

NUEVO MÉTODO
PARA LA
FIJACIÓN Y CONSERVACIÓN DE PROTOZOARIOS

Por AUGUSTO C. SCALA

De las Universidades nacionales de Buenos Aires y La Plata

« Hemos comenzado por estudiar lo que se relaciona á nuestra especie considerada como una entidad independiente y ahora nos ocupamos en general de todas las especies y de todo lo que vive. Más tarde, pensaremos de preferencia en todo lo que el universo contiene, en todo lo que se mueve, mundos, protozoarios y átomos. » (*Notions générales de biologie*, etc., 1906. Trad. de A. L. Herrera.)

El estudio de los protozoarios es uno de los temas que ha despertado en estos últimos tiempos un interés bien manifiesto por parte de todos los biólogos, quienes al ver en ellos los primeros representantes de los seres vivos formados sobre la superficie terrestre merced á las infinitas reacciones de los elementos inorgánicos, esperan poder realizar en un porvenir cercano la síntesis de la materia viva. No nos cabe la menor duda sobre la resolución de este problema, cuando sepamos repetir la reacción por medio de la cual, el CO^2 actuando sobre las infinitas combinaciones de sales inorgánicas en solución, dió origen á ese cuerpo tan extremadamente sensible que llamamos protoplasma.

De aquí que la observación minuciosa de esos pequeños seres haya tenido siempre un interés creciente y así se explica el empeño y dedicación especiales con que se han ideado una serie interminable de procedimientos teóricos y prácticos con el objeto de facilitar el estudio de esos interesantes animales.

Haremos una rápida reseña de las substancias usadas y su crítica según los resultados obtenidos por los diversos autores y los nuestros, para citar seguidamente la técnica que hemos ideado y nos ha dado el éxito más lisonjero.

Después de una larga serie de tanteos, el ácido ósmico en solución al

0,5-1 por ciento quedó consagrado por el uso como el mejor fijador de protozoarios, pero si bien es cierto que su acción es eminentemente fijadora tiene defectos tan notables en la práctica, como para tener que lamentar su uso.

Ya Mojsisovics en 1881 (hace 26 años), trataba el tema en su libro *Zootomie*, lamentando la falta de un verdadero fijador para los protozoarios y dice refiriéndose á ello y al ácido ósmico: « Por desgracia no se conoce aún método seguro para conservar á no ser las duras cáscaras de los protozoarios (se refiere á los tecamebianos, foraminíferos, radiolarios); algunos infusorios es cierto, conservan poco más ó menos su forma primitiva cuando se les agrega gradualmente ácido ósmico; pero el encogimiento que se continúa en la glicerina es ordinariamente tan considerable, que pasado cierto tiempo apenas puede aun determinarse con exactitud la especie del animal ». Á pesar de lo cual el ácido ósmico se usa todavía y se le cree irremplazable.

M. Certes recomienda un procedimiento de preparación y conservación de infusorios que consiste en fijarlos en sus formas por el ácido ósmico, en colorearlos y conservarlos en glicerina.

A. Garbini (*Manuale per la tecnica moderna del microscopio*, Milán, 1897) fija con ácido picro-sulfúrico, luego alcohol á 35 y 70 grados. Colorea, y deshidrata con los alcoholes á 90 y 100 grados. Diafaniza con esencia de clavo y monta en bálsamo de Canadá.

Utiliza también el ácido ósmico al 1 por ciento; y el bicloruro mercurio al 2 por mil.

Respecto á este último fijador debemos decir que su uso en la proporción indicada por los diversos autores no conduce jamás á resultados seguros. Los protozoarios se desorganizan en el 99 por ciento de los casos; y esto se debe, como hemos podido comprobarlo á la fuerte proporción usada (2 ‰). El bicloruro mercurio es un notable fijador de protozoarios siempre que se trate de preparaciones transitorias, es decir hechas para una observación de pocas horas en cuyo caso recomendamos su solución al 0,50 por mil de la cual se agregará una pequeña gota á la que contiene los protozoarios.

Insistimos en el error que cometen los autores usando soluciones muy concentradas para este fin; la delicada estructura de esos seres requiere líquidos diluidos, pues el desequilibrio originado es tan grande, que basta para explicar los insucesos.

La mayor parte de los autores, entre otros G. Du Plessis, D. Carazzi, C. Vogt y E. Jung, una vez hecha la fijación con el bicloruro al 2 por mil dejan secar la preparación espontáneamente, pero esta práctica inveterada da por resultado una completa deformación que desfigura en absoluto el primitivo aspecto del animal.

C. Vogt y E. Jung (*Anatomie comparée pratique*) dan mucha importan-

cia también al ácido ósmico y al bicloruro mercúrico pero reconocen sus inconvenientes.

Entre los autores que se ocupan del estudio de protozoarios citaremos á Louis Leger, quien en el libro *Zoologie descriptive*, tomo I, hace una pequeña monografía de la *Amœba proteus* (Leidy) y *Amœba terricola* (Greef), pero sin dar ni citar técnicas especiales.

Fabre-Domerque, en el libro que acabamos de citar, se ocupa de los flagelados y ciliados, tomando como tipo de los primeros el *Chilomonas Paramœcium* (Ehr) y el *Paramœcium Aurelia* (O. F. Müller) de los segundos. Sigue en ambos casos la misma técnica: mata con ácido crómico al 1 por ciento para poner en evidencia la cutícula (método que recomendamos) y hace el estudio del macro y micronúcleo comprimiendo al animal, lo mata fijándole al mismo tiempo con ácido ósmico en solución saturada (!), colorea por último con el verde de metilo acético.

Agrega dicho autor (y en esto está de acuerdo con los otros) que el ácido ósmico tiene el inconveniente de emnegrecer mucho los infusorios que al cabo de poco tiempo se vuelven completamente opacos. Para evitarlo, hace pasar por la preparación una corriente de agua amoniacal (amoníaco, una gota; agua destilada, 20 cc.) consiguiendo disminuir la opacidad con estos lavajes.

La técnica es larga y complicada, el resultado dudoso. Según Fol, los fijadores usados hasta aquí no dan los resultados del percloruro férrico (A. GARBINI, *Manuale per la tecnica moderna del microscopio*), tintura alcohólica de percloruro férrico á la que se agrega de 5 á 10 veces su volumen de alcohol á 70 grados (Vulpian) en seguida los pasa al alcohol acidulado, alcohol á 100 grados, luego en una solución al 1 por ciento de ácido gálico para obtener coloración pardusea, deshidrata, diafaniza y monta en bálsamo del Canadá.

La técnica es larguísima, el percloruro en la proporción indicada actúa contrayendo al cabo de un tiempo.

La serie de líquidos recomendados para el estudio de protozoarios no termina aquí:

Se utiliza también el líquido de Lugol (iodo, 1 gramo; ioduro potásico, 2 gramos; agua, 300).

El líquido de Merkel, modificado especialmente para esta técnica, compuesto por tetracloruro platínico, 1 gramo; ácido crómico, 1 gramo; ácido acético, 1 gramo; agua 400-1000.

El ácido oxálico en solución saturada ha sido preconizado como fijador instantáneo y como conservador de las cilias, pero siempre que se trate de preparaciones transitorias, pues el ácido oxálico en solución saturada, tiene los inconvenientes de todas las soluciones fijadoras concentradas; altera, descompone y desfigura.

Leon Jammes (*Zoologie pratique baséé sur la dissection*) se ocupa de

algunos protozoarios pero sin dar técnicas especiales pudiendo decirse lo mismo del libro *Tecniqne microscopique* de Böhm y Ooppel, quienes indican el ácido ósmico en las proporciones conocidas.

El doctor don Angel Gallardo profesor de zoología de las facultades de Medicina y Ciencias Naturales, nos proporcionó varias técnicas siendo las principales al ácido ósmico al 1 por ciento; formol al 10 por ciento, y bicloruro mercuríco (bicloruro mercuríco, 10 gramos; agua destilada, 30 gramos; amoníaco 10 gramos; agréguese poco á poco y remuévese el agua que se evapora).

Las dos primeras tienen los inconvenientes apuntados; la última determina el encogimiento paulatino y la disgregación final, como tuvimos ambos oportunidad de comprobarlo con algunos vorticelidos preparados el año anterior.

Tememos cansar á nuestros lectores al citar tantos procedimientos, mas lo hacemos para poder sentar una conclusión: La técnica protistológica no posee aún en su arsenal un verdadero fijador simple ó compuesto que posea la doble propiedad siguiente: Fijar conservando la forma primitiva del protozooario y determinar la aparición de las cilias ó pestañas vibrátiles.

El hecho sobradamente comprobado, nos animó á buscar un líquido que poseyese mejores condiciones que los usados y creyendo haber resuelto en parte el problema lo proponemos al estudioso, puesto que á nosotros nos ha facilitado la tarea á veces complicada.

Nos llegan de Europa preparaciones llamadas de protozoarios, pero estamos en presencia de un dilema: ó nos mandan lo peor que tienen, ó no poseen métodos definitivos de preparación, el hecho es que para poder decir: se trata de tal ó cual protozooario se necesita una fuerza de voluntad demasiado altruísta y que por tanto no condice ni cabe admitir en cuestiones de índole científica.

El líquido que proponemos debe su poder conservador y fijador á la acción combinada de tres substancias en proporciones mínimas: el formol, la glicerina y un alcaloide; la atropina, disueltos en agua.

En el estudio de los protozoarios nunca se ha utilizado alcaloide alguno y si bien es cierto que se han usado varios alcaloides para otros grupos, no tenemos noticia que se hayan propuesto para éste.

La estrienina, la nicotina, la cocaína, se usan en la preparación transitoria de celenterados, gusanos, moluscos; la atropina nunca se usó.

Después de una serie de tanteos é insucesos hemos logrado obtener una fórmula que es la que proponemos:

Agua	50 centigramos
Formol	X gotas
Glicerina	10 gramos
Atropina	0.002 miligramos

Disuélvase la atropina en el agua á calor suave, déjese enfriar y agréguese la glicerina, en seguida el formol; filtrese y consérvese en frasco de tapa esmerilada.

Para fijar con esta solución hacemos uso de pequeñas pipetas que nosotros mismos preparamos afilando un tubo cuyo calibre puede variar de 0^m005 á 0^m008. La parte afilada se corta luego de modo que su poro final sea de 0^m0005; en tal forma se consiguen gotas uniformes pequeñas y suficientes para el caso.

La gota que contiene los protozoarios la colocamos en un tubo también afilado cuyo calibre superior es de 0^m008 y el inferior 0^m002 tapado por un pequeño tapón de goma. Largo del tubo de 0^m060 á 0^m080.

Técnica. — Los protozoarios se colocan en el tubo de preparación y en seguida se vierte una gota pequeña con la pipeta descripta más arriba.

Fijación. — La acción es inmediata; déjese aposar (5'-10'), después de lo cual se retira el exceso de líquido por medio de pequeñas tiras de papel de filtro, ayudando la absorción con la inclinación moderada del tubo.

Si se quieren observar sin colorear, se tapa con un dedo la abertura grande del tubo preparador se quita suavemente el tapón y se depositan los protozoarios sobre el portaobjeto, tocándole con la gota que pende del tubo.

Preparaciones transitorias. — Si se quiere hacer la observación durante algún tiempo se pone una gota de glicerina sobre la preparación y se recubre suavemente con el cubreobjetos.

Preparaciones coloreadas definitivas. — Procédase como indicamos en los párrafos *Técnica y fijación* pero absorbiendo tan sólo en parte el fijador, hecho esto, con pequeñas pipetas preparadas como la que indicamos anteriormente, se agrega una gota del colorante que se use, se deja actuar unos 2 á 5 minutos según los casos, se retira el colorante excesivo en la misma forma indicada para el fijador y se lava agregando agua que luego se retira; se reemplaza el agua por alcohol diluido á 30 grados al que se haya agregado 5 por ciento de glicerina, se continúa con los demás alcoholes hasta llegar al xilol. La operación está terminada con gran rapidez y en menos tiempo del que se necesita para describirla.

Una vez que los protozoarios están en el xilol pueden depositarse sobre el portaobjetos, se pone una gota de bálsamo diluido en el xilol (3 partes del primero por 1 parte del segundo) y se monta recubriendo con el cubreobjeto (de 0^m18 diámetro).

La preparación queda así asegurada indefinidamente.

En cuanto al colorante hemos obtenido espléndido resultado usando la doble coloración Bruno de Bismarek — verde de iodo — en la dilución siguiente:

	Gramos
2º Bruno de Bismarek.....	0.10
Agua destilada.....	100.00
1º Verde de iodo.....	0.10
Agua destilada.....	100.00

Las pestañas y cilias vibrátiles se ponen de manifiesto desde el primer momento con el solo fijador.

Temíamos que los vorticelidos por el hecho de poseer el filamento contráctil no pudiesen ser incluidos en la lista, pero hemos podido comprobar que conservan su forma esférica y muestran la corona vibrátil con toda claridad.

Las vorticelas nos fueron proporcionadas por el director del gabinete de historia natural (Colegio Nacional central), señor Juan Nielsen, quien pudo observar el hecho, aprovechando esta oportunidad para agradecerle las finas deferencias que como amigo sincero, nos brinda en todo momento.

No me corresponde hacer la crítica del método pero diré solamente las ventajas que de su uso pude obtener :

1º El fijador es incoloro, por tanto no disimula la estructura del protozario;

2º Su manejo es fácil, así como su preparación y conservación;

3º Su costo es mínimo;

4º Renne la doble calidad de fijar y conservar que deben atribuirse en primer lugar al uso moderado del formol mezclado á la glicerina.

La atropina mantiene el estado primitivo del protozario ejerciendo su acción sobre la cutícula y las cilias que extiende sin violentar en lo más mínimo la forma.

Hubiera deseado tratar de los diversos colorantes utilizados entre los cuales citaré la safranina, el picrocarmín, la eosina, el bruno de Bismarek, el verde de iodo y de metilo, la hematoxilina, la nigrosina, el azul de genjiana, pero continuamos su estudio en detalle y por ahora nos limitamos á aconsejar el uso del verde de iodo y bruno de Bismarek; más adelante daremos á conocer los resultados.

Termino recomendando el método de fijación que propongo y espero gustoso las críticas, pues contribuirán á perfeccionar la técnica hasta hoy usada.

Buenos Aires, junio 19 de 1907.

BIBLIOGRAFÍA

- G. VOGT y E. JUNG, *Anatomic comparée pratique*.
LOUIS LEGER, En *Zoologie descriptive*, tomo I.
FABRE-DOMERGUE, En *Zoologie descriptive*, tomo I.
BÖNH y OPPEL, *Tecniqne microscopique*.
MOJSISOVICS, *Zootomie*.
A. GARBINI, *Manuale per la tecnica moderna del microscopio*.
D. CARRAZI, *Tecnica di anatomia microscopica*.
L. JAMMES, *Zoologie pratique basée sur la dissection*.
A. L. HERRERA, *Notions générales de biologie*, etc.
L. BOUTAN, *Dissections et manipulations de zoologie*.