



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

Asesora científica

Dra. Norma Chirichigno Fonseca

Editor científico

Dr. Pedro G. Aguilar Fernández

© 2001, Instituto del Mar del Perú

Esquina Gamarra y General Valle

Apartado Postal 22

Callao, PERÚ

Teléfono 429-7630 / 420-2000

Fax(511) 465-6023

E-mail:imarpe@imarpe.gob.pe

Hecho el depósito de Ley No 2002-518

*Reservados todos los derechos de reproducción total
o parcial, la fotomecánica y los de traducción.*

Impresión: Fimart S.A.C.

Av. Del Río III - Pueblo Libre

Teléfono: 424-0662

Tiraje: 300 ejemplares

Terminado de imprimir: junio 2002

PROCEDIMIENTO ESTANDARIZADO DE OPERACIÓN: MÉTODO DE DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO EN INVERTEBRADOS ACUÁTICOS (PEO-IMP-CO-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	3
Abstract	3
1. Objetivo	4
2. Alcance	4
3. Generalidades	4
4. Términos y definiciones	4
5. Responsabilidades	5
6. Condiciones de seguridad	5
7. Equipamiento, locales y materiales	5
8. Operaciones preliminares	6
9. Procedimiento	7
10. Cálculo	7
11. Interpretación de resultados	8
12. Registros	8
13. Referencias	9
14. Anexos	9
15. Datos referentes a la elaboración, revisión y aprobación del PEO-IMP-CO-001	10

RESUMEN

TAM, J., G. VERA, E. PINTO Y G. SÁNCHEZ. 2001. Procedimiento estandarizado de operación: método de determinación del consumo de oxígeno en invertebrados acuáticos (PEO-IMP-CO-001). *Inf. Prog. Inst. Mar Perú*. 153:3-10

Se presenta el procedimiento estándar de operación (PEO) para el método de determinación del consumo de oxígeno de invertebrados acuáticos, 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, consumo medio de oxígeno, consumo específico de oxígeno, metabolismo.

ABSTRACT

TAM, J., G. VERA, E. PINTO AND G. SÁNCHEZ. 2001. Standard operating procedure: method for the determination of the oxygen consumption of aquatic invertebrates (PEO-IMP-TI-001). *Inf. Prog. Inst. Mar Perú*. 153:3-10

The standard operating procedure (SOP) for the method of determination of the oxygen consumption of aquatic invertebrates 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, mean oxygen consumption, specific oxygen consumption, metabolism.

1. OBJETIVO

Determinar el consumo de oxígeno en invertebrados acuáticos.

2. ALCANCE

Este Procedimiento Estandarizado de Operación (PEO) es aplicable por los analistas de la Línea de Investigación de Ecotoxicología Acuática (LIEA) en la determinación del consumo de oxígeno de invertebrados acuáticos.

3. GENERALIDADES

Mediante el consumo de oxígeno se obtiene una medida del metabolismo de los organismos. El análisis consiste en determinar la cantidad de oxígeno disuelto antes y después de un período de tiempo, en el cual el organismo realiza procesos respiratorios aeróbicos.

La medición del consumo de oxígeno se puede realizar en la fase gaseosa o en la fase acuosa (KAMLER 1970). La medición en la fase gaseosa se realiza con métodos gasométricos o manométricos, y se usa para organismos muy pequeños (protozoarios, rotíferos). La medición en la fase acuosa se puede realizar con métodos de recipientes cerrados o con métodos de flujo continuo (STROGANOV 1964). La cantidad de oxígeno disuelto en el agua puede ser determinada por el método químico propuesto por WINKLER o por el método electroquímico. En el método electroquímico se aplica un voltaje polarizante a un electrodo para que el oxígeno reaccione con el cátodo originando un flujo de corriente.

En el PEO se medirá el consumo de oxígeno en la fase acuosa en recipientes con el método electroquímico. Se utilizarán cámaras respirométricas cerradas de diferentes volúmenes de acuerdo al tamaño de los organismos.

La tasa metabólica está influenciada por varios factores: temperatura, tamaño, disponibilidad de oxígeno, alimento, estado reproductivo, nivel de actividad y condición fisiológica (BRICELJ Y SHUMWAY 1991).

4. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

Consumo medio de oxígeno (CMO) o tasa de respiración: cantidad de oxígeno consumido por un organismo durante un período determinado de tiempo (*e.g.* $\mu\text{L O}_2 \cdot \text{ind}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Consumo específico de oxígeno (CEO): cantidad de oxígeno consumido por gramo de peso seco de un organismo durante un período determinado de tiempo (*e.g.* $\mu\text{L O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{ peso seco} \cdot \text{h}^{-1}$).

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 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 el contacto de los reactivos con la piel.
- Evitar el 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

Oxímetro con sonda polarográfica y opciones de compensación automática de temperatura y calibración según altitud y salinidad. Los accesorios deben incluir membranas de repuesto y solución electrolítica (YSI 1991).

Cámara respirométrica o respirómetro (Fig. 1). Se prefieren recipientes anchos y cortos, para evitar un gradiente de oxígeno (SÁNCHEZ 1981). El volumen debe ser tal que el oxígeno al inicio sea 3-4 veces el oxígeno consumido.

- Agitador magnético, con velocidad regulable y magneto plastificado.
- Balanza analítica, con precisión de 0,1 mg.
- 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.

Locales

Local para mantenimiento de organismos

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

Local para la realización de experimentos

- Debe contar con mesas de agua termorregulables, aireación y suministro eléctrico.

Materiales

- Agua destilada, para lavado del sensor de oxígeno.
- Agua de mar con una salinidad de 35 ups, filtrada ($1\mu\text{m}$), y esterilizada con luz ultravioleta.
- Medio de cultivo para *Chaetoceros gracilis*: se utiliza el medio de cultivo f/2 de GUILLARD modificado (TAM *et al.* 2002).

8. OPERACIONES PRELIMINARES

Colecta y transporte de organismos

Los organismos son colectados y transportados al laboratorio con aireación constante. Los organismos dañados son desechados. Se debe registrar la hora, fecha, posición geográfica y los parámetros ambientales (oxígeno, temperatura, salinidad, pH) en el Formato de Muestreo (Anexo 14.1).

Para determinar la tasa metabólica estándar se requiere mantener a los organismos durante un período de aclimatación y en ayuno. El período de aclimatación de los organismos comúnmente es de 12-24 h (CHAPELLE Y PECK 1995), sin embargo es recomendable extender este período hasta por lo menos 7 días (GOMES *et al.* 1995). El período de ayuno de los organismos comúnmente es menor a 24 h (CHAPELLE Y PECK 1995), sin embargo es recomendable extender este período hasta por lo menos 3 días (GOMES *et al.* 1995), dependiendo de las características del organismo (ayuno de 24 a 48 h para organismos de aguas cálidas y de 4 a 7 días para organismos de aguas frías).

Preparación del agua de dilución

Saturar con oxígeno el agua de mar filtrada y esterilizada, utilizando el sistema de aireación, por 1 hora a $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Preparación de la cámara respirométrica

Se llena la cámara respirométrica con agua de mar filtrada ($1\mu\text{m}$) y aireada por 12 h. Se coloca un magneto en el fondo de la cámara. Se ajusta una placa de acrílico perforada en el fondo para proteger el magneto. Se coloca la cámara sobre un agitador magnético y se ajusta la velocidad hasta que ocurra una mezcla ligera. El oxímetro debe registrar 100% de saturación, con una lectura estable por 20 minutos. La temperatura se mantiene constante durante el experimento.

Preparación del oxímetro

Antes de usar el oxímetro, la sonda debe llenarse con una solución electrolítica de cloruro de potasio (KCl) y una nueva membrana debe instalarse, evitando la presencia de burbujas en el

interior. La sonda debe almacenarse en la cámara de calibración con una esponja húmeda (atmósfera con 100% de humedad y contenido de oxígeno conocido). El oxímetro se debe recalibrar antes de cada medición. Se enciende el oxímetro y se deja estabilizar unos 15 minutos. Se introduce la información requerida (altitud y salinidad) para que el oxímetro complete el proceso de calibración (YSI 1991).

9. PROCEDIMIENTO

Cerrado de la cámara respirométrica

Se introduce un individuo previamente pesado y medido en la cámara respirométrica. Rápidamente, se atornilla la tapa del respirómetro y se remueven las burbujas de aire inclinando la cámara, y permitiendo a las burbujas salir por el orificio de la tapa. Se inserta la sonda de oxígeno en el orificio de la tapa de modo que quede herméticamente cerrado.

Se recomienda mantener al organismo por 6 horas en la cámara respirométrica, y medir el consumo de oxígeno hasta que una tasa constante sea observada.

Medición de oxígeno

Se realiza una lectura midiendo el contenido de oxígeno ($\text{mL O}_2 \cdot \text{L}^{-1} = 1,43 \times \text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) inicial y final (O_e) después de un período de tiempo (h), de modo que el oxígeno final debe ser mayor a un 75% de saturación de oxígeno, para evitar estrés por falta de oxígeno.

Se realiza una lectura control, midiendo el contenido de oxígeno inicial y final (O_e) en ausencia del organismo. El consumo de oxígeno en estas condiciones se atribuye a microorganismos (bacterias, protozoos).

La medición se realiza por duplicado, utilizando el mismo organismo las dos veces. Se anotan los resultados en el Formato de Análisis y Resultados (Anexo 14.1).

Otras mediciones

El peso húmedo del organismo (mg) es determinado dejando escurrir el agua adherida al individuo para luego pesarlo en la balanza analítica. En el caso de moluscos, registrar el peso sin valvas.

El peso seco del organismo (mg) es determinado exponiendo el tejido a 60 °C en la estufa por 24 y 48 horas a peso constante.

El volumen del organismo (L) es determinado midiendo la cantidad de agua que es desplazada por el organismo cuando se coloca en un recipiente (GUTJAHR-GOBELL Y NELSON 1990).

10. CÁLCULO

Los consumos de oxígeno se calculan con las siguientes fórmulas (modificado de GUTJAHR-GOBELL Y NELSON 1990):

$$\text{CMO} = (\text{O}_e - \text{O}_c) * (\text{V}_c - \text{V}_o) * 1000 / \text{T}$$

$$\text{CEO} = \text{CMO} / \text{P}$$

Donde:

- CMO = Consumo medio de oxígeno ($\mu\text{L O}_2 \cdot \text{ind}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
 CEO = Consumo específico de oxígeno ($\mu\text{L O}_2 \cdot \text{mg}^{-1}$ peso húmedo. h^{-1})
 O_e = Contenido final de oxígeno en el experimento ($\text{mL O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$).
 O_c = Contenido final de oxígeno en el control ($\text{mL O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$).
 V_c = Volumen de la cámara respirométrica (L)
 V_o = Volumen del organismo (L)
 T = Período de tiempo de medición (h)
 P = Peso seco del organismo (mg)

Se anotan los resultados en el Formato de Análisis y Resultados (Anexo 14.2).

11. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El CEO de un organismo puede utilizarse como indicador de diferentes procesos fisiológicos. El CEO puede interpretarse como la tasa metabólica estándar, cuando se mide a los organismos bajo condiciones fisiológicamente estacionarias, aclimatados y en ausencia de alimento; incluyendo sólo las actividades metabólicas necesarias para mantener al organismo vivo más las contribuciones instantáneas por crecimiento o gametogénesis (BAYNE *et al.* 1976 en CHAPPELLE Y PECK 1995). El CEO representa el metabolismo estándar siempre y cuando la actividad sea mínima (DUNCAN Y KLEKOWSKI 1975), por lo que debe interpretarse como metabolismo de rutina cuando son inevitables movimientos espontáneos en la columna de agua, como en el caso de las zoeas (SCHALTZLEIN Y COSTLOW 1978).

El CEO como un indicador de estrés metabólico requiere exponer a los organismos *in situ* ya sea a alteraciones de los parámetros ambientales o a sustancias tóxicas durante un período de tiempo prolongado (15-20 días).

12. REGISTROS

Formato de muestreo

Se debe anotar el nombre científico de la especie colectada, la hora, fecha, posición geográfica del lugar de muestreo 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 inicio y final de lecturas, el contenido de oxígeno inicial y final, y el consumo individual de oxígeno, en el Formato de Análisis y Resultados (Anexo 14.2). También se debe registrar la temperatura y salinidad durante el experimento.

13. Referencias

- BRICELI, V.M. Y S. SHUMWAY. 1991. Physiology: energy acquisition and utilization. p. 305-346. In: Shumway, S. (Ed.). Scallops: biology, ecology and aquaculture. Elsevier. The Netherlands. 1095 pp.
- DUNCAN, A. Y R. Z. KLEKOWSKI. 1975. Parameters of an energy budget. In: Grodzinski, W., R. Z. Klekowski and A. Duncan. p. 97-147. (Eds.). Methods for ecological bioenergetics. IBP Handbook 24. Blackwell Sci. Pub. Great Britain. 367 pp.
- GONZÁLEZ, M. A., O. PARRA Y A. CIFUENTES. 1995. Técnicas de cultivo de microalgas en laboratorio. p. 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.
- GUTJAHR-GOBELL, R. Y W. NELSON. 1990. Standard operating procedure to determine growth and scope for growth (SFG) index using the blue mussel *Mytilus edulis*. Science Applications International Corporation/Environmental Research Laboratory. SAIC
- KAMLER, E. 1970. The main parameters regulating the level of energy expenditure in aquatic animals. Polskie Archiwum Hydrobiologii. 17:201-216.
- SÁNCHEZ, G. 1981. Estudio sobre el consumo de oxígeno en anchoveta *Engraulis ringens*. Inf. Interno. Inst. Mar Perú.
- SCHALTZLEIN, F. C. Y J. D. COSTLOW. 1978. Oxygen consumption of the larvae of the decapod crustaceans, *Emerita talpoida* (Say) and *Libinia emarginata* Leach. Comp. Biochem. Physiol. 61:441-450.
- STROGANOV, N. S. 1964. Methods of study of respiration in fish. In: Akademiya Nauk SSSR. p. 27-77. Techniques for the investigation of fish physiology. NSF. US. 313 p.
- TAM, J., G. VERA, E. PINTO Y G. SÁNCHEZ. 2002. Procedimiento estandarizado de operación: método de determinación de la tasa de ingestión de organismos filtradores (PEO-IMP-TI-001). Inf. Prog. Inst. Mar Perú.
- YSI. 1991. Operations manual. YSI Model 55. Handheld dissolved oxygen and temperature system. 21 p.

14. ANEXOS

14.1 Formato de muestreo

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

**Determinación del consumo de oxígeno en invertebrados acuáticos
(PEO-IMP-CO-001)**

Programa:	
Fecha de muestreo:	
Hora:	
Nombre científico:	
Posición geográfica:	
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 del consumo de oxígeno en invertebrados acuáticos
(PEO-IMP-CO-001)**

Programa:	
Fecha de análisis:	
Especie:	
Cámara respirométrica No.:	
Volumen de la cámara (V _c , L):	
Volumen del organismo (V _o , L):	
No. individuos:	
Longitud promedio (L, mm):	
Peso seco promedio (P, mg):	
Analista responsable:	

Lectura No.	Fecha	Hora Inicial	Hora final	Oxígeno inicial control (mL.L ⁻¹)	Oxígeno final control (O ₂ mL.L ⁻¹)	Oxígeno inicial expto. (mL.L ⁻¹)	Oxígeno final expto. (O ₂ mL.L ⁻¹)	Consumo medio de oxígeno (CMO, μL.ind ⁻¹ .h ⁻¹)	Consumo específico de oxígeno (CEO, μL.ind ⁻¹ .h ⁻¹)	Saturación de oxígeno final expto. (%)

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

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

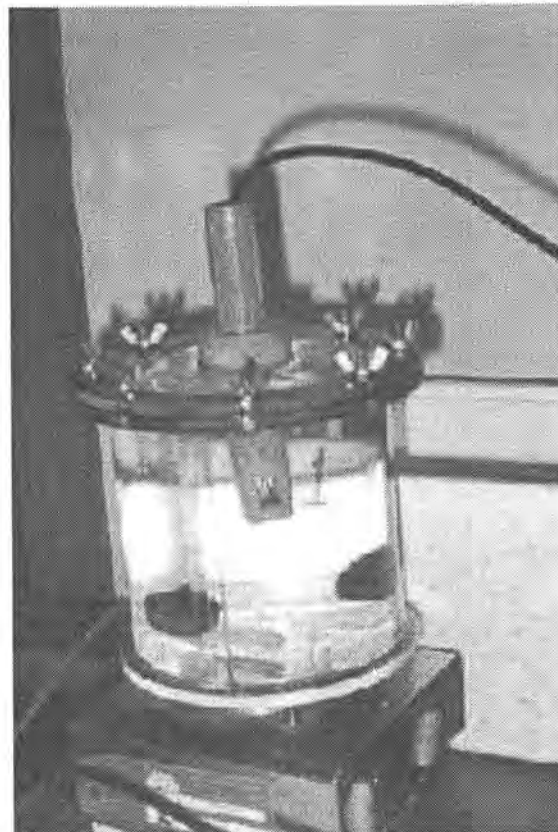


FIGURA 1. Cámara respirométrica con el electrodo de un oxímetro incorporado (modificado de Sánchez 1981).