# OBJETIVOS

Determinar la densidad de células por un volumen, para cálculos de diversidad, abundancia y riqueza de la comunidad fitoplanctónica.

# ALCANCE

Este procedimiento es aplicable a muestras de aguas pelágicas, neríticas y estuarinas colectadas en el laboratorio de la Dirección General Marítima – Dimar.

# GLOSARIO

**Campo de recuento del microscopio:** Área delimitada (por ejemplo: un cuadrado o una retícula) del campo de visión del microscopio, que se utiliza para el recuento.

**Cuantificar:** Conteo de células utilizando los métodos de sedimentación por cámara Sedgewick Rafter y/o Utermöhl.

**Especie:** Unidad/conjunto de una o más células algales encontradas durante el análisis de fitoplancton, que constituyen una unidad discreta (susceptible de sedimentar de forma independiente) con respecto a otras células de la muestra.

**Fitoplancton:** Comunidad de organismos de vida libre, en suspensión, principalmente fotosintéticos de los sistemas acuáticos, que incluyen las cianobacterias y las algas.

**Homogeneizar:** es un proceso por el que se hace que una mezcla presente las mismas propiedades en toda la sustancia.

**Límite de detección:** Número y/o tamaño mínimo de un taxón específico o grupo de organismos de una muestra cuya presencia puede detectarse con una probabilidad especificada.

**Precisión:** Grado de acuerdo entre los resultados de ensayos/mediciones independientes, obtenidos en condiciones estipuladas.

**Muestra:** Organismo o conjunto de organismos tomados como representantes de una población o de su ambiente. Las muestras son seleccionadas al azar sin tener en cuenta su calidad.

**Sedimentar:** Es el proceso mediante el cual se depositan o precipitan los organismos fitoplanctónicos al fondo del recipiente de sedimentación.

# DOCUMENTOS DE REFERENCIA

* Andersen, P., Throndsen, & J. (2004). *Manual of Harmful Marine Microalgal. UNESCO Publishing. Cap* (Vol. 4, pp. 19–129).
* Edler, L. (1979). Recommendations for marine biological studies in the Baltic Sea: phytoplankton and chlorophyll. *Baltic Mar. Biol.*, *5*, 1–38.
* Edler, L., & Elbrächter, M. (2010). *The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO Paris.
* Hasle, R. G. (1978). The inverted microscope method. *Phytoplankton Manual*, 88–96.
* Poot-Delgado, C. A. (2014). Microalgas como bioindicadoras de la calidad del agua: una revisión. In *Contaminación e impacto ambiental diagnóstico y tendencias* (pp. 99–116).
* UNE EN 15204. (2007). *Calidad de agua. Guía para el recuento de fitoplancton por microscopïa invertida (tëcnica de Utermöhl)*. Asociaciön espanola de Normalizaciön y certificaciö year={2010},.
* Utermohl. (1958). *Zur Ver vollkommung der quantitativen phytoplankton-methodik*. itteilung Internationale Vereinigung Fuer Theoretische unde Amgewandte Limnologie.
* Venrick, E. L. (1978). How many cells to count? *Phytoplankton Manual*, 167–180.
* Villafañe, V. E., & Reid, F. M. H. (1995). Métodos de microscopía para la cuantificación del fitoplancton. *Manual de Métodos Ficológicos*, 169–185.
* M5-00-FOR-136 Datos Primarios de Análisis Densidad de Plancton y Macroinvertebrados Bentónicos.

# CONDICIONES GENERALES

## Generalidades

El fitoplancton desempeña un papel importante como base de las redes tróficas alimenticias y como indicadores de la calidad de agua. Sin embargo, los análisis ambientales han sido soportados por mediciones y determinaciones de las características físicas y químicas del agua, generando un vacío de información al momento de detectar los cambios en las comunidades biológicas, por lo que Poot-Delgado (2014) propuso métodos biológicos para evaluar las condiciones ecológicas de masas de agua.

Teniendo en cuenta que las comunidades fitoplanctónicas pueden brindar información como indicadoras de masas de agua y cambios en los ecosistemas marino-costeros de origen natural y/o antropogénicos; es necesario monitorearlas y describirlas para obtener información acerca de las condiciones ambientales. Para tal fin, se plantean métodos de análisis cualitativos que permiten conocer la presencia y/o ausencia de especies; además, análisis cuantitativos que permite calcular el número de células presentes en un volumen determinado de muestra, conocido como densidad. Dentro del análisis cuantitativo se destaca el método de sedimentación que, aunque el procedimiento es mucho más largo y no es altamente selectivo, proporciona mejor conservación de las células disminuyendo su rompimiento.

### 5.1.1. Análisis cualitativo

Este análisis es utilizado en muestras obtenidas por arrastres verticales y horizontales de redes de fitoplancton. El procedimiento descrito en este apartado se basa en la identificación de taxones de una muestra sin tener en cuenta su cantidad, cuyas observaciones se hacen en un microscopio invertido u óptico estándar a través de una cámara Sedgwick-Rafter.

### 5.1.2. Análisis semicuantitativo

Se aplica en muestras obtenidas por arrastres verticales y horizontales de redes, nos permite cuantificar el microfitoplancton. A través de las redes solo se puede obtener una fracción de la comunidad fitoplanctónica (organismos ≥ 20 µm) dejando a un lado organismos de menor tamaño como el nanoplancton y el picoplancton (Venrick, 1978; Villafañe & Reid, 1995).

### 5.1.3. Análisis Cuantitativo

Esta técnica se utiliza mediante microscopía invertida, consiste en emplear una cámara de sedimentación, conformada por dos partes (Figura 1), un cilindro superior en acrílico que usualmente complementan volúmenes finales de la cámara de 10, 25, 50 y 100 ml y una placa de acrílico inferior con un vidrio delgado que no puede exceder los 1.5 mm y un anillo metálico removible (Hasle, 1978), útil para estimar la abundancia y composición taxonómica del fitoplancton en aguas marinas y estuarinas (Utermöhl, 1958).

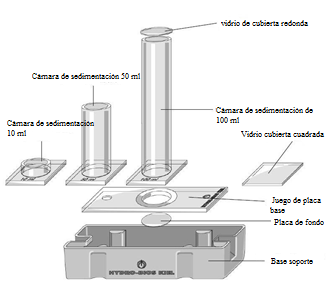


Figura 1. Cámara de sedimentación Utermöhl y sus componentes. Tomada y modificada de: <https://america.bioweb.co/products.com>

Hay tres alternativas de conteo con las cámaras de sedimentación:

1. **Numero de campos seleccionados aleatoriamente:**

Consiste en utilizar un grilla de Whipple que se coloca en el ocular del microscopio. Este retículo es un disco que tiene impreso un cuadrado de 10 x10 dividido en 100 partes iguales. Este elemento permite delimitar el campo de recuento y se lleva la cuenta del número de campos contados. Esta área puede diferir de un microscopio a otro y dependiendo del aumento del objetivo empleado, se debe calibrar previo al análisis. Cuando se trabaja sobre un campo de recuento de un microscopio, es importante asegurarse que se utiliza un criterio coherente para decidir si los objetos algales que se encuentran sobre las líneas de la cuadrícula, se registran como interiores o exteriores (Figura 2).

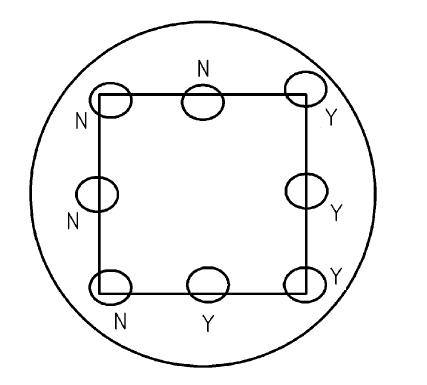


Figura 2. Recuento de selección aleatoria por campo. Los objetos algales que cruzan la línea superior y el lado izquierdo de la cuadrícula no se incluyen mientras que aquellos que cruzan la línea inferior y el lado derecho si se incluyen. (N: se excluye del recuento; Y: incluido en el recuento).

1. **Cámara completa**

Es apropiado para densidades bajas de fitoplancton o para la detección de especies grandes cuya distribución en la cámara no puede ser aleatoria. El recuento se realiza desplazando la cámara de arriba-abajo e izquierda-derecha y viceversa (Figura 4). Se utiliza una retícula ocular que contenga 2 líneas paralelas horizontales que delimitan la transecta, preferiblemente con una tercera línea vertical que la cruce. Aquellos objetos que estén encima de línea superior de la transecta se incluyen en conteo, pero no aquellos que se encuentran atravesados por la línea inferior, ya que se contarán al realizar la siguiente transecta (o viceversa) (Figura 3).

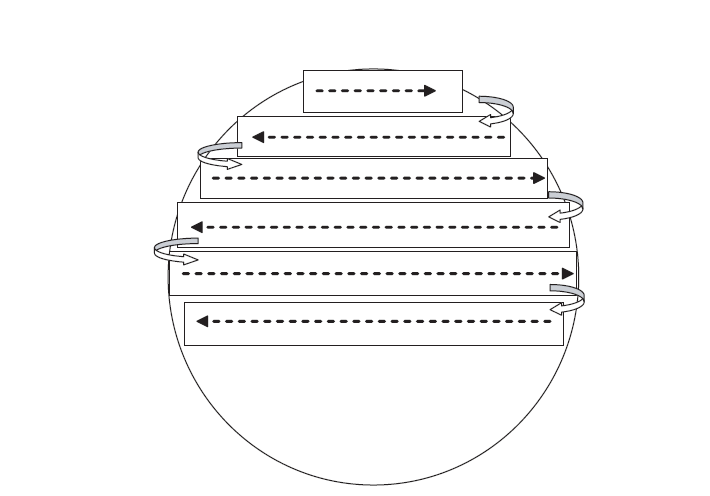
****

Figura 3. Recuento por cámara completa (Tomada de: Edler & Elbrächter, 2010).

1. **Recuento por transectas**

Se emplea el mismo retículo utilizado para el recuento de cámara completa, teniendo cuidado en asegurarse que existe una distribución aleatoria de objetos algales sedimentados y de que no hay “efecto de borde” (mayor número de algas sedimentadas hacia la periferia). Sí, se va analizar una parte más pequeña, uno, dos, tres transectas serán contadas, después de girar entre 25-45° (Figura 4).

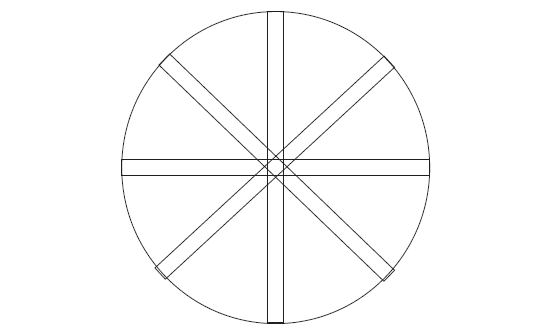
****

Figura 4. Conteo de transectas verticales, horizontales y transversales (Tomada de: (Edler & Elbrächter, 2010)

## Equipos

* Cámara de sedimentación combinada Utermöhl.
* Cámara Sedgwick Rafter (S.R) (50 mm x 20 mm x 1 mm profundidad) reglada de 1mm.
* Microscopio invertido o microscopio compuesto.

## Materiales

### Análisis cualitativo y semicuantitativo

* Agua destilada
* Beaker (500 ml).
* Pipetas o goteros de 5 ml.
* Tubos cónicos de centrifuga de 20, 40 o 50 ml.
* Pipeta Hensen Stempel.
* Probeta.
* Viales color ámbar con capacidad de 50 ml.
* Material Bibliográfico sobre taxonomía del fitoplancton.

### Análisis cuantitativo

* Agua destilada
* Vaselina
* Pipetas o Goteros de 5 ml
* Material Bibliográfico sobre taxonomía del fitoplancton

## Reactivos

* Aceite de inmersión

# DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

## Procedimiento

### Análisis cualitativo

#### Aclimatación y homogeneización de la muestra

* Extraer la muestra del sitio de almacenamiento.
* Aclimatar la muestra durante un periodo de 12 horas para alcanzar la temperatura ambiente (UNE EN 15204, 2007).
* Agitar suavemente la muestra mediante combinaciones de movimientos horizontales circulares y el volteo boca arriba y boca abajo, durante 1 a 3 minutos para proporcionar un mejor mezclado, consiguiendo que las partículas vuelvan a quedar separadas y en suspensión (UNE EN 15204, 2007)

**Nota 1:** Una agitación vigorosa puede provocar el daño de células y la desintegración de colonias frágiles, lo que constituye un problema al momento de identificar un organismo o determinar el tamaño de una colonia (UNE EN 15204, 2007).

**Nota 2:** Para evitar la ruptura de colonias y la acumulación de burbujas. Durante el tiempo de almacenaje, las partículas sedimentan en la botella y se forman agregados entre algas pequeñas y otras algas o colonias más grandes o con detritus. La homogeneización de la muestra supone la re-suspensión y separación de las partículas. Esto puede hacerse manualmente o preferiblemente con un dispositivo de mezcla.

#### Preparación de la muestra

* Extraer con ayuda de una pipeta, 1 ml de la muestra. La pipeta debe tener una abertura que permita una extracción adecuada de organismos fitopláncteres o pipeta Hensen-Stempel de 1 ml estandarizado, que no restrinja el movimiento de las especies de fitoplancton más grandes.
* Deposite la muestra sobre una cámara Sedgwick Rafter y colocar cuidadosamente un cubreobjeto, de forma perpendicular al eje y a lo largo de la cámara, de modo que quede una esquina abierta para rellenar y otra para el escape de aire.
* Gire lentamente el cubreobjetos para que cubra completamente la cámara, con el fin de evitar que se introduzcan burbujas de aire y asegurar que la muestra mantenga su volumen completo más atrás (Figura 5),
* Depositar la cámara Sedgwick-Rafter sobre la platina del microscopio y realizar una observación de la muestra a una magnificación de 40X o 100X, en búsqueda de organismos fitoplanctónicos.

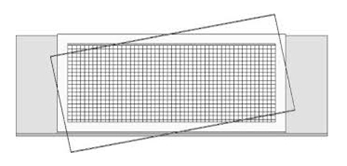


Figura 5. Cámara Sedgewick Rafter. Posición del cubreobjetos para la aplicación de la muestra en la cámara.

**Nota:** Si al momento de girar el cubreobjetos para que cubra completamente la cámara S-R se observan burbujas, adicione cuidadosamente una gota de la muestra a la celda de conteo.

#### Lectura de la submuestra

* Observar e identificar los organismos microfitoplanctónicos a magnificaciones de 100X a 600X, con la finalidad de observar diferentes formas, características y estructuras que se necesitan para la identificación de los organismos.
* Generar una lista preliminar de especies observadas.
* Determinar presencia/ausencia al nivel taxonómico más bajo posible.
* Registrar en formato M5-00-FOR-136 Datos Primarios de Análisis Densidad de Plancton y Macroinvertebrados Bentónicos.

**Nota 1:** Para este análisis se realiza una revisión completa de alícuotas aplicando la curva de acumulación de especies observadas por muestras. Las curvas de acumulación de especies muestran la tasa a la que nuevas especies se encuentran, más no la riqueza total.

**Nota 2:** Las especies de difícil determinación se separan para un previo tratamiento de limpieza, separación de placas, coloración u otro método, para ser observadas a través de un microscopio a un aumento de 400X o 100X.

**Nota 3:** Realice esquemas o dibujos de todas sus observaciones, la fotografía es de gran ayuda siempre y cuando se resalte lo característico del individuo a identificar.

**Nota 4:** Lavar y limpiar entre muestras para evitar la contaminación cruzada.

**Nota 5:** Después de completar el análisis, lavar y secar la cámara y el cubreobjetos. Se recomienda un detergente líquido neutro.

### Análisis semicuantitativo

#### Aclimatación y homogeneización de la muestra

* Extraer la muestra del sitio de almacenamiento.
* Aclimatar la muestra durante un periodo de 12 horas para alcanzar la temperatura ambiente (UNE EN 15204, 2007).
* Agitar suavemente la muestra mediante combinaciones de movimientos horizontales circulares y el volteo boca arriba y boca abajo, durante 1 a 3 minutos para proporcionar un mejor mezclado, consiguiendo que las partículas vuelvan a quedar separadas y en suspensión (UNE EN 15204, 2007).

**Nota 1:** Una agitación vigorosa puede provocar el daño de células y la desintegración de colonias frágiles, lo que constituye un problema al momento de identificar un organismo o determinar el tamaño de una colonia (UNE EN 15204, 2007)

**Nota 2:** Para evitar la ruptura de colonias y la acumulación de burbujas. Durante el tiempo de almacenaje, las partículas sedimentan en la botella y se forman agregados entre algas pequeñas y otras algas o colonias más grandes o con detritus. La homogeneización de la muestra supone la re-suspensión y separación de las partículas. Esto puede hacerse manualmente o preferiblemente con un dispositivo de mezcla.

#### Preparación de la muestra

* Extraer con ayuda de una pipeta 1 ml de la muestra. La pipeta debe tener una abertura amplia que no restrinja el movimiento de las especies de fitoplancton más grandes.
* Deposite la muestra sobre una cámara Sedgewick Rafter y colocar cuidadosamente un cubreobjeto, de forma perpendicular al eje y a lo largo de la cámara, de modo que quede una esquina abierta para rellenar y otra para el escape de aire
* Gire lentamente el cubreobjetos para que cubra completamente la cámara, con el fin de evitar que se introduzcan burbujas de aire y asegurar que la muestra mantenga su volumen completo como se muestra en la figura. 1 del análisis cualitativo.
* Colocar la cámara Sedgewick Rafter sobre la platina del microscopio y realizar una observación de la muestra a una magnificación de 40X o 100X, en búsqueda de organismos fitoplanctónicos.

**Nota 1:** Si al momento de girar el cubreobjetos para que cubra completamente la cámara S-R se observan burbujas, adicione cuidadosamente muestra a la celda de conteo.

6.1.2.4. **Lectura de la submuestra:**

* Antes de iniciar el recuento, realizar un barrido en toda la cámara, con la finalidad de tener un conocimiento general de los taxones presentes, formas, características y estructuras que se necesitan para la identificación del fitoplancton y su vez una estimación de la concentración celular.
* Generar una lista preliminar de especies observadas.
* Decidir una estrategia de conteo y determinar si se debe contar la cámara completa o una fracción (conteo por campo).
* Registrar en formato M5-00-FOR-136 Datos Primarios de Análisis Densidad de Plancton y Macroinvertebrados Bentónicos.

**Nota 1:** Las especies de difícil determinación se separan para un previo tratamiento de limpieza, separación de placas, coloración u otro método, para ser observadas en microscopio compuesto. Empleando magnificaciones de 100X o 400X. Si, se utiliza microscopio óptico compuesto, realice esquemas o dibujos de todas sus observaciones, la fotografía es de gran ayuda siempre y cuando se resalte lo característico del individuo a identificar.

**Nota 2:** Lavar y limpiar entre muestras para evitar la contaminación cruzada.

**Nota 3:** Después de completar el análisis, lavar y secar la cámara y el cubreobjetos. Se recomienda un detergente líquido neutro.

### Análisis Cuantitativo

#### Aclimatación y homogeneización de la muestra

* Extraer la muestra del sitio de almacenamiento.
* Aclimatar la muestra durante un periodo de 12 horas para alcanzar la temperatura ambiente (UNE EN 15204, 2007).
* Agitar suavemente la muestra mediante combinaciones de movimientos horizontales circulares y el volteo boca arriba y boca abajo, durante 1 a 3 minutos para proporcionar un mejor mezclado, consiguiendo que las partículas vuelvan a quedar separadas y en suspensión (UNE EN 15204, 2007).

**Nota 1:** Una agitación vigorosa puede provocar el daño de células y la desintegración de colonias frágiles, lo que constituye un problema al momento de identificar un organismo o determinar el tamaño de una colonia (UNE EN 15204, 2007)

**Nota 2:** Para evitar la ruptura de colonias y la acumulación de burbujas. Durante el tiempo de almacenaje, las partículas sedimentan en la botella y se forman agregados entre algas pequeñas y otras algas o colonias más grandes o con detritus. La homogeneización de la muestra permite la re-suspensión y separación de las partículas. Esto puede hacerse manualmente o preferiblemente con un dispositivo de mezcla.

**Nota 3:** La aclimatación facilita la distribución aleatoria del plancton entre la cámara de sedimentación y la muestra, y todo el equipo utilizado. Esto ayuda a que no se provoquen corrientes de convección con distintos efectos de sedimentación de las especies de fitoplancton, dependiendo de sus propiedades físicas. Además, se pueden formar burbujas en las muestras relativamente frías a medida que la solubilidad de los gases disminuye con el aumento gradual de temperatura de la muestra (UNE EN 15204, 2007).

#### Sedimentación y preparación de la muestra

* Instalar la cámara Utermöhl y colocarla sobre una superficie horizontal plana (Figura 6A).
* Tomar la muestra suficiente para rellenar la cámara en una sola adición. ( Figura 6B.).
* Cerrar el cilindro de sedimentación con vidrio de cubierta redonda evitando que se formen burbujas de aire.
* Para mantener una temperatura ambiente y fuera de la luz solar directa, la cámara se debe cubrir con una caja de plástico y colocar una caja Petri con agua al lado de la cámara para minimizar la evaporación (Figura 6C.).
* El tiempo de sedimentación de la muestra se ajusta con relación a la altura del cilindro de la cámara (Tabla 1).
* Pasado el tiempo de sedimentación, desplazar el cilindro de sedimentación suavemente sobre la placa base y reemplazar por un vidrio de cubierta cuadrada, evitando introducir burbujas de aire en esta etapa (Figura 6D).
* Colocar la placa base o inferior en el microscopio invertido.
* Posteriormente, determinar la identificación y cuantificación de células de fitoplancton (Figura 6E.)

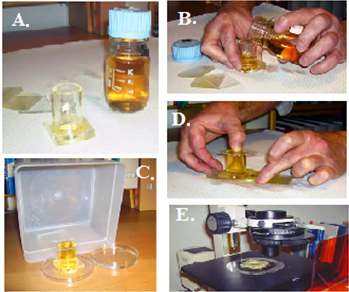


Figura 6. Preparación de la cámara de sedimentación. (A) y (B) Llenado de la cámara de sedimentación. (C) Protección de la muestra durante el tiempo de sedimentación. (D) Reemplazo del cilindro de sedimentación por la cubierta de vidrio cuadrada. (E) Montaje de placa en el microscopio invertido.

#### Lectura de la submuestra:

* Realizar un barrido de cámara completa con la magnificación a 100X para tener una visión general de la densidad y distribución de los individuos (si la distribución es desigual, la muestra se descarta).
* Durante el barrido, generar una lista preliminar de especies observadas para seleccionar la estrategia de conteo (el tiempo estimado dependerá de la capacidad del analista, por lo general, es entre 10 a 30 minutos).
* El conteo rápido rutinario se realiza con la magnificación a 100X (microfitoplancton), conteo con detalle intermedio con la magnificación 200X (microfitoplancton y nanofitoplancton) y conteo con máximo detalle con la magnificación 400X (microfitoplancton y nanofitoplancton) (Edler and Elbrächter, 2010).
* En todos los casos, identificar los organismos hasta el nivel taxonómico más bajo (Hasle, 1978), usando guías taxonómicas especializadas disponibles en el laboratorio de biología.
* Decidir la observación de la cámara mediante tres estrategias de recuento, puede ser por selección de campos aleatoriamente (Figura 3), transectas (Figura 4) o cámara completa (Figura 5).
* El conteo mínimo se debe definir dependiendo del objetivo de estudio.
* Los resultados son expresados en Cel/L.
* Registrar en formato M5-00-FOR-136 Datos Primarios de Análisis Densidad de Plancton y Macroinvertebrados Bentónicos.

**Nota 1:** Los tres niveles de magnificación y observación de la muestra sea acorde al espectro de tamaño de los microorganismos que componen las comunidades fitoplanctónicas (Tabla 2).

**Nota 2:** Al contar secciones de la cámara por transectas se tendrá en cuenta, el criterio de inclusión de las células que se encuentren en líneas contiguas. La forma más adecuada es decidir que las células que se encuentran completamente en el campo o aproximadamente al menos 2/4 partes o más, deben ser contadas, mientras que las que sean parcialmente observadas, es decir, aproximadamente1/4 o menos, deben ser excluidas.

**Nota 3:** En determinado caso, no se pueda llegar a identificar el género o la especie presente en la muestra, trate de identificarlo a un nivel taxonómico superior (Familia u orden) y registre fotográficamente, con la ayuda de guías taxonómicas especializadas, realice nuevamente la identificación. Si no lo logra identificar el taxón, se registra hasta el nivel más bajo considerado por el analista.

**Nota 4:** Cuando se realiza el conteo, el analista debe decidir si el conteo se hará de forma individual en las especies de fitoplancton que forman colonias o cadenas o sí, se va a tomar como una unidad. Debido que, el cálculo de las células por colonia puede aproximarse mediante un conteo completo y el cálculo medio de una cierta cantidad de colonias.

Tabla 1.

Tiempo de sedimentación para muestras preservadas con solución de Lugol para los diferentes volúmenes de cámara de sedimentación (Edler, 1979).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Volumen de la cámara (cm3) | Altura de la cámara  (Cm) | Tiempo de sedimentación  (h) |
| 2-3 | 0,5 – 1 | 3 |
| 10 | 2 | 8 |
| 25 | 5 | 18 |
| 50 | 10 | 24 |
| 100\* | 20 | 48 |

Tabla 2.

Magnificaciones recomendadas para el conteo de diferentes clases de tamaños de fitoplancton (Tomado y modificado de: (Andersen et al., 2004; Edler, 1979)

|  |  |
| --- | --- |
| **Clase de tamaños** | **Magnificación** |
| 0.2 – 2. 0 µm (Picofitoplancton)\* | 1000X |
| 2.0 – 20 µm (Nanofitoplancton) | 100 – 400X |
| >20 µm (Microfitoplancton) | 100X |

**\*** Usualmente el picofitoplancton no se analiza con el método Utermöhl.

### Análisis de viabilidad de fitoplancton en muestras de aguas de lastre.

* Medir el volumen de la muestra en un beaker volumétrico.
* Una vez medido el volumen, con la pipeta Hensen-Stempel de 1 ml, homogeneizar la muestra agitándola en forma circular.
* Cuando la muestra esté suficientemente homogeneizada, se acciona la pipeta y se toma la alícuota.
* Retirar la pipeta Hensen-Stempel del beaker y verter la alícuota en la cámara Sedgewick-Rafter.
* Revisar la cámara Sedgewick-Rafter bajo el microscopio invertido.
* Revisar si las células presentan cloroplastos, para confirmar que están vivas.
* Por cada individuo vivo observado, hacer un registro de conteo en el formato M5-00-FOR-136 Datos Primarios de Análisis Densidad de Plancton y Macroinvertebrados Bentónicos.
* Continuar con el proceso de recuento hasta que el número de alícuotas sin células sea mayor que 3, o se hayan alcanzado al menos 50 individuos
* Registrar los resultados del conteo en el formato M5-00-FOR-136 Datos Primarios de Análisis Densidad de Plancton y Macroinvertebrados Bentónicos.

## Cálculos

### Análisis cualitativos

Para la elaboración de la curva de acumulación de especies utilizando Microsoft Excel, se realizará lo siguiente:

1. Crear una base de datos en Microsoft Excel.
2. Crear una Tabla dinámica, seleccionando toda la tabla. Insertar > Tabla Dinámica> Aceptar.
3. En la ETIQUETAS DE FILA, Colocar especies registradas, en ETIQUETAS DE COLUMNA, colocar alícuotas y en VALORES presencia/ausencia de cada especie.
4. Hacer una matriz de datos en Microsoft Excel, luego se leerá en el programa de índices.
5. Abrir una hoja en blanco
6. Copiar los datos del número de células de cada especie en las alícuotas realizadas y se pega en una nueva hoja.
7. Llenamos los espacios en blanco con Ceros (0).
8. En la primera fila se colocar el nombre del archivo.
9. En la siguiente fila, en la primera celda especies registradas, seguido las jornadas de toma de muestras.
10. Click en la pestaña archivo >Guardar > Archivo como “Texto Delimitado por Tabulaciones”.
11. Click en cerrar Archivo > Aceptar y cerrar.
12. Abrir Software de índice de Biodiversidad (ejemplo: ESTIMATES).

### Análisis semicuantitativos

#### Conteo cámara completa

Se realizará un barrido de toda la superficie de la cámara. Se tiene en cuenta, los cálculos descritos en APHA (2017). Se Calcula el número de células por mililitro con la siguiente ecuación:

= número total de células contadas por mililitro.

= número de células contadas en la cámara.

Si se toman varias alícuotas, se debe obtener un promedio de los datos total con la siguiente ecuación:

= número total de células contadas por mililitro.

= número de células contadas en la cámara.

= número de alícuotas usadas.

#### Conteo por campos

Para el conteo por medio de campos, se debe conocer de antemano las medidas en milímetros de diámetro del campo por cada capacidad de aumento. Con este dato, se calcula el volumen del campo, que es igual a , donde *D* es el diámetro en mm medido en cada capacidad de aumento y el volumen del campo es: donde *h* es la altura de la cámara. Siguiendo los cálculos descritos en APHA (2017), se calcula el número de células por mililitro, de la siguiente manera:

= número total de células contadas por mililitro.

= número de células contadas en la cámara.

= Volumen del campo.

= número total de campos.

#### Conteo por tiras

En el conteo por tiras se necesita saber cuál es el volumen de cada tira, el cual depende del largo, el ancho y la profundidad de la cámara. Se debe calcular el volumen de cada tira que, por lo general en cámaras de un mililitro, la tira longitudinal tiene por volumen 50 mm3 y la tira transversal tiene por volumen 20 mm3. Se utiliza los cálculos de APHA (2017Para el cálculo del número de células por ml se utiliza la siguiente ecuación:

= número total de células contadas por mililitro.

= número de células contadas en la cámara.

= Volumen de la tira contada.

= número total de tiras.

#### Cálculo total de densidad por muestra.

Para calcular la densidad total de las células por litro halladas en la muestra, se debe tener en cuenta el dato hallado en cada una de las alícuotas y el método de análisis que se utilizó. se utiliza la siguiente ecuación:

Cel/L= Densidad de células por litro

= número de Cel/ml encontradas en la alícuotas.

= Volumen concentrado de la muestra (ml)

= Volumen total de la alícuota (ml)

=Volumen filtrado a través de la red de fitoplancton (L)

### Análisis Cuantitativo

La cuantificación del fitoplancton será realizada estadísticamente, ya que no es posible contar todos los individuos que se encuentran en la muestra. Se utilizan método de recuento de células por cámara Utermöhl.

#### Conteo por cámara completa

El recuento se realiza desplazando la cámara de izquierda-derecha de arriba-abajo, teniendo en cuenta no superponer el barrido para no contar la misma célula dos veces.

Para el conteo de cámara completa, se expresarán en número de células por unidad de volumen (Cel/L), según la siguiente formula:

Donde:

Cel/L = Densidad de fitoplancton.

N = Número de células contadas.

v = Volumen de la cámara, mL.

##### Conteo por campos

Para el conteo por medio de campos, se debe conocer de antemano las medidas en milímetros de diámetro del campo por cada capacidad de aumento. Con este dato, se calcula el área del campo, donde el área del campo es igual a , donde *D* es el diámetro en mm medido en cada capacidad de aumento. Siguiendo los cálculos descritos en APHA (2017), se calcula el número de células por mililitro, de la siguiente manera:

Donde:

N/mL = Número de células contados por mililitros

C = Número de células contados

At = Área de la cámara, mm2

Af = Número de campos

F = Área de campo, mm

V = Volumen de muestra concentrada, mL

Para calcular la densidad de células por litro (Cel/L), se multiplica el anterior valor por 1000.

##### Conteo por tiras

En el conteo por tiras se necesita saber cuál es el área de cada una de estas, esta se calcula entre el largo y el ancho de cada tira. El máximo de longitud que puede tener una tira en una cámara Utermöhl estándar es de 25,8 mm, y el ancho dependerá del aumento que se esté usando. Este último debe ser calculado por el analista antes de iniciar el conteo.

Para el cálculo del número de células por mL se utiliza la siguiente ecuación:

Donde:

N/mL = Número de células contados por mililitros

C = Número de células contados

At = Área de la cámara, mm2

L = Longitud de la tira, mm

W = Amplitud de la tira, mm

S = Número de tiras contadas

V = Volumen de muestra concentrada, mL

Para calcular la densidad de células por litro (Cel/L), se multiplica el anterior valor por 1000.

##### Precisión

La precisión normalmente expresada a un nivel de significancia del 95% como una proporción de la media. La Tabla 3 y la Figura 7 muestran la relación entre el número de unidades contadas y la precisión. En muchos estudios se ha decidido que el recuento de 50 unidades de la especie dominante, dando con un nivel de confianza del 95%, un límite de 28%. Aumentando la precisión por ejemplo a 20% o 10%, se necesita un aumento dramático en unidades contadas, 100 y 400 respectivamente (Edler, 1979; Venrick, 1978). La precisión es calculada mediante la siguiente ecuación:

Precisión % =

Está claro que no es recomendable contar 50 unidades de todas especies presentes en una muestra. Algunas especies pueden no ser lo suficientemente abundante, por lo que disminuirá la precisión general. Por lo tanto, para mantener una precisión aceptable para toda la muestra, al menos 500 unidades en total deberán ser contadas (Edler, 1979).

Tabla 3.

Relación entre el número de células contadas y límites de confianza de 95% con el nivel de significancia (Andersen et al., 2004; Edler, 1979).

| **No. de células contadas** | **Límite de confianza +/- (%)** | **Límite absoluto si la densidad es estimada en organismos/ml** |
| --- | --- | --- |
| 1 | 200 | 1 ± 2 |
| 2 | 141 | 2 ± 2.82 |
| 3 | 116 | 3 ± 3.46 |
| 4 | 100 | 4 ± 4 |
| 5 | 89 | 5 ± 4.47 |
| 6 | 82 | 6 ± 4.89 |
| 7 | 76 | 7 ± 5.29 |
| 8 | 71 | 8 ± 5.65 |
| 9 | 67 | 9 ± 6 |
| 10 | 63 | 10 ± 6.32 |
| 15 | 52 | 15 ± 7.74 |
| 20 | 45 | 20 ± 8.94 |
| 50 | 28 | 50 ± 14.1 |
| 100 | 20 | 100 ± 20 |
| 200 | 14 | 200 ± 28.28 |
| 400 | 10 | 400 ± 40 |
| 500 | 9 | 500 ± 44.7 |
| 1000 | 6 | 1000 ± 63.2 |

Figura 7. Relación entre el número de células contadas y el límite de confianza en 95% de nivel de significancia

##### Límite de detección

El límite de detección es una característica de funcionamiento importante en los estudios de fitoplancton. Para un taxón determinado (asumiendo la distribución aleatoria), el límite de detección puede determinarse mediante estadística de Poisson, conforme a

α = Nivel de significancia.

ndet =límite de detección.

*ftotal =*número total de campos microscópicos en la cámara.

*Fcontados* =número de campos contados.

*V*  = volumen submuestra en la cámara

## Flujograma y descripción de actividades

### Análisis cualitativo de fitoplancton.

Tabla 4.

Flujograma y descripción de actividades análisis cualitativo de fitoplancton

| **No** | **FLUJOGRAMA** | **DESCRIPCIÓN** | **RESPONSABLE** | **REGISTRO** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Inicio | INICIO |  |  |
| 1 | Aclimatar | Aclimatar la muestra durante un periodo de 12 horas. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 2 | Agitar | Agitar suavemente la muestra mediante combinaciones de movimientos horizontales circulares hasta homogeneizarla. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 3 | Extraer | Extraer con ayuda de una pipeta, 1 ml de la muestra. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 4 | Depositar | Depositar la muestra sobre una cámara Sedgwick-Rafter | Analista de laboratorio | No aplica |
| 5 | Girar | Gire lentamente el cubreobjetos para que cubra completamente la cámara, con el fin de evitar que se introduzcan burbujas de aire | Analista de laboratorio | No aplica |
| 6 | Depositar | Depositar la cámara Sedgwick-Rafter sobre la platina del microscopio y realizar una observación de la muestra a una magnificación de 40X o 100X, en búsqueda de organismos fitoplanctónicos | Analista de laboratorio | No aplica |
| 7 | Observar | Observar e identificar los organismos microfitoplanctónicos a magnificaciones de 100X a 600X. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 8 | Generar | Generar una lista preliminar de especies observadas | Analista de laboratorio | No aplica |
| 9 | Determinar | Determinar presencia/ausencia al nivel taxonómico más bajo posible. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 10 | Registrar | Registrar en formato las identificaciones de los especímenes | Analista de laboratorio | No aplica |
|  | Fin | FIN |  |  |

### Análisis semicuantitativo de fitoplancton.

Tabla 5.

Flujograma y descripción de actividades análisis semicuantitativo de fitoplancton

| **No** | **FLUJOGRAMA** | **DESCRIPCIÓN** | **RESPONSABLE** | **REGISTRO** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Inicio | INICIO |  |  |
| 1 | Aclimatar | Aclimatar la muestra durante un periodo de 12 horas. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 2 | Agitar | Agitar suavemente la muestra mediante combinaciones de movimientos horizontales circulares hasta homogeneizarla. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 3 | Extraer | Extraer cuidadosamente el sobrenadante de las muestras depositadas en los tubos falcon. | Analista de laboratorio | M5-00-FOR-136 |
| 4 | Concentrar | Concentrar a un volumen final de 50 ml. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 5 | Mezclar | Mezclar el volumen final preservada en viales de centelleo y extraer con ayuda de una pipeta, 1 ml de la muestra. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 6 | Depositar | Depositar la muestra sobre una cámara Sedgwick-Rafter | Analista de laboratorio | No aplica |
| 7 | Girar | Girar lentamente el cubreobjetos para que cubra completamente la cámara, con el fin de evitar que se introduzcan burbujas de aire | Analista de laboratorio | No aplica |
| 8 | Depositar | Depositar la cámara Sedgwick-Rafter sobre la platina del microscopio y realizar una observación de la muestra a una magnificación de 40X o 100X. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 9 | Realizar | Realizar una visualización previa de la muestra, con la finalidad de tener un conocimiento general de los taxones presentes, formas, características y estructuras que se necesitan para la identificación del fitoplancton y su vez una estimación de la concentración celular. | Analista de laboratorio | No aplica |
|  | A |  |  |  |
|  | A |  |  |  |
| 10 | Generar | Generar una lista preliminar de especies observadas | Analista de laboratorio | No aplica |
| 11 | Decidir | Decidir si se debe contar la cámara completa o una fracción (conteo por campos). | Analista de laboratorio | No aplica |
| 12 | Registrar | Registrar en formato las identificaciones de los especímenes | Analista de laboratorio | No aplica |
|  | Fin | FIN | | |

### Análisis cuantitativo de fitoplancton

Tabla 6.

Flujograma y descripción de actividades análisis cuantitativo de fitoplancton

| **No** | **FLUJOGRAMA** | **DESCRIPCIÓN** | **RESPONSABLE** | **REGISTRO** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Inicio | INICIO |  |  |
| 1 | Aclimatar | Aclimatar la muestra durante un periodo de 12 horas. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 2 | Agitar | Agitar suavemente la muestra mediante combinaciones de movimientos horizontales circulares hasta homogeneizarla. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 3 | Instalar | Instalar la cámara Utermöhl y colocarla sobre una superficie horizontal. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 4 | Adicionar | Adicionar la muestra suficiente para rellenar la cámara en una sola adición. | Analista de laboratorio | M5-00-FOR-136 |
| 5 | Sedimentar | Sedimentar a un tiempo determinado según la altura del cilindro. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 6 | Desplazar | Desplazar el cilindro de sedimentación suavemente sobre la placa base. | Analista de laboratorio | No aplica |
|  | A |  |  |  |
|  | A |  |  |  |
| 7 | Reemplazar | Reemplazar por un cubreobjetos, evitando introducir burbujas de aire en esta etapa. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 8 | Realizar | Realizar un barrido de cámara completa con la magnificación a 100X. para tener una visión general de la densidad y distribución de los individuos | Analista de laboratorio | No aplica |
| 9 | Generar | Generar una lista preliminar de especies observadas | Analista de laboratorio | No aplica |
| 10 | Seleccionar | Seleccionar el conteo dependiendo de la magnificación a utilizar | Analista de laboratorio | No aplica |
| 11 | Identificar | Identificar los organismos hasta el nivel taxonómico más bajo, usando guías taxonómicas especializadas disponibles en el laboratorio de biología. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 12 | Determinar | Decidir la observación de la cámara mediante tres estrategias de recuento, puede ser por selección de campos aleatoriamente, transectas y cámara completa. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 13 | Registrar | Registrar en formato las identificaciones de los especímenes | Analista de laboratorio | M5-00-FOR-136 |
|  | Fin | FIN | | |

### Análisis de viabilidad de fitoplancton en muestras de aguas de lastre.

Tabla 7.

Flujograma y descripción de actividades

| **No** | **FLUJOGRAMA** | **DESCRIPCIÓN** | **RESPONSABLE** | **REGISTRO** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Inicio | INICIO | | |
| 1 | Colocar | Colocar la cámara Sedgwick-Rafter en el portaplaca y ubicar este último sobre la platina del microscopio invertido. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 2 | Asegurar | Asegurar el portaplaca | Analista de laboratorio | No aplica |
| 3 | Esperar | Esperar 15 minutos | Analista de laboratorio | No aplica |
| 4 | Revisar | Revisar la cámara a baja magnificación (10X) | Analista de laboratorio | No aplica |
| 5 | Si  ¿La densidad de organismos es alta?  1  No | ¿La densidad de células es alta? | Analista de laboratorio | No aplica |
| 6 | Realizar | Realizar una dilución con agua de mar filtrada | Analista de laboratorio | No aplica |
| 7 | 1  Contar | Contar el número de organismos presentes en toda la cámara e identificar hasta el nivel taxonómico más bajo posible. | Analista de laboratorio | M5-00-FOR-136 |
| 8 | Realizar | Realizar registro fotográfico con cámara fotográfica o con el microscopio invertido y el software necesario | Analista de laboratorio | No aplica |
| 9 | Lavar | Lavar cuidadosamente la cámara al finalizar el conteo de cada alícuota | Analista de laboratorio | No aplica |
| 10 | Lavar | Lavar en repetidas ocasiones la pipeta al cambiar de muestra | Analista de laboratorio | No aplica |
|  | Fin | FIN | | |

# FACTORES DEL AMBIENTE, LA SEGURIDAD Y SALUD EN EL TRABAJO

Toda actividad rutinaria y no rutinaria, interna o externa, en todas las áreas y unidades de trabajo; que se desarrolle dentro del cumplimiento de la misión de la Dimar, debe realizarse teniendo en cuenta el cuidado al medio ambiente y las personas, es por esto que se analizaron cada una de las actividades de la entidad y se determinaron los aspectos e impactos ambientales que se generan; los peligros y riesgos asociados; y las necesidades para establecer los controles, desde la gestión ambiental y de la seguridad y salud en el trabajo.

Por tal razón, en desarrollo de cada actividad se debe tener en cuenta la identificación de peligros, evaluación, valoración de riesgos y determinación de controles, los aspectos e impactos ambientales, el contexto normativo que se debe cumplir, los programas de gestión y procedimientos seguros de trabajo, para lograr mejorar las condiciones de trabajo, minimizar cualquier riesgo en el desarrollo de las actividades y realizar un adecuado manejo y optimización de los recursos, para prevenir, mitigar, controlar y compensar de ser necesario el impacto generado por la actividad realizada.

## 7.1. Factores del ambiente

La Dimar identificó los aspectos ambientales relacionados a las actividades, y sus impactos ambientales asociados, como resultado total o parcial de los aspectos ambientales, en todas sus dependencias; lo cual se observa en la ***Matriz de Identificación de Aspectos e Impactos Ambientales*** para una consulta del nivel de detalle requerido y determinar el programa ambiental que lo minimiza.

**7.2. Factores de la seguridad y salud en el trabajo**

La Dimar identificó, evalúo y valoró los factores de riesgos presentes en los procesos de la Entidad, para establecer mecanismos que los eliminen o mitiguen a los límites tolerables en todas sus dependencias; lo cual se observa en la ***Matriz de Identificación de Peligros, Evaluación, Valoración de Riesgos*** y determinación de controles por dependencia para una consulta del nivel de detalle requerido, detallando las medidas de intervención que lo minimice.

# ANEXOS

No aplica para este procedimiento.