

## Anexo 1.

### Protocolo de análisis de fitoplancton. Laboratorio de fitoplancton y Fitobentos, Centro EULA

 <b>Universidad de Concepción</b>	<b>ANALISIS DE FITOPLANCTON</b>	
Código: LEE-MET-504-80	versión 3	Página: 1 de 6

#### 1 Objetivos

##### 1.1. Objetivo general:

Analizar cualitativa y cuantitativamente muestras de fitoplancton provenientes de ecosistemas continentales (ríos, lagos, lagunas, humedales) y marinos.

##### 1.2. Objetivos específicos:

- Identificar taxonómicamente las algas presentes en las muestras (análisis cualitativo).
- Cuantificar la abundancia de las especies y/o géneros de algas del fitoplancton (número de células por volumen) correspondiente a un análisis cuantitativo.
- Contribuir con el conocimiento de las especies de microalgas presentes en los ecosistemas acuáticos continentales y marinos de Chile.

#### 2 Alcance

Muestras de fitoplancton provenientes de ecosistemas continentales (ríos, lagos, lagunas, humedales) y marinos.

#### 3 Definiciones

**Cámara de conteo:** Recipiente especial de volumen conocido, utilizado para la cuantificación de organismos en microscopio óptico, convencional o invertido.

**Senobio o colonia:** Organismo formado por un conjunto de células que no tienen intercambio de material o información en forma directa. En las cianobacterias, clorofíceas y otras clases de algas, las células de las colonias generalmente no se tocan y están embebidas en una matriz mucilaginosa común. Pueden tener variadas formas de acuerdo al plano de división de las células.

**Fitoplancton:** conjunto de microorganismos acuáticos autótrofos del plancton, que tienen capacidad fotosintética y que viven dispersos en la columna de agua de diversos ecosistemas acuáticos.

**Floración de algas:** Crecimiento explosivo de la población algal en aguas superficiales debido a un incremento de los nutrientes vegetales (nitratos y fosfatos) y a la elevación de la temperatura o ambas causas.

#### 4 Referencias

Fitoplancton	UNE-EN-15204:2007 Guía para el recuento de fitoplancton por microscopía invertida (técnica de Utermóhl)  UNE-EN 15972:2012 Directrices para el estudio cuantitativo y cualitativo del fitoplancton marino.
Fitoplancton	Identificación y enumeración de fitoplancton con cámara Sedgewick-Rafter  UNE-EN 15972:2012 Directrices para el estudio cuantitativo y cualitativo

Cualquier copia impresa, electrónica o reproducción de este documento sin el sello de control de documentos (timbre) se constituye en COPIA NO CONTROLADA y debe consultarse al LEE para verificar su vigencia.

 <b>Universidad de Concepción</b>	<b>ANÁLISIS DE FITOPLANCTON</b>	
Código: LEE-MET-504-80	versión 3	Página: 2 de 6

	del fitoplancton marino.
--	--------------------------

Muestreo Fitoplancton y Fitobentos	Protocolo de Muestreo de Fitoplancton Código: M-LE-FP-2011. Manual para el Monitoreo e Identificación de la Microalga Bentónica <i>Didymosphenia geminata</i>
Fitoplancton toxico (marea roja)	SERNAPESCA. 2016. Manual de Inocuidad y Certificación. Ministerio de Economía, Fomento y Turismo. Parte II Cap.V.

## 5 Descripción

### *Toma de muestras*

Se recomienda utilizar una botella con capacidad entre 0,5 L a 2 L, según los requisitos de la Norma Chilena Calidad del agua – Muestreo – Parte 2: Guía sobre técnicas de muestreo NCh411/2 (ver 6.4.2.1. Fitoplancton). Los datos de la toma de muestra deben completarse en el formulario LEE-FOR-507-14

La Unidad de muestreo del Centro EULA y/o la persona encargada del muestreo debe fijar las muestras con Lugol; aproximadamente 0,2 - 0,5 mL por 100 mL de muestra y etiquetar adecuadamente cada frasco (sitio, estación de muestreo, fecha, profundidad, número) para su posterior análisis en el laboratorio.

### *Procesamiento de las muestras*

El análisis de las muestras se realizará en los microscopios Zeiss Axioplan West Germany y Zeiss Axiovert 35 West Germany. El analista debe registrar cada vez que utilice el microscopio en los cuadernos de registro LEE-CCM-505-01 y LEE-CCM-505-02.

### Análisis cualitativo de las muestras:

El analista identificará taxonómicamente las muestras a través de la observación de las microalgas en el microscopio fotónico, en el que se detallaran las estructuras de las células y realizarán medidas necesarias para facilitar la identificación. Dependiendo del grupo algal se emplearán diferentes técnicas: tinciones, degradación de materia orgánica, separación de placas entre otros, que permitan determinar la presencia de estructuras específicas (vainas, mucílago, placas, flagelos).

Para la clasificación de los diferentes grupos algales se utilizará un enfoque polifásico y se basará en la clasificación propuesta por Guiry (2005) en la base de datos de algas Algaebase, publicada online. Se utilizará literatura especializada (guías y claves de identificación taxonómica) y los registros visuales (fotografías) de microalgas incluidas en la base de imágenes del laboratorio de Fitoplancton y Perifiton del Centro EULA elaborada para tal fin.

### Análisis cuantitativo de las muestras:

Para realizar el análisis cuantitativo se puede utilizar el Método de Utermöhl o de Sedwick-Rafter. El criterio para definir uno u otro método dependerá de: la tipología de la muestra (cultivos, floraciones, dominancia de algas filamentosas), de los requerimientos del cliente y/o proyecto de investigación. Se registrará el número de células contadas por especie o género en planillas de trabajo digitales elaboradas en el computador del laboratorio LEE-FOR-510-02-(FITO-03)-2. La identificación taxonómica de los taxones se realizará de la misma forma en la que se describió para el análisis cualitativo de las muestras.

Cualquier copia impresa, electrónica o reproducción de este documento sin el sello de control de documentos (timbre) se constituye en COPIA NO CONTROLADA y debe consultar al LEE para verificar su vigencia

 <b>Universidad de Concepción</b>	<b>ANALISIS DE FITOPLANCTON</b>	 <b>EULA-CHILE</b> Centro de Ciencias Ambientales
Código: LEE-MET-504-80	versión 3	Página: 3 de 6

#### Método de Utermöhl

Preparación de la cámara: puede utilizar diferentes tipos de cámaras, dependiendo de la concentración de células en la muestra. Las cámaras de sedimentación deben estar limpias y libres de polvo para evitar la contaminación de muestras anteriores. Es necesario engrasar el fondo del cilindro con una pequeña cantidad de vaselina para asegurar que todas las partes de la cámara están herméticamente selladas.

Homogeneización de la muestra: El frasco de la muestra debe ser sacudido firme y suavemente, para homogeneizar el contenido, antes de ser vertido en la cámara de sedimentación.

Llenado de la cámara de sedimentación: Después de la homogeneización, la cámara se coloca sobre una superficie horizontal y se llena suavemente con la muestra. La cámara se sella con un vidrio de cubierta sin dejar burbujas de aire.

Sedimentación: La sedimentación se realizará a temperatura ambiente. El tiempo de sedimentación depende de la altura de la cámara, se recomienda aproximadamente 3 horas por centímetro de la columna.

Después de la sedimentación y dependiendo de la cámara utilizada (cilindros separados o no), se desliza el cilindro suavemente de la placa inferior y se sustituye por una tapa de vidrio. Esta cámara o todo el cilindro se coloca en el microscopio invertido y las células del fitoplancton se identifican y cuentan.

Procedimiento de conteo: El análisis cuantitativo debe comenzar con un escaneado de todo el fondo de la cámara con un aumento bajo (10 x). Esto ayuda a dar una visión general de la densidad y distribución del fitoplancton. Si la distribución se considera desigual, la muestra debe desecharse. Durante la exploración se realiza una lista preliminar de especies, lo que puede ayudar a seleccionar la estrategia de conteo, ya sea por transectos o por campos.

#### Métodos de conteo:

**Transectos:** Este método se utilizará cuando la densidad celular es baja, se recorrerá la cámara verticalmente realizando una identificación y conteo de todas las células presentes, para iniciar un segundo transecto, la cámara se hace girar entre 25 y 45° y así sucesivamente. Este procedimiento se repite hasta llegar al número de unidades de recuento fijadas para el análisis. Sin embargo, si la densidad celular es muy baja (lagos oligotróficos) el conteo se dará por terminado al recorrer un máximo de cuatro transectos.

**Campos:** Para muestras densas, se puede contar un área parcial de la cámara utilizando campos al azar (campos aleatorios) (APHA, 2012).

Es necesario contar un cierto número de unidades de recuento (células, colonias o filamentos). Se recomienda el conteo de al menos 100 unidades de la especie dominante y/o al menos 300 células en total.

En el caso de microalgas que forman colonias (con tamaños de célula > 5 µm) y/o filamentos, se contará el número de colonias/filamentos observables en cada campo y el número de células observables en cada colonia/filamento (mínimo en 30), posteriormente, se calculará un promedio con el que se determinará el número de células por litro (Cel./L) (Bellinger & Sigee, 2010). La identificación taxonómica de los taxones se realizará hasta un 70 % a nivel de especie por muestra, independiente del método elegido para contar.



 <b>Universidad de Concepción</b>	<b>ANÁLISIS DE FITOPLANCTON</b>	
<b>Código:</b> LEE-MET-504-80	<b>versión 3</b>	<b>Página:</b> 4 de 6

La transformación de los recuentos microscópicos a la concentración o densidad del fitoplancton de un volumen de agua determinado (usualmente litro o mililitro) se logrará usando las siguientes ecuaciones:

Para un recuento por transectos:

$$N_0/ml = C \times A_t / L \times A \times N \times V$$

Dónde:

C = número de organismos contados

A<sub>t</sub> = área total de la cámara, mm<sup>2</sup>

L = longitud del transecto, mm

A = ancho del transecto, mm

N = número de transectos contados

V = volumen de la muestra asentada (volumen de la cámara) (APHA, 2012)

Para un recuento por campos:

$$N_0/ml = C \times A_t / A_r \times N \times V$$

Dónde:

C = número de organismos contados

A<sub>t</sub> = área total de la cámara, mm<sup>2</sup>

A<sub>r</sub> = área del campo, mm<sup>2</sup>

N = número de campos contados

V = volumen de la muestra asentada (volumen de la cámara) (APHA, 2012)

#### Análisis de muestras marinas

En el caso de análisis de muestras marinas provenientes de floraciones algales nocivas, el analista seguirá el procedimiento recomendado por SERNAPESCA (2016) en el Manual de Inocuidad y Certificación. El análisis consiste en sedimentar la muestra por un tiempo mínimo de 3 horas y analizar 3 réplicas de la muestra de red decantada de 0,1 ml c/u, usando cubre objeto de 18 x 18 mm. El resultado del análisis corresponde al promedio del número de células en las réplicas. El resultado se reporta en base al nivel que corresponda de la siguiente tabla de abundancia relativa.

	Escala	<i>D. acuta</i> , <i>D. acuminata</i> , <i>A. ostenfeldii</i> , <i>P.</i> <i>crassipes</i> , <i>P. micans</i> ,	<i>A. catenella</i> , <i>P. reticulatum</i>	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp., <i>P. australis</i> y <i>P.</i> <i>pseudodelicatissima</i>
Ausente	0	0	0	0
Raro	1	1-5	1-2	1-10
Escaso	2	6-15	3-10	11-50
Regular	3	16-35	11-42	51-210
Abundante	4	36-75	43-170	211-850
Muy abundante	5	76-155	171-682	851-3410
Extremadamente abundante	6	156-315	683-2730	3411-13650
Hiper abundante	7	316-635	2731-10922	13651-54610

#### Cámara de Sedwick-Rafter

 <b>Universidad de Concepción</b>	<b>ANALISIS DE FITOPLANCTON</b>	 <b>EULA-CHILE</b> Centro de Ciencias Ambientales
Código: LEE-MET-504-80	versión 3	Página: 5 de 6

Se coloca el cubreobjetos (de 24 mm por 60 mm) en diagonal a través de la cámara (50 mm de largo por 20 mm de ancho y 1 mm de profundidad). Con una pipeta Pasteur, se transfiere una alícuota de 1 ml de la muestra bien mezclada o de la submuestra concentrada o diluida en la esquina abierta de la cámara hasta que el cubreobjetos gire en su lugar. Dejar reposar la célula durante al menos 15 minutos para permitir la sedimentación. Se puede utilizar un microscopio vertical o invertido. Contar unidades en campos seleccionados al azar o transectos. Para un recuento de transectos, examinar dos a cuatro dependiendo de la densidad celular. Para el recuento de campo, examinar 10-30 campos aleatorios de Whipple. Treinta campos deben incluir entre 90 % y 95 % de las especies. Dado que las unidades no siempre se distribuyen al azar en la cámara, se debe espaciar los transectos o campos a lo largo de toda la cámara. Contar todas las formas que están total o parcialmente cubiertas por la rejilla de Whipple; Adoptar un sistema consistente de contar los organismos que tocan uno de los bordes.

El número de organismos se calcula mediante la siguiente ecuación según el método adoptado para el conteo:

Para un recuento por transectos:

$$No/ml = C \times 1000 \text{ mm}^3 / L \times P \times A \times N$$

Donde,

C = número de organismos contados

L = longitud de cada transecto (S-R longitud de la celda), mm

P = profundidad de un transecto (S-R longitud de la celda), mm

A = ancho de un transecto (anchura de la rejilla Whipple), mm

N = número de bandas contadas

Para un recuento de campo:

$$No/ml = C \times 1000 \text{ mm}^3 / A \times P \times N$$

Dónde:

C = número de organismos contados

A = área de un campo (anchura de la rejilla Whipple), mm<sup>2</sup>

P = profundidad de un campo (profundidad de la cámara de S-R), mm

N = número de campos contados

Dilución de muestras:

En muestras demasiado densas se realizaran diluciones y utilizaran cámaras de tamaño apropiado para permitir una identificación y recuento preciso de las células. El factor de dilución debe tenerse en cuenta en el cálculo de los resultados finales.

Concentración de muestras:

En muestras con baja densidad se podrá concentrar el material por sedimentación y decantación (dejar reposar durante al menos 2 días) o por centrifugación (1000 g durante 20 min). La concentración inicial debe ser de aproximadamente 5-10 veces la original, dejando unos 20 ml de concentrado para análisis. Es importante medir y registrar los volúmenes originales y finales, antes y después de la concentración.

 <b>Universidad de Concepción</b>	<b>ANÁLISIS DE FITOPLANCTON</b>	 <b>EULA-CHILE</b> Centro de Ciencias Ambientales
<b>Código: LEE-MET-504-80</b>	<b>versión 3</b>	<b>Página: 6 de 6</b>

**Almacenamiento de muestras:**

Las muestras analizadas permanecerán guardadas 1 año en el laboratorio de Fitoplancton y Fitobentos del Centro EULA, con el fin de poder verificar los resultados ante dudas surgidas con posterioridad. Para estudios especiales (monitoreos a largo plazo) que requieran tener las muestras almacenadas durante más de un año se deben seguir los requerimientos de la norma Chilena NCh411/3. El color de la muestra con lugol debe comprobarse regularmente y, si es necesario, se debe añadir más preservante.

*Entrega de resultados*

El analista debe reportar un listado de las especies y/o género que se encontró en la muestra. La abundancia se reportará en número de células por mL o L. Los resultados se incluirán en un informe del Laboratorio (LEE-FOR-510-01), emitido por el laboratorio de Fitoplancton y Perifiton revisado por el jefe del laboratorio. Cuando se trate de un proyecto de investigación, se realizará un informe de acuerdo a los requerimientos del proyecto y/o investigador.

El tiempo aproximado de entrega de los resultados (emisión del informe) será analizado en cada caso dependiendo del número de muestras a analizar, la tipología de la muestra y los requerimientos del cliente.

*Reactivos químicos*

Ioduro de potasio con ácido acético o acetato de sodio al 70 % (Lugol)

*Equipos*

Microscopio invertido  
Microscopio óptico compuesto

*Materiales*

Guías y claves de identificación taxonómica  
Botellas de plástico  
Pipetas pasteur  
Cámaras de sedimentación de diferentes volúmenes, 5, 10, 25 50 o 100 ml. Las cámaras constan de dos partes: un cilindro superior y una placa inferior con un cristal fino.  
Cámara de Sedwick-Rafter