

## Instructivo para Usuarios: Preparación de muestras para Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

El procesamiento de las muestras lo realiza parcialmente el usuario (fijación, deshidratación y montaje), la preparación de las mismas depende de su naturaleza y se deben de preparar de la siguiente manera:

### **1 Preparación de muestras húmedas de acuerdo al tamaño**

**Especímenes muy pequeños (<100  $\mu\text{m}$ ):** Incluye bacterias, células individuales o cultivadas, la mayoría de los protozoarios y esporas, deben ser adheridas a sustratos sobre los cuales se lleve todo el procesamiento para MEB. Un método común es filtrar la suspensión en filtros millipore o filtros de policarbonato, (son lisos y tienen una superficie uniforme) o ser colocados directamente sobre cubreobjetos de vidrio de 10-14 mm de diámetro o sobre el portamuestra MEB de aluminio (ver punto 5.3).

**Especímenes pequeños (100-500  $\mu\text{m}$ ):** Como algunos invertebrados, se procesan en contenedores porosos, viales o en bolsas de papel arroz.

**Especímenes medianos a grandes (>0.5 mm):** Son fácilmente manipulados con pinzas, como bloques de tejidos, invertebrados grandes pueden ser procesados en contenedores de vidrio. Si es necesario la muestra se corta en pequeños bloques de aproximadamente 1 mm.

### **2 Procesamiento de muestras húmedas**

#### **Fijación**

La muestra se sumerge en el fijador, los más comunes son: glutaraldehído al 2.5 % en amortiguador de fosfatos o la mezcla de glutaraldehído al 2.5% y formaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos, por un tiempo de 0.5-1 hora para muestras que se encuentran sobre un sustrato y de 1-3 horas para bloques de tejidos y especímenes medianos a grandes (Figura 1). El pH del fijador debe de ajustarse al del espécimen. Realizar tres lavados con amortiguador de fosfatos (o el mismo utilizado en la fijación) con una duración

de 5-10 minutos cada uno. La concentración del fijador y el tiempo de fijación, al igual que el amortiguador utilizado depende del tipo de muestra.

### **Deshidratación**

Deshidratar la muestra en una serie de alcoholes graduados (Figura 2). Generalmente se usa el etanol en agua destilada de 10% 30% 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, (un cambio por 10 min c/u) y 100% (tres cambios por 15 min c/u). Los tiempos de deshidratación dependen del tipo de muestra.

### **Secado de las muestras por punto crítico**

Este paso solo aplica a muestras húmedas a petición del usuario y lo realiza el laboratorio, para lo anterior el usuario debe entregar las muestras fijadas y deshidratadas.

## **3 Montaje de la muestra**

Se le proporciona al usuario los portamuestras de aluminio MEB con cinta de carbón de doble adhesivo en la parte superior, el usuario rotula con un marcador indeleble de punta fina la parte lateral del portamuestras con la clave que le asigne a su muestra. Los portamuestras deberán entregarse al final de la última sesión de observación.

Bajo el microscopio estereoscópico con ayuda de pinzas o pincel fino y con mucho cuidado, el usuario coloca la muestra en la posición adecuada que corresponde a la zona de interés para la observación en el MEB. El montaje de la muestra debe ser preciso y de ser posible en un solo paso, ya que el adhesivo es muy fuerte. Si la muestra se manipula mucho, se puede dañar o puede quedar con restos de adhesivo que pueden cubrir la superficie de las estructuras de la muestra.

Las muestras en suspensión se colocan sobre un sustrato de vidrio, filtros o membranas o directamente sobre el portamuestras con pipeta Pasteur o micropipeta.

## **4 Recepción de las muestras por el SAMEB**

Las muestras húmedas que presentan contenido de agua deben de estar previamente fijadas y deshidratadas por el usuario. Éstas se reciben dependiendo del tamaño en el contenedor adecuado en el interior de frascos de vidrio de boca ancha en etanol absoluto,

la tapa del frasco debe de estar sellada con parafilm, el frasco debe estar etiquetado con el nombre del usuario, instituto-laboratorio, tipo de muestra, fecha y la clave con la que el usuario identifique a cada muestra.

Las muestras secas, ya sea mediante el procedimiento de secado de punto crítico o aquellas que presentan una estructura rígida, las monta el usuario en portamuestras de aluminio rotulados con la clave de la muestra. El usuario entrega los portamuestras en cajas Petri de plástico o vidrio selladas con parafilm y etiquetadas con los datos: nombre del usuario, tipo de muestra, clave con la que el usuario identifique a cada muestra y fecha.

### **5 Tamaño de las muestras**

Las muestras no deben ser mayor a un  $1 \text{ cm}^3$ , las muestras. Para análisis de muestras en polvo se requiere al menos 10 mg.