
Instrucciones para la construcción de un sistema lineal multi- compartimentado de exposición no forzada para ensayos de selección de hábitat*

Autores

Victoria Vera Vera, Luis Alberto C. Macías, Elizabeth N. V. Rodríguez,
David Salvatierra, Cristiano V. M. Araújo[†]

⁴ Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC), Departamento de Ecología y Gestión Costera, Puerto Real, Cádiz, España

* Este manual ha sido modificado a partir del inicialmente producido durante la estancia del autor C.V.M. Araújo en la Universidad Laica Eloy Alfaro (ULEAM – Ecuador) como parte de sus actividades como investigador Prometeo del gobierno Ecuatoriano. Más detalles serán publicados por los autores Victoria Vera-Vera, Luis Cedeño-Macias, Dayanara Macías-Mayorga, Julián Blasco, Matilde Moreira-Santos, Rui Ribeiro y Cristiano V.M. Araújo en el capítulo “Métodos de exposición no forzada en sistemas multi-compartimentados para incluir la selección de hábitat como respuesta a la contaminación” del libro “Limnología: Dos conceptos básicos às pesquisas avançadas”.

[†] **Contacto:** cristiano.araujo@icman.csic.es.

1. MANUAL DEL SISTEMA LINEAL MULTI-COMPARTIMENTADO

El sistema lineal multi-compartimentado de exposición no forzado (Figura 1) ha sido propuesto por Lopes et al. (2004) y ampliamente descrito en trabajos que buscaban estudiar cómo la dinámica espacial de los organismos es influenciada por la contaminación (ver las revisiones de Araújo et al., 2016 and Moreira-Santos et al., 2019). Uno de los aspectos importantes a tener en cuenta en este tipo de sistema es que el número de compartimentos que lo integran dependerá del número de concentraciones que se quieran ensayar, es decir, cuánto más compartimentos se use, más niveles de contaminación será posible simular. La modificación del sistema en cuanto a longitud y, consecuentemente, número de compartimentos se encuentra asociada a que exista tiempo suficiente para el desplazamiento de los organismos dentro del sistema considerando las diferencias entre especies con movilidades diferentes, esperando así que los resultados sean iguales.

El sistema que se presenta en este manual puede ser modificado según el tipo de estudio que se llevará a cabo. Por ejemplo, el número de compartimentos del sistema es ilimitado; asimismo, el tamaño del compartimento debe ser definido en función del tamaño de los organismos que serán utilizados, pues la densidad de la población es un parámetro importante a considerar en un ensayo de selección de hábitat. A continuación, se detalla una guía de cómo se construye sistema lineal multi-compartimentado.

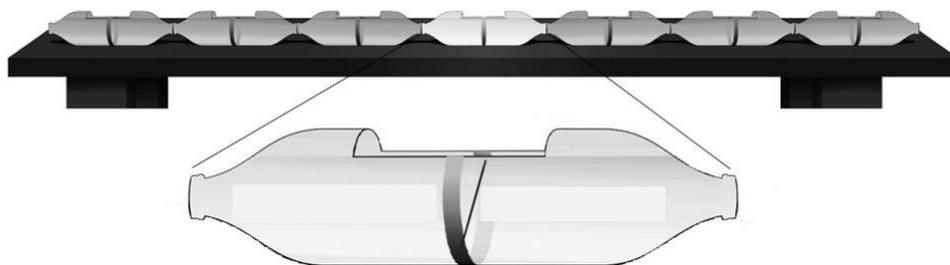


Figura 1. Sistema de exposición no forzada de múltiples compartimentos utilizado en los ensayos de selección de hábitat.

2. CONSTRUCCIÓN DE LOS COMPARTIMENTOS

Para construir un compartimento, se necesitan dos botellas de plástico vacías de igual forma y tamaño. En el caso de la guía, se presenta un sistema con 7 compartimentos (14 botellas). Preferentemente, se deben usar botellas de agua que no hayan tenido contacto con ninguna sustancia química para garantizar que no haya ningún tipo de residuo. Si se desconoce su procedencia o se observa material extraño en las botellas, ésta debe ser descartada. Como las botellas serán manipuladas, cortadas y pegadas, es recomendable usar aquellas que presentan cierto grado de rigidez y de textura lisa, para evitar que se deformen. Una vez obtenidas las botellas, se debe verificar el buen estado de las mismas, retirar las etiquetas (en caso de tenerlas) y realizar un lavado previo con agua destilada. Posteriormente, se

procederá a ejecutar los cortes para la creación de los compartimentos, tal como se describe a continuación:

Paso 1. Las dos mitades de cada compartimento

Se cortan las botellas transversalmente usando un objeto corto punzante (estiletes o tijeras), de forma a obtener la porción equivalente a la mitad de un compartimento (formada por la parte superior de la botella - Figura 2). Hay que tener en cuenta que cuanto más cerca de la base de la botella sea el corte, mayor tamaño tendrá el compartimento. Por el contrario, si se desea un compartimento más pequeño, el corte debe ser lo más cercano posible a la boca de la botella. Se descartan las bases de las botellas.



Figura 2. Mitad de un compartimento tras el corte de la botella.

Paso 2. Preparar la apertura de cada compartimento

Se realiza sobre la mitad del compartimento un pequeño corte rectangular (Figura 3). El tamaño del corte va a determinar el área de acceso al compartimento (ver Paso 3).



Figura 3. Mitad de un compartimento indicando el corte para la apertura superior.

Paso 3. Montaje del compartimento

Se pegan dos mitades con sus respectivos cortes rectangulares alineados. En el borde de una mitad se aplica el pegamento (e.g. Sikaflex-E o Sikaflex 11FC+, no tóxicos a los organismos) por el borde externo y

en la otra mitad se pone pegamento en el borde interno del corte rectangular, de tal forma que al unirse se adhieran ambas mitades con el pegamento, garantizando un buen sellado (Figura 4). Se recomienda evitar que el pegamento pase a la parte interna de la botella.



Figura 4. Unión de las dos mitades de dos botellas para formar un compartimento.

Al unir ambas mitades para formar el compartimento, hay que tener en cuenta que los cortes rectangulares se conecten uniformemente y se alineen entre sí para permitir que se forme una apertura en el compartimento armado (Figura 5); se deja secar el pegamento por 24 h. La apertura tiene la finalidad de permitir que se introduzcan las muestras y los organismos de ensayo en los respectivos compartimentos.

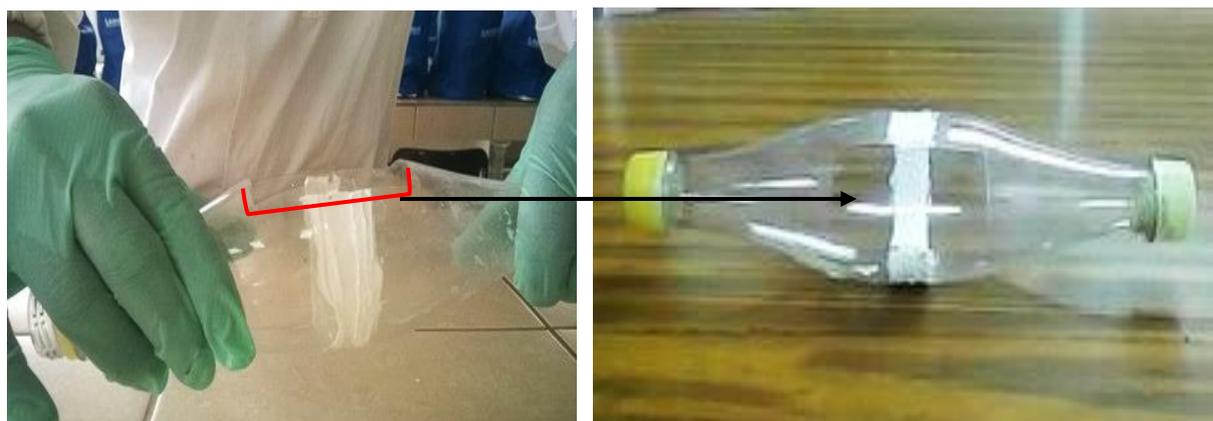


Figura 5. Compartimento destacando la apertura superior.

Paso 4. Verificando fugas en los compartimentos.

Se colocan las dos tapas originales de las botellas en cada extremidad del compartimento, se llena con agua de grifo, y se deja en reposo por al menos 24 h. Si se observara fuga de agua en alguno de los compartimentos, se reforzará con pegamento la fisura donde surge la fuga; se espera otras 24 h para

secar el pegamento y otras 24 h con agua del grifo para verificar una vez más la ausencia de fugas. Para facilitar la identificación de posibles fugas, se colocan los compartimentos llenos de agua sobre papel absorbente.

3. UNIÓN DE LOS COMPARTIMENTOS

Paso 1. Conectar dos compartimentos.

Se retiran las tapas de los extremos de cada compartimento y se aplica pegamento cuidadosamente en los bordes de la boca de las botellas y en la parte externa (para ayudar la unión) (Figura 6); evitando aplicar el pegamento internamente para no bloquear el paso entre los compartimentos. A continuación, se unen los compartimentos asegurando que las respectivas aperturas superiores estén alineadas. Se deja secar el pegamento durante 24 h. Se recomienda unir los compartimentos en grupos de dos, después en grupos de cuatro, y así sucesivamente, de forma a evitar exceso de manipulación del sistema que dificultará el buen alineamiento de las aperturas (ver Paso 3). Para facilitar este proceso, se sugiere montar los compartimentos utilizando una base (por ejemplo, una canaleta) para el sistema (ver sección 4).



Figura 6. Unión entre compartimentos.

Paso 2. Reforzar la conexión de los dos compartimentos.

Se aplica nuevamente pegamento en la parte externa donde se conectaron los compartimentos, con el fin de reforzar la unión entre ellos y reducir el riesgo de fuga de líquidos (Figura 7).

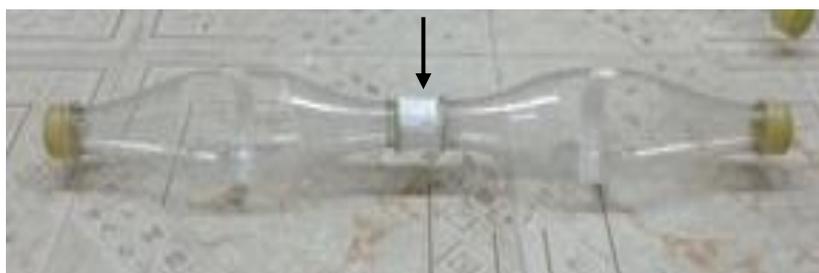


Figura 7. Refuerzo de las conexiones entre los compartimentos.

Paso 3. Conectando todos los compartimentos de un sistema.

Unir los grupos de compartimentos necesarios para construir un sistema, siguiendo los procedimientos descritos en el paso 1 y 2 de esta sección. El número de compartimentos de un sistema de exposición no forzada no está estandarizado, aunque esta guía presenta un esquema ilustrativo de 7 compartimentos.

Paso 4. Verificación de ausencia de fugas en cada sistema.

Se cierra las dos extremidades del sistema con las tapas de las botellas, se llena el sistema con agua y se espera 24 h. Si se observara fuga de agua entre las conexiones, se debe seguir los procedimientos indicados en el Paso 4 de la sección 2.

4. SOSTÉN PARA EL SISTEMA

Armado el sistema de multi-compartimentos, es recomendable elaborar un sostén para darle estabilidad y evitar así movimientos bruscos o balanceos durante la ejecución del ensayo, provocando desequilibrios en el sistema y en consecuencia en el gradiente de contaminación. Se emplean canaletas o tubos de plásticos (tipo policloruro de vinil-PVC), con dimensiones (ancho x largo) semejantes a las del sistema, cortados longitudinalmente por el eje medio (Figura 8). El sostén puede ser elaborado de otro material, desde que ofrezca estabilidad al sistema.



Figura 8. Sostén de policloruro de vinil (PVC) para dar estabilidad al sistema.

5. TAPONES PARA ESTABECER EL GRADIENTE

Paso 1. Haciendo un tapón.

Los tapones son importantes durante el montaje del ensayo, puesto que inicialmente hay que evitar que las concentraciones introducidas en cada compartimento se mezclen con las de los compartimentos adyacentes. Se forma una pequeña bola (tapón), usando plastilina no tóxica, que tenga un diámetro un poco mayor a la boca de las botellas. Será necesario un tapón para cada conexión entre compartimentos para evitar el paso de fluido de un compartimento a otro durante el montaje del experimento. Se envuelve

cada tapón con cinta teflón no tóxico o parafilm, para evitar que la plastilina tenga contacto directo con el sistema y las soluciones testadas (Figura 9).



Figura 9. Tapón y procedimiento de envoltura con teflón.

Paso 2. Aislar los compartimentos.

El aislamiento de los compartimentos se hace introduciendo un tapón en cada conexión como está representado en la Figura 10.



Figura 10. Colocación de los tapones en los compartimentos.

6. VERIFICACIÓN DEL VOLUMEN DE LOS COMPARTIMENTOS Y DEL SISTEMA

La determinación de los volúmenes de cada compartimento es crucial para comprobar que todos los compartimentos tienen el mismo tamaño y, a la vez, determinar el volumen total del sistema.

Paso 1. Medir el volumen de cada compartimento.

Utilizando un recipiente graduado, se llena cada compartimento vertiendo agua del grifo por la apertura, hasta que el agua cubra la zona de paso entre los compartimentos, pero sin sobrepasar el límite de la apertura superior para evitar que se desborden (Figura 11). Después de llenar cada compartimento, se estima el volumen de cada uno de los compartimentos del sistema; la suma de todos los valores dará el volumen total del sistema.



Figura 11. Medición de la capacidad del volumen del sistema.

7. CALIBRACIÓN DEL SISTEMA

Calibrar el sistema consiste en verificar que el gradiente de contaminación permanece estable en cada sistema replicado durante el periodo de exposición estipulado a utilizar en los ensayos (en cada sistema y entre las réplicas de cada compartimento). El mínimo recomendable serían 3 réplicas, que es lo utilizado en esta guía. Para esto se puede utilizar cualquier sustancia no tóxica que sea fácilmente cuantificable. Para la ilustración de esta guía se utilizó cloruro de sodio (NaCl) por la facilidad de medirlo indirectamente a través de la conductividad.

Paso 1. Seleccionar la concentración a estudiar en cada compartimento.

Se asigna un porcentaje de contaminación a cada compartimento, siendo que en los compartimentos extremos hay que asignar 0% que representa el control (compartimento sin contaminación) y 100% que representa el nivel máximo de contaminación. De acuerdo con el esquema ilustrativo de 7 compartimentos de esta guía, se selecciona las siguientes concentraciones: 0, 17, 34, 50, 66, 84 y 100% (Figura 12).



Figura 12. Modelo de la distribución del gradiente de contaminación en cada compartimento.

Paso 2. Aislar los compartimentos.

Se coloca un tapón en cada conexión entre compartimentos (Figura 10), para impedir que la solución vertida en cada compartimento pase al compartimento adyacente.

Paso 3. Preparación del gradiente de concentraciones.

Se preparan con agua del grifo o agua destilada las concentraciones de NaCl a ser añadidas a los compartimentos (teniendo en cuenta los porcentajes de contaminación indicados en la Figura 12. Se mide la conductividad de cada concentración de NaCl.

Paso 4. Generar el gradiente en el sistema.

Se vierte cada concentración de NaCl en su respectivo compartimento y se retiran los tapones de forma cuidadosa con la ayuda de una pinza (Figura 13), para que las concentraciones se mezclen naturalmente formando el gradiente. Todo el procedimiento debe ser realizado con extremo cuidado evitando balanceos del sistema, de forma a no incrementar la mezcla entre los compartimentos.



Figura 12. Uso de una pinza para retirar los tapones.

Paso 5. Cuantificar el gradiente inicial.

Se mide la conductividad en cada compartimento 30 minutos después de retirar los tapones. Para ello, se debe introducir el electrodo por la apertura central de cada compartimento, iniciando la lectura y registro de valores desde el control hasta el compartimento con mayor concentración de NaCl. Mantener el sistema con este gradiente durante el mismo periodo de tiempo a ser usado en los ensayos, de modo a poder comparar: (i) la variación entre las réplicas de las concentraciones de NaCl y (ii) si el gradiente se mantiene a lo largo del sistema.

Paso 6. Cuantificar el gradiente final.

Se mide la conductividad en cada compartimento tras el periodo máximo establecido para los ensayos, siguiendo los procedimientos detallados en el paso 6. Se puede hacer sucesivas mediciones de la conductividad para saber cómo el gradiente va cambiando a lo largo del tiempo. Hay que tener en cuenta que la mezcla dentro del sistema será bastante diferente con la presencia de los organismos. Esa calibración sirve simplemente para que se tenga una idea de la estabilidad del sistema sin organismos.

Paso 7. Análisis estadístico de la calibración.

Se hace una regresión entre la concentración nominal de NaCl (0, 17, 33, 50, 66, 84 y 100 mg/L) y la conductividad medida en el Paso 3. Se estiman las concentraciones iniciales y finales de NaCl en cada compartimento ($n = 3$) a partir del modelo de regresión entre ambas medidas. Aunque los valores de conductividad (o concentraciones finales) no sean los mismos que los iniciales, lo que se busca es asegurarse de que haya un gradiente de contaminación, es decir, que haya diferencia estadística entre las concentraciones de cada compartimento.

8. SELECCIÓN Y ACLIMATACIÓN DE LOS ORGANISMOS

Para elegir una especie de ensayo, hay que tomar en cuenta la movilidad y el tiempo que les lleva a los organismos desplazarse por todo el sistema. Si los organismos que se van a experimentar tienen poca movilidad y tardan demasiado tiempo en recorrer todo el sistema, se puede extender el periodo del ensayo o reducir el tamaño del sistema con botellas más pequeñas.

9. ENSAYO CONTROL DE DISTRIBUCIÓN DE LOS ORGANISMOS

El ensayo control de distribución verifica si la distribución de los organismos dentro del sistema cuando expuestos solo a agua control (sin contaminación) es aleatoria, es decir, que no hay preferencia de los organismos por ninguno de los compartimentos, especialmente hacia los extremos del sistema. Este ensayo descarta la presencia de cualquier factor externo que pueda interferir en el desplazamiento del organismo. Este ensayo puede realizarse previo a los ensayos con contaminante o en simultáneo y debe consistir en un mínimo de 3 réplicas.

Paso 1. Llenar el sistema.

Se llena todo el sistema con el agua control (agua de cultivo o de referencia).

Paso 2. Organismos para el ensayo.

Se separa un número total de organismos a exponer en cada compartimento del sistema (Figura 14), utilizando el mínimo posible de agua, para que al introducir los organismos en el sistema el volumen de agua de los compartimentos no aumente considerablemente; organismos pequeños y de fácil manipulación pueden ser colocados en el sistema con pipetas o redcillas para acuarios. El número de organismos por compartimento debe ser calculado de modo a que su densidad no influya en la selección del compartimento; es importante por eso considerar en el cálculo la posibilidad de que todos los organismos del sistema se desplacen hacia un único compartimento, sin que haya una sobrepoblación.

Paso 3. Exposición de los organismos.

Se vierten los organismos de cada recipiente en el respectivo compartimento. El tiempo de exposición será igual al seleccionado para los ensayos con contaminación.



Figura 13. Separación de los organismos y su introducción en el sistema.

Paso 4. Condiciones de exposición.

Se realiza el ensayo en ambiente cerrado, con temperatura controlada y en oscuridad, con el fin de eliminar cualquier factor externo tal como corriente de aire, luz, presencia humana u otro factor que interfiera en el desplazamiento de los organismos. El tiempo de exposición no debe ser superior al tiempo utilizado en la calibración del sistema.

Paso 5. Conteo de organismos.

Se coloca cuidadosamente los tapones entre las conexiones de los compartimentos para cerrar el paso de los organismos y acto seguido se registra el número de organismos que se encuentran en cada uno de los compartimentos. En todos estos procedimientos se utiliza una luz roja, con el fin que los organismos no detecten la presencia del observador y así mantener las condiciones de exposición (Figura 15).

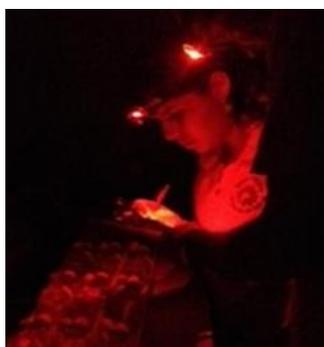


Figura 15. Conteo de organismos al final del experimento utilizando luz roja.

Información Adicional: más detalles de los trabajos pueden ser consultados en sus CVs disponibles en internet (e.g., Research Gate).