



informe progresivo

nº
153

Setiembre
2001

**Procedimiento Estandarizado de Operación:
Método de determinación del consumo de oxígeno en
invertebrados acuáticos (PEO-IMP-CO-001)**

*Jorge Tam, Giovanna Vera,
Edwin Pinto, Guadalupe Sánchez.3*

**Procedimiento Estandarizado de Operación:
Método de determinación de la tasa de ingestión
de organismos filtradores (PEO-IMP-TI-001)**

*Jorge Tam, Giovanna Vera,
Edwin Pinto, Guadalupe Sánchez.11*

Publicación periódica mensual de distribución nacional. Contiene información de investigaciones en marcha, conferencias y otros documentos sobre temas marítimos. EL INFORME PROGRESIVO tiene numeración consecutiva. Deberá ser citado como Inf. Prog. Inst. Mar Perú.

INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ (IMARPE)

Esq. Gamarra y Gral. Valle, Chucuito, Callao.

Apartado 22, Callao, Perú.

Telf. 429-7630 / 420-2000 Fax: 465-6023

Email: imarpe@imarpe.gob.pe

PROCEDIMIENTO ESTANDARIZADO DE OPERACIÓN: MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE LA TASA DE INGESTIÓN DE ORGANISMOS FILTRADORES (PEO-IMP-TI-001)

Jorge Tam Giovanna Vera Edwin Pinto

Línea de Investigación en Ecotoxicología Acuática

Guadalupe Sánchez

Unidad de Monitoreo y Gestión del Medio Ambiente Marino Costero

CONTENIDO

Resumen	11
Abstract	11
1. Objetivo	12
2. Alcance	12
3. Generalidades	12
4. Términos y definiciones	12
5. Responsabilidades	13
6. Condiciones de seguridad	13
7. Equipamiento, locales y materiales	13
8. Operaciones preliminares	15
9. Procedimiento	15
10. Cálculo	16
11. Interpretación de resultados	16
12. Registros	17
13. Referencias	17
14. Anexos	17
15. Datos referentes a la elaboración, revisión y aprobación del PEO-IMP-TI-001	18

RESUMEN

TAM, J., G. VERA, E. PINTO Y G. SÁNCHEZ. 2001. Procedimiento estandarizado de operación: método de determinación de la tasa de ingestión de organismos filtradores (PEO-IMP-TI-001). *Inf. Prog. Inst. Mar Perú*. 153: 11-20.

Se presenta el procedimiento estándar de operación (PEO) para el método de determinación de la tasa de ingestión de organismos acuáticos filtradores, aplicable por los analistas de la Línea de Investigación en Ecotoxicología Acuática (LIEA). Se describe el equipamiento, materiales necesarios, procedimientos de campo y laboratorio, y análisis e interpretación de los datos.

PALABRAS CLAVE: Procedimiento estándar de operación, tasa de ingestión, tasa de filtración.

ABSTRACT

TAM, J., G. VERA, E. PINTO AND G. SÁNCHEZ. 2001. Standard operating procedure: method for the determination of the consumption rate of filter-feeding organisms (PEO-IMP-TI-001). *Inf. Prog. Inst. Mar Perú*. 153:11-20.

The standard operating procedure (SOP) for the method of determination of the consumption rate of filter-feeding aquatic organisms is presented, which is applied by the analysts of the

Aquatic Ecotoxicology Research Branch (AERB). The necessary equipment and materials, field and laboratory procedures, data analysis and interpretation are described.

KEY WORDS: Standard operating procedure, ingestion rate, filtration rate.

1. OBJETIVO

Determinar la tasa de ingestión de organismos acuáticos filtradores.

2. ALCANCE

Este Procedimiento Estandarizado de Operación (PEO) es aplicable por los analistas de la Línea de Investigación en Ecotoxicología Acuática (LIEA) en la determinación de la tasa de filtración de organismos acuáticos.

3. GENERALIDADES

La tasa de ingestión representa una medida del consumo de alimento de los organismos filtradores. El análisis consiste en determinar la cantidad de alimento en suspensión, antes y después de un período de tiempo en el cual los organismos realizan procesos alimentarios filtradores a través de sus filamentos branquiales.

La tasa de ingestión se puede determinar con métodos de recipientes cerrados (ARAYA *et al.* 1993) o con métodos de flujo continuo (MACDONALD Y THOMPSON 1986, RIISGARD Y RANDLOV 1981). La cantidad de alimento en suspensión puede ser cuantificada mediante una cámara NEUBAUER o con un contador electrónico de partículas. En el contador de partículas, el paso de la partícula por un orificio altera el flujo de corriente en relación proporcional a superficie y volumen.

En el presente PEO se medirá la tasa de ingestión en recipientes cerrados cuantificando el alimento con la cámara NEUBAUER.

4. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

Filtración. Tipo de alimentación mediante un mecanismo de atrapamiento pasivo o activo (bombeo, cilios, tentáculos) de partículas en suspensión, las cuales son retenidas en los filamentos branquiales, y luego transportadas a la abertura bucal.

Tasa de ingestión (TI). Cantidad de alimento (células de microalgas) consumido por un organismo filtrador durante un período determinado de tiempo (*e.g.* cél.ind⁻¹.h⁻¹).

Tasa de filtración (TF). Volumen de agua filtrado por un organismo durante un período determinado de tiempo (*e.g.* mL.ind⁻¹.h⁻¹).

5 RESPONSABILIDADES

El Personal Muestreador es responsable de coleccionar los organismos y registrar parámetros ambientales importantes del hábitat natural, tales como: oxígeno, temperatura, salinidad, pH, entre otros.

El Analista es responsable de la ejecución de los procedimientos de laboratorio.

El Jefe de la Línea de Investigación de Ecotoxicología Acuática es responsable de verificar la aplicación del PEO.

6. CONDICIONES DE SEGURIDAD

- En el laboratorio, el personal usará un mandil.
- Usar guantes para evitar contacto de los reactivos con la piel.
- Evitar contacto del agua con los equipos eléctricos.
- La balanza analítica estará dentro de una cámara aislada, libre de vibraciones y corrientes de aire.
- Los reactivos se guardarán en estantes oscuros y a temperatura ambiente (entre 18°C y 25°C).

7. EQUIPAMIENTO, LOCALES Y MATERIALES

Equipamiento

Para mantenimiento de organismos:

Tanques.
Sistema de esterilización ultravioleta.
Sistema de filtros.
Sistema de aireación.

Para cultivo de microalgas:

Autoclave.
Bomba de vacío con sistema de filtración.
Filtros de nitrocelulosa de 0,22 µm.
Balanza analítica, con precisión de 0,1 mg.
Matraces de 1 L.

Para la realización de experimentos:

Mesas de agua termorregulables.
Acuarios.
Termómetro de vidrio, con precisión de 0,1 °C.

Refractómetro o hidrómetro, con precisión de 0,1 ups.
 pHmetro, con precisión de 0,01 unidades de potencial de hidrógeno.
 Microscopio compuesto.
 Viales.
 Cámara NEUBAUER.
 Pipetas PASTEUR.
 Tetillas de jebe.
 Contómetro.
 Cronómetro.

Locales

Ambiente para mantenimiento de organismos

Debe contar con tanques, sistema de aireación, suministro de agua, sistema de filtros (de 10 μm , 5 μm y 1 μm) y sistema de esterilización ultravioleta.

Ambiente para cultivo de microalgas

Debe contar con equipo de aire acondicionado a temperatura constante (20 ± 1 °C), fluorescentes con luz fría, sistema de aireación y estantes.

Ambiente para la realización de experimentos

Debe contar con mesas de agua termostáticas, sistema de aireación y suministro eléctrico.

Materiales

- Papel lente
- Plumones indelebles
- Plástico negro
- Solución yodada de lugol (Reactivo de UTERMÖHL).

Agua de mar con una salinidad de 35 ups, filtrada por 0,22 μm , esterilizada con luz ultravioleta.

Medio de cultivo f/2 de GUILLARD (1975 en GONZÁLEZ *et al.* 1995) modificado:

	Solución Stock	Medio de cultivo (g.L ⁻¹)
Solución 1 : NaNO ₃	75 g.L ⁻¹	0,075
Solución 2 : NaH ₂ PO ₄ ·9H ₂ O	5 g.L ⁻¹	0,005
Solución 3 : Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	10 g.L ⁻¹	0,01
Solución 4 : FeCl ₃ ·6H ₂ O	3,15 g.L ⁻¹	0,00315
Na ₂ ·EDTA·2H ₂ O	4,36 g.L ⁻¹	0,00436
MnCl ₂ ·4H ₂ O	18 g. (100 mL) ⁻¹	0,00018
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,2 g. (100 mL) ⁻¹	0,000022
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,05 g. (100 mL) ⁻¹	0,0000105
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,98 g. (100 mL) ⁻¹	0,0000098
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,63 g. (100 mL) ⁻¹	0,0000063

8. OPERACIONES PRELIMINARES

Colecta, transporte y acondicionamiento de organismos

Se deben registrar la hora, fecha, posición geográfica del lugar de muestreo y los parámetros ambientales (oxígeno, temperatura, salinidad, pH), y anotarlos en el Formato de Muestreo (Anexo 14.1). Los organismos son colectados, transportados y estabulados durante una semana en el laboratorio en tanques de 300 L con aireación constante, recambios diarios de agua de mar y alimentación diaria con la microalga *Chaetoceros gracilis*. Los organismos dañados son desechados. Los organismos se dejan de alimentar 24 h antes de la prueba.

Cultivo de microalgas

La especie usada como alimento de los organismos filtradores es *Chaetoceros gracilis*, que puede ser aislada de aguas costeras peruanas.

La solución 3 se prepara separando 10 mL de silicato en solución, en una probeta de 10 mL, y vertiéndolos a 900 mL de agua destilada acidificada con 5 mL de HCl (37%). Aforar a 1L con agua destilada.

La solución 4 se prepara disolviendo el $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y el $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 900 mL de agua destilada, adicionando 1 mL de las soluciones de Mn, Zn, Co, Cu y Na, y aforando a 1 L.

El medio de cultivo se prepara agregando 1 mL de cada una de las soluciones 1, 2, 3 y 4 a 900 mL de agua destilada, aforando a 1 L con agua de mar. El medio se esteriliza en autoclave por 15 min y se almacena a 4 °C.

Preparación de acuarios experimentales (Fig. 1)

Rotular los acuarios y llenar cada uno de ellos con 500 mL de agua de mar aireada. Establecer el sistema de aireación para cada acuario. Considerar un acuario para la prueba control sin organismo.

9. PROCEDIMIENTO

Adicionar a cada acuario 200 mL del cultivo de microalgas con una densidad conocida de aproximadamente $4.000.000 \text{ c\acute{e}l. mL}^{-1}$ y homogeneizar.

Colectar una alícuota de 1,0 mL del medio, almacenarla en un vial rotulado (especie, fecha, hora) y agregar unas gotas de solución yodada de lugol (Reactivo de UTERMÖHL). Determinar la densidad celular inicial en cada acuario mediante conteo de microalgas en la cámara NEUBAUER utilizando contómetro y microscopio compuesto.

Colocar el organismo en un acuario, y cubrirlo con un plástico negro, registrando la temperatura y hora de inicio de la prueba. En caso de tratarse de organismos pequeños, colocar varios ejemplares en el acuario (DÍAZ Y MARTÍNEZ 1992).

Cada 15 minutos, por espacio de 1 hora, tomar 1,0 mL de medio, almacenar en un vial, y fijar con Lugol para determinar la densidad celular, controlando que la densidad celular no llegue a cero.

Después de una hora, retirar el organismo y anotar la hora de término de la prueba. Colectar nuevamente una alícuota de 1,0 mL del acuario, fijándolas con lugol para determinar la densidad celular final.

La medición se realiza por duplicado, utilizando los mismos organismos las dos veces, considerando el período de 24 horas de ayuno antes de las pruebas. Se anotan los resultados en el Formato de Análisis y Resultados (Anexo 14.2).

10. CÁLCULO

La tasa de filtración y la tasa de ingestión se calculan con las siguientes fórmulas (modificado de ARAYA *et al.* 1993):

$$TF = V (b+d) / N$$

$$b = [\ln (F_c / I_c)] / T$$

$$d = [\ln (I_e / F_e)] / T$$

$$TI = TF \cdot C_m$$

$$C_m = I_e (e^{-d \cdot t} - 1) / (-d \cdot t)$$

Donde:

TF = Tasa de filtración (mL . ind⁻¹ . h⁻¹).

TI = Tasa de ingestión (cél . ind⁻¹ . h⁻¹).

V = Volumen de agua (L).

N = Número de individuos en el experimento.

b = Tasa de incremento de microalgas en el control (h⁻¹).

d = Tasa de decremento de microalgas en el experimento (h⁻¹).

I_c = Densidad celular inicial en el control (cél . mL⁻¹).

F_c = Densidad celular final en el control (cél . mL⁻¹).

I_e = Densidad celular inicial en el experimento (cél . mL⁻¹).

F_e = Densidad celular final en el experimento (cél . mL⁻¹).

C_m = Densidad celular promedio (cél . mL⁻¹).

T = Período de tiempo de medición (h).

11. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La tasa de ingestión de organismos filtradores equivale al consumo de alimento que luego se distribuye como energía digerida y energía egestada dentro del balance energético del individuo, por lo cual puede también ser expresada en unidades de joule . ind⁻¹ . h⁻¹ (KLEKOWSKI Y DUNCAN 1992). La tasa de filtración o tasa de aclaramiento puede estandarizarse con propósitos comparativos dividiéndola por el peso seco del individuo (BEIRAS *et al.* 1990). Si las partículas son suficientemente grandes para ser retenidas con 100% de eficiencia, la tasa de filtración equivale a la tasa de bombeo (BRICELJ Y SHUMWAY 1991).

12. REGISTROS

Formato de muestreo

Se debe anotar la especie colectada, hora, fecha, posición geográfica y los parámetros ambientales (oxígeno, temperatura, salinidad, pH) en el Formato de Muestreo (Anexo 14.1).

Formato de análisis y resultados

Se debe anotar el peso y longitud promedio de los individuos, la hora de lectura, la densidad celular inicial y final, y calcular la tasa de filtración y de ingestión en el Formato de Análisis y Resultados (Anexo 14.2). También se debe registrar la temperatura y salinidad durante el experimento.

13. Referencias

- ARAYA, P., A. POZO, M. AVENDAÑO Y R. ESCRIBANO. 1993. Dinámica de alimentación de individuos *Argopecten purpuratus* L. en condiciones de laboratorio. Rev. Biol. Mar. Valparaíso. 28:313-329.
- BEIRAS, R., A. PÉREZ Y M. ALBENTOSA. 1990. Tasas de filtración en larva de ostra (*Ostrea edulis* L.). Actas III Congreso Nac. Acuicult.:581-585.
- BRICELJ, V.M. Y S. SHUMWAY. 1991. Physiology: energy acquisition and utilization. pp. 305-346. In: Shumway, S. (Ed.). Scallops: biology, ecology and aquaculture. Elsevier. The Netherlands. 1095 pp.
- DÍAZ, M. A. Y G. MARTÍNEZ. 1992. Efecto de diferentes dietas sobre el balance energético en juveniles de *Argopecten purpuratus* L. Rev. Biol. Mar. 27:163-173.
- GONZÁLEZ, M. A., O. PARRA Y A. CIFUENTES. 1995. Técnicas de cultivo de microalgas en laboratorio. pp. 219-250. En: Alveal, K., M. E. Ferrario, E. C. Oliveira y E. Sar (Eds.). Manual de métodos ficológicos. Universidad de Concepción. Chile. 863 pp.
- KLEKOWSKI, R. Z. Y A. DUNCAN. 1975. Physiological approach to ecological energetics. In: Grodzinski, W., R. Z. Klekowski and A. Duncan. pp. 15-64. (Eds.). Methods for ecological bioenergetics. IBP Handbook 24. Blackwell Sci. Pub. Great Britain. 367 pp.
- MACDONALD, B. A. Y R. J. THOMPSON. 1986. Influence of temperature and food availability on the ecological energetics of the giant scallop *Placopecten magellanicus*. III. Physiological ecology, the gametogenic cycle and scope for growth. Mar. Biol. 93:37-48.
- RIISGARD, H. U. Y A. RANDLOV. 1981. Energy budgets, growth and filtration rates in *Mytilus edulis* at different algal concentrations. Mar. Biol. 61:227-234

14. ANEXOS

14.1. Formato de muestreo

Instituto del Mar del Perú (IMARPE)
Línea de Investigación en Ecotoxicología Acuática

Determinación de la tasa de ingestión en organismos acuáticos (PEO-IMP-TI-001)

Programa:	
Fecha de muestreo:	
Hora:	
Especie:	
Latitud:	
Longitud:	
Temperatura (°C):	
Salinidad (ups):	
pH:	
Oxígeno (mL.L ⁻¹):	
Muestreador responsable:	

14.2. Formato de análisis y resultados

Instituto del Mar del Perú (IMARPE)
Línea de Investigación en Ecotoxicología Acuática

**Determinación de la tasa de ingestión en organismos acuáticos
(PEO-IMP-TI-001)**

Programa:	
Fecha de análisis:	
Especie:	
Acuario No.:	
Volumen del medio (V)	
No. individuos (N):	
Longitud promedio (mm):	
Peso húmedo promedio (mg):	
Peso seco promedio (mg):	
Analista responsable:	

Lectura No.	Fecha	Hora Inicial	Hora final	Densidad microalgas inicial, I_c (cél.mL ⁻¹)	Densidad microalgas inicial, I_c (cél.mL ⁻¹)	Densidad microalgas final en el control, F_c (cél.mL ⁻¹)	Densidad microalgas final en el expto., F_e (cél.mL ⁻¹)	Tasa de filtración, TF (mL.ind ⁻¹ .h ⁻¹)	Tasa de ingestión, TI (Cél.ind ⁻¹ .h ⁻¹)

15. DATOS REFERENTES A LA ELABORACIÓN, REVISIÓN Y APROBACIÓN DEL PEO-IMP-TI-001

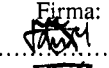
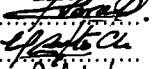
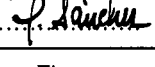

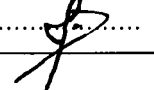
Elaborado por:	Firma:	Fecha:
Dr. Jorge Tam		10 Julio 2001
Bлга. Giovanna Vera		10 Julio 2001
Tco. Quím. Edwin Pinto		10 Julio 2001
Dra. Guadalupe Sánchez		10 Julio 2001
Revisado y aprobado por:	Firma:	Fecha:
Blgo. Renato Guevara-Carrasco		10 Julio 2001



FIGURA 1. Acuarios experimentales con sistema de aireación.