

Métodos de recolección y técnicas de identificación de Nemertinos marinos bentónicos

MALVA SÁNCHEZ (*)

INTRODUCCION

El phylum Nemertea está constituido por vermes acelomados que tienen tubo digestivo completo, sistema circulatorio cerrado y una proboscis que se ubica dorsalmente en relación con el tubo digestivo, en una cavidad que se denomina rincocelo.

Los nemertinos miden entre 0,5 mm. y 20 m. de largo y entre 0,5 mm y 1 cm. de ancho. Tienen colores variados: algunos son blancos y transparentes, otros son de colores anaranjados o amarillo, café o negro. Pueden presentar también manchas, franjas o bandas coloreadas.

En su gran mayoría son marinos. Se pueden encontrar desde el litoral hasta 1.500 m. de profundidad. Son de hábitos bentónicos o pelágicos. El grupo está escasamente representado en tierra y agua dulce.

Gran cantidad de las especies del phylum han sido descritas con ejemplares fijados. Su identificación, a nivel de especie, se basa esencialmente en diferencias de la anatomía interna, por lo cual es necesario hacer cortes histológicos de los ejemplares; pero para un juicio de tipo sistemático definitivo es también indispensable hacer una descripción detallada de los caracteres morfológicos externos.

Los nemertinos tienen cuerpo blando con una fuerte pared muscular. Al ser fijados pueden sufrir contracciones violentas que alteren caracteres morfológicos importantes. Para observar en forma satisfactoria tanto la morfología externa como interna del grupo deben usarse técnicas apropiadas que permitan realizar una buena recolecta, narcosis, fijación e inclusión de los ejemplares. Este trabajo es una selección de técnicas convencionales

probadas por el autor y que han dado resultados satisfactorios en el estudio de este grupo.

MÉTODOS DE RECOLECCION

Los métodos para recolectar nemertinos varían según el sustrato en el que se trabaja.

En arena:

Se coloca la muestra de arena en una paila y se agrega agua de mar en una proporción de tres a uno moviendo vigorosamente. Una vez que la arena sedimenta, se filtra el agua que contiene los animales por una red de plancton de tipo manual. El contenido de la red se deposita en una placa Petri. Este procedimiento debe repetirse varias veces con cada muestra. El agua de mar puede ser reemplazada por una solución de cloruro de magnesio en agua potable al 7‰.

En rocas:

Se colocan los trozos de rocas en bolsas plásticas con agua. Una vez en el laboratorio las rocas se rompen en trozos más pequeños, separando con especial cuidado los gusanos para no romperlos.

En bancos de choritos
(*Perumytilus purpuratus*):

Los choritos se separan de la roca, o de otros choritos, con espátula y se revisa la superficie de los animales y de las rocas en las que ellos estaban. Al realizar esta operación, es frecuente encontrar juntos nemertinos y poliquetos, si son muy pequeños pueden confundirse a simple vista.

(*) Laboratorio de Zoología, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile.

En algas:

Se colocan en un recipiente de vidrio dos tercios de algas y un tercio de agua de mar. Se mantiene la mayor parte de la muestra a la sombra o en la oscuridad dejando sólo un rincón de ella iluminada con luz natural o artificial. Así disminuye, o se detiene, la asimilación clorofílica en las plantas, baja la concentración de oxígeno y aumenta la del dióxido de carbono contenido en el agua. Los nemertinos son habitualmente fototácticos negativos y geotácticos positivos en condiciones normales, pero en las condiciones aquí descritas migran hacia la superficie iluminada. Este fenómeno es lo que KIRSTEYER (1967) llama trampa fisiológica.

En roqueríos de piedras relativamente pequeñas:

Se levantan las piedras, se dan vuelta con rapidez con el objeto de observar la arena en que se apoyan, ya que los nemertinos se entierran velozmente, luego se observa la superficie inferior de la piedra.

CONSERVACION DEL MATERIAL VIVO

Para mantener vivos los animales en el laboratorio, se pueden colocar en acuarios con aireación. Algunas especies pueden vivir varios días en pailas con agua de mar, incluso sin aireación, si se cambia diariamente el agua y se mantiene a una temperatura no superior a 10°-12° C, un ejemplo de esto es *Lineus atrocaeruleus*.

Hay otras especies, más frágiles, como *Lineus ruber* que se fragmentan en condiciones adversas. Los animales muy maduros, cuyas gónadas están llenas de espermios o huevos, suelen reventarse fácilmente en acuarios.

NARCOSIS

Para fijar los animales en estado de relajación muscular y evitar contracciones violentas al matarlos es conveniente anestesiarlos antes de su fijación.

Algunos anestésicos que se usan son:
Sulfato de manganeso monohidratado SO_4
 $\text{Mn. H}_2\text{O}$.

Se utiliza en solución al 2% en agua de mar del lugar, filtrada en proporción de un individuo por cada 50 ml. en cápsula de Petri. El método tiene la ventaja de producir una anestesia rápida, pero si se mantienen los ejemplares más de una hora en esta solución se presentan úlceras y autotomía. (MORETTO 1966).

Los mejores resultados se obtuvieron con cloruro de magnesio cristalino $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 7% solución en agua potable.

Se usa 50 ml. por cada cuatro o cinco ejemplares de tres cm. Los animales se anestesian aproximadamente a las dos horas. Si se desea medir u observar la morfología externa, este tiempo de narcosis es suficiente. Para evitar contracciones violentas en una posterior fijación es necesario mantenerlos de doce a veinticuatro horas, según sea el tamaño, en el cloruro de magnesio al 7% en agua potable. Los nemertinos que permanecieron veinticuatro horas en este anestésico una vez devueltos al agua de mar abandonaron el estado de relajación.

FIJACION

El animal que va a ser ingresado a alguna colección o se va a someter a cortes histológicos debe ser anestesiado antes de la fijación.

Algunos de los fijadores probados fueron los siguientes:

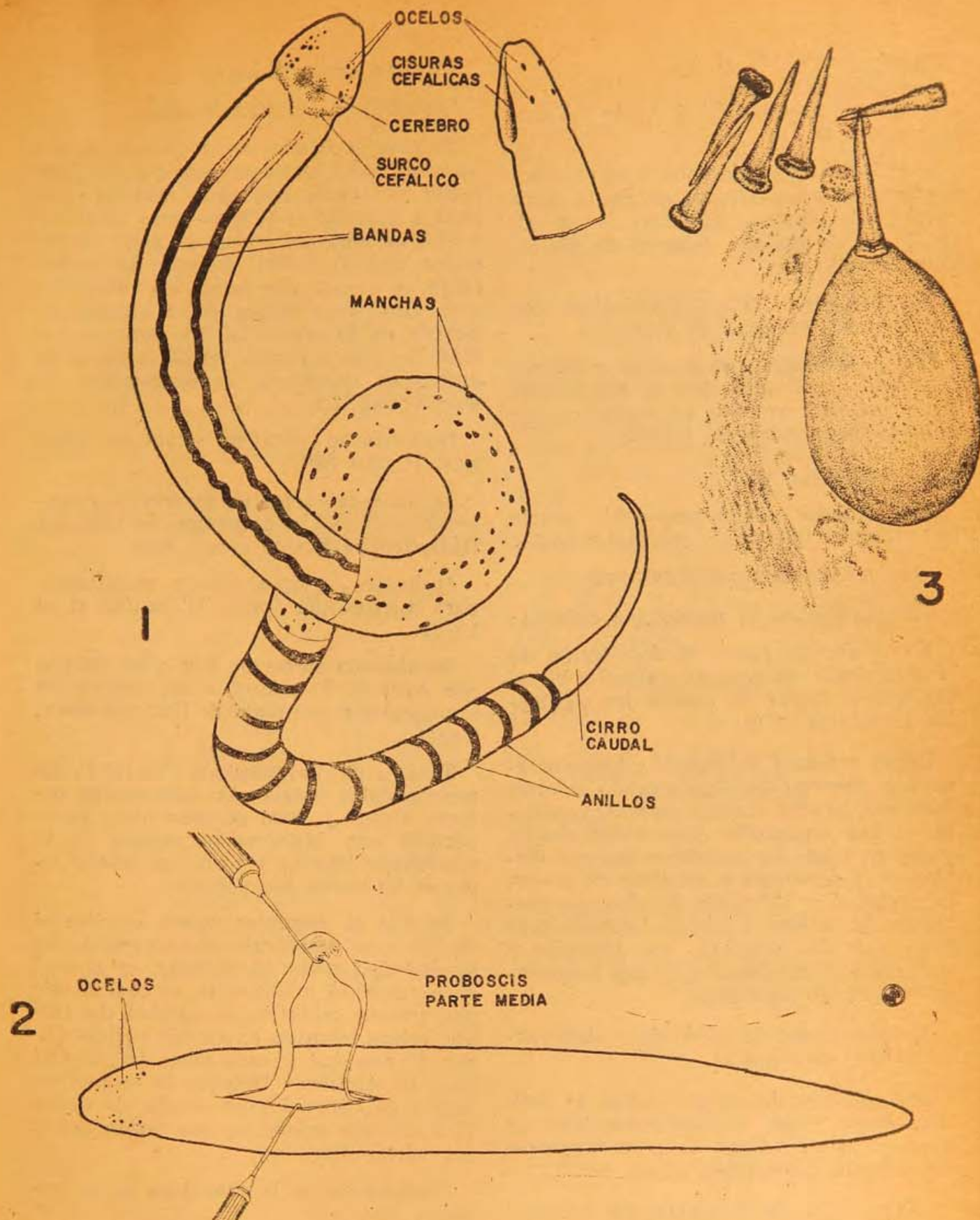
Fluido de BOUIN:

- 75 partes de ácido pícrico en solución acuosa,
- 25 partes de formalina, y
- 5 partes de ácido acético glacial.

El tiempo de fijación depende del tamaño del nemertino y varía entre cinco y veinticuatro horas. Después de fijados se preservan en alcohol de 70%, el que debe renovarse hasta que el color amarillo del ácido pícrico se pierda. No se obtuvo buenos resultados con este fijador porque los tejidos se endurecían mucho.

En fijador de KARNOWSKY modificado para incluir en epon blando:

Está constituido por:



Paraformaldehído al 4%.

Glutaldehído al 3%.

Buffer: Fosfato pH 7.4 0,1 m o Cacodrilato 0,1 m.

Se usó especialmente para incluir los nemertinos en epon blando, adaptado para microscopía óptica. (PUSCHEL et al. 1973). Se obtuvo una fijación de los tejidos satisfactoria.

En formalina MERCK pro-análisis solución al 9% en agua de mar:

Con la formalina pro-análisis se obtuvo excelentes resultados. No es recomendable el uso de formalina comercial porque provoca destrucción de tejidos.

En alcohol de 70°:

Este fijador es recomendable usarlo con animales que van a ser diafanizados.

ANÁLISIS MORFOLOGICOS

Observación de la morfología externa:

Es preferible hacer la descripción de la morfología externa en animales vivos, debiéndose tomar en cuenta los siguientes caracteres (Fig. 1):

Largo y forma del cuerpo; debe hacerse una descripción detallada de colores, manchas, bandas u otras marcas; establecer si hay separación clara entre cabeza y cuerpo o no. En la cabeza hay que distinguir la presencia o ausencia de ocelos, la cantidad y ubicación de ellos; la presencia de cisuras o surcos, teniendo presente que los primeros son laterales y profundos y que los surcos son transversales y menos marcados.

En el extremo terminal debe observarse si hay cirro caudal.

En animales de colores claros, se pueden observar por transparencia, algunos órganos internos como el cerebro, proboscis, gónadas, intestinos, vasos, etc.

Observación de la morfología interna:

Se realiza en cortes histológicos seriados de los animales o en ejemplares diafanizados "in toto".

Técnicas de inclusión:

Inclusión en gelatina MERCK.

Se pasa el fijador a un lavado de dos horas en agua corriente; enseguida se enjuaga dos veces con agua destilada; se pasa a gelatina al 10% en agua destilada a 37°C durante 24 horas; se pone en gelatina al 20% a 37°C durante 24 horas; luego se coloca dos horas en refrigerador. Una vez endurecido el bloque se guarda en formalina al 9% durante dos días. Se hacen cortes de 20 a 25 u de grosor en micrótopo de congelación, se monta y se tiñe.

Inclusión en parafina sólida de inclusión, P. 52 - 58°C.

Se hicieron cortes transversales y longitudinales de 7 u de grosor. Se tiñó con Hematoxilina-Eosina o con Azan.

Inclusión en epon blando modificado para microscopía óptica (PUSCHEL et al 1973).

Se hicieron cortes de 4 u y se tiñeron con Azul de Toluidina o con método de impregnación con plata de BIELCHOWSKY, CAJAL.

Técnica de diafanización "in toto". Es recomendable usarla con animales de colores claros y poco pigmentados, pues permite una observación general de la morfología interna pero no en detalle como en los cortes histológicos.

Se fija el ejemplar entero en alcohol de 70° y se deshidrata sucesivamente en alcohol de 70° por 15 minutos, en alcohol de 80° por 15 minutos, en alcohol de 95° por treinta minutos, en alcohol de 100° por treinta minutos, en alcohol de 100° III por 15 minutos y en alcohol de 100° III por 15 minutos. Después se coloca en Aceite de Cedro I y en Aceite de Cedro II hasta que aclare, lo que puede demorar varios días.

Observación de la armadura de la proboscis:

Los nemertinos pueden pertenecer a la clase Anopla o Enopla. Una de las características relevante de los nemertinos que

pertenecen a la clase Enopla, reside en que tienen una proboscis con armadura formada por una base, un estilete central y dos o más bolsas de estiletes accesorios. Si se disecan animales fijados es difícil ubicar los estiletes, debido a que se endurece la proboscis. También es difícil, reconstruir por observación de cortes histológicos la forma y el largo de la base y los estiletes.

La proboscis es larga y delgada, de color blanco o rosado y está formada por tres cámaras: una anterior que constituye la mayor parte de la trompa; la parte media que es la más corta y semeja un bulbo, en ella se encuentra el aparato estilífero, y la cámara posterior que es fina y delgada.

La armadura de los nemertinos Enopla puede observarse, usando algunas de las siguientes técnicas:

1. Se coloca una o dos gotas de agua de mar en un portaobjeto y encima el nemertino tapado por un cubreobjeto, que se sujeta con cera en sus ángulos para no aplastar el animal. En el momento de realizar la observación en el microscopio estereoscópico, por transparencia, se quita la cera y se comprime el ejemplar. Si el nemertino no ha estado largo tiempo comprimido puede devolverse al agua de mar.

2. Se separa de la muestra el ejemplar que se va a observar y se le añaden al agua de mar algunas gotas de alcohol de 70° para que el animal evierte la proboscis. Se observa la armadura por transparencia en el microscopio estereoscópico.

3. Disección de la armadura. Se coloca el nemertino, en lo posible anestesiado, en un portaobjeto con algunas gotas de agua de mar o cloruro de magnesio. Se hace una incisión con pinzas y agujas finas en la parte dorsal plano medio sagital, a nivel del tercio anterior. Se introduce la aguja y se levanta con ella la proboscis que semeja un hilo, se tira suavemente y se saca, separando la parte media de la proboscis, disecando, la base y los estiletes. La medición de esta estructura se hace en el microscopio sin cubreobjeto. (Fig. 2 y 3).

Esta última observación de la armadura lleva más tiempo, pero es la más adecuada, pues no se altera la forma ni el tamaño.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Prof. NIBALDO BAHAMONDE, del Museo de Historia Natural de Santiago, quien sugirió esta publicación y revisó el texto del trabajo.

BIBLIOGRAFIA

KIRSTEUEER, E.

1967. Marine benthonic Nemerteans: How to collect and preserve them. *Am. Mus. Novitates*. 2290:1-10.

MORETO, H.

1966. Una sustancia relajante para el phylum Nemertea. *Physis*, 26(71):224.

M. PUSCHEL, A. HERRERA y J. ALVAREZ

1973. A soft Epon for the rotary microtome. *Acta anat.* 84:71-75