

EL FITOPLANCTON: METODOS DE MUESTREO, CONCENTRACION, RECUENTO Y CONSERVACION

Por: J.J. Ramírez (1)

INTRODUCCION

El fitoplancton es el conglomerado de organismos flotantes cuyo movimiento depende en mayor o menor grado de las corrientes y se caracteriza por su capacidad para sufrir grandes pérdidas de individuos que se relacionan con la gravedad y los ciclos generales del agua (Margalef, 1974; Odum, 1973).

En 1907, Apstein y Zacharias arrastraron en el agua una red de gasa de malla fina y por primera vez se tuvo noticia de esta comunidad compuesta principalmente por algas.

Según su tamaño se han dado varias divisiones para el plancton tanto de mar como de agua dulce, las cuales han sido propuestas por Margalef (1955), Pérez y Deveze (1963) y Dussart (1965). La de éste último se da a continuación:

Ultraplancton	Por debajo de 2 nm	Nanoplancton
Nanoplancton	2 - 20 nm	
Microplancton	20 - 200 nm	Plancton de red
Megaplancton	200 - 2000 nm	Schwoerbel, 1975).

El objetivo de la presente práctica de laboratorio es describir los principales métodos de muestreo, concentración, recuento y conservación con sus ventajas y desventajas, para que por comparación pueda escogerse el que se adapte en un momento y circunstancias dados como material de trabajo y/o consulta.

MATERIALES Y METODOS

Red de malla fina para arrastre

Frascos de boca ancha

Botella Kemmerer o toma muestras

Centrifugadora eléctrica

Embudos de decantación

Cámaras tubulares de Utermöl

Cámaras excavadas de Kolkwitz y Rafter

Microscopio binocular

Microscopio invertido

Yodo

Yoduro potásico

Acido acético al 10o/o

Formol

DESCRIPCION DE LOS METODOS Y PROCEDIMIENTO

1. Toma de muestras

El sitio de muestreo y el método a elegir dependen de los objetivos buscados y deben estar cerca a los del muestreo físico-químico y bacteriológico. Una muestra de fitoplancton consiste de un volumen de agua generalmente de un litro como mínimo. La profundidad a la que se toma la muestra depende del método: superficial con redes y "profunda" con toma muestras.

Para la toma de muestras generalmente existen dos formas, las cuales se pueden mezclar y variar.

(1) Biólogo Departamento de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, S.A.

a. *Con red de malla fina.*

Es el más usado en nuestro medio pero con él no puede obtenerse información acerca del nano ni del ultrafitoplancton y según Rhode (1958), Nauwerck (1963) y otros, ambos juegan un papel vital en la producción primaria y como alimento del zooplancton. Puede concluirse, entonces, que este método no puede usarse para trabajos cuantitativos, pues como puede verse brinda información de sólo una parte de la comunidad.

Mediante él se atrapan organismos de más de 20 μ m y es usado ante todo para trabajos cualitativos. Los organismos son sacados por filtración y hay una selección llevada a cabo según sea el tamaño de los poros y la red. La red puede colmatarse y esta colmatación depende de la relación entre la abertura de la red y la superficie de filtración de finura del filtro y de la densidad del fitoplancton en el agua.

Usese para este método una red de zeppelin o una red arrojadiza normal construidas con gasa del número 20 al 25. La primera es una red larga y estrecha que corresponde a un cono en la parte inferior y se alarga hacia arriba en forma de cilindro. Posee una longitud de 1 m y un diámetro superior de 15 cm (figs. 1 y 2).

La red arrojadiza es un tronco de cono de manipulación más fácil que la anterior y con un diámetro de 25 cm y una longitud de 1 m. A ambas redes se les adiciona en la parte inferior un frasco pequeño de capacidad conocida, donde se recoge la muestra para su posterior fijación y conservación.

b. *Con toma muestras.*

Se usan para trabajos cuantitativos en los que se necesita una menor cantidad de agua que brinde por sí misma una muestra representativa. Poseen diferente capacidad y pueden ser reemplazados en su ausencia por frascos de boca ancha, botellas Kemmerer y otros. El toma muestras tiene la ventaja de que la relación entre el volumen de agua y la cantidad de fitoplancton contenida en la muestra se da directamente y además en ellos pueden hacerse muestreos a diferentes profundidades, los cuales no pueden efectuarse con redes, a menos que estas se modifiquen, como es el caso de la red de cierre (ver Schwoerbel, 1975).

Debe usarse el toma muestras de Friedinger (el más conocido entre nosotros) que tiene tapas verticales y que al igual que los del tipo Ruttner se cierran mediante un mensajero. El uso del toma muestras y su capacidad dependen de la densidad del fitoplancton en el agua, la que puede determinarse previamente con una red. (Fig. 7).

Las deficiencias de los toma muestras consisten en que tienen un volumen demasiado pequeño, dando por ello resultados no muy seguros; además, cogen muestras al azar a una profundidad dada y en un espacio reducido, las cuales pueden no ser representativas. Por ello es necesario determinar previamente la densidad del fitoplancton para tratar de conocer que cantidad de agua es necesario tomar.

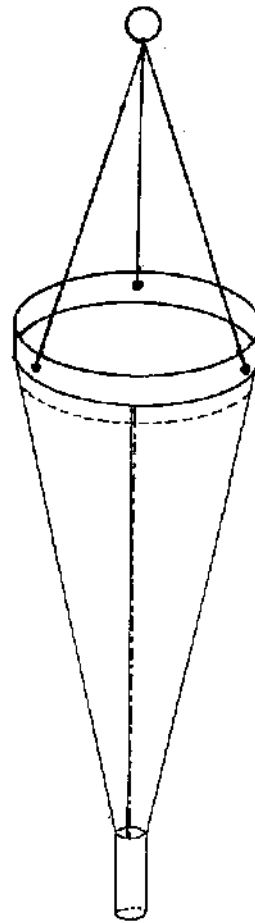


FIG. 1 RED ARROJADIZA O NORMAL

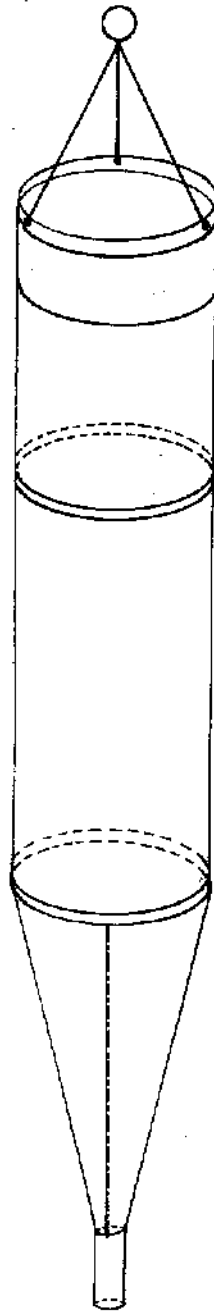


FIG. 2 RED DE ZEPPELIN

2. *Concentración*

Es el paso previo al recuento y de él depende en gran parte el éxito de aquel. Existen diferentes métodos, unos más precisos que otros, cuyo uso está condicionado por el tipo de trabajo a efectuar y la tecnología disponible. Entre nosotros son comunes la centrifugación, las cámaras excavadas de Kolkwitz y Sedgwick-Rafter y la sedimentación en embudos de decantación (más escasa). (Figs. 3 y 4).

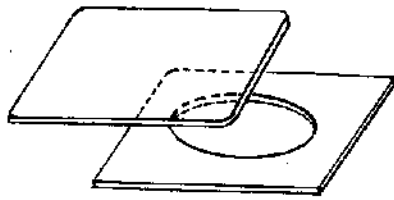


FIG. 3 CAMARA EXCAVADA DE KOLKWITZ

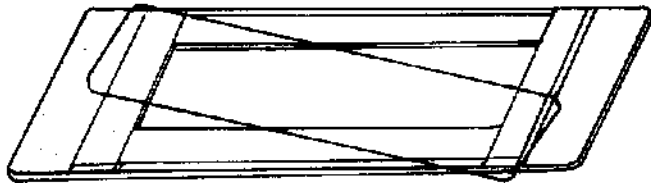


FIG. 4 CAMARA DE SEDGWICK RAFTER

Los métodos de sedimentación en cámaras tubulares y filtración con membranas son poco usados y conocidos (Fig. 5)

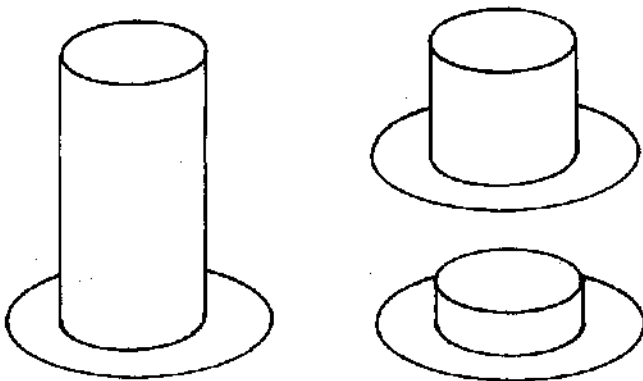


FIG. 5 DIFERENTES TIPOS DE CAMARAS TUBULARES.

a. *Concentración por centrifugación.*

Usese una centrífuga eléctrica a una velocidad baja, pues velocidades altas pueden deformar y destruir organismos. Es adecuado este método cuando la densidad de la muestra es baja, para poder concentrarla. Se toman generalmente de 100 a 200 ml de muestra, centrifúguese durante un intervalo de tiempo entre 2 y 5 minutos.

b. *Concentración por sedimentación.*

Deben usarse embudos de decantación (fig 6) de una capacidad de 500 a 1000 ml. La muestra a analizar

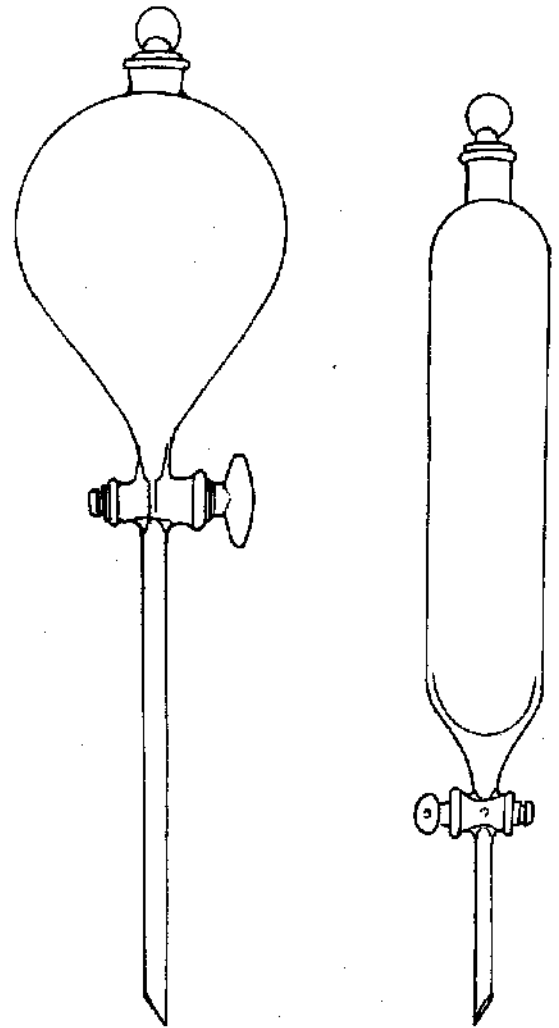


FIG. 6 EMBUDOS DE DECANTACION.

debe fijarse previamente y mezclarla por agitación. Se vierte luego en los embudos y se deja precipitar. El tiempo de la precipitación dependerá de la concentración del fitoplancton en la muestra y varía entre 24, 48 y 72 horas incluso. Una vez que la sedimentación haya terminado, debe abrirse la llave del embudo y déjese caer solamente el precipitado y analícese al microscopio mediante uno de los métodos descritos más adelante.

c. *Método de las cámaras tubulares de Utermöhl (1932)*

Deben usarse aquí cámaras tubulares, las cuales son cilindros de diferente volumen y altura, pero de igual diámetro de fondo y de fácil fabricación con plexiglas. Los tamaños pueden elegirse a voluntad, dependiendo de las condiciones. En el fondo se tapan con un cubreobjetos redondo y arriba con un vidrio circular o cuadrado. En estas cámaras, la sedimentación es mucho más larga, pero la concentración de plancton en el fondo es mayor y se utiliza

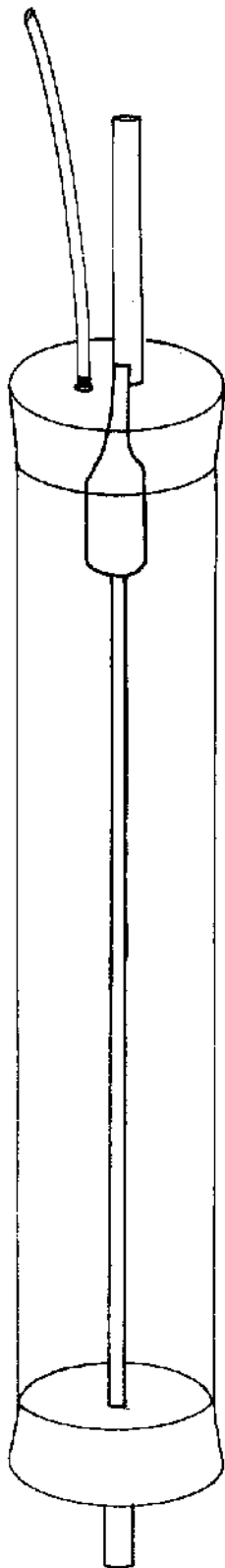


FIG. 7 TOMA MUESTRAS DE FRIEDINGER.

ante todo en muestreos pobres en plancton. Se elige la cámara según la densidad del plancton: cuanto más rica es la muestra, más pequeña ha de ser la cámara. El diámetro del fondo es generalmente de 25 mm y la altura varía, con el fin de cambiar el volumen de la cámara. (Fig.5).

Colóquese la cámara en una caja de petri. Agítese bien el envase que contiene la muestra fijada de fitoplancton y llénese la cámara hasta el borde. Procúrese que la muestra esté a la temperatura de la habitación. Tápese posteriormente en forma cuidadosa con el cubre cámaras para evitar la formación de burbujas. Déjese reposar la cámara hasta que se sedimente todo el plancton. El tiempo de sedimentación varía con la altura: 3 a 4 horas/cm de altura. (Schwoerbel, 1975).

d. *Método de las cámaras excavadas de Kolkwitz y Rafter.*

Se usan cámaras de 0.5 a 1 ml de volumen y con poca profundidad de sedimentación (fig. 3 y 4). Usense cuando no se posea microscopio invertido y ante todo con muestras ricas en fitoplancton. En las cámaras de Kolkwitz (fig.3) la excavación es circular mientras, que en los de Sedgwick-Rafter (fig.4) es rectangular y de 20 x 50 mm. x 1 mm de profundidad para un volumen total de 1 ml. En ambas, la gran desventaja es que solamente pueden observarse los organismos con aumentos pequeños (de 10X como máximo). Además, la capa de plancton que puede ponerse en estas cámaras es muy fina, siendo su superficie relativamente grande. El problema de los aumentos puede obviarse si se logran adaptar dichas cámaras al microscopio invertido, especialmente las de Kolkwitz. Estas cámaras son muy útiles en el estudio del fitoplancton de masas pequeñas de agua. (Schwoerbel, 1975; Murgel Branco, 1969).

e. *Método de filtración con membranas*

Puede usarse para todos los tipos de agua natural con algunas limitaciones impuestas por la naturaleza de la muestra, como son: sedimento en cantidades especiales, detritus y precipitados orgánicos e inorgánicos. Las ventajas de este método son:

- Las células pueden observarse fácilmente y con aumentos altos, pues quedan en la superficie del filtro.
- El filtro al ser sometido a calor se transparenta evitando obstrucciones en el paso de la luz desde el condensador.

Es el método menos usado en nuestro medio. Usense los siguientes aparatos para este método:

Compresor pequeño de 115 voltios, una boquilla para filtro de vidrio, Erlenmeyer de 1 litro de capacidad y con prolongaciones para adaptar mangueras, tapones, mangueras, tubos de vidrio, pinzas, filtro (miliporo de 0.45

nm, rejillado y de 25 mm de diámetro, incubadora de laboratorio, aceite de inmersión y una probeta de 850 ml. (Fig.8)

Para utilizar este método deben seguirse los siguientes pasos:

1. Coloque los dos Erlenmeyer, la boquilla del filtro, las mangueras, los tapones, las pinzas y el compresor como se muestra en la figura 8.
2. Mida un volumen apropiado (V) de la muestra, previamente agitada y con el compresor prendido viértala dentro de la boquilla (Fig.9). Durante la filtración mantenga baja la presión.

3. Cuando finalice la filtración, mueva cuidadosamente la manguera que conecta el compresor con el erlenmeyer de filtro antes de apagar aquel.
4. Remueva el filtro con ayuda de unas pinzas y colóquelo sobre un portaobjetos que tenga previamente una gota de aceite de inmersión. Evite la formación de burbujas al colocar el filtro. (Fig.10).
5. Coloque el portaobjetos en la incubadora a 60 - 65°C hasta que el filtro se torne transparente. Las estructuras porosas serán reemplazadas por el aceite de inmersión, el cual posee el mismo índice de refracción (1.5) que la membrana del filtro.

FIG. 8

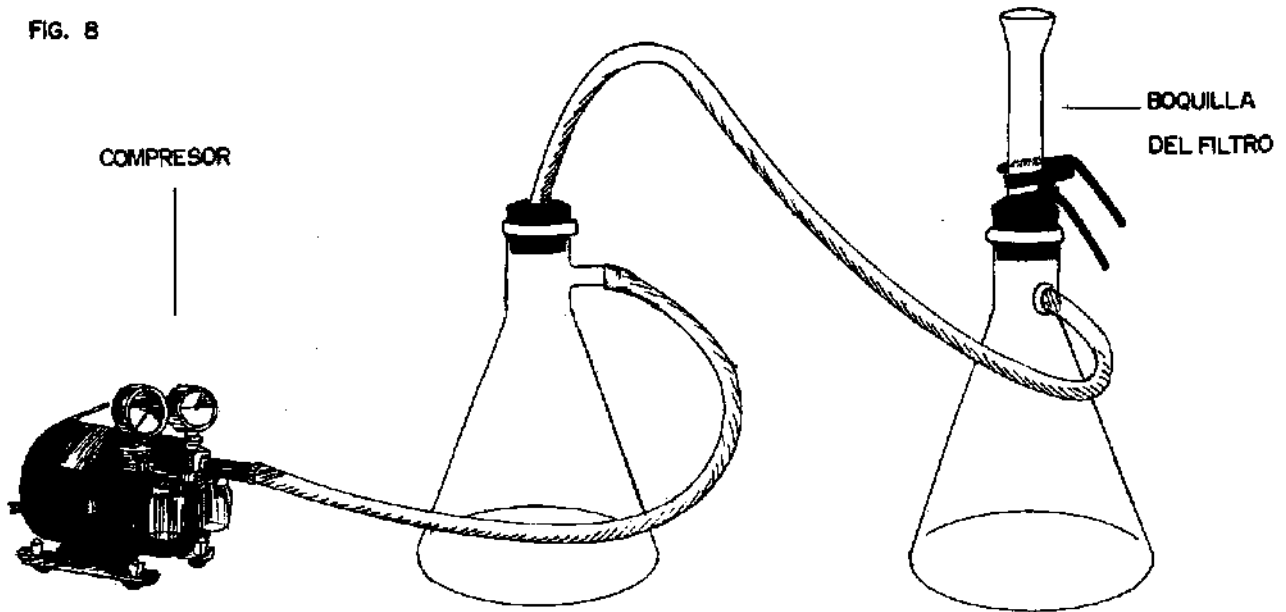


FIG. 9

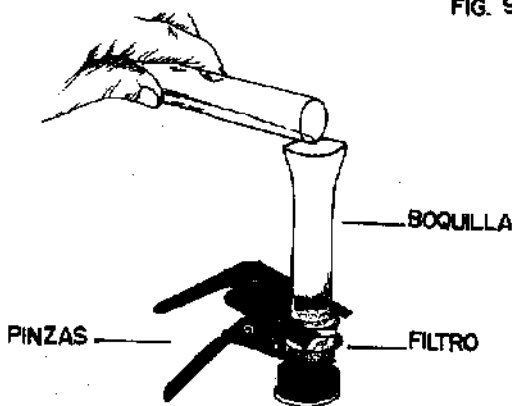
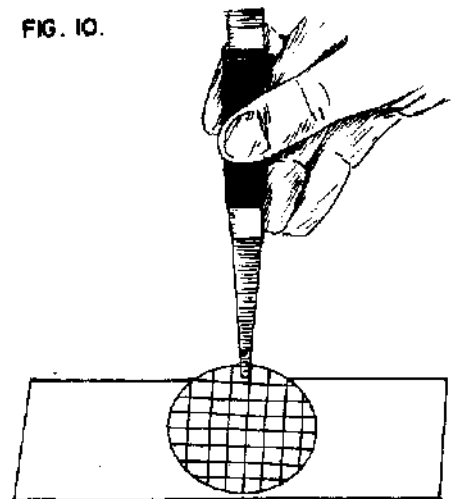


FIG. 10.



6. Colóquese luego el cubreobjetos evitando la formación de burbujas. Sélelo con barnin, pero si quiere hacer una preparación permanente, agregue antes 1 ó 2 gotas de medio de montaje.
7. Examine al microscopio a 10X, 40X y 100X con oculares 10X. Escoja 5 cuadrados de la rejilla al azar en el filtro y cuente las células en cada cuadrado, usando 100X y en zig zag.

Cálculos

Se usa la siguiente ecuación para la estimación del fitoplancton/ml.

$$N = \frac{Cx \cdot 255 \text{ mm}^2}{Vx G_n \times 9,50 \text{ mm}^2} \quad (1)$$

Donde:

N = No. de organismos/ml de muestra.

C = Conteo total para todos los cuadrados

255mm² = área efectiva para un filtro miliporo de 25 mm.

V = Volumen filtrado de la muestra, corregido para diluciones si las hay.

G_n = No. de cuadrados examinados en la rejilla.

9,50 mm² = área de los cuadrados de la rejilla del filtro miliporo.

Si es necesario diluir la muestra debido a la gran cantidad de organismos presentes en la muestra, se filtra únicamente una porción; el volumen original queda como sigue:

V = Volumen que se toma de la dilución para ser filtrado.

$$X = \frac{\text{Volumen original de la muestra}}{\text{Volumen final de la muestra diluida.}}$$

En la ecuación (1) como siempre se toman 5 cuadrados de la rejilla del filtro, G_n será constante al igual que 255 mm² y 9,50 mm², luego:

$$N = \frac{C \times 255}{V \times 5 \times 9,50} = \frac{C}{V} \times 5,37 \quad (2)$$

Esta será la ecuación final siempre que se tomen 5 cuadrados y el filtro miliporo tenga un diámetro de 25 mm. Si el diámetro del filtro varía, existen otras ecuaciones no descritas en esta práctica.

f. Otros métodos

Existen otras formas de observación que renuncian a la clasificación y diferenciación de los organismos, pero hablan de su cantidad o "nubes" de los mismos y de los cambios en su distribución. Entre ellos figuran la cámara de televisión submarina y la ecosonda.

3. Recuento

Para éste se requieren aumentos altos y tiempo. Uno de los métodos más empleados es el del microscopio de Utermöhl, en el cual los objetivos están debajo del fondo de la cámara de recuento y puedan así contarse los organismos sedimentados previamente. Los pasos a seguir son: a) llenado de las cámaras tubulares. b) colocación de las muestras sedimentadas en el microscopio y c) recuento de las mismas. La elección de los aumentos depende de los organismos más pequeños que haya que contar (1000 veces para el nanoplancton). No se cuenta el fondo de toda la cámara sino una parte. Dependiendo de lo complejo y completo del material disponible, hay muchas formas de conteo. Aquí se describirá una sencilla que es similar a la usada en el microscopio binocular normal y consiste en tomar entre 5 y 10 campos al azar, en los cuales se cuentan los organismos encontrados. Si se conoce previamente el área de cada campo, al sumar las áreas de los campos se sabrá el área total buscada.

Ejemplo: Si se tiene una cámara de 20 mm de diámetro = 315 mm² de superficie (altura: 64mm) y se cuentan 5 campos que totalizan 5 mm² y en ellos hubo X organismos, entonces: $\frac{X \times 315 \text{ mm}^2}{5 \text{ mm}^2} = 63 \times X$ que es el resultado

total para la cámara. Este resultado dividido por el volumen de la cámara da el número de organismos/ml. (en nuestro caso: $\frac{163 \times X}{20 \text{ ml}} = \text{org/ml.}$ (Schwoerbel, 1975).

Si no se posee un microscopio binocular invertido, entonces puede usarse uno normal y en ausencia de cámaras de uno u otro tipo hágase lo siguiente:

- a) cálfrese un gotero y averíguese el volumen de 1 gota de agua de muestra del mismo.
- b) Usando siempre el mismo cubreobjeto en cada análisis, averíguese el número de organismos presentes en él al cubrir la gota. Luego, para averiguar el número de organismos/ml, multiplíquese el número de organismos contados x 1 ml y divídase por el volumen de la gota del gotero.

Si se usa la celda de Sedwick-Rafter o la de Kolkwitz debe hacerse lo siguiente:

- a) Averíguese el número de campos existentes en toda la celda (o sea en un área de 20 x 50 mm, o mejor dicho en 1 ml de muestra). Para conocer este número de campos hay dos procedimientos principales:

- 1) El método del micrómetro ocular de Whipple que solo nombraremos y
- 2) El método del recuento por hileras. Aquí se cuentan todos los microorganismos presentes en una faja del ancho del campo, en toda la longitud de la celda de Sedwick-Rafter. La concentración de microorganismos/ml, se obtiene multiplicando el número obtenido de microorganismos por el número de campos existentes en el ancho de la celda, los cuales pueden ser contados directamente (Murgel Branco, 1969)

4. Conservación

Las dos formas más conocidas de fijación y conservación son la solución de lugol y la de formalina.

a. *Preparación de la solución de lugol:* Disuelva 10 g de cristales de yodo y 20 g de Yoduro de potasio en 200 ml de agua destilada. Añada 20 ml de ácido acético glacial unos pocos días antes de usar. Almacénese en botellas color ámbar. Por cada 100 ml de muestra de fitoplancton 2 - 3 gotas de solución lugol.

b. *Preparación de la solución de Formalina:* Diluya 5 ml de solución acuosa de formaldehído al 37 - 40o/o (Formalina) se diluyen en 100 ml de agua destilada. Este es el método más comunmente usado.

BIBLIOGRAFIA

- Apstein, C. 1895. *Das Süss wasserplancton*, Kief und Leipzig Lipsius & Tischer, 206 S. (En: Schwoerbel, 1975, pag 43).
- Dusart, B. 1965. Les différentes catégories de plancton. *Hydrobiologie* 26, 72-74 (En: Schwoerbel 1975, pag 44).
- Margalef, R. 1955. Los organismos indicadores en la Limnología. *Biología de las aguas continentales*, 12, 300 S (En: Schwoerbel, 1975, pag 43).
- 1974. *Ecología*. Ed. Omega, Barcelona. 951 pp.
- 1976. *Biología de los embalses*. *Sc. An.* No.1, p 5 - 62.
- Millipore Corp. 1975. *Phytoplankton analysis: The millipore filter method*. Cat Lab. 310. U.S.A. 8 pp.
- Murgel, B.S. 1969. *Hidrobiología aplicada a la ingeniería Sanitaria*. Trad. Myriam Mujica. Fac. de Ing. Sanitaria. Lima, Perú p. 263 - 265.
- Nauwerck, A. 1963. Die Beziehungen zwischen Zooplankton und Phytoplankton im see Erken - *Symb. Bot. Upsal.* XVII: 5,1 163. (En: Schwoerbel 1975, pp 70).
- Odun, E. 1972. *Ecología 3a. Ed.* Edit. Interamericana 439 pp.
- Palmer, C.M. 1977. *Algae and Water pollution*. Municipal environmental research laboratory. Office of research and development, Ohio.
- Pérez, J.M. et L. Deveze. 1963. *Océanographie biologique et biologie Marin II. La Vie pelagique*. Press Univ. Paris, 511 s. (En: Schwoerbel 1975, pg. 43)
- Rhode, W. 1941. Zur Verbesserung der quantitativen phytoplankton methodik. *Zool. bidr. Upsala* 20, 465 - 477 (Citado en: Schwoerbel, pág. 70).
- Roldán, G y Machado, T. 1978. *Manual de Limnología*, Medellín 186 pp.
- Schwoerbel, J. 1975. *Métodos de Hidrobiología*. (Trad. Fco Javier Haering). P.H. Blume ed. Madrid 262 pp.
- Welch, P.S. 1952. *Limnology*. 2a. Ed. Mc Graw Hill. Book Co. N.Y. 538 pp.
- Zacharias, O. 1907. Das planktonseicher "Etmphor". *Arch. Hydrobiol.* 2, 230 - 342. (En: Schwoerbel, 1975, pág. 43).