

Boltovskoy, A., 1995

Técnicas de microscopía electrónica de barrido: aplicación a las microalgas.

In: *Manual de métodos ficológicos.*

Ed.: K. Alveal, M. E. Ferrario, E. C. Oliveira & E. Sar.

Univ. de Concepción, Concepción. pp. 119-138.

**SCANNING ELECTRON MICROSCOPY:
TECHNIQUES FOR MICROALGAE**

CONTENTS

INTRODUCTION	120
How does SEM work?	120
When to utilise the SEM?	120
Preparation of the microalgae.	121
FIXATION SOLUTIONS AND HARDENERS	122
What fixation solution should be used for SEM?	122
Glutaraldehyde.	122
Osmium tetroxide.	122
Formaldehyde - paraformaldehyde.	123
Buffered solutions.	123
Hardeners.	124
PRELIMINARY TREATMENT OF THE ALGAL MATERIALS	124
Rinsing and concentrating.	124
Micromanipulation.	125
Dehydration.	125
Cleaning.	125
HANDLING MICRTOPARTICLES	126
Sandwich technique.	126
Agar encapsulation.	126
DRYING	127
CRITICAL POINT DRYING	128
FREEZE DRYING	131
Sublimation in aqueous medium.	131
Sublimation in Peldri II.	133
MOUNTING	134
METAL COATING	135
Evaporative coating	136
Ion sputtering.	136
CONCLUSION	137
LITERATURE CITED	138

TECNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO: APLICACION A LAS MICROALGAS

ANDRES BOLTOVSKOY

Instituto de Limnología "Dr. R. A. Ringuelet" y
Departamento Científico Ficología
Facultad de Ciencias Naturales y Museo
Paseo del Bosque s/n
1900 La Plata, Argentina

INTRODUCCION	120
¿Cómo funciona el MEB?	120
¿Cuándo recurrir al MEB?	120
Preparación de las microalgas	121
FIJADORES Y ENDURECEDORES	122
¿Qué fijadores elegir para el MEB?	122
Glutaraldehído	122
Tetróxido de osmio	122
Formaldehído - paraformaldehído	123
Soluciones tamponadas	123
Endurecedores	124
TRATAMIENTO PRELIMINAR DEL MATERIAL ALGAL	124
Lavado y concentración	124
Micromanipulación	125
Deshidratación	125
Limpieza	125
MANEJO DE MICROPARTICULAS	126
Técnica del sándwich	126
Encapsulamiento en agar	126
SECADO	127
SECADO POR PUNTO CRITICO	128
SECADO POR SUBLIMACION	131
Sublimación en medio acuoso	131
Sublimación en Peldri II	133
MONTAJE	134
METALIZADO	135
Cobertura evaporativa	136
Rociado iónico	136
CONCLUSION	137
REFERENCIAS	138

INTRODUCCION

MEB es la sigla con que se designa al Microscopio Electrónico de Barrido en castellano (y también en francés), siendo equivalente al inglés SEM (Scanning Electron Microscope). Ante todo, para determinar en qué ocasiones hace falta o se puede recurrir al MEB, vale la pena mencionar cuáles son las diferencias entre el MEB y el microscopio electrónico de transmisión (MET). Si bien ambos trabajan con haces de electrones y permiten obtener imágenes de especímenes con aumentos muy superiores a los posibles con sistemas ópticos, difieren en su funcionamiento y se emplean con diferentes objetivos. Mientras que en el MET el haz de electrones debe atravesar un preparado (como la luz en un proyector de transparencias) dando una imagen "transmitida", en el MEB se obtiene una imagen "reflejada". En consecuencia, mientras que el MET sólo permite examinar cortes u objetos muy delgados, dando imágenes "planas", el MEB proporciona imágenes de la superficie de los objetos sin importar su espesor. Si bien esto es básicamente cierto, en ocasiones se utiliza también al MET para estudiar estructuras superficiales, pero no directamente, sino mediante examen de muy delgadas réplicas creadas mediante el sombreado con carbón. De igual forma el MEB permite estudiar estructuras internas, examinando la superficie expuesta de células congeladas y quebradas mediante las técnicas de criofractura y criocorrosión (ver Billard & Chrétiennot-Dinet, en este manual).

¿Cómo funciona el MEB?

El MEB consta de una columna de óptica electrónica que trabaja en vacío, puesto que de otro modo los electrones serían absorbidos por el aire. Los electrones emitidos por un filamento que se encuentra en el extremo superior de la columna son dirigidos hacia una cámara ubicada en la base de la columna donde se encuentran los especímenes montados sobre un taco metálico soportado por una platina móvil. La superficie de los especímenes, al ser excitada por el bombardeo electrónico, emite electrones secundarios, los que tras un proceso de aceleración y amplificación son dirigidos hacia dos tubos de rayos catódicos. Una de las pantallas fluorescentes proporciona una imagen visual y otra se utiliza para el registro fotográfico. La imagen visual que se obtiene no es fija como en el MET, sino que se va recomponiendo constantemente mediante el barrido de una línea luminosa que recorre la pantalla a intervalos regulares.

¿Cuándo recurrir al MEB?

Las principales cualidades del MEB son: a) La posibilidad de examinar las superficies de los objetos con un rango de variación de entre 15 y 100.000 aumentos. b) Una profundidad de campo 300 veces mayor que la del microscopio óptico, a iguales aumentos, proporcionando imágenes de objetos en todo su volumen, sin

planos fuera de foco. c) Una resolución de 7 nm, o sea 30 veces mayor que la del microscopio óptico. d) Los movimientos de la platina permiten examinar el mismo objeto desde diferentes ángulos, de modo que sólo la superficie de apoyo queda fuera del alcance del observador. e) Además de las ventajas más obvias de esta última característica, dos fotomicrografías del mismo objeto tomadas con un ángulo ligeramente diferente (par estereográfico), al ser observadas a través de lentes estereoscópicas, permiten ver una imagen en tres dimensiones, lo cual en muchos casos puede decidir sobre la interpretación de los relieves (Lane, 1972; ver Navarro, en este manual).

De lo dicho se desprende que la microscopía electrónica de barrido es aplicable a las microalgas en el estudio de sus estructuras externas, o esqueletos internos desprovistos de protoplasma, tales como frústulos de diatomeas, tecas de dinoflagelados, cocolitos de los cocolitofóridos, esqueleto de los silicoflagelados y ebriales, periplastos y lórigas de las euglenofíceas, escamas y lórigas en las crisofíceas, lórigas de algunas volvocales, paredes de las desmidiáceas, periplastos de algunas otras algas verdes con características particulares (por ejemplo en los géneros *Pediastrum* y *Scenedesmus*), diferentes tipos de quistes, etc. El MEB puede resultar de utilidad aún en el caso de algunas criptofíceas con periplastos diferenciados o en cianofitas endolíticas o incrustantes (Hickel, 1975), pero difícilmente revele algo más interesante que lo que nos permite ver el microscopio óptico en células con cubiertas mucosas o de paredes lisas, salvo en el caso de estudios ultraestructurales muy específicos. La microscopía electrónica de transmisión, en cambio, resulta útil en estudios de cortes histológicos o citológicos ultrafinos de cualquier grupo algal (ver Cáceres, en este manual).

Preparación de las microalgas

El MEB se fabrica en forma comercial desde 1965, o sea desde hace unos 30 años, mientras que el primer MET comercial es 25 años más antiguo. Tal vez a causa de esa diferencia, a la semejanza de sus nombres y al parentesco en cuanto a ciertos principios de funcionamiento de ambos, aún persiste una tendencia a creer que la preparación de los materiales para el MEB es similar y tan delicada como para el MET. Lo cierto es que para los estudios de morfología superficial de las microalgas con el MEB rara vez hace falta una fijación más compleja que la formolización y, obviamente, no se requieren cortes ni tinciones: los organismos de cubiertas más resistentes sólo necesitan ser montados y revestidos de una capa de material conductivo. Sin embargo, los materiales más lábiles o frágiles, como se verá, necesitan un tratamiento adicional mediante técnicas especiales para evitar su colapso durante el secado. La descripción de las metodologías que se presentan a continuación está referida al tratamiento de materiales donde las células (cenobios o colonias) algales se encuentran aisladas y son fácilmente resuspendibles, como sucede en las muestras de plancton o de cultivos en medios líquidos. Para las microalgas que se desarrollan sobre superficies sólidas (naturales o artificiales), como en el caso de coberturas perifíticas, son aplicables los mismos procedimien-

tos, recurriendo al raspado, o utilizando como soporte fragmentos del sustrato original. Los cultivos sobre agar, por ejemplo, pueden ser fijados directamente sobre el mismo agar, luego de lo cual se recortan pequeños cubos del mismo, que son preparados para el SEM de la manera acostumbrada (Watson *et al.*, 1980).

FIJADORES Y ENDURECEDORES

¿Qué fijadores elegir para el MEB?

La fijación química no siempre es indispensable para el examen de las microalgas en el MEB, por un lado, hay materiales que se examinan una vez eliminado todo vestigio de protoplasma (diatomeas, silicoflagelados) y, por otro, algunas células, especialmente las que presentan cubiertas más resistentes, pueden ser examinadas al MEB sin ser fijadas, previo secado espontáneo o mediante las técnicas de punto crítico o de sublimación que se describen más adelante. Sin embargo, en la mayoría de los casos es deseable o necesaria una fijación mediante agentes químicos. A fin de seleccionar el fijador apropiado para cada caso se debe tener en cuenta el tipo de material con el que se trabaja y los objetivos de la investigación, y aún así en muchas situaciones el fijador ideal para un caso dado sólo podrá ser determinado mediante experimentación. Es razonable evitar el empleo de fijadores caros, altamente tóxicos y de difícil manejo, en los casos en que puede resultar suficiente una fijación con formol.

Glutaraldehído

Existe cierta tendencia al empleo del glutaraldehído como fijador para el MEB, probable herencia de las técnicas de fijación para el MET. Sin embargo, como en los estudios al MEB no se busca la perfecta preservación de las estructuras intracelulares, sino la visualización de las estructuras superficiales, los métodos de fijación más sofisticados se justifican sólo en los estudios más delicados. Por otra parte, si bien el glutaraldehído es buen fijador de las estructuras intracelulares en general, es mal fijador de lípidos y no estabiliza las membranas, las que pueden permanecer osmóticamente activas generando el peligro potencial de la deformación de las células después de la fijación (Pickett-Heaps, 1980). En la sección de Soluciones tamponadas se da un ejemplo de fijación con glutaraldehído. Debido a su toxicidad se lo debe manejar bajo campana de gases.

Tetróxido de osmio

El OsO_4 es considerado como el fijador más ampliamente utilizado para el MEB (Maugel *et al.*, 1980). Su gran ventaja es que mata instantáneamente a los microorganismos, "congelándolos" en el estado en que se encontraban en vivo,

incluyendo sus estructuras más delicadas (p. ej. flagelos). Pickett-Heaps (1980) considera suficiente para el MEB la fijación con OsO_4 al 1%, a temperatura ambiente, durante 30-60 minutos, sin recurrir a una prefijación con glutaraldehído. Una ventaja adicional del OsO_4 es que la presencia del osmio reducido confiere mayor conductividad eléctrica a los especímenes (Maugel *et al.* op. cit.), cualidad que resulta valiosa durante el examen del material al microscopio (ver Metalizado). El OsO_4 es una sustancia costosa y muy tóxica.

Formaldehído - paraformaldehído

Si bien la fijación con tetróxido de osmio parece imprescindible para las células desnudas y las más delicadas, en muchísimos casos una fijación con formol (que es una solución de formaldehído al 40%) resulta más que suficiente. Por otro lado, el tipo de fijador no puede ser elegido cuando se examinan materiales de colección. Personalmente he trabajado con células provenientes de muestras fijadas con formol durante decenas de años, que se encontraban en perfecto estado para las exigencias de un estudio de su morfología superficial. El formol actúa precipitando o coagulando a las proteínas, lo que confiere rigidez al protoplasma, ayudando a evitar la deformación o colapso de la célula durante el proceso de secado. El formol comercial contiene casi siempre cierta cantidad de ácido fórmico. A consecuencia de ello y para evitar que la acidez termine destruyendo las cubiertas calcáreas de algunos organismos planctónicos marinos (cocolitofóridos, etc.), se debe tomar la precaución de neutralizarlo. Esta neutralización es un arma de doble filo, puesto que la alcalinidad puede causar la corrosión de los frústulos de las diatomeas y de las estructuras silicificadas de otros organismos (Thronsdén, 1978). A partir del paraformaldehído en polvo, que es un polímero del formaldehído, se puede obtener formol libre de impurezas. El paraformaldehído se solubiliza lenta y parcialmente en agua a 60°C. La hidrólisis puede acelerarse mediante el agregado de pequeñas cantidades de álcali ($1,0 \text{ mol}^{-1} \text{ NaOH}$).

Soluciones tamponadas

Para una buena fijación es importante que el vehículo en el que se diluye el fijador sea lo más semejante posible al medio original de donde proviene el material a ser fijado, en cuanto a osmolaridad, pH y composición iónica. Un vehículo con estas condiciones constituye un tampón. Por ejemplo Paerl & Shimp (1973) utilizaron para el plancton de agua dulce una solución de glutaraldehído al 2% v:v tamponado con cacodilato de sodio 0,1 M (concentración final), durante una hora, a 4,5°C. Las muestras de origen marino fueron tamponadas con agua de mar, porque en agua salada el cacodilato de sodio precipita. Para eliminar las sales, luego de la fijación se realizaron pasajes a través de concentraciones decrecientes de agua de mar filtrada (100%, 75%, 50%, 25% y agua destilada) por 5 minutos en cada una.

Endurecedores

Tanto el formol como el glutaraldehído y el tetróxido de osmio, además de fijar, actúan como agentes endurecedores del protoplasma, lo cual representa una ventaja puesto que en algunos casos hace posible pasar por alto las técnicas especiales de secado como las de la sublimación y del punto crítico, o mejorar los resultados de las mismas. El hexametildizilazano (HMDS, reactivo usado comúnmente en cromatografía gaseosa) ha dado resultados similares a los que se obtienen con la técnica del punto crítico en el secado de tejidos blandos de insectos (Nation, 1983), y tal vez pueda aplicarse a microalgas, aunque no conozco antecedentes al respecto. Su empleo es muy simple: el material fijado y lavado con agua destilada es deshidratado mediante el pasaje por soluciones de etanol, como se explica en Deshidratación. Luego el material es inmerso en HMDS durante 5 minutos y secado a temperatura ambiente. Aparentemente este compuesto endurece al material tratado, pero no está claro si el efecto endurecedor se produce por combinación del mismo con los restos del etanol, o por su acción directa sobre las proteínas. Debido a su posible reactividad con los tejidos, debe evitarse el contacto del HMDS con la piel y es necesario trabajar bajo campana de gases.

TRATAMIENTO PRELIMINAR DEL MATERIAL ALGAL

Lavado y concentración

Salvo en los casos en que el material sea deshidratado mediante el pasaje por solventes orgánicos, el lavado previo al secado es imprescindible, ya que con él se eliminarán las impurezas que pueda contener el agua de la muestra. Sin esta precaución, las estructuras superficiales a ser investigadas con el MEB, una vez seco el material, pueden quedar enmascaradas por el precipitado de restos del fijador o la formación de cristales de sales. Por la misma razón los materiales de origen marino deben ser lavados con mayor cuidado. El lavado y la concentración puede llevarse a cabo mediante varios pasos de centrifugación y decantación con agua destilada o por medio la filtración a través de filtros de membrana. La ventaja de los filtros de membrana es que sobre ellos es posible la fijación previa al resto de los tratamientos, el procesamiento ulterior de deshidratación y la aplicación de técnicas especiales de secado (ver Manejo de Micropartículas). Los filtros de membrana también son empleados para el examen directo, o sea como substrato definitivo para las observaciones al MEB. Para ello los filtros más recomendables son los Nucleopore (Bisalputra *et al.*, 1973; Paerl & Shimp, 1973; Watson *et al.*, 1980). Estos filtros están constituidos por un film de policarbonato, un tipo especial de poliéster, los más pequeños poseen 13 mm de diámetro y se fabrican con una porosidad de 8 a 0,1 μm . A diferencia de los filtros de membrana compuestos de nitrato o acetato de celulosa, su superficie es lisa y sus poros son cilíndricos y de diámetro uniforme, de modo que proporcionan un fondo muy apropiado para las

observaciones y fotomicrografías del MEB. Durante la filtración se aplica un vacío suave, de entre 100 y 500 Torr, o aún menor si se desea evitar la distorsión de las formas más frágiles.

Micromanipulación

Las técnicas de centrifugación o de filtración son apropiadas cuando se dispone de material abundante y homogéneo de los organismos a ser tratados, como en el caso de muestras de floraciones o de cultivos mono-específicos. Cuando se quieren minimizar las pérdidas, porque se cuenta con escasa cantidad de material, o cuando las algas a ser examinadas provienen de una muestra donde predominan otros organismos, conviene recurrir al aislamiento y pasaje de los especímenes por sucesivas gotas de agua destilada mediante una micropipeta capilar y bajo microscopio estereoscópico u óptico de luz transmitida (ver Boltovskoy: Dinoflagelados, en este manual). Los preparados con abundantes organismos ajenos al interés del estudio planteado son indeseables, porque exigen tiempos de búsqueda bajo el MEB excesivamente largos.

Deshidratación

Como se verá más adelante, tanto durante la preparación de las algas para el secado por punto crítico, como para la sublimación en Peldri II (ver más adelante), se requiere el reemplazo del agua de las células por otro solvente (deshidratación). El traslado de las células del agua al fluido de deshidratación puro puede causar distorsiones en ellas. Por eso el material (vehiculizado sobre algún soporte) es deshidratado mediante baños sucesivos de 5 minutos cada uno en acetona y agua (o 10 minutos en alcohol y agua) con cantidades crecientes del agente deshidratante (10, 30, 50, 70 y 100%). Finalmente, para asegurar la total remoción del agua, se realizan dos o tres pasajes más por acetona o alcohol absoluto.

Limpieza

En algunos casos los lavados con agua destilada son insuficientes. Los materiales mucilaginosos segregados por algunas algas, una vez secos, forman una capa fibrosa o amorfa que enmascara su superficie (Pickett-Heaps, 1980), razón por la que la capa mucilaginosa debe ser eliminada, antes o después de la fijación. Si el material será deshidratado (por ejemplo en el caso de la técnica del secado por punto crítico o de la sublimación en Peldri II), los pasajes por las mezclas de agua-acetona o agua-etanol pueden ser suficientes para remover el mucílago. Soluciones de NaOH 0,1 N pueden ser muy efectivas en la remoción del mucílago, pero pueden dañar a las células. A veces los polisacáridos se oxidan y se disuelven en medio alcalino, pero para obtener los resultados deseados deben ensayarse dife-

rentes opciones para cada caso particular (Pickett-Heaps, *op. cit.*). Para eliminar el protoplasma en organismos en los cuales se estudian las estructuras silíceas (diatomeas, silicoflagelados) se los somete a tratamientos enzimáticos o de oxidación (ver Ferrario *et al.*, en este texto). Mayores detalles sobre técnicas de eliminación de materiales extraños o indeseables pueden encontrarse en Maugel *et al.*, (1980).

MANEJO DE MICROPARTICULAS

Las cámaras de presión de los equipos de punto crítico permiten el secado de objetos más o menos grandes sin dificultad. En la práctica no se pueden colocar directamente en su interior partículas diminutas como las microalgas, porque difícilmente podrían ser recuperadas. Para solucionar la manipulación de materiales microscópicos en pequeñas cantidades estos deben ser encerrados dentro de algún soporte que sea permeable. Existen para ello dos posibles alternativas: la técnica del sándwich y la del encapsulamiento en agar. Mediante una u otra se logra que el material microscópico se vuelva fácilmente transportable durante la deshidratación y el pasaje por el aparato de punto crítico.

Técnica del sandwich

Según Paerl & Shimp (1973), el material es filtrado a través de filtros de membrana de 2,4 cm de diámetro, que se pliegan por la mitad antes de que se sequen y se envuelven en papel de aluminio limpio de 3 x 3 cm. Los bordes del papel de aluminio también se pliegan para encerrar completamente al filtro, y se cortan los cuatro ángulos del envoltorio para permitir la entrada y salida de los fluidos durante el procesamiento ulterior. Una vez seco el material se desecha el papel de aluminio, los filtros se fraccionan mediante una hoja de afeitar y son montados directamente sobre los tacos con un adhesivo de plata coloidal (ver Montaje). Una variante de esta técnica es la de Watson *et al.* (1980), que utilizan filtros Nucleopore de 13 mm de diámetro y una vez que los especímenes quedan retenidos por el mismo desarmen el equipo de filtración, cubren el primer filtro con otro limpio y colocan a ambos dentro de un anillo portafiltros que los mantiene unidos por los bordes. En estas condiciones las microalgas pueden ser acarreadas a través de las soluciones deshidratantes y sometidas al secado por punto crítico sin dispersarse. En la técnica del sándwich hay que poner especial cuidado para evitar que los filtros se sequen en cualquiera de las etapas intermedias antes del secado por punto crítico.

Encapsulamiento en agar

Esta técnica, propuesta por Garner & Bryant (1973) para palinomorfos, es perfectamente aplicable a las microalgas y consta de los siguientes pasos. 1) Los ejem-

plares lavados con agua destilada se depositan sobre discos humedecidos, de 3 mm de diámetro, recortados de filtros de membrana Millipore Metricel GM-3, con poros de 1,2 μm , u otros, que sean solubles en acetona. 2) Se preparan membranas de colodión, goteando colodión (nitrato de celulosa) disuelto en acetato de amilo sobre una superficie de agua destilada limpia. Una vez seco el solvente, se levanta la membrana mediante un anillo de alambre de 5 mm de diámetro. Con la membrana aún húmeda, se cubre el disco del filtro, de modo que los especímenes queden entre ambos. 3) Se vierte agar al 4% a 50°C en una caja de Petri hasta una altura de 5 mm. 4) Mediante pinzas, el disco con los especímenes es colocado sobre la superficie del agar con el colodión hacia abajo y, antes de que el agar solidifique, es empujado dentro del mismo, a media altura, con la ayuda de una varilla de madera. Así se pueden incluir varios filtros con material proveniente de diferentes muestras. 5) Una vez enfriado el agar, cada disco se extrae junto con una columna de agar mediante un sacabocado tubular de bronce de paredes finas y de unos 5 mm de diámetro. El tubo se vacía soplando sobre papel de filtro humedecido y cada "cápsula" de agar puede ser marcada mediante alfileres de cabeza coloreada acortados a 5 mm, los que a su vez servirán de lastre durante la deshidratación. 6) La deshidratación previa al punto crítico se realizará con acetona (ver Deshidratación) con lo cual el agar de las cápsulas se vuelve translúcido y tanto el filtro como la membrana de colodión son disueltos. El agar permite la circulación de los solventes y de los materiales disueltos a través de su matriz, y mantiene a los especímenes en su lugar. Las cápsulas son colocadas en una canastilla de acero y se encuentran listas para ser llevadas a lo largo de la serie de deshidratantes y sometidas a la técnica del punto crítico. Una vez secas, las cápsulas se vuelven opacas. Para extraer el material de su interior, se las marca alrededor de la cavidad donde se alojan los especímenes mediante el filo de una hoja de afeitar y luego se quiebran cuidadosamente para acceder a los ejemplares adheridos a las paredes de la misma. Los especímenes se transfieren al taco del MEB o a un portaespecímenes mediante suaves golpecitos aplicados sobre las mitades de las cápsulas.

SECADO

El material que se prepara para su examen con el MEB debe estar completamente seco, tanto para permitir el proceso de metalización de los especímenes (ver más adelante) como para que no se colapsen al ser sometidos al vacío. El secado de especímenes más o menos duros puede realizarse a temperatura ambiente. Sin embargo, los materiales biológicos semiblandos suelen resquebrajarse al secarse de esa manera y los blandos sufren diverso tipo de distorsiones o se colapsan. Los daños que sufren los organismos durante el secado evaporativo se deben a fuerzas de tensión superficial, de toneladas por centímetro cuadrado, que se producen en las cavidades microscópicas cuando existe la interfase líquido-gas (agua-vapor). Para secar células lábiles, sin que sufran daños, se pueden elegir varios caminos de acuerdo al tipo de material con que se trabaje y al equipamiento con que se

cuenta: a) endurecer el material antes de secarlo, b) atenuar las fuerzas de tensión superficial, y c) evitar que actúen las fuerzas de tensión superficial. En el primer caso, como ya se ha visto, se recurre a la fijación con formol o glutaraldehído o al tratamiento con endurecedores (técnica del HMDS). Las fuerzas de tensión superficial a que se someten las células durante el secado pueden ser atenuadas sustituyendo el agua en que se encuentran por líquidos de menor tensión superficial (alcohol, xileno, acetona, freón 113), procediendo como en Deshidratación y dejando secar por evaporación (Maugel *et al.*, 1980). Si con los métodos anteriores no se obtienen resultados satisfactorios, es necesario recurrir a técnicas más complicadas como la del punto crítico o la de la sublimación, mediante las cuales se evita que las fuerzas de tensión superficial actúen.

Las diferentes maneras de secar el material biológico destinado a ser examinado con el MEB pueden ser explicados mediante un diagrama de fases (Fig. 1), que representa los tres estados de la materia -sólido, líquido y gaseoso- de cualquier sustancia en relación a la presión y a la temperatura a que se encuentra sometida. Las curvas del diagrama representan las condiciones de presión y temperatura que separan a las diferentes fases, T es el punto triple, donde las tres fases coexisten y K es el punto crítico de presión y temperatura por encima del cual el líquido y el gas adquieren la misma densidad y se mezclan, de modo que no existe una interfase que los separe. Cualquier objeto impregnado en un líquido, al secarse paulatinamente (Fig. 2) se somete a fuerzas de tensión superficial que la mayoría de las microalgas no pueden resistir. Una de las formas de evitar estas fuerzas es llevar el líquido a la temperatura y a la presión por encima de su punto crítico donde la interfase líquido gas desaparece, y luego descomprimir. El espécimen queda entonces rodeado de gas (en otras palabras, se encuentra seco) sin haber sido expuesto a fuerzas de tensión superficial (Fig. 3). La otra manera de evitar que el material biológico deba soportar estas fuerzas es congelarlo y luego sublimar el hielo (método de la sublimación), puesto que en la interfase sólido-gas no se producen fuerzas de tensión superficial (Fig. 4).

Aún empleando alguno de estos dos métodos, los objetos biológicos grandes (tejidos animales o vegetales) también pueden sufrir contracción (Boyde, 1978). Posiblemente esto no se aplique estrictamente a células aisladas y menos a sus cubiertas o estructuras de sostén silicificadas, calcificadas y aun orgánicas. De cualquier manera, este aspecto deberá ser controlado cuando se proyecte realizar mediciones sobre las fotomicrografías.

SECADO POR PUNTO CRITICO

Al método de secado por punto crítico (Anderson, 1956), muchas veces se lo llama simplemente punto crítico. Este se basa en un concepto de la física desarrollado en 1822. El punto crítico de un sistema líquido-gas es una temperatura (y la presión asociada a esa temperatura) en la cual el líquido, debido a su expansión, y el gas, debido a la compresión, adquieren la misma gravedad específica, y en consecuencia se mezclan. Al mezclarse, la transición de líquido a gas tiene

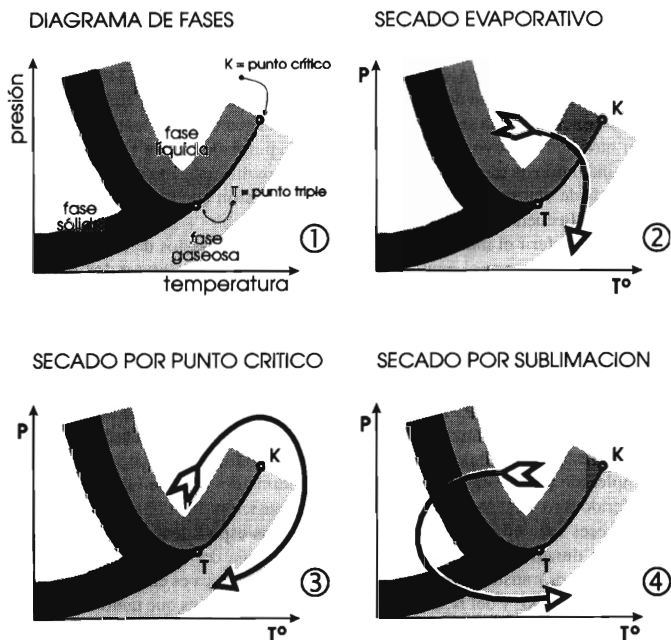


Fig. 1: Diagrama de fases que representa los tres estados de la materia - sólido, líquido y gaseoso- de una sustancia en relación a la presión y a la temperatura. T es el punto triple, donde las tres fases coexisten y K es el punto crítico de presión y temperatura por encima del cual el líquido y el gas adquieren la misma densidad, desapareciendo la interfase entre ellos.

Fig. 2: Secado evaporativo: representación gráfica sobre un diagrama de fases, donde la flecha muestra el proceso al que se somete un espécimen embebido en un líquido, secado por evaporación. El espécimen es sometido a fuerzas de tensión superficial características de la interfase líquido-gas, que se originan en sus cavidades microscópicas. Los especímenes menos resistentes se deformarán o quedarán destruidos.

Fig. 3: Técnica de secado por punto crítico: representación gráfica sobre un diagrama de fases, donde la flecha muestra el proceso al que se somete un espécimen embebido en un líquido, secado según esta técnica. El espécimen es llevado a la temperatura y a la presión por encima del punto crítico del fluido, evitando la interfase líquido-gas. Al descomprimirse el sistema, el espécimen quedará seco sin haber sufrido distorsiones.

Fig. 4: Técnica de secado por sublimación: representación gráfica sobre un diagrama de fases, donde la flecha muestra el proceso al que se somete un espécimen embebido en un líquido, secado según esta técnica. Si el espécimen se congela y luego se hace sublimar, quedará seco sin haber sido expuesto a fuerzas de tensión superficial y, por lo tanto, sin sufrir deformaciones.

lugar sin una interfase, porque las densidades de ambos se mantienen iguales. Consecuentemente también desaparecen las fuerzas de tensión superficial.

Los materiales biológicos se presentan naturalmente en medio acuoso, pero la temperatura y la presión a las que el agua alcanza el punto crítico (374°C y más de 200 atmósferas) resultan destructivas para la mayor parte de ellos. Entonces, para obtener condiciones de secado más favorables, el agua debe ser reemplazada por algún otro líquido cuyo punto crítico sea más apropiado (Tabla 1). A este se lo denomina fluido de transición y si este último no es miscible con el agua, se necesitará más de una sustitución. Las series de sustitución que han sido empleadas con mayor frecuencia se muestran en la Tabla 2.

Para transferir el material que deberá ser secado, a fluidos de transición que no sean miscibles con el agua (CO₂, Freón 13), se requiere uno o dos líquidos intermedios. En cualquier serie de sustitución (Tabla 2), cada compuesto debe ser miscible con el que le precede y con el que le sigue. Por ejemplo, usando como deshidratante a la acetona que es miscible con el agua y con el CO₂, no se requiere un solvente intermedio. El etanol, en cambio, se mezcla con el agua pero no con el CO₂, de modo que se necesita pasar por el acetato de amilo, para transferir el material en estudio al CO₂. El óxido nitroso es el único medio conocido, que siendo apto para la aplicación de la técnica del punto crítico, es miscible con el agua. En teoría este sería el fluido de transición más cómodo, puesto que al no requerir el empleo de deshidratantes ni de solvente intermedio, el material biológico es transferido directamente del agua al fluido de transición; sin embargo en la realidad a veces falla en substituir toda el agua de los especímenes, lo cual genera artefactos durante el secado. Por su parte, la ventaja del empleo del Freón 13 como fluido de transición consiste en que su presión crítica es casi dos veces más baja que la del CO₂ y del N₂O (Tabla 1). Un inconveniente es que tanto éste como su solvente intermedio, el Freón 113, figuran en la lista de productos que deberían ser dejados de fabricar para 1997, según la reglamentación del Protocolo de

Tabla 1: Temperatura y presión críticas del agua y de los fluidos de transición que han sido empleados en la técnica de secado por punto crítico.

FLUIDO	T° CRITICA	PRESIÓN CRITICA
AGUA (H ₂ O)	374,0°C	218,5 bar
DIOXIDO DE CARBONO (CO ₂)	31,1°C	73,8 bar
FREON 13 (CCIF ₃)	28,9°C	39,8 bar
OXIDO NITROSO (N ₂ O)	36,5°C	75,0 bar

Tabla 2: Series de sustitución más comunes empleadas en la técnica del punto crítico, para transferir materiales biológicos de un medio acuoso al fluido de transición.

MEDIO ACUOSO	DESHIDRATANTE	SOLVENTE INTERMEDIO	FLUIDO DE TRANSICION
Agua →	acetona →	→	dióxido de carbono
Agua →	etanol →	acetato de amilo →	dióxido de carbono
Agua →	etanol →	Freón 113 →	Freón 13
Agua →	→	→	óxido nitroso

Montreal (UNEP, 1987), por ser potencialmente peligrosos para la integridad de la capa de ozono terrestre. En definitiva, el CO₂ es el más usado como fluido de transición, pues siendo el menos costoso, da resultados satisfactorios y es ambientalmente más sano.

Los pasajes del material por los deshidratantes y por los solventes intermedios se realizan fuera del equipo de punto crítico (ver Deshidratación), mientras que la sustitución final se lleva a cabo dentro de la cámara de presión del aparato.

Para el secado de material biológico mediante el método del punto crítico existen equipos con diferente grado de automatización. El aparato en su forma más simple consta de una cámara de presión donde irá alojada la muestra a ser tratada, con una compuerta hermética y dos válvulas, una de entrada y otra de drenaje. A continuación se describen los pasos necesarios para procesar una muestra empleando la secuencia agua-acetona-CO₂.

1) Los especímenes encapsulados en agar o sobre filtros de membrana (técnica del sándwich), ya deshidratados, se transfieren en acetona a la cámara de presión, cerrándose la compuerta de la misma.

2) A través de la válvula de entrada, lentamente, la cámara se llena de CO₂ que va reemplazando a la acetona. La acetona se va eliminando a través de la válvula de drenaje mientras se mantiene abierta la entrada de CO₂. Este procedimiento continúa a lo largo de varios minutos y se repite luego de una hora.

3) Una vez que la acetona es completamente reemplazada, se cierran todas las válvulas de la cámara de presión, y se la lleva a 40°C mediante un baño de agua, para sobrepasar el punto crítico del CO₂.

4) Superado este, los especímenes se encuentran secos. Entonces se abre la válvula y el CO₂ se ventea lentamente durante 5 minutos, hasta llegar a la presión y temperatura ambiente. Si el material será almacenado antes de ser montado y metalizado, conviene guardarlo en un recipiente con alguna sustancia hidrófila (cloruro de calcio) para que no se vuelva a humedecer.

SECADO POR SUBLIMACION

Sublimación en medio acuoso

En laboratorios que cuentan con unidades de liofilización comerciales, las muestras se congelan con nitrógeno líquido (Maugel *et al.*, 1980; Watson *et al.*, 1980) a temperaturas cercanas a los -200°C y se subliman en cámaras de vacío con platina refrigerada entre -60 y -80°C a lo largo de varias horas. Este procedimiento, que requiere un equipamiento especial y lleva mucho tiempo, tiene por finalidad lograr la solidificación casi instantánea a temperaturas muy bajas y prevenir la descongelación parcial y recongelación durante la sublimación, evitando la formación de grandes cristales de hielo que puedan dañar a los especímenes.

Esta metodología, indicada para especímenes grandes, parece no ser imprescindible en el caso de células individuales, con las que la liofilización puede realizarse en forma controlada de una manera mucho más simple, de acuerdo al mé-

todo de congelación-sublimación de Boltovskoy (1976), algo modificado. Se trata de un procedimiento rápido que no requiere una unidad de liofilización y emplea como refrigerante al hielo seco o nieve carbónica (CO_2 sólido con una temperatura cercana a los -80°C), más accesible y más manejable que el nitrógeno líquido. La probabilidad de pérdidas de especímenes tratados con este método es menor que durante la serie de manipulaciones que implica la técnica del punto crítico. Este aspecto es muy importante cuando se cuenta con escasos ejemplares, situación que se da con frecuencia puesto que entresacar células de una muestra es un proceso laborioso que por cuestiones de tiempo rara vez permite acumular grandes cantidades de material. Durante el procedimiento del secado por sublimación en medio acuoso, obviamente, no es necesaria una deshidratación, y además el proceso puede mantenerse permanentemente bajo el control visual del operario. La técnica que se describe a continuación se ha ensayado con buenos resultados en flagelados (euglenoideos y dinoflagelados), desmidiaceas, otras algas verdes, y también en ciliados y algunos organismos multicelulares del zooplancton.

Los elementos utilizados para poner en práctica esta técnica son:

1) Una pequeña bomba de vacío fino con una capacidad de desplazamiento de unos 100 litros por minuto, que permita llegar a una presión residual cercana a los $4 \text{ a } 5 \times 10^{-4}$ Torr.

2) Una cápsula de sublimación, recipiente de vidrio con fondo plano de aproximadamente unos 15-20 mm de diámetro y de la misma altura, con tapón de vidrio esmerilado o de goma.

3) Un desecador, con silicagel u otra sustancia higroscópica para retener el agua de sublimación; los bordes de la tapa del desecador, así como el obturador esmerilado de la misma, deberán estar bien lubricados con grasa siliconada a fin de evitar pérdidas de vacío.

4) Un soporte que sostendrá a la cápsula de sublimación será colocado dentro del desecador y servirá para evitar la transferencia del calor de las paredes del mismo y para amortiguar las vibraciones que puedan provenir de la bomba de vacío en funcionamiento; puede ser preparado cortando el tercio inferior de un recipiente de plástico blando, colocándolo con su fondo hacia arriba y practicando en él una perforación donde la cápsula de sublimación entre a presión.

5) Hielo seco o un tubo de gas carbónico (puede ser un matafuegos de CO_2) para obtener nieve carbónica venteando el gas a través de una tela plegada (trabajar con guantes para evitar quemaduras de frío en la piel).

6) Portaespecímenes que se preparan de metal o de vidrio, de diámetro igual o menor al del taco. Los metálicos son recortados de laminillas de cobre o de bronce y los de vidrio, quebrando cubreobjetos o portaobjetos previamente marcados mediante una punta de diamante o de vidia. Los portaespecímenes de vidrio tienen la ventaja de permitir la observación de los resultados del secado con el microscopio óptico.

Es sumamente importante en la aplicación de esta técnica que el material sea cuidadosamente lavado con agua destilada (ver Lavado y concentración). La sublimación se lleva a cabo sobre un portaespecímenes, que se coloca dentro de la cápsula de sublimación y ésta a su vez dentro del desecador. Si el portaespecímenes

va a ser el soporte definitivo de los ejemplares, conviene recubrirlo previamente con algún adhesivo, como se explica en Montaje.

Las células algales, recogidas mediante una micropipeta bajo microscopio estereoscópico u óptico de luz transmitida (ver Boltovskoy: Dinoflagelados, en este manual) son sopladas junto con pequeñas cantidades de agua sobre el portaespecímenes. Debe tratarse que éste reciba la menor cantidad posible de agua y posea un máximo de superficie libre, es preferible distribuir el material en varias gotas pequeñas y no en una grande. A continuación el portaespecímenes con las gotas de agua es colocado dentro de la cápsula de sublimación y el agua se congela apoyando la cápsula sobre un trozo de hielo seco, o sobre un grumo de nieve carbónica. Durante la congelación la cápsula debe estar tapada para evitar la condensación de la humedad atmosférica sobre el preparado enfriado.

Una vez congelado el material, la cápsula de sublimación se inserta en el soporte de plástico, se le quita el tapón, e inmediatamente se coloca la tapa al desecador con la bomba de vacío conectada y en funcionamiento. La bomba debe seguir funcionando durante todo el tiempo de la sublimación, que en las condiciones especificadas dura entre 10 y 20 minutos. Con bombas de vacío de menor potencia este tiempo va en aumento, y se corre mayor peligro de una descongelación total o parcial de la muestra. En estos casos es posible no usar el desecador y conectar la bomba de vacío directamente a la cápsula de sublimación, la que durante el proceso se mantendrá refrigerada mediante un baño de hielo seco y acetona (Boltovskoy, 1976). Cuando mediante un examen visual se comprueba que no existe más hielo en el portaespecímenes (las células secas cuyas medidas superan los 30-40 μm pueden verse como puntos blancos), se cierra la válvula del desecador y se detiene el funcionamiento de la bomba. Luego de dejar pasar 20-30 minutos para que el portaespecímenes adquiera la temperatura ambiente (nuevamente, para evitar la condensación de agua sobre el mismo), se deja entrar aire al sistema, muy lentamente, hasta llevarlo a la presión atmosférica. El material así tratado ya está listo para el montaje.

Sublimación en Peldri II

Se trata de un método propuesto recientemente que no requiere grandes cambios de presión ni temperatura, como en el caso del punto crítico o de la sublimación en medio acuoso. No conozco antecedentes del empleo de esta técnica para la deshidratación de microalgas o materiales de consistencia similar, sin embargo, en principio, el sistema debería dar resultados al menos razonables. Peldri II es la marca comercial (Pelco International, California) de un compuesto fluorocarbonado (de los que se suponen responsables del deterioro de la capa de ozono). Aunque sus fabricantes presentan su empleo como una alternativa del método del punto crítico, en realidad el principio con el que funciona es el de la sublimación. A diferencia del agua la temperatura de congelación de este compuesto es de alrededor de los 24°C. Esta sustancia no se mezcla con el agua, de modo que el material a secar debe ser deshidratado de la manera ya descrita, mediante pasajes por acetona o etanol, luego de lo cual se traslada directamente al Peldri II líquido (a una tem-

peratura por encima de los 26°C). El compuesto, ya con el material, se vuelve a solidificar llevándolo por debajo de los 23°C mediante el contacto con una superficie previamente refrigerada. La sublimación puede llevarse a cabo sin la aplicación de vacío, en un recipiente abierto dentro de una campana de gases, cuidando que la muestra no sobrepase la temperatura de fusión del Peldri II, o puede ser acelerada mediante una bomba de vacío pequeña o una trompa de vacío.

Las ventajas de este método consisten en que no requiere equipos especiales, como el del punto crítico o bomba de vacío. El tiempo de procesamiento es menor que el necesario para tratar una muestra por el sistema del punto crítico, pero similar o mayor que el de la sublimación en medio acuoso, puesto que exige la deshidratación del material.

MONTAJE

Los especímenes a ser examinados serán introducidos en la cámara del MEB sobre un taco metálico que varía en forma y tamaño según el modelo del microscopio y las dimensiones del preparado. En su forma más simple, el taco es un cilindro macizo de cobre, latón o aluminio de cerca de 1 cm de diámetro y más o menos la misma altura. Sobre una de las superficies planas del cilindro se coloca el material directamente, o previo montaje sobre otro soporte. Las células resistentes que no requieren ser sometidas a un tratamiento de secado especial, pueden ser colocadas sobre el taco en una gota de agua destilada, dejando que esta seque espontáneamente. Algo más laborioso, pero más racional es transferir al taco células ya secas (cualquiera sea el método de secado que se emplee) mediante una aguja o pelo de lana de vidrio enmangados, lo que puede hacerse, si el tamaño de las células lo permite, bajo un microscopio estereoscópico. La ventaja de este procedimiento es que los organismos pueden disponerse en hileras y muy cerca unos de otros, ahorrando tiempo de búsqueda en el MEB, facilitando el examen de todos los ejemplares en forma ordenada, así como su localización en caso que se necesite un segundo examen. Es conveniente la aplicación de una película de pegamento que cubra la superficie del taco o de los portaespecímenes para asegurar que los ejemplares no se desprendan. Muy apropiado para el caso es el adhesivo comercial específico para microscopía electrónica de barrido "Pelco Microstick Adhesive" que contiene una base de cloruro de polivinilo (PVC) en solución de metil etil cetona. Este se aplica con un pequeño pincel brindando una buena adherencia sobre una superficie lisa. Si se emplea algún adhesivo no específico, debe verificarse que resista el calor y el vacío del metalizador y del MEB sin cuartearse y sin que los especímenes se hundan o queden embebidos en él.

Con frecuencia se utilizan otros substratos para montar el material, los que luego son adheridos al taco, a saber: a) Recortes de filtros de membrana, cuando los organismos se concentran mediante filtrado, o cuando se los somete a la técnica de secado por punto crítico sobre trocitos de filtro. b) Planchuelas de cobre de "papel de España", que por su espesor y su conductividad térmica representan una ventaja durante la congelación en la técnica de secado por sublimación y por su

conductividad eléctrica son ventajosas para el examen con el MEB. c) Fracciones de portaobjeto o cubreobjeto, que facilitan la inspección de los resultados del secado al microscopio óptico de luz transmitida, la cual también puede realizarse sobre las superficies opacas, aunque con menores aumentos y con iluminación lateral. Antes de colocar el material en los portaespecímenes de vidrio o de cobre es conveniente aplicar una película de pegamento, al igual que en el caso del montaje directo sobre el taco. En las bases de filtro de membrana se recomienda como adhesivo la polilisina (ver Billard & Chrétiennot-Dinet, en este manual).

Cualquiera de los sustratos intermedios deberá ser fijado al taco, ya sea por medio de una cinta adhesiva de doble faz, con esmalte para uñas, con pasta de grafito o con plata coloidal (líquida o en pasta). Los dos primeros son económicamente más accesibles, pero no son eléctricamente conductivos. Los adhesivos de grafito y de plata son específicos para los preparaciones del MEB, y también pueden emplearse como complemento de los anteriores, para bordear el sustrato intermedio, una vez fijado al taco, asegurando una mejor conexión con el mismo.

Como se verá en el apartado siguiente, para obtener una buena imagen en el MEB, es de primordial importancia que exista conductibilidad eléctrica entre los especímenes y el taco. Algunos de los materiales que suelen utilizarse en el montaje no son conductivos (PVC, vidrio, cintas adhesivas, esmalte para uñas). En teoría sería preferible evitarlos, pero en la práctica se los admite sin mayores inconvenientes porque la metalización de los materiales biológicos (que tampoco son conductivos) se efectúa sobre la muestra ya montada, de modo que la capa de metal cubre también a los materiales utilizados en el montaje, y si se ha trabajado con la debida prolijidad, proporcionan la necesaria conexión a tierra.

METALIZADO

Antes de su examen con el MEB, los especímenes deben ser recubiertos por una película metálica de 10 a 30 nm. Para ello se emplea algún metal pesado o una aleación, como por ejemplo la de oro y paladio, que es la de uso más frecuente. El motivo principal de este procedimiento es conferir conductividad eléctrica a la superficie de las muestras que permita una descarga a tierra a través del taco. De otra manera los materiales biológicos, por lo general no conductivos, se cargarían eléctricamente. La impregnación química también puede ayudar a aumentar la conductibilidad, como se ha visto en el apartado sobre la fijación con tetróxido de osmio. Los preparados con carga eléctrica degradan la resolución del microscopio y producen imágenes con artefactos en forma de bandas claras y oscuras. La metalización debe realizarse una vez montado el material en el taco, puesto que la capa metálica proveerá una conexión de los especímenes con el taco aún en caso de haberse utilizado sustratos intermedios no conductivos.

Otras razones para metalizar el material biológico son: a) Se obtiene una mejora de la imagen debido a que la superficie metalizada emite mayor cantidad de electrones secundarios por cada uno de los electrones primarios incidentes. b) Se disminuye la probabilidad de efectos secundarios indeseables de la incidencia de

los electrones, tales como calentamiento y penetración del haz de electrones dentro del material, lo cual puede producir movimiento de los ejemplares montados, aparición de manchas negras, y perforaciones, con aspecto de quemaduras, sobre su superficie. c) La capa metálica confiere mayor estabilidad mecánica (adhesión al sustrato y resistencia) a los ejemplares.

Los laboratorios de microscopía electrónica de barrido por lo general poseen el equipamiento necesario para la cobertura metálica de los preparados. Comúnmente se utilizan para el metalizado uno de dos métodos alternativos: la cobertura evaporativa (evaporative coating) y el rociado iónico (ion sputtering). Ambos procedimientos se llevan a cabo dentro de un recipiente hermético, que permite la creación de vacío en su interior. Por lo general se trata de una cámara en forma de campana de vidrio de unos 20-30 cm que deja observar a través de sus paredes la evolución del proceso de metalizado. En Echlin (1978) pueden hallarse descripciones más detalladas de estas técnicas y del instrumental necesario para llevarlas a cabo.

Cobertura evaporativa

En condiciones de alto vacío (10^{-4} a 10^{-5} Torr) el material a ser evaporado es calentado hasta que se vaporiza, condensando sobre la superficie de las muestras. El alto vacío es necesario por que las colisiones entre las moléculas del metal evaporado y las del gas residual llevan a reacciones químicas que ocasionan la contaminación de la película metálica. Mediante un arco eléctrico entre los electrodos de alambre de oro-paladio se logra la vaporización del metal en estado monoatómico, el que se condensa sobre los tacos. Estos últimos se encuentran a suficiente distancia como para evitar el recalentamiento del material, sostenidos por una platina que les confiere movimientos de inclinación y rotación para asegurar una cobertura homogénea de la superficie de los especímenes.

Rociado iónico

En este método, también llamado de la desintegración catódica, se aplica el principio físico llamado ionización. El rociado iónico requiere un vacío de entre 10^{-1} y 10^{-3} Torr en una atmósfera de argón (gas inerte y pesado). El pasaje de una corriente eléctrica continua de alto voltaje (hasta 2.000 v) hace que parte del gas residual dentro de la campana se separe en iones positivos y electrones, formando lo que se denomina el plasma: una descarga fluorescente en la cual los iones positivos son atraídos al cátodo y los electrones al ánodo. Los iones positivos bombardean al cátodo, que es una placa del metal cobertor (generalmente oro-paladio), y éste reacciona despidiendo partículas (cathode sputtering). En el curso del bombardeo, los átomos del metal colisionan con los del gas alterando sus trayectorias y, de esta manera, cubriendo con una película uniforme a los tacos que se encuentran cerca del cátodo sobre una platina refrigerada.

Ambos métodos de cobertura metálica ofrecen buenos resultados, pero la des-

ventaja del primero es que requiere un equipo de alto vacío. Si bien el proceso del metalizado en sí es hasta 100 veces más prolongado en el rociador iónico que en el evaporador (donde el depósito del metal es casi instantáneo), este último requiere mayor tiempo de bombeo para obtener el vacío apropiado. De todas maneras el rociado iónico es el método actualmente más usado, puesto que estudios comparativos han mostrado que produce películas más uniformes (Watson *et al.*, 1980). En general, es importante controlar bien el tiempo de metalizado de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes de los instrumentos, porque una película metálica excesivamente gruesa puede enmascarar detalles de la superficie celular y una demasiado fina, puede dar lugar a artefactos como los que ya se han descrito para el caso de materiales biológicos sin metalizar.

CONCLUSION

Una vez metalizado, el preparado se encuentra listo para su examen. Muchas veces la correcta interpretación de las estructuras algales requiere correlacionar las imágenes del microscopio óptico con las del MEB, en ese orden si se comparan imágenes del mismo ejemplar. Pero a veces se hace necesario examinar al microscopio óptico ejemplares que han sido montados y metalizados para el MEB. Zippi (1991) explica cómo proceder para la relocalización de ejemplares y para la preparación de montajes que admitan un análisis posterior al microscopio óptico.

El tiempo de trabajo frente al MEB es por lo general mucho más limitado que el que se dispone para el estudio de las fotomicrografías obtenidas. En la selección de las mismas para su presentación en publicaciones debe contar no sólo su valor documental sino también la calidad de la imagen. En la preparación de las láminas, es posible que en muchos casos no haga falta utilizar la fotografía completa: se puede evitar la presentación de detalles marginales recortando bordes o utilizando ampliaciones de sólo una parte de la imagen. Zweifel (1988) da buenos consejos sobre diferentes formas de mejorar la presentación de las fotografías científicas, ya sea retocándolas para hacer resaltar detalles o enmascarando elementos del fondo que desvían la atención de la imagen principal, y sobre la aplicación de rútiles y notaciones de aspecto profesional, para lograr, en definitiva, una buena reproducción en la imagen impresa.

Por último, es necesario destacar que las técnicas aquí descriptas tienen un alto grado de flexibilidad y no necesariamente deben ser aplicadas al pie de la letra. En cada caso se ha explicado el fundamento de las diferentes metodologías para que el investigador o el estudiante puedan adaptarlas con conocimiento de causa no solamente al tipo de materiales con que traten o con los objetivos del estudio que aborden, sino también a los medios que se encuentren disponibles en o al alcance de su laboratorio.

REFERENCIAS

- Anderson, T.F., 1956. Electron microscopy of microorganisms. *Phys. Tech. Biol. Res.* 3: 177-240.
- Bisalputra, T., J.Y. Cheng, F.J.R. Taylor & N.J. Antia, 1973. Improved filtration techniques for the concentration and citological preservation of microalgae for electron microscopy. *Can. J. Bot.* 51: 371-377.
- Boltovskoy, A., 1976. Técnica simple para la preparación de microinvertebrados tecados y loricados lábiles para su examen con el microscopio electrónico de barrido. *Limnobiós* 1: 21-26.
- Boyde, A., 1978. Pros and cons of critical point drying and freeze drying for SEM. *Scanning Electron Microscopy* 2: 303-314.
- Echlin, P., 1978. Coating techniques for scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. *Scanning Electron Microscopy* 1: 109-132.
- Garner, G.E. & V.M. Bryant, 1973. Preparation of modern palynomorphs for scanning electron microscopy by the critical point drying method. *Geoscience and Man* 7: 83-88.
- Hickel, B., 1975. The application of the scanning electron microscope to freshwater phytoplankton taxonomy and morphology. *Arch. Hydrobiol.* 76: 218-228.
- Lane, G. S., 1972. Dimensional measurements. In J. W. S. Hearle, J. T. Sparrow & P. M. Cross (eds.), *The use of Scanning Electron Microscope*. Pergamonn Press, Oxford: 219-222.
- Maugel, T.K., D.B. Bonar, W.J. Creegan & E.B. Small, 1980. Specimen preparation techniques for aquatic organisms. *Scanning Electron Microscopy* 2: 57-77.
- Nation, J.L., 1983. A new method using hexamethyldiazane for preparation of soft insects tissues for scanning electron microscopy. *Stain Technol.* 56: 347-351.
- Paerl, J.W. & L.S. Shimp, 1973. Preparation of filtered plankton and detritus for study with scanning electron microscopy. *Limnol. Oceanogr.* 18: 802-805.
- Pickett-Heaps, J., 1980. Preparation of algae for scanning electron microscopy. In E. Gnatt (ed.), *Handbook of phycological methods. Developmental and cytological methods*. Cambridge University Press, Cambridge: 367-375.
- Thronsen, J., 1978. Preservation and storage. In A. Sournia (ed.), *Phytoplankton manual*. UNESCO, Paris: 69-74.
- UNEP (United Nations Environmental Programme), 1987. Montreal protocol on substance that deplete the ozone layer. UNEP, Nairobi.
- Watson, L.P., A.E. McKee & B.R. Merrell, 1980. Preparation of microbiological specimens for scanning electron microscopy. *Scanning Electron Microscopy* 2: 45-56.
- Zippi, P.A., 1991. SEM and light microscope mounting and specimen location technique for same-specimen study of palynological strew mounts. *Micropaleontology* 37: 407-413.
- Zweifel, F. W., 1988. *A handbook of biological illustration*. 2nd ed. The University of Chicago Press, Chicago - London, 137 pp.