INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ

INFORME

ISSN 0378-7702

Volumen 45, Número 2

Abril - Junio 2018
Callao, Perú

PERÚ Ministerio de la Producción

PROTOCOLO PARA MUESTREO BIOLÓGICO Y BIOMÉTRICO DE MACROALGAS PARDAS COMERCIALES

PROTOCOL FOR BIOLOGICAL AND BIOMETRIC SAMPLING OF COMMERCIAL BROWN MACROALGAE

Alex Gamarra[1] *Alex Tejada*[1] *Roger Muñoz*[3]
Daniel Flores[4] *Omayra Galarza*[5]

RESUMEN

Gamarra A, Tejada A, Muñoz R, Flores D, Galarza O. 2018. *Protocolo para muestreo biológico y biométrico de macroalgas pardas comerciales. Inf Inst Mar Perú. 45(2): 182-193.-* En el Instituto del Mar del Perú se realizan estudios poblacionales (prospecciones, evaluaciones y monitoreos) sobre las macroalgas pardas de las especies *Macrocystis pyrifera* (mayormente varada), *Lessonia nigrescens* y *L. trabeculata* (ambas extraídas en el intermareal rocoso –la primera- y en el submareal rocoso –la segunda-) registrando información biológica *in situ*, para lo cual se requiere de procedimientos estandarizados a nivel nacional. En este protocolo se describe la forma en que se obtienen las muestras, su transporte y conservación y los pasos para la recopilación de datos biológicos (longitud, peso, condición reproductiva) al efectuar estudios poblacionales. Asimismo, se presentan los procedimientos para obtención de información sobre condición reproductiva del recurso, a nivel macroscópico y microscópico.

Palabras clave: macroalgas pardas, muestreo biológico – biométrico, Perú

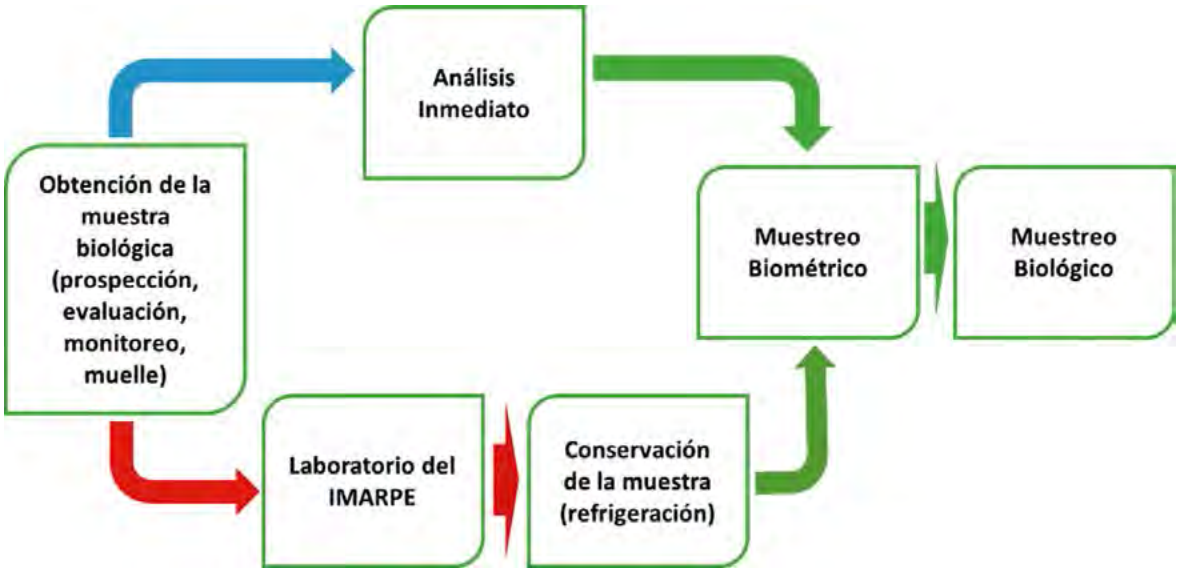
ABSTRACT

Gamarra A, Tejada A, Muñoz R, Flores D, Galarza O. 2018 *Protocol for biological and biometric sampling of commercial brown macroalgae. Inf Inst Mar Peru. 45(2): 182-193.-* At the Peruvian Marine Research Institute, population studies (surveys, assessments and monitoring) are carried out on the brown macroalgae of the *Macrocystis pyrifera* (mostly stranded), *Lessonia nigrescens* and *L. trabeculata* (both extracted in the rocky intertidal -the first- and in the rocky subtidal -the second-) species, recording biological information *in situ*, for which standardized procedures are required at the national level. This protocol describes how samples are collected, transported and conserved, and the steps for collecting biological data (length, weight, reproductive status) when conducting population-based studies. The procedures for obtaining information on the reproductive condition of the resource at the macroscopic and microscopic levels are also presented.

Keywords: brown macroalgae, biological - biometric sampling, Peru

DESCRIPCION DEL PROCESO DE MUESTREO

Flujograma del proceso de muestreo:



1 Área Funcional de Investigaciones de Invertebrados Marinos y Macroalgas, agamarra@imarpe.gob.pe
2 Laboratorio Costero de Ilo
3 Laboratorio Costero de Camaná
4 Laboratorio Costero de Pisco,
5 Facultad de Ciencias Biológicas – Universidad Nacional Mayor de San Marcos

1. TIPO DE MUESTREO

Para los muestreos biométrico y biológico, se deberán obtener los esporofitos al azar simple o al azar estratificado.

2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

El técnico o profesional destacado para este fin debe portar una identificación institucional, para efectuar las investigaciones poblacionales sobre el recurso macroalgas pardas: (1) prospección, (2) evaluación, (3) monitoreo poblacional en muelle durante una actividad extractiva autorizada, y/o (4) monitoreo poblacional del recurso en ambiente natural (praderas de macroalgas).

La muestra debe contener en lo posible todos los rangos de tamaños observados por los buzos científicos o extractores. Los especímenes deben provenir, de preferencia, de muestreos al azar o seleccionados al azar en los puntos de desembarques autorizados durante las extracciones reguladas por PRODUCE.

Registrar datos como: zona de muestreo o extracción (en lo posible georreferenciado), biomasa total (kg), composición por especies de otras macroalgas (kg) y artes o métodos de pesca empleados.

Registrar el nombre del patrón y también el nombre y matrícula de la embarcación. El número de ejemplares de las especies en estudio para los muestreos biométrico y biológico se detallan en la Tabla 1.

3. TRANSPORTE Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Las muestras deberán ser transportadas en cajas plásticas grandes y cerradas, protegiéndolas de la radiación solar, para evitar la deshidratación de los especímenes. El transporte de la muestra al laboratorio no debería tomar más de dos horas.

El muestreo debe realizarse inmediatamente después de llegada la muestra al laboratorio. En caso de no ser posible, preservarlas en refrigeración (entre -1 y 5 °C) por un máximo de 24 horas, para luego procesarlas.

4. MATERIALES

- Dinamómetro digital con precisión de 10 g
- Cinta métrica de 150 cm longitud total
- Cinta métrica de 500 cm de longitud total
- Cuchillo aserrado
- Bandejas plásticas
- Balanza electrónica con una precisión de 0,01 g
- Equipo de disección (tijeras, pinzas, etc.)
- Bandejas plásticas
- Material de escritorio (lapiceros, lápiz, borrador, corrector, etcétera)
- Tablero

Tabla 1.- Tamaño de muestra para muestreos biométricos y biológicos por especie

Nombre común	Especie	Número de ejemplares	
		Biométrico	Biológico
Aracanto negro, negra	*Lessonia nigrescens* Bory de Saint-Vincent	Mínimo 50 ejemplares	De acuerdo al análisis biométrico, puede variar de 10 a 30 ejemplares
Aracanto palo, palo	*Lessonia trabeculata* Villouta y Santelices		
Sargazo, bolita	*Macrocystis pyrifera* C. Agardh		

- Papel metálico
- Papel canson
- Calibrador vernier
- Microscopio de contraste
- Cámara fotográfica digital
- Láminas porta y cubre objetos
- Formularios de muestreo biológico
- Indumentaria dispuesta en la Ley N° 29783, Ley de seguridad y salud en el trabajo (mandil, botas, guantes, gorro, etcétera)

5. MUESTREO BIOMÉTRICO

Si la logística lo permite, el muestreo biométrico se debería realizar en la embarcación o en el campo durante el estudio poblacional; caso contrario, se deberá transportar la muestra al laboratorio, con los cuidados respectivos para su procesamiento, según lo señalado en el ítem 4.

Ordenar los ejemplares en un lugar apropiado en la embarcación u orilla rocosa o en la mesa de muestreo en el laboratorio.

Registrar el tamaño del diámetro mayor, menor y perímetro del disco de fijación o rizoide y longitud total del esporofito con una cinta métrica en centímetros (Fig. 1). En ejemplares pequeños las medidas se tomarán con vernier.

Registrar el peso total del rizoide y del esporofito en gramos, mediante una balanza con dinamómetro digital o balanza electrónica calibrada (Fig. 1).

Contabilizar el número de estipes y de aerocistos (para *Macrocystis pyrifera*) y la ocurrencia de coalescencia.

Indicar el nivel o grado de pastoreo según la escala cualitativa: 0 = sin pastoreo (0%), 1 = poco pastoreado (>5% - 25%), 2 = medianamente pastoreado (>25% - 50% del esporofito), 3 = muy pastoreado (>50% - 100%).

La información biométrica deberá escribirse en la ficha de muestreo biológico para macroalgas marinas, establecido por el Instituto del Mar del Perú (Anexo 1).

6. MUESTREO BIOLÓGICO MACROSCÓPICO

Durante el registro de la información biométrica de las macroalgas pardas indicar la condición fértil (1= fértil; 0= no fértil).

Dependiendo del género se tendrán las siguientes consideraciones:

1. *Macrocystis pyrifera* se deberá contabilizar el número total de esporofilas y número de esporofilas con soros. Las esporofilas se ubican en la base del esporofilo hasta el inicio de los aerocistos (Neushul 1963, North 1971)

2. *Lessonia* spp., se deberá contabilizar el número total de láminas y el número de láminas con soros.

Del muestreo biométrico, seleccionar cinco esporofitos en el intervalo de longitud total <100 cm, entre 100 cm - 300 cm y >300 cm, para organizar el muestreo biológico.

Extraer tres esporofilas o láminas reproductivas con soros por cada esporofito por rango de tamaño y fotografiar para su posterior análisis digital. De cada lámina reproductiva se registrará: (1) longitud total, (2) área total y (3) área total del tejido reproductivo (soro, Anexo 2).

El registro de medidas en las esporofilas y/o láminas reproductivas permitirá calcular el porcentaje del área promedio que cubre el tejido reproductivo en las esporofilas.

7. MUESTREO BIOLÓGICO MICROSCÓPICO

Las esporofilas medidas serán lavadas con abundante agua dulce, para eliminar los epibiontes, luego continuar el lavado con agua de mar filtrada y esterilizada. Dejarlos secar por 12 horas en oscuridad.

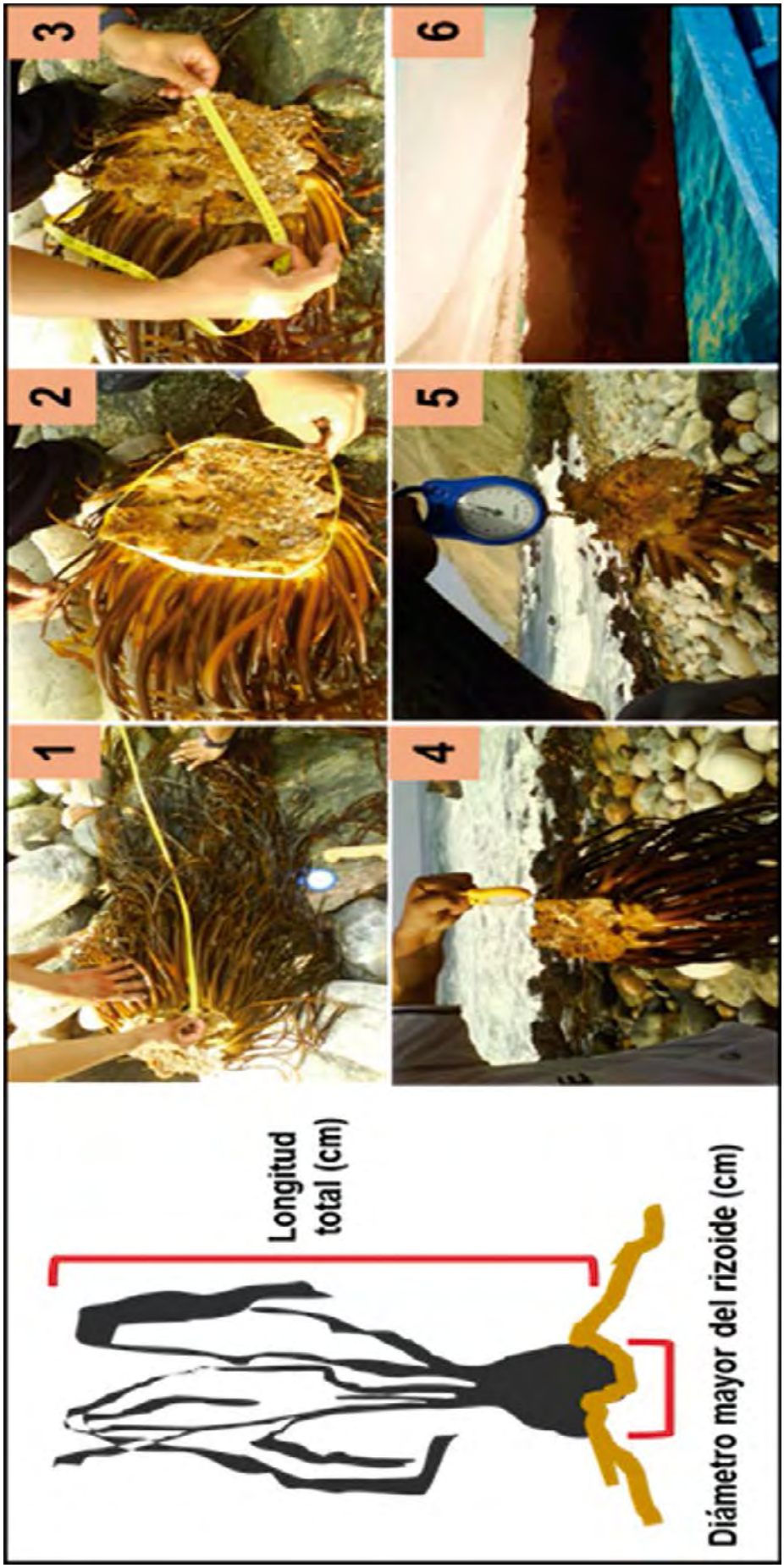


Figura 1.- Registro de la longitud total (1), perímetro (2), diámetro mayor del rizoide (3), peso total (4), peso del rizoide (5) e identificación de la condición reproductiva del esporofito (macroalga parda) (6)

Cortar pequeños trozos de 1 cm^2 y depositarlos por 6 horas en placas Petri de vidrio de 5 cm de diámetro que contengan 5 mL de medio Provasoli (Oliveira *et al.* 1995, Anexo 3) para que esporulen.

Extraer 1 mL de la solución con una micropipeta y depositarlo en un hemocitómetro o cámara de Neubauer, para el conteo de esporas liberadas.

El conteo de esporas se realizará en el campo central del hemocitómetro en forma diagonal, por triplicado, obteniéndose el número de esporas promedio por muestra. El cálculo del número de esporas se detalla en el Anexo 4.

8. REFERENCIAS

Neushul M. 1963. Studies in the giant kelp, *Macrocystis.* II. Reproduction. Am. J. Bot. Vol. 50: 354-359.

North W J. 1971. The biology of giant kelp beds (*Macrocystis*) in California. Nova Hedwigia 32: 17-20.

Oliveira E C, Paula E J, Plastino E M, Petti R. 1995. Métodos para cultivo no axénico de macroalgas marinas *in vitro*. En Manual de Métodos Ficológicos. K. Alveal, M.E. Ferrario, E.C. Oliveira y E. Sar (Eds.) Universidad de Concepción. Concepción, Chile. 429-447.

Promperú. 2015. Desenvolvimiento del comercio exterior pesquero en el Perú. 62 p.

Vásquez J, Castillo R, Zavala J, Tejada A, Mamani J. 2012. Programa de investigación de las algas pardas en el sur del Perú. 2011-2015. Inf Inst Mar Perú. Volumen Extraordinario. 5 - 57.

Anexo 1

Ficha de muestreo biológico de macroalgas marinas

INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ

MUESTREO BIOLÓGICO DE MACROALGAS MARINAS

ESPECIE ..... ESTACION .....
ACTIVIDAD ..... LATITUD .....
LUGAR ..... LONGITUD .....
SECTOR ..... PROF. .....
FECHA ..... SUSTRATO .....

ID	MEDIDAS (cm)				FERTIL.	PESOS (g)		NÚMERO			REGISTRO		OBSERVACIONES
	LONG.	DMR	DmR	Perim.		TOTAL	RIZOIDE	ESTIP.	ESPORF.	AEROC.	PAST.	COAL.	
1													
2													
3													
4													
5													
6													
7													
8													
9													
10													
11													
12													
13													
14													
15													
16													
17													
18													
19													
20													
21													
22													
23													
24													
25													
26													
27													
28													
29													
30													

DENSIDAD	Repl. 1	Repl. 2	Repl. 3	Repl. 4	Repl. 5	Repl. 6	Repl. 7	Repl. 8	Repl. 9	Repl. 10

RESPONSABLE

NO FERTIL	0
FERTIL	1

PAST=Pastoreo			
0=sin past.	1=poco past.	2=medio past.	3=muypast.

NO COAL.	0
COAL.	1

LONG= Longitud Total, DMR=Diametro Mayor Rizoide, DmR=Diametro menor Rizoide, PER=Perimetro, PT=Peso Total, PR=Peso Rizoide, ESTIP=Estipite, ESPOR=Esporofilos, AEROC=Aerocistos, COAL=Coalescencia.

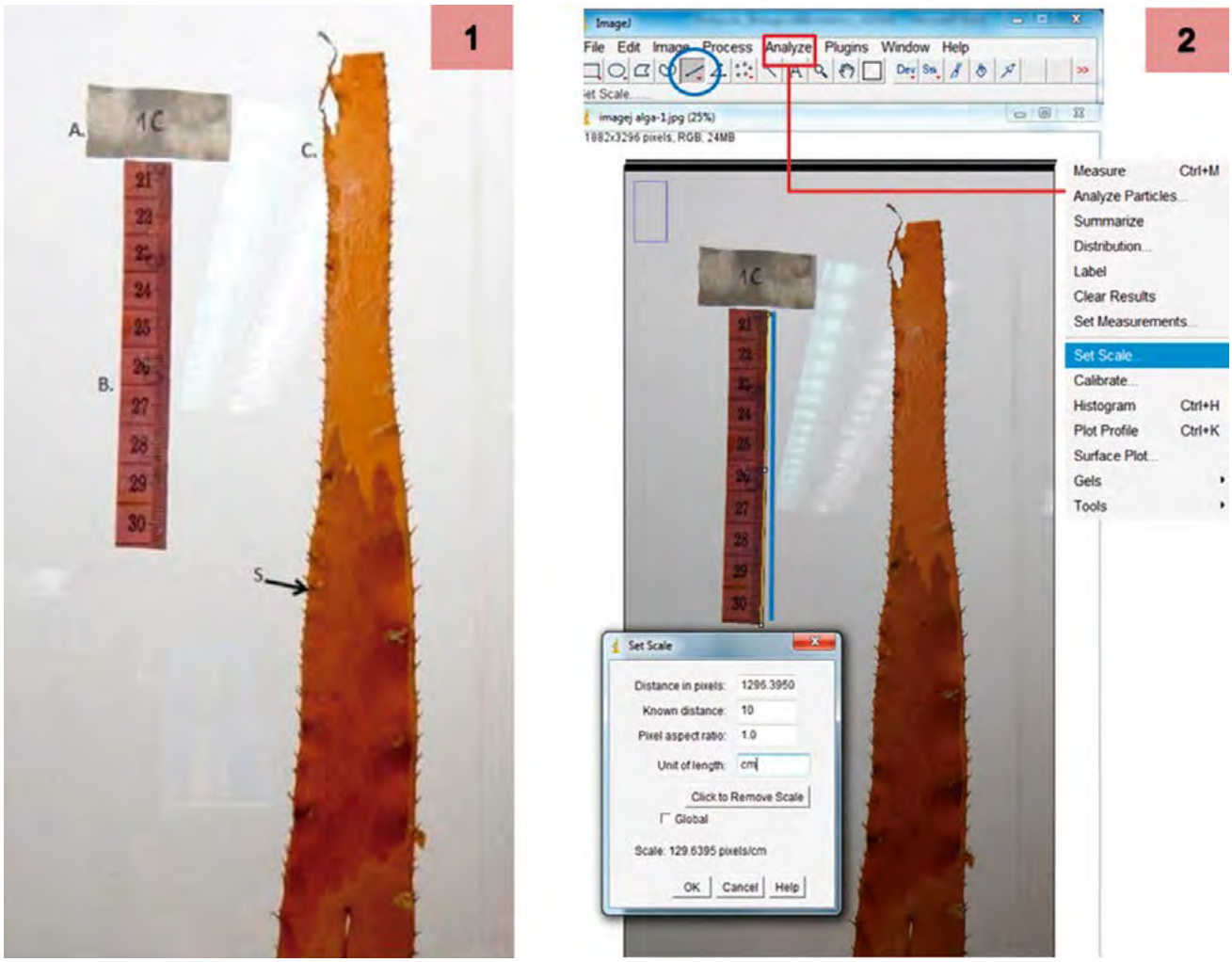
Anexo 2

Muestreo de estructuras reproductivas en macroalgas pardas

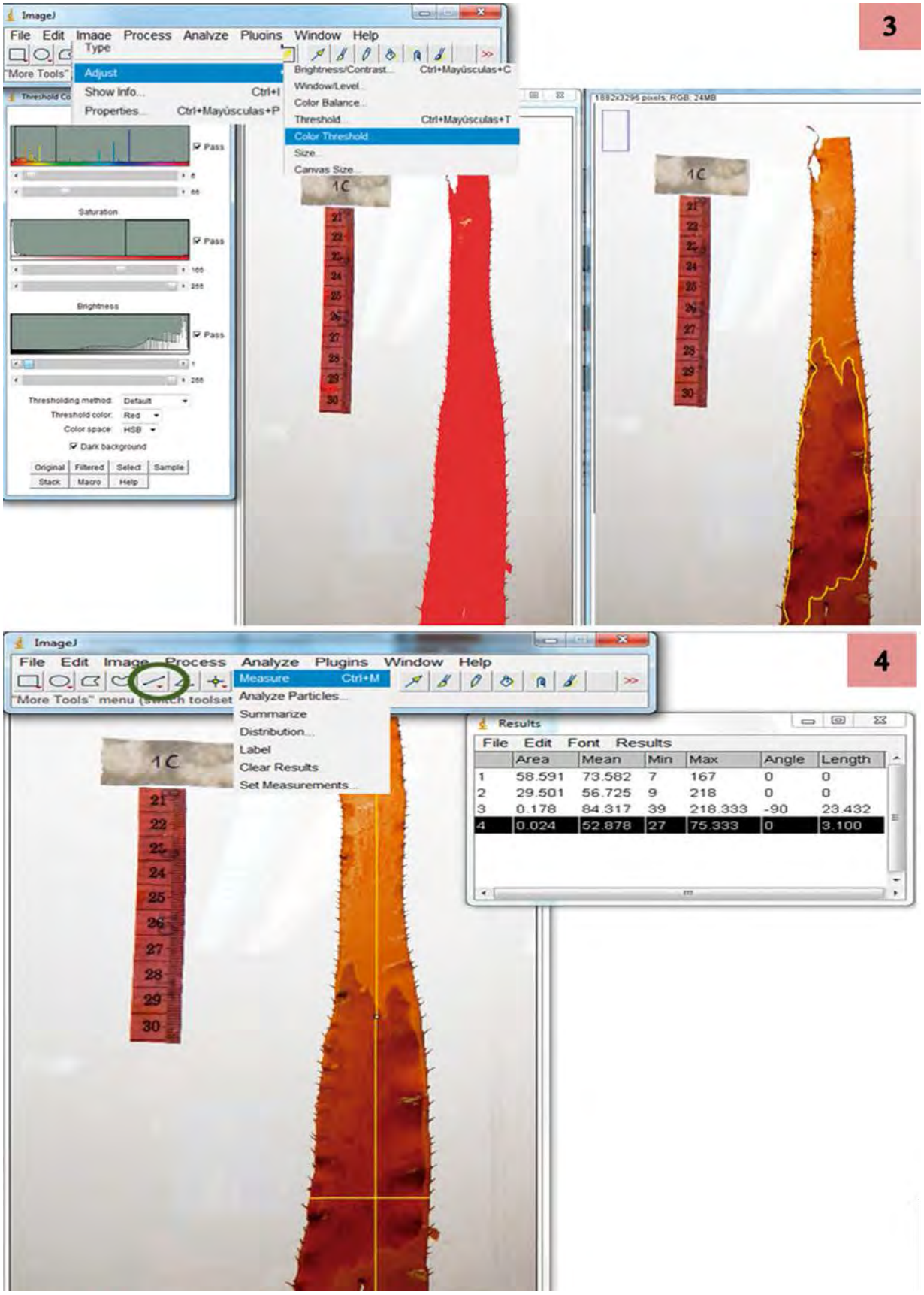
Paso 1. Montaje para fotografía: fotografiar los esporofilos sobre un fondo blanco a contra luz, para mejor visualización del soro**(S).** Tomar en cuenta: **(A)** Código del esporofilo, en esta se indicará el número del esporofilo y a que esporofito pertenece. **(B)** Escala o longitud conocida, necesaria al procesar la fotografía. **(C)** Extender cuidadosamente el esporofilo y fotografiar.

Paso 2. Análisis de la imagen: Si se trabajara con el programa "ImageJ", abrirlo e inmediatamente se mostrará la interfase principal del programa. Para abrir la imagen de interés seleccionar el comando file**>open,** seleccionar el archivo que contiene la imagen a procesar.

Para realizar las mediciones se calibra el programa, para lo cual se requiere de una escala que permita obtener la relación entre cm y pixeles. Pulsar la herramienta **straight** (círculo azul), trazar una recta alrededor de la escala y luego seleccionar **analyze >set scale,** donde se mostrará el cuadro de diálogo **set scale.** Colocar la distancia conocida en el cuadrado **known distance** y la unidad de medida en **unit of length**.



Paso 3. Medición del área total y área del soro: usar secuencialmente el comando **image>adjust>color threshold**, aparecerá el cuadro de dialogo **color threshold.** Luego ajustar los ítems con la finalidad de seleccionar el área deseada, la que se mostrará de color rojo. Finalmente pulsar **select**.



Paso 4. Para la medición de la longitud total y el ancho seleccionar la herramienta **straight,** trazar una línea desde la base hasta el ápice del esporófilo. Luego pulsar el comando **analyze>measure** y se abrirá la ventana **results**, donde se mostrarán las medidas realizadas. Seguir el mismo procedimiento para hallar el ancho del esporofilo**.**

Paso 5. Con los datos obtenidos hallar el porcentaje de cobertura aplicando la siguiente fórmula:

$$\%\text{Cobertura} = \frac{\text{Área del soro}}{\text{Área total}} \text{X}100$$

Presentarlo de la siguiente manera:

Código	Longitud total (X)	Ancho (X)	Área total	Área del esporofilo	% Cobertura
1C	23,432	3,1	58,591	29,501	50,35073646

Anexo 3

Medio Provasoli - PES (McLachlan, 1973 en Oliveira *et al.* 1995)

Reactivos	Soluciones en agua destilada (I)	Volúmenes parciales utilizados
Na_2-glicerofosfato. $5H_2O$	5000 g/100 mL	16,0 Ml
$NaNO_3$	5600 g/150 mL	150,0 mL
Cianocobalamina (Vitamina B12)	0,0100 g/100 mL	1,6 mL
Tiamina	0,1000 g/100 mL	8,0 mL
Biotina	0,0100 g/100 mL	0,8 mL
Tampón – tris (II)	6,5440 g/150 mL	150,0 mL
Fe EDTA: Na_2EDTA (III) +	0,2640 g/500 mL	500,0 mL
Fe $(NH4)_2.6H_2O$	0,2808 g	
P II – mezcla de metales (IV)		500,0 mL
Volumen final de agua destilada (V)		2000,0 mL

Los volúmenes excedentes pueden ser almacenados en congelador

(I) Tris-aminometano. Llevar a pH 7,8 con HCl 5 N

(II) Etilenodiaminotetracetato de sodio

(III) P II - Mezcla de metales

Na_2 EDTA	0,4000 g
H_3BO_3	0,4480 g
$FeCl_3\,6H_2O$	0,0192 g
$MnSO_4.H_2O$	0,0480 g
$ZnSO_4.7H_2O$	0,0088 g
$CoSO_4.7H_2O$	0,0019 g
Agua destilada	500,0 mL

Los metales trazas pueden ser previamente diluidos, mantenidos en congelador y pipeteados conforme dilución.

(I) Subdividir en fracciones pequeñas de acuerdo con la utilización y mantener en congelador. Después del descongelamiento, mantener en el refrigerador para su uso en el intervalo de 15-30 días.

Anexo 4

Conteo y cálculo del número de esporas en estructuras reproductivas en macroalgas pardas

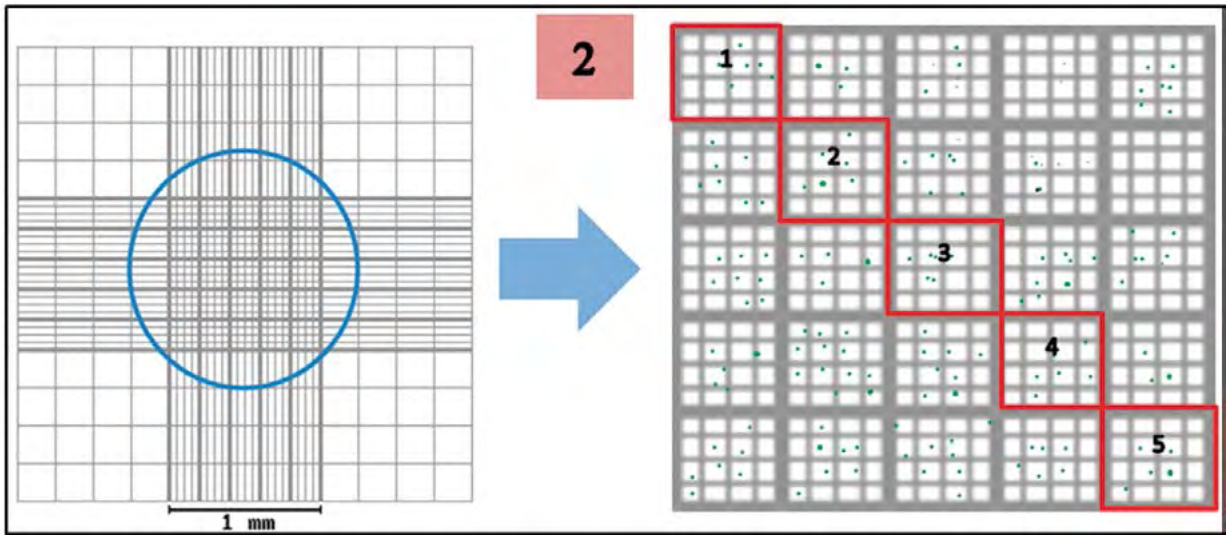
Para determinar el número de esporas por volumen, utilizar un hematocitómetro o cámara de Neubauer y proceder de la siguiente manera:

1. Colocar un cubre objetos sobre la cámara de Neubauer. Tomar una gota del medio con ayuda de una pipeta Pasteur y llenar la cámara con la suspensión de esporas.

2. Colocar la cámara de Neubauer en la platina del microscopio, observar en el aumento conveniente.

3. Observar dos campos de conteo ubicados en la parte superior e inferior de la misma, cada campo presenta 5 cuadrados, que a su vez están divididos por cinco cuadrados más pequeños (círculo azul).

4. Realizar el conteo del contenido de 1, 2, 3, 4 y 5 como se muestra en la figura (cuadrados rojos). Si observa esporas que tocan el límite superior o el límite izquierdo del cuadrado, deben contabilizarse, pero no se contabilizan si tocan el límite inferior o el límite derecho.



5. Con los datos obtenidos calcular el número de esporas por mililitro, el que se hallará multiplicando la media por una constante, la cual depende de la cámara que se utilice. En este caso tendríamos:

Código	**Promedio**	**1C**	**2C**	**3C**	**4C**	**5C**	**Suma**
	1	5	3	3	2	5	18
	2	3	4	3	3	3	16
1c	**3**	5	3	2	5	4	19
						Total	53
						Promedio	17,67

Esporas/mL = 17,67 x constante

Esporas/mL = 17,67 x 25000

Esporas/mL = 4416666,67