

# Un sencillo aparato para aislar esporas

por

Manuel J. de Urries y Azara

La conveniencia, y en muchos casos la necesidad de operar con cultivos monospóricos, ha hecho que los micólogos que en el cultivo de hongos se han ocupado, hayan ideado, con este fin, procedimientos más o menos complicados, muchas veces meras adaptaciones de los métodos usados en Bacteriología, y que no voy a reseñar aquí. Con la introducción de los micromanipuladores, las dificultades han desaparecido casi por completo, ya que, según las referencias que tengo, el aislar una determinada spora, sirviéndose de dichos aparatos, es cosa bastante fácil y rápida. De todos modos, aún hoy día son muchos los laboratorios que no tienen esos complicados instrumentos y en ellos se siguen empleando diversos sustitutivos, entre los que el aparato de Hannaw (1) es uno de los que tienen, al parecer, más aceptación.

Al no disponer en los laboratorios de este Jardín Botánico de micromanipulador alguno, he ideado para mis trabajos un dispositivo, al parecer no descrito hasta ahora, según la bibliografía a mi alcance, que, si por su eficacia en lo que se refiere al caso concreto de los aislamientos monospóricos puede compararse a la de los complicados aparatos micromanipuladores que han lanzado al mercado diversas casas de material científico tiene sobre ellos, entre otras, la gran ventaja de su reducidísimo coste.

El sistema que voy a detallar coincide con otros ya empleados por los que se sirven de sencillos aparatos destinados a estos fines, en la sustitución de los movimientos horizontales de la aguja por sus movimientos relativos, ya que la aguja queda quieta y lo que se mueve es la superficie donde están las esporas, aprovechando para ello el sistema de tornillos de la platina movable. Pero con mi aparato se llega más lejos en esta simplificación, pues también se suprime el tornillo o cremallera que ha de mover la aguja en dirección vertical, ya que para este movi-

---

(1) Hannaw.—A simple apparatus for isolating single spores. *Phytopet*, 1928. (De este trabajo sólo conozco la referencia que aparece en *Bot. Centr. Blatt*).

miento se aprovecha uno de tanta exactitud como lo es el tornillo micrométrico del propio microscopio. Con ello queda suprimido todo mecanismo de precisión, lo que lleva consigo el considerable abaratamiento en su coste y facilidad de construcción. En cualquier taller de bronceista u oficio similar pueden construir este aparato por muy pocas pesetas.

El fundamento teórico del sistema es el mismo que aprovechó el profesor E. Caballero (1) en la confección de sus preparaciones de Diatomeas.

Suponiendo que el objeto estuviera en el plano focal anterior del microscopio, la distancia frontal (2) es la representada por  $z$  en la fórmula

$$z = z_1 + \delta$$

pero  $z_1$ , distancia entre el plano focal del objetivo y su superficie externa, es una constante del mismo, y el valor de  $\delta$  viene expresado por

$$\delta = \frac{t_1^2}{\Delta}$$

en que  $f_1$ , distancia focal del objetivo, es otra constante y  $\Delta$  es la longitud óptica del microscopio. Por tanto, aun manteniendo fija la distancia entre la superficie anterior del objetivo y la punta de la aguja, podremos obtener movimientos relativos de ésta con sólo variar la longitud del tubo.

En mis primeros ensayos me limitaba a pegar con goma, a la montura del objetivo, la aguja de vidrio, que sustituía a la cerda empleada por el profesor Caballero. Este procedimiento tenía, entre otros, el inconveniente de la pérdida de tiempo cuando había que colocar otra aguja por haberse roto la anterior o necesitarse otra de diferente calibre. El conseguir una perfecta colocación de la misma, me suponía a veces una mañana o tarde de trabajos de tanteo. Con mi nuevo aparato, en cambio, la sustitución de agujas es operación en que tardo ahora, por lo regular, unos segundos, y, en el peor de los casos, no llega a dos minutos.

El aparato que empleo es de latón, pero aún sería mejor construirlo con un material más elástico.

(1) Caballero (E.): «Técnica de las preparaciones sistemáticas». *An. Soc. Esp. H. Nat.*, tomo XXVI, 1897.

(2) Castellarnau (J. M.<sup>ca</sup>): «Teoría general de la formación de la imagen en el microscopio». Madrid, 1911.

Consta de dos abrazaderas, unidas por una articulación movable. La abrazadera mayor se coloca en la armadura del objetivo, y con la menor se sujeta una varilla de vidrio que lleva en su extremo la micro-aguja, pegada con una gota de goma. No hay necesidad de que la aguja quede exactamente en la dirección de la varilla, y veremos más adelante que incluso conviene que no lo esté.

Para fabricar las finas agujas de vidrio, se han ideado diversos «micromecheros», pero yo las obtengo sin necesidad de ellos. Comienzo por estirar una varilla de vidrio (de unos 4 mm. de diám.) utilizando una lamparilla corriente de alcohol; de ese modo consigo un hilo relativamente delgado. Luego, teniendo los codos apoyados sobre la mesa de trabajo, sujeto con los dedos un trozo de este hilo por sus extremos y lo acerco con cuidado a la porción infero-lateral de la llama, sin llegar a la región visible, haciendo algo de tracción, con lo que, al débil calor allí reinante, se va estirando lentamente el hilo, hasta alcanzar el calibre deseado. Operando con precaución, no llega a fundirse el hilo, y se obtienen agujas que, muchas veces, incluso hay que rechazar por su excesiva delgadez.

Aunque explicado el fundamento teórico del sistema, fácilmente se comprende la marcha que debe seguirse en el aislamiento de las esporas, detallaré todos sus tiempos para evitar posibles tanteos y pérdida de tiempo a los principiantes.

Con el aparato se puede trabajar de dos modos: estando la superficie de siembra dirigida hacia arriba (sistema *A*), o con dicha superficie orientada hacia abajo (sistema *B*).

La operación comprende cuatro tiempos: *a*) colocación de la aguja; *b*) esterilización de la misma; *c*) captura de la espora, y *d*) siembra.

#### SISTEMA A.

*Colocación de la aguja.*— Con un poco de práctica se realiza fácilmente, sin sujetarse a orden alguno en los tanteos; pero al principiante recomiendo la siguiente marcha: Estando el aparato dispuesto como indica la fig. 1.<sup>a</sup> y el

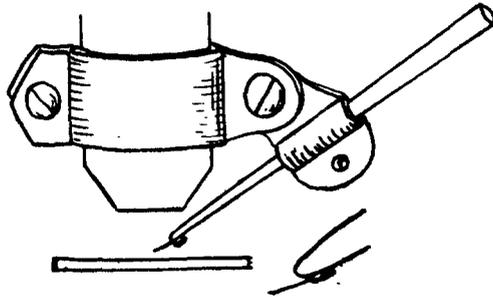
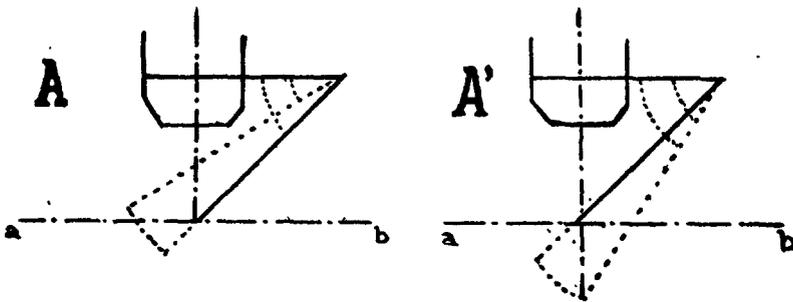


Fig. 1.<sup>a</sup>

tubo del microscopio alargado al máximo, se pasa la varilla de vidrio (varilla recta) por la abrazadera correspondiente, apretando el tornillo

hasta que quede ligeramente sujeta. Debe procurarse que la aguja comience por estar colocada de tal modo que corte al eje óptico por encima del plano focal anterior. En estas condiciones, se mira al microscopio y, si no aparece la aguja en el campo, debe girarse la varilla hasta que, como una sombra más o menos tenue, se divise. Si al acortar ahora el tubo la imagen se hace más borrosa, es señal de que la aguja está demasiado cerca del objetivo y debe abrirse algo el ángulo de la charnela, al tiempo que se sube la aguja, hasta conseguir que su extremo aparezca enfocado y en el centro del campo (fig. 2.<sup>a</sup>, esquema A). Si por

Fig. 2.<sup>a</sup>

el contrario, al acortar el tubo la imagen se hiciera más limpia, entonces la aguja está demasiado baja y hay que cerrar el ángulo de la charnela, y, asimismo, subir la aguja (fig. 2.<sup>a</sup>, esquema A').

Estas operaciones son, por lo regular, más largas de referir que de realizar, y debe tenerse en cuenta, una vez colocada la aguja, no hay necesidad de tocarla en sucesivas siembras mientras no deba cambiarse por rotura o por ser las esporas de muy diferente tamaño o condición.

*Esterilización de la aguja.*—Para ello, coloco sobre la platina un pocillo con alcohol o éter y bajo el tubo hasta que el extremo de la aguja se introduzca en el líquido.

*Captura de la spora.*—Supondré, por ser el caso más sencillo, que la masa pulverulenta de esporas está extendida sobre el porta-seco (en los demás casos pueden aplicarse con mi aparato los mismos sistemas de captura que con cualquier otro que se sirva de agujas para ello), como puede ocurrir con basidiosporas de Himenomicetos, clamidosporas de Ustilaginales, esporas de mohos, etc. Puesto el porta con esporas sobre la platina, y con el tubo acortado todo lo posible, se procede así:

1.º Se baja el tubo hasta enfocar la superficie del porta con las esporas (el extremo de la aguja no aparece entonces en el campo o apenas se distingue muy borrosamente).

2.º Con los movimientos de la platina, se hace que la espora elegida quede en el centro del campo.

3.º Se alarga poco a poco el tubo al tiempo que se baja lentamente el mismo hasta que, estando bien enfocada la espora, casi lo esté también la punta de la aguja. Entonces se puede apreciar si van a coincidir ambos, y es el momento de corregir, si fuere preciso, la colocación de la espora, moviendo la platina.

4.º Un ligero alargamiento del tubo provocará, ahora, el perfecto enfoque de la aguja, y un pequeño giro del tornillo micrométrico la bajará hasta tocar la espora, que quedará adherida a su extremo con suma facilidad.

5.º Se levanta el tubo y se retira el porta, que debe guardarse en una caja de Petri, hasta la próxima siembra, para evitar contaminaciones.

*Siembra.*—Habrán de tenerse preparados de antemano, en cajas Petri, húmedas, los portas con la gota de medio nutritivo en que hayan de sembrarse las esporas. Basta entonces poner en la platina uno de los portas así preparados y bajar el tubo del microscopio hasta que la punta de la aguja toque en el medio de siembra. Si ejecutamos esta operación sin dejar de mirar por el microscopio, veremos, en todo momento, en el centro del campo, el extremo de la aguja con la espora adherida a ella, y podremos tener el control perfecto de lo que sembramos. Una vez hecho esto, se levanta rápidamente el tubo y se retira el porta.

#### SISTEMA B.

En este caso el aparato se dispone como aparece en la fig. 3.<sup>a</sup>, y la varilla de vidrio, en vez de ser recta, está doblada en dos puntos, según se ve en la figura, donde también se indican las dimensiones aproximadas. La aguja propiamente dicha, pegada al extremo de la varilla, va dirigida de abajo arriba; el ángulo que debe formar con la horizontal, varía según los casos, pero en general es preferible que se acerque a la vertical.

*Colocación de la aguja.*—Se sigue aquí un proceso análogo al explicado para el sistema A, con la única diferencia esencial de que el extremo de la aguja ha de quedar enfocado cuando el tubo tenga la mínima longitud posible. La colocación de la aguja en el centro del campo se logra variando ligeramente el ángulo de la charnela, y el enfoque de su punta, bajando o subiendo la varilla.

*Esterilización de la aguja.*—Puede hacerse humedeciéndola con alcohol o éter, mediante un pincel.

*Captura de la espora.*—También supondré esta vez que se trata de

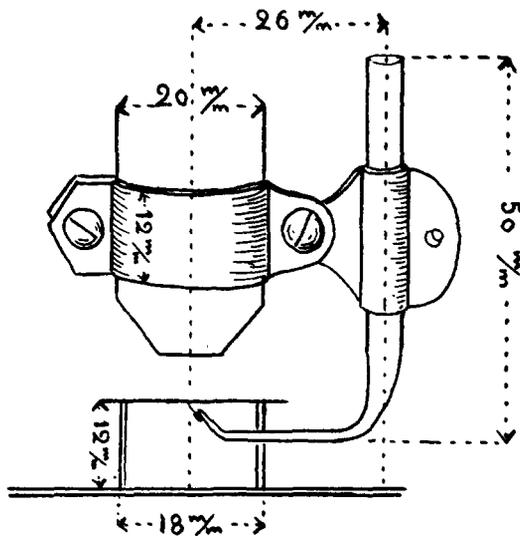


Fig. 3.<sup>a</sup>

esporas pulverulentas. En este caso, se empieza por extender el polvillo de esporas sobre un cubre previamente flameado, que se guardará dentro de una caja Petri hasta el momento del empleo.

Sobre la platina se coloca un porta y, sobre él, un anillo de vidrio con una ranura lateral. Esta ranura permite el paso de la varilla, y así queda la aguja dentro del espacio limitado por el

anillo. Sobre éste, se coloca el cubre con las esporas en su cara inferior, y a continuación se realizan las operaciones siguientes:

1.º Alargar considerablemente el tubo; con ello la aguja se desenfocará.

2.º Levantar el tubo hasta que aparezcan enfocadas las esporas.

3.º Mover la platina hasta que la espora que haya de aislarse aparezca en el centro del campo.

4.º Subir lentamente el tubo y, al mismo tiempo, acortarlo también lentamente hasta que las imágenes de la espora y de la aguja, a un tiempo, se vean casi enfocadas.

5.º Eventual corrección de la posición de la espora.

6.º Mover lentamente el tornillo micrométrico hasta que la espora quede adherida a la punta de la aguja.

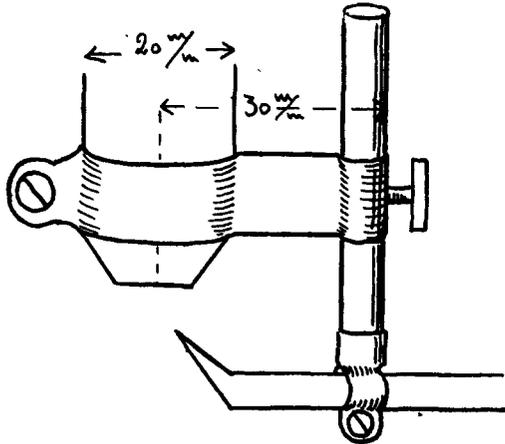
7.º Bajar el tubo y retirar el cubre.

*Siembra.*—Sobre el anillo se coloca un cubre con una gota del medio nutritivo en su cara inferior. A continuación, se levanta el tubo hasta que la punta de la aguja toque la gota pendiente; esta operación debe hacerse bajo control microscópico. No queda ya sino bajar el tubo y retirar el cubre con la siembra.

El sistema *B* tiene sobre el *A*, entre otras, la ventaja de disminuirse así el peligro de contaminación y de desecación cuando se trata de aislamientos difíciles, en que se tarda bastante tiempo; pero en algunos casos sencillos es preferible el primer sistema por su mayor rapidez. De ahí mis preferencias por el aparato descrito. Si no hubiera de seguirse más que el segundo sistema, podría emplearse un aparato como el de la figura 4.<sup>a</sup>

En algunos casos, sustituyo la varilla de vidrio por una micropipeta; pero, en general, logro mejores resultados con el procedimiento de la aguja.

Vaya, finalmente, un dato de cierto interés: tratándose de objetos fáciles, como son p. ej. las esporas de los mohos, el tiempo que invierto normalmente en aislar una espora (comprendiendo las distintas fases de esterilización de la aguja, captura de la espora y siembra) es apenas de un minuto.

Fig. 4.<sup>a</sup>