# OBJETIVOS

Establecer el procedimiento para la determinación de la densidad zooplanctónica y calcular mediante análisis gravimétricos y volumétricos la biomasa del zooplancton colectado en muestras de aguas marinas y estuarinas.

# ALCANCE

Este procedimiento es aplicable para el análisis de muestras oceánicas, costeras y/o estuarinas de la comunidad zooplanctónica, enfocado a determinar la abundancia en términos de densidad (individuos/volumen) y la productividad secundaria en términos de biomasa, expresada en unidades de masa por unidades de volumen.

# GLOSARIO

**Alícuota:** La alícuota es una parte que se toma de un volumen o de una masa iniciales, para ser usada en una prueba de laboratorio, cuyas propiedades físicas y químicas, así como su composición, representan las de la sustancia original.

**Biomasa:**  Cantidad de materia viva acumulada en una comunidad biológica.

**Biovolumen:** Volumen que ocupa la biomasa deuna comunidad biológica

**Densidad:** Medida del número de individuos (zoopláncteres) por unidad de volumen.

**Formalina:** Solución de agua de mar con formol buferizado.

**Peso húmedo:** Peso de los tejidos de los organismos más el agua contenida en estos.

**Peso seco:** Cantidad total del tejido de los organismos menos el peso húmedo.

**Peso seco sin ceniza:** Peso seco menos el peso del material inorgánico.

**Zooplancter:** Individuo perteneciente a la comunidad Zooplanctónica, que cuenta como una unidad identificable taxonómicamente.

**Zooplancton:** Conjunto de animales heterótrofos de diferentes filos que forman parte del plancton.

# DOCUMENTOS DE REFERENCIA

* BAIRD, R., EATON, A. y RICE, E. 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23rd edition. Washington D.C.: American Public Health Association, pp. 1–541. <https://doi.org/10.2105/AJPH.56.3.387>.
* BRIERLEY, B., CARVALHO, L., DAVIES, S., y KROKOWSKI, J. 2007. Guidance on the quantitative analysis of phytoplankton in Freshwater Samples.
* CHIBA, S, S. BATTEN, C.S. MARTIN, S. IVORY, P. MILOSLAVICH y L.V. WEATHERDON. 2018. Zooplankton monitoring to contribute towards addressing global biodiversity conservation challenges. Journal of Plankton Research 40(5): 509–518.
* EDLER, L. 1979. Recommendations on methods for Marine Biological Studies in the Baltic Sea. Phytoplankton and Chlorophyll. Baltic Marine Biologists Publication No. 5, pp. 38.
* EDLER, L. y ELBRÄCHTER., M. 2010. The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. En: Intergovernmental Oceanographic Commission of ©UNESCO. Karlson, B., Cusack, C. y Bresnan, E. (Editors). Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, no. 55.), pp. 13-20.
* ELANGOVAN, S., KUMAR, M., SANKAR, R., JAYABARATHI, R. y PADMAVATI, G. 2012. Abundance, species composition of microzooplankton from the coastal waters Blair, South andaman Island. Aquatic Biosystems, 8:20.
* FURET, J.E. y BENSON-EVANS, K. 1982. An evaluation of the time required to obtain sedimentation of fixed algal particles prior to enumeration. Britanic Phycology Journal17, 253.
* GODHANTARAMAN, N. 1994. Species composition and abundance of tintinnids and copepods in the Pichavaram mangroves (South India). Ciencias Marinas 20, 371–391.
* GOSWAMI, S.C. 2004. Zooplankton methodology, collection y identification - A field manual. Dona Paula, Goa: National Institute of Oceanography: 26 pp.
* HASLE, G. R. 1978. The inverted-microscope method. En: Sournia, A. (Ed.) Phytoplankton manual. UNESCO Page Brothers (Noruie) Ltd., 88-96.
* KEISTER, J.E., D. BONNET, S. CHIBA, C.L. JOHNSON, D.L. MACKAS Y R. ESCRIBANO. 2012. Zooplankton population connections, community dynamics, and climate variability. ICES Journal of Marine Science 69 (3): 347–350.
* JACOBS, F. y G. GRANT. 1978. Guidelines for zooplankton sampling in quantitative baseline and monitoring programs. U.S. Environmental Protection Agency 600: 3-78.
* LEGRESLEY, M., y MCDERMOTT, G. 2010. Counting chamber methods for quantitative phytoplankton analysis - haemocytometer, Palmer-Maloney cell and Sedgewick-Rafter cell. En:  Intergovernmental Oceanographic Commission of ©UNESCO. Karlson, B., Cusack, C. y Bresnan, E. (Editors). Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, no. 55.), pp. 25-30.
* LENZ, J. 2000. Introduction. En: Harris, R., Wiebe, P., Lenz, J., Skjoldal, R., y Huntley, M. (Editors). ICES zooplankton methodology manual. Reino Unido, Academic Press, pp.83-192.
* LUND, J.W.G., KIPLING, C. y LECREN, E.D. 1958. The inverted microscope methods of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. Hydrobiologia, 11:143-169.
* MONCHEVA, S. y PARR, B. 2010. Manual for Phytoplankton sampling and nalysis in the Black Sea. 67 pp.
* NAUWERCK, A. 1963. Die beziehungen zwischen zooplankton und phytoplankton im See Erken. Symb. Bot. Ups. 17(5), 1-163.
* PAXINOS, R. y MITCHELL, J. 2000. A rapid Utermöhl method for estimating algal numbers, Journal of Plankton Research 22 (12), 2255–2262. <https://doi.org/10.1093/plankt/22.12.2255>.
* POSTEL, L., FOCK H., y HAGEN, W. 2000. Biomass and abundance. En: Harris, R., Wiebe, P., Lenz, J., Skjoldal, R., y Huntley, M. (Editors). ICES zooplankton methodology manual. Reino Unido, Academic Press, pp.83-192.
* SANTHANAM, P., P. PACHIAPPAN y A. BEGUM. 2019. A Method of Collection, Preservation and Identification of Marine Zooplankton. En: SANTHANAM, P., A. BEGUM Y P. PACHIAPPAN (Eds). Basic and Applied Zooplankton Biology. Springer Singapore. 442 pp.
* SIEBURTH, J, SMETACEK, V. y LENZ, J. 1978. Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. Limnology and Oceanography, 23: 1256-1263.
* SHUKHANOVA, Z.N.1978. Settling without the inverted microscope. En: A. Sournia (Ed.), Phytoplankton Manual UNESCO, Page Brothers (Noruie) Ltd., 97 pp.
* WEBER, C.1973. Biological field and laboratory method for measuring the quality of surface waters and effluents. Natural Environment Research Center. U.S. Environmental Protection Agency. 194 pp.
* WIEBE, P., BUCKLIN, A. y BENFIELD, M. 2017. Sampling, Preservation and Counting of Samples II: Zooplankton. In Castellani, C. and Edwards, M. (eds.), Marine plankton: a practical guide to ecology, methodology, and taxonomy (First edition), pp. 104-134.  Oxford University Press, Oxford; New York, NY.
* M5-00-FOR-136 Datos Primarios de Análisis Densidad de Plancton y Macroinvertebrados Bentónicos
* M5-00-FOR-137 Análisis gravimétricos y volumétricos zooplancton
* M5-00-PRO-027 Toma de Muestras

# CONDICIONES GENERALES

## Generalidades

El término zooplancton se refiere al componente animal del plancton (Santhanam et al., 2019), el cual se caracteriza por formas de vida microscópicas que viven en la columna de agua y no tienen la habilidad para contrarrestar el movimiento de las corrientes, por lo que viven flotando o suspendidos (Baird et al., 2017). Cumplen un importante rol dentro de los niveles de la cadena trófica, sobre todo en la producción secundaria, ya que son el principal vínculo de transformación y transferencia de energía obtenida de los productos sintetizados por el fitoplancton hacia niveles superiores.

El zooplancton incluye al menos un estadio de desarrollo de casi todos los taxones animales, particularmente invertebrados, lo cual lo convierte en un grupo muy diverso (Jacobs & Grant, 1978) morfológica, filogenética y ecológicamente. Debido a su pequeño tamaño y a sus cortos ciclos de vida, estos organismos son sensibles a los cambios ambientales asociados a la variabilidad hidroclimática y a factores de estrés ambiental (Chiba et al., 2018). En este sentido, cambios en su abundancia y composición alteran la estructura de los ensamblajes marinos (por ejemplo, el potencial de pesca pelágica) y modifican su distribución, afectando las interacciones tróficas y la energía disponible en estos ecosistemas (Keister et al., 2012).

La densidad de zooplancton es una medida importante para el estudio de la comunidad planctónica. Con esta medida se estima la dominancia de grupos taxonómicos sobre otros y la distribución del recurso dentro de la comunidad en el tiempo y espacio.

Por su parte, la medida de la biomasa del zooplancton brinda información acerca de la productividad secundaría y la actividad biológica de un área determinada y es importante para el estudio de las relaciones energéticas entre las comunidades del fitoplancton, zooplancton y el necton. Con estos datos se puede evaluar los cambios en la productividad de diferentes sitios y su relación con cambios en las variables abióticas que puedan explicarlos. Las propiedades del zooplancton usadas para caracterizar su biomasa incluyen su volumen, peso (húmedo, seco, seco libre de ceniza), composición química y contenido calórico.

## Equipos

* Balanza analítica (+/- 0.1 mg)
* Bomba de vacio
* Cabina de extracción
* Cámara Bogorov
* Cámara Sedgwick-Rafter
* Cámara Utermöhl
* Estereomicroscopio
* Fraccionador Folsom
* Fraccionador Motoda
* Horno (estufa)
* Microscopio invertido
* Mufla
* Unidad de filtración

## Materiales

* Beakers
* Cajas Petri
* Crisoles
* Desecador
* Papel aluminio
* Pinzas blandas
* Pinzas para crisoles
* Pipeta Hensen-Stempel
* Probetas
* Recipientes para muestras rotulados
* Tamiz de 4 cm
* Tamiz de 50 o 100 µm

## Reactivos

* Formaldehído buferizado al 37% con tetraborato de sodio
* Solución de Lugol para tinción de células en procedimientos de microscopía, Yodo/Potasio yodado.

## Recomendaciones

* Emplear los Elementos de Protección Personal (EPP) recomendados para la realización de este ensayo (guantes, gafas, tapabocas y bata), así como cualquier otro recomendado por el Jefe de Laboratorio.
* Tener especial cuidado con la manipulación de las muestras con formaldehído

# DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

## Procedimiento

En esta sección se detalla el procedimiento para realizar el análisis cualitativo y cuantitativo de la comunidad zooplanctónica considerando cuatro clases de tamaño con base en Lenz (2000) y Sieburth et al. (1978): microzooplancton (20-200 µm), mesozooplancton (200 µm -20 mm), macrozooplancton (2-20 cm) y megazooplancton (20-200 cm).

### Análisis de la comunidad microzooplanctónica (20- 200 µm)

La composición taxonómica y densidad de la comunidad microzooplanctónica será analizada a partir de las muestras colectadas para fitoplancton y preservadas con solución Lugol.

En términos generales, el proceso incluye la concentración de las muestras por sedimentación y su posterior observación y conteo a través de microscopía óptica. Para el método de Utermöhl, el tiempo de sedimentación depende de la altura de la cámara y el preservante usado (Nauwerck, 1963). Los tiempos recomendados para cada caso son mostrados en la Tabla 1. La cuantificación de organismos puede realizarse en cámara Sedgwick-Rafter o en cámara Utermöhl; la primera es recomendada para muestras con alta densidad de organismos (LeGresley & McDermott, 2010) y la segunda, cuando la densidad de organismos es baja (Paxinos & Mitchell, 2000). En este sentido, se sugiere el uso de conteo mediante cámaras Sedgwick-Rafter para muestras obtenidas con redes de arrastre y cámaras Utermöhl, para muestras colectadas mediante botellas Niskin.

Tabla 1.

Tiempos de sedimentación recomendados para aplicación del método Utermöhl según el fijador utilizado.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Fijación con solución lugol** | | |
| **Volumen de la cámara (ml)** | **Altura aproximada de la cámara (cm)** | **Tiempo de sedimentación (h) sugerido por Edler (1979)** |
| 2 | 1 | 3 |
| 10 | 2 | 8 |
| 25 | 5 | 16 |
| 50 | 10 | 24 |
| Fijación con formaldehído al 4% | | |
| 40 h independiente del volumen de la cámara (Hasle, 1978) | | |

#### Análisis en cámaras Sedgwick-Rafter

##### Concentración de las muestras

* Mantener la muestra en completa quietud tras su arribo al laboratorio.
* Dejar precipitar la muestra 48 h (Godhantaraman, 1994).
* Una vez haya terminado el periodo de sedimentación, extraer cuidadosamente el sobrenadante utilizando una pipeta; procurar no generar burbujas ni movimiento en la muestra.
* Para reducir el riesgo de pérdida de organismos, revisar siempre una alícuota del sobrenadante cada 10 o 5 alícuotas extraídas. Tenga en cuenta que la revisión debe hacerse con mayor frecuencia a medida que el volumen de muestra disminuye.
* Si ante un menor volumen de muestra se dificulta la extracción, verter el contenido restante en uno o varios tubos Falcon, lavando el recipiente original con un poco de agua de mar filtrada para evitar pérdida de organismos.
* Dejar sedimentar nuevamente 48 h (Godhantaraman, 1994).
* El volumen concentrado de muestra puede variar según el ambiente y método de colecta de la muestra oscilando entre 50 y 100 ml (Shukhanova, 1978) e incluso menos (Elangovan et al., 2012). Según su volumen, almacenar las muestras concentradas en tubos Falcon (> 20 ml) o viales de borosilicato (≤ 20 mil) rotulados adecuadamente.

##### Extracción de alícuotas

En este paso se deben extraer alícuotas de 1 ml de muestra concentrada según el numeral 6.1.1.1.1 para proceder con el conteo de microzoopláncteres.

* Homogeneizar cada muestra concentrada de manera manual alternando movimientos verticales y circulares durante dos minutos. No agitar vigorosamente.
* Cuando los zoopláncteres estén homogéneamente distribuidos en el sobrenadante, accionar la pipeta Hensen-Stempel de 1 ml y capturar la alícuota.
* Colocar sobre la cámara Sedgwick-Rafter vacía, la placa cubreobjeto en posición diagonal (Figura 1A).
* Verter cuidadosamente la alícuota extraída en la cámara Sedgwick-Rafter a través de uno de los extremos descubiertos de la misma (Figura 1B).
* A medida que va vertiendo la alícuota, mueva el cubreobjetos lentamente en sentido de las manecillas del reloj (Figura 1D-E), evitando la formación de burbujas, hasta llenar totalmente la cámara Sedgwick-Rafter (Figura 1F). Si con el movimiento del cubreobjetos las burbujas no desaparecen, servir una nueva alícuota.

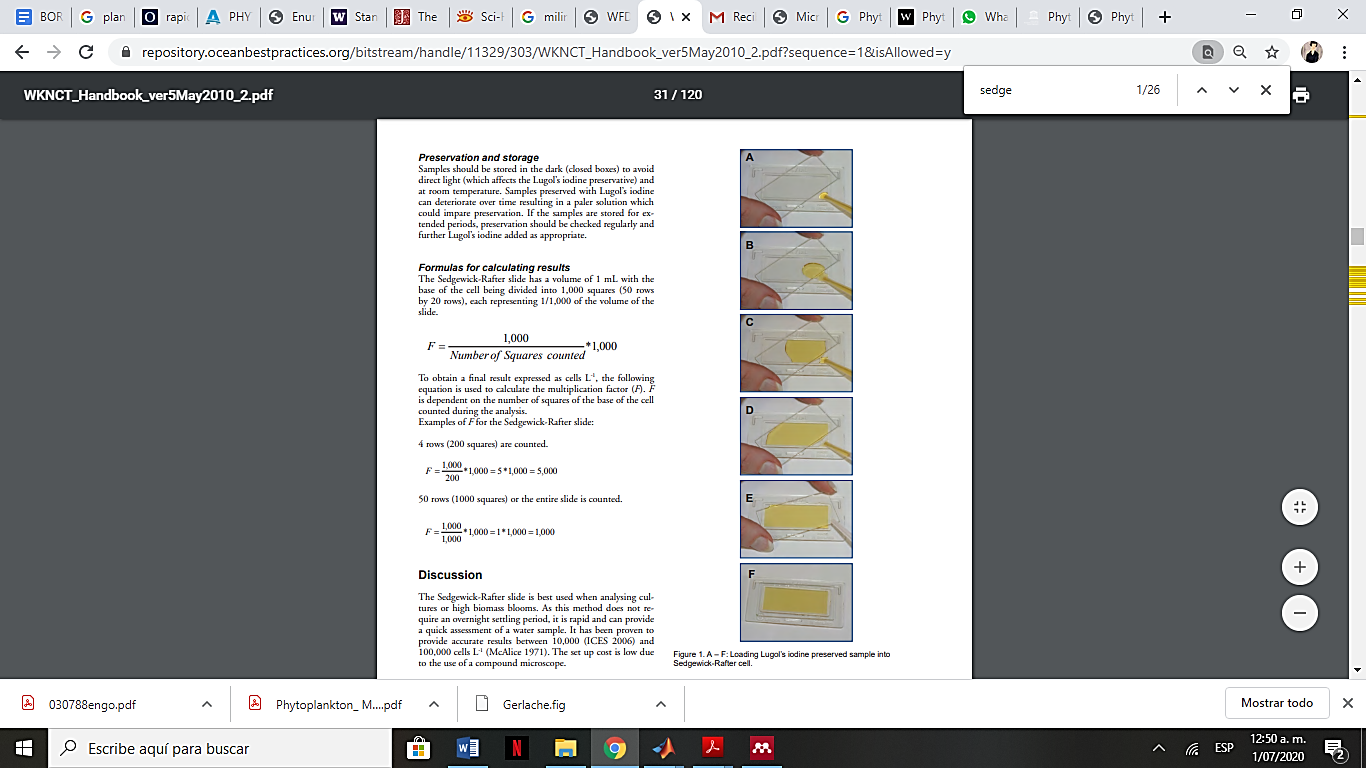
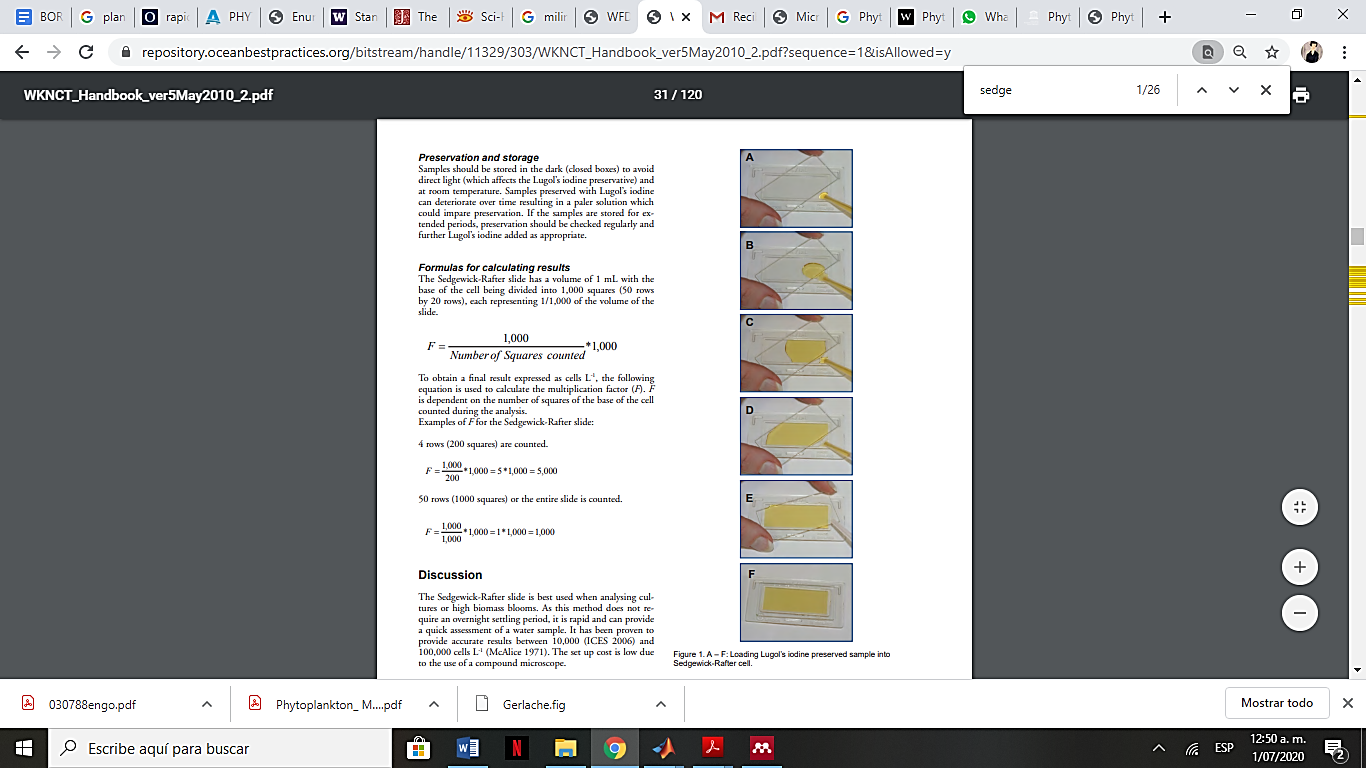


Figura 1. Procedimiento de montaje de una alícuota de muestra en una cámara Sedgwick-Rafter. Tomado de LeGresley y McDermott (2010).

##### Recuento en cámara Sedgwick-Rafter

* Tras servir la alícuota, colocar la cámara Sedgwick-Rafter en el portaplaca y ubicar este último sobre la platina del microscopio invertido.
* Asegurar el portaplaca.
* Esperar 15 minutos para permitir que el microplancton se deposite en el fondo de la placa (Weber, 1973; LeGresley & McDermott, 2010).
* Revisar la cámara a baja magnificación (10X) para verificar la concentración de organismos. En caso de que la densidad de organismos sea alta, realizar una dilución con agua de mar filtrada (LeGresley & McDermott, 2010).
* Contar el número de organismos presentes en toda la cámara a un aumento mínimo de 200X (Moncheva & Parr, 2010) e identificar hasta el nivel taxonómico más bajo posible.
* Cuando lo requiera, realizar registro fotográfico con cámara fotográfica o empleando el microscopio invertido y el Software necesario (e. g. CellSens).
* Lavar cuidadosamente la cámara al finalizar el conteo de cada alícuota para evitar contar nuevamente organismos que puedan quedar adheridos a la misma, así como la contaminación cruzada entre muestras.
* Se recomienda lavar en repetidas ocasiones la pipeta al cambiar de muestra, de esta manera evitará la contaminación con organismos retenidos.

#### Análisis por el método de Utermöhl

Antes de iniciar el procesamiento, tanto las muestras como las cámaras de sedimentación deben mantenerse en reposo bajo las condiciones de laboratorio (Moncheva & Parr, 2010) por un periodo ideal de 24 h y mínimo de 12 h (Brierley et al., 2007). Este periodo de aclimatación es importante para prevenir corrientes de convección y la formación de burbujas de aire que pueden interferir con la sedimentación (Edler & Elbrächter, 2010).

El volumen de las submuestras dependerá de la densidad de organismos. Para aguas oligotróficas pueden llegar a requerirse más de 100 ml de muestra, mientras que, para aguas con elevadas concentraciones de organismos suelen realizarse diluciones. Se recomienda el uso de cilindros de 2.5 ml para densidades altas y 10 ml para densidades bajas (Brierley et al., 2007). Sin embargo, considerando que se trabaja con una comunidad de organismos poco frecuentes, se sugiere la concentración de submuestras de 50 ml (Hasle, 1978; Moncheva & Parr, 2010).

##### Concentración de las muestras

* Homogeneizar cada muestra de manera manual alternando movimientos verticales y circulares durante tres minutos (Brierley et al., 2007; Moncheva & Parr, 2010), realizando mínimo 50 movimientos (Edler & Elbrächter, 2010). No agitar vigorosamente.
* Ubicar la cámara de sedimentación sobre una superficie totalmente plana.
* Servir con un solo movimiento la cantidad de muestra adecuada para el cilindro que será empleado (Edler & Elbrächter, 2010).
* Cubrir la cámara con la placa cubreobjetos gruesa, evitando que se formen burbujas en el interior. De ser necesario engrasar la placa que cubrirá la cámara con un poco de vaselina para mantener el sello hermético (Edler & Elbrächter, 2010).
* Cubrir el montaje de las cámaras de sedimentación con una caja plástica (Edler & Elbrächter, 2010).
* Mantener las cámaras en proceso de sedimentación, bajo condiciones oscuras y en completa quietud durante el tiempo de sedimentación indicado para cada caso en la Tabla 1.
* Una vez el periodo de sedimentación ha culminado, deslizar una placa cubreobjetos a la altura de la base del cilindro de sedimentación hasta desplazarlo completamente, evitando la introducción de burbujas (Figura 2).

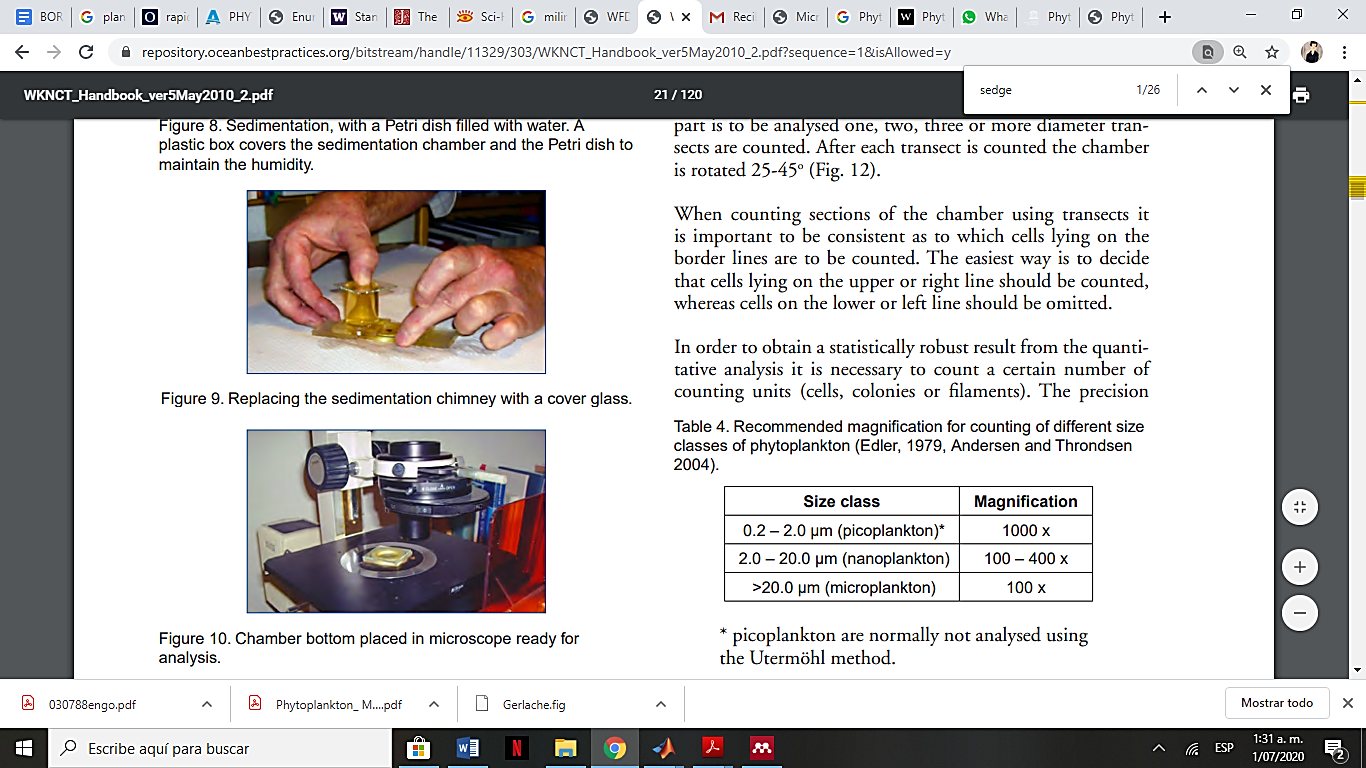
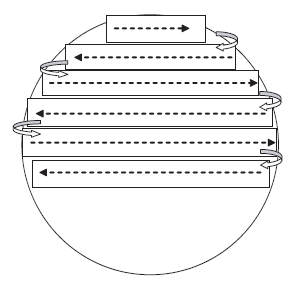


Figura 2. Operación de reemplazo del cilindro de sedimentación por el cubreobjetos. Tomado de Edler y Elbrächter, 2010.

##### Recuento en cámara Utermöhl

El proceso de recuento se realiza a partir de la cámara sellada según lo señalado en el numeral 6.1.1.2.1.

* Trasladar la cámara cuidadosamente hacia el microscopio invertido y ubicarla en el portaplaca.
* Asegurar el portaplaca.
* Revisar la cámara a baja magnificación (10X) para verificar la concentración de organismos. Si la distribución de los organismos sobre el fondo de la placa no es equitativa, la muestra deberá descartarse e iniciar nuevamente el proceso de concentración (Edler & Elbrächter, 2010).
* Contar el número de organismos presentes en toda la cámara (**Figura 3**) a un aumento mínimo de 200X (Moncheva & Parr, 2010) e identificar hasta el nivel taxonómico más bajo posible.
* Cuando lo requiera, realizar registro fotográfico con cámara fotográfica o empleando el microscopio invertido y el Software necesario (e.g. CellSens) a un aumento mínimo de 40X.
* Lavar cuidadosamente la cámara al finalizar el conteo de cada alícuota para evitar contar nuevamente organismos que puedan quedar adheridos a la misma.



**Figura 3.** Esquema del recuento de la totalidad de la cámara Utermöhl. La flecha indica la dirección de conteo**.**

### Análisis de la comunidad mesozooplanctónica (200 µm -20 mm)

#### Extracción de zoopláncteres mayores a 2 cm: macroplancton y megaloplancton

Antes de proceder con los análisis respectivos de la muestra se recomienda realizar la extracción de los organismos más grandes (Baird et al., 2017). En este paso se deben extraer los zoopláncteres gelatinosos (e.g. Medusas, ctenóforos y salpas) y de un tamaño superior a 2 cm de las muestras de zooplancton colectadas en el procedimiento M5-00-PRO-027 Toma de Muestras, los cuales corresponden a las categorías de macroplancton (2 - 20 cm) y megaloplancton (20 cm - 2 m) con base en Lenz (2000) y Sieburth et al. (1978).

* Filtrar la muestra a través de un tamiz de 2 cm de ojo de malla.
* Lavar con agua de mar filtrada la porción que queda de la muestra sobre el tamiz hasta que los zoopláncteres más pequeños caigan en la muestra filtrada.
* Depositar la muestra filtrada nuevamente en su recipiente original.
* Retirar del tamiz los zoopláncteres gelatinosos y grandes.
* Depositar en un recipiente debidamente rotulado con los datos de la muestra original.
* Preservar con formol buferizado al 4% en agua de mar filtrada.

#### Fraccionamiento de la muestra

Posterior a la extracción de los zoopláncteres según lo indicado en el numeral 6.1.2.1, se debe dividir la muestra original de zooplancton en dos submuestras, correspondiendo cada una al 50%, para lo cual se puede usar un fraccionador Folsom (Baird et al., 2017).

* Medir el volumen total de la muestra en un recipiente volumétrico.
* Si el volumen de la muestra es inferior a un litro, adicionar agua de mar filtrada para llevarlo al volumen indicado. Si la muestra tiene un volumen superior, dejar precipitar los zoopláncteres y extraer el sobrenadante hasta completar el volumen deseado.
* Con el volumen estandarizado a 1 litro, verter la muestra en la cámara circular del fraccionador Folsom.
* Una vez dentro del fraccionador, balancear la muestra 10 veces, moviendo la cámara circular del fraccionador.
* Cuando se cumpla el paso anterior, separar la muestra en los colectores inferiores del fraccionador Folsom.
* Envasar cada una de las submuestras en recipientes separados.
* Rotular cada submuestra con información del porcentaje de la muestra original que representa (50%) y el análisis para el cual será empleada (densidad o biomasa).

#### Análisis de densidad de mesozooplancton

En esta parte del procedimiento se procesa la submuestra destinada a los análisis de densidad obtenida a partir del numeral 6.1.2.2.

* Medir el volumen de la submuestra en un beaker volumétrico.
* Lavar la muestra con abundante agua de mar filtrada en una cámara extractora (Postel et al., 2000) con un tamiz de 100 µm.
* Servir la muestra con agua de mar filtrada, en su totalidad o fraccionada, en cajas Petri para el conteo y separación del total de organismos pertenecientes a grupos poco abundantes y/o de interés particular de la investigación (Wiebe et al., 2017; Goswami, 2004).
* Almacenar cada grupo en recipientes de tamaño adecuado y debidamente rotulados, preservar con formaldehído buferizado al 4 % para su posterior identificación.
* Para el análisis de los grupos más abundantes, depositar el volumen restante de la muestra en su recipiente original y preservar nuevamente para su posterior análisis.
* Lavar la muestra con abundante agua de mar filtrada y medir su volumen en un beaker volumétrico.
* En caso de observar una baja cantidad de organismos, se recomienda que la muestra sea primero concentrada por filtración (Baird et al., 2017). En contraste, para grandes cantidades de organismos, se aconseja llevar a un volumen estándar adicionando agua de mar filtrada. La selección del factor de dilución necesario para alcanzar una concentración apropiada para el análisis estará basada en la experiencia del analista (Postel et al., 2000).
* Una vez estandarizado el volumen, con la pipeta Hensen-Stempel homogeneizar la muestra agitándola en forma circular. Tener en cuenta que el volumen estandarizado debe ser el mismo para todas las muestras provenientes de un mismo muestreo; sin embargo, puede variar entre muestreos.
* Cuando los zoopláncteres presentes en el beaker estén homogéneamente distribuidos, accionar la pipeta y capturar una alícuota equivalente al volumen de la cámara Bogorov que será empleada (Postel et al., 2000; Baird et al., 2017).
* Retirar la pipeta Hensen-Stempel del beaker y verter en la cámara Bogorov el volumen correspondiente.
* Revisar la cámara Bogorov bajo el estereoscopio, iniciando en una de las esquinas y trasladándose lateralmente.
* Por cada individuo observado, hacer un registro de conteo en el formato M5-00-FOR-136 Datos Primarios para el Análisis de Densidad de Plancton y Macroinvertebrados Bentónicos, indicando a qué grupo taxonómico pertenece.
* Continuar con el proceso de recuento hasta que el grupo más abundante alcance mínimo 200 organismos para alcanzar una precisión de 14% (ver Tabla 2) (Postel et al., 2000). De ser necesario, tomar más alícuotas.
* Terminar el conteo de la muestra una vez alcanzado este número y finalizada la revisión de la totalidad de la alícuota.
* Registrar los resultados del conteo en el formato M5-00-FOR-136 Datos Primarios para el Análisis de Densidad de Plancton y Macroinvertebrados Bentónicos.

#### Análisis de biomasa y biovolumen

Con la submuestra, correspondiente al 50 % de la muestra original, obtenida en el numeral 6.1.2.2 se realizará la determinación de la biomasa (biovolumen, peso húmedo, peso seco, peso seco libre de ceniza) mediante análisis volumétricos y gravimétricos.

##### Análisis volumétrico (biovolumen)

* Filtrar la muestra con una malla de 20 µm en una bomba de vacío para eliminar el exceso de agua.
* Llenar una probeta con agua de mar filtrada hasta un volumen conocido, el cual se registra en el formato M5-00-FOR-137 Análisis gravimétricos y volumétricos zooplancton.
* Con ayuda de unas pinzas blandas, depositar la masa de zooplancton en la probeta con agua de mar filtrada. Si nota que al depositar la totalidad de la masa zooplanctónica se sobrepasará la capacidad máxima de la probeta, se recomienda dividir la masa de zooplancton en partes iguales (las necesarias) y depositarlas en un número equivalente de probetas.
* Registrar el (los) volumen(es) de agua desplazado(s) en el formato M5-00-FOR-137 Análisis gravimétricos y volumétricos zooplancton.
* Verter el contenido de la probeta en embudo de filtración para retirar el exceso de agua.
* Depositar la masa de zooplancton en una caja Petri debidamente rotulada con los datos de la muestra original.

##### Análisis gravimétrico

* Para cada muestra a analizar, relacionar un crisol de tamaño congruente con el volumen de la misma.
* Elaborar tapas con papel aluminio de acuerdo al tamaño de los crisoles y rotular con la información de cada muestra.
* Pesar dos veces en una balanza analítica cada crisol junto con su respectiva tapa de aluminio.
* Registrar los valores obtenidos en el formato M5-00-FOR-137 Análisis gravimétricos y volumétricos zooplancton.

##### Peso húmedo

* Trasladar la masa de zooplancton reservada en la caja Petri (6.1.2.4.1) con ayuda de unas pinzas blandas a uno de los crisoles cubiertos con tapa aluminio previamente pesados (6.1.2.4.2).
* Cubrir la muestra con papel aluminio
* Pesar dos veces los crisoles con la muestra correspondiente en su interior en una balanza analítica.
* Registrar los datos obtenidos en el formato M5-00-FOR-137 Análisis gravimétricos y volumétricos zooplancton**.**

##### Peso seco

* Precalentar el horno a 60°C.
* Una vez alcanzada la temperatura deseada, introducir los crisoles con muestra y mantenerlos allí durante 24 horas (Postel et al., 2000). Organizar los recipientes dentro del horno de manera equidistante.
* Cumplido el tiempo establecido, retirar los crisoles con ayuda de unas pinzas para crisol.
* Depositar los crisoles en el desecador por al menos 30 minutos, mientras baja la temperatura.
* Retirar los crisoles del desecador y pesar dos veces en la balanza analítica.
* Anotar los datos en el formato M5-00-FOR-137 Análisis gravimétricos y volumétricos zooplancton.

##### Peso seco libre de ceniza

* Introducir los crisoles sin la tapa de aluminio (esto evita que se incineren y aumente el error al momento de pesar) en la mufla a una temperatura de 500°C. Tratar de organizar los recipientes dentro de la mufla de manera equidistante.
* Tras alcanzar la temperatura deseada, mantener los crisoles en el interior durante 6 horas.
* Retirar los crisoles con ayuda de unas pinzas para crisol, y depositarlos en el desecador por al menos 30 minutos, mientras baja la temperatura.
* Retirar los crisoles del desecador y colocarle su respectiva tapa de aluminio.
* Pesar dos veces en una balanza analítica.
* Anotar los datos en el formato M5-00-FOR-137 Análisis gravimétricos y volumétricos zooplancton.
* Descartar el residuo de cada crisol luego de la incineración.

### Análisis de la comunidad zooplanctónica perteneciente al macroplancton (2 - 20 cm) y megaloplancton (20 cm - 2 m)

* Depositar los organismos extraídos en el numeral 6.1.2.1 en un tamiz de tamaño de poro de 100 o 200 µm.
* Lavar en el tamiz los organismos depositados con agua de mar filtrada hasta retirar los residuos de formol.
* Una vez haya retirado los residuos de formol, disponer los organismos en cajas Petri.
* Revisar en el estereoscopio la caja Petri y mantener hidratados los organismos con agua de mar filtrada para realizar su observación, identificación taxonómica y cuantificación.
* Una vez realice el conteo e identificación, registrar los datos en el formato M5-00-FOR-136 Datos Primarios para el Análisis de Densidad de Plancton y Macroinvertebrados Bentónicos.
* Disponer cada organismo en un recipiente adecuado debidamente rotulado.
* Preservar el contenido de cada recipiente con formaldehído al 4%.
* Almacenar el recipiente en su lugar de disposición final.

### Análisis de viabilidad de zooplancton en muestras de agua de lastre.

* Medir el volumen de la muestra en un beaker volumétrico.
* Una vez medido el volumen, con la pipeta Hensen-Stempel homogeneizar la muestra agitándola en forma circular. Tener en cuenta que el volumen estandarizado debe ser el mismo para todas las muestras provenientes de un mismo muestreo; sin embargo, puede variar entre muestreos.
* Cuando los zoopláncteres presentes en el beaker estén homogéneamente distribuidos, accionar la pipeta y capturar un alícuota equivalente al volumen de la cámara Bogorov que será empleada (Postel et al., 2000; Baird et al., 2017).
* Retirar la pipeta Hensen-Stempel del beaker y verter en la cámara Bogorov el volumen correspondiente.
* Revisar la cámara Bogorov bajo el estereoscopio, iniciando en una de las esquinas y trasladándose lateralmente.
* Revisar si los zoopláncteres tienen movimiento, tanto de desplazamiento como de alimentación, para confirmar que están vivos.
* Por cada individuo vivo observado, hacer un registro de conteo en el formato M5-00-FOR-136 Datos Primarios para el Análisis de Densidad de Plancton y Macroinvertebrados Bentónicos, indicando a qué grupo taxonómico pertenece.
* Continuar con el proceso de recuento hasta que el número de alícuotas sin individuos sea mayor que 3.
* Registrar los resultados del conteo en el formato M5-00-FOR-136 Datos Primarios para el Análisis de Densidad de Plancton y Macroinvertebrados Bentónicos.

## Cálculos

### Análisis de la comunidad microzooplanctónica (20- 200 µm)

#### Volumen de agua filtrada por la red

Donde,

= Volumen de agua filtrada por la red en m3

= Diámetro de la red en metros

= Distancia recorrida por la red en metros

La distancia recorrida por la red () se calcula así:

Donde,

= Lectura final del flujómetro

= Lectura inicial del flujómetro

= 26873, constante del rotor

#### Análisis en cámara Sedgwick-Rafter

Esta ecuación de cálculo aplica para muestras de microzooplancton contadas por alícuotas en cámaras Sedgwick-Rafter.

##### 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 organismos por mililitro con la siguiente ecuación:

= número total de organismos contadas por mililitro.

= número de organismos 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 organismos contadas por mililitro.

= número de organismos 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, donde el área del campo 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 organismos por mililitro, de la siguiente manera:

= Número total de organismos contadas por mililitro.

= Número de organismos 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 (2017).

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

= Número total de organismos contadas por mililitro.

= Número de organismos 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 los organismos por litro hallados 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:

Org/L= Densidad de organismos por litro

= Número de Org/ml encontrados en la alícuota.

= Volumen concentrado de la muestra (ml)

= Volumen total de la alícuota (ml)

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

#### Análisis por el método Utermöhl

La cuantificación del microzooplancton será realizada estadísticamente, ya que no es posible contar todos los individuos que se encuentran en la muestra. Se utilizan métodos de recuento de zoopláncteres para 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 el mismo organismo dos veces.

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

Donde:

Org/L = Densidad de microzooplancton.

N = Número de organismos contados.

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, que 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 organismos por mililitro, de la siguiente manera:

Donde:

N/mL = Número de organismos contados por mililitros

C = Número de organismos contados

At = Área total de la cámara, mm2

Af = Número de campos

F = Área de campo, mm2

V = Volumen de muestra concentrada, mL

Para calcular la densidad de organismos por litro (Org/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 usado. Este último debe ser calculado por el analista antes de iniciar el conteo.

Para el cálculo del número de organismos por mililitro (N/mL) se utiliza la siguiente ecuación:

Donde:

N/mL = Número de organismos contados por mililitros

C = Número de organismos contados

At = Área total 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 organismos por litro (Org/L), se multiplica el anterior valor por 1000.

### Análisis de la comunidad mesozooplanctónica (200 µm -20 mm)

A continuación, se presenta la ecuación para calcular la densidad de individuos por metro cúbico (m-3)

Donde:

N / m3 = Densidad de individuos en m3. Si necesita reportar en unidades de volumen diferentes, aplique el factor de conversión necesario.

N= Número de individuos contados por alícuota en la cámara de conteo.

Vc= Volumen concentrado inicial de la muestra en ml

A= Volumen de la alícuota tomada con la pipeta Hensen-Stempel en ml.

n= Número de alícuotas tomadas con la pipeta Hensen-Stempel

Vf= Volumen filtrado de la muestra en m3

### Densidad de la comunidad zooplanctónica perteneciente al macroplancton (2 - 20 cm) y megaloplancton (20 cm - 2 m)

Donde:

No.org /1000 m3 = Densidad de individuos en 1000 m3

N= Número de individuos contados en la muestra

Vf= Volumen filtrado de la muestra en m3

### Precisión

Asumiendo una distribución Poisson de los individuos contados, la precisión, a un nivel de confianza del 95%, se puede calcular con la siguiente ecuación:

Precisión % =

Con respecto al número de individuos, para aumentar la precisión al doble se debe cuadruplicar el esfuerzo de conteo, como lo muestra la Tabla 2 (Venrick, 1978, Edler 1979).

Tabla 2.

Relación entre el número de individuos contadas y límites de confianza de 95% con el nivel de significancia (Edler, 1979; Andersen and Trondsen, 2004).

| **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 |

### Límite de detección

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

Donde:

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 de la comunidad microzooplanctónica (20- 200 µm)

#### Análisis en cámaras Sedgwick-Rafter

##### Concentración de las muestras

Tabla 3.

Flujograma y descripción de actividades para Concentración de las muestras (Sedgwick-Rafter)

| **No** | **FLUJOGRAMA** | **DESCRIPCIÓN** | **RESPONSABLE** | **REGISTRO** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Inicio | INICIO | | |
| 1 | Mantener | Mantener la muestra en completa quietud tras su arribo al laboratorio. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 2 | Precipitar | Precipitar la muestra durante 48 h | Analista de laboratorio | No aplica |
| 3 | Extraer | Extraer el sobrenadante utilizando una pipeta | Analista de laboratorio | No aplica |
| 4 | Revisar | Revisar una alícuota del sobrenadante cada 10 o 5 alícuotas extraídas | Analista de laboratorio | No aplica |
| 5 | ¿Se dificulta la extracción?  Si  1  No | Ante un menor volumen de muestra ¿se dificulta la extracción? | Analista de laboratorio | No aplica |
| 6 | Verter | Verter el contenido restante en uno o varios tubos Falcon | Analista de laboratorio | No aplica |
| 7 | Sedimentar | Sedimentar nuevamente por 48 h | Analista de laboratorio | No aplica |
| 8 | Si  ¿El volumen concentrado es mayor a 20 ml?  2  1  No | ¿El volumen concentrado es mayor a 20 ml? | Analista de laboratorio | No aplica |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
| 9 | Almacenar | Almacenar en tubos Falcon rotulados adecuadamente | Analista de laboratorio | No aplica |
| 10 | Almacenar  2 | Almacenar en viales de borosilicato rotulados adecuadamente | Analista de laboratorio | No aplica |
|  | Fin | FIN | | |

##### Extracción de alícuotas

Tabla 4

Flujograma y descripción de actividades para la extracción de alícuotas (Sedgwick-Rafter)

| **No** | **FLUJOGRAMA** | **DESCRIPCIÓN** | **RESPONSABLE** | **REGISTRO** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Inicio | INICIO | | |
| 1 | Homogeneizar | Homogeneizar cada muestra concentrada de manera manual durante dos minutos. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 2 | Accionar | Accionar la pipeta Hensen-Stempel de 1 ml y capturar la alícuota | Analista de laboratorio | No aplica |
| 3 | Colocar | Colocar sobre la cámara Sedgwick-Rafter vacía la placa cubreobjeto en posición diagonal. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 4 | Verter | Verter la alícuota extraída en la cámara a través de uno de los extremos descubiertos. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 5 | Mover | Mover el cubreobjetos lentamente hasta llenar totalmente la cámara Sedgwick-Rafter evitando la formación de burbujas. | Analista de laboratorio |  |
| 6 | 2  Si  ¿Se formaron burbujas y no desaparecen?  No | ¿Se formaron burbujas y no desaparecen? | Analista de laboratorio | No aplica |
| 7 | Servir  1 | Servir una nueva alícuota | Analista de laboratorio | No aplica |
|  | Fin  2 | FIN | | |

##### Recuento en cámara Sedgwick-Rafter

Tabla 5

Flujograma y descripción de actividades para el recuento en cámara Sedgwick-Rafter

| **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 | ¿La densidad de organismos es alta?  Si  2  No | ¿La densidad de organismos es alta? | Analista de laboratorio | No aplica |
| 6 | 1  Realizar | Realizar una dilución con agua de mar filtrada | Analista de laboratorio | No aplica |
| 7 | 2  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 | | |

#### Análisis por el método de Utermöhl

##### Concentración de las muestras

Tabla 6

Flujograma y descripción de actividades para la concentración de las muestras (Utermöhl)

| **No** | **FLUJOGRAMA** | **DESCRIPCIÓN** | **RESPONSABLE** | **REGISTRO** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Inicio | INICIO | | |
| 1 | Homogeneizar | Homogeneizar cada muestra de manera manual alternando movimientos verticales y circulares durante tres minutos | Analista de laboratorio | No aplica |
| 2 | Ubicar | Ubicar la cámara de sedimentación sobre una superficie plana. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 3 | Servir | Servir la cantidad de muestra adecuada para el cilindro empleado | Analista de laboratorio | No aplica |
| 4 | Cubrir | Cubrir la cámara con la placa cubreobjetos gruesa, evitando que se formen burbujas. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 5 | Cubrir | Cubrir el montaje de las cámaras de sedimentación con una caja plástica. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 6 | Mantener | Mantener el montaje bajo condiciones oscuras y en completa quietud durante el tiempo indicado. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 7 | Deslizar | Deslizar una placa cubreobjetos a la altura de la base del cilindro hasta desplazarlo completamente. | Analista de laboratorio | No aplica |
|  | Fin | FIN | | |

##### Recuento en cámara Utermöhl

Tabla 7

Flujograma y descripción de actividades para el recuento en cámara Utermöhl

| **No** | **FLUJOGRAMA** | **DESCRIPCIÓN** | **RESPONSABLE** | **REGISTRO** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Inicio | INICIO | | |
| 1 | Trasladar | Trasladar la cámara cuidadosamente hacia el microscopio invertido y ubicarla en el portaplaca. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 2 | Asegurar | Asegurar el portaplaca. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 3 | Revisar | Revisar la cámara a baja magnificación (10X) | Analista de laboratorio | No aplica |
| 4 | ¿La distribución de los organismos es equitativa?  1  No  Si | ¿La distribución de los organismos es equitativa? | Analista de laboratorio | No aplica |
| 5 | 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 |
| 6 | Realizar | Realizar registro fotográfico con cámara fotográfica o con el microscopio invertido y el Software necesario | Analista de laboratorio | No aplica |
| 7 | Lavar | Lavar cuidadosamente la cámara al finalizar el conteo de cada alícuota | Analista de laboratorio | No aplica |
| 8 | Descartar  1 | Descartar la muestra e iniciar nuevamente el proceso de concentración. | Analista de laboratorio | No aplica |
|  | Fin | FIN | | |

### Análisis de la comunidad mesozooplanctónica (200 µm -20 mm)

#### Extracción de zoopláncteres mayores a 2 cm: macroplancton y megaloplancton

Tabla 8

Flujograma y descripción de actividades para la extracción de zoopláncteres mayores a 2 cm

| **No** | **FLUJOGRAMA** | **DESCRIPCIÓN** | **RESPONSABLE** | **REGISTRO** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Inicio | INICIO | | |
| 1 | Lavar  Filtrar | Filtrar la muestra a través de un tamiz de 2 cm de ojo de malla. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 2 |  | Lavar con agua de mar filtrada la porción que queda de la muestra sobre el tamiz hasta que los zoopláncteres más pequeños caigan en la muestra filtrada. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 3 | Depositar | Depositar la muestra filtrada nuevamente en su recipiente original. | Analista de laboratorio | No aplica |
|  |  |  |  |  |
| 4 | Retirar | Retirar del tamiz los zoopláncteres gelatinosos y grandes. | Analista de laboratorio | No aplica |
|  |  |  |  |  |
| 5 | Depositar | Depositar en un recipiente debidamente rotulado con los datos de la muestra original. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 6 | Preservar | Preservar el contenido de cada recipiente con formaldehído al 4% | Analista de laboratorio | No aplica |
|  | FIN | FIN | | |

#### Fraccionamiento de la muestra

Tabla 9

Flujograma y descripción de actividades para el fraccionamiento de la muestra

| **No** | **FLUJOGRAMA** | **DESCRIPCIÓN** | **RESPONSABLE** | **REGISTRO** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Inicio | INICIO | | |
| 1 | Si  ¿Realizó el paso 6.3.2.1?  No  1 | En caso de no haber realizado la extracción y separación de los organismos mayores a 2 cm, dirigirse al numeral 6.3.2.1 | Analista de laboratorio | No aplica |
| 2 | Medir | Medir el volumen total de la muestra en un recipiente volumétrico | Analista de laboratorio | No aplica |
| 3 | Estandarizar | Si el volumen de la muestra es inferior a un litro, adicionar agua de mar filtrada para llevarlo al volumen indicado. Si la muestra tiene un volumen superior, dejar precipitar los zoopláncteres y extraer el sobrenadante hasta completar el volumen deseado. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 4 | Verter | Con el volumen estandarizado a 1 litro, verter la muestra en la cámara circular del fraccionador Folsom. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 5 | Balancear | Una vez dentro del fraccionador, balancear la muestra 10 veces, moviendo la cámara circular del fraccionador. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 6 | Separar | Separar la muestra en los colectores inferiores del fraccionador Folsom, y envasar cada una de las sub muestras en recipientes separados | Analista de laboratorio | No aplica |
| 7 | Rotular | Rotular cada sub muestra con información del porcentaje de la muestra original que representa (50%) y el análisis para el cual será empleada (densidad o biomasa). | Analista de laboratorio | No aplica |
|  | FIN | FIN | | |

#### Análisis de densidad de mesozooplancton

Tabla 10

Flujograma y descripción de actividades para análisis de densidad de mesozooplancton

| **No** | **FLUJOGRAMA** | **DESCRIPCIÓN** | **RESPONSABLE** | **REGISTRO** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Inicio | INICIO | | |
| 1 | Medir | Medir el volumen de la sub muestra en un beaker volumétrico. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 2 | Lavar | Lavar la muestra con abundante agua de mar filtrada con un tamiz de 100 µm. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 3 | Servir | Servir la muestra con agua de mar filtrada, en su totalidad o fraccionada, en cajas Petri para el conteo y separación del total de organismos pertenecientes a grupos poco abundantes y/o de interés particular de la investigación | Analista de laboratorio | No aplica |
| 4 | Almacenar | Almacenar cada grupo en recipientes de tamaño adecuado y debidamente rotulados, preservar con formaldehído buferizado al 4 % para su posterior  identificación. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 5 | Depositar | Para el análisis de los grupos más abundantes, depositar el volumen restante de la muestra en su recipiente original y preservar para su posterior análisis. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 6 | Lavar | Lavar la muestra con abundante agua de mar filtrada y medir su volumen en un beaker volumétrico. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 7 | Estandarizar | Dependiendo de la cantidad de organismos, concentrar por filtración o adicionar agua de mar filtrada, hasta llevar a un volumen estándar; basado en la experiencia del analista. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 8 | Homogenizar | Con una pipeta Hensen-Stempel homogeneizar la muestra agitándola en forma circular. El volumen estandarizado debe ser el mismo para todas las muestras provenientes de un mismo muestreo. | Analista de laboratorio | No aplica |
|  | A |  |  |  |
|  | A |  |  |  |
| 9 | Capturar | Accionar la pipeta una vez homogenizados la muestra y capturar una alícuota equivalente al volumen de la cámara Bogorov que será empleada. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 10 | Verter | Retirar la pipeta Hensen-Stempel del beaker y verter en la cámara Bogorov el volumen correspondiente. Revisar la cámara Bogorov bajo el estereoscopio, iniciando en una de las esquinas y trasladándose lateralmente. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 11 | Contar | Contar cada individuo observado, indicando a qué grupo taxonómico pertenece. Continuar con el proceso de recuento hasta que el grupo más abundante alcance mínimo 200 organismos para alcanzar una precisión de 14% (ver Tabla 2) (Postel et al., 2000). De ser necesario, tomar más alícuotas. | Analista de laboratorio | M5-00-FOR-136 |
| 12 | Registrar | Registrar los datos de conteo e identificación en el respectivo formato. | Analista de laboratorio | M5-00-FOR-136 |
|  | FIN | FIN | | |

#### Análisis de biomasa y biovolumen

##### Análisis volumétrico (biovolumen)

Tabla 11

Flujograma y descripción de actividades para el análisis volumétrico (biovolumen)

| **No** | **FLUJOGRAMA** | **DESCRIPCIÓN** | **RESPONSABLE** | **REGISTRO** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Inicio | INICIO | | |
| 1 | Filtrar | Filtrar la muestra con una malla de 20 µm en una bomba de vacío para eliminar el exceso de agua. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 2 | Llenar | Llenar una probeta con agua de mar filtrada hasta un volumen conocido. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 3 | Depositar | Con ayuda de unas pinzas blandas, depositar la masa de zooplancton en la probeta con agua de mar filtrada. Dividir la masa de zooplancton en partes iguales de ser necesario. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 4 | Registrar | Registrar los datos de conteo e identificación en el respectivo formato. | Analista de laboratorio | M5-00-FOR-136 |
| 5 | Filtrar | Verter el contenido de la probeta en embudo de filtraciónpara retirar el exceso de agua. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 9 | Depositar | Depositar la masa de zooplancton en una caja Petri debidamente rotulada con los datos de la muestra original. | Analista de laboratorio | No aplica |
|  | FIN | FIN | | |

##### Análisis gravimétrico

Tabla 12

Flujograma y descripción de actividades para el análisis gravimétrico

| **No** | **FLUJOGRAMA** | **DESCRIPCIÓN** | **RESPONSABLE** | **REGISTRO** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Inicio | INICIO | | |
| 1 | Relacionar | Para cada muestra a analizar, relacionar un crisol de tamaño congruente con el  volumen de la misma. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 2 | Elaborar | Elaborar tapas con papel aluminio de acuerdo al tamaño de los crisoles y rotular con la información de cada muestra. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 3 | Pesar | Pesar dos veces en una balanza analítica (previamente calibrada) cada crisol junto con su respectiva tapa de aluminio. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 4 | Registrar | Registrar los valores obtenidos en el respectivo formato. | Analista de laboratorio | M5-00-FOR-137 |
|  | FIN | FIN | | |

##### Peso húmedo

Tabla 13

Flujograma y descripción de actividades para peso húmedo

| **No** | **FLUJOGRAMA** | **DESCRIPCIÓN** | **RESPONSABLE** | **REGISTRO** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Inicio | INICIO | | |
| 1 | Depositar | Trasladar la masa de zooplancton reservada en la caja Petri (6.3.2.4.1) con ayuda de unas pinzas blandas a uno de los crisoles cubiertos con tapa aluminio previamente pesados (6.3.2.4.2). Cubrir la muestra con la tapa de papel aluminio | Analista de laboratorio | No aplica |
| 2 | Pesar | Pesar dos veces los crisoles con la muestra correspondiente en su interior en una balanza analítica. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 3 | Registrar | Registrar los valores obtenidos en el respectivo formato. | Analista de laboratorio | M5-00-FOR-137 |
|  | FIN | FIN | | |

##### Peso seco

Tabla 14

Flujograma y descripción de actividades para peso seco

| **No** | **FLUJOGRAMA** | **DESCRIPCIÓN** | **RESPONSABLE** | **REGISTRO** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Inicio | INICIO | | |
| 1 | Precalentar | Precalentar el horno a 60°C. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 2 | Introducir | Una vez alcanzada la temperatura deseada, introducir los crisoles con muestra y mantenerlos allí durante 24 horas (Postel et al., 2000). Tratar de organizar los recipientes dentro del horno de manera equidistante. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 3 | Retirar | Cumplido el tiempo establecido, retirar los crisoles con ayuda de unas pinzas para crisol | Analista de laboratorio | No aplica |
| 4 | Depositar | Depositar los crisoles en el desecador por al menos 30 minutos, mientras baja la  temperatura. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 5 | Pesar | Pesar los crisoles con la muestra dos veces en la balanza analítica. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 6 | Registrar | Registrar los valores obtenidos en el respectivo formato. | Analista de laboratorio | M5-00-FOR-137 |
|  | FIN | FIN | | |

##### Peso seco libre de ceniza

Tabla 15

Flujograma y descripción de actividades para peso seco libre de ceniza

| **No** | **FLUJOGRAMA** | **DESCRIPCIÓN** | **RESPONSABLE** | **REGISTRO** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Inicio | INICIO | | |
| 1 | Introducir | Introducir los crisoles sin la tapa de aluminio en la mufla a una temperatura de 500°C. Tras alcanzar la temperatura deseada, mantener los crisoles en el interior durante  6 horas. | Analista de laboratorio | No aplica |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
| 2 | Retirar | Cumplido el tiempo establecido, retirar los crisoles con ayuda de unas pinzas para crisol. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 3 | Depositar | Depositar los crisoles en el desecador por al menos 30 minutos, mientras baja la temperatura. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 4 | Tapar | Retirar los crisoles del desecador y colocarle su respectiva tapa de aluminio. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 5 | Pesar | Pesar los crisoles con la muestra dos veces en la balanza analítica. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 6 | Registrar | Registrar los valores obtenidos en el respectivo formato. | Analista de laboratorio | M5-00-FOR-137 |
| 7 | Descartar | Descartar el residuo de cada crisol luego de la incineración. | Analista de laboratorio | No aplica |
|  | FIN | FIN | | |

### Análisis de macroplancton (2 - 20 cm) y megaloplancton (20 cm - 2 m)

Tabla 16

Flujograma y descripción de actividades para el análisis de macroplancton (2-20 cm) y megaloplancton (20 cm - 2 m)

| **No** | **FLUJOGRAMA** | **DESCRIPCIÓN** | **RESPONSABLE** | **REGISTRO** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Inicio | INICIO | | |
| 1 | Si  ¿Realizó el paso 6.3.2.1?  No  1 | En caso de no haber realizado la extracción y separación de los organismos mayores a 2 cm, dirigirse al numeral 6.3.2.1 | Analista de laboratorio | No aplica |
| 2 | Depositar | Depositar los organismos extraídos en el numeral 6.3.2.1 en un tamiz de tamaño de poro de 100 o 200 µm para hacer un lavado con agua de mar filtrada. | Analista de laboratorio | No aplica |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
| 3 | Lavar | Lavar en el tamiz los organismos depositados con agua de mar filtrada hasta retirar los residuos de formol. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 4 | Disponer | Disponer los organismos lavados en una caja Petri | Analista de laboratorio | No aplica |
| 5 | Revisar | Revisar en el estereoscopio la caja Petri y mantener hidratados los organismos con agua de mar filtrada para realizar su observación, identificación taxonómica y cuantificación. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 6 | Realizar | Realizar el conteo e identificación taxonómica de los organismos encontrados en toda la muestra | Analista de laboratorio | No aplica |
| 7 | Registrar | Registrar los datos de conteo e identificación en el respectivo formato. | Analista de laboratorio | M5-00-FOR- 136 |
| 8 | Depositar | Depositar cada organismo en un recipiente adecuado debidamente rotulado. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 9 | Disponer | Disponer cada organismo en un recipiente adecuado debidamente rotulado. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 10 | Preservar | Preservar el contenido de cada recipiente con formaldehído al 4% | Analista de laboratorio | No aplica |
| 11 | Almacenar | Almacenar el recipiente con el organismo preservado en su lugar de disposición final. | Analista de laboratorio | No aplica |
|  | FIN | FIN | | |

### Análisis de viabilidad de zooplancton en muestras de agua de lastre.

Tabla 17

Flujograma y descripción de actividades para el análisis de viabilidad de zooplancton en muestras de agua de lastre

| **No** | **FLUJOGRAMA** | **DESCRIPCIÓN** | **RESPONSABLE** | **REGISTRO** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Inicio | INICIO | | |
| 1 | Medir | Medir el volumen de la muestra en un beaker volumétrico. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 2 | Homogenizar | Con una pipeta Hensen-Stempel homogeneizar la muestra agitándola en forma circular. El volumen estandarizado debe ser el mismo para todas las muestras provenientes de un mismo muestreo. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 3 | Capturar | Accionar la pipeta una vez homogenizados la muestra y capturar una alícuota equivalente al volumen de la cámara Bogorov que será empleada. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 4 | Verter | Retirar la pipeta Hensen-Stempel del beaker y verter en la cámara Bogorov el volumen correspondiente. Revisar la cámara Bogorov bajo el estereoscopio, iniciando en una de las esquinas y trasladándose lateralmente. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 5 | Contar | Revisar si los individuos tienen movimiento de traslación o de alimentación. Esto se puede hacer con diferentes magnitudes de aumento. Contar cada individuo observado que esté vivo, indicando a qué grupo taxonómico pertenece. Continuar el proceso de conteo y de extracción de alícuotas, hasta que más de 3 alícuotas no presenten individuos | Analista de laboratorio | M5-00-FOR-136 |
| 6 | Registrar | Registrar los datos de conteo e identificación en el respectivo formato. | Analista de laboratorio | M5-00-FOR-136 |
|  | 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.