

Manual de instrucciones y uso del
DIATEC 35-VIVO



 Generalitat de Catalunya
Departament d'Ensenyament
Direcció General
d'Ordenació Educativa
Centre de Documentació
i Experimentació de Ciències

Pg. de la Vall d'Hebron, 64-70
08023 BARCELONA
Tel. 417.68.75/417.67.70

DIATEC 35-VIVO

Una oquedad de micro-observación

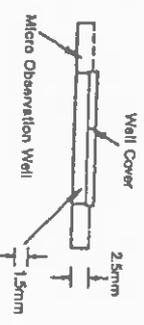
Diatero 35-VIVO, es una oquedad de micro-observación del mismo tamaño que una diapositiva fotográfica de 35 mm, que ha sido diseñada para multitud de utilizaciones didácticas. Se puede someter a esterilización en autoclave. 35-VIVO puede también utilizarse como una "microplaca Petri", ofreciendo una oportunidad única de observación directa de actividades celulares. Diatero 35-VIVO puede sustituir directamente las diapositivas cóncavas tradicionales que se utilizan para preparaciones líquidas en general.

Información General para la utilización de Diatero

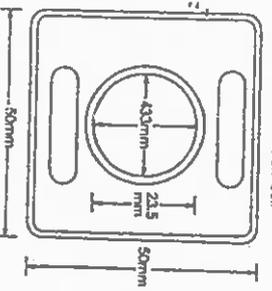
Las especificaciones son las siguientes:

- Tamaño 50mm x 50mm
- Espesor total 2.5 mm
- Profundidad de la oquedad 1.5 mm
- Superficie de la oquedad 433 mm²
- Diámetro de la oquedad 23.5 mm

SIDE VIEW
Micro Observation Cell



TOP VIEW
Micro Observation Cell



Precauciones para la utilización de Diathec 35-VIVO

1.- Para evitar ralladuras de la superficie que puedan interferir en la observación microscópica, se recomienda que se protejan con papel tipo Kleenex o bien almacenarlos separadamente en sobres plásticos.

2.- Utillicense solamente materiales no abrasivos para limpiar o secar.

3.- No se deben mantener durante periodos prolongados a la luz solar. La luz solar puede causar despolimerización de los polímeros plásticos.

Compatibilidades A.- Microproyectores

Diathec 35-VIVO se puede utilizar con:

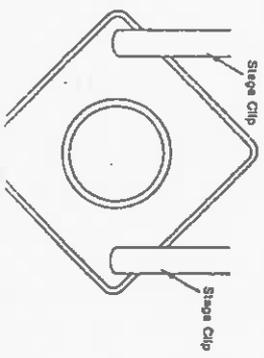
- Proyectores Hallight
- Microproyectores Kenematio
- Microproyectores B & L
- Otros microproyectores que admitan depositivas de 35 mm con dimensiones exteriores de 50 mm x 50 mm.

B.- Microscopios

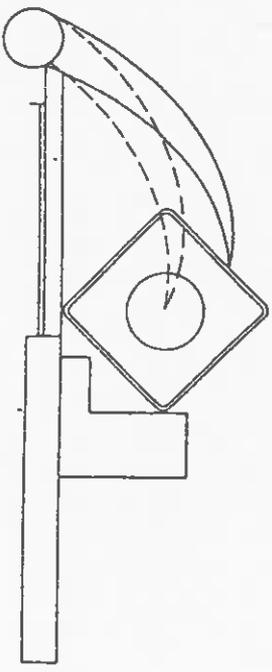
Diathec 35-VIVO se puede utilizar con casi todos los microscopios compuestos o de reflexión.

1.- Microscopio compuesto

- Platina con clips.- Coloque la oquedad de micro-observación diagonalmente sobre la platina.
Ver figura



-Platina mecánica con brazo retráctil.- Coloque la oquedad de micro-observación diagonalmente sobre la platina, según la figura. NOTA: Las oquedades de micro-observación no se pueden colocar sobre platinas mecánicas sin brazos retráctiles.



-Objetivos.- Se pueden utilizar objetivos de pocos aumentos (4x, 10x). Los objetivos de muchos aumentos (40x) y los objetivos de inmersión no se pueden ajustar, debido a que no permiten un suficiente margen. Este margen de trabajo y observación está en relación directa con el movimiento posible del objetivo, para obtener el enfoque óptimo de la imagen que se pretende estudiar.

2.- Microscopio de reflexión

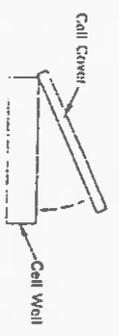
Las oquedades de micro-observación se pueden utilizar con cualquier microscopio de reflexión. Las oquedades se pueden iluminar bien desde arriba o desde abajo.

Usos sugeridos de Diatec 35-VIVO

1.- Diatec oquedad de micro-observación, se ha diseñado especialmente para una dispositiva de espesor. Cada oquedad de micro-observación tiene una capacidad aproximada de 0,5 ml, para observación microscópica utilizando microscopio compuesto o de reflexión.

Se consigne esta cantidad con una pipeta calibrada, o con 3 gotas de un cuentagotas estándar (de vidrio o de plástico). Ponganse siempre las gotas en el centro de la oquedad.

Coloquese cuidadosamente la tapa formando ángulo y empujando hacia abajo hasta su completo cierre, teniendo cuidado de no retener burbujas de aire.



2.- Preparación de "gotas de compresión"

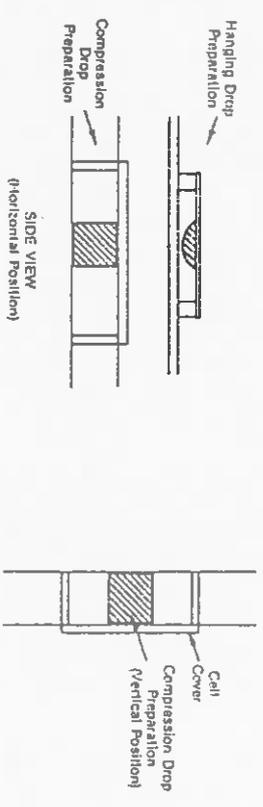
De la misma manera que la preparación estándar de "gota suspendida", pero en vez de "suspender" la gota se mantiene estacionaria y "comprimida" entre las dos piezas plásticas, que componen la oquedad de micro-observación.

Procedimiento.

1.- Colóquese una sola gota de un cuenta-gotas en el centro de la oquedad de micro-observación, estando ésta sobre una superficie horizontal. Se pueden obtener gotas más pequeñas utilizando cuenta-gotas de calibre más fino.

2.- Colóquese con cuidado la tapa de la oquedad. tápese con cuidado procurando no mover la gota.

3.- Afírmese la tapa hasta su posición, teniendo cuidado de no mover la gota.



4.- La gota se mantiene estacionaria en posición vertical u horizontal y se puede observar con microscopio o microproyector.

5.- Las técnicas de "gotas suspendidas" o de "compresión" se utilizan en mantener los protozoos contenidos en el espacio determinado. Las gotas de compresión reducen la aberración esférica, aventajando las preparaciones de gota-suspendida debido a la forma de la gota, según la figura:



3.- Medida del diámetro del campo

Marcado del objetivo: La siguiente información está generalmente impresa sobre cada objetivo:

10x; 0,25; 16 mm.

10x = poder de ampliación del objetivo.

0.25 = "N.A." o índice numérico de apertura. Valor que expresa el poder de resolución del objetivo

16 mm = índice de campo visual, utilizado para calcular el diámetro del campo visible con cada objeto. Dividiendo el número de campo visual por la ampliación del objetivo se llega al diámetro de campo en milímetros

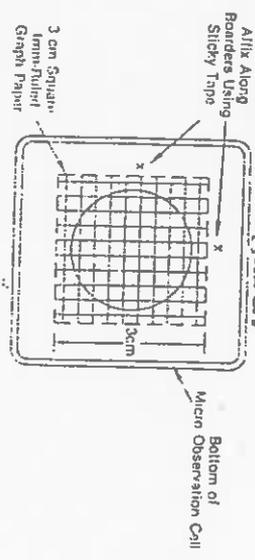
Ejemplo: $16 \text{ mm} / 10 = 1.6 \text{ mm}$ ($\delta 1.600 \mu$)

Si los números del campo visual no están impresos en sus objetivos, se puede calcular el diámetro de los campos de pocos aumentos, utilizando el procedimiento que sigue:

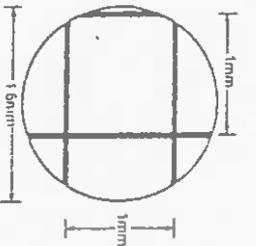
Procedimiento

1.- Tómese papel milimetrado y córtese un trozo de 3 cm².

2.- Se coloca con cuidado el cuadrado del papel calibrado en la superficie inferior de la cubierta de micro-observación, utilizando cello o cinta adhesiva. Téngase cuidado de centrar el papel calibrado. Dejese la tapa encima de la cubierta de micro-observación. Véase la figura:



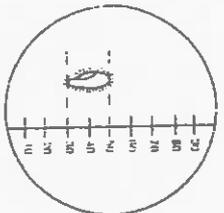
3.- Utilizando una ampliación de pocos aumentos (10x ocular con 10x objetivo), un cuadrado debe quedar como la figura de la página siguiente. El diámetro del campo es 1.6 mm δ 1.600 μ



4.- Cálculo de los tamaños de los protozoos

Después de calcular el diámetro de campo en micrómetros para los objetivos de pocos aumentos, estos valores se pueden utilizar para estimar el tamaño de lo que se quiera medir.

Un micrómetro ocular es un disco de vidrio esmerilado de precisión, con una escala calibrada detrás del ocular de un microscopio compuesto. La escala es variable, pero generalmente cuando está calibrada se divide en 100 partes. De esta manera utilizando micrómetro ocular debe de ser como la figura inferior



Procedimiento.

1.- El diámetro de campo se obtuvo como 1.600 μ (vease el diámetro de medición de campo más arriba). Por lo tanto cada unidad de división de la escala (100 divisiones) equivale a:

$$1.600 \mu / 100 \text{ unidades} = 16 \mu / \text{unidad}$$

2.- Póngase el microorganismo a medir moviendo la escala de calibración o la quedada de micro-observación sobre la platina, Refierase a la ilustración anterior.

NOTA: Se recomiendan agentes retardantes de protozoos (físicos y químicos) durante la observación y cálculo de tamaño.

3.- Se utiliza el paramecium en el ejemplo siguiente: Refiriéndose a la figura anterior se puede ver que la quedada mide 20 unidades de escala. El cálculo de su tamaño:

$$\begin{aligned} \text{Longitud} &= 20 \text{ unidades de escala} \times 16 \mu / \text{unidad} = \\ &= 320 \mu \end{aligned}$$

5 Recuento de las células para estimación de población.

La quedada de micro-observación Diatoc 35 VIVO se puede utilizar para obtener estimaciones de población de muestras del placton. El objetivo es contar el número de microorganismos en un volumen conocido de muestra (o soluciones diluidas). Se pueden hacer cálculos de extrapolación para volúmenes de células según la situación de las muestras. La quedada de micro-observación puede contener 0,5 ml sin contar burbujas de aire o mermas.

Procedimiento

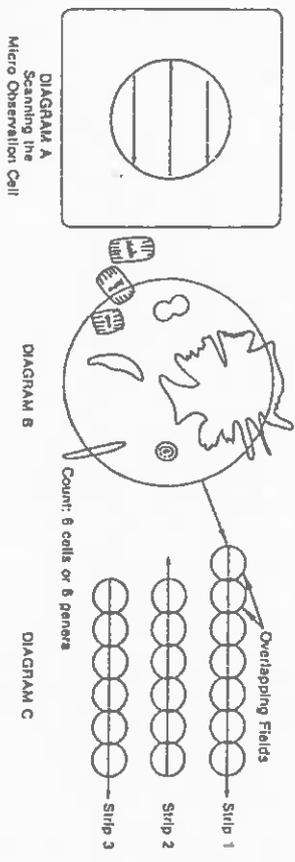
1.- Cálculo de diámetro de campo para objetivo específico de pocos aumentos a utilizar. Vease el del campo de medida.

2.- Agítase bien la muestra para mezclar las células. Llenese una pipeta calibrada y póngase exactamente 0,5 ml en el centro de la quedad de micro-observación.

3.- Póngase la tapa de la quedad con quedad desde un ángulo cerrándolo bien. Apriete la tapa hasta su posición, teniendo cuidado de no perder nada de la muestra o de retener burbujas de aire. Repítase si es necesario.

NOTA: Las células móviles son difíciles de contar (si no imposible). Se sugiere añadir unas gotas de yodo (La tintura de yodo es apta) a un pequeño volumen de muestra que se va a contar. Añadense 2 a 3 gotas de yodo por 100 ml. de muestra. El yodo destruye las células y tinte los granulos de almidón (de las células de algas) de un color azul-negro.

4.- Cuéntase y tómase nota del número de células de la cantidad total de células o de microorganismos escogidos. Utilícese la técnica de contar descrita debajo:



Empezase por el punto marcado "x" en el diagrama A y andétese todo lo que está en el campo (o lo que interesa). Incluyense en la cuenta todas las células que caigan dentro del campo (vease el diagrama B). Muévase el campo hacia la derecha y repítase el recuento. Sigase hasta que se haya leído la franja completa (vease diagrama C). Cuéntase por lo menos 3 de estas franjas.

5.- Utilícese la fórmula siguiente para calcular la densidad de los microorganismos (por géneros individuales o total) por ml de muestra.
area x número de células por género (o total)
area del campo x 3 franjas x volumen

Ejemplo: El diámetro del campo ha sido determinado como 1.6 mm. Se han recontado 3 franjas y 24 filamentos de Spirogyra.

$$\frac{4.33 \text{ mm} \times 24 \text{ Spirogyra}}{1.6 \text{ mm/franja} \times 3 \text{ franjas} \times 0.5 \text{ ml}} = \frac{10.392}{2.4} = 4,330 \text{ filamentos de Spirogyra}$$

NOTA: Normalmente las muestras concentradas se deben volver a examinar. Para determinar la densidad presente en soluciones acuosas usaremos la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{organismos por muestra conc.} \times \text{vol. total de conc.}}{\text{volumen total de agua examinada}}$$

Ejemplo: Se filtró 10 litros de agua de lago para obtener una muestra concentrada de 100 ml. Esta muestra se fijó con 2-3 gotas de yodo. Una parte alcuota de esta muestra de 0.5 ml de este concentrado de 100 ml se volvió a examinar. Los cálculos serían como sigue:

4.330 filamentos de Spirogyra x 100 ml. concentrado
10.000 ml de agua filtrada de lago

= 43.3 filamentos de Spirogyra por ml agua de lago

6.- Ilustración gráfica de Galvanotaxis

Galvanotaxis es la atracción de los organismos al polo positivo o negativo de un campo eléctrico. Muchos tienen movimientos dirigidos bien hacia el cátodo (polo -) o hacia el ánodo. (polo +) cuando se inicia una corriente eléctrica. Fisiológicamente esta reacción se debe a un latido ciliar en la región del cuerpo más cerca del ánodo, mientras que un número menor de cilios cerca del cátodo late en la dirección inversa.

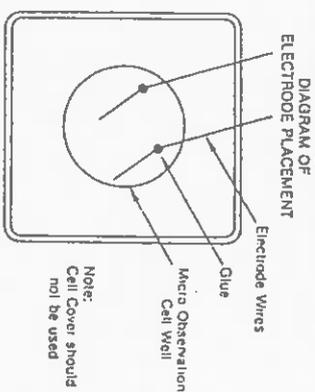
Estudio del Paramecium

Materiales necesarios:

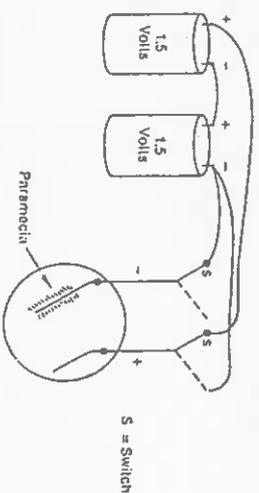
- 1 oquedad de micro-observación 35 VIVO
- 1 tubo de pegamento de epoxi o de otro pegamento no soluble en agua.
- 2 pilas "D" 1.5 voltios o un transformador DC de 6-9 voltios.
- 2 alambres de platino, preferentemente, como electrodos, o de cobre, de una medida de 16 (5 pulgadas)
- 1 alambre de teléfono de 30 pulgadas
- 2 interruptores

Procedimiento

1.- Fijen los dos cables de electrodos con pegamento al fondo de la oquedad de micro-observación, según se ve en la figura.



2.- Construyase un circuito según la figura.



3.- Prepare el conjunto según el diagrama de arriba. Asegúrese que la oquedad de micro-observación está bien apoyada para su observación conecte se el circuito.

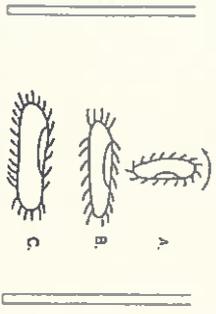
4.- Añadase un cultivo de paramecium a la oquedad de micro-observación. Añadase bastante líquido para cubrir los electrodos. No se utiliza la tapa la oquedad.

Observaciones

1.- El paramecium emigrará hacia el cátodo (polo -) y se concentrará alrededor de él, ya que tiene galvanotropismo negativo.

2.- Al cambiar la corriente utilizando interruptores tal como se indica por las líneas de puntos en el diagrama anterior, el paramecium cambiará de dirección y emigrará hacia el electrodo ahora negativo.

Este mecanismo se puede estudiar en detalle



A: Los cilios de la izquierda han sido invertidos; normalmente hacia la derecha. El protozoo se vuelve hacia la izquierda, hacia el cátodo (vease la flecha)

B: El cuerpo se mueve hacia el cátodo sólo con la pequeña inversión de cilios producidos anteriormente.

C: Al utilizar una corriente más fuerte (6-9 voltios) se desplazan más cilios.

NOTA: Para esta demostración se puede utilizar el microscopio de reflexión. Para ello se coloca un papel negro (a prueba de luz) debajo de la opacidad de micro-observación para observar con más facilidad las células. La luz se suministra desde arriba.

Se puede estudiar más fácilmente la reversión ciliar si se utiliza un agente físico retardante del protozoo. Los agentes químicos pueden interferir con la acción ciliar, merced a sus efectos anestésicos sobre el organismo observado.

Estudios de otros Protozoos

	<u>Reacción</u>
Bursaria truncatella	CG
Euglenia viridis	NR
Nyctotherus cordiformis	CG
Opalina ranarum	CG
Paramecium species	CG
Polytoma uvella	AG
Spirostomum sp.	CG
Stentor coerules	CG

CLAVE: CG= Galvanotaxia catódica

AG= Galvanotaxia anódica

NR= no hay reacción

7.- Demostración de fototaxis

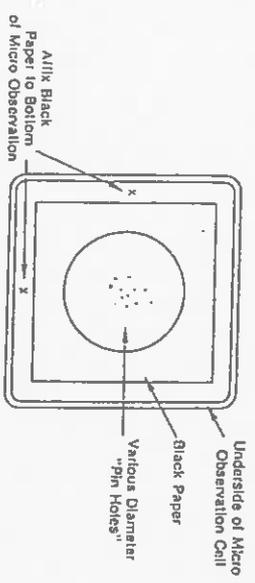
La reacción de un organismo dirigiéndose hacia la luz se llama fototaxis positiva. La reacción opuesta, en sentido inverso a la luz, se llama fototaxis negativa. Bacterias de color púrpura y algas azul-verdosas reaccionan fóbicamente a los cambios de intensidad de la luz, mientras que los protozoos flagelados, tales como la Euglenia, tienen la capacidad para organizar movimientos dirigidos hacia una fuente de luz.

Procedimiento

1.- Cortese un cuadrado de 3 cm. de un papel negro a prueba de luz.

2.- Con un alfiler se hacen bastantes agujeros en el centro del cuadrado. Haganse algunos agujeros más grandes que otros.

3.- Fijese el cuadrado de papel a la parte inferior de la oquedad de micro-observación, según la figura siguiente:



4.- Llenese la oquedad con un cultivo de Euglena sobre fécula. Cúbrase y póngalo sobre la platina del microscopio.

5.- Ajustese el condensador microscópico para que emita máxima cantidad de luz a través de la oquedad de micro-observación, Trabajando en una cámara oscura se facilita la observación.

6.- Después de algunos minutos nótese que las células se han concentrado alrededor de los agujeros hechos, donde la luz penetra a través del papel negro.

8.- Micro cultivos estériles

Técnica de esterilización

1.- Colóquese una oquedad de micro-observación desmontada en una cestilla para autoclave.

2.- Póngase la oquedad en autoclave -si no se dispone de autoclave, se puede utilizar un esterilizador de vapor- a 15 libras por pulgada cuadrada durante 20 minutos. Utilícese el "ciclo seco" de la auto-clave.

3.- Con los dos componentes todavía en la cestilla, se manipula la tapa del tal manera que se coloque sobre la parte superior de la oquedad. Deje la cestilla cerrada hasta que se necesite.

Método para cultivo de agar

Antes de adicionar el agar asegúrese de tener disponible el agar fundido adecuado para el medio bacteriológico requerido, junto con una pipeta estéril calibrada. Esta actividad es idéntica a la que se requiere cuando se utilizan placas Petri estériles.

IMPORTANT! Se requiere tener práctica en técnica estéril para el procedimiento siguiente:

Procedimiento

1.- Trabajando sobre una superficie sólida y limpia quítase la tapa de la oquedad de micro-observación a partir de un ángulo mínimo que sea suficiente para poder verter la cantidad requerida.

2.- Colóquese aproximadamente 0,2 ml (1-2 gotas) del agar fundido. Tébase inmediatamente. Sacúdase la oquedad de micro-observación cuidadosamente para que el medio de cultivo añadido cubra toda la super

ficie, pero no la cubierta. Déjese enfriar.

3.- Para inocular utilícese instrumentos esteriles. Tenga cuidado de no romper la superficie fina del agar.

4.- Para su observación utilíce un microscopio compuesto o de reflexión. La capa de agar debe de ser lo bastante fina para permitir una observación standard sin suplemento de luz o un microscopio compuesto invertido.

Sugerencias a estudiar

- Observación de las células en colonias de Physarum
- Observación de la migración de plasmodium de Physarum.
- Observación de mohos (Saprolegnia, Allomyces)

Cultivos líquidos

Coloquense cultivos de líquido esterilizado tal y como se ha descrito más arriba. Inoculense mediante una pipeta



BIBLIOGRAFIA

Alexopoulos, C.J., Introductory Mycology, John Wiley and Sons, New York, 1.962

Behringer, M.P., Techniques and Materials in Biology. Mc.Graw-Hill, Inc., New York, 1.973

Crum, L.E., Classroom Activities and Experiments for Life Science, Parker Publishing Co., West Nyack, New York, 1.974.

Orlans F.C., Animal Care from Protozoa to Small Mammals, Addison-Wesley Publishing Co., Inc. Reading, Massachusetts, 1.977