 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO DE MUESTREO Y ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD DEL FITOPLANTON EN CUERPOS DE AGUA LÓTICOS			
	<i>Código:</i> IN-GAA-93	<i>Versión:</i> 04	<i>Fecha de aprobación:</i> 03/08/2022	<i>Página:</i> 1 de 7

1. Objeto

Establecer los procedimientos de muestreo y análisis de la comunidad biológica del fitoplancton en cuerpos de aguas lóaticos.

2. Alcance

Este procedimiento es para el personal calificado de la Unidad Hidrobiológica de Calidad de Aguas del Centro de Calidad de Aguas del Instituto de Ciencias Ambientales de la Orinoquía Colombiana (ICAOC) de la Universidad de los Llanos, con fines de servicios ambientales, investigación u otra índole que requiera caracterizar la comunidad fitoplanctónica de cuerpos de aguas lóaticos.

3. Referencias normativas.

- Rice E.W., Baird R.B. & Eaton A.D (Eds). 2017. STANDARD METHODS: For the Examination of Water and Wastewater, 23RD Edition, ISBN 978-087553-287-5. [10200 B (3) C, D (1) F (2.b)]. US. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.

4. Definiciones.


- Botella Van Dorn:** Muestreador de agua horizontal o vertical, pensado para tomar muestras de agua cercadel fondo del mar, lagos, arroyos o en cuerpos de agua estratificados. Fabricado de PVC robusto, tiene un sistema de cierre doble, activado por un mensajero.
- Cámara Palmer-Maloney:** Cámara circular de 17.9 mm de diámetro, 0.4 mm de profundidad y un volumen de 0.1 mL, diseñada para conteo de microplancton y nanoplancton.
- Fitoplancton:** Organismos fotosintéticos con adaptaciones para vivir suspendidos en la columna de agua con o sin movimiento propio.
- Organismo (Unidad natural):** Unidad de conteo donde son registrados como un único organismo, los organismos unicelulares, colonias naturales o filamentos.
- Sistemas lóaticos:** Hábitats acuáticos que presentan movimiento constante de agua y que no llega a acumularse. Ejemplo de estos sistemas son los ríos, riachuelos, caños y quebradas
- Solución Transeau:** Solución fijadora, compuesta de agua destilada, alcohol al 96% y formol al 37% en una proporción 6:3:1 respectivamente.
- Taxón:** Grupo de organismos emparentados, que en una clasificación dada han sido agrupados, asignándole al grupo un nombre en latín, una descripción y un "tipo", de forma que el taxón de una especie es un espécimen o ejemplar concreto.

5. Consideraciones generales

5.1 Muestreo.

5.1.1. Insumos

EQUIPOS	MATERIALES	REACTIVOS
<ul style="list-style-type: none"> Cámara fotográfica digital. Geoposicionador GPS. 	<ul style="list-style-type: none"> Frascos plásticos de 250 mL con tapa hermética. Botella Van Dorn (horizontal). Red de Fitoplancton 20-23 micras de poro. Rótulos y formatos de campo. Papel film. Baldes. EPPs. 	<ul style="list-style-type: none"> Agua destilada. Solución Transeau.

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA		
	INSTRUCTIVO DE MUESTREO Y ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD DEL FITOPLANTON EN CUERPOS DE AGUA LOTICOS		
	<i>Código: IN-GAA-93</i>	<i>Versión: 04</i>	<i>Fecha de aprobación: 03/08/2022</i>

5.1.2. Para la toma de muestras

- En lo posible, las muestras de fitoplancton deben ser colectadas durante los periodos de flujo estable para favorecer la estratificación de la columna de agua (donde las condiciones lo permitan) y la toma de muestras de una comunidad madura de fitoplancton.
- Evitar áreas fuertemente sombreadas.
- Tomar las muestras en zonas de bajo flujo de agua (por ejemplo: remansos).
- No tomar muestras donde las condiciones de profundidad y corriente no sean seguras.
- Evitar en lo posible producir una mezcla en la columna de agua que ocasione turbiedad.
- Cuando la baja profundidad del cuerpo de agua no permita el muestreo con botella Van Dorn proceda a tomar las muestras con un recipiente de volumen conocido (balde).

5.1.3. Información de campo.

- Diligenciar el formato FO-GAA-209 FORMATO DE INFORMACIÓN EN SISTEMAS LÉNTICOS/LÓTICOS para documentar la descripción del sitio, coordenadas geográficas, condiciones del clima, uso predominante del suelo, características de vegetación y de los hábitats disponibles. Al finalizar la toma de las muestras la información deberá completarse con exactitud.
- Tomar fotografías o realizar un esquema del sector de muestreo. Estos esquemas o fotos deben resaltar la presencia de los siguientes atributos del cuerpo de agua: zonas de rápidos o remansos, cascadas, árboles caídos, charcas, recodos y sustratos muestreados entre otros, además, deben mostrar influencia o no de estructuras importantes como plantas, características de la orilla y de áreas cercanas al punto de muestreo.

5.2 Fase de laboratorio.

5.2.1 Insumos.


EQUIPOS	MATERIALES	REACTIVOS
<ul style="list-style-type: none"> • Microscopio óptico compuesto. • Cámara fotográfica. • Cámara Palmer-Maloney 	<ul style="list-style-type: none"> • Pipetas Pasteur de vidrio. • Tetinas de caucho. • Pincel fino. • Glicerina o vaselina. • Formato de conteo. • Cubreobjetos de 22x40 mm. • Probeta de vidrio. • Tubos falcón de 15 a 50 mL. 	<ul style="list-style-type: none"> • Agua destilada.

5.2.1 Unidad de conteo.

Cada organismo unicelular, filamento o colonia serán catalogados como una "Unidad natural", cuya unidad de conteo se expresará como "Organismo". Únicamente contar organismos con cloroplastos, en el caso de las diatomeas, si la muestra no ha sido oxidada, no identificar hasta un nivel taxonómico bajo (especie) y no contar frústulas rotas.

5.2.2 Pretratamiento y registro fotográfico.

- En el caso de revisar muestras de cuerpos de aguas que no han sido analizados anteriormente en el laboratorio, realice un montaje en un portaobjetos con una muestra homogenizada y realice la identificación y la toma de fotografías de los organismos presentes.
- Todos los taxones identificados deben tener una evidencia fotográfica, la cual será registrada en una base

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO DE MUESTREO Y ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD DEL FITOPLANTON EN CUERPOS DE AGUA LOTICOS			
	<i>Código:</i> IN-GAA-93	<i>Versión:</i> 04	<i>Fecha de aprobación:</i> 03/08/2022	<i>Página:</i> 3 de 7

dedatos por lugar o campaña de muestreo.

- Si en el proceso de conteo se identifica un taxón que no haya sido registrado en la base de datos, tome la respectiva fotografía.
- Si el taxón no puede ser identificado durante el conteo, se podrá:
 - Tomar las coordenadas de su ubicación y posterior al conteo, girarlo, si su posición es lo que no permite su identificación.
 - Si lo que requiere es mayor resolución, tomar una alícuota de la muestra homogenizada y montarla en una lámina. Buscar los taxones, de ser necesario utilizar el objetivo de 100X y con claves especializadas identificar al nivel taxonómico más bajo posible.

Para el conteo en cámara Palmer-Maloney:

- En el caso que la muestra presente bajas densidades de organismos y sedimentos, se debe concentrar la muestra por sedimentación para agilizar el conteo por campos al azar (10 a 20 organismos en un campo proporcionan buenas densidades, abundancias menores hacen lento el conteo).

Si la muestra presenta un elevado contenido de sedimentos o solapamiento de organismos que no permitan su identificación o conteo, se procede a diluir la muestra.

- Si no es posible obtener la densidad de organismos recomendada para el conteo por campos al azar, se recomienda contar toda la cámara.
- Si hay abundancia de grandes filamentos que sobrepasen las fronteras del campo ocular, contarlos por separado con un aumento más bajo e incluir su abundancia en el conteo.

5.2.3 Controles de calidad para la identificación taxonómica.

- Mantener una literatura básica de taxonomía en el laboratorio, esencial para la identificación de los especímenes, la cual debe ser actualizada cuando sea necesario.
- El estatus taxonómico de los organismos identificados (división, clase, orden, género y especie) serán corroborados en la base de datos AlgaeBase (<http://www.algaebase.org/>).

5.3 Manejo y aseguramiento de la información.

- El registro y archivo de la información de la comunidad de fitoplancton se realizará en el computador asignado para la Unidad Hidrobiológica de Calidad de Aguas. Esta información se almacena en la carpeta correspondiente al año en el que se realizó el monitoreo, en carpetas independientes identificadas con el nombre de la campaña. Además del FO-GAA-218 REGISTRO DE ABUNDANCIAS E ÍNDICES ECOLÓGICOS DE LA COMUNIDAD DE FITOPLANCTON, PERIFITON Y ZOOPLANCTON, la carpeta de cada campo debe contener los archivos correspondientes al informe hidrobiológico de la comunidad y los respectivos anexos.
- Para garantizar el aseguramiento de la información, semestralmente se realiza un respaldo de la información, los archivos derivados de este son copiados por el líder del laboratorio.

6. Contenido.

6.1 Preparación de materiales y equipos.

- Preparar una lista con los materiales y equipos requeridos para realizar el muestreo empleando el FO-GAA-159 FORMATO LISTA DE MATERIAL DE MUESTREO, la cual será entregada al personal encargado de bodega para su preparación y despacho.
- En la recepción de los materiales y equipos se debe corroborar que se encuentran completos y en óptimas condiciones para su uso.
- Proceder a cargar los materiales y equipos al medio de transporte y dirigirse al punto de muestreo
 - Seleccionar un sector de 100 m longitudinales para realizar el muestreo.

Marcar el frasco colector de la muestra con la identificación (comunidad muestreada), fecha de colecta, sitio de muestreo.

- Antes de tomar la muestra, purgue la botella Van Dorn horizontal y la red de fitoplancton con una carga de agua.
- Tomar las muestras a profundidades que no sean mayores a 1 m con la botella Van Dorn horizontal. Si requiere desplazarse entre cada toma de muestra, hágalo siempre en dirección aguas arriba.
- Filtrar con red de fitoplancton hasta 22 L dependiendo de la colmatación de la red.
- Deposite la muestra del frasco colector de la red de fitoplancton (125 mL), en un recipiente de 250 mL de tapa hermética que no permita la entrada de luz a la muestra, fije con solución Transeau en una proporción 1:1, tape el frasco herméticamente con ayuda de papel film. Pegue la etiqueta externa.

6.2.1 Finalización del muestreo.

- Recoger y ordenar todos los materiales y equipos usados en campo, y lavar los implementos usados en el muestreo.

6.2 Recepción y solicitud de análisis de muestras.

- Revisar que la información esté registrada en todos los rótulos y que coincida con el FO-GAA-197 FORMATO PARA LA RECEPCIÓN DE MUESTRAS. Las muestras que ingresen al laboratorio deben cumplir con las siguientes condiciones:
 - Deben estar en frascos de 250 mL (tapados herméticamente y que no permitan la entrada de luz), fijadas con solución transeau en proporción 1:1.
 - Si la muestra proviene de otro laboratorio ajeno al Centro de Calidad de Aguas, se debe especificar el volumen de la muestra y volumen filtrado.
- Se debe revisar el estado de la preservación y valorar si se requiere adicionar más preservante, registrar el ingreso de las muestras en la BITÁCORA DE INGRESO DE MUESTRAS HIDROBIOLÓGICAS de la Unidad Hidrobiológica de Calidad de Aguas, ubicar y almacenar las muestras en un estante hasta ser procesadas

6.3 Análisis de laboratorio.

- Preparar el material requerido para el conteo, revisando que todo se encuentre limpio.
- Homogenizar la muestra con movimientos por inversión (arriba y abajo) de 50 a 100 veces.
- Montaje de la muestra en cámara Palmer-Maloney:
 - Colocar perpendicularmente una laminilla cubreobjetos rectangular de 22 x 40 mm sobre el círculo de la cámara dejando libres los canales laterales. Para asegurar que el cubreobjetos no se levante al llenar la cámara, puede colocar un objeto como un borrador sobre la lámina para que haga presión.
 - Llenar la cámara con una pipeta a través de uno de los canales, el aire dentro de la cámara debe salir por el canal opuesto. Si la muestra no sale por el otro extremo de la cámara depositar una gota de la submuestra en dicho extremo.
 - Girar la laminilla cubreobjetos para cubrir el área rectangular de la cámara.
 - Si se observan gotas de aire en la cámara descarte la submuestra devolviéndola al frasco original, se lava la cámara y se repite el procedimiento.
 - Para evitar pérdidas de volumen por evaporación adicionar glicerina o vaselina alrededor de la lámina con ayuda de un pincel.
 - Monte la cámara en el microscopio y deje sedimentar la muestra mínimo 10 min.
- Diligenciar el FO-GAA-204 FORMATO DE CONTEO DE COMUNIDADES HIDROBIOLÓGICAS PERIFITON, FITOPLANCTON Y ZOOPLANCTON, con la información de la muestra (número de campaña, identificación de la muestra y punto de monitoreo), fecha de revisión, analista, equipo, entre otras.
- Con un aumento de 400X revisar preliminarmente 10 campos al azar para estimar la densidad de la muestra

y determinar si se debe concentrar, diluir o contar toda la cámara (ver consideraciones generales).

□

- Para diluir la muestra: Tomar un volumen de la muestra homogenizada y depositarlo en un tubo Falcon. Adicionar agua destilada hasta obtener el nuevo volumen deseado.
- Para concentrar la muestra: Tomar un volumen de la muestra homogenizada en una cámara de sedimentación o recipiente similar graduado. Dejar sedimentar una hora por milímetro de profundidad de la cámara. Al finalizar el tiempo, extraer el sobrenadante por succión empleando una pipeta o manguera para suero de 2 mm de diámetro interno. La manguera o pipeta debe estar por encima del límite del marcaje del volumen al que se desea concentrar la muestra (volumen final).
- Cuando la densidad de algas es muy baja, se empleará toda la muestra (250 mL), dejándola sedimentar en un cilindro graduado durante tres días. Posteriormente se eliminará el agua sobrenadante hasta dejar 25 mL en el fondo del cilindro¹.
- El factor de dilución o concentración no debe ser mayor a 25.
- Registrar el volumen inicial y final de la alícuota.
- En el aumento de 400X revisar campos de observación al azar identificando al nivel taxonómico más bajo posible y contar mínimo 300 "organismos"
- Si no es posible obtener la densidad óptima para contar campos al azar, por un alto contenido de sedimento y/o una muy baja densidad algal, se recomienda contar la cámara completa.
- La información de la identificación y conteo, método de conteo (campos al azar o cámara completa) y el volumen inicial y final en los procesos de dilución/concentración de la muestra (si se realizó), deben ser registrados y diligenciados en el FO-GAA-204 FORMATO DE CONTEO DE COMUNIDADES HIDROBIOLÓGICAS PERIFITON, FITOPLANCTON Y ZOOPLANCTON.
- Una vez culminado el proceso de identificación y conteo, lavar la cámara Palmer-Maloney, secarla y almacenarla en su respectivo sitio.
- La muestra es llevada de nuevo al área de almacenamiento.

Nota 1: Las muestras revisadas pueden ser descartadas después de tres meses de la entrega del informe final al cliente.

6.4.1 Reporte de resultados.

□ Digitalizar los datos de la identificación y conteo en una hoja de cálculo, en la cual se harán los respectivos análisis de abundancia por taxón identificado:

➤ Abundancia por taxón (Organismos/L).

- Si realizó conteo por campos al azar emplee la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Organismos}}{\text{mL}} = \frac{C}{A \times D \times F} \times \frac{V_c}{V_f} \times F_d \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ mL}}$$

Donde:

C = número de organismos (unidades naturales) contados. A = área del campo ocular (mm²).

D = profundidad de cámara Palmer-Maloney (mm).

F = número de campos contados.

V_f = volumen filtrado (total del volumen que se filtra con la red).

V_c = volumen de la muestra.

F_d = factor de dilución o concentración (Volumen final/Volumen de la alícuota).

- Si realizó conteo de la cámara completa emplee la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Organismos}}{\text{mL}} = \frac{N}{0.1 \text{ mL}} \times \frac{V_c}{V_f} \times F_d$$



Donde:

N = Número de organismos (unidades naturales) contados,

V_f = volumen filtrado (total del volumen que se filtra con la red),

V_c = volumen de la muestra,

F_d = factor de dilución o concentración (Volumen final/Volumen de la alícuota).

Los cálculos anteriores también podrán ser reportados como Organismos/L, para lo cual se emplea el factor de conversión correspondiente.

$$\text{Abundancia relativa (\%)} = \frac{\text{No. de individuos registrados por taxón}}{\text{No. total de individuos en la muestra}} \times 100\%$$

- El estatus taxonómico de los organismos identificados (división, clase, orden, género y especie) serán corroborados en la base de datos AlgaeBase (<http://www.algaebase.org/>).
- La información de clasificación taxonómica y la abundancia de los organismos identificados se resumirá en el FO-GAA-218 REGISTRO DE ABUNDANCIAS E ÍNDICES ECOLÓGICOS DE LA COMUNIDAD DE FITOPLANCTON, PERIFITON Y ZOOPLANCTON. Con la abundancia neta de los organismos, se realizará una revisión cruzada con otro analista de la unidad con el fin de evitar errores en la transcripción.

6.4 Informes


Los informes se realizan empleando el FO-GAA-234 INFORMES TÉCNICOS AMBIENTALES el cual incluye:

- Objetivo.
- Métodos.
- Resultados:
 - Composición y abundancia.
 - Abundancia relativa de clases.
 - Abundancia de géneros o especies/morfotipos, enfatizando en los más abundantes.
 - Índices ecológicos de diversidad alfa.
- Conclusiones.
- Bibliografía.

Se pueden incluir otros análisis a necesidad del cliente, sin embargo, deben ser consultados con anterioridad con el líder de la Unidad Hidrobiológica.

7. Documentos de referencia

1. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 2013. Protocolo de análisis y cálculo de métricas de fitoplancton en lagos y embalses. Código: MFIT- 2013 Versión 2, p.14.
- FO-GAA-159 FORMATO LISTA DE MATERIAL DE MUESTREO
 - FO-GAA-209 FORMATO DE INFORMACIÓN EN SISTEMAS LÉNTICOS/LÓTICOS
 - FO-GAA-219 FORMATO DE VERIFICACIÓN DE CEPILLOS PARA EL MUESTREO DE PERIFITON.
 - FO-GAA-197 FORMATO PARA RECEPCIÓN DE MUESTRAS.
 - FO-GAA-161 FORMATO DE SOLICITUD DE ANÁLISIS HIDROBIOLÓGICOS.
 - FO-GAA-204 FORMATO DE CONTEO DE COMUNIDADES HIDROBIOLÓGICAS PERIFITON, FITOPLANCTON Y ZOOPLANCTON
 - FO-GAA-218 REGISTRO DE ABUNDANCIAS E ÍNDICES ECOLÓGICOS PARA

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO DE MUESTREO Y ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD DEL FITOPLANTON EN CUERPOS DE AGUA LOTICOS			
	<i>Código: IN-GAA-93</i>	<i>Versión: 04</i>	<i>Fecha de aprobación: 03/08/2022</i>	<i>Página: 7 de 7</i>

- PERIFITON, FITOPLANCTON Y ZOOPLANCTON
- FO-GAA-234 INFORMES TÉCNICOS AMBIENTALES

8. Historial de cambios:

Versión	Fecha	Cambios	Elaboró / Modificó	Revisó	Aprobó
01	11/02/2019	Documento Nuevo	Julian Barreto <i>Profesional de Apoyo</i>		Marco Aurelio Torres Director ICAOC
02	12/03/2019	Correcciones en redacción y estructura	Julian Barreto <i>Profesional de Apoyo</i>	Silvia Morales <i>Responsable U. Hidrobiología</i>	Mario Gutiérrez <i>Profesional de Calidad</i>
03	13/08/2021	Se adicionaron los códigos de los formatos empleados. Se adicionó un nuevo ítem en la concentración de muestras.	Julian Barreto <i>Profesional de Apoyo</i>	Sandra Hernández <i>Responsable U. Hidrobiología</i>	Juan Manuel Trujillo <i>Director CCA</i>
04	03/08/2022	Aclaración en ítem de cálculo de densidades	Julian Barreto <i>Profesional de Apoyo</i>	Sandra Hernández <i>Responsable U. Hidrobiología</i>	Juan Manuel Trujillo <i>Director CCA</i>