

# Folia Biologica

Publicación del personal técnico del Instituto Bacteriológico  
del Departamento Nacional de Higiene

Dirección y Administración: VELEZ SANSFIELD 563

Folia Biol. - Buenos Aires, Enero, Febrero y Marzo 1935 - Nos 46-47-48

## TRABAJOS ORIGINALES

### Dispositivo sencillo para micromanipulaciones

Por S. SORIANO

Aprovechando el movimiento micrométrico vertical de un microscopio, se ha ideado un dispositivo sencillo que permite la ejecución de la mayor parte de los trabajos que pueden efectuarse con los aparatos especiales de micromanipulación en los laboratorios de microbiología<sup>1</sup>.

El dispositivo consiste en una pinza porta-pipeta, que sirve para mantener firmemente sujeta a un microscopio la pipeta cuya punta ha de efectuar las micromanipulaciones.

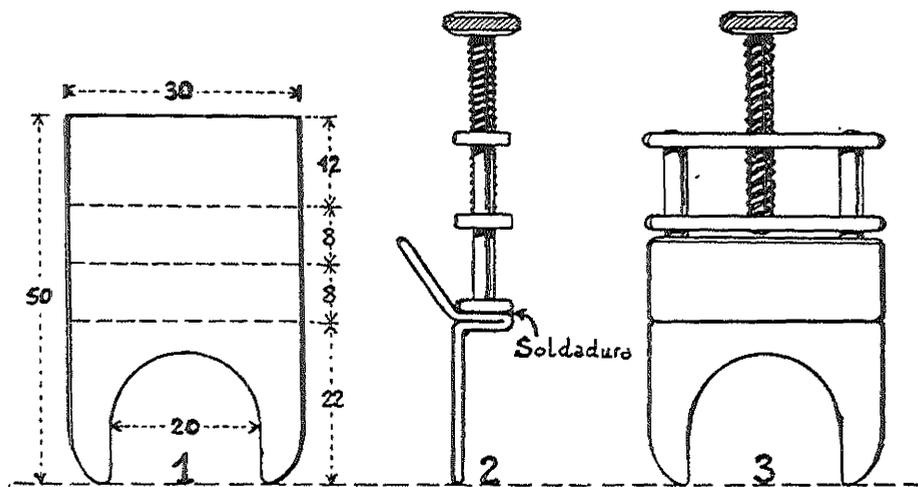


Fig. 1.

*Construcción de la pinza:* Se puede utilizar una pinza de HOFFMANN a la cual se suelda una chapa cortada según indica el esquema 1 de la figura 1, disponiéndola en la forma que muestran los esquemas 2 y 3 de la misma figura.

<sup>1</sup> Una misma idea ha sido utilizada por MALONE, aunque en forma algo distinta. (MALONE R. H., *Jour. Path. and Bact.*, 22, 222, 1918).

*Descripción del dispositivo:* La pinza se fija a un microscopio cualquiera que sirve de sostén y del cual se usarán solo los tornillos macro y micrométrico, sujetándola por medio de uno de los lentes objetivos, para lo cual basta con destornillararlo unas vueltas y encajar el arco de la pinza en el espacio formado. Al atornillar de nuevo el objetivo, la pinza queda firmemente sujeta al revólver.

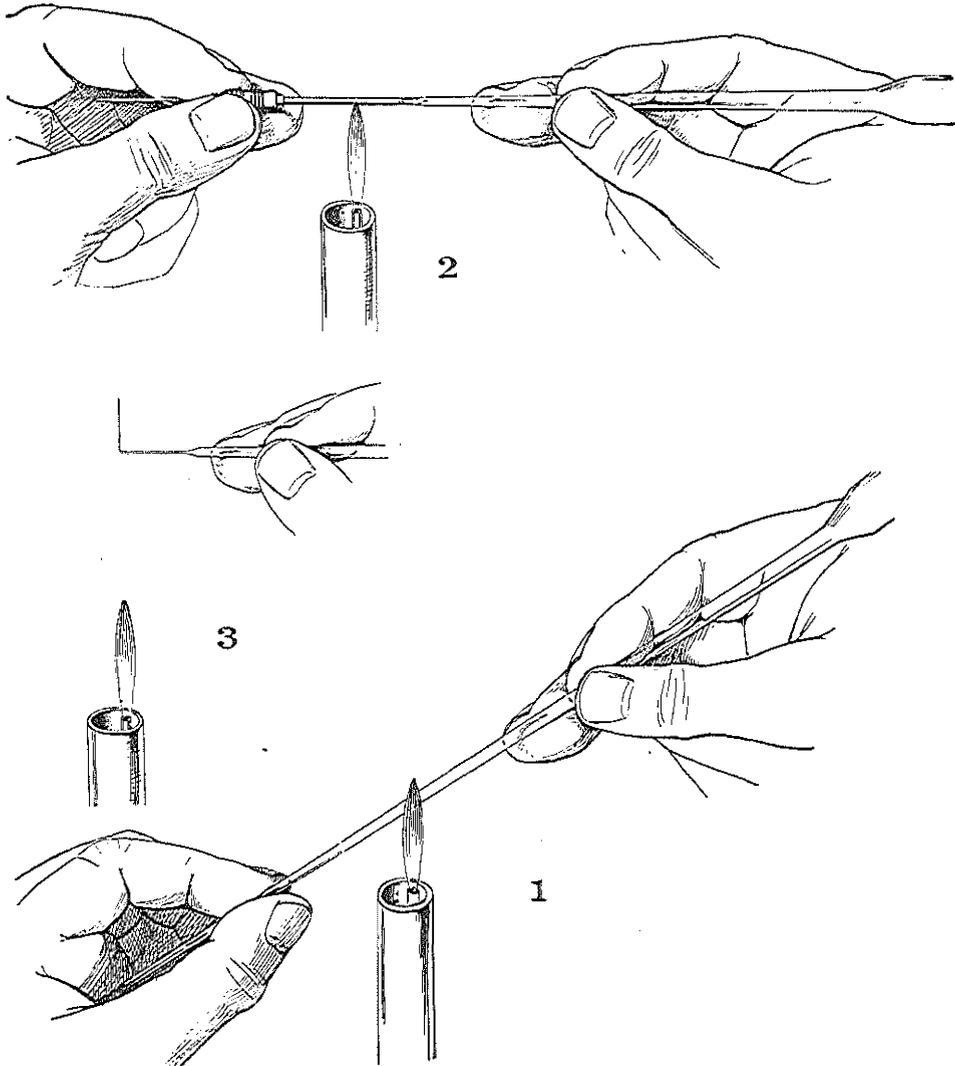


Fig. 2.

La pipeta se coloca en la pinza y se fija por medio del tornillo, quedando en esta forma listo para el uso el « micromanipulador ».

Para utilizar el dispositivo descrito, se hace uso de un segundo microscopio « de observación », en cuya platina se dispone la cámara húmeda, caja de PÉTRI etc., con el material microbiano que se desea manipular.

*Fabricación de las micropipetas:* Se comienza por estirar directamente a mano una pipeta PASTEUR común de una sola punta, por medio de la pequeña llama

veladora de un mechero de BUNSEN, según indica el esquema 1 de la figura 2. A continuación resulta muy práctico utilizar el siguiente procedimiento del Prof. Dr. A. SORDELLI: se introduce el capilar hecho a mano, en la luz de una aguja de inyecciones más bien fina, entrando por la punta biselada. Se mantienen fijas entre los dedos el extremo de la pipeta y la base de la aguja, según indica el esquema 2 de la figura 2 y se calienta el caño de ésta a la veladora, estirando suavemente, pero con firmeza, ni bien la fusión del vidrio lo permite. Con el calentamiento uniforme producido por la camisa metálica, se obtienen generalmente y ni bien se haya adquirido un poco de práctica, capilares suficientemente finos y con luz en el interior, como para servir en los más delicados trabajos de micromanipulación bacteriológica.

Por medio de una pequeña tijera flameada se corta el capilar a una distancia conveniente y colocándolo con cuidado sobre la veladora, como indica el esquema 3 de la figura 2, se hace doblar la punta hacia arriba en ángulo recto y a la distancia que se quiera, por acción de la columna de aire caliente formada por la llama. En caso necesario puede aún retocarse con un corte de tijera la longitud del capilar doblado hacia arriba, de modo que pueda entrar libremente por la «puerta» de la cámara húmeda, debiendo ser a la vez suficientemente largo como para que su punta, una vez dentro de la cámara toque el cubre-objeto, sin que la parte horizontal de la pipeta tropiece en la barra superior de la puerta de entrada.

*Usos del dispositivo:* El dispositivo descrito puede ser utilizado en los distintos trabajos de micromanipulación. A continuación se detallan algunos de los usos más comunes en los laboratorios de microbiología.

1° *Aislamientos en cámara húmeda.* — Se emplea este dispositivo especialmente para los aislamientos unicelulares de bacterias<sup>1</sup>. En el microscopio de observación se dispone una cámara húmeda construída sobre un porta-objeto según indican los esquemas de la figura 3, con el umbral de la entrada y las

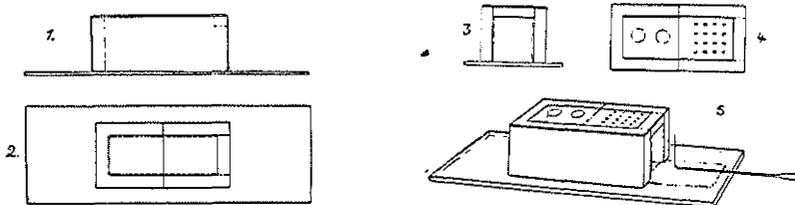


Fig. 3.

paredes tapizadas con papel de filtro mojado y cubierta en la parte superior con dos cubre-objetos comunes (18 × 18) en uno de los cuales se han depositado dos gotas de un medio líquido apropiado y en una de ellas una cierta cantidad del material microbiano (por ej.: cultivo muy fresco de pocas horas, o bien esporas). Se coloca la micropipeta en la pinza del microscopio sostén, sujetándola en posición horizontal y con la punta dirigida hacia arriba. Se conecta en la parte no estirada, un trozo de caño de goma que termina en una cánula de vidrio, para poder soplar el material de la punta de la pipeta cuando sea necesario, y se introduce la misma dentro de la cámara húmeda, situándola luego en el campo visual, comenzando por enfocarla con los lentes de menor aumento, hasta terminar por centrarla en el campo óptico de los mayores aumentos en seco. Los aparatos quedan dispuestos según indica la figura 4.

<sup>1</sup> Los aislamientos unicelulares de levaduras y esporas de hongos, se efectúan en general con mucha mayor facilidad empleando la técnica de LINDNER de «cultivos en gotitas» («tröpfchenkulturen») hechas con una plumita de dibujo, o bien con el dispositivo 2° que se describirá más adelante.

Los dos movimientos horizontales necesarios para el centrado de la pipeta se obtienen, de acuerdo con la figura 5, en la forma siguiente: 1º desplazando el pie del microscopio soporte con pequeños movimientos laterales muy cuidadosos hechos a mano desde *c*, con punto de apoyo en *b*; 2º girando el revólver alrededor de su centro *a* por medio de suaves movimientos laterales efectuados con los dedos apoyados sobre el tornillo *r* de la pinza <sup>2</sup>.

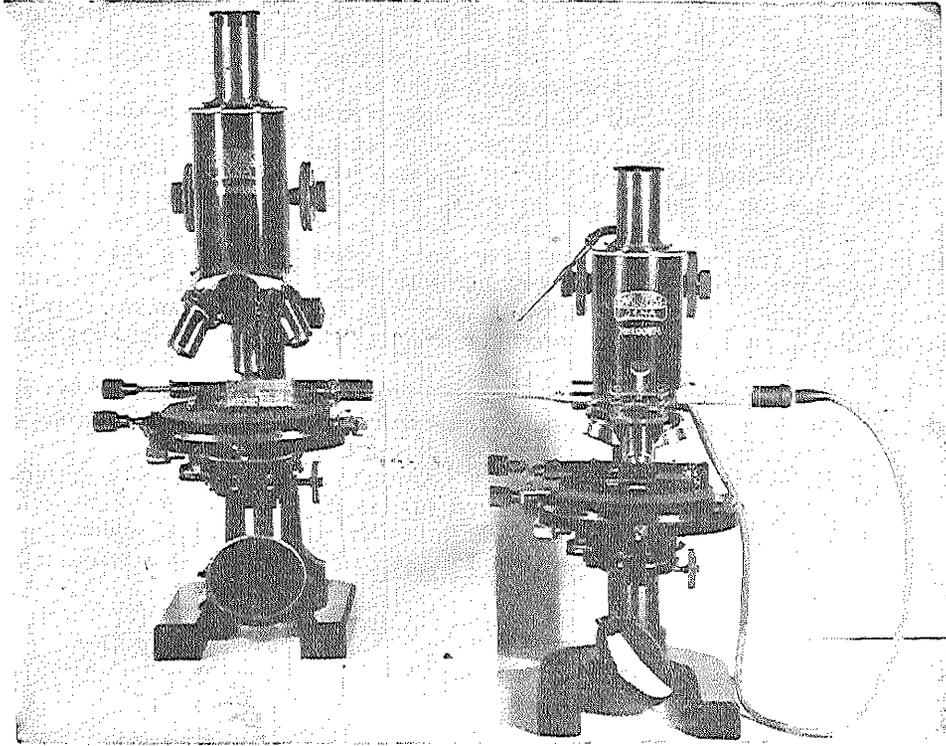


Fig. 4.

Una vez centrada la punta de la pipeta, se efectúan las micromanipulaciones para los aislamientos en la forma que sigue:

- 1º Se carga la pipeta en la gota de medio estéril.
- 2º Se hace entrar un poco de material en ella tomándolo de la suspensión en la otra gota.
- 3º Se vuelca el material absorbido, formando una tercera pequeña gota cerca de las anteriores, con el objeto de homogeneizar la suspensión definitiva. Esto último no es necesario si la suspensión inicial es bastante diluida.
- 4º Se soplan pequeñas gotitas en el segundo cubre-objeto, preferentemente en posición simétrica, para lo cual resultan muy útiles las escalas con *vernier* de la platina «chariot». En general conviene depositar cuatro hileras de cuatro gotitas cada una o cinco hileras de cinco.
- 5º Se revisan cuidadosamente las gotitas, inclusive con los grandes aumentos y se anota la posición de aquellas que contienen una sola célula o espora.

<sup>2</sup> Para poder efectuar este movimiento es indispensable haber desplazado un poco el revólver fuera de las posiciones fijas que coinciden con las aberturas de los objetivos, operación que se efectúa al principio, al colocar la pinza en el microscopio.

Con gérmenes muy pequeños o de más difícil visibilidad, resulta más conveniente efectuar las dos últimas operaciones en la forma que sigue:

4 a. Se soplan pequeñísimas gotitas en el cubre-objeto observando la salida de las mismas con gran aumento y retirando la pipeta hacia abajo enseguida que se ha visto salir un solo germen.

5 a. A cada una de las microgotitas, una vez terminada la serie, se agrega luego una cierta cantidad de medio estéril, con una nueva micropipeta que vuelve a cargarse con ese objeto. Se ha comprobado repetidas veces que en esta operación no se llevan los gérmenes de una gotita a la otra soplando el medio con la misma pipeta, siempre que se retire ésta hacia abajo mientras aún se está soplando, cuando la gotita ha adquirido un tamaño conveniente.

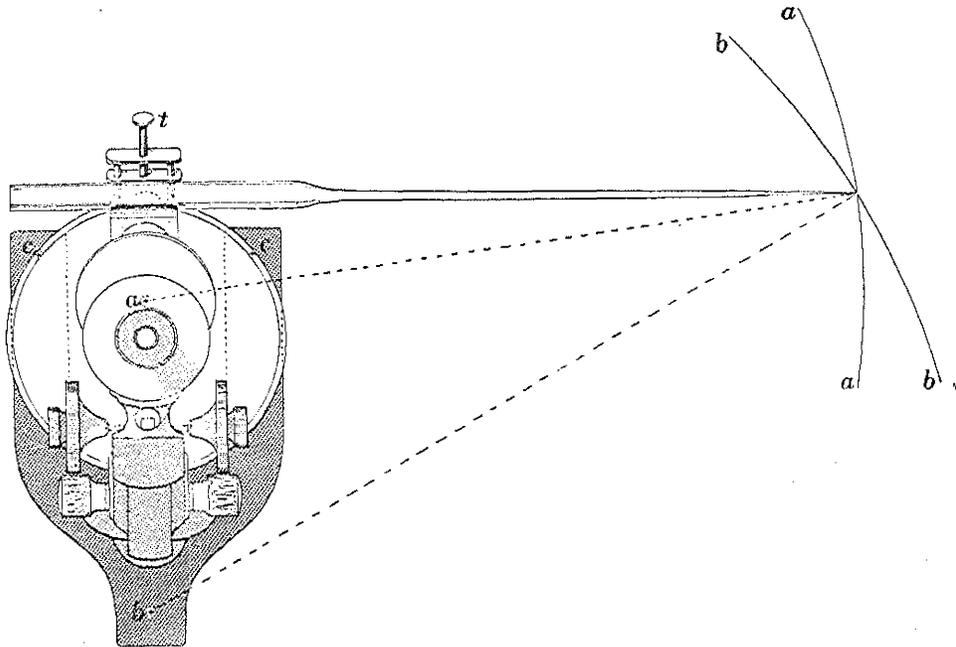


Fig. 5.

Los movimientos necesarios para efectuar todas las operaciones arriba indicadas se consiguen: 1º Con los movimientos de la platina del microscopio de observación, para colocar las gotas en el campo óptico y para la distribución de las gotitas. 2º Con los movimientos macro y micrométricos del microscopio soporte para mover hacia arriba o abajo la micropipeta.

Una vez terminada esta operación, se coloca el cubre-objeto con las gotitas sobre un porta-objeto excavado preparado de antemano con un aro de vaselina colocado en caliente con un pincelito y se terminan de cerrar bien los bordes con vaselina. En caso necesario se continúan los aislamientos en otros cubre-objetos hasta la cantidad deseada, incubándose luego todos a temperatura conveniente.

Cuando se ha obtenido el desarrollo, se absorbe entonces cada gotita con una punta fina de pipeta, la cual se rompe luego directamente en un tubo de ensayo con un medio de cultivo adecuado.

2º *Aislamientos sin cámara húmeda.* — Si el tamaño de los microbios a aislar es relativamente grande, o son muy refringentes, puede usarse este otro dispositivo más simple:

Sobre un porta-objeto, se dispone un pequeño bloque de agar de unos  $2 \times 1$  cm de lados y bastante alto (recién cortado de una caja de PETRI en la que se han volcado dos tubos de agar punción). En el medio y paralelamente a los lados mayores se traza una línea de siembra con material tomado de un cultivo en agar del microorganismo cuyo aislamiento unicelular se procura, haciéndolo con una punta de pipeta muy estirada de modo que sea bien flexible y con la extremidad cerrada en la veladora en forma de una pequeña bolita para evitar la ruptura del agar al efectuar la línea de siembra.

A continuación se estira simplemente a mano la punta de una pipeta PASTEUR y se dobla hacia arriba como en el caso anterior, cortándola a poca distancia del ángulo. La extremidad en este caso debe ser bastante fina aunque no necesita serlo tanto como en el método anterior. Se dispone la pipeta en la pinza-soporte con la punta dirigida hacia abajo y en posición conveniente como para poder accionar libremente con ella entre el agar y el objetivo sin tocar en ningún momento este último para evitar infecciones. A este objeto deberá usarse un objetivo de no demasiado aumento (generalmente  $10 \times$ ) pudiendo usarse oculares  $20 \times$  ó  $25 \times$  para conseguir aumentos grandes.

Se busca, preferentemente en los bordes de la siembra, alguno de los gérmenes bien separados y se pica con la punta de la pipeta, llevándolo enseguida a un medio de cultivo apropiado en el cual se abandona ésta rompiéndola o cortándola (generalmente tubos de ensayo, con un medio líquido, o bien caja de PETRI con agar, cuyo lugar de caída se marca con una circunferencia en el reverso)<sup>1</sup>.

En caso de prestarse el material, cuando éste es seco y pulverulento (como por ejemplo con las esporas de « carbones » y « rullas » de los cereales) puede prescindirse del bloque de agar, colocando una cierta cantidad del mismo directamente sobre un porta-objeto flameado y picando las esporas en seco con la punta de la pipeta, a la cual se adhieren<sup>2</sup>.

3º *Aislamientos de pequeñas colonias, sectores, colonias secundarias, etc., en cajas de Petri.* — Se estira la punta de una pipeta PASTEUR en forma tal que quede relativamente gruesa, se inclina en ángulo aproximado de  $45^\circ$  hacia abajo sobre una veladora a 1 cm más o menos de su extremidad y se coloca en la pinza soporte de manera que quede inclinada hacia abajo para poder entrar bien en la caja de PETRI sin tocar los bordes. Se observan las colonias, enfocando con pequeño aumento para poder tener un amplio espacio de acción de la pipeta y se coloca la punta de ésta en el campo óptico moviendo simplemente a mano el microscopio sostén. Se sitúa la punta justamente sobre la parte que desea aislarse y con el tornillo macrométrico se baja entonces la pipeta hasta tocar el material, el cual se hace entrar poco a poco en la misma con algún movimiento ocasional del micrométrico. Se transporta luego a un medio de cultivo apropiado en el cual se abandona la punta rompiéndola.

<sup>1</sup> El autor ha visto emplear este método del bloque de agar al Dr. J. FORTNER del Instituto « Roberto Koch » de Berlín, quien manipulaba una micropipeta recta, directamente a mano (!).

<sup>2</sup> Método de HATA de aislamiento de esporas de hongos en seco.