

TECNICA SIMPLE PARA LA PREPARACION
DE MICROINVERTEBRADOS TECADOS Y LORICADOS LABILES
PARA SU EXAMEN CON EL MICROSCOPIO
ELECTRONICO DE BARRIDO *

POR ANDRES BOLTOVSKOY

SUMMARY

Simple drying technique applicable to labile thecate and loricate microinvertebrates for examination with scanning electron microscope.

A rapid and simple method for drying microorganisms with half hard covers that undergo deformations while being air dried, is described. This is an ultrasimplified freeze drying technique which has given good results with *Dinoflagellata* of the genera *Peridinium* and *Glenodinium* as well as with *Rotifera* of the genus *Keratella*. It is presumed that this method can be applied to another biological objects with covers of similar consistence.

Con el uso del microscopio electrónico de barrido (MEB) en nuestro medio, surgen ciertos problemas relacionados con la preparación del material biológico para su observación a través de dicho aparato. El material que se lleva al MEB debe estar completamente seco. En el caso de objetos duros (caparazones calcáreos, por ejemplo) el secado puede realizarse directamente por evaporación. Sin embargo, materiales biológicos blandos al secarse de esa manera sufren distorsión. Para el secado de materiales lábiles existen dos métodos conocidos en la literatura como "freeze drying" (ver Sjöstrand, 1967, cap. VIII) y "critical point drying". Estos, aunque efectivos, requieren un equipo costoso y, a veces, la aplicación de técnicas complicadas que llevan mucho tiempo. El servicio de MEB del CONICET cuenta con el equipo necesario para procesar el material según el segundo de los métodos mencionados. La dificultad de su aplicación a ejemplares pequeños en baja cantidad es solucionada por Garner y Bryant (1973) aunque complicando bastante el procesado del material.

La finalidad del presente trabajo es la de describir un método de congelación-sublimación ultrasimplificado de modo que pueda llevarse a cabo con poco gasto casi en cualquier laboratorio biológico. El método en cuestión dio buenos resultados en el tratamiento de microinvertebrados tecados y loricados (dinoflagelados y rotíferos respectivamente) cuyas cubiertas, sin ser blandas, sufren deformaciones y pueden resquebrajarse si se los seca por evaporación. Si bien no puede resultar útil para estructuras más frágiles o blandas, se presume que el método en cuestión puede ser utilizado con éxito en todo tipo de microorganismos o estructuras (tecas, lórigas, partes quitini-

* Contribución científica n° 78 del Instituto de Limnología, CONICET-Facultad de Ciencias Naturales, Museo de La Plata.

zadas de artrópodos, polen, esporas, microalgas, etc.) cuyas cubiertas no sean lo suficientemente rígidas como para soportar la tensión superficial del agua durante una desecación evaporativa.

Los elementos necesarios para llevar a cabo una desecación según el método a describirse son (fig. 1) :

1) **BOMBA DE VACÍO DE ACEITE:** En nuestras experiencias se ha usado una bomba para vacío fino "Torricelli" que llega a producir un vacío de 0,00005 mm Hg. También se han probado otras bombas de menor potencia.

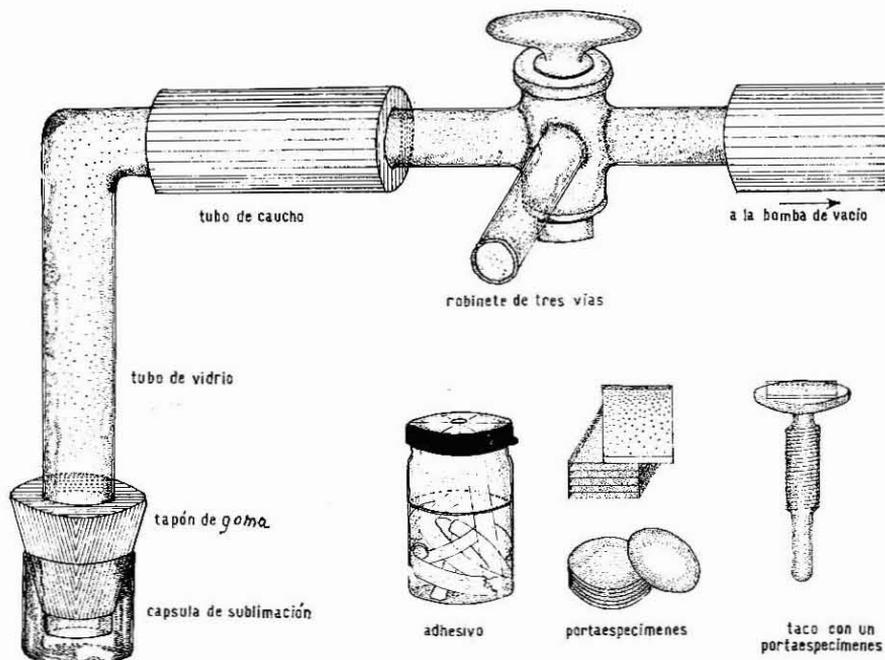


Fig. 1. -- Elementos necesarios para secar material biológico según el método sencillo de congelación-sublimación (ver explicación en el texto)

2) **CÁPSULA DE SUBLIMACIÓN:** Es un tubo con fondo plano de 16 mm de diámetro y aproximadamente 15 mm de altura. Se pueden usar los así llamados tubos-pastillero.

3) **TUBO EN L:** Se prepara doblando en ángulo recto un tubo de vidrio de 10 mm de diámetro.

4) **PORTAESPECÍMENES:** Se pueden hacer de metal o de vidrio. Estos últimos permiten la observación al microscopio óptico del material, una vez desecado. Los portaespecímenes metálicos son discos de 12-13 mm de diámetro de "papel de España" de cobre o de bronce. Los de vidrio, se recortan de cubreobjetos o de portaobjetos en forma de cuadraditos de 10 mm de lado.

5) **ADHESIVO:** Se prepara colocando pequeños trozos de cinta adhesiva "Scotch", o similar, en un recipiente con unos pocos mililitros de benzol o xileno. El pegamento de la cinta se solubiliza en el líquido, obteniéndose

un adhesivo muy diluído pero suficiente como para mantener a los microorganismos unidos al portaespecímenes.

6) **MEZCLA REFRIGERANTE:** En un vaso de precipitado de unos 250 ml con alcohol metílico o acetona se van agregando pequeños trozos de hielo seco hasta que el hervor que se produce al principio cesa y el burbujeo llega a su mínimo. A medida que la mezcla se va calentando, deberá ir agregándose más hielo carbónico.

Los sucesivos pasos del procedimiento que pondrá al material en condiciones de ser examinado mediante el MEB, son los siguientes:

1) **FIJACIÓN:** Se ha comprobado que el fijado con formol endurece más a los dinoflagelados si se utiliza una concentración mayor que la normalmente usada para fijar muestras de plancton. Además, las tecas que permanecieron en el fijador durante largo tiempo resultaron más resistentes que las recién fijadas.

2) **LAVADO:** El material que va a ser desecado debe ser lavado con agua destilada mediante varios pasos de centrifugación o decantación (en caso de que el material sea abundante) o mediante el pasaje por sucesivas gotas de agua destilada, con la ayuda de una micropipeta capilar. Debe tenerse en cuenta que cualquier sustancia disuelta o suspendida en el agua en que se encuentran los organismos (sales, restos del fijador, etc.), al evaporarse aquella cristalizará o precipitará sobre los mismos enmascarando la verdadera estructura de su superficie.

3) **PREPARACIÓN PARA EL SECADO:** Puede realizarse directamente en el fondo de la cápsula de sublimación, previamente lavada y desengrasada (en este caso, una vez desecado el material deberá ser transferido a un portaespecímenes, como se verá en MONTAJE). En caso contrario, los ejemplares se transfieren junto con unas gotas de agua al portaespecímenes, previamente encolada su superficie superior mediante un pincel. Para ello se usará el adhesivo preparado *ad hoc*, como se ha explicado más arriba. Debe tratarse que el portaespecímenes contenga la menor cantidad posible de agua, y esta tenga un máximo de superficie libre: es preferible colocar varias gotas pequeñas y no una grande. La colocación de las microgotas puede realizarse con el portaespecímenes ya dentro de la cápsula de sublimación.

4) **DESECACIÓN:** La cápsula de sublimación con el portaespecímenes en su interior con el material a desecar encima se ajusta al tapón de goma del tubo de vidrio acodado. Este está conectado a la bomba de vacío a través de un robinete de tres vías. La base de la cápsula se sumerge en la mezcla refrigerante previamente preparada hasta que se congelen las microgotas. Se pone a funcionar la bomba de vacío cuidando que durante el proceso *a)* no se descongelen las gotas y *b)* que estas no se desprendan del portaespecímenes debido a las vibraciones de la bomba en funcionamiento. Si en las primeras pruebas se ve que las microgotas se descongelan antes de terminado el proceso de sublimación, habrá que sumergir la cápsula en la mezcla refrigerante varias veces a lo largo del mismo, para evitar que ello suceda. Con nuestra bomba, el desecado de una muestra llevaba de 5 a 10 minutos sin que alcanzara a descongelarse. Con bombas de vacío de menor potencia el tiempo de sublimación va en aumento, pudiendo ser de horas. Esto es poco conveniente ya que el proceso requiere constante vigilancia. Cuando mediante un examen visual se comprueba que no existe más hielo en el portaespecí-

menes, se para el funcionamiento de la bomba. Se lleva la cápsula a temperatura ambiente para evitar la condensación de agua en su interior y recién entonces, mediante el robinete, se hace entrar aire en el sistema, evitando su penetración violenta. El portaespecímenes ya está listo para ser montado mediante pintura eléctricamente conductiva sobre un taco especial, sobre el cual será cubierto de una finísima capa metálica y llevado al MEB para su examen.

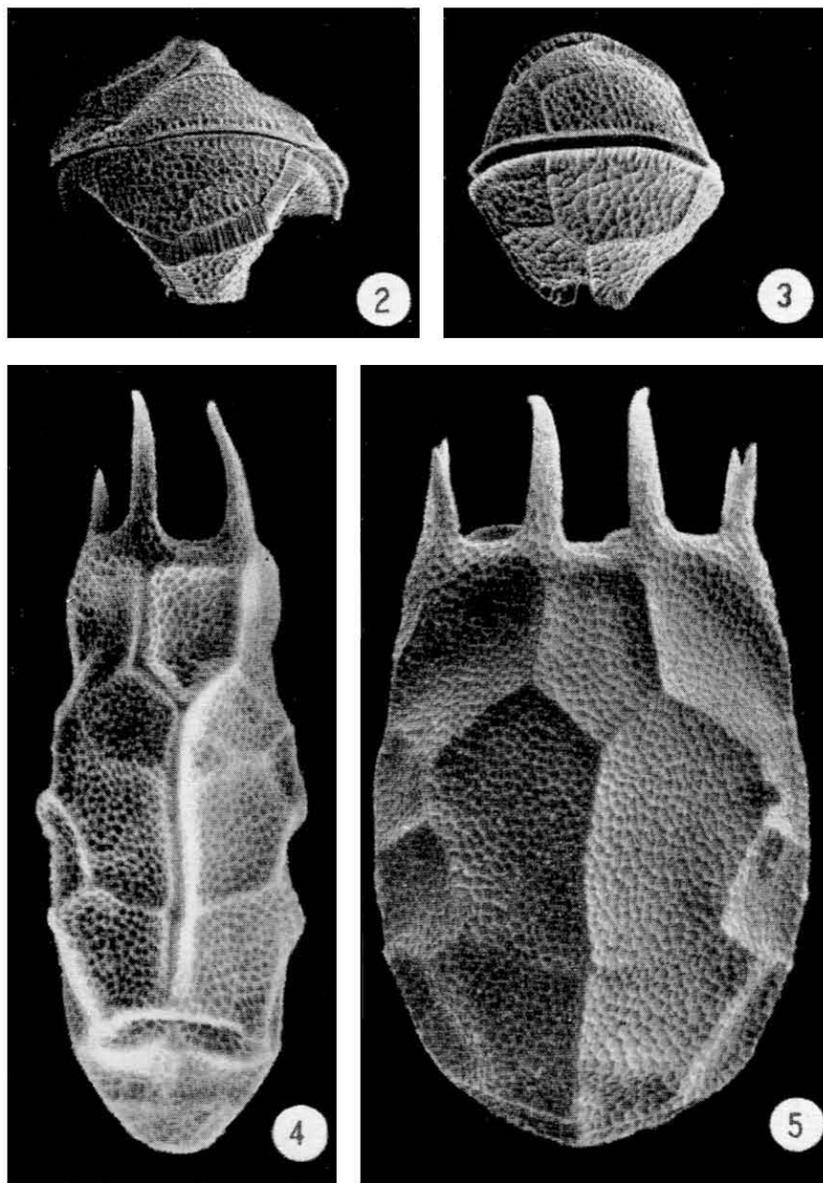
5) MONTAJE: En caso de que la sublimación haya sido realizada no sobre un portaespecímenes sino en el fondo de la cápsula de sublimación, los ejemplares desecados deberán luego ser montados sobre un portaespecímenes encolado. Las ventajas de este procedimiento son: *a*) en caso de organismos suficientemente grandes como para ser manipulados con facilidad (por ejemplo rotíferos) se permitirá su orientación de acuerdo a cómo quieran ser observados en el MEB; *b*) en caso de organismos pequeños (dinoflagelados) y difíciles de orientar, al ser montados quedarán en muy variadas posiciones y no según su cara normal de apoyo, como sucede en una desecación directamente sobre el portaespecímenes. El transporte así como la orientación de los organismos secos puede realizarse mediante una fina aguja enmangada o un "pelo" de vidrio, bajo microscopio binocular estereoscópico. Con respecto a manipulación, orientación y elección del medio de montaje apropiado para organismos pequeños son también aplicables las técnicas descriptas por Leffingwell y Hodgkin (1970) para polen.

El método aquí descripto fue aplicado por el autor en la desecación de dinoflagelados de agua dulce de los géneros *Peridinium* y *Glenodinium*. También se lo ha empleado en la desecación de rotíferos del género *Keratella*.

Las figuras 2-5 muestran la diferencia de los resultados obtenidos en *Peridinium* y *Keratella* en una desecación evaporativa y una desecación por congelación-sublimación. El mismo método fue utilizado con éxito por Ballech (1975) en la preparación de dinoflagelados marinos del género *Proto-peridinium*.

Las ventajas del procedimiento descripto son: *a*) simplicidad; *b*) rapidez; *c*) mínimo de manipuleos del material y *d*) mínimo de posibilidades de pérdida del material. Las desventajas del mismo consisten en que sólo es aplicable a materiales semiduros. Otro inconveniente es que el adhesivo propuesto suele resquebrajarse al ser sometido a calor durante el metalizado y el bombardeo de electrones. En estos casos el fondo de las micrografías puede cubrirse con tinta china común, para su publicación.

Parte de este trabajo ha sido realizado en el Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido, del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, a cuyo personal agradezco su colaboración. Quiero también expresar mi agradecimiento a los señores J. C. Cachi, por su ayuda en la puesta a punto de la técnica y J. C. Suárez, por la realización de los dibujos.



Figs. 2-5. — Resultados obtenidos por desecación evaporativa y por el método simple de congelación-sublimación. 2, *Peridinium willei* secado por evaporación, $\times 750$; 3, *Peridinium willei* secado según el método de congelación-sublimación, $\times 750$; 4, *Keratella cochlearis* secada por evaporación, $\times 800$; 5, *Keratella cochlearis* secada según el método de congelación-sublimación, $\times 800$.

BIBLIOGRAFIA

- BALECH, E. 1975. Estructuras de *Protopteridinium* en Microscopía electrónica de barrido. *Neotrópica*, 21 (64): 20-25.
- GARNER, G. E. y V. M. BRYANT, 1973. Preparation of modern palynomorphs for scanning electron microscopy by the critical point drying method. *Geoscience and Man*, 7: 83-88.
- LEFFINGWELL, H. A. y N. HOBKIN, 1970. Techniques for preparing fossil palynomorphs for study with the scanning and transmission electron microscopes. *Rev. Paleobot. Palyn. II*: 177-199.
- SJÖSTRAND, F. S. 1967. Electron microscopy of cells and tissues. Vol. 1: pp. XII + 462. *Academic Press*, New York-London, 1970.