

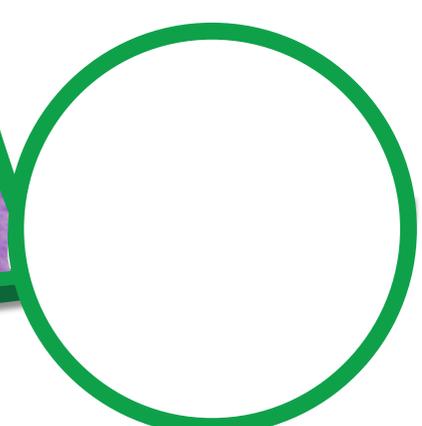
# Zoobentos y Fisiología de Organismos Acuáticos



Xochitl **Guzmán García**

Mayra Pamela

**Becerra Amezcua**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA

RECTOR GENERAL

Dr. José Antonio De Los Reyes Heredia

SECRETARIA GENERAL

Dra. Norma Rondero López

UNIDAD IZTAPALAPA

RECTORA DE UNIDAD

Dra. Verónica Medina Bañuelos

SECRETARIO DE UNIDAD

Dr. Javier Rodríguez Lagunas

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE C.B.S.

Dr. José Luis Gómez Olivares

COORDINADOR DE EXTENSIÓN UNIVERSITARIA

Dr. Juan José Ambríz García

JEFE DE LA SECCIÓN DE PRODUCCIÓN EDITORIAL

Lic. Adrián Felipe Valencia Llamas

Primera edición 2024

ISBN: 978-607-28-3325-8

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA

Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco, Núm. 186, Col. Leyes de Reforma 1 A Sección,  
Alcaldía Iztapalapa, C.P. 09310, Ciudad de México

Impreso y hecho en México/Printed in Mexico

## Índice

Prefacio	5
Introducción	7
Objetivo general	9
Evaluación de las actividades	9
Aspectos de seguridad e higiene a seguir en el laboratorio	9
Consideraciones bioéticas	9
Prácticas	11
1. Métodos de colecta (bentos)	11
2. Identificación de muestras biológicas (bentos)	19
3. Dispositivos para el mantenimiento de organismos marinos	27
4. Manejo de organismos acuáticos en dispositivos experimentales (moluscos, anémonas, pez ángel, pez cebra)	31
5. Análisis de células de defensa en organismos acuáticos	35
6. Pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ) como modelo experimental	41
7. Identificación taxonómica de anémonas de mar	45
8. Extracción del veneno de cnidarios.	53
9. Análisis de toxicidad del veneno de cnidarios en células sanguíneas de peces.	59
10. Macroinvertebrados indicadores de la calidad del agua	63
Anexo 1	69
Agradecimientos	73



## Prefacio

El presente material apoya la Unidad de Enseñanza Aprendizaje (UEA) Zoobentos, asignatura de la Licenciatura en Hidrobiología, la cual se imparte en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM Iztapalapa, así como la UEA optativa Fisiología de organismos acuáticos.

La identificación de los organismos es necesaria en estudios de biodiversidad, que, a su vez, forma parte de los estudios para la generación de medidas de conservación, remediación, manejo y explotación sustentable de las áreas costeras.

Se incluye bibliografía, láminas de identificación, claves de organismos y videos relacionados con el manejo de organismos acuáticos, su importancia y actividades de campo. El material, pretende que la información brinde apoyo en un tema tan amplio como es la biología de los organismos bentónicos.

El objetivo de este manual es familiarizar a los estudiantes con las comunidades de macroinvertebrados bentónicos, sin que sea un ejercicio taxonómico exhaustivo. La importancia radica en que facilita la ubicación de taxobentónicos que representan una de las comunidades más diversa y, además, representa una guía para el uso de claves específicas utilizadas en estudios taxonómicos más profundos. Este documento integra instructivos para el desarrollo de prácticas de laboratorio con organismos vivos y estudios post mortem.

El contenido de esta obra está enfocado a que los estudiantes adquieran habilidades en el trabajo de campo, manejo de animales de laboratorio y técnicas utilizadas para conocer respuestas fisiológicas tanto como por estresores físico-químicos como variaciones derivadas del cambio climático. Asimismo, dar a conocer la importancia biotecnológica de los organismos acuáticos que reside en sus principios bioactivos y proponerlos como modelos tanto en la investigación como en la docencia. Por otra parte, motiva a los estudiantes emplear un manejo ético mediante el control adecuado de los organismos, lo que permite conocer la etología y normatividad en el manejo de los organismos acuáticos.

Adicionalmente se incluyen cuestionarios y ejercicios digitales, con el propósito de que el estudiante realice una evocación de los diferentes ambientes o ecosistemas acuáticos y tenga así un aprendizaje significativo, redondeando sus conocimientos para que el tiempo del trimestre no sea un obstáculo para obtener la información, debido a lo ceñido del tiempo.

El análisis de la información permitirá que los estudiantes desarrollen un criterio que les permita generar una opinión profesional acerca de los organismos acuáticos, su fisiología, su importancia ecológica y utilizarlos como modelos para el biomonitoreo ambiental.



## Introducción

El ambiente bentónico es una de las comunidades más diversas tanto por las relaciones de los organismos como por las interacciones que establecen con el substrato, los factores fisicoquímicos y la dinámica de las olas.

Una gran cantidad de organismos, invertebrados y vertebrados forman parte del bentos, por lo que reconocer los principios de desarrollo y sus niveles de organización nos conducen a una mejor comprensión de su clasificación y filogenia de estos animales. Las características taxonómicas son tan específicas para los phyla que puede ser un ejercicio exhaustivo si no se tiene la preparación adecuada, la utilización de claves de los principales grupos son una herramienta que facilita su reconocimiento, pero además permiten que el Biólogo o Hidrobiólogo pueda plantear objetivos diferentes de los taxonómicos.

La familiarización rápida con los grupos que conforman una comunidad bentónica permite la utilización de organismos indicadores o grupos claves en la evaluación de agentes contaminantes o disturbios de un ecosistema.

En nuestro país y en el mundo, el estudio de los organismos bentónicos tiene un creciente interés debido a la riqueza de organismos y a sus propiedades que los hacen objeto de líneas de investigación novedosas. La preservación y el cuidado de la biodiversidad es un reto para las generaciones actuales y futuras. Diferentes textos refieren sobre las características de estos organismos, existe información especializada que da cuenta de los grupos taxonómicos e información utilizando a los organismos bentónicos como bioindicadores para evaluar la contaminación y la vulnerabilidad de los sistemas, sin embargo, la UEA de zoobentos y Fisiología de organismos acuáticos se circunscribe a un período corto que dificulta el análisis de todos los tópicos. El principal objetivo de esta obra es guiar y dar información para que los alumnos encuentren métodos y técnicas de análisis para proponer estudios fisiológicos, ecológicos y biotecnológicos que den cuenta de la importancia de los organismos bentónicos.



## Objetivo general

Que el estudiante adquiera habilidades en las actividades de campo; manejo de organismos bentónicos; identificación taxonómica y uso de la biodiversidad bentónica como modelo de investigación y docencia. Así mismo, al elaborar reportes del trabajo realizado en campo generará información que permita la integración del conocimiento a niveles fisiológico, ecológico, biotecnológico, así como de preservación y uso sostenible de los organismos bentónicos.

## Evaluación de las actividades

Será indispensable la asistencia del estudiante, participando activamente, elaborar los reportes de las prácticas de laboratorio, así como de los ejercicios, actividades y cuestionarios que el profesor indique.

## Aspectos de seguridad e higiene a seguir en el laboratorio

Este manual se ajusta al Instructivo del Funcionamiento Interno y Operativo para Regular el Uso de los Servicios e Instalaciones Laboratorios de Docencia aprobado en la sesión 471 del Consejo Académico celebrada el 26 de abril de 2021. Así como el Instructivo de Funcionamiento Interno y Operativo para Regular el Uso de los Servicios e Instalaciones de los Laboratorios de Investigación (aprobada en la sesión 498 del Consejo Académico celebrada el 27 de octubre de 2022). Será por lo tanto obligatorio dar cumplimiento a los reglamentos correspondientes.

## Consideraciones bioéticas

Las prácticas propuestas en este manual consideran el programa y los lineamientos éticos del PIMVS (Predio e Instalación para el Manejo de la Vida Silvestre); CIDMIRA (Centro de Investigación y Docencia para el Manejo Integral de los Recursos Acuáticos); UAM-I (permiso SEMARNAT 09/LR-0900/11/17), así como los principios de la bioética incluidos en los Lineamientos para la Conducción Ética de la Investigación, Docencia y Difusión de la División de Ciencias Biológicas y de La Salud 2010 de la UAMI, los cuales pueden ser consultados en la siguiente liga:

<https://cbs.izt.uam.mx/index.php/comision-academica-divisional-de-etica>



# Práctica 1. Métodos de Colecta (bentos)

## Introducción

Los organismos bentónicos son los que se encuentran sobre o en estrecho contacto con la región del fondo de los cuerpos de agua. El ambiente bentónico es una de las comunidades más diversas, tanto por las relaciones entre los organismos como por las interacciones que establecen con los factores condicionantes (el sustrato, los factores fisicoquímicos y la dinámica de olas) que definen el establecimiento de las especies biológicas. El ambiente bentónico se divide en una serie de zonas ecológicas distintivas según la profundidad, la topografía del fondo marino y los gradientes verticales de los parámetros físicos. Estas son las zonas supralitoral, litoral, sublitoral, batial, abisal y hadal (Fig.1).

El número de especies animales bentónicas superan al de especies pelágicas, debido a la mayor variedad física de los hábitats bentónicos. Por esta razón, las especies benthicas desarrollan características morfológicas y fisiológicas dependiendo del medio en el que se encuentren, en consecuencia, se pueden observar comunidades de diferente tamaño, movilidad, posición, incluso, se pueden observar comunidades que se distribuyen con relación al oleaje y tipo de sustrato.

Los animales bentónicos se dividen en especies infaunales y epifaunales, dependiendo de si viven dentro de los sedimentos o en la superficie del fondo marino, respectivamente. Las categorías de tamaño del zoobentos consisten en el macrobentos ( $>500 \mu\text{m}$ ), meiobentos ( $< 500 \mu\text{m}$  y  $> 63 \mu\text{m}$ ) que se encuentra característicamente en arena y barro, y el microbentos ( $< 63 \mu\text{m}$ ) que está compuesta principalmente por protozoos.

Existen comunidades de fondos rocosos, de fondos blandos (características de los estuarios), del fondo de la plataforma continental, taxabentónicas asociadas a comunidades de pastos marinos, a comunidades de arrecifes de coral (costeros, de barrera, atolones), organismos que conforman la vida en la zona abisal y la comunidad bentónica modificada por la contaminación y el cambio climático, estas comunidades han sido ampliamente recomendadas como bioindicadoras en estudios de biomonitoreo de la contaminación.

La distribución de los organismos en su hábitat se establece mediante un estudio de campo que tiene como objetivo ubicar a los organismos que se encuentran en las comunidades. Para resolver esto, se deben considerar los diferentes métodos de muestreo e incluso, la combinación de ellos. La recolecta de los organismos bentónicos depende de la región que se pretenda trabajar y el tipo de sustrato. Las muestras biológicas deben cumplir con una serie de características básicas para ser representativas de la comunidad en cuestión. Al realizar la recolecta se deben registrar datos de la localización geográfica y parámetros fisicoquímicos del sitio de recolecta del hábitat de interés y registrar datos cualitativos y cuantitativos (área, volumen, colores, peso, etc.). Para el muestreo son de uso común los cuadrantes y los transectos en banda, en línea y a lo largo de un perfil, así como los sistemas de coordenadas y de distancia entre dos puntos. El equipo para la colecta puede consistir en dragas, redes de arrastre, nucleador y tamicos (Fig. 2). Algunos estudios recientes, han modificado los métodos de colecta para comprender la ecología del bentos y, han generado conocimiento sobre la importancia, el potencial biotecnológico y la vulnerabilidad.

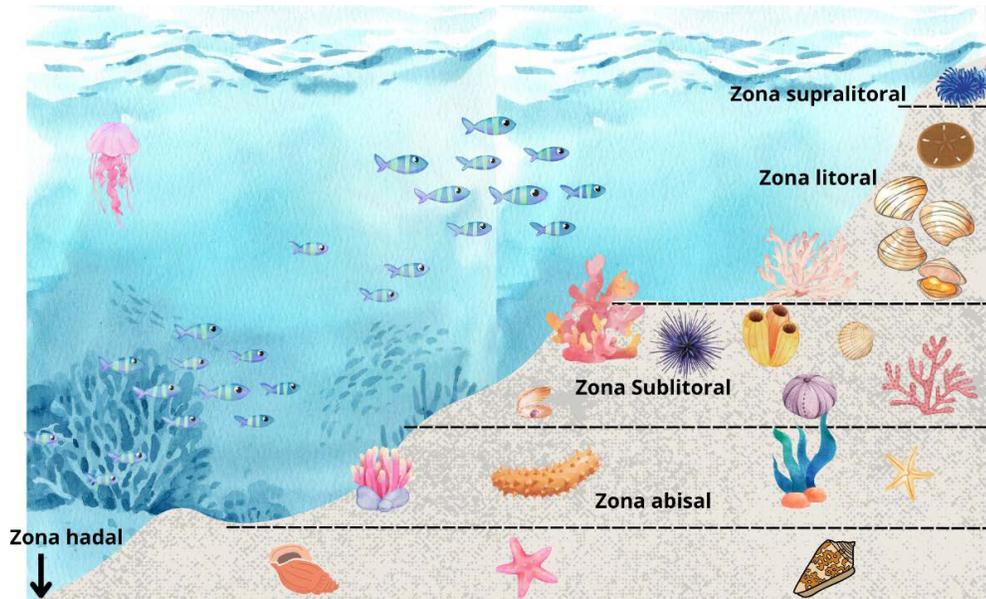


Fig 1. Representación de la influencia de la profundidad en el establecimiento de las comunidades bentónicas (zonación del ambiente bentónico).

## Métodos de colecta: bentos

### Cuadrantes

Son estructuras rígidas en forma de cuadrado, existen de diversos tamaños. Se colocan al azar sobre un área homogénea que se desea muestrear.

Se puede colectar infauna y epifauna, ej. algunos gasterópodos, bivalvos.

### Transectos

Se utiliza principalmente en sustratos duros arrecifales y rocosos.

Consiste en trazar una línea a lo largo del área a muestrear para tomar muestras a intervalos generalmente de 1 m.

Se puede colectar infauna y epifauna, ej. Ostiones, esponjas.

### Nucleadores manuales

Estructuras cilíndricas huecas el cual un extremo puede ser tapado herméticamente.

Se obtienen una muestra cuantitativa, replicable y con mínima perturbación y solo se puede usar en áreas muy someras.

Se puede colectar infauna y epifauna, ej. Algunos crustáceos, poliquetos.

### Redes de patín

Se desliza sobre el fondo semejando un trineo, los organismos son capturados en el copeo al final de la red.

Capturan epifauna móvil, útil para capturar pequeños crustáceos presentes en grandes cantidades.

### Redes de mariposa

Utilizadas en áreas someras o a profundidades que permiten el muestreo con buceo autónomo.

Capturan fauna pequeña y móvil. Se pueden capturar camarones, peces, bivalvos.

### Dragas

Hay diferentes tipos. Se utilizan en ambientes profundos.

Se obtienen muestras cuantitativas, replicables.

Se recolecta crustáceos, poliquetos, bivalvos, gasterópodos, nematodos.

### Envenenamiento y explosivos

Se emplean para la extracción de la fauna asociada al coral la cual captura a todos los organismos sin embargo es una técnica muy destructiva. Método no autorizado por la FAO [Hampton-Smith M., et al. 2021]. Se pueden capturar esponjas, corales.

### Nucleador múltiple

Toma muestras (llamadas también núcleos) del lecho marino, a profundidades de hasta 4500 metros. Los cilindros forman un círculo de aproximadamente un metro 20 centímetros de diámetro, lo que permite tomar las muestras in situ.



Fig 2. Algunos métodos de colecta utilizados en la colecta de organismos bentónicos.

## Objetivo

Identificar los diferentes métodos de muestreo para grupos de organismos zoobentónicos, así como su separación y procesamiento.

## Materiales

- 1 vaso de precipitado de 1 L
- 1 probeta de 1 L
- 1 matraz de 2 L
- 1 piseta de agua
- 1 piseta de alcohol
- 2 pinzas de disección
- 1 aguja de disección
- 1 bisturí
- 5 cajas Petri
- 1 charolas de disección
- 5 etiquetas de papel albanene

## Reactivos (para el grupo)

- 10 L Alcohol
- 5 L Formaldehído (para todo el grupo)
- 10 L Agua destilada

## Equipo

- 3 tamices de diferente diámetro; No. 18 (1 mm), No. 25 (0.71 mm), No. 30 (0.59 mm), No. 35 (0.50 mm), No. 60 (0.25 mm).
- 1 microscopio óptico
- 1 microscopio estereoscópico
- 1 red tipo cuchara

## Muestras biológicas

- Porífera - Esponjas
- Annelida - Poliquetos
- Cnidaria - Anémona
- Mollusca - Almeja
- Echinodermata - pepino de mar

## Procedimiento

### Método de colecta

Reconocer las características de la red tipo cuchara, así como el número y diámetro del tamiz proporcionado. Posteriormente, coloque las muestras biológicas en el tamiz de preferencia utilizando una pinza. Lave suavemente en el chorro de agua. Registre los datos de colecta y el método empleado (seleccione el método de muestreo apoyándose en la Tabla 1).

### Preservación y etiquetado

Elabore una etiqueta interna y externa para la muestra biológica (Fig. 3). Las etiquetas deben contener la siguiente información: lugar de procedencia, colector, fecha de colecta, número de ejemplares, método de muestreo, y una clave (puede asignar la clave con los siguientes datos; Número de la muestra (deberá ser consecutivo) con tres dígitos; lugar de colecta.; sitio o Punto de muestreo, tipo de muestra, fecha (día, mes y año con 4 dígitos).

Ejemplo de clave: 001.PM\_01.Echinodermata.CI.Holoturoidea.Tecolutla,Ver.\_04052024.

Coloque una etiqueta interna y una externa (el rotulado de la etiqueta debe ser escrito con lápiz, ya que tanto en la fijación como durante el mantenimiento se utilizan solventes). Cada grupo de organismos requiere una solución para la sedación, fijación y conservación (tabla 2). Dependiendo del espécimen, es necesario saber qué fijador se utilizará (la cantidad y el tiempo requerido). Prepare en la campana de extracción 2 L de solución fijadora de formalina amortiguada 10% ( Fig.4 anexo 1) y 2 L de alcohol al 70% como solución conservadora. Revise cuidadosamente el frasco que contiene la muestra biológica, para darle mantenimiento, revise que la solución no esté turbia, y en caso contrario sustitúyala. El espécimen debe estar fijado y/o conservado con la solución adecuada, en 5-10 veces su propio volumen.

Institución	UAM-I
Clave o número de muestra	001.PM01.cnidario_akurqroo.160901
Lugar de colecta	Akumal, Quintana Roo *GEOPOSICION
Fecha de colecta	16/Octubre/2001
Colector	Desconocido
Conservador	Alcohol al 47%
Datos taxonómicos	Cnidaria
Números de organismos	1
Fecha de mantenimiento	30/Septiembre/2016
Responsable de mantenimiento	Dulce Maldonado, Laboratorio de Zoobentos
Observaciones y Recomendaciones	Realizar mantenimiento en tres meses (cambiar el conservador), realizar tamizaje para desechar restos. Datos adicionales T2, C3, C10cm.

Fig 3. Formato sugerido para la elaboración de una etiqueta

Tabla 1. Principales métodos de colecta para organismos bentónicos.

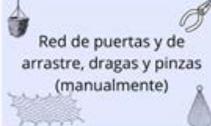
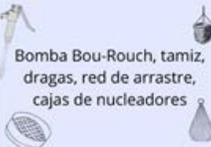
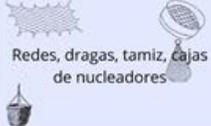
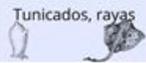
Phylum	Grupos representativos	Características distintivas	Clasificación bentónica	Método de colecta
Porifera	Esponjas 	Coanocitos	Epibentos, pivotante	Dragas, red de arrastre y pinzas (manualmente) 
Cnidaria	Anémonas y corales 	Nematocistos	Megabentos, Epibentos, Endobentos, Sésil, Pivotante	Red de puertas y de arrastre, dragas y pinzas (manualmente) 
Platyhelminthes	Planarias, tremátodos, céstodos 	Cuerpo aplanado	Meiobentos	Bomba Bou-Rouch 
Nematoda	Nemátodos 	Cuerpo redondeado	Meiobentos	Bomba Bou-Rouch, cajas de nucleadores 
Annelida	Poliquetos, oligoquetos, sanguijuelas, equiúridos, gusanos tubícolas 	Segmentación	Meiobentos, macrobentos, endobentos, sésil, sedentario, vágil, cavador, taladrador	Bomba Bou-Rouch, tamiz, dragas, red de arrastre, cajas de nucleadores 
Mollusca	Caracoles, almejas, ostras, quitones 	Pie, manto, rádula	Macrobentos, megabentos, epibentos, endobentos, Sésil, vágil y cavador	Redes, dragas, tamiz, cajas de nucleadores 
Arthropoda	Crustáceos 	Exoesqueleto	Macrobentos, megabentos, epibentos y cavador	Redes, dragas, cajas de nucleadores 
Ectoprocta	Bryozoos 	Lofóforo, coloniales	Sésil	Dragas 
Phylum	Grupos representativos	Características distintivas	Clasificación bentónica	Método de colecta
Echinodermata	Estrellas de mar, pepinos de mar, ofiuroideos, erizos de mar 	Pentamerismo, sistema vascular acuifero	Megabentos, endobentos, sedentario, vágil	Redes, dragas, cajas de nucleadores 
Chordata	Tunicados, rayas 	Notocorda	Megabentos, epibentos	Redes, dragas y tamiz 

Tabla 2. Soluciones utilizadas durante la sedación, fijación y conservación de organismos acuáticos.

Grupo de organismos	Anestésico	Solución fijadora	Medio de conservación	Fuente bibliográfica
<p>Porifera</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Se recomienda el secado de las muestras</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Alcohol 50% (por 38h o por 12 h), transfiriéndolas 12 h en alcohol 70%</li> <li>Formol 10%, poco recomendado</li> <li>Alcohol absoluto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Alcohol 70%</li> <li>En seco</li> <li>Formol 10%</li> </ul>	<p>Molilla, 1992; Gaviño et al., 1979; Aladro-Lubel, 1992; Darrigan et al., 2007.</p>
<p>Cnidaria</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Painodol</li> <li>Nicotina</li> <li>Solución Gray</li> <li>Solución cloruro/magnesio 10%</li> <li>Por congelación</li> <li>Con cristales de Mentol</li> <li>Hidrato cloral</li> <li>Sales de sulfato</li> <li>Formol 10% (unas gotas)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Formol 5-10%</li> <li>Bouin</li> <li>Alcohol 70%</li> <li>Solución buffer de formol al 5-10% con agua del medio</li> <li>Alcohol 70%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Alcohol 30-70%</li> <li>Hipoclorito Potásico 50%</li> <li>Formol neutro 5%</li> <li>Bouin</li> </ul>	<p>Molilla, 1992; Gaviño et al., 1979; Aladro-Lubel, 1992.</p>
<p>Cnidaria, Hidrozoos</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sales de sulfato de magnesio que se agregan periódicamente (cada 20 minutos) al agua del medio durante varias horas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Formol al 5%</li> <li>Bouin</li> <li>Alcohol 70%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Alcohol 70%</li> </ul>	<p>Darrigan et al., 2007</p>
<p>Cnidaria, Cubozoos y Escifozoos</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>No se requiere anestesia previa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Los Escifozoos pelágicos deben ser fijados en formol al 20% y conservados en el mismo medio diluido a la mitad</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Las Estauromedusas se transfieren directamente al conservante (formol 10% o alcohol 70%)</li> </ul>	<p>Darrigan et al., 2007</p>
<p>Cnidaria, Antozoos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aceite de clavo o cloretona, o dejar que se insensibilicen de forma natural a medida que se acumulan las sustancias tóxicas y se agota el oxígeno del medio.</li> <li>Los corales blandos hay que narcotizarlos previamente igual que se hace con las anémonas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Para fijar anémonas, una vez que el animal queda insensible, se añade formol hasta obtener una disolución al 5%.</li> <li>Los corales blandos se fijan en formol neutro durante 15 minutos, posteriormente se dejan secar en sitio sombreado. Para que queden más limpios se mantienen en agua durante varios días y se lavan a presión</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Los corales blandos se incluyen en una disolución blanqueadora (lejía comercial al 10%), se enjuagan repetidamente y se dejan secar. También pueden conservarse en medio líquido (formol neutro 5%, alcohol 70%)</li> </ul>	<p>Darrigan et al., 2007</p>
<p>Macrofauna y meiofauna (poliquetos, nemátodos, moluscos, etc.)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cloruro de Magnesio al 10%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Formol al 4 %</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Las muestras de sedimento para analizar macrofauna son tamizadas usando una abertura de malla de 500 µm, mientras que para analizar muestras de meiofauna el tamiz es de 63 µm.</li> <li>Después las muestras son preservadas en alcohol al 70%</li> </ul>	<p>Abbott, 1974; Ortiz et al., 2004; de León-González et al., 2009.</p>

## Instrucciones para el registro de resultados

### Método de colecta

Registre las características de la red tipo cuchara, así como el número y diámetro del tamiz proporcionado.

### Preservación y etiquetado

Registre los datos y material utilizado para la etiqueta interna y externa de las muestras biológicas trabajadas, la clave asignada, fecha de mantenimiento, solución empleada y persona responsable del mantenimiento. El alumno deberá registrar los cálculos de soluciones porcentuales: Ejemplo: alcohol 70%, formol 10% a partir de reactivos de laboratorio.

Anexo 1	
Solución de formalina neutra al 10% estabilizada	
Formaldehido 37%-40%	100.0 mL
Agua destilada	900.0 mL
Fosfato de sodio monobásico	4.0 g
Fosfato de sodio dibásico(anhidro)	6.5 g
Almacene en un recipiente propiamente rotulado. Rotule como una sustancia química peligrosa.	

Fig 4. Ficha descriptiva de las soluciones empleadas para la preservación de los organismos

### Indicaciones para el desarrollo del informe o reporte

Realice una infografía: “Colecta y mantenimiento de los organismos bentónicos”. Incluya la información del método de colecta (del tamiz utilizado en la práctica), aspectos relevantes de la **preservación y etiquetado** (las características de la etiqueta que utilizó, la solución de conservación utilizada), y una ficha descriptiva (ejemplo en la Fig. 5. imagen del organismo, escala, ubicación taxonómica) de los organismos observados.



**Casa abierta al tiempo**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
**METROPOLITANA**



**Nombre científico:** *Bunodosoma* sp. **Nombre común:** Anémona







**Diagnosis:** Anémona con disco pedio para sujetarse. Regularmente con vesículas uniformes redondeadas con nematocistos. Estructuras musculares desarrolladas. Tentáculos y mesenterios dispuestos de forma hexámera. De color rojo a naranja en la base (columna) y de blanco a rojizo en los tentáculos.

**Origen:** Tecolutla, Veracruz

**Fecha:** 2021-2023

**No. organismos:** 12

**Tipo de alimentación:** Zooplancton líquido

**Cantidad de alimento:** 0.75 ml p/organismo

**Parámetros fisicoquímicos:**

Salinidad: 35 ppm

Temperatura: 27 °C

pH: 8

Amonio: 0 mg/L

Oxígeno disuelto: 6 mg/L

Permiso SEMARNAT: 09/LR-0900/11/17



**CIDMIRA**

Fig 5. Ficha descriptiva de los organismos bentónicos

## Cuestionario

1. ¿Qué método de colecta puede utilizar en zona de pastos marinos?, justifique su respuesta
2. Proponga un método de colecta para la fauna asociada a fondo blando. Justifique su respuesta
3. ¿Cómo se realiza la anestesia y preservación de crustáceos (elijan un ejemplo)?
4. ¿Cuál es la diferencia entre preservación y conservación de muestras?

## Bibliografía

-  Harasewych, M. G., & Moretzsohn, F. (2014). The book of shells: a life-size guide to identifying and classifying six hundred seashells. University of Chicago Press, 656 p.
-  Koagouw, W., Stewart, N. A., & Ciocan, C. (2021). Long-term exposure of marine mussels to paracetamol: is time a healer or a killer? Environmental Science and Pollution Research International, 28(35), 48823–48836 p. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14136-6>.
-  Museo de Historia Natural Métodos de colecta, identificación y análisis de comunidades biológicas: plancton, perifiton, bentos (macroinvertebrados) y necton (peces) en aguas continentales del Perú / Departamento de Ictiología. (2014). Lima- Ministerio del Ambiente. Lima Perú. pp 39–45.
-  Ortiz, M., Martín, A., & Yusbelly, J. (2007). Lista y referencias de los crustaceos anfípodos (Amphipoda: Gammaridea) del Atlántico occidental tropical. Rev. Biol. Trop, 55(2), pp 479–498.
-  Ortiz, M., Martín, A., Winfield, I., Díaz, Y., & Atienza, D. (2004). Anfípodos (Crustacea: Gammaridea). Clave gráfica para la identificación de las familias, géneros y especies marinas y estuarinas del Atlántico occidental tropical. Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF.
-  Ravinesh, R., & Kumar, A. B. (2022). Collection, preservation, and documentation of estuarine and marine benthic invertebrates. In Prince S. Godson, Salom Gnana Thanga Vincent and S. Krishnakumar. Ecology and Biodiversity. Elsevier.(pp. 33-82). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821161-8.00007-6>
-  Solís, W. S., Hernández, P. A., & Solís, F. A. (2000). Muestreo de bentos. In Métodos de Muestreo en la Investigación Oceanográfica. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología (pp. 357-398). Universidad Nacional Autónoma de México. México.136 p.
-  Walag, A. M. P. (2022). Understanding the World of benthos: an introduction to benthology. In Ecology and Biodiversity of Benthos Elsevier. pp. 1-19.

## Material de apoyo (videos)

Aquabiósfera SAS. (10 de febrero de 2018). AQUABIÓSFERA. MUESTREO DE FONDOS BLANDOS Sedimentos y Bentos. Caribe, Colombia [Archivo de Vídeo]. <https://www.youtube.com/watch?v=v2geOmKq26g>.

Wageningen Marine Research. (20 de marzo de 2018). Características de los animales bentónicos marinos [Archivo de Vídeo]. <https://www.youtube.com/watch?v=nqzHL59pWQU>

## Práctica 2. Identificación de muestras biológicas (bentos)

### Introducción

La identificación de organismos es un trabajo difícil que requiere un conocimiento previo de las características generales de las especies y así ubicarlos en su grupo taxonómico. Para esta tarea existen claves taxonómicas que proveen de una guía que permite analizar las características generales de los grupos, así como claves especializadas por grupos taxonómicos específicos.

Recientemente se han actualizado guías para el uso de animales en laboratorios incluyendo los animales acuáticos, donde se reconoce que existen diferentes necesidades, ya que, los grupos son tan diversos como el número de especies. De acuerdo con el Registro Mundial de Especies Marinas (WORMS por sus siglas en inglés) existen aproximadamente 2 912 especies marinas registradas en nuestro país en donde la taxonomía es una disciplina fundamental para determinar estas especies, para ello se requieren colecciones de historia natural que documenten la biodiversidad regional.

La taxonomía es muy relevante para la bioconservación ya que permite la delimitación de las especies de manera estable, consiente y explícita; para esto la Convención de la Diversidad Biológica (CDB) generó acuerdos multinacionales orientados a preservar la biodiversidad, que comprende tres niveles de organización (genética, de especies y de comunidades o ecosistemas).

En los mares de Latinoamérica no hay una estimación actualizada en lo que respecta a la biota béntica y una gran parte del tiempo del taxónomo se consume en revisar problemas de nomenclatura, muchos de los nombres han sido considerados como sinónimos menores y quizá no lo sean, por lo que es importante adiestrar a los alumnos a usar estas guías taxonómicas que permitan en un futuro crear información de calidad de los organismos bentónicos en nuestro país.

### Objetivo

Identificar las características generales de muestras biológicas conservadas y su grupo taxonómico.

### Materiales

- 1 Piseta de agua
- 1 Piseta de alcohol
- 1 Regla de 30 cm
- 2 Pinzas de disección
- 1 Aguja de disección
- 5 Cajas Petri
- 1 Charolas de disección
- 5 Etiquetas de papel albanene

### Reactivos

- 2 L Alcohol 70 %
- 1 L Agua destilada

## Equipo

- 1 Tamiz de cualquier número
- 1 Microscopio estereoscópico

## Muestras biológicas

- Porifera - Esponjas
- Annelida - Poliquetos
- Cnidaria - Anémona
- Mollusca - Almeja
- Echinodermata - pepino de mar

## Procedimiento

### *Identificación y análisis de las muestras biológicas.*

Utilizando una charola de disección observe las características biológicas de la muestra y ubique su grupo taxonómico (apoyándose en la clave de los principales organismos acuáticos, APHA, 2011) (Tabla 1 y Fig 1).

### *Clave de los principales grupos de organismos acuáticos.*

Para el reconocimiento de los organismos se sugiere la utilización de la clave APHA (2011) (Tabla 1), posteriormente puede consultar las láminas de identificación para los grupos de macroinvertebrados bentónicos (Fig 1).

Comienza en la opción 13a de las claves, eligiendo una de las opciones. Ubica el número del enunciado indicado al final de la descripción elegida y repita el proceso, continúe hasta que el nombre de un organismo o el número de una lámina aparezcan en la clave.

## Instrucciones para el registro de resultados

### *Identificación y análisis de las muestras biológicas.*

Registre las características biológicas de la muestra y su grupo taxonómico, color, tipo de simetría, características anatómicas, etc. Realice un dibujo o ficha de los taxabentónicos analizados (documentado bibliográficamente). Obtenga un dato cuantitativo, puede ser número de organismos, peso, longitud etc.

## Indicaciones para el desarrollo del informe o reporte

### **Identificación y análisis de las muestras biológicas.**

Elabore una tabla de los taxabentónicos revisados e incluya los siguientes datos: Phylum, clave de la muestra, nombre científico. También realice una ficha descriptiva con la imagen de la muestra analizada, sus datos cuantitativos, su nombre científico y común, así como la descripción anatómica resumida. Por último, diseñe una clave para los organismos revisados en la práctica. Podrá encontrar ejemplos en la Tabla 2 y 3.

Tabla 1. Traducción de la clave APHA (2011).

2A- Clave para organismos macroscópicos	
1ª Macroscópico: El organismo, masa o colonia, visto a simple vista	13
13 b.- Unidad bien organizada o colonia	14
14 a.- Organismos como plantas, estructuras florales, sí presentan, no responden al ser tocadas, generalmente son sombreadas de color verde, café o rojo	16
14 b.- Organismos como animales; usualmente responden al ser tocados, ya sea sésiles o de vida libre	15
15 a.- Presenta notocorda interna (vertebrados)	17
15 b.- No presenta notocorda interna (macroinvertebrados) *	18
16 a.- Estructura de planta relativamente simple, pueden presentar estructuras sujetas, pero no raíces reales o tejidos fibrosos. Algas largas, (Nitella, Chara y Batrachospermun)	
16 b.- Estructuras de plantas, usualmente incluyen raíces verdaderas, troncos y hojas fibrosas o tejido vascular presente; pueden observarse flores o semillas. <b>Plantas superiores</b>	
17a.- Apéndices laterales, si presenta, son planos. <b>Peces</b>	
17b.- Apéndices laterales, si presenta, son en forma de pie, con dígitos separados. <b>Anfibios</b>	
2B. Clave para macro invertebrados	
18 a.- Cuerpo bilateral simétrico (con lados izquierdo y derecho, pero pueden ser superficialmente enrollados como espiral). Animales usualmente no sujetos, pero pueden vivir dentro y sujetos a un huevo o carcasa, o se arrastran, usualmente solitarios	23
18 b.- Simetría no bilateral	19
19 a.- Cuerpo típicamente de simetría radial	21
19 b.- Cuerpo o colonia no simétrica	20
20 a.- Cuerpo generalmente poroso; no una colonia, algunas veces con cuernos o dedos. Representantes en agua marina y una sp de agua dulce son frágiles, color verde o café; formas marinas con colores fuertes, varios colores. Esponjas ( <b>Porifera</b> ). Lámina 1)	
20 b.- Cuerpo de otro modo	22
21 a.- Animales con cuerpos suaves refinados y tentaculados alrededor de la boca; sin ano. Solitarios o coloniales. Largas colonias que tienen usualmente esqueleto rígido, fuerte, ramificado, o forma de abanicos. Hydras anémonas; Medusa, corales; etc. ( <b>Cnidaria</b> ). Lámina 2)	
21 b.- cuerpo cubierto usualmente por espinas, suave a rígido, aplanado o elongado, típicamente tienen 5 radios, con o sin espinas o brazos; presentan ano, solitarios, marinos solamente, estrellas, pepinos de mar, erizos, galletas de mar, abanicos de mar ( <b>Echinodermata</b> ). Lámina 3	
22 a.- Colonia una masa suave, una red de ramas tubulares, una planta con penacho, o una entrelazada, en forma de costra o masa. Animales musgos. ( <b>Ectoproctos o Briozoa</b> ). Lámina 4	
22 b.- Exclusivamente marino. Superficie del cuerpo o colonia relativamente fina a gruesa. Formas solitarias, como sacos, con 2 aberturas externas. Exhiben todos los grados de colonialismo. Compuestos por alineaciones de masas viscosas, con organismos arraigados o abrazados a pequeños patrones radiales, masas sin forma semejándose a una gelatina congelada. Jeringas marinas, puercos ( <b>Asciidae, Urochorda, Chordata</b> ).	
23 a.- Animal que vive dentro de una concha, con cuerpo suave (Mollusca). Lámina 5, 8, 9	29
23 b.- Animal sin concha	24
24 a.- Apéndice locomotor presentes (pueden no funcionarle) el cuerpo puede ser duro o suave	30
24 b.- Ausencia de apéndices, cuerpo cubierto suave, animal flexible (puede presentarse una capsula-cabeza)	25

<b>2B. Clave para macro invertebrados</b>	
25 a.- Cuerpo rodeado por anulaciones o arrugas a intervalos regulares, dividiendo a este en muchos pequeños segmentos, más enrollados que largos	26
25 b.- Presenta segmentos o sin ellos; si presenta, no muy enrollados, más bien largos	27
26 a.- Cuerpo con discos de succión en uno o ambos lados, de menos de 10 discos de largo. Sanguijuelas ( <b>Anelida, Hirudinea</b> ).	
26 b.- cuerpo sin discos de succión, de más de 10 veces el tamaño de estos discos, además, con pelos o cerdas evidentes. Gusanos segmentados ( <b>Annelida</b> ). Lámina 6	
26 c.- Organismos vermiformes, metaméricos (en etapa larvaria o adulta, con proboscis. Marinos bentónicos ( <b>Equiura, Sinpuncula</b> ). Lámina 7	
27 a.- Cuerpo sin segmentos	28
27 b.- Cuerpo segmentado, delgados. Moscas doble haladas ( <b>Diptera</b> ).	
28 a.- Cuerpo largo y delgado, parece refinado, igualmente tapado por un fino punto en el final. Gusanos redondos. ( <b>Nemátoda</b> ).	
28 b.- cuerpo plano; alargado u oblongo; puntos de pigmentos en la cabeza; además cabeza en forma de espada. Gusanos planos ( <b>Platelmintos, turbellaria</b> ). Lámina 10	
29a Concha con dos valvas con bisagra. Bivalvos (Pelecípoda) o conchas lámpara ( <b>Brachiopoda</b> ).	
29b concha entera, usualmente espiral. Caracoles ( <b>Gastropoda</b> ). Lámina 5	
30 a.- cuerpo con apéndices funcionales	31
30 b.- cuerpo sin apéndices funcionales, pupa o cápsula vive en un huevo. Pupa (Insecta).	
31 a.- cuerpo con 3 pares de apéndices, larvas, ninfas, adultos ( <b>Insecta</b> )	42
31 b.- Cuerpo con más de 3 pares de apéndices	32
32 a.- Cuerpo compacto, como araña, con cuatro pares de piernas (dos apéndices). Termitas de agua (Ácaros) o araña acuática (Pycnogonidea).	
32 b.- Cuerpo con 5 pares de apéndices, crustáceos (Crustácea). Lámina 11	33
32c cuerpo con cubierta dura; dividido en dos amplias cabezas, cuerpo truncado, y cola fina afilada (marino) cangrejo herradura ( <b>Arachnoidea</b> ).	
<b>4. Clave para Crustáceos</b>	
33a par compuesto de ojos en tallo.	34
33b par compuesto de ojos, si presenta, sésil	36
34a Caparazón, si presenta y no se fusiona con más de cuatro segmentos torácicos	35
34b Caparazón fusionado con todos los segmentos torácicos, presenta pinzas. ( <b>Decapoda</b> ).	
35a caparazón cubre la mayoría de los segmentos torácicos Mysidacea	
35b el caparazón se extiende sobre los segmentos anteriores de la región abdominal Leptostraca	
36a cuerpo aplanado horizontalmente	37
36b cuerpo aplanado lateralmente. ( <b>Anfípodos</b> ). Lámina 11	
37a el primer par de apéndices torácico tiene pinzas. Tanaidacea.	
37b el primer par de apéndices torácicos son puntiagudos y similares a todos los apéndices torácicos. Isopoda.	

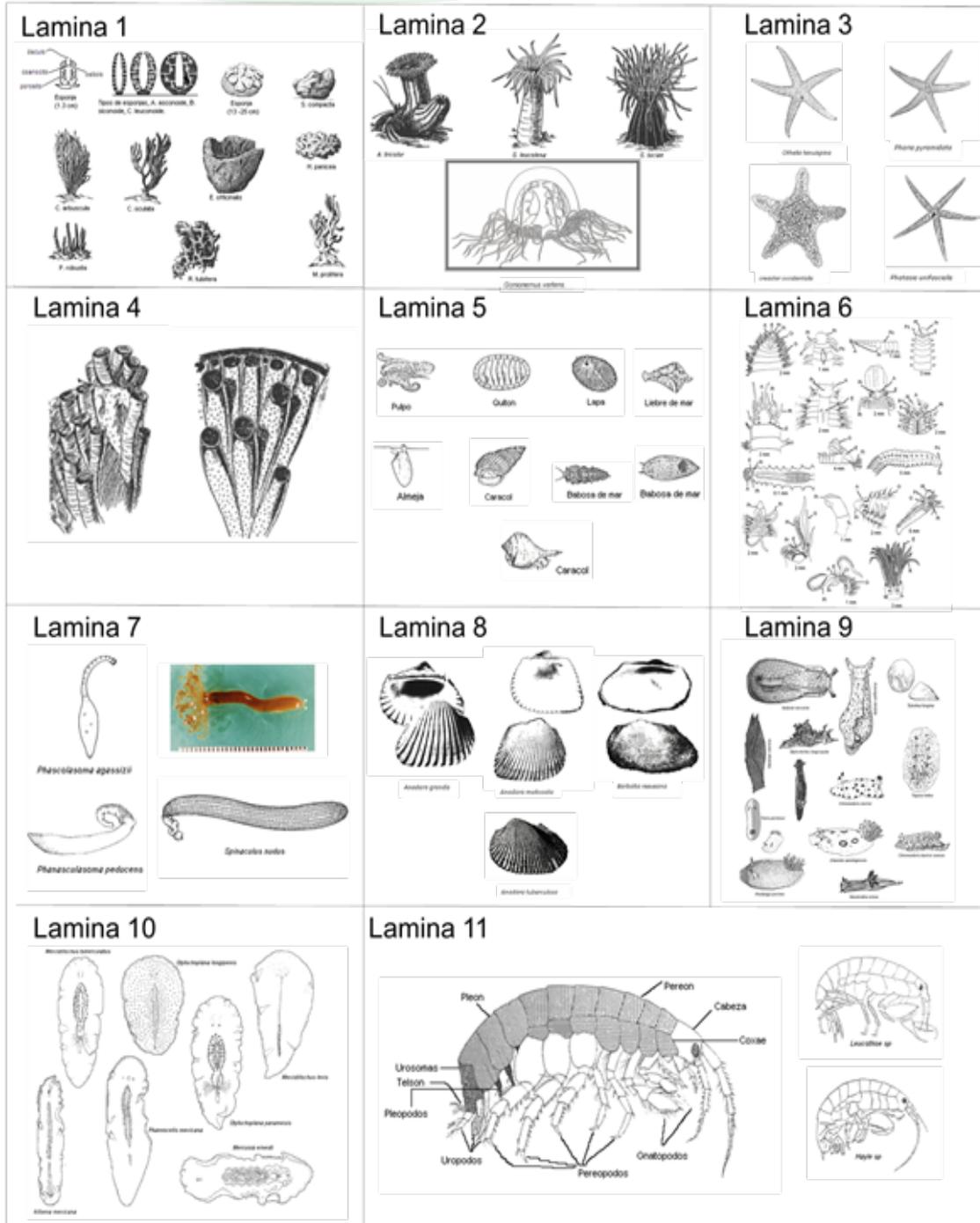


Fig 1. Cada lámina sirve de referencia para la identificación de diferentes organismos referidos en la Tabla 1.

Tabla 2. Ejemplos de identificación de crustáceos asociados al sistema arrecifal Akumal, Quintana Roo. Identificación y fotografías por Morales Gutiérrez B. P. (2007).

Orden Decapoda  
Suborden  
Dendrobranchiata  
Infraorden caridea  
Superfamilia  
Palaemonidea  
Familia palaemonidae  
Subfamilia pontoninae  
*P. longicaudatus*

Superfamilia  
Paguroidea  
Familia Paguridae  
*Pagurus annulipes*

Infraorden Brachyura  
Sección  
Brachyrhyncha  
Superfamilia  
Xanthoidea  
Familia Xanthidae  
*Panopeus herbstii*

Infraorden anomura  
Sección paguridea  
Superfamilia  
Coenobitoidea  
Familia diogenidae  
*Paguristis moorei*

Infraorden  
Brachyura  
Sección dromiacea  
Superfamilia  
Majoidea  
Familia majidae  
Subfamilia tychinae  
*Pitho lherminieri*

Subfamilia  
Mithracinae  
*Mithrax sculptus*

Orden Isopoda  
Suborden  
Flabellifera  
Familia Cirolanidae  
*Cirolana albidoida*

Tabla 3. Ejemplos de identificación de equinodermos asociados al sistema arrecifal Akumal, Quintana Roo. Identificación y fotografías por Arenazas Gutiérrez A. (2007).

**Phylum:**  
**Echinodermata**  
**Clase:** Asterozoa  
 Orden: Valvatida  
 Familia: Ophiasteridae  
 Especie: *Lickia guildingii*



**Clase:** Ophiuroidea  
 Orden: Ophiurida  
 Familia: Ophiocomidae  
 Especie: *Ophiocomaechinata*



**Familia:**  
*Ophiodermatidae*  
 Especie: *Ophiodermacinereum*



**Especie:**  
*Ophiodermabrevicaudum*



**Especie:**  
*Ophiodermabrevispinum*



**Clase:** Holothuroidea  
**Orden:** Aspidochirotida  
**Familia:** Holoturidae  
 Genero: Holoturia  
 Sungénero: Thymiosycia  
 Especie: *Holothuria (Thymiosycia) arenicola*



**Familia:** Phylloporidae  
**Especie:** *Holothuriaoccidentalis*



**Clase:** Echinoidea  
**Orden:** Echinoidea  
**Familia:** Echinometridae  
 Especie: *Echinometra lucunter lucunte*



## Cuestionario

- 1 ¿Qué es una clave dicotómica?
- 2 ¿Cuáles son las características de reconocimiento externo simples de poríferos, cnidarios, platelmintos, anélidos, moluscos y artrópodos?
- 3 Realizar una crítica del artículo "Taxonomía de invertebrados marinos: necesidades en Latinoamérica", citado en la bibliografía.

## Bibliografía

-  5.5 classification. (s/f). Com.au. Recuperado el 3 de mayo de 2024, de <http://www.old-ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-5-ecology-and-evoluti/55-classification.html>
-  Garcia-Cubas, A., & Reguera, M. (2004). *Catálogo ilustrado de moluscos gasterópodos del Golfo de México y Mar Caribe*.
-  Laguarda-Figueras, A., Hernández-Herrejón, L. A., Solís-Marín, F. A., & Durán-González, A. (2009). Ofiuroideos del Caribe mexicano y Golfo de México. *ICMYL-UNAM*.
-  Reyes, J., Santodomingo, N., Garcia-Cubas, A., & Reguera, M. (2002). *Manual de identificación CITES de Invertebrados Marinos de Colombia. Medellín: Serigráficas. 97 p. Serie de Documentos generales /INVEMAR*.
-  Solís-Marín, F. A., Arriaga-Ochoa, J. A., Laguarda-Figueras, A., Frontana-Uribe, S. C., & Durán-González, A. (2009). *Holoturoideos (Echinodermata: Holothuroidea) del Golfo de California*.
-  Standard methods for the examination of water and wastewater. (2012). *Choice (Chicago, Ill.)*, 49(12), 49-6910-49-6910. <https://doi.org/10.5860/choice.49-6910>
-  Vallejo, S., González, S. I., Emilia, N., & Schwindt, E. (2008). *TAXONOMÍA DE INVERTEBRADOS*.

## Práctica 3. Dispositivos para el mantenimiento de organismos marinos

### Introducción

Los acuarios son recipientes de tamaños diversos, que contienen agua sintéticamente preparada y componentes químicos, físicos y biológicos, con el fin de recrear las condiciones similares al hábitat natural donde viven los organismos acuáticos, ya sean de agua dulce, salobre o marina. Al ser ecosistemas vivos y dinámicos, necesitan mantener las condiciones óptimas de temperatura, luz, limpieza, oxigenación y filtración para ser eficaces. Los animales acuáticos producen desechos metabólicos incluyendo el amoníaco que deben ser eliminados mediante la nitrificación. La nitrificación comprende dos pasos: la conversión del amoníaco en nitrito, proceso mediado por *Nitrosomonas sp.*, y la transformación de estos nitritos en nitratos por medio de *Nitrobacter sp.* Las bacterias nitrificantes junto con un mecanismo de filtración permiten el control en los dispositivos acuáticos. Existen diferentes técnicas de filtración entre las que destacan, la filtración biológica, la filtración mecánica, la filtración química, la filtración con un separador de proteínas y la filtración con algas.

Para el manejo de vida acuática, se requiere un programa que incluya lineamientos desde la colecta, el confinamiento hasta el manejo de restos biológicos. La SEMARNAT promueve diversas acciones para el manejo y control; sin embargo, existe aún extracción ilegal. El decomiso constituye un problema nuevo, ya que no existen centros de depósito que puedan dar un buen destino a ejemplares derivados de la incautación. Ante este problema, y con el propósito de generar conocimiento sobre la fisiología, etología y manejo ético de los organismos acuáticos, se registró ante la SEMARNAT el PIMVS (Predio e Instalación para el Manejo de la Vida Silvestre fuera de su hábitat natural) CIDMIRA-UAMI (Centro de Investigación y Docencia para el Manejo Integral de los Recursos Acuáticos; SEMARNAT-08-045-B), que considera los lineamientos y normas vigentes para el manejo de organismos acuáticos (Fig 1).

### Objetivos

Promover el uso, mantenimiento y control de dispositivos para fomentar el conocimiento fisiológico, etológico y ético de modelos experimentales acuáticos.

### Materiales

- 1 acuario (40 L)
- 1 plataformas para acuario
- 1 filtros de cascada (100 L)
- 1 termómetros digitales sumergibles (Digital thermometer)
- 1 calentador de inmersión (50 watts)
- 1 bomba de aire
- 1 lampara sunny de 1.20 cm led azul y blanca
- 1 cabeza de poder (1000 L/hr)
- 1 manguera para oxígeno
- 1 red
- 1 sifón
- 1 cubeta de plástico

- 1 piseta de alcohol
- 1 piseta de agua destilada

### Reactivos

- 4 kg de Sal marina marca Instant Ocean
- 1 kit de medición de amonio marca sanifert
- 1 kg Hojuelas de alimento de peces Wardley
- 20 L Agua destilada

### Equipo

- 1 skimmer-espumador para 200 galones marca Sunny
- 1 oxímetro
- 1 potenciómetro
- 1 refractómetro
- 1 estuche de disección
- 1 charola de disección

### Muestras biológicas

Cnidarios, Equinodermos y Moluscos (proporcionadas por el CIDMIRA-UAMI).

### Procedimiento

1. El alumno reconocerá la capacidad (L) de los dispositivos experimentales. Para preparar agua con salinidad de 35ppm, disuelva 500g de sal en 20L de agua filtrada en una cubeta. Utilizando un refractómetro mida la salinidad y ajuste a la salinidad solicitada (Fig 2).
2. Coloque el acuario en el rack destinado para la realización de la práctica, en el PIMVS: CIDMIRA-UAMI (Lab. De Ecotoxicología, Pexpa) y vierta el agua sintética preparada. Seleccione y coloque los accesorios de control de los parámetros fisicoquímicos: calidad de agua (filtro biológico, mecánico, químico), luz (lámparas), temperatura (termostato), bomba de oxígeno y difusor de agua.
3. Realice el monitoreo del sistema con parámetros de control (pH, temperatura, oxígeno disuelto, salinidad).
4. Con el kit de medición de amoniaco, registre la cantidad de amonio, nitritos y nitratos en el agua de mar artificial.

## Instrucciones para el registro de resultados

En formato de tabla registre los parámetros fisicoquímicos del acuario. Consulte en la bibliografía los parámetros adecuados para el mantenimiento de vida marina e incluya los datos de referencia en la tabla.

## Indicaciones para el desarrollo del informe o reporte

El alumno deberá reportar las características de su sistema experimental, periodo de prueba que se requiere para el control de los desechos nitrogenados. Investigará sobre tipo de organismos que puede utilizar para corroborar que el acuario esté en óptimas condiciones para alojar organismos acuáticos. Incluirá el registro de los parámetros en formato de Tabla.



Fig 1. Aspecto del área húmeda del Centro de Investigación y docencia para el Manejo Integral de los Recursos Acuáticos (CIDMIRA) en el Laboratorio de Ecotoxicología, UAM-I



Fig 2. Para la preparación de un litro de agua marina a 35‰ se añadirá 41.5 g de sal por 1 litro de agua potable o destilada. La sal deberá ser añadida poco a poco en un balde que contenga el agua, para permitir la mezcla homogénea de las sales se instalará un cabezal de poder provocando la circulación del agua; esta agua marina deberá ser preparada con un mínimo de 15 días antes de introducir a los organismos para obtener una estabilidad química del agua. Figura realizada por Cartagena María Paredes Ramos (2017).

## Cuestionario

1. Menciona 3 ejemplos de investigaciones etológicas en las que se utilizan los acuarios.
2. ¿Investigue que problemas bioéticos existen en el manejo de organismos acuáticos ?
3. ¿Qué procesos fisiológicos se pueden estudiar en organismos acuáticos gracias a los acuarios?
4. Menciona 3 ejemplos de organismos acuáticos que se mantienen en cautiverio para investigación.

## BIBLIOGRAFÍA

-  Castellanos, J., & Ramos, Y. (2014). Caracterización de bacterias oxidasas de amonio aisladas del humedal de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad de Boyacá. *Revista*, 3, 82–95.
-  Comité para la Actualización de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, & Institute for Laboratory Animal Research Division on Earth and Life Studies. (2017). *Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio: Octava Edición*. Ediciones UC.
-  Culchac Cuaran, L. Y., Estrada Marcillo, J. S., & Ordóñez Jurado, H. R. (2021). Cuantificación de bacterias nitrificantes en un suelo Typic melanudands en tres condiciones de uso de suelo en Pasto, Nariño, Colombia. *Corpoica ciencia y tecnología agropecuaria*, 22(2). [https://doi.org/10.21930/rcta.vol22\\_num2\\_art:1424](https://doi.org/10.21930/rcta.vol22_num2_art:1424)
-  Garcia, X. G. (2021, junio). CIDMIRA. Youtube. <https://youtu.be/zN33oIRInE?si=sYy0kJlumAa6Yhn>

# Práctica 4. Manejo de organismos acuáticos en dispositivos experimentales (moluscos, anémonas, pez ángel, pez cebra)

## Introducción

Uno de los modelos más utilizados en la ciencia es el pez cebra (*Danio rerio*) debido a que su genoma es muy parecido al del humano (80% de similitud); sin embargo, existen otras especies de fácil control como las almejas y las anémonas de mar; que nos brindan información sobre diferentes procesos fisiológicos importantes para entender la vida marina.

El acuario se puede instalar con diversos componentes mecánicos y concentración de sales minerales, que permitan la recreación del ambiente de agua dulce, marina o salobre (Fig 1). Para la climatización de los organismos en los dispositivos experimentales, es necesario el control de los parámetros fisicoquímicos de acuerdo a sus necesidades. Uno de los aspectos más importantes a considerar en el mantenimiento de un acuario, es la calidad del agua, esta se mantiene con diversos filtros. También es importante el control de los valores de nitratos, nitritos, amonio, fosfatos, entre otros, así como mantener los rangos de la temperatura, la concentración de oxígeno y el pH. Existen distintas pruebas comerciales basadas en la colorimetría para la medición de estos parámetros. Estas pruebas, generalmente suelen contener un tubo de vidrio o plástico, los reactivos necesarios, así como una guía ilustrada que explica paso a paso cómo desarrollarla, las pruebas son sencillas y rápidas de hacer.

Una vez instalado el acuario, es necesario la generación de una comunidad bacteriana (*Nitrosomonas*) que transforme el amonio (la forma química más tóxica para los organismos acuáticos) en nitritos (Nitrobacterias) y nitratos, lo que se conoce como la maduración del agua, el tiempo de este periodo de maduración depende del filtro biológico que se pretenda usar. El proceso de maduración de un filtro biológico requiere aproximadamente 36 días, de los cuales, entre 8 a 12 días se requieren para la multiplicación de la bacteria *Nitrosomonas*, posteriormente entre el 13 y 36 día la bacteria *Nitrobacter* genera que el nivel de estrés de nitritos baje y en este punto se pueden introducir los organismos. Es necesario llevar a cabo revisiones de los parámetros fisicoquímicos, cada semana para verificar la calidad del agua en el sistema.

## Objetivo

Manejo y control de dispositivos experimental y organismos acuáticos, además de conocer las principales diferencias entre el manejo y mantenimiento de especies dulceacuícolas y marinas.

## Materiales

- 1 acuario (40 L)
- 1 plataformas para acuario
- 1 filtros de cascada (100 L)
- 1 termómetros digitales sumergibles (Digital thermometer)
- 1 calentador de inmersión (50 watts)
- 1 bomba de aire
- 1 lampara sunny de 1.20 cm led azul y blanca
- 1 cabeza de poder (1000 L/hr)
- 1 manguera para oxígeno

- 1 red
- 1 sifón
- 1 piseta de alcohol
- 1 piseta de agua destilada
- Tanque de desove y cría

## Reactivos

- Sal marina (160 galones/600 lts)
- Kit de medición de amonio sanifert
- Hojuelas de alimento de peces Wardley 1 Kg
- Agua destilada 20 L

## Equipo

- 4 skimmer-espumador 200 gal (Haqoos SP300)
- 1 oxímetro
- 1 potenciómetro
- 1 refractómetro
- 1 estuche de disección
- 1 charola de disección

## Procedimiento

Instalar el rack y las peceras para el sistema experimental marino de flujo cerrado y biofiltro, con periodos de recambio parcial. Instalar un biofiltro, un dispositivo separador o fraccionador de proteínas, (conocido, como *skimmer*). En las instalaciones de cuarentena como la zona de mantenimiento, se procurará que la luz siga el ciclo natural del día, manteniendo así en la medida de lo posible las condiciones naturales del medio, encendiendo poco a poco las luces por la mañana y apagándolas por la tarde-noche. Utilizar de preferencia un sistema inteligente controlado vía wifi donde se colocan temporizadores para controlar la intensidad del encendido de las luces a lo largo del día y con ello lograr reproducir los ocasos y el medio día (donde la luz es más intensa). Independientemente del soporte y dispositivos, preparar material complementario que incluye: Calentadores o enfriadores que consiguen alcanzar y mantener un valor adecuado, bombas de agua, espumadores, lupas, microscopios, portaobjetos, redes, sifones, refractómetro, sal marina para acuarios entre otros.

Se utilizarán kits para medir los parámetros fisicoquímicos del agua incluyen: contenido en nitratos, nitritos, amoníaco, fosfatos, yodo, calcio, etc. Es necesario medir y mantener vigilados tanto los compuestos que sean nocivos como los que sean necesarios para el buen desarrollo de las especies, así como la temperatura, la concentración de oxígeno y el pH.

Se sugiere señalar en qué momento y de qué manera se introducen los animales al sistema para respetar el periodo de climatización y cuarentena. En la zona de climatización y cuarentena, se vigilará la presencia de lesiones macroscópicas o parásitos, así como el registro de los datos morfométricos aproximados. En esta zona, se define y adapta la dieta. Cada tanque tiene una biomasa determinada, de modo que la cantidad de comida se calculará como un porcentaje del peso de los animales.

Los animales enfermos o infectados por algún parásito serán eliminados o se les suministrará tratamiento natural hasta su recuperación. En caso de mortalidad, los restos del organismo serán fijados en formol al 10% para su procesamiento en la sección de análisis tisular, a fin de conocer las probables causas de muerte.

Si es necesario para el manejo del organismo, se utilizará la sedación recomendada (Especificar qué tipo de manejo, por ejemplo, para sacrificio o tratamiento de una enfermedad o parásito o sometido a algún contaminante).

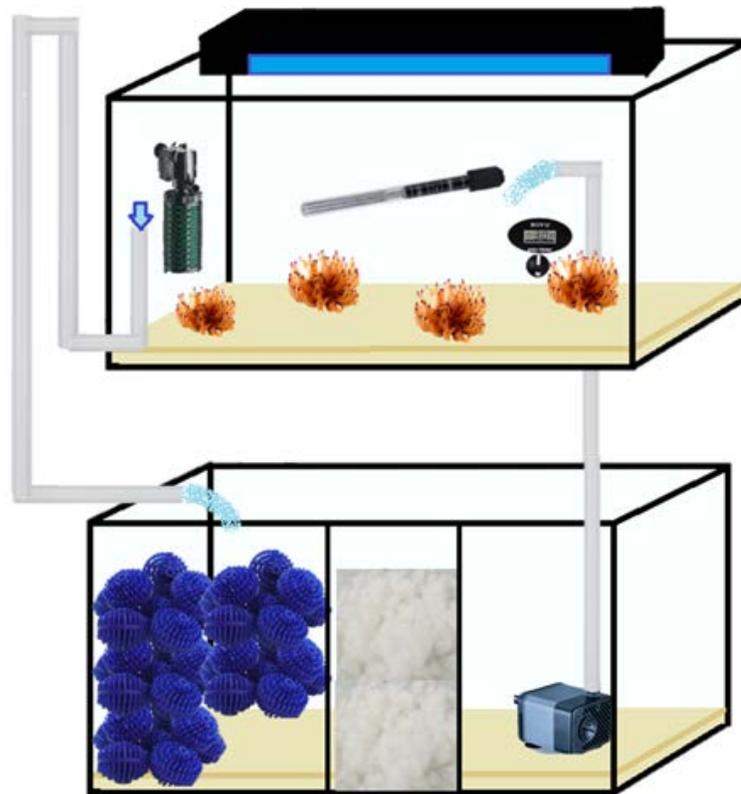


Fig 1. Ejemplo de un dispositivo experimental con filtro externo para anémonas marinas.

Diseño y figura realizado por Huerta Aguirre Gabriela (2017)

## Instrucciones para el registro de resultados

El alumno reportará el registro de parámetros fisicoquímicos, morfométricos, tasa de mortalidad, características etológicas y normatividad vigente para la especie.

## Indicaciones para el desarrollo del informe o reporte

El alumno deberá reportar las características de su sistema experimental, así como los parámetros fisicoquímicos idóneos para cada organismo, el tipo de alimentación requerida y frecuencia de alimento.

## Cuestionario

1. Mencione los principales problemas a los que se enfrenta una persona principiante en el montaje de un dispositivo experimental.
2. Mencione tres características que hacen del modelo del pez cebrá un buen modelo experimental.
3. Mencione un ejemplo de algún estudio en donde se utilicen anémonas como modelo biológico.

## Bibliografía

-  Bopp, S. K., Minuzzo, M., & Lettieri, T. (2006). The zebrafish (*Danio rerio*): an emerging model organism in the environmental field. Institute for Environment and sustainability (Joint Research Centre), 1-24.
-  Gaspar W, Niño A, Alejos R, Ynga G. (2021). Manual para la producción de *Artemia franciscana* como alimento para larvas y juveniles de peces. *Inf Inst Mar Perú*. 48(1): 35-49.
-  Lango Reynoso, F., Castañeda-Chávez, M., Zamora-Castro, J., Hernández-Zárate, G., Ramírez-Barragán, M., & Solís-Morán, E. (2017). Ornamental marine fishkeeping: a trade of challenges and opportunities. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40(1), 12-21. doi:<http://dx.doi.org/10.3856/vol40-issue1-fulltext-2>
-  Luna-Figueroa J, Vargas T, Figueroa J. (2010). Alimento vivo en la dieta de larvas y juveniles de *Pterescalar ophyllum* (Lichtenstein, 1823). *Avances en Investigación Agropecuaria*. 14: 63-72.
-  Rojas-Muñoz, A., Miana, A. B., & Belmonte, J. C. I. (2007). El pez cebrá, versatilidad al servicio de la biomedicina. *Investigación y ciencia*, (366), 62-69.
-  Sánchez, A. (2017). Efecto de la temperatura sobre el tiempo y la eficiencia de descapsulación y eclosión en el crustáceo euri-termo *Artemia sp.* Trabajo de Fin de Grado en Biología. Universidad del País Vasco.
-  Silva, J. G. (2018). El material natural en la Biología escolar. Consideraciones éticas y didáctica sobre las actividades prácticas de laboratorio. *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias*, 15(1), 1-19.

# Práctica 5. Análisis de células de defensa en organismos acuáticos

## Introducción

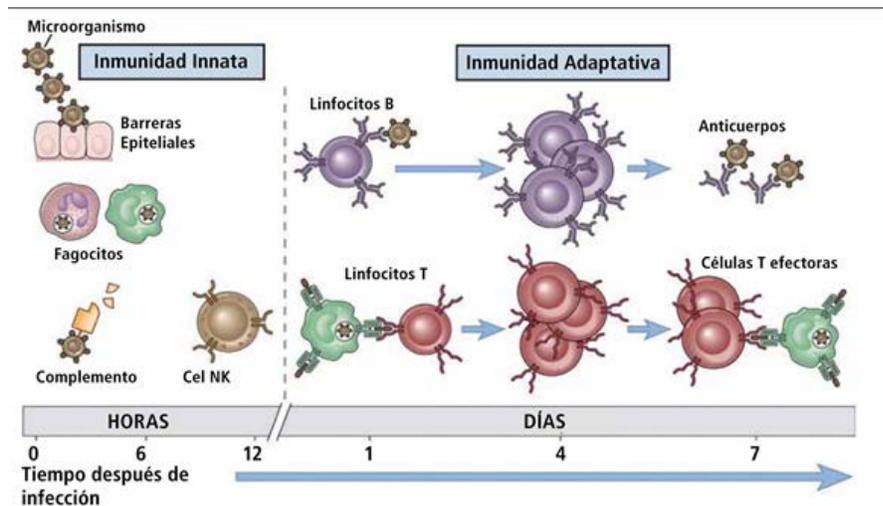
Los organismos vivos están en contacto con un medio ambiente hostil, el cual les puede generar afecciones y enfermedades. Mediante la respuesta inmune, los organismos pueden mediar y resistir diversos estresores. La respuesta inmunitaria se define como un mecanismo de defensa de los organismos contra sustancias dañinas o extrañas. También se llama reacción inmunitaria o respuesta inmunológica.

El sistema inmune se activa como consecuencia de una agresión endógena o exógena. Una de sus principales funciones es la defensa contra microorganismos y la inmunovigilancia contra tumores, enfermedades autoinmunes y alergias. Se puede clasificar en sistema inmune innato y adaptativo. Sin embargo, ambos sistemas funcionan de manera integrada.

El sistema inmune innato (Fig. 1) es la primera línea de defensa del huésped. Posee mecanismos preexistentes que se activan de manera rápida y que preceden a la Inmunidad Adaptativa en la respuesta defensiva; es el más antiguo y está presente en todos los organismos multicelulares. Los principales componentes del sistema inmune innato son las barreras físicas y químicas (epitelios, enzimas); células fagocíticas y citoquinas.

El sistema inmune adaptativo (Fig.1) está presente en los vertebrados, es específico para distintas moléculas y se caracteriza por mejorar la capacidad defensiva frente a exposiciones sucesivas. Los principales elementos son los linfocitos B y T que se activan frente a los antígenos (sustancias que inducen respuestas inmunes específicas). En los invertebrados, el uso efectivo del sistema inmune innato les ha permitido mantener la integridad como especie y como defensa contra agentes patógenos. Esta capacidad de defensa les ha favorecido en cuanto a la colonización y supervivencia ante todo tipo de hábitats, por lo cual, la versatilidad de estos organismos sugiere que poseen un sistema inmune altamente efectivo como mecanismo de protección

Fig 1. Principales elementos utilizados en la respuesta inmune.



Tomado de Toche, 2012.

## Objetivos

Caracterizar la respuesta celular en muestras del líquido circulante de invertebrados o vertebrados acuáticos.

## Materiales

### Para obtención de muestras

- Organismos acuáticos (recién extraídos)
- Jeringas de 3 y 5 ml
- Tubos tapón lila con anticoagulante EDTA
- Capilares de vidrio heparinizados

### Para la elaboración de frotis

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Microscopio de campo claro
- Lápiz punta diamante

### Para la tinción de frotis

- Jarras Coplin
- Vasos Coplin

## Reactivos

### Para tinción Giemsa

Colorante Giemsa

Agua acética

Alcohol absoluto

Benzocaína

### Para tinción Wrigth

Colorante de Wrigth

Buffer de fosfatos

## Equipo

- Tren de Tinción

## Procedimiento

### Obtención de sangre o hemolinfa

1. Sedar a los organismos con benzocaína al 5% o solución recomendada (tabla 2 de sedación).
2. Realizar la extracción de líquido circulante mediante punción cardíaca o por la estructura cercana al centro hematopoyético). Introduciendo la aguja formando un ángulo de 45° con jeringas de 3 o 5 ml (dependiendo el tamaño del organismo).
3. Retirar la aguja de la jeringa y vaciar la sangre o líquido circulante por las paredes del tubo con anticoagulante EDTA.

Las diferencias en las concentraciones se determinarán mediante microscopía de campo claro y tinción de Wright, Giemsa.

### Frotis de hemolinfa o sangre

1. Extraer una gota (cerca de 20  $\mu$ l) de sangre o hemolinfa
2. Colocar la sangre o hemolinfa en un extremo del portaobjetos
3. Colocar otro portaobjetos sobre el primero formando un ángulo de 45 grados como se muestra en la figura 2.
4. Cuando el portaobjetos de arriba toque la sangre, recórrase con rapidez hasta el otro extremo del portaobjetos de base
5. Dejar secar el frotis a temperatura ambiente y realizar las tinciones necesarias.

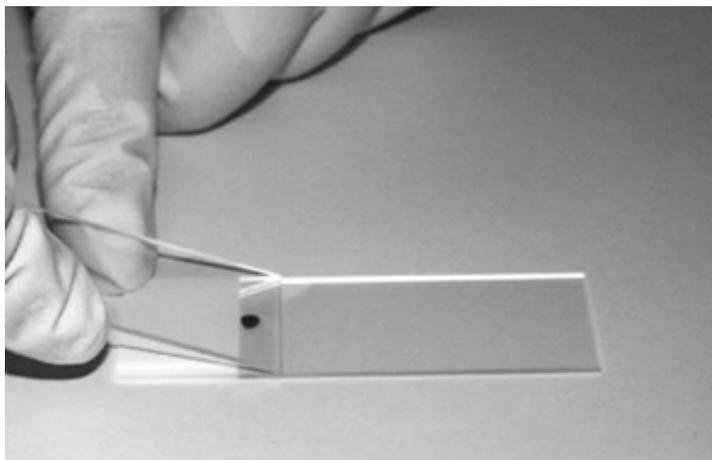


Fig 2. Técnica de extensión de sangre.

### **Tinción de Giemsa**

1. Primera fijación: secado del frotis a temperatura ambiente.
2. Segunda fijación: agregar alcohol absoluto en un vaso Coplin e incubar durante una hora.
3. Escurrir la preparación y se dejar secar
4. Agregar el colorante Giemsa, diluido sobre el portaobjetos en una jarra Coplin y dejar actuar durante una hora.
5. Lavar con agua destilada y dejar secar.
6. Realizar una inmersión rápida en agua acética, seguida de una inmersión en agua potable para detener el efecto del agua acética.
7. Dejar secar y observar al microscopio.

### **Tinción de Wright**

1. Colocar la laminilla en el puente de tinción hacia arriba.
2. Cubrir el extendido completamente con colorante de Wright y dejarlo actuar 5 min.
3. Agregar el buffer poco a poco y de manera gentil con una pipeta (la laminilla debe presentar una coloración verde metálico).
4. Dejar actuar de 10 a 15 min.
5. Eliminar la mezcla agregando agua corriente.
6. Dejar secar en posición vertical inclinada.
7. Observar al microscopio a 100X con aceite de inmersión.

### **Análisis**

1. Enfocar el microscopio con el objetivo de 100x.
2. Explorar el frotis para localizar las mejores zonas (donde se aprecien las células bien teñidas y no aglomeradas).
3. Realizar la observación en forma de zig-zag y diferenciar las células encontradas reportándolas en vertebrados como: neutrófilo (banda), neutrófilo segmentado, linfocito, monocito, basófilo, eosinófilo (línea blanca) y eritrocitos inmaduros. En el caso de invertebrados describa los hemocitos, la apariencia del núcleo y citoplasma.
4. Para una correcta identificación, se recomienda el uso de un atlas.

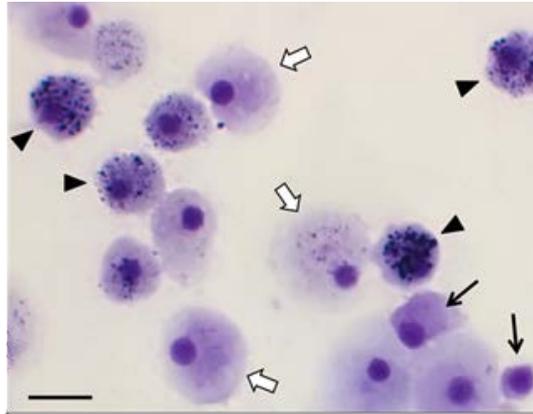


Fig 3. Elementos celulares de la hemolinfa. Flechas blancas indican hemocitos con contenidos granulares diferentes.

### Instrucciones para el registro de resultados

Dibuje las células que se observaron en el microscopio óptico (o si es posible, tome fotografías) y discuta su función.

Adicionalmente se realizarán observaciones de laminillas previamente elaboradas las cuales serán proporcionadas por el profesor.

### Indicaciones para el desarrollo del informe o reporte

El reporte deberá contener una breve introducción citando las fuentes que utilizó, (deberán ser recientes, no más de 10 años), sus principales observaciones, una discusión de sus resultados dando importancia a investigaciones de este tipo y una conclusión.

### Cuestionario

1. ¿Qué tipo de células se pueden encontrar en el líquido circulante de organismos acuáticos?
2. ¿Qué efectos tienen los estresores ambientales sobre las células del líquido circulante de los organismos acuáticos? Mencione dos ejemplos.

## Bibliografía

-  Lieschke, G. J., & Trede, N. S. (2009). Fish immunology. *Current Biology*, 19(16), R678-R682.
-  Marín, Y. A., & Salazar-Lugo, R. (2009). El sistema inmune de los invertebrados. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(9).
-  Mokhtar, D. M. (2021). *Fish histology: From cells to organs* (2a ed.). Apple Academic Press. <https://doi.org/10.1201/9781003097419>
-  Murgas, L. D., Oliveira, D. G. de, & Paula, D. A. de J. (2020). Genotoxicity in *Danio rerio* exposed to increasing concentrations of soluble fractioning of burnt soybean oil biodiesel. *PubVet*, 14(04). <https://doi.org/10.31533/pubvet.v14n4a549.1-6>
-  Paola, T. P., Dra. (2012). Visión panorámica del sistema inmune. *Revista médica Clínica Las Condes*, 23(4), 446–457. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(12\)70335-8](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(12)70335-8)
-  Rauta, P. R., Nayak, B., & Das, S. (2012). Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. *Immunology letters*, 148(1), 23-33.
-  Yu, F., Liu, Y., Wang, W., Yang, S., Gao, Y., Shi, W., Hou, H., Chen, J., & Guo, R. (2024). Toxicity of TPHP on the gills and intestines of zebrafish from the perspectives of histopathology, oxidative stress and immune response. *The Science of the Total Environment*, 908(168212), 168212. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168212>

## Práctica 6. Pez cebra (*Danio rerio*) como modelo experimental

### Introducción

El pez cebra es un modelo animal con muchas cualidades que lo posicionan como una alternativa atractiva para realizar investigaciones ya que tiene alta fecundidad, posee un desarrollo rápido desde el estadio embrionario hasta adulto y el costo de la infraestructura, los insumos y los reactivos necesarios para su crianza y reproducción son bajos. Se ha convertido en un modelo popular en estudios farmacológicos como el cribado, estudios de modo de acción, análisis de la función génica, toxicología predictiva, teratogenicidad, fármacos y toxicogenómica.

No es fácil distinguir los machos de las hembras, salvo cuando alcanzan la madurez sexual, entonces podremos observar como la hembra adquiere una forma más redondeada, se ve un poco más grande que los machos y pierde algo de color. Otro dimorfismo sexual está en las rayas, los machos alternan bandas azules y doradas, mientras que las hembras son azules y plateadas.

La reproducción del pez cebra se ve muy afectada por ciclos circadianos por lo que la iluminación es un aspecto importante para considerar, además de la alimentación que deberá estar basada en comida viva, como artemia, ya que contiene una mayor cantidad de nutrientes que la comida preparada y les confiere un mayor aporte de energía.

En la reproducción de esta especie existe un cortejo que dura varias horas, el cual consiste en que el macho golpea a la hembra con la cabeza para la expulsión de huevos, posteriormente por señales bioquímicas el macho libera los espermatozoides al agua para fecundar a los huevos, estos huevos fecundados caerán al sustrato, por lo que es necesario la colocación de canicas o una red que impida que los peces adultos puedan comérselos.

En cautiverio, para lograr la reproducción es necesario seleccionar a los machos y hembras. Las mejores hembras serán aquellas que tengan el abdomen más ancho, ya que esto indicará que está bien alimentada y provista de huevos. El macho seleccionado será grande y con buena apariencia.

### Objetivo

El objetivo de esta práctica es elaborar un proyecto de mantenimiento del pez cebra, es por ello que el estudiante deberá tener en cuenta el tipo de instalaciones para su cría, la calidad del agua donde se encuentran, la alimentación que reciben o los procesos de reproducción utilizados, cabe señalar que es importante optimizar los cuidados necesarios para que el número de embriones viables sea máximo y también poder mantener un número de ejemplares adultos en buenas condiciones.

### Materiales

- 5 cajas Petri
- Pipetas Pasteur
- 1 estuche de disección
- Laminillas de pez cebra
- Canicas o rocas de río

### Reactivos

- Agua dulce potable

### Equipo

- Microscopio estereoscópico

- 2 peceras de 40 litros
- 1 cámara de obtención de crías o pecera pequeña (15 litros)
- Bomba de oxigenación para acuario
- Termostato
- Filtro para pecera

## Muestras biológicas

Peces cebras machos y hembras adultos

## Procedimiento

### Montaje de acuario

El tamaño del acuario debe estar en el entorno de los 40 litros, no es necesario una filtración fuerte, aunque es posible que veamos que tienen preferencia por nadar cerca de la salida de la bomba del agua.

Los intervalos óptimos recomendados para el desarrollo del pez cebra son: Temperatura 25-28°C; pH 6-8 Unidades; dureza 90-357ppm.

### Sexado de peces

Observar los principales dimorfismos sexuales entre los peces y separarlos en dos acuarios diferentes, de acuerdo a las características observadas en la Fig.1.



Fig 1. Características morfológicas en hembras y machos *Danio rerio*

## Preparación de pecera para reproducción

El día antes de la puesta solo se les dará de comer artemia para que tengan más energía. Para la puesta se utilizará una pecera más pequeña denominada "paridera".

En el fondo de la pecera se colocarán canicas para que los huevos al caer no corran el riesgo de ser devorados por sus progenitores; esta división no permite el paso de los adultos al fondo de la pecera donde se encuentran los huevos. Se colocarán dos hembras por un macho.

## Recolección de embriones

Una vez que se haya llevado a cabo la reproducción, se procederá a recoger los huevos utilizando un colador. Los huevos se irán recogiendo y depositando en el colador; una vez se tengan todos, se lavarán con cuidado con agua limpia y se pondrán en una placa petri con agua que tenga la misma concentración de sales. Los huevos muertos que no sean fecundados o que simplemente no salgan adelante se retirarán con una pipeta Pasteur. Estos huevos serán fáciles de reconocer ya que son de color blanco.

## Observación en el microscopio

Observe en el microscopio y anote las horas que tienen los embriones post-fertilización de acuerdo con la siguiente figura (Fig. 2):

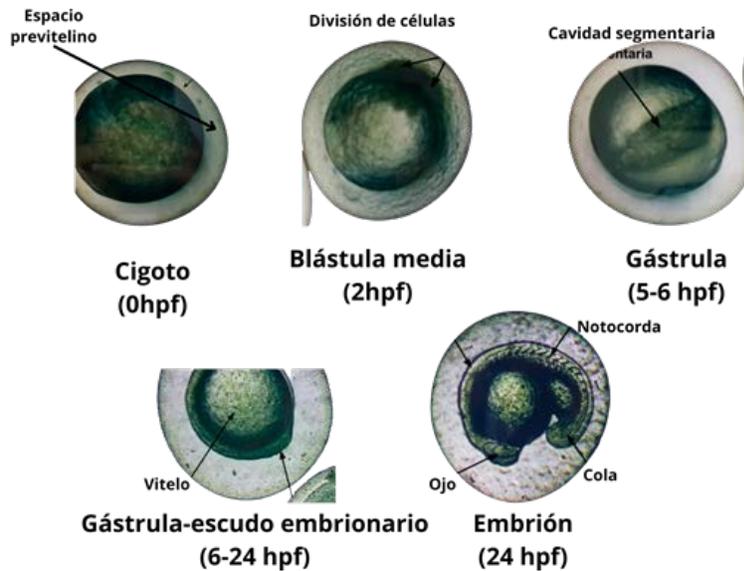


Fig 2. Desarrollo embrionario *Danio rerio*.

## Instrucciones para el registro de resultados

Registre mediante fotografías sus observaciones en el microscopio y señale los principales cambios celulares que ha notado.

## Indicaciones para el desarrollo del informe o reporte

Su reporte deberá contener una breve introducción citando las fuentes que utilizó que deberán ser recientes (no más de 10 años), sus principales observaciones, una discusión de sus resultados dando importancia a investigaciones de este tipo y una conclusión.

## Cuestionario

1. ¿Cuántas crías aproximadamente tiene una hembra *Danio rerio*?
2. ¿Qué tipo de estudios conoces en donde se ha utilizado el pez cebra como modelo biológico?
3. ¿Cuánto tiempo tardan en eclosionar los huevos de pez cebra?
4. ¿En qué etapa germinal se desarrolla el sistema nervioso en este modelo?
5. ¿Qué tipo de alteraciones puedes observar en estudios con este modelo biológico?

## Bibliografía

-  Aleström, P., Holter, J. L., & Nourizadeh-Lillabadi, R. (2006). Zebrafish in functional genomics and aquatic biomedicine. *Trends in biotechnology*, 24(1), 15-21.
-  Bopp, S. K., Minuzzo, M., & Lettieri, T. (2006). The zebrafish (*Danio rerio*): an emerging model organism in the environmental field. *Institute for Environment and sustainability*, 1-24.
-  Briggs, J. P. (2002). The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. *American Journal of Physiology-Regulatory, integrative and comparative physiology*, 282(1), R3-R9.
-  Emran, F.; Brooks, J.M.; Zimmerman, S.R.; Johnson, S.L. y Lue, R.A. (2009). Zebrafish embryology and cartilage staining protocols for high school students. *Zebrafish*, 6(2): 139-43.
-  Espinosa, M. B. (2016). El Pez Cebra: una Herramienta en Educación. The Zebrafish: a Tool in Education. *Revista De Educación En Biología*, 19(1), (pp. 11-18).
-  Gerhard, G. S. (2003). Comparative aspects of zebrafish (*Danio rerio*) as a model for aging research. *Experimental Gerontology*, 38(11-12), 1333-1341.
-  Hutson L.D., y Liang J.O. (2009). Making an impact: zebrafish in education. *Zebrafish*, 6(2): 119-20.
-  Keller, J. M., & Keller, E. T. (2018). The use of mature zebrafish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease. *Conn's handbook of models for human aging*, 351-359.
-  Rahman Khan, F., & Sulaiman Alhewairini, S. (2019). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism. *Curr. Trends Cancer Manag*, 81517(10.5772).

## Práctica 7. Identificación taxonómica de anémonas de mar

### Introducción

Las anémonas de mar son especies ampliamente distribuidas en aguas profundas o costeras en todo el mundo, con mayor diversidad en zonas templadas. Taxonómicamente se encuentran dentro del Filo Cnidaria, que se caracteriza por presentar células especializadas denominadas cnidocitos, con la capacidad de sintetizar organelos urticantes llamados cnidocistos, que utilizan para capturar a sus presas y defenderse de sus depredadores.

Las anémonas en su mayor parte están formadas por una columna gruesa que puede ser lisa o presentar verrugas, vesículas o algunas estructuras menos comunes. En un extremo de la columna hay un disco aplanado (discopodio) para su fijación y en el otro extremo, se encuentra el disco oral, que puede poseer de ocho a varios centenares de tentáculos, y en algunas especies con terminación en nematosferas (Fig.1).

La importancia ecológica de las anémonas consiste principalmente en la transferencia de energía de las comunidades bentónicas a la columna de agua, además de tener un papel muy importante en procesos primarios de los ciclos biogeoquímicos, sin embargo, esta importancia ha sido menospreciada. Además, este tipo de organismos pueden funcionar como indicadores biológicos, lo que permite a través de analizarlos evaluar actividades ambientales, sociales y económicas que se realicen en las zonas aledañas. Algunos factores que influyen en su distribución y densidad son: disponibilidad de sustrato, condiciones ambientales y circulación de agua.

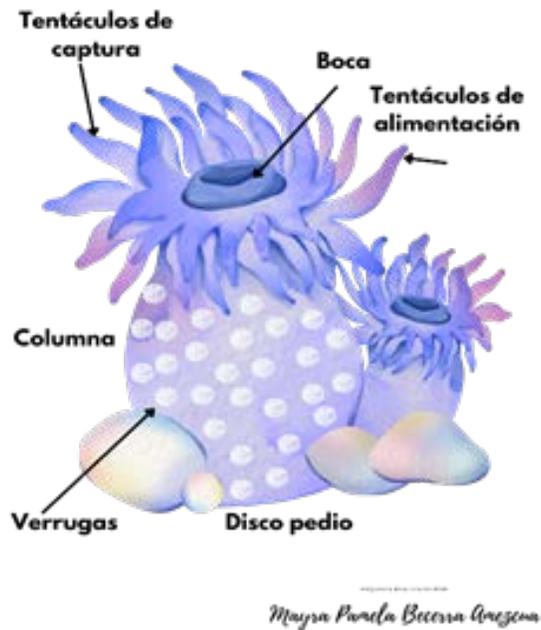


Fig 1. Anatomía externa de anémonas de mar

### OBJETIVO

Caracterizar la taxonomía externa e interna de una anémona de mar para la identificación de especies.

### MATERIALES

- Cinta métrica
- Estuche de disección
- Portaobjetos

- Cubreobjetos
- Regla de micrómetro para microscopio
- 1 caja de Petri
- 2 probetas de 1 L
- 2 vasos de precipitados de 1 L
- 4 vasos de precipitados de 500 ml
- 2 pipetas Pasteur
- 1 caja de portaobjetos 100 pzas.de 25 x 76 mm
- 1 caja cubreobjetos 100 pzas. De 24 x 50 mm
- 1 paquete de cuchillas de bajo perfil
- 1 rollo de gasa
- 5 agujas de disección
- 5 estuches de disección
- 5 charolas de disección
- 5 Písetas de agua destilada
- 1 microscopios ópticos con cámara
- 1 microscopios estereoscópicos con cámara
- 5 cajas portalaminillas de 100 espacios

## REACTIVOS

- Cloruro de Magnesio o Sulfato de Magnesio
- Agua de mar artificial
- Ácido acético
- Glicerina
- Fenol
- Formalina

- 1L Hematoxilina
- 20 L de alcohol absoluto
- 20 L de xilol
- 4L formol al 37 %
- 4 kg de parafina en hojuelas Resina sintética de montaje
- Ziehl Neelsen equipo 3x125 ml Cat. 64293
- Hemocolorante rápido EQ. Cat. 548.

### Equipo

- Microscopio óptico
- Microscopio estereoscópico

### Muestras biológicas

Anémonas (proporcionadas por el CIDMIRA-UAMI)

Laminillas histológicas de anémonas (proporcionadas por el CIDMIRA-UAMI)

### Procedimiento

#### Caracterización externa

Para la preservación de tonalidades y estructuras de los organismos se añade poco a poco cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) o sulfato de Magnesio ( $MgSO_4$ ) al 5 o 10% en agua de mar (dependiendo del tamaño) para su relajación durante aproximadamente 30 minutos o hasta que los organismos no presentaran respuesta al estímulo táctil; en ese momento se toman las fotos y datos respectivos de características externas (Tabla 1), como presencia o no de verrugas, número y tamaño de tentáculos, medida de disco oral, disco pedal, columna, coloración (Fig.2).

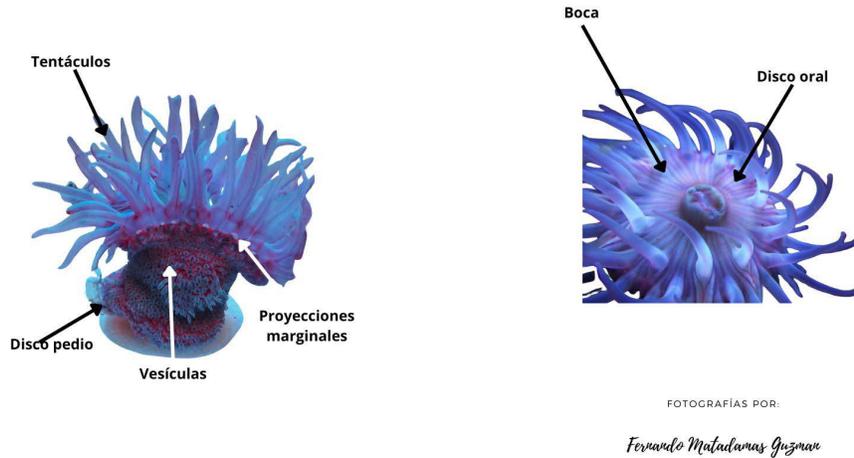


Fig 1. Principales estructuras anatómicas externas de una anémona. Fotografía y composición por Matadamas Guzmán, F. M. (2019).

Característica	Ejemplo
Color	Verde olivo, naranja
Forma de la columna	Gorda y corta
Patrón de disco oral	Rayada
Base y resto del tentáculo	Barras transversales
Proyecciones marginales	No
Esférulas marginales	No
Verrugas	Sí
Vesículas	No
No. de tentáculos	60
Presencia de collar	No

Tabla 1. Registro de datos morfométricos de la anémona.

## Morfología interna y exámenes histológicos

Los especímenes preservados deben ser examinados en detalle. Los estudios histológicos son necesarios para observar detalles sobre el tejido muscular, anatomía y distribución de tejido reproductivo por lo que laminillas histológicas de anémonas serán proporcionadas por el profesor.



Fig. 2 Características generales de *Bunodosoma cavernatum*. A. Presenta cinco ciclos de tentáculos en el disco oral. B. En la columna (círculo) se observan hileras de verrugas. C. Los tentáculos presentan morfología cónica-lisa. Fotografía y composición por Valdez Peralta I.H. (2018).

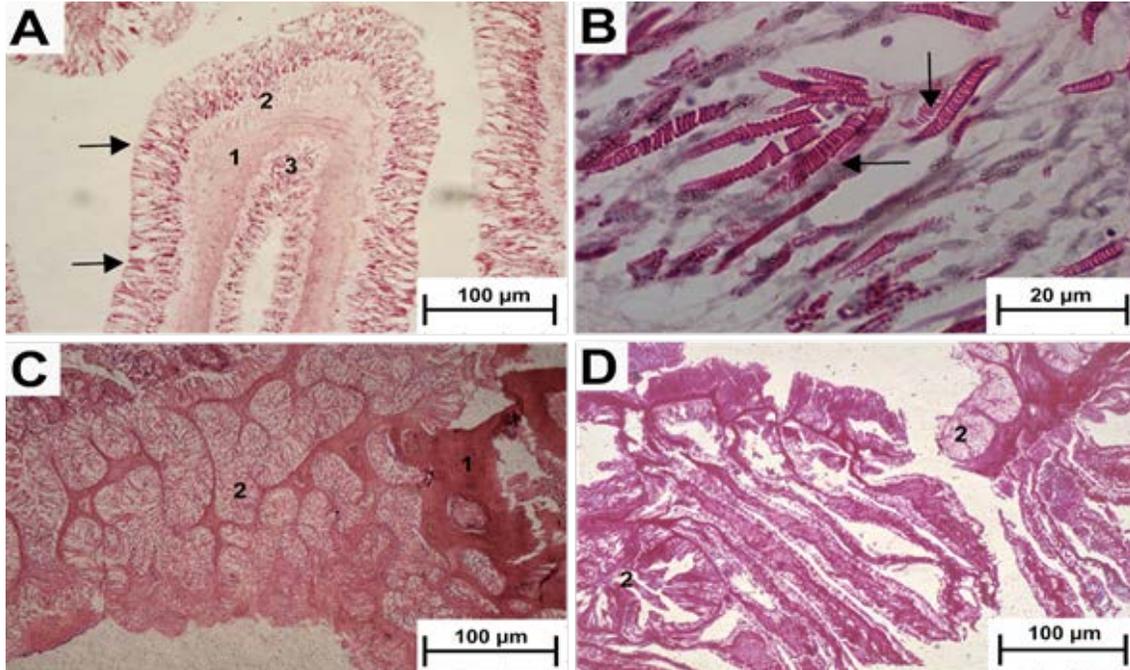


Fig 3. Caracterización tisular de la parte oral, columna y disco pedio de la anémona. A. Corte transversal de un tentáculo, se observa conformado por una capa externa de células especializadas (flechas), una mesoglea como tejido de soporte (1), tejido muscular para el movimiento de los cnidocitos (2) y una cubierta interna epitelial (3). B. Presencia de cnidocitos tipo espirocistos (flechas) en un tentáculo. C. La estructura semicompacta de la columna está formada por tejido muscular (2) que rodea en su totalidad a la mesoglea (1) que aísla a la cavidad gastrovascular, estos músculos se especializan en la retracción y en el soporte de la anémona. D. La estructura de soporte y fijación al sustrato de la anémona, el disco pedio, presenta tejidos musculares (2) que coadyuvan en el movimiento. Tinción H-E. Fotografía y composición por Valdez Peralta I.H. (2018).

## Datos de cnidae

Una pequeña cantidad de tejido ectodérmico se obtiene con la punta de una pinza o un bisturí y se pone una gota de ácido acético al 4% en un portaobjetos. Después de uno o dos minutos se añade una solución de 1:1 agua de mar: glicerina que tiene un par de gotas de fenol y formalina por cada 100 ml de solución. El tejido es cuidadosamente aplastado con un cubreobjetos y se puede sellar con resina. El cnidae puede entonces ser examinado con un microscopio óptico.

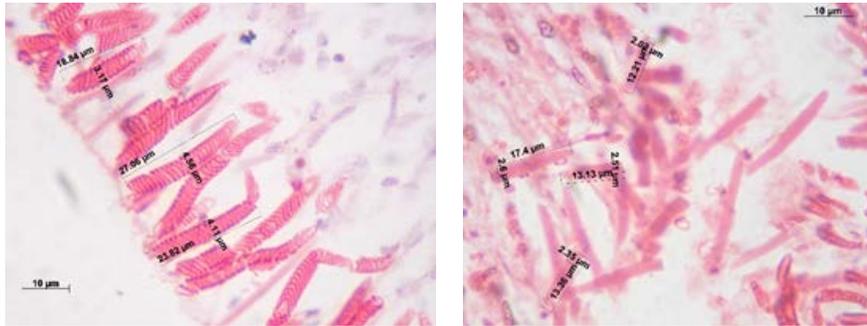


Fig 4. Microfotografías del cnidae de la anémona. Espirocitos en el panel izquierdo. Mastigóforos en el panel derecho.

Fotografía y composición por Cordero Ramos D.I. (2019)

## Instrucciones para el registro de resultados

Registre mediante fotografías todas sus observaciones, complete y reporte la tabla 1 con las principales características registradas, identifique y mida los cnidocitos presentes en el organismo.

## Indicaciones para el desarrollo del informe o reporte

Su reporte deberá contener una breve introducción citando las fuentes que utilizó que deberán ser recientes (no más de 10 años), sus principales observaciones, una discusión de sus resultados dando importancia a investigaciones de este tipo y una conclusión.

## Cuestionario

1. ¿Qué ventajas o desventajas observas en la taxonomía tradicional de anémonas contra la identificación de especies por biología molecular?
2. Menciona tres especies de anémonas que se encuentren en las costas mexicanas.
3. Menciona por lo menos 2 tipos de cnidocistos vistos en la práctica.
4. Menciona un estudio en donde utilicen anémonas que te parezca interesante.

## Bibliografía

- Acuña F, Garese A, Excoffon A, Cortes J. (2013). New Records of Sea Anemones (Cnidaria: Anthozoa) from Costa Rica. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*; 48(1): 177-184.
- Basulto, A., Pérez, V. M., Noa, Y., Varela, C., Otero, A. J., & Pico, M. C. (2006). Immunohistochemical targeting of sea anemone cytolytins on tentacles, mesenteric filaments and isolated nematocysts of *Stichodactyla helianthus*. *Journal of Experimental Zoology. Part A, Comparative Experimental Biology*, 305(3), 253–258.
- Brown, A., Wright, R., Mevenkamp, L., & Hauton, C. (2017). A comparative experimental approach to ecotoxicology in shallow-water and deep-sea holothurians suggests similar behavioural responses. *Aquatic Toxicology*, 191, 10–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.028>
- Cordero Ramos Dulce Ivonne. (2019). Caracterización del cnidoma de la anémona *Bunodosoma* sp. De Tecolutla Veracruz y montaje de la técnica molecular. Servicio Social. Lab. Ecotoxicología. Universidad Autónoma Metropolitana. UAMI.

-  Daly, M., Crowley, L. M., Larson, P., Rodríguez, E., Heestand Saucier, E., & Fautin, D. G. (2017). Anthopleura and the phylogeny of Actinioidea (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria). *Organisms Diversity & Evolution*, 17(3), 545–564. <https://doi.org/10.1007/s13127-017-0326-6>
-  Gadelha, J.R., Morgado, F., & Soares, A. M. V. M. (2013). Histology and histochemistry of sea anemones in environmental contamination studies. *Microscopy and Microanalysis*, 19(S4), 57–58. <https://doi.org/10.1017/s1431927613000901>
-  Gonzalez-Munoz, R., Simoes, N., Sanchez-Rodriguez, J., Rodríguez, E., & Segura-Puertas, L. (2012). First inventory of sea anemones (Cnidaria: Actiniaria) of the Mexican Caribbean. *Zootaxa*, 3556(1), 1-38.
-  Häussermann, V. (2004). Identification and taxonomy of soft-bodied hexacorals exemplified by Chilean sea anemones; including guidelines for sampling, preservation and examination. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 84(5), 931-936.
-  Márquez Ramos José Alberto 2019. Diseño de sistemas experimentales y mantenimiento para el área húmeda del laboratorio de ecotoxicología. Servicio Social. Lab. Ecotoxicología. Universidad Autónoma Metropolitana. UAMI.
-  Matadamas Guzmán F. M. (2019). Patrón celular y tisular en la anémona Budonosoma sp como modelo de regeneración. Proyecto investigación Biología Experimental. Lab. Ecotoxicología. Universidad Autónoma Metropolitana. UAMI.
-  Rodríguez, E., Barbeitos, M.S., Brugler, M.R., Crowley, L.M., Grajales, A., Gusmão, L., Häussermann, V., Reft, A., & Daly, M. (2014). Hidden among sea anemones: the first comprehensive phylogenetic reconstruction of the order Actiniaria (Cnidaria, Anthozoa, Hexacorallia) reveals a novel group of hexacorals. *PloS one*, 9(5), e96998.
-  Valdez Peralta H. I. (2018). Montaje de técnica molecular y tisular en la anémona Bunodosoma sp. Servicio Social. Lab. Ecotoxicología. Universidad Autónoma Metropolitana. UAMI.



## Práctica 8. Extracción del veneno de cnidarios.

### INTRODUCCIÓN

Los Cnidarios, un fascinante filo de invertebrados marinos, abarcan una amplia diversidad de especies, desde los impresionantes corales hasta las enigmáticas medusas. Su denominación, "Cnidarios", deriva de la presencia notable de células especializadas conocidas como cnidocitos, una característica distintiva que define a este grupo taxonómico. Estas células, cargadas de un arsenal químico, desempeñan un papel esencial en la supervivencia y el comportamiento de los Cnidarios, actuando como armas defensivas, herramientas de captura de alimentos y medios de fijación al sustrato.

Los cnidocitos no solo constituyen un recurso estratégico para la supervivencia de estos organismos marinos, sino que también han suscitado un gran interés en el ámbito biomédico. Los venenos producidos por diversos organismos marinos, incluidos los Cnidarios, albergan un potencial significativo para la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos. Estos venenos son verdaderas mezclas de sustancias químicas, principalmente compuestos péptidos y proteínas, que poseen una compleja estructura molecular única en su clase.

La diversidad estructural y bioquímica de los venenos marinos ha despertado el interés de la comunidad científica debido a su capacidad para interactuar con sistemas biológicos específicos. De hecho, se ha demostrado que muchas de estas moléculas venenosas poseen propiedades farmacológicas extraordinarias, que van desde la acción analgésica hasta la actividad antitumoral. La exploración sistemática de los venenos de los Cnidarios y otros organismos marinos promete abrir nuevas fronteras en el descubrimiento de compuestos bioactivos con aplicaciones terapéuticas innovadoras, ofreciendo así una valiosa contribución al campo de la medicina y la biotecnología.

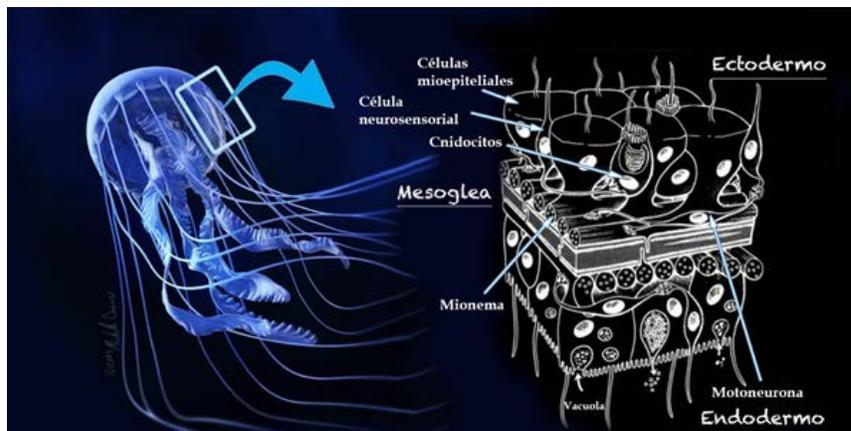


Fig 1. Capas tisulares en cnidarios. Imagen y esquema modificados de Michell (2016), Ruppert et al. (2004) y Ávila-Soria (2009)

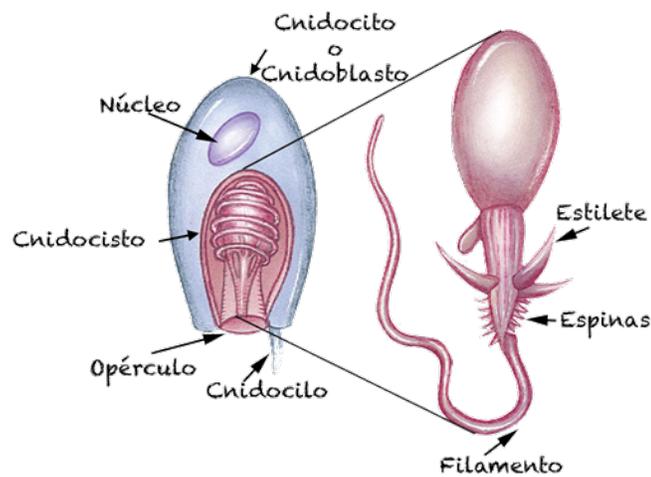


Fig 2. Estructuras del Cnidocito representativo del filo cnidaria (Erin, 2001)

## Objetivo

Que el alumno se familiarice con las células productoras de veneno del filo cnidaria y aprenda las principales técnicas de extracción de veneno, que se utiliza con fines biotecnológicos.

## Materiales

- Estuche de disección
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Celdas de plástico de 1 cm
- Microtubos de 2 ml
- Micropipetas de 100 a 1000 ml
- Puntas para micropipetas

## Reactivos

- Solución de Bradford
- Albúmina sérica bovina
- Hielo seco
- Solución salina de fosfatos
- Agua Mili-Q o destilada

## Equipo

- Microscopio óptico
- Centrífuga refrigerada
- Espectrofotómetro

## Muestras biológicas

Anémonas (proporcionadas por el CIDMIRA-UAM)

## Procedimiento

Extracción de veneno de cnidocistos

1. Anestesiarse a las anémonas con cloruro de magnesio (como se indica en la práctica "Identificación taxonómica de anémonas de mar") para cortar los tentáculos de las anémonas.
2. Homogeneizar los tentáculos congelados en hielo seco con un homogenizador de vidrio, colocar agua ultrapura (Mili-Q) o solución de fosfatos y observar en el microscopio óptico para verificar si la mayoría de los nematocistos están descargados; si no es así, homogeneizar nuevamente hasta que la mayoría de los nematocistos se observen descargados y centrifugar a 20000 x g a 4 °C por 15 min.
3. Cuantificar la proteína que se encuentra en el sobrenadante

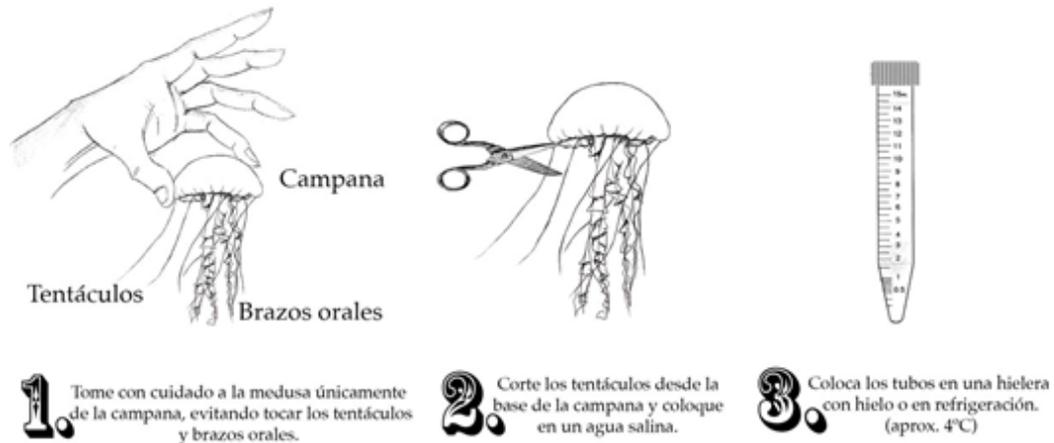


Diagrama elaborado por : M. en C. Mayra Pamela Becerra Amezcua basado en Marchini et al 2004.

Fig 3. Esquema general de procesamiento de medusas para extracción de veneno.

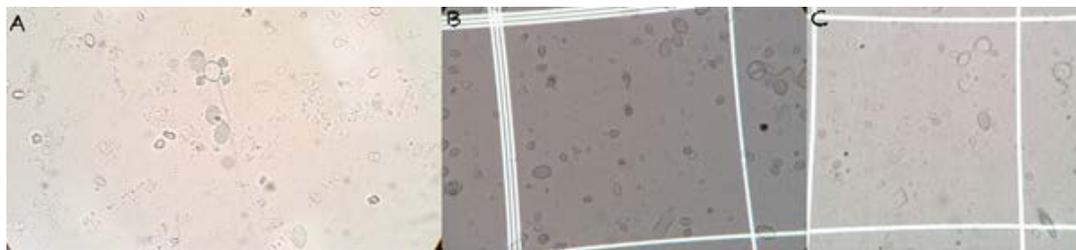


Fig 4. Procesamiento de nematocistos para obtención de veneno. A) Nematocistos con restos celulares B) Nematocistos limpios después de gradiente de Percoll C) Ruptura de nematocistos con perlas de vidrio

#### Elaboración de solución estándar de proteínas y curva patrón para cuantificación de proteínas

1. Para llevar a cabo la cuantificación de proteínas se requiere utilizar una muestra de referencia de alta calidad con la que se realiza una curva patrón o estándar. Esta solución requiere de una concentración conocida de alguna proteína, en general se utilizan Albúmina Sérica Bovina (BSA).
2. Disolver 1 mg de BSA en 1 ml agua y alicuotar en 10 partes. Para corroborar una correcta concentración se deberá medir la absorbancia ( $A_{280}$ ) de la solución estándar en una celda de 1 cm obteniendo el siguiente resultado que ya está estandarizado:

$$A_{280} \text{ Albúmina Sérica Bovina (BSA)} = 0.66$$

3. La curva patrón se obtiene graficando las concentraciones conocidas de BSA contra la Absorbancia de cada concentración y posteriormente ser realiza una regresión lineal para obtener la ecuación de la recta con la que se extrapolan los datos de la muestra y esto nos permite conocer la concentración no conocida o de la muestra,

4. Añadir 1 ml del reactivo de Bradford a los tubos estándar y muestras problemas preparadas como se indica en la Tabla 1. Dejar a temperatura ambiente por 5 minutos y leer Absorbancia a 595nm frente al blanco. El color es estable 1 hora (Este procedimiento se hace por duplicado y el promedio es el que se utiliza para la curva patrón).

**Tabla 1. Curva patrón para cuantificación de proteínas**

Tubos	Reactivos			Resultados	
	Estándar (0.5 mg/ml)	Agua	Reactivo de Bradford	A <sub>595</sub> nm	Concentración
Blanco	0µl	100µl	1ml		
1	25µl	75µl	1ml		
2	50µl	50µl	1ml		
3	75µl	25µl	1ml		
4	100µl	0µl	1ml		
	Muestras				
M1	100µl	0µl	1ml		
M2	100µl	0µl	1ml		

### Instrucciones para el registro de resultados

Elabore en un archivo Excel la curva estándar de proteína graficando la concentración conocida contra la absorbancia obtenida, obtenga la R<sup>2</sup> (si ésta se encuentra cercana a 1, sus datos serán fiables) y la ecuación de la recta  $y=mx+b$  en la que  $y$  = absorbancia;  $x$  = concentración. Con base en estos datos y calcule la concentración de proteína que se encuentra en la muestra.

### Indicaciones para el desarrollo del informe o reporte

Su reporte deberá contener una breve introducción citando las fuentes que utilizó que deberán ser recientes (no más de 10 años), sus principales observaciones, una discusión de sus resultados dando importancia a investigaciones de este tipo y una conclusión.

### Cuestionario

1. Investiga otros métodos de cuantificación de proteínas diferentes a los realizados en esta práctica y menciona ventajas y desventajas de cada uno.
2. Investiga otros métodos de extracción de veneno en cnidarios, mencionando el más utilizado y las razones por las que se utilizan estos métodos.
3. Menciona un ejemplo de alguna investigación en donde se utilizan venenos de cnidarios y sus principales conclusiones.

### Bibliografía

- Ashwood, L. M., Norton, R. S., Undheim, E. A., Hurwood, D. A., & Prentis, P. J. (2020). Characterising functional venom profiles of anthozoans and medusozoans within their ecological context. *Marine Drugs*, 18(4), 202.
- Becerra-Amezcuca, M.P., I. Guerrero-Legarreta, H. González-Márquez & X. Guzmán-García (2016) In vivo analysis of effects of venom from the jellyfish *Chrysaora* sp. in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicon* 113: 49-54. ISSN: 0041-0101 <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.02.008>

-  Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
-  D'Ambra, I., & Lauritano, C. (2020). A review of toxins from Cnidaria. *Marine drugs*, 18(10), 507.
-  Jaimes-Becerra, A., Chung, R., Morandini, A. C., Weston, A. J., Padilla, G., Gacesa, R., ... & Marques, A. C. (2017). Comparative proteomics reveals recruitment patterns of some protein families in the venoms of Cnidaria. *Toxicon*, 137, 19-26.
-  Jouiaei, M., Yanagihara, A. A., Madio, B., Nevalainen, T. J., Alewood, P. F., & Fry, B. G. (2015). Ancient venom systems: a review on cnidaria toxins. *Toxins*, 7(6), 2251-2271.
-  Moore JC, DeVries JW, Lipp M, Griffiths JC, Abernethy DR (2010): Total Protein Methods and Their Potential Utility to Reduce the Risk of Food Protein Adulteration. *Compr Rev Food Sci Food Saf.*; 9: 330-357



## Práctica 9. Análisis de toxicidad del veneno de cnidarios en células sanguíneas de peces.

### Introducción

Los eritrocitos de los peces no solo desempeñan un papel vital en la función circulatoria, sino que también se erigen como biomarcadores sensibles, delineando así la respuesta biológica a la presencia de xenobióticos en el medio ambiente acuático. Los biomarcadores, o marcadores biológicos, son aquellas manifestaciones de alteración inducidas por agentes externos, tales como compuestos químicos de origen antropogénico o venenos animales, que se reflejan en cambios bioquímicos, estructurales o funcionales en los organismos vivos.

En el contexto de los peces, los eritrocitos sirven como centinelas celulares, capaces de detectar y reaccionar ante la presencia de toxinas animales. A pesar de que los parámetros cuantitativos fundamentales de la sangre roja en los peces tienden a mantenerse estables gracias a sus mecanismos compensatorios, ciertos venenos pueden desencadenar una serie de anomalías morfológicas en estas células sanguíneas. Estas anomalías pueden abarcar desde alteraciones nucleares hasta deformaciones celulares, procesos de amitosis e incluso hemólisis.

Por consiguiente, el estudio de los eritrocitos de peces como biomarcadores no solo proporciona una ventana hacia los efectos de los xenobióticos en los ecosistemas acuáticos, sino que también ofrece una estrategia valiosa para abordar y comprender los impactos ambientales y la salud de los organismos acuáticos. La sensibilidad inherente de los eritrocitos de peces ante los venenos animales subraya su relevancia como herramienta de monitoreo en la evaluación de la calidad ambiental y la detección temprana de posibles riesgos para la vida acuática.

### Objetivo

Evaluar la toxicidad de venenos de cnidarios en células sanguíneas de peces.

### Materiales

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Jeringa de 3 ml
- Placa de 96 pocillos
- Micropipeta de 10-100  $\mu$ l
- Micropipeta de 20-200  $\mu$ l
- Puntas para micropipetas

### Reactivos

- Heparina
- Benzocaína
- Solución salina de fosfatos
- Detergente extran

- Alcohol absoluto
- Agua destilada
- Colorante Giemsa

## Equipo

- Microscopio óptico
- Centrifuga
- Cámara de Neubauer

## Muestras biológicas

- Peces para extracción de sangre (proporcionadas por el CIDMIRA-UAMI).
- Veneno de cnidario obtenido en la práctica 8. Extracción de veneno de cnidarios.

## Procedimiento

### Microensayo de hemólisis

La actividad hemolítica será medida usando eritrocitos de *Cyprinus carpio* o un pez de un tamaño parecido para la extracción de sangre. Aproximadamente 1 ml de sangre de pez, mediante punción venosa caudal con una jeringa heparinizada, será colectada de cada pez, los cuales serán anestesiados con 0.001% de benzocaína.

La sangre será lavada tres veces con solución salina de fosfatos (PBS), centrifugando cada vez a 2500g por 15 min. Después de los lavados se realizará una dilución 1:100 para el conteo de eritrocitos en una cámara de Neubauer.

Colocar Alícuotas de células (200  $\mu$ l) en una microplaca de 96 pocillos de fondo plano adicionando diferentes concentraciones de extracto crudo del veneno de cnidario por pozo (0,10, 20, 30, 40 y 60  $\mu$ l), como control positivo de lisis se usará 10  $\mu$ l detergente extran neutro para lavado de material de laboratorio. La placa se incubará por 5 min a temperatura ambiente.

Se realizarán frotis de sangre y se dejarán secar a temperatura ambiente para su fijación con alcohol absoluto durante 1 hora, posteriormente se realizará un lavado con agua destilada para su tinción con colorante Giemsa y se realizarán observaciones en un microscopio óptico para detectar alteraciones celulares.



Fig 1. Ejemplos de principales efectos del veneno en eritrocitos de peces cebra.  
A) Eritrocitos control, B) Equinocitos, C) Hemólisis, D) Poiquilocitosis y E) Anormalidades nucleares.

## Instrucciones para el registro de resultados

Elabore una tabla con sus observaciones, colocando si es una lesión reversible o irreversible, documenta con fotografías y discute tus resultados.

## Indicaciones para el desarrollo del informe o reporte

Su reporte deberá contener una breve introducción citando las fuentes que utilizaste que deberán ser recientes (no más de 10 años), sus principales observaciones, una discusión de sus resultados dando importancia a investigaciones de este tipo y una conclusión.

## Cuestionario

1. Menciona las ventajas que tiene utilizar células sanguíneas de peces contra células sanguíneas de humanos. Argumenta tu respuesta con literatura.
2. Menciona otros biomarcadores celulares utilizados en estudios toxicológicos.
3. Investiga y menciona otro estudio de venenos animales en donde utilicen células sanguíneas.

## Bibliografía

-  Becerra-Amezcu, Mayra Pamela, Hernández-Díaz, Misael, López-Vite, Saúl Abraham, Hernández-Calderas, Irma y Guzmán-García, Xochitl (2018) Eritrocitos de peces como biomarcadores para evaluar el efecto de sustancias tóxicas. En: Ramírez-Romero, Patricia, et.al. Contribuciones al Conocimiento de la Ecotoxicología y Química Ambiental en México. Volumen 2.
-  Banagouro, K. C. Q., et. al. (2022). Biochemical and toxinological characterization of venom from macrorhynchia philippina (Cnidaria, Hydrozoa). BioMed Research International, 2022.
-  Colom-Casasnovas, A., Garay, E., Cisneros-Mejorado, A. et al. (2022) Sea anemone *Bartholomea annulate* venom inhibits voltage-gated Na<sup>+</sup> channels and activates GABAA receptors from mammals. *Sci Rep* 12, 5352. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09339-x>
-  Diaz-Garcia, C. M. et al. (2012) Toxins from *Physalia physalis* (Cnidaria) raise the intracellular Ca<sup>2+</sup> of beta-cells and promote insulin secretion. *Curr. Med. Chem.* 19, 5414–5423.
-  Evans, G. O. (2008). *Animal Hematotoxicology: A Practical Guide for Toxicologists and Biomedical Researchers*, CRC Press
-  Nisa, S. A., Vinu, D., Krupakar, P., Govindaraju, K., Sharma, D., & Vivek, R. (2021). Jellyfish venom proteins and their pharmacological potentials: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 176, 424-436.
-  Padros, F. (2005). *Manual de técnicas básicas de diagnóstico patológico en peces*. Ed. Universidad Autónoma de Barcelona. V Curso de Ictiología Práctica para Piscicultores. P. 1-62
-  Santhanam, R. (2020). *Biology and ecology of venomous marine Cnidarians* (pp. 1-5). Singapore:: Springer.
-  Zeits, M. Y Sens, P. (2012). Reversibility of red blood cell deformation. *Physical Review E*, 85(5), 051904.



## Práctica10. Macroinvertebrados indicadores de la calidad del agua

### Introducción

Los macroinvertebrados acuáticos son aquellos organismos adheridos a vegetación acuática, troncos y rocas sumergidas, entre otros, en el fondo de ríos y lagos. Se pueden observar a simple vista, ya que su tamaño es superior a los 0.5 mm. Las poblaciones de macroinvertebrados están principalmente conformadas por organismos que desarrollan todo su ciclo de vida en el agua, como platelmintos, insectos, crustáceos y moluscos. Estos organismos presentan diferentes niveles de sensibilidad frente a perturbaciones de los sistemas, por lo que la abundancia o carencia de ciertos taxa nos puede dar un indicio el estado de salud de un cuerpo acuático. Además, estos organismos integran los cambios del ambiente que se producen a lo largo de su vida, a diferencia de los parámetros fisicoquímicos que solo reflejan cambios momentáneos. Por todo ello, a nivel mundial, se han utilizado los macroinvertebrados acuáticos, especialmente los insectos, como indicadores de la calidad de ecosistemas acuáticos (ríos, lagos o humedales), por lo que se les denomina como bioindicadores.

Las actividades humanas como la agricultura, la expansión residencial, el desarrollo de embalses, así como las alteraciones hidrológicas de los cuerpos de agua pueden cambiar las condiciones ambientales del agua y afectar así la presencia de macroinvertebrados acuáticos en consecuencia, la contaminación de las cuencas hídricas produce pérdida de biodiversidad teniendo implicaciones, como disminución de la resiliencia, simplificación del sistema y pérdida de integridad ecológica. Los científicos han clasificado a cada macroinvertebrado con relación a su sensibilidad a las perturbaciones del ambiente. Es por ello que se han desarrollado diferentes métodos por los que se cuantifican los diferentes taxa presentes en los cuerpos acuáticos para evaluar su estado de salud. Algunos ejemplos son el Índice de diversidad de Brillouin (HB), el Análisis EPT (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera) y el Índice Biótico de Hilsenhoff (IBH).

### Objetivo

Utilizar el Índice EPT para evaluar el estado de salud del río Amacuzac, Morelos utilizando la información de su muestreo.

### Materiales

- Etiquetas
- Cinta adhesiva
- Pluma
- Marcador permanente
- Frascos de diversos tamaños
- Pinzas planas
- Parafilm
- Tijeras
- Charola

### Reactivos

Alcohol 70% y 80%

## Equipo

Microscopio estereoscópico

## Muestras biológicas

Macroinvertebrados colectados

## Procedimiento

Muestreo de los macroinvertebrados

Se establecieron tres zonas de referencia en el río Amacuzac, Morelos con coordenadas Latitud 19° 13' 12" N y longitud 99° 42' 36" W. Mediante la observación de microambientes. Posteriormente se tomaron muestras de las diferentes zonas con red surver, red marco y red de pateo, estas se sumergían mientras que las rocas eran limpiadas para obtener mayor cantidad de organismos, ya obtenidos los organismos se fijaron en alcohol al 80% y se les colocó su respectiva etiqueta externa e interna con el fin de mantener el orden de las muestras.

## Limpieza y separación de muestras biológicas

Las muestras biológicas se deben conservar en alcohol etílico al 80%, la cantidad del alcohol debe ser suficiente o sobrepasarse un poco de la muestra colectada (3 veces el volumen de la muestra). Cada frasco de plástico debía contener una etiqueta exterior e interior con los datos específicos de cada punto de muestreo.

Para la limpieza y separación de las muestras se colocó una pequeña porción de la muestra en una caja de Petri cuadrículada y se analizó en un microscopio estereoscópico Modelo Stemi 2000-C Zeiss. La materia orgánica se removió cuidadosamente de un extremo a otro, hasta asegurarse de que no quedaran organismos. Se debe tener cuidado ya que algunos organismos pueden pasar inadvertidos, ya sea por su tamaño o por estar camuflados con los restos de vegetación o sustratos minerales.

## Identificación de macroinvertebrados

Los organismos de cada muestra se separaron por su morfología externa general, posteriormente se identificó la familia a la que pertenecían basado en diferentes referencias (Anexo 1).

La identificación de los organismos debe ser hasta nivel taxonómico más bajo posible, sin embargo; en la mayoría de los casos solo se clasificaron hasta familia.

Tabla 1. Cuantificación de los macroinvertebrados

Clasificación	Abundancia	EPT Presentes
Anisoptera		
Bivalvia	3	
Baetidae	25	25
Ceratopogonidae	3	
Chironomidae	13	
Corydalidae	3	
Elmidae	22	
Euthyplociidae	4	4
Gastropoda		
Glossosomatidae	2	2
Gordioidea		
Hirudinea		
Hydrachnidae		
Hydrobiosidae	5	5
Hydropsichidae	30	30
Leptoceridae	10	10
Leptohyphidae	5	5
Leptophlebiidae		
Naucoridae		
Oligochaeta		
Oligoneuridae	2	2
Perlidae	1	1
Philopotamidae	6	6
Psephenidae	8	
Ptilodactylidae	2	
Pyralidae	6	
Simuliidae		
Tipulidae		
Turbelaria		
Veliidae		
Zygoptera		
Otros grupos	8	
<b>Total</b>	<b>158</b>	<b>90</b>

Tabla 2. Clasificación de la calidad del agua de acuerdo con el Índice EPT

Calidad del agua	Valor del Índice
Muy Buena	75 - 100%
Buena	50 - 74%
Regular	25 - 49%
Mala	0 - 24%

## Instrucciones para el registro de resultados

Utilice la tabla 1 como base para calcular el índice EPT. Divida el total de EPT Presentes entre el total de Abundancia de Individuos, este es el valor de la relación de Ephemeropteras, Plecopteras y Trichopteras (EPT) presentes en la muestra. Multiplique este valor por cien para sacar el porcentaje. Finalmente, use la tabla 2 para determinar el estado de salud del río Amacuzac, Morelos. Investiga si utilizando estos datos puedes utilizar otro índice para evaluar la salud del río Amacuzac.

## Indicaciones para el desarrollo del informe o reporte

Su reporte deberá contener una breve introducción citando las fuentes que utilizaste que deberán ser recientes (no más de 10 años), sus principales observaciones, una discusión de sus resultados dando importancia a investigaciones de este tipo y una conclusión.

## Cuestionario

1. Define a un macroinvertebrado
2. Menciona porqué se utilizan a los macroinvertebrados como bioindicadores
3. Menciona al menos dos índices utilizados para evaluar la condición de salud de un cuerpo acuático

## Bibliografía

- Blahnik, R. J., & Holzenthal, R. W. (2008). Revision of the Mexican and Central American species of *Mortoniella* (Trichoptera: Glossosomatidae: Protoptilinae). *Zootaxa*, 1711(1), 1-72.
- Bueno-Soria, J. (2010). Guía de identificación ilustrada de los géneros de larvas de insectos del orden Trichoptera de México. [Illustrated identification guide to the genera of insect larvae of the order Trichoptera in Mexico]. National Autonomous University of Mexico, México City, 228.
- Carrera, C. y Fierro, K. (2001) Manual de monitoreo: los macroinvertebrados acuáticos como indicadores de la calidad del agua. Eco-Ciencia. Quito.
- Chun S. et al., (2017) Analysis and prediction of the spatial distribution of EPT (Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera) assemblages in the Han River watershed in Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 20(2): 613-625.
- Gutiérrez-Fonseca P. E. y A. Ramírez. (2016) Evaluación de la calidad ecológica de los ríos en Puerto Rico: principales amenazas y herramientas de evaluación. *Hidrobiológica* 26 (3): 433-441.
- Lopez Mendoza S., et al., (2019) Macroinvertebrados acuáticos como indicadores de calidad del agua del río Teusacá (Cundinamarca, Colombia). *Ingeniería y Desarrollo*, 37 (2): 269-288.
- Merritt, R. W., & Cummins, K. W. (Eds.). (1996). An introduction to the aquatic insects of North America. Kendall Hunt.

-  Moreno, C. E. (2001). Métodos para medir la biodiversidad. M&T–Manuales y Tesis SEA, vol. 1. Zaragoza, 84 pp.
-  Okoye, C. O., Echude, D., Chiejina, C. O., Okoye, K. C., Eze, M. N., & Ezeonyejaku, C. D. (2021). Macroinvertebrates as bioindicators of water quality assessment in a tropical stream. *Int. J. of Aquatic Science*, 12(2), 3552-3561.
-  Orozco-González, C. E., & Ocasio-Torres, M. E. (2023). Aquatic macroinvertebrates as bioindicators of water quality: a study of an ecosystem regulation service in a tropical river. *Ecologies*, 4(2), 209-228.
-  Sabha, I., Hamid, A., Bhat, S. U., & Islam, S. T. (2022). Water quality and anthropogenic impact assessment using macroinvertebrates as bioindicators in a stream ecosystem. *Water, Air, & Soil Pollution*, 233(9), 387.
-  Sajamí Reymundo, Janet Isabel, & Huamantínco Araujo, Ana Asunción. (2016). Distribución espacial de Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera y Coleoptera (Insecta) en una quebrada de primer orden, bosque montano, Junín, Perú. *Revista Peruana de Biología*, 23(2), 95-102. <https://dx.doi.org/10.15381/rpb.v23i2.12377>



## ANEXO 1

### Clasificación de Macroinvertebrados según su sensibilidad

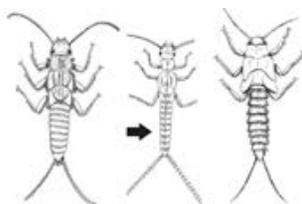
Adaptado de Maryland Department of Natural Resources; Resource Assessment Service 2004

#### Organismos Sensibles

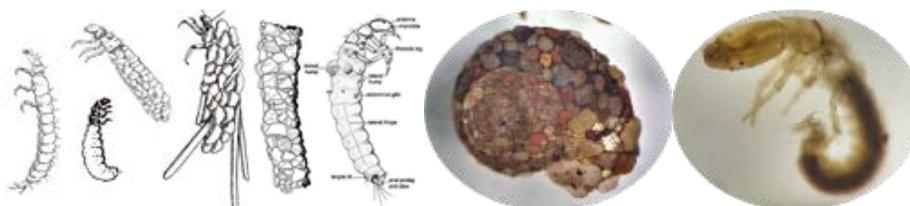
Organismos sensibles a la contaminación, se encuentran en el agua de buena calidad.



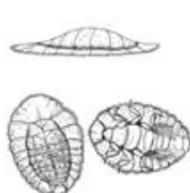
Mayfly\* (Mosca de Sábalo o efímera): Orden Ephemeroptera- Branquias en forma de placas o plumosas a los lados de la parte inferior del cuerpo (flecha); tres (a veces 2) delgadas colas.



Stonefly\* (Mosca de piedra o plecópteros): Orden Plecoptera- Dos colas delgadas. Seis patas articuladas con dos puntas en forma de gancho. Grandes antenas, sin branquias en la parte inferior (flecha)



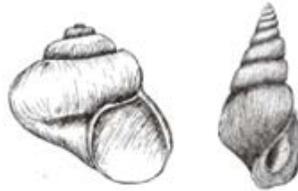
Caddisfly\* (tricoteros o frigáneas): Orden Trichoptera- Seis patas articuladas y ganchudas justo detrás de la cabeza; 2 ganchos en la parte trasera; puede estar en un estuche hecho de piedras, hojas o palos.



Water Penny (Escarabajos monedas de agua): Orden Coleoptera- con forma de un pequeño disco con 6 patas diminutas abajo; rastreador lento.



Hellgrammite y Fishfly\* (coridálidos): Orden Megaloptera- color oscuro, 6 patas, mandíbulas pellizas grandes, 8 pares de antenas en la mitad inferior del cuerpo con mechones de agallas algodonadas pareadas a lo largo del envés (flecha), antena corta, 2 colas y 2 parejas de ganchos en el extremo del lomo.

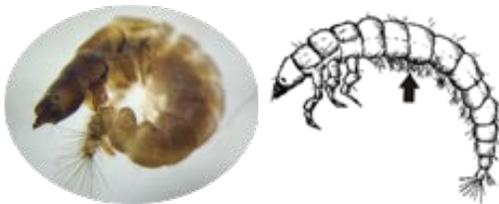


Caracoles: Clase Gastropoda- La apertura de la concha está cubierta por un plato fino se llama operculum. La concha usualmente se abre a la derecha.

Organismos moderadamente sensibles a la contaminación que se encuentran en el agua de buena calidad o poca calidad.

Net-spinning Caddisfly\* (tricopteros): Orden Trichoptera-

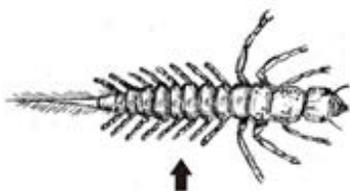
Organismos moderadamente sensibles



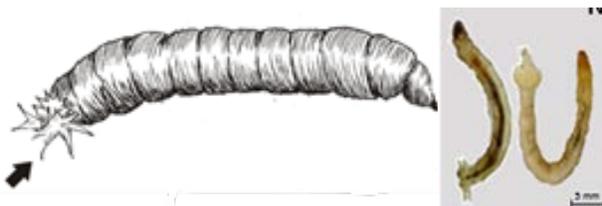
Seis patas articuladas y ganchudas justo detrás de la cabeza; 2 ganchos en la parte trasera. Tiene un copete de agalla mullida en su mitad inferior (flecha).

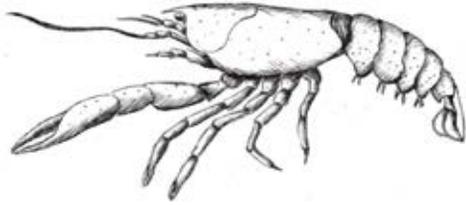
Alderfly\* (siálidos): Orden Megaloptera- seis patas

articuladas; mandíbulas pellizcadoras; muchas antenas puntiagudas a lo largo del borde del cuerpo (flecha); cola larga al final.

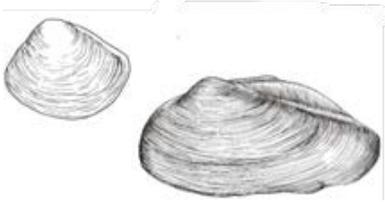


Crane Fly\* (Tipuloidea): Orden Diptera- Como un gusano; sin piernas articuladas; cabeza escondida dentro del cuerpo de color marrón claro; 4 lóbulos en forma de dedos en la parte posterior (flecha)

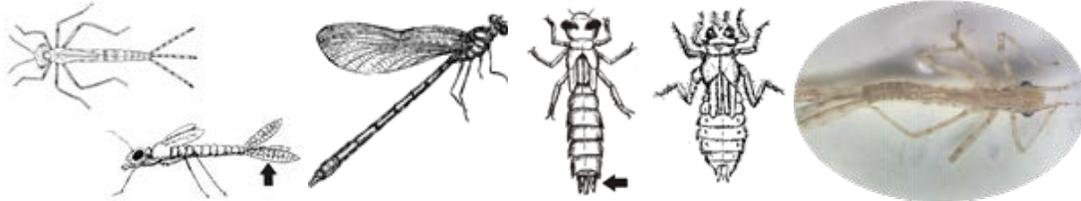




Cangrejo de Río: Orden Decapodo- Hasta 6", 2 pinzas grandes, 8 patas, parece a una langosta pequeña.



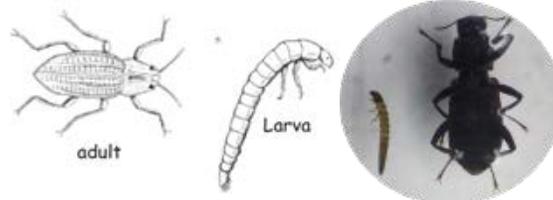
Almejas: Clase Bivalvia - Dos conchas unidas por un músculo abductor.



Damselfly (caballitos del diablo) y Dragonfly (libélulas): Orden Odonata- ojos grandes, 6 finas patas enganchadas, 3 colas anchas con forma de romo, Postura de trípode. Liso (sin agallas) en los la dos de la mitad inferior del cuerpo. Las libélulas generalmente tienen un cuerpo más grueso y más corto que los caballitos del diablo, que son delgados.



Scud (Anfípodo): Orden Amphipoda- color de blanca a gris. Nada de lado, posee más de 6 patas, se le parece a un camarón pequeño.



Riffle Beetle (Larva de Escarabajos): Orden Coleoptera- color claro, 6 patas en la mitad superior del cuerpo, antenas

\*Nota: Todos estos organismos de la Clase Insecta son muestreados en su forma larvaria.

### Organismos tolerantes

Organismos tolerantes a la contaminación se encuentran en cualquier calidad de agua.



Black fly\* (moscas negras): Orden Diptera- cabeza negra con cerdas diminutas para filtrar los alimentos (flecha); ventosa en el extremo; sin piernas articuladas.



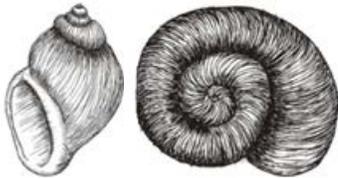
Non-biting Midge\* (quironómidos): Orden Diptera- cabeza oscura; cuerpo blanco, gris o rojizo; cuerpo segmentado parecido a un gusano; 2 pequeñas patas sin articulaciones en ambos extremos (flecha)



Leech (Sanguijuelas): Orden Hirudinea-, marrón, cuerpo viscoso, Ventosas viscosas de color marrón o gris en ambos extremos (flecha).



Aquatic worm (Gusano acuático): Clase Oligochaeta- puede ser muy pequeño; cuerpo fino parecido a un gusano.



Pouch Snail (Caracol Pouch) y Ramshorn Snails (Caracoles del lago): Clase Gastropoda- Sin operculum. Respira aire. Concha abre usualmente a la izquierda en el caracol Pouch, mientras que el caracol de lago tiene la concha enrollada en un plano.

## Agradecimientos

Las autoras de este manual agradecemos el apoyo en la edición y contenido del presente manual a la Dra. Meztli Matadamas Guzmán, así como a la Hidrobióloga Berenice Mendoza Cruz, al Hidrobiólogo Saúl López Vite y al Biólogo Experimental Fernando Misael Matadamas Guzmán; por su apoyo en la implementación y estandarización de las técnicas de rutina y especiales en organismos acuáticos y experimentales, así como su apoyo en la escritura y aportación a este manual.

De manera análoga, agradezco el entusiasmo de los alumnos egresados de las UEAs Zoobentos y Fisiología de organismos acuáticos, a los colaboradores de servicio social y alumnos que han desarrollado su proyecto de investigación por sus múltiples contribuciones desde las primeras etapas del proyecto CIDMIRA-UAMI (2017), el cual que ha permitido adquirir mucha experiencia y el permiso para el manejo de organismos in vivo. A Nuestra Universidad y a las autoridades y al Hbiol. Israel Miranda Valencia por el apoyo en el registro del PIMVS-CIDMIRA , UAMI, a través del cual ha sido posible el desarrollo del programa de manejo de organismos acuáticos y su incidencia en docencia-investigación. Gracias a ello hemos podido participar con proyectos de difusión de la cultura como los Encuentros con la ciencia en Tecolutla, Ver.

Asimismo, agradecemos el apoyo que nos ha brindado el CONAHCYT a través de los proyectos: Biomarcadores de Vulnerabilidad al Cambio Climático utilizados en proyectos de restauración (2022-2024) y Moléculas bioactivas y biomarcadores ecotoxicológicos en la anémona Bunodosoma sp. para su uso biotecnológico (2023-2025).





Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud



**Av. San Rafael Atlixco No.186, Col. Vicentina  
C.P. 09340, Del. Iztapalapa, México D.F.  
Tel.: (01) 58044600**