

**PRÁCTICA NÚMERO 1**  
**MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE NEMATODOS**

**M.Sc Alejandro Esquivel H**

**MANEJO Y CUIDADO DE LAS MUESTRAS**

**E**l manejo y cuidado de la muestra entre la recolección y el proceso de extracción, es un aspecto que no se debe descuidar. El período de almacenamiento debe ser en lo posible muy corto, sin embargo, cuando se esta en sitios alejados y la muestra no puede ser enviada en forma inmediata al laboratorio, los dos parámetros más importantes que se deben cuidar durante el almacenamiento y transporte son la temperatura y la humedad.

Para evitar el secado y mantener la humedad, es recomendable empacar las muestras (suelo, raíces o cualquier otro sustrato) en bolsas plásticas bien cerradas; nunca exponiéndolas directamente al sol o en contacto con equipos que generen temperaturas elevadas. Lo más recomendable es almacenarlas en cajas o contenedores térmicos (figura 1). Algunos estudios han demostrado que el uso de cajas de estereofón o hieleras, permite recuperar hasta 3 veces más especímenes, en relación a muestras almacenadas por dos semanas en contenedores no aislados. Muestras vegetales (raíces, tallos, bulbos, etc) se pueden almacenar por unos días en el refrigerador a una temperatura entre 5 – 7 grados Celsius.

Un manejo inapropiado durante el transporte, almacenamiento y extracción, puede ocasionar un alto porcentaje de mortalidad, dando como resultado datos equivocados en relación a las densidades de población, lo que puede incidir directamente en un manejo oportuno del problema.



**Figura 1.** Almacenamiento y envío de muestras al laboratorio en un contenedor de aislamiento térmico (hielera).

## MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

**H**ay varios métodos de extracción de nematodos usados en forma rutinaria en los laboratorios de nematología. La selección del método de extracción depende de varios factores: objetivo del estudio, eficiencia deseada, equipo disponible y condición de la muestra entre otros. Hay que tener presente que ningún método de extracción disponible hoy día, es capaz de remover el 100 % de los nematodos presentes en la muestra, por lo que hay elegir aquel con las menores deficiencias. Con la finalidad de determinar las poblaciones de nematodos en una muestra dada, es de suma importancia contar con un laboratorio de referencia, donde se utilice una técnica estándar de extracción. Cuando se envían muestras cruzadas a distintos laboratorios, se debe tener presente, que los métodos de extracción pueden variar y como consecuencia el resultado final.

Hay dos procesos básicos mediante los cuales los nematodos pueden ser removidos del suelo o del material vegetal. Uno de ellos depende de la movilidad de los nematodos para su extracción, mientras que el otro es capaz de extraer formas inactivas y estados no móviles, mediante una corriente de agua ascendente, o por medio de una solución de gravedad específica superior a los fluidos del nematodo. Todas las técnicas de extracción están basadas en estos procesos o combinación de ambos, lo importante es elegir el método adecuado de acuerdo con los objetivos del estudio. Algunas técnicas de extracción utilizadas en los laboratorios de nematología son las siguientes: embudo de Baerman, técnica de cribado y centrifugación en solución azucarada, método de cribado y decantación de Cobb, elutriador de Oostenbrink, aparato de Fenwick para extracción de quistes, etc. Lo importante es elegir el método más adecuado, según los objetivos propuestos con el muestreo.

A continuación se describe y discute dos métodos de extracción muy utilizados rutinariamente en los laboratorios de nematología: embudo de Baerman y la técnica de cribado y centrifugación en solución azucarada.

## EMBUDO DE BAERMAN

Un buen ejemplo, en donde se requiere que los nematodos se muevan a través de la muestra para su extracción, es el embudo de Baermann. Existen varias modificaciones del método original, en donde básicamente han sido reemplazados algunos componentes por otros más eficientes.

Los requerimientos básicos de esta técnica consisten en un embudo de vidrio o de plástico de tamaño mediano. En su parte inferior se le ajusta una manguera de hule suave, que se cierra mediante una pinza de presión tipo mohr.

El embudo se coloca en un soporte y se llena con agua potable. Posteriormente, pequeñas cantidades de suelo (50 – 100 cc), material vegetal u otro tipo de materia orgánica, son colocadas dentro de una bolsa de tela porosa o papel, la cual se sumerge suavemente en el agua del embudo. Una de las variantes que se puede implementar consiste en colocar a pocos milímetros del borde superior del embudo, un cedazo o malla de alambre cuya función es soportar la muestra, la que es vertida sobre tela o papel, cuya consistencia, textura y porosidad puede variar.



**Figura 2.** Embudo de Baerman mostrando sus principales componentes.

La técnica del embudo de Baermann modificado según Christie y Perry, (**figura 3**) consiste en suspender el suelo en un determinado volumen de agua, y después de un corto período de reposo, la suspensión se vierte sobre un juego superpuesto de cribas de 100 y 400 mallas. El suelo retenido en la criba más fina, se transfiere a un cilindro con fondo de tela, que posteriormente se coloca en el embudo. Después de 24 a 48 horas, todas las formas activas de nematodos han pasado a través de la tela o papel y pueden ser recogidas en un pequeño volumen de agua al retirar la pinza mohr de la manguera.



1. Submuestra de 100 cc de suelo.



2. Dos lavados de 30 s de suspensión de la submuestra.



3. Tamizado a través de dos tamices de 100 y 400 mallas



4. Suelo a un cilindro de "PVC" con un fondo de tela o papel.



5. El cilindro se coloca en el embudo de Baermann procurando que el papel haga contacto con el agua

**Figura 3.** Método de extracción de nematodos mediante la técnica de embudo de Baerman modificado.

Entre las ventajas de este método están el bajo costo y lo portabilidad del equipo, mientras que dentro de las desventajas se pueden citar la dependencia del método de la movilidad de los nematodos, que difiere entre especies y estados del ciclo de vida, la cual además puede ser afectada desde que la muestra es tomada en el campo.

La carencia de oxígeno, especialmente en la base del embudo donde los nematodos son colectados y el problema de que estos se alojan en las paredes inclinadas del mismo, son otras desventajas del método. Sin embargo, estos inconvenientes pueden ser superados, sustituyendo el embudo por una palangana pequeña y colocando la muestra en el papel toalla o tela dentro de un cilindro de PVC de 17 cm de diámetro con fondo de malla. Es importante sujetar al fondo del cilindro de PVC un par de alambres, la separación de unos milímetros del fondo de la palangana, favorece el paso de los nematodos a través del papel filtro. La palangana debe de contener un volumen de agua suficiente que haga contacto con la muestra colocada en el papel filtro (figura 4). Todas las formas activas de nematodos son recuperadas después de 18 a 24 horas. La eficiencia del método depende entre otras cosas, de la movilidad de los nematodos y el tipo papel filtro o tela utilizada.



**Figura 4.** A) Cilindro de PVC, palangana plástica, papel filtro, B) Bandeja ensamblada y C) Bandeja ensamblada con muestra de suelo.

## TÉCNICA DE CENTRIFUGACIÓN-FLOTACIÓN

La técnica fue introducida por Caveness y Jensen (1955), quienes mezclaron y centrifugaron pequeñas muestras de suelo (<4ml) con agua. Posteriormente mediante una segunda centrifugación en solución de azúcar, los nematodos eran recuperados del suelo. El principio de la técnica, es la recuperación de los nematodos por flotación, mediante soluciones de gravedad

específica superior a los fluidos del nematodo. Por el bajo costo, en la mayoría de laboratorios se utilizan soluciones preparadas con azúcar de caña, sin embargo, soluciones de sulfato de magnesio y sulfato de zinc también pueden ser utilizadas. Cuando se trata de suelos arcillosos, es recomendable agregar a la muestra algún tipo de detergente (metafosfato de sodio, carbonato de sodio) que ayude a la dispersión de las partículas de arcilla y favorezca la extracción de los nematodos. De lo contrario muchos nematodos pueden quedar atrapados en los agregados del suelo.

El estrés osmótico ocasionado por estas soluciones puede matar o distorsionar los nematodos, por lo tanto es necesario enjuagarlos con suficiente agua para ayudar a la recuperación. Actualmente la técnica, es utilizada rutinariamente en muchos laboratorios, debido especialmente a que es efectiva para extraer huevos, estados inmóviles, formas inactivas y nematodos muertos. Además es un método rápido, que permite procesar y leer gran cantidad de muestras en pocas horas. Ligeras modificaciones se pueden encontrar en la literatura, en relación al arreglo de los tamices, número de lavados, tiempo y velocidad de centrifugación, y gravedad específica de la solución extractora.

## **Procedimiento**

1. Tomar una alícuota de suelo (100 gr) bien homogeneizado. Eliminar las raíces, piedras y otros desechos
2. Colocar la muestra en una cubeta y lavarla directamente bajo un chorro de agua a presión, la cantidad de agua agregada no debe superar la mitad de la misma
3. La suspensión resultante se agita bien y se deja reposar alrededor de 30 segundos.
4. Posteriormente se procede a decantar la solución sobre un juego de tamices superpuesto de 100 y 400 mallas. La operación se puede repetir una vez más con el suelo remanente en la cubeta
5. Con la ayuda de un frasco lavador (pizeta) los residuos retenidos en la criba de 400 mallas se transfieren a tubos de centrifuga de 50 ml, con el cuidado de que éstos una vez colocados en la centrifuga queden balanceados.

6. Se procede a centrifugar de 4 a 5 minutos alrededor de 3000 r.p.m. Se decanta cuidadosamente el sobrenadante y se agrega una solución de azúcar (484 gr. de azúcar de caña y aforar a un litro).
7. Se resuspende nuevamente el suelo y se centrifuga a la misma velocidad de 1.5 a 3 minutos.
8. El sobrenadante que contiene los nematodos es vertido sobre una criba de 400 mallas, y el exceso de azúcar adherida a los nematodos, es removido lavando con suficiente agua. Por último, se transfieren a un plato de conteo o siracusa para su examen. Por medio de esta técnica se pueden recuperar prácticamente todos los tipos de nematodos del suelo, y el proceso entero puede realizarse en menos de 10 minutos.



1. Una vez homogenizada y cuarteada la submuestra se procede a pesar 100 cc de suelo.



2. La submuestra de 100 cc de suelo es colocada en un balde.



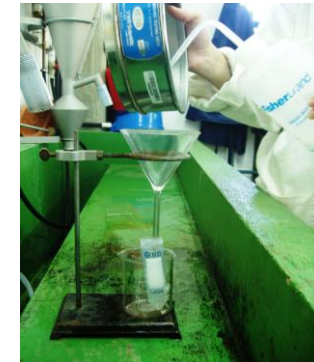
3. Se adiciona agua hasta llenar unos  $\frac{3}{4}$  del balde con el objetivo de suspender la submuestra de suelo. Una vez lleno el balde la submuestra se deja en reposo 30 s. Este paso se realiza dos veces.



4. Transcurridos los 30 s la submuestra de suelo es pasada a través de un juego de tamices supersupestos de 100 y 400 mallas respectivamente.



5. Con la ayuda de la mano se agita los tamices para un mejor paso de la suspensión.



6. Recoger en un tubo de ensayo toda la muestra de suelo que haya quedado en el tamiz de 400 mallas





7. Centrifugar durante 3 min a 3000 rpm.



8. Descartar el sobrenadante y dejar la muestra de suelo.



9. Adicionar una solución extractora a base de azúcar con una densidad específica de 1.18.



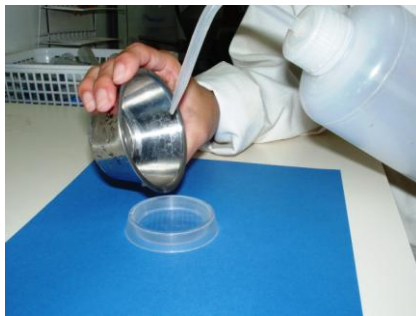
10. Centrifugar nuevamente a 3 min a 3000 rpm.



11. Los nematodos son recuperados en un tamiz pequeño de 400 mallas.



12. Se elimina el exceso de azúcar que pueda dañar los nematodos.



13. Finalmente, los nematodos son recuperados en una cajita de conteo.

Fig. 5. Extracción de nematodos por el método de tamizado y centrifugación azucarada.

## EXTRACCIÓN DE NEMATODOS DE MATERIAL VEGETAL

**A**lgunas de las técnicas ya discutidas pueden ser utilizadas para la extracción de nematodos de material vegetal. Así por ejemplo, el empleo del embudo de Baermann o el método de centrifugación-flotación son recomendables para la extracción de nematodos endoparásitos migratorios.

El examen directo en el estereoscopio a baja magnificación, es otra técnica que se emplea para pequeñas cantidades de material vegetal. La técnica es muy sencilla, y consiste primero en lavar las raíces suavemente de todo resto de suelo. Posteriormente, las raíces son trasladadas a placas petri, siracuzas o vidrios reloj, a los que previamente se les ha adicionado una pequeña cantidad de agua. Con la ayuda de agujas de disección, el material se va rasgando cuidadosamente para liberar a los nematodos. Los nematodos liberados flotan y pueden ser recolectados con una microaguja o una micropipeta. Al igual que con el suelo, las raíces deben mantenerse a una temperatura y humedad adecuada y examinarse tan pronto como sea posible.

La maceración de tejidos con ayuda de una licuadora es otra técnica adecuada para la obtención de nematodos endoparásitos. Se toman aproximadamente **10 gr. de raíces**, se cortan en trozos de 2 a 3 cm de longitud y se colocan dentro de una licuadora. Se agrega cierta cantidad de agua y dependiendo de la dureza del material, se licua a máxima velocidad de 20 a 60 seg. La suspensión resultante se vierte sobre un juego de cribas de 100 y 400 mallas. Los nematodos junto con los desechos vegetales retenidos en la criba más fina, son trasladados al embudo de Baermann, en donde se logra la separación final. Una vez macerado el tejido en la licuadora, otra opción es extraer los nematodos con la técnica de centrifugación en solución azucarada, similar a lo explicado para las muestras de suelo.

En la figura 6, se ilustran otras técnicas utilizadas en la extracción de nematodos. El elutriador de Oostenbrink y el método de cribado y decantación de Cobb, se basan en la velocidad de asentamiento de las partículas de suelo suspendidas en agua, respecto a la de los nematodos.



**Figura 6.** Extracción de nematodos de suelo por la técnica del elutriador de Oostenbrink (A) y la técnica de cribado y decantación de Cobb (B).