16.36	1.3814	1.9084	17.5 - 14	10
11	21.19	1.43	2.0449	23.4 - 18.2	10
12	37.69	9.0514	81.9289	63.7 - 30.9	10
13	7.67	2.9329	8.6021	15.6 - 5.2	10
14	54.36	7.0295	49.4144	71.5 - 45.2	10
15	6.24	0.78	0.6084	7.8 - 5.2	10
16	46.85	7.51016	56.4025	62.4 - 37.4	10
17	23.6	4.416333	19.504	32.2 - 19.5	10
18	17.65	5.540623	30.6985	30.9 - 14.3	10
19	55.82	9.301591	86.5196	81.9 - 47.8	10
20	65.49	7.300884	53.3029	84.5 - 56.9	10
21	12.87	2.285191	5.2221	19.5 - 11.7	10
22	19.08	4.424884	19.5796	30.9 - 13	10
23	12.09	1.748971	3.0589	16.9 - 10.4	10
24	14.3	1.3	1.69	16.9 - 13	10
25	73.84	7.708463	59.4204	94.9 - 66.3	10
26	42.73	2.564001	6.5741	47.8 - 38.7	10
27	28	3.769363	14.2081	34.8 - 24.7	10
28	39.25333	4.510487	20.34449	49 - 31.5	30



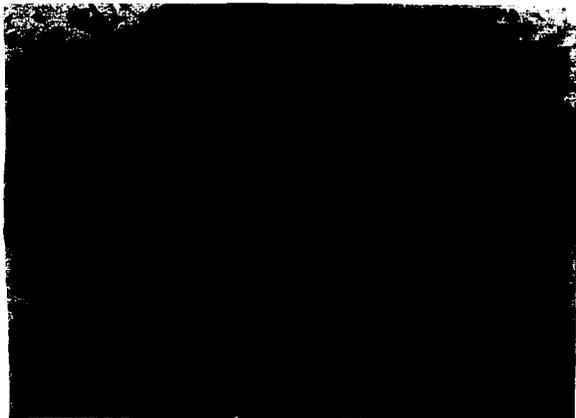
**Fig.2** *Euplotes eurystomus in vivo*, en contraste de fases, con filtro azul, 10x



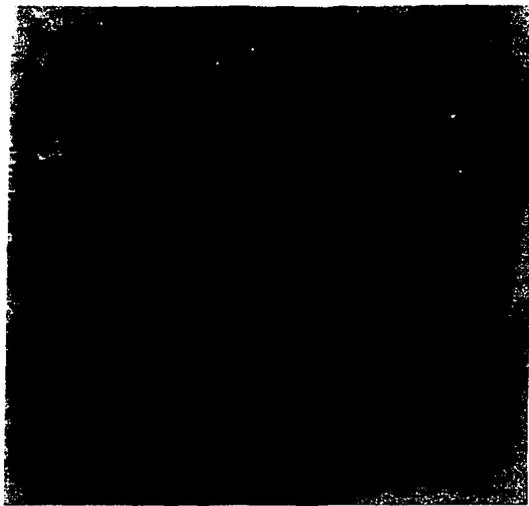
**Fig.3** *Euplotes eurystomus in vivo* en contraste de fases, con filtro azul y sin colorante. El macronúcleo (Ma y flechas) en banda y el micronúcleo (Mi, cabeza de flecha) se puede apreciar adyacente y una parte de la zona adoral de membranelas (ZAM). 40x.



Fig.4 *E. curystomus in vivo*, en campo obscuro, en donde se puede apreciar el macronúcleo (Ma y flechas), una parte de la zona adoral de membranas (ZAM), vacuolas digestivas (Vd). 40x .



**Fig.5** *Euplotes curystomus* en posición dorsal con argiroma (Ar) "tipo curystomus", y una parte de la zona adoral de membranelas (ZAM) preparación argéntica de Klein, 40x.



**Fig.6** Posición ventral del organismo, mostrando la zona adoral de membranelas (ZAM), argiroma (Ar) y cirros caudales (Ca). Técnica de Klein, 40x.



Fig.7 Micrografía electrónica de barrido de *Euplotes eurystomus* en posición ventral mostrando la zona adoral de membranelas (ZAM), posición de cirros: frontoventrales (IV), transversales (T) y caudales (Ca). Recubrimiento con oro 4560X

En las Figs. 8, 9 y 10a y b se muestra la parte dorsal de *E. eurystomus* donde se localizan las cinetias dorsolaterales cuyo número va de ocho a 10. El número de cilios de las cinetias centrales va de 19-24. En la Fig. 10b se pueden observar las fosas ciliares por donde emerge el cilio anterior de cada cinétida. El peristoma constituye el aparato bucal localizado en la región ventral, formado principalmente por la cavidad bucal, la cual se encuentra rodeada por una zona adoral de membranelas (ZAM) muy conspicua, extendiéndose por todo el extremo anterior en forma triangular y prominentemente sigmoidal, ocupando hasta la mitad del cuerpo; cuenta aproximadamente con 40-55 membranelas (Figs. 1, 7 y 10a); al final de la ZAM y a la derecha se encuentra una membrana paroral bien desarrollada y abajo de ésta, se localiza el citostoma, por el cual entra el alimento acumulándose en pequeñas vacuolas digestivas.

### **Morfología interna**

Con la ayuda de la microscopía electrónica de transmisión se logró apreciar la ultraestructura de los siguientes organelos: cilios, cirros, mitocondrias, vacuolas digestivas, retículo endoplásmico, vacuola contráctil y el aparato nuclear.

La infraciliatura somática forma parte del córtex, e incluye a los cinetosomas y a los microtúbulos y microfibrillas asociadas a éstos. En relación a la ciliatura bucal cada membranela está formada por tres hileras cortas de cilios, estos se encuentran recubiertos también por la membrana plasmática superficial y están constituidos por un axonema de nueve pares de microtúbulos periféricos y dos centrales (Figs.11 y 12).

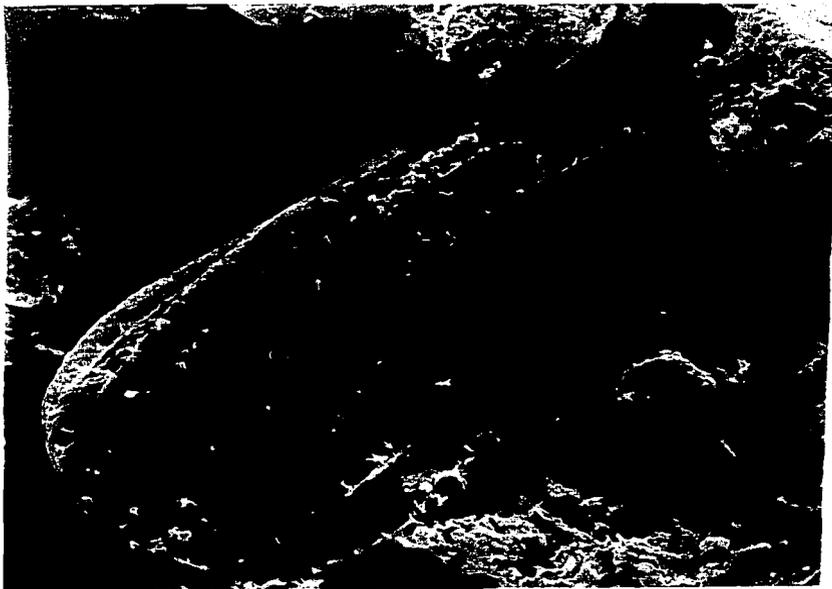


Fig.8 Micrografía electrónica de barrido. Posición dorsal de *Euplores eurystomus*, mostrando la parte convexa y las 8 cinetias dorsolaterales (Ci y flechas). Recubrimiento con oro. 780X.



Fig.9 Micrografía electrónica de barrido mostrando al organismo completo en posición dorsal, en donde se aprecia su forma convexa y las ocho cinetias dorsolaterales con sus cilios cortos y pequeños pliegues entre estas así como una parte de la zona adoral de membranelas (ZAM). 8 cinetias dorsolaterales (Ci), cilios (ci), pliegues (pl). Recubrimiento con oro. 3152X.



Fig.10a Micrografía electrónica de barrido, ampliación de una porción del extremo anterior mostrando una parte de la zona adoral de membranelas (ZAM), las fosas ciliares (fc), las cinetias (Ci) y los pliegues (pl) entre éstas. Recubrimiento de oro. 4400X.

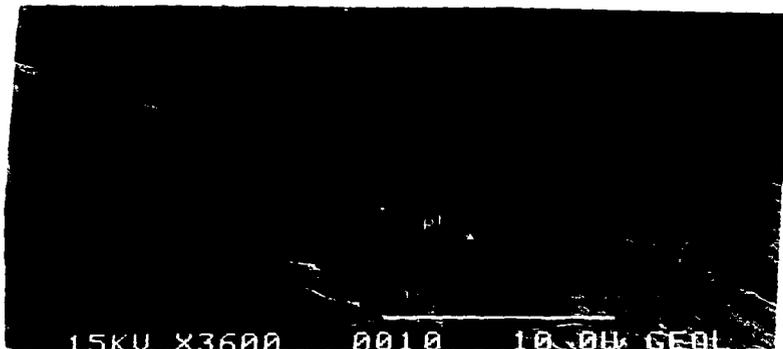


Fig.10b Amplificación de otra sección de la superficie dorsal, en donde se observa parte de las cinetias (Ci) y las fosas ciliares (fc) con los cilios anteriores de las cinétidas. Entre las cinetias se aprecian los plegamientos pelliculares (pl). Recubrimiento con oro, 3600X.

El citoplasma es hialino con pequeñas granulaciones, numerosas mitocondrias microtubulares de diferentes tamaños, típicas del género *Euplotes* localizadas abajo de la membrana plasmática y estratégicamente en aquellos lugares en donde se requiere un mayor consumo de energía, como es el caso de los cilios; numerosas vacuolas digestivas, el retículo endoplásmico en forma de cisternas, se encuentra distribuido en la mayor parte del citoplasma (Fig. 13); también se observaron la presencia de algunos endosimbiontes que por su estructura nuclear al parecer podrían corresponder a eucariontes unicelulares (Fig.14). Para el estudio del aparato nuclear se utilizó la microscopía fotónica con organismos procesados con la técnica argéntica de protargol con la cual se destacó el macronúcleo en banda con forma de 3 y/o C invertida abarcando todo el cuerpo del ciliado; éste es poliploide y reticulado, presenta una envoltura nuclear de doble membrana, ya que contiene una gran cantidad de cromatina en grumos y/o compacta, así como también numerosos nucleolos y partículas ribonucleoproteicas. Antes de la división macronuclear aparecen las bandas de replicación en los extremos del macronúcleo, las cuales se mueven hacia el centro, estas bandas están involucradas en la síntesis del ADN, histonas y posiblemente otras proteínas. En la Fig. 13 se puede observar perfectamente en un corte longitudinal el paso de la banda de replicación, la cromatina compacta, la envoltura nuclear y los nucleolos, los cuales algunos tienen el centro claro. Presenta un micronúcleo compacto adyacente al macronúcleo en la zona anterior derecha (Fig.15 y 16) y la vacuola contráctil se localiza cerca de los cirros transversales (Fig.17).



**Fig.11** Corte longitudinal de las membranas de la zona adoral de *E. eurytomus* en donde se observan las tres hileras de cilios que conforman cada membrana; la membrana plasmática (MP), el axonema constituido por dos microtúbulos centrales (Mc) y los nueve microtúbulos periféricos (Mp), mitocondrias (mi). Contraste Ur-Pb, 40000X.



**Fig.12** Micrografía electrónica de transmisión. En donde se observan dos diferentes cortes de cilios, uno en sentido longitudinal (extremo inferior izquierdo) y el otro en sentido transversal (extremo superior derecho). Vacuola contráctil (Vc), mitocondria (mi), membrana plasmática (MP), microtúbulos centrales (Mc), microtúbulos periféricos (Mp), en corte transversal de cilios (a) y corte longitudinal (b) del cilio. Contraste Ur-Pb, 25000X.

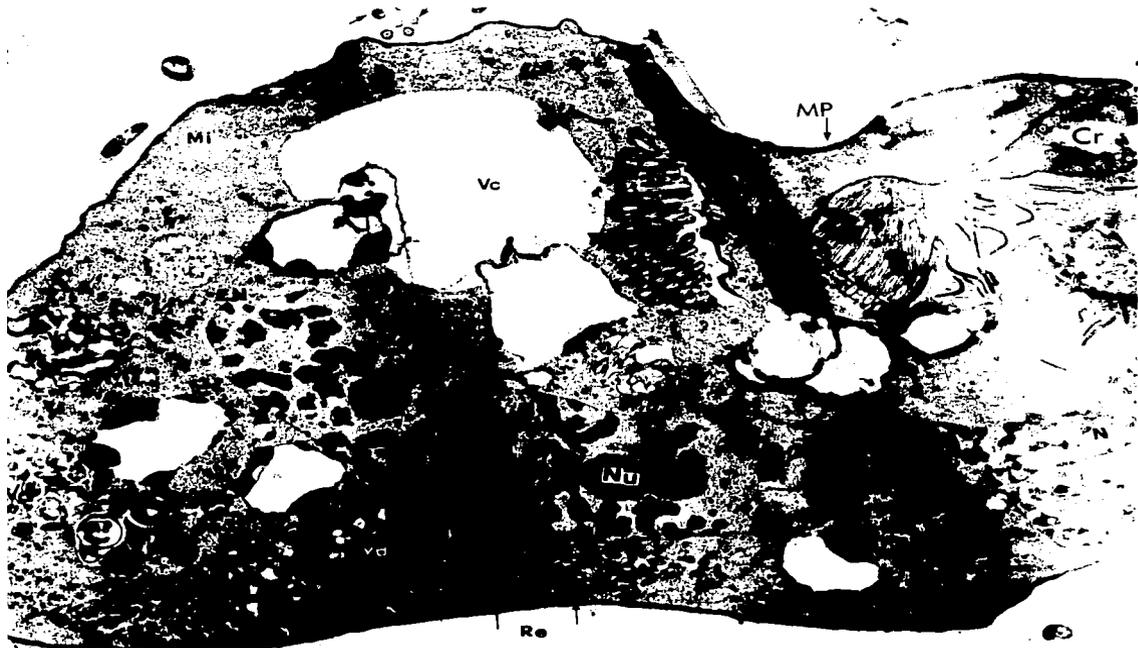


Fig.13 Micrografía electrónica de transmisión, muestra a *Euplotes eurystomus* casi completo en un corte longitudinal, apreciándose el macronúcleo con la banda de replicación (BR), la envoltura nuclear (EN), nucleolos (Nu), cromatina compacta (Cc), mitocondrias (mi), retículo endoplásmico (Re), vacuola contráctil (Vc) y vacuola digestiva (Vd), membrana plasmática (MP) y cirro (Cr). Contraste con uranilo-plomo, 7500X .

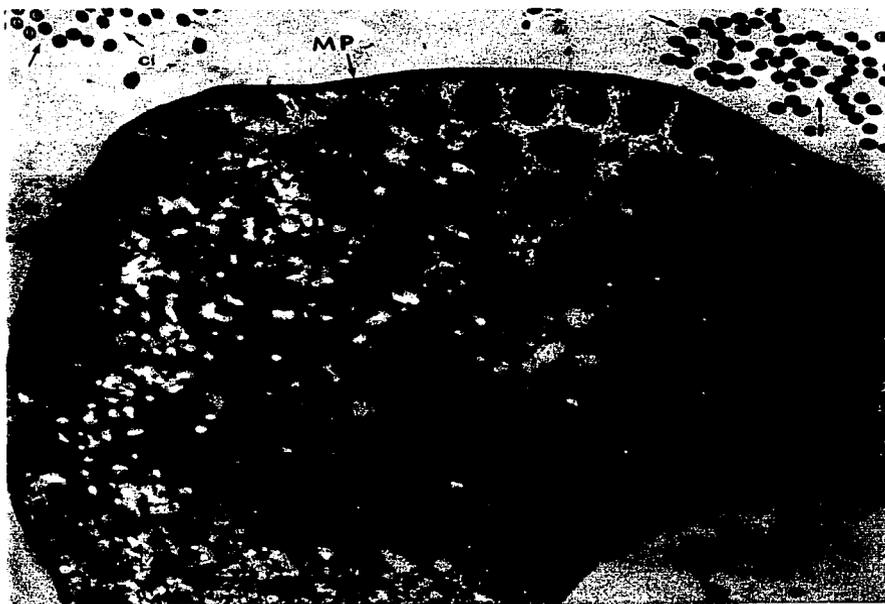


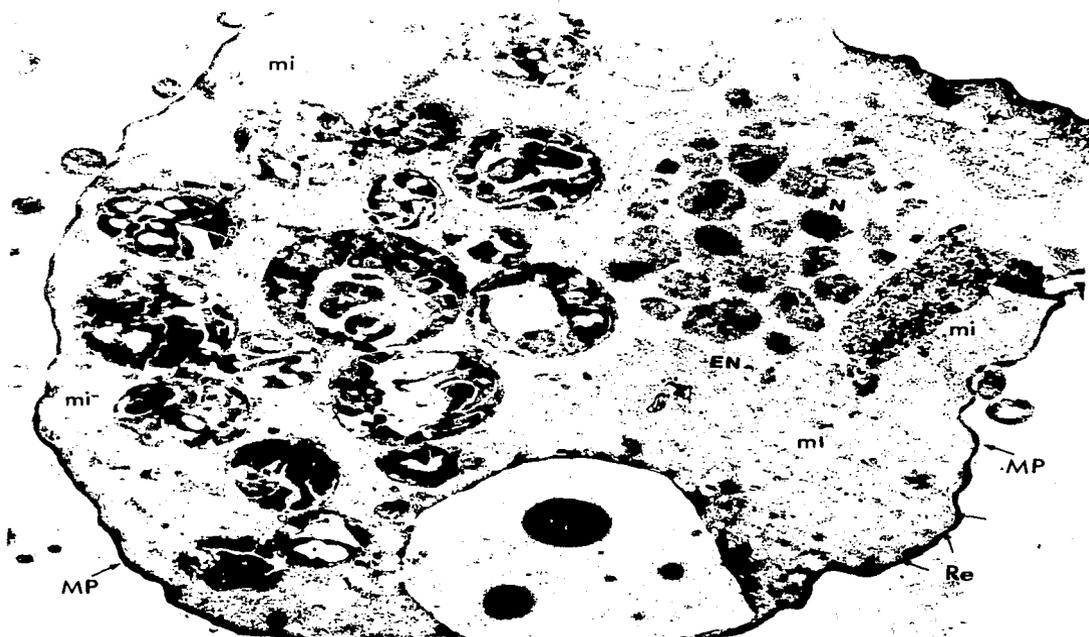
Fig.14 Micrografía electrónica de transmisión. Corte transversal de *Euplotes eurystomus*, mostrando cilios (ci), mitocondrias (mi), membrana plasmática (MP) y endosimbiontes (End). Contraste con Ur-Pb, 11934X



Fig.15 *Euplotes eurystomus* con el macronúcleo (Ma) en forma de 3, zona adoral de membranelas (ZAM), cirros: frontoventrales (Fv), transversales (T) y caudales (Ca) en preparación argéntica de protargol. 40x.



Fig.16 Otro tipo de macronúcleo (Ma) en forma de C invertida, zona adoral de membranelas (ZAM), cirros: frontoventrales (Fv), transversales (T) y caudales (Ca) de *E. eurystomus*, protargol, 40x.



**Fig.17** Micrografía electrónica de transmisión. Corte transversal del ciliado casi completo. Núcleo (N), cromatina compacta (Cc), envoltura nuclear (EN), vacuolas digestivas (Vd), vacuola contráctil (Vc) y mitocondria (mi), retículo endoplasmático (Re) y la membrana plasmática (MP). Contraste Ur-Pb, 12500X.

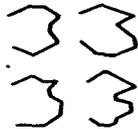
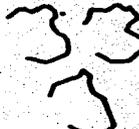
## DISCUSIÓN

Las descripciones morfológicas han sido la base para la clasificación de las especies de ciliados, debido a que el criterio de aislamiento reproductivo es muy problemático y difícil de utilizar en este grupo, como en los protozoos en general.

En este trabajo se muestran y describen las características corticales y ultraestructurales del ciliado hipotrico *Euplotes eurytomus*, que con las técnicas argentícas utilizadas para microscopía fotónica permitieron destacar el argiroma dorsal, cinetias dorsolaterales (técnica de Klein), el aparato nuclear, distribución de cirros y la zona adoral de membranelas (técnica de protargol), caracteres tradicionalmente empleados para la determinación de las especies del género *Euplotes*.

Los resultados obtenidos en este estudio, presentan una similitud con los de ciertos autores, (Tuffrau 1960; Curds 1975; Hill y Reilly, 1976 y Foissner *et al.* 1991) en especial en determinadas características estructurales del ciliado (Tabla 3), como el número de cirros frontoventrales, transversales y caudales así como en lo referente al número de cinetias dorsolaterales. La mayor diferencia se observa en el número de membranelas consideradas por Curds (1975) y en la variabilidad del macronúcleo.

**Tabla 3.** Algunos de los caracteres tomados en cuenta para la identificación de *Euplotes eurytomus* por varios autores.

CARACTERES	TUFFRAU, 1960	CURDS, 1976	HILL & REILLY, 1976	POISSNER et al., 1991	DATOS DEL PRESENTE ESTUDIO
Tamaño en $\mu\text{m}$ (longitud x anchura)	105 - 160 sin medición de anchura	100 - 160 x 40 - 90	140 - 180 x 95 - 135	140 - 230	113.15 - 175 - x 59.5 - 133 -
Cinetias dorsolaterales	8	10	9 - 11	10	8 - 10
Cirros frontoventrales	9	9	9	9	9
C. Transversales	5	5	5	5	5
C. Caudales	4	4	4	4	4
No. de Membranelas	-	50 - 65	45 - 55	-	40 - 55
Forma de macronúcleo				cita los aparatos nucleares de los autores anteriores	

Jones y Gates (1994) señalan que los criterios morfológicos tradicionales utilizados por la mayoría de los investigadores no son suficientes para distinguir claramente las especies, por lo que sugieren la cuantificación del mayor número de características morfológicas así como su análisis estadístico. En el presente trabajo se tomó en consideración lo propuesto por estos autores en lo referente a la cuantificación de los caracteres taxonómicos, con el propósito de hacer una descripción más precisa de esta población de *Euplotes eurytomus*, no obstante debido a que la cantidad de microorganismos en preparaciones permanentes no fue una cantidad representativa estadísticamente para poder interpretar los resultados de las mediciones obtenidas, ya que de estas mediciones son

solo en su mayoría en cantidad de 10 individuos, lo cual no se puede tratar estadísticamente, aunque esto se puede aplicar y mejorar para estudios a futuro. Las mediciones *in vivo* (que fue de 100 individuos), de anchura y longitud en el intervalo de máximo y mínimo es muy amplio encontrándose que solo con Hill y Reilly (1976) en la tabla 3, es similar el intervalo que el presenta.

En las micrografías electrónicas de barrido, se pudieron observar las estructuras corticales, las rugosidades superficiales, así como la posición de cirros y la ZAM de *E. eurytomus* que coincide con la descripción de Ruffolo (1976a). Adicionalmente este autor menciona que cada cinétida consta de dos cinetosomas, uno anterior y otro posterior; el primero lleva el cilio y contiene una red de partículas polarizadas conocidas como lasiosomas y el cinetosoma posterior lleva un corto condilocilio en forma de una prominencia y tiene además una fibra estriada, esta parte de la cinétida no fue observada debido a que los cortes realizados para la microscopía electrónica de transmisión no coincidieron en este lugar específico.

## **CONCLUSIONES**

- 1. La especie determinada por técnicas argentícas de Klein y protargol fue *Euplotes eurystomus* Wrzesniowski, 1870.**
- 2. La utilización de las técnicas de microscopía electrónica de transmisión y de barrido, fueron las adecuadas para la demostración de la ultraestructura interna y externa para este tipo de ciliado.**
- 3. Se realizó por primera vez en México un estudio morfométrico de *Euplotes eurystomus* tomando en consideración lo propuesto por Jones and Gates (1994).**
- 4. Es uno de los primeros estudios de ciliados en México empleando una herramienta de estudio tan importante como lo es la microscopía electrónica de transmisión y de barrido.**

## LITERATURA CITADA

- Bardele, C.F., Huttenlauch, I. y Schoppmann, H. 1986. The ciliate cortex studied by TEM and SEM cryofracture techniques. *Symp. Biol. Hung.* **33** : 115-124
- Borror, A. C. 1962. Ciliate Protozoa of the Gulf of México. *Bull. Mar. Sci. Gulf. Caribb.*, **12**(3):333-349
- , 1963. Morphology and ecology of the benthic ciliated Protozoa of Alligator Harbor, Florida. *Arch. Protistenk.*, **106**:465-534
- , 1968. Ecology of interstitial Ciliates. *Trans. Amer. Micros. Soc.*, **87**(2):233-243
- , 1972. Revision of the order Hypotrichida (Ciliophora, Protozoa). *J. Protozool.* **19**: 1-23
- Carter, H. P. 1972. Infraciliature of eleven species of the genus *Euplotes*. *Trans, Amer. Microsc. Soc.*, **91**:466-492
- Chatton, É. y Lwoff, A. 1930. Impregantion, par diffusion argentique, de l'infraciliature des ciliés marins et d'eau douce, après fixation cytologique et sans dessiccation. *Compt. Rend. Séanc. Soc. Biol.*, **104**:834-836
- Curds, C. R. 1975. A guide to the species of the genus *Euplotes* (Hypotrichida, Ciliatea). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.)*. **28**:1-61.
- Curds, C. R., Gates M.A. y Roberts D. M. 1983. *British and other Freshwater Ciliated Protozoa*, Part II, Cambridge University Press, London.
- Ehrenberg, C. G. 1838. *Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen. Ein Blick in das tiefere organische Leben der Natur*. Verlag von Leopold Voss. Leipzig.

- Foissner, W. 1982. Ökologie und Taxonomie der Hypotrichida (Protozoa: Ciliophora) einiger österreichischer Böden. *Arch. Protistenk.*, **126**:19-143.
- Foissner, W, Blatterer, H. Berger, H. y Kohmann F. 1991. *Taxonomische und ökologische Revision der Cilien des Saprobien-systems. Band I: Cyrtophorida, Oligotrichida, Hypotrichida, Colpodea*. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft. Informationsberichte Heft 1/91 Bayer. p.191-361
- Gates, M. A. 1988. Dorsal Kinetosomal Distribution in the Ciliate Genus *Euplotes*. *J. Protozool.*, **35**(4):506-510.
- Hill, B. F. y Reilly A. J. 1976. A comparative study of three Fresh-Water *Euplotes* Species (Ciliophora, Hypotrichida). *Trans. Amer. Micros. Soc.*, **95**(3): 492-504 .
- Hill, B. F. 1980. Classification and phylogeny in the suborder Euplotina (Ciliophora, Hypotrichida). University Microfilms International Dissertation Information Service 300 N. Zeeb Road, Ann Arbor, Michigan, U.S.A.
- Jones, T. C. y Gates, M. A. 1994. A morphometric analysis of the *Euplotes charon* morphotype (Ciliophora: Euplotida). *J. Euk. Microbiol.*, **41**(5): 441-450.
- Kahl, A. 1930-1935. Urtiere order Protozoa. I. Wimpertiere order Ciliata (Infusoria) eine Bearbeitung der freilebenden und ectocommensalen Infusorien der Erde, unter Ausschluss der marinen Tintinnidae. En: DAHL, E. (ed). Die Tierwelt Deutschlands, G. Fischer, Jena. Teil **18** (1930); **21**(1931); **25**(1932); **30**(1935).
- Klein, B.M. 1926. Ergebnisse mit einer silvermethode bei ciliaten. *Arch. Protistenk.*, **56**:243-279.
- , 1958. The "dry" silver method and its proper use. *J. Protozool.*, **5**:99-103.

- Kloetzel, A. J. 1991. Identification and Properties of Plateins, Major Proteins in the Cortical Alveolar Plates of *Euplotes*. *J. Protozool.* **38** (4):392-401.
- Lee, J.J., Hutner, S.H. and Bovee, E. C. 1985. *An Illustrated guide to the Protozoa*. Allen Press Lawrence, U.S.A.
- Murti, G.K. 1976. Preliminary Notes. Helices in the macronucleus of *Euplotes eurystomus*. *Exp. Cell Res* **99**:423-425.
- Raikov I. B. 1976. Evolution of macronuclear organization. *Ann. Rev. Genet.*, **10**:413-440.
- Ruffolo, J.J., Jr. 1976a. Fine structure of the dorsal bristle complex and pellicle of *Euplotes*. *J. Morphol.* **148**:469-488.
- 1976b. Cortical morphogenesis during cell division cycle in *Euplotes*: an integrated study using light optical, scanning electron and transmission electron microscopy. *J. Morphol.* **148**:489-528.
- Small, E. B. y Lynn, D.H. 1985. Phylum Ciliophora Doflein, 1901. In: Lee, J.J., Hutner, S.H. and Bovee, E. C. 1985. *An Illustrated guide to the Protozoa*. Allen Press Lawrence, U.S.A. pp 393-569.
- Tuffrau, M. 1954. Les caractères spécifiques dans le genre *Euplotes* (Note préliminaire). *Bull. Sc. Zool. Fr.* **79**:463-465.
- 1960. Revision du genre *Euplotes*, fondée sur la comparaison des structures superficielles. *Hidrobiol.* **15**:77.
- Wu, H. C. I. y Curds, C. R. 1979. A guide to the species of the genus *Apidisca*. *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.)*. **36**(1):34.