

TECNICA EXPERIMENTAL PARA REALIZAR BIOENSAYOS TOXICOLOGICOS CON ANIMALES ACUATICOS*

Experimental technique for aquatic animals toxicological bioassays.

JUAN F. GAVILAN E.** e IVONNE HERMOSILLA B.**

RESUMEN

Se presenta un sistema de cultivo para animales acuáticos que permite estandarizar estudios toxicológicos en condiciones de laboratorio. El sistema se puede mantener experimentalmente por períodos de tiempo cortos o prolongados y replicar simultáneamente tantas veces como sea necesario.

ABSTRACT

A culture system for aquatic animals allowing the standardization of toxicological studies under laboratory conditions is presented. This system can be experimentally maintained for long or short periods of time and simultaneously replicated as many times as necessary.

Keywords: Technique. Toxicology. Bioassays. Aquatic Animals.

INTRODUCCION

En estos últimos años se han incrementado los estudios de contaminación ambiental para conocer la toxicidad y los efectos teratológicos de algunos compuestos químicos, ajenos al ambiente, pero incorporados a él debido al desarrollo industrial y al extraordinario uso de compuestos químicos en la agricultura moderna.

La alteración en el ambiente más allá del nivel de tolerancia y la capacidad regulativa de la naturaleza preocupa a muchos investigadores, los cuales han volcado sus esfuerzos para realizar estudios sobre toxicidad especialmente de pesticidas (Biagianti y Brusle, 1983).

*Proyecto 20.31.03. Dirección de Investigación, Universidad de Concepción.

**Laboratorio de Biología del Desarrollo. Depto. de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales. Casilla 2407, Apartado 10, Concepción, Chile.

En bioensayos de contaminación acuática es común detectar el uso de determinados organismos que ofrecen ventajas para su manejo en condiciones de laboratorio, entre ellos los estados embrionarios y/o larvales están mereciendo un buen sitio como substrato óptimo de estos estudios. Sin embargo, existe la inquietud de que muchas especies que no son objeto de investigación puedan también estar en peligro a causa de la contaminación ambiental.

Esta situación ha demandado estandarizar una técnica adecuada en primer lugar para mantener a los organismos que preocupan en condiciones de laboratorio (Nace, 1968), y en segundo lugar para someter a éstos a soluciones test. Al respecto, respondiendo a esta necesidad, en el presente trabajo se define una metodología para bioensayos de contaminación utilizando estados embrionarios y larvales de anfibios.

METODOLOGIA Y RESULTADOS

La técnica se ensayó utilizando posturas y estados larvales (renacuajos) de la "rana chilena", *Caudiverbera caudiverbera* (Linné, 1758). Los estados embrionales fueron definidos según la tabla de Jorquera e Izquierdo (1964) para la rana chilena y los estados larvales según Etkin (1964) para los anuros en general.

Botellas plásticas desechables de dos litros de capacidad en forma invertida, sirvieron de unidades de cultivos (Fig. 1.A y 1.B). La base de la botella fue abierta y el cuello sellado desde el interior con un tapón de goma a través del cual se hizo pasar un tubo nivelador de vidrio de 0,6 cm de diámetro y de 20 cm de longitud, el que tiene como función mantener el volumen constante en la botella. Un tubo de plástico de 1,8 cm de diámetro y de 14 cm de longitud, con la capacidad suficiente para dejar en su interior el tubo nivelador, funciona como sifón (Fig. 1.A). La base de este tubo provista de ranuras se apoya sobre el tapón de goma, estas ranuras del sifón permiten la expulsión de desechos sólidos cuando éstos se acumulan en el cuello de la botella.

En caso de que la acumulación sea significativa, será necesario que el tubo sifón se tape en su extremo superior para producir un rápido sifonaje permitiendo un recambio parcial o completo de agua.

Entre la zona media y el fondo de la botella se coloca una malla circular de plástico reforzada en su perímetro con anillos de goma. Esta debe presentar perforaciones menores al tamaño del material biológico en ensayo (Fig. 1.A y 1.B). Para su instalación se baja a lo largo del tubo sifón. La función de la malla es definir dos compartimentos en el depósito, por ello el diámetro de la malla debe ser similar al diámetro interno del depósito permitiendo que en los bioensayos con embriones, éstos pueden mantenerse suspendidos entre aguas y en los bioensayos con estados larvales se favorezca la separación de los desechos y desperdicios sólidos que tienden a acumularse en el fondo de la botella (Fig. 1.B).

Las unidades de cultivo se pueden suspender en soportes metálicos o repisas de madera (Fig. 1.B y Fig. 2). Instaladas las unidades de cultivo con el volumen de agua o solución test a usar, se debe considerar la aeración del sistema. Para ello será necesario contar con un aerador eléctrico (Jewell 110 V AC. 6 Watt), el cual proporciona el aire que sale a través

de dos mangueras plásticas de 5 mm de diámetro (Fig. 2). Con el objeto de hacer llegar a cada unidad de cultivo una presión de aire constante, una de las mangueras se conecta a una columna de agua de volumen variable, que consiste en un tubo de vidrio de 3,5 cm de diámetro (Fig. 2). La otra rama del aerador proporciona el aire a cada una de las unidades de cultivo. Para ello, se conectan mangueras plásticas de 1,5 mm de diámetro, utilizando agujas desechables de uso clínico (Fig. 1.B y 2).

En el caso de los bioensayos, en los que se emplean estados larvales, es necesario un recambio continuo de agua. La continuidad se asegura manteniendo el sifón abierto y suministrando agua a cada una de las unidades de cultivo por simple goteo a la superficie. Tal suministro se consigue instalando una red de mangueras, semejante a las utilizadas en el sistema de aeración que se conectan a la fuente de agua o solución test que deberá ser colocada por sobre el nivel en el que se encuentren instaladas las unidades de cultivo (Fig. 2). El exceso de agua se elimina pasivamente desde la botella a través del tubo nivelador que se conecta a mangueras de desagüe de longitud variable. (Fig. 1.A).

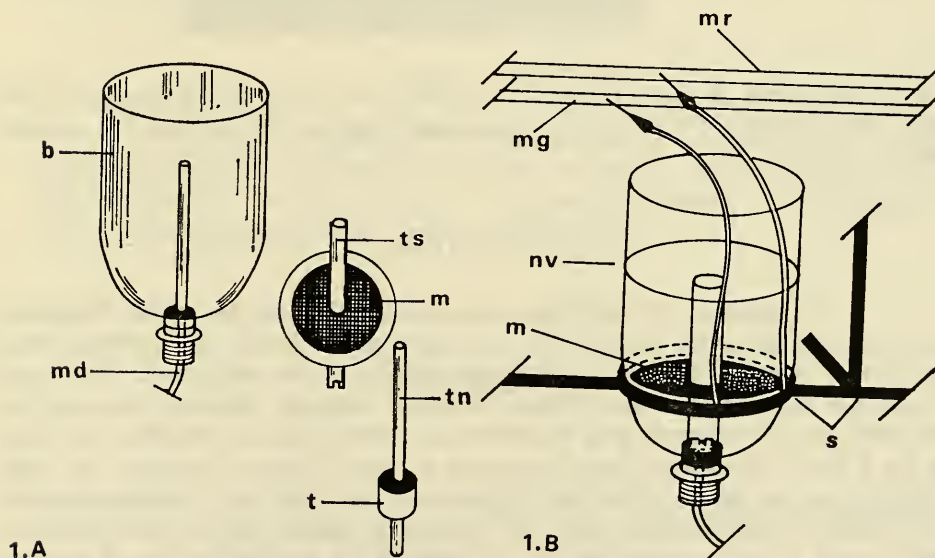


Fig. 1.A.- Elementos de la Unidad de Cultivo: Botella plástica (b) cuyo cuello es cerrado con un tapón de goma (t), provista de un tubo nivelador de vidrio (tn), un tubo sifón de plástico (ts) y una malla circular (m). En el extremo externo del tubo nivelador se adosa una manguera de desagüe (md).

Fig. 1.B.- Unidad de Cultivo instalada sobre soporte metálico (s), conectada a red de mangueras de aire (mr) y agua (mg). Nivel del agua (nv).

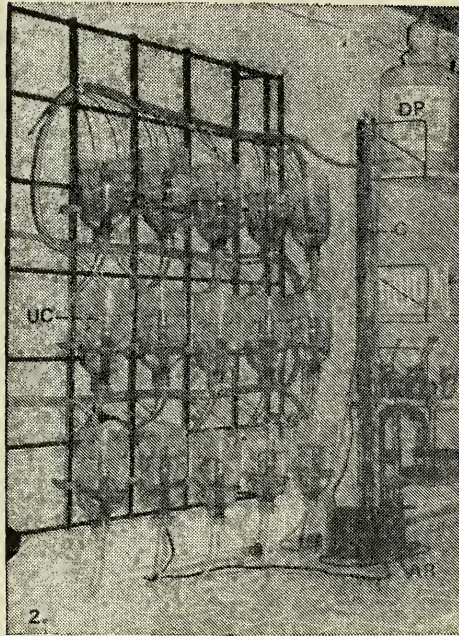


Fig. 2.- Disposición de varias Unidades de Cultivo (UC) conectadas al sistema de aeración: (AR) aerador y (C) columna de regulación. Depósito (DP) de agua y/o solución test.

DISCUSION

La presente metodología describe un sistema de cultivo diseñado para ser utilizado en bioensayos con organismos acuáticos, especialmente anfibios y peces. Para ello se utilizan unidades de cultivo en las cuales es posible mantener cierta constancia en la relación volumen/número de organismos. El volumen que se determinó como óptimo en estas unidades es de 1 litro y en razón a este volumen se puede fijar el número de organismos por unidades de cultivo. Si bien es cierto que esto conlleva utilizar un número relativamente bajo de huevos o larvas, las características de bajo costo y fácil confección de los materiales empleados en el sistema permite establecer réplicas tantas veces como lo requiera un análisis estadístico confiable. Por otro lado, es necesario enfatizar que el bajo número de embriones por unidad de cultivo, permite un mejor manejo y control de las experiencias sin someter a los organismos a situaciones de stress, condiciones que deben ser consideradas seriamente en la discusión de resultados que valoran parámetros ajenos al ambiente normal del animal, sobre todo, en organismos con alta motilidad (Wedemeyer, 1970).

Las características del sistema descrito en el presente trabajo, como el recambio de agua, suministro de aire, compartimentalización de las botellas y, cuando sea necesario alimentación, permite el análisis del bioensayo durante un período de tiempo que puede comprender horas o semanas. Al revisar la bibliografía se puede establecer que los bioensayos

tienen una duración variable dependiendo ello del diseño experimental. Al trabajar con sistemas acuáticos es primordial mantener a éste en buenas condiciones por lo que se requiere un recambio continuo de agua o solución test, prescindiendo de este recambio en aquellas experiencias en que exista aeración constante. (Laughlind y Linden, 1982).

Comúnmente, los autores optan por efectuar una trasvasijación de las soluciones, 1 a 2 veces por semana (Marchal – Segaultand y Ramade, 1981; Muramoto, 1981), especialmente cuando se trabaja con estados larvales. Nuestro sistema presenta la ventaja de renovar el agua y aire pasivamente por autocontrol sistemático, descartando, a su vez, cualquier posibilidad de stress a los organismos. Situación esta última que no se considera en la bibliografía y que tendría importancia en respuestas fisiológicas.

Como las experiencias realizadas para probar la metodología no se han limitado a bioensayos de corta duración sino que a través de varias etapas del desarrollo de anfibios, el sistema ofrece garantía para mantener los estados larvales en buenas condiciones al suministrar el alimento adecuado. Este suministro puede ser realizado a diario (Elliot – Feeley y Armstrong, 1982), sin embargo, debería respetarse un horario preestablecido evitando así nuevas condiciones de stress.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su reconocimiento a la Dirección de Investigación de la Universidad de Concepción, por su apoyo a través del Proyecto 20.31.03 y al Prof. Hugo I. Moyano del Depto. de Zoología de la Universidad de Concepción, por su colaboración.

REFERENCIAS

- Biagianti, S. et J. Bruslé, 1983. Revice Générale de l'action de divers polluants (Pesticides) sur les poissons. Ann. Biol. XXII (1): 70–83.
- Davis, K., T. W. Schultz and J. N. Dumont, 1981. Toxic and Teratogenic effects of selected aromatic amines on embryos of amphibian *Xenopus laevis*. Arch. Environm. Contam. Toxicol. 10: 371–391.
- Elliott–Feeley, E., and J. B. Armstrong, 1982. Effects of Fenitrothion and Carbaryl on *Xenopus laevis* development. Toxicol. 22: 319–335.
- Etkin, W., 1964. Metamorphosis. In Moore, J. A. ed. Physiology of the amphibian I. Academic Press. N. York I–v.: 427–462.
- Folmar, L. C., H. O. Sander and A. M. Julien, 1979. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. Arch. Environm. Contam. Toxicol. 8: 269–278.

- Jorquera, B. y L. Izquierdo, 1964. Tabla de Desarrollo Normal de *Calyptocephalella gayi* (Rana chilena). *Biológica* XXXVI: 43-53.
- Laughlin, R. and O. Linden, 1982. Sublethal responses of the tadpoles of the European frog *Rana temporaria* to two tributyltin compounds. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 28: 494-499.
- Marchal-Segault, D. and F. Ramade, 1981. The effects of Lindane, and Insecticide, on Hatching and Postembryonic Development of *Xenopus laevis* (Daudim) Anuran Amphibian. *Environm. Res.* 24: 250-258.
- Michibata, H., 1981. Uptake and distribution of cadmium in the egg of the teleost, *Oryzias latipes* J. *Fish. Biol.* 19: 691-696.
- Muramoto, S., 1981. Variations of some elements in Cadmium Induce, Malformed fish. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 27: 193-200.
- Nace, George W., 1968. The Amphibian Facility of the University of Michigan. *Bio Science.* 18(28): 767-775.
- Wedemeyer, G. A., 1970. The role of stress in the disease resistance of fishes. *In* Sniesko, S. F. ed. A. symposium on diseases of fishes and shellfishes. *Am. Fish. Soc. Spec.* 5: 30-35.