



# Manual para el Monitoreo e Identificación de la Microalga Bentónica *Didymosphenia geminata*



Subsecretaría  
de Pesca

Gobierno de Chile



**Manual para el Monitoreo e  
Identificación de la Microalga Bentónica  
*Didymosphenia geminata***

---



## PROPIEDAD INTELECTUAL:

Este documento es propiedad de la Subsecretaría de Pesca, Gobierno de Chile. Su reproducción total o parcial, impresa o en medios electrónicos, está prohibida. Esto incluye edición, transcripción, creación de documentos derivados usando texto e imágenes contenidas en el documento y su distribución en cualquier medio.

## AUTORES:



### **Carolina A. Díaz P.**

Dr. (c) en Ciencias c/m Ecología y Biología Evolutiva, Universidad de Chile.  
Licenciada en Ciencias Ambientales c/m Biología, Universidad de Chile.

Instituto de Ecología y Biodiversidad (IEB)  
Departamento de Ciencias Ecológicas  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile  
e-mail: [cadiaz@haloroundia.com](mailto:cadiaz@haloroundia.com); [cardiaz@uchile.cl](mailto:cardiaz@uchile.cl)  
[www.haloroundia.com](http://www.haloroundia.com)

Directora Ejecutiva  
AMAKAIK Consultoría Ambiental  
e-mail: [cadiaz@amakaik.cl](mailto:cadiaz@amakaik.cl)  
[www.amakaik.cl](http://www.amakaik.cl)



### **Ximena Molina P.**

Dr. (c) Geografía: Gestión Ambiental y Paisaje, Universidad de Barcelona.  
Magister en Cs. Biológicas c/m Ecología, Universidad de Chile.  
Licenciada en Biología, Universidad de Concepción.

Jefe de Proyectos  
POCH Ambiental S.A.  
e-mail: [ximena.molina@poch.cl](mailto:ximena.molina@poch.cl)  
[www.poch.cl](http://www.poch.cl)

Profesora Adjunta  
Escuela de Ciencias Ambientales  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile



### **Vivian Montecino B.**

Profesor Biología y Ciencias, Universidad de Chile.

Profesora Asociada  
Departamento de Ciencias Ecológicas  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile  
e-mail: [vivianmontecino@uchile.cl](mailto:vivianmontecino@uchile.cl)  
[www.ciencias.uchile.cl](http://www.ciencias.uchile.cl)

*Autores*

**Carolina A. Díaz P., Ximena Molina P., Vivian Montecino B.**

*Edición, diseño y diagramación original*

**Cristian Henríquez P.**

*Asistente de edición*

**Úrsula Romero M.**

*Fotografía*

**Carolina A. Díaz P.**

*Diseño e Impresión*

**Mensaje**

**Propuesta metodológica basada en protocolos de la Directiva Marco de Agua, DARES, NIWA, publicaciones de Rick Battarbee, Frank Round, Nora Maidana, Cathy Kilroy y Sarah Spaulding, modificada para los ríos chilenos según juicio de expertos.**

# PRESENTACIÓN

Las aguas continentales, ríos y lagos de Chile, constituyen recursos naturales de excepcional valor tanto por su extraordinaria belleza y biodiversidad como por su importancia económica en la realización de actividades pesqueras recreativas, de acuicultura y como atractivos turísticos de nivel internacional.

Entre nuestros recursos más valiosos se encuentran los lagos y ríos existentes en las regiones sur-austral del país. Los atractivos de varios cursos de agua en estas regiones contribuyen a una creciente actividad turística nacional e internacional y a importantes operaciones de acuicultura que constituyen aspectos centrales en el desarrollo económico de la región.

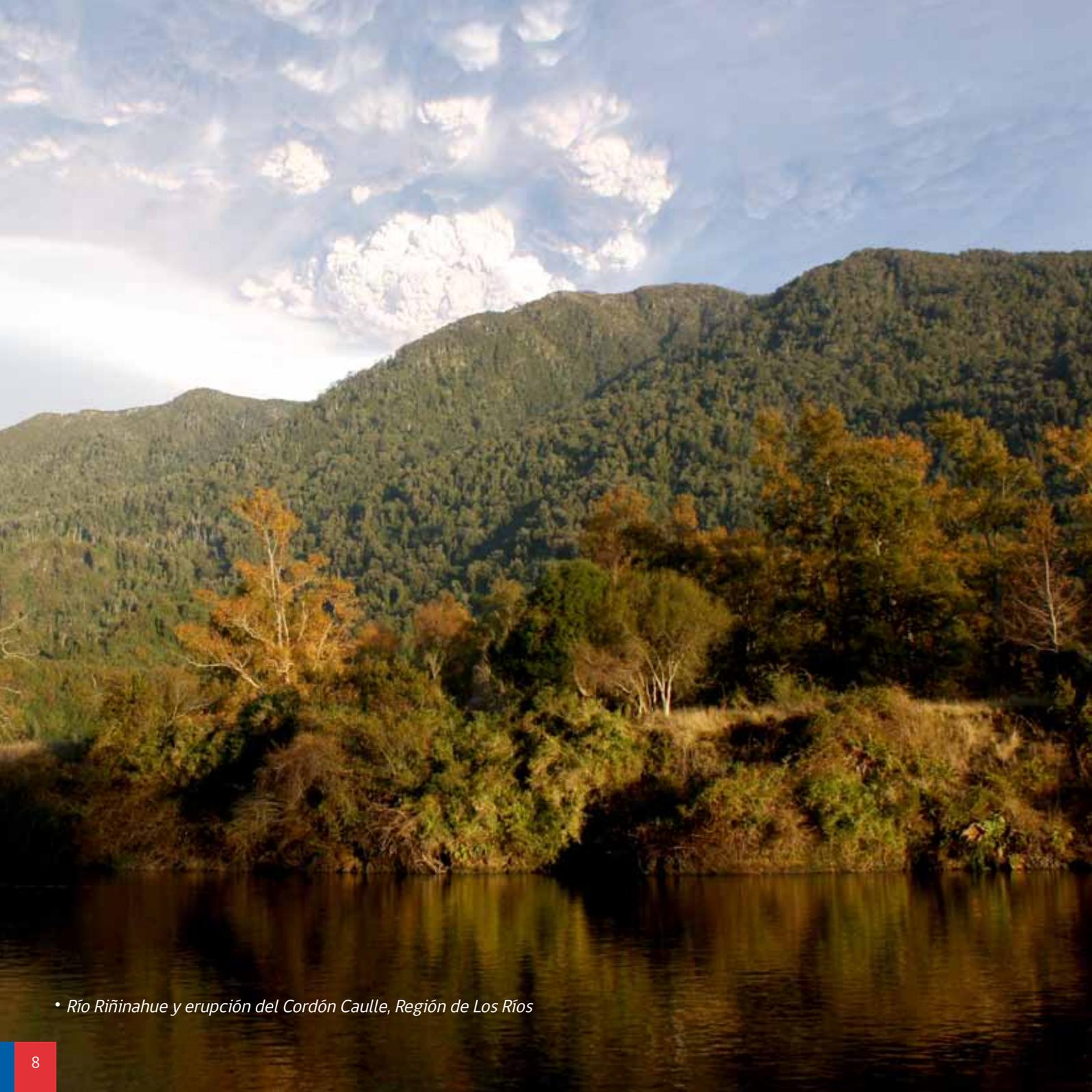
A inicios de 2010, se conoció la presencia de la diatomea bentónica *Didymosphenia geminata* (Didymo) en algunos ríos de la Región de Los Lagos. Esta microalga es un problema ambiental emergente en todo el mundo. La especie es endémica de ríos y lagos en el Hemisferio Norte y ha causado problemas ambientales a la fauna acuática en el Reino Unido, Escandinavia y América del Norte. En las últimas dos décadas se ha extendido fuera de su rango a ríos y lagos de Nueva Zelanda, y ahora en Chile, donde se comporta como una especie invasora.

La cuenca del río Futaleufú y otros recursos lóticos del sur de Chile están siendo afectados por esta plaga. Una vez establecida, Didymo es muy difícil de erradicar, por lo que una de las medidas de control más efectivas es evitar su propagación.

El presente protocolo describe la metodología de toma de muestras en los cuerpos de agua, la preparación y análisis de las muestras, la identificación de *Didymosphenia geminata* y las medidas de bioseguridad para evitar la dispersión del alga nociva durante los muestreos.

Esta Subsecretaría pone este documento a disposición de organismos públicos competentes para ser aplicado en los programas de vigilancia, detección y control de la plaga Didymo, así también a disposición de académicos, empresas consultoras, profesores y estudiantes para su conocimiento y uso.

**Pablo Galilea Carrillo**  
Subsecretario de Pesca, Valparaíso,  
Diciembre de 2011.



• *Río Riñinahue y erupción del Cordón Caulle, Región de Los Ríos*

# PRÓLOGO

*Didymosphenia geminata* (Lyngb.) M. Schmidt 1899 es un alga unicelular bentónica que produce proliferaciones masivas formando una masa de mucílago conocido como Didymo o moco de roca, que cubre extensas áreas sobre sustrato principalmente rocoso, constituyendo una plaga. Las consecuencias de este “moco” en los sistemas acuáticos continentales son de tipo ecológico, estético y económico, mas sin efecto para la salud humana. El alga es nativa del hemisferio Norte, pero en los últimos años se ha propagado representando un problema mundial. En Chile, fue detectada por primera vez en 1962 y no hubo registro de ella sino hasta el verano de 2010 en la cuenca de Futaleufú, Región de Los Lagos, y más tarde en la Región de Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo. Su principal modo de propagación en nuestro país ha sido atribuido a actividades antrópicas recreativas asociadas al turismo, tales como la pesca con mosca, *kayaking* y *rafting*.

Ante la presencia confirmada de Didymo, la Subsecretaría de Pesca (SUBPESCA), de conformidad al D. S. MINECON N° 345 de 2005, Reglamento sobre Plagas Hidrobiológicas (REPLA), declaró los sectores afectados área de plaga. Posteriormente, el Servicio Nacional de Pesca diseñó el correspondiente Programa de Vigilancia, Detección y Control que debe aplicarse en el área plaga. El objetivo del Programa es “controlar la presencia de la microalga *Didymosphenia geminata* y disminuir, al máximo, las probabilidades de su dispersión a otros sistemas de aguas continentales, protegiendo de esta manera áreas de alto valor ambiental y actividades de pesca y de acuicultura que se desarrollan en los mismos”.

La implementación del Programa de Vigilancia, Detección y Control de Didymo, hace necesario un protocolo que determine los lineamientos para un correcto procedimiento de muestreo, identificación de la microalga, desinfección y medidas para controlar su dispersión.

El presente protocolo es producto del estudio “Prospección de la presencia de *Didymosphenia geminata* en las regiones XIV, X, XI y XII y elaboración de material de difusión tendiente a su control”, ejecutado por POCH Ambiental S.A. con participación de investigadores del Departamento de Ciencias Ecológicas de la Universidad de Chile, financiado por la Subsecretaría de Pesca. Este fue sometido a discusión en seminarios y talleres de difusión de resultados del estudio y las observaciones recibidas fueron consideradas en la versión final.

## AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen los aportes de los participantes a los seminarios, talleres y otras instancias de discusión en el desarrollo de la metodología propuesta y la preparación de este protocolo. Agradecen también los comentarios de revisores, académicos de Universidades y Centros de Investigación, Servicios Públicos y de Consultores Ambientales. Mención especial merece la contribución de Cathy Kilroy, National Institute of Water & Atmospheric Research Ltd. NIWA, Nueva Zelanda.



• Río Fuy, Saltos Huilo-Huilo,  
Región de Los Ríos

# CONTENIDOS

<b>1. MUESTREO</b> .....	13
1.1. Selección de sitios de muestreo.....	14
1.2. Materiales del muestreo no biológico .....	15
1.3. Inspección visual de <i>Didymo</i> .....	15
1.4. Actividades en el sitio de muestreo .....	16
1.4.1. Actividades generales.....	16
1.4.2. Georreferencia .....	16
1.4.3. Descripción del sitio de muestreo .....	17
1.5. Muestreo físico y químico .....	17
1.5.1. Parámetros <i>in situ</i> .....	17
1.5.2. Velocidad de la corriente.....	19
1.5.3. Obtención de muestras para análisis químico .....	19
1.6. Muestreo biológico .....	22
1.6.1. Estimación de cobertura de <i>Didymo</i> .....	22
1.6.2. Microalgas planctónicas .....	25
1.6.2.1. Materiales.....	25
1.6.2.2. Obtención de muestras de microalgas planctónicas .....	26
1.6.3. Diatomeas bentónicas .....	27
1.6.3.1. Materiales .....	27
1.6.3.2. Obtención de muestras de diatomeas bentónicas.....	29
<b>2. BIOSEGURIDAD EN MUESTREO</b> .....	31
2.1. Materiales.....	32
2.2. Medidas preventivas .....	33
2.2.1. Segregación de funciones .....	33
2.2.2. Otras medidas preventivas .....	34
2.3. Procedimiento de limpieza y desinfección.....	35
2.3.1. Medidas de desinfección .....	35
2.3.2. Desinfección de equipos de muestreo .....	36
2.4. Desinfección de embarcaciones.....	38
2.4.1. Embarcaciones con motor.....	38
2.4.2. Embarcaciones sin motor .....	39
2.4.3. Formulario de limpieza .....	39
2.5. Consideraciones importantes .....	40
<b>3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS</b> .....	41
3.1. Microalgas planctónicas .....	42

3.1.1. Materiales de laboratorio .....	42
3.1.2. Procedimiento.....	42
3.2. Diatomeas bentónicas y planctónicas: células viables .....	43
3.2.1. Materiales de laboratorio .....	43
3.2.2. Procedimiento .....	43
3.3. Digestión ácida para observación de diatomeas planctónicas y bentónicas .....	43
3.3.1. Equipos y materiales de laboratorio .....	43
3.3.2. Tratamiento de las muestras .....	44
3.3.2.1. Tratamiento pre-digestión de las muestras .....	44
3.3.2.2. Digestión de muestras .....	44
3.3.3. Montaje de preparados permanentes .....	46
3.3.3.1. Dilución de la muestra .....	46
3.3.3.2. Preparados permanentes .....	48
3.3.3.3. Consideraciones importantes .....	50
<b>4. ANÁLISIS MICROSCÓPICO .....</b>	<b>53</b>
4.1. Microalgas planctónicas: recuento de fitoplancton acompañante .....	54
4.1.1. Equipos y materiales de laboratorio .....	54
4.1.2. Identificación taxonómica .....	54
4.1.3. Criterios de cuantificación.....	54
4.1.4. Recuento de microalgas .....	55
4.1.5. Expresión de resultados .....	55
4.2. Diatomeas: recuento de células viables .....	56
4.2.1. Equipos y materiales de laboratorio .....	56
4.2.2. Identificación taxonómica .....	56
4.2.3. Cuantificación.....	56
4.2.4. Recuento de diatomeas .....	56
4.2.5. Expresión de resultados .....	57
4.3. Diatomeas bentónicas y planctónicas: recuento en preparados permanentes .....	57
4.3.1. Equipos y materiales de laboratorio .....	57
4.3.2. Bibliografía recomendada para identificación taxonómica .....	58
4.3.3. Identificación taxonómica de las diatomeas .....	58
4.3.4. Cuantificación .....	59
4.3.5. Recuento de diatomeas .....	59
4.3.6. Expresión de resultados .....	60
<b>5.- IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Didymosphenia geminata</i> (LYNGBYE) M. SCHMIDT 1899 .</b>	<b>61</b>
<b>6.- REFERENCIAS .....</b>	<b>65</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>67</b>



# 1. MUESTREO

• *Río Futaleufú, Región de Los Lagos*

## 1.1. Selección de sitios de muestreo

La selección de los sitios de muestreo (Fig. 1) se realiza bajo las siguientes consideraciones:

- Seleccionar sitios de desarrollo de actividades antrópicas consideradas como posibles vectores de *Didymo*, tales como las actividades de pesca recreativa, deportiva y turística, deportes acuáticos como *kayaking* y *rafting*, etc.
- Observar características hidráulicas, físicas y químicas, que podrían ser críticas para la floración y proliferación de *D. geminata*.
- Zonas de vulnerabilidad ambiental, como por ejemplo descargas de residuos.
- Accesibilidad del tramo y sitio de muestreo bajo condiciones de seguridad.
- Condiciones de terreno favorables para las actividades de muestreo, como por ejemplo tipo de sustrato (rocoso), profundidad (somera), etc.
- Selección del punto de muestreo preferentemente aguas arriba y aguas abajo de afluentes de mayor importancia en cada río para inferir presencia o ausencia de *D. geminata* en estos afluentes no muestreados.
- Representatividad de los distintos hábitats del río, diferenciando las zonas rítrónicas, medias y potámicas.



Figura 1. Selección de sitios de muestreo.

## 1.2. Materiales del muestreo no biológico

- GPS: para georreferenciar el sitio de muestreo. Se recomienda la utilización de un equipo con barómetro de calibración automática para medir altitud con mayor precisión.
- Electrodo para medir conductividad, pH, oxígeno, temperatura.
- Soluciones de calibración para electrodos: se recomienda pH 4,7 y 10.
- Huincha métrica de 50 m de longitud.
- Flujómetro para determinar la velocidad de la corriente. Como alternativa es frecuente el uso de derivadores para medir la velocidad superficial, como medida estimativa.
- Fichas de terreno diseñadas según el muestreo.
- Cámara fotográfica: para registrar todos los aspectos del punto de muestreo y el sitio de recolección de las muestras.
- Frascos plásticos para análisis químicos: este material lo debe entregar el laboratorio encargado de realizar dichos análisis.
- Contenedores aislantes para transporte de frascos: las muestras deben transportarse manteniendo la cadena de frío (4°C), por lo que se debe proporcionar algún medio para cumplir este requisito. En lo posible los contenedores deben contar con control de temperatura, para su registro en la cadena de custodia (proporcionada por el laboratorio de análisis).
- Materiales para obtención de muestras biológicas según lo especificado en el ítem 1.5 "Muestreo Biológico", perteneciente a este mismo capítulo.
- Vestuario e implementos de seguridad según lo descrito en el capítulo 2. "BIOSEGURIDAD EN MUESTREO".

## 1.3. Inspección visual de Didymo

Bajo el cumplimiento de las consideraciones expuestas en el ítem 1.1 "Selección de sitios de muestreo", en todo programa de prospección se debe realizar primeramente una inspección visual del área a muestrear con el objetivo de observar la presencia de Didymo a nivel macroscópico o como "moco". Para ello, se recorre el área en busca de indicios de la presencia de esta alga en los sustratos rocosos (Fig. 2. a-b) o en la vegetación ribereña, tal como se ilustra en el ítem 1.6.1 "Estimación de cobertura de Didymo". Esta inspección también se realiza como criterio para seleccionar los puntos de muestreo. Sin embargo, para los planes de seguimiento esta etapa del procedimiento se realiza de manera independiente, sin ser utilizada para la selección de punto de muestreo.



Figura 2 (a-b). Inspección visual de Didymo.

## 1.4. Actividades en el punto de muestreo

### 1.4.1. Actividades generales

- Una vez seleccionado el sitio de muestreo, teniendo en cuenta capturar la variabilidad del mismo, se debe medir un tramo representativo de aproximadamente 50 m paralelo al río. El inicio y fin del tramo debe ser georreferenciado.
- Como indica la figura 3, al interior de este tramo, se establecen transectos dispuestos de forma perpendicular a la ribera, en los que se estima cobertura de Didymo, según el aspecto visual. Estos transectos deben estar distanciados unos metros según la accesibilidad al sitio de muestreo. La profundidad de la columna de agua no debe superar los 0,6 m, con tipo de sustrato rocoso adecuado para el desarrollo de Didymo. En cada transecto se describe: la presencia o ausencia de masa mucilaginoso, el aspecto del mucílago y textura al tacto (descrita para Didymo como áspera y semejante a algodón). Si se detecta la presencia de masa mucilaginoso se estimará su cobertura (%), la que debe posteriormente ser confirmada por el análisis microscópico. El método para caracterizar y estimar cobertura se describe en el ítem 1.6.1. "Estimación de cobertura de Didymo".
- Se realizan diversas observaciones útiles para caracterizar el sitio de muestreo dirigida a la prospección de *D. geminata*. Ésta se realiza completando una ficha de terreno, previamente diseñada, de formato estándar que se aplica a todos los sitios de muestreo de la campaña, tal como se indica en el ítem 1.4.3.
- En el sitio de muestreo se realiza la medición de las variables, estimación de parámetros y recolección de muestras, para el análisis físico, químico y biológico, según corresponda.
- Cada sitio de muestreo es registrado visualmente por medio de fotografías.

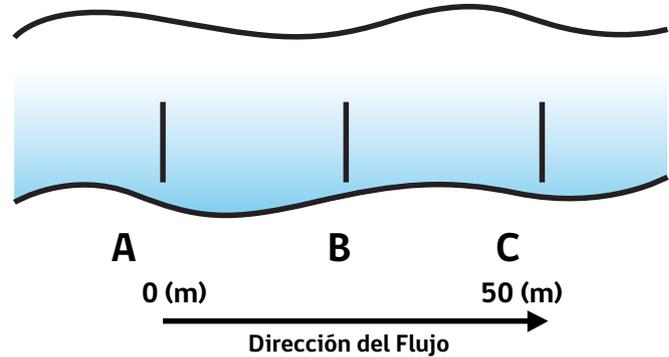


Figura 3. Esquema para delimitar la inspección visual de Didymo (transectos A, B, C)

### 1.4.2. Georreferencia

El punto de obtención de muestras debe estar georreferenciado (Fig. 4). Cada registro, aunque se encuentre en la memoria del instrumento debe ser anotado en la ficha de muestreo correspondiente. Esta información es usada para la elaboración de la cartografía.



Figura 4. Georreferenciación

### 1.4.3. Descripción del sitio de muestreo

En cada sitio de muestreo se deben realizar observaciones para caracterizar el sitio, las que deben ser registradas en una “Ficha de terreno” (ver anexo, pág. 69). Ésta reúne antecedentes de tipo hidromorfológicos, ecológicos y ambientales.

Cada ficha de terreno debe incluir información que pueda ser relevante para la caracterización del sitio, que sea un aporte a la etapa de análisis taxonómico y de interpretación de los resultados. Se incluyen al menos los siguientes ítems: nombre del proyecto, profesional responsable de la toma de muestra, lugar de muestreo, nombre o código que identifique el punto de muestreo, tipo de muestra, fecha, hora, georreferencia, altitud, presencia o ausencia de Didymo según inspección visual, tipo de hábitat y observaciones sobre conexión de los ríos con otros sistemas acuáticos, afluentes, ancho del río, profundidad, tipo y tamaño de sustrato del lecho del río, etc. Además, se deben anotar todos los valores de los parámetros físicos y químicos registrados *in situ*, los volúmenes de las muestras de bentos y/o de plancton según sea el caso, el área de la cual se obtuvo la muestra de bentos y el tiempo de recolección de la muestra de plancton.

## 1.5. Muestreo físico y químico

### 1.5.1. Parámetros *in situ*



Figura 5 a: calibración de pHímetro



Figura 5 b: registro de pH



Figura 5 c: medición de conductividad



Figura 5 d: oxígeno disuelto y % de saturación

### 1.5.1. Parámetros *in situ*

La toma de muestras biológicas en un sistema acuático, debe ser acompañada de la obtención de los parámetros *in situ* (Fig. 5 a -d), a modo de tener el contexto físico y químico en el que el factor biótico objeto de estudio se desarrolla.

Se considera fundamental contar al menos con registros de Temperatura, pH, Conductividad, Oxígeno Disuelto y % de Saturación de Oxígeno. Para ello, en el mercado existen equipos para realizar estas estimaciones, que van desde sondas multiparamétricas a equipos simples. Deben ser equipos adecuados para el trabajo de terreno, rápidos y precisos, con compensación de temperatura (ATC). Los electrodos deben ser permanentemente calibrados (Fig.5 a; siempre antes de cada utilización) y mantenidos con las soluciones de almacenaje respectivas.

En la Tabla 1 se especifican los parámetros a determinar *in situ* y a continuación de ésta se entregan algunas recomendaciones asociadas a los parámetros más importantes.

**Tabla 1. Parámetros determinados *in situ***

Parámetro	Metodología y ejemplo de equipos
pH	Potenciométrica, equipo multiparámetro Rango de pH: 0,0 - 14,0; Resolución 0,01; Precisión $\pm 0,02$ .
Conductividad eléctrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	Potenciométrica, equipo multiparámetro Rango de CE: 0 - 3.999 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; Resolución 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; Precisión $\pm 2\%$ F.S.
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Equipo multiparámetro Rango de Temperatura 0,0 - 60,0 $^{\circ}\text{C}$ ; Resolución 0,1 $^{\circ}\text{C}$ ; Precisión $\pm 0,5\%$ $^{\circ}\text{C}$ .
Oxígeno disuelto (mg/l)	Equipo oxígeno metro. Resolución 0,1 %/0.01 mg/L $^{\circ}\text{C}$ ; 0,1 $^{\circ}\text{C}$ ; Precisión $\pm 1,5\%$ F.R.; $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Rango: 0.00 a 300 %; 0.00 a 45 mg/L.

- **pH:** preferir equipo de alta precisión con medidor de temperatura y compensación automática, resistente a la contaminación por sales y otras sustancias que toman contacto con el electrodo. Para su calibración se deben seleccionar buffers de pH 4,01; pH 7,01 y pH 10,01. Para su correcta calibración usar el manual correspondiente al modelo disponible. Anote en la ficha de registro la fecha y hora de calibración.
- **Conductividad eléctrica:** preferir equipo de alta precisión con medidor de temperatura y compensación automática. Tenga cuidado de usar un equipo con el rango adecuado en CE de 0 a 3999 ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). Para su correcta calibración usar el manual correspondiente al modelo en uso, que especifica el electrodo para la solución de calibración correspondiente, como por ejemplo de 1413 ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). Anote en la ficha de registro la fecha y hora de calibración.
- **Oxígeno disuelto:** preferir equipo de alta precisión con medidor de temperatura y compensación automática de altura y salinidad. Calibración automática de temperatura del aire. Elija instrumentos que posean cubierta protectora para la membrana. Para su correcta calibración usar el manual correspondiente al modelo disponible, que especifica además los cuidados y cambios de la membrana. Anote en la ficha de registro la fecha y hora de calibración.

*RECOMENDACIÓN: después de la estimación de los parámetros in situ en cada estación de muestreo, se debe aplicar el procedimiento de remoción y lavado de cada electrodo para su desinfección, siguiendo las instrucciones detalladas en el capítulo 2. Después de aplicar la solución de desinfección a los electrodos estos deben ser lavados con agua destilada y posteriormente mantenidos en la solución adecuada, se indique el manual respectivo.*

### 1.5.2. Velocidad de la corriente

La velocidad de la corriente de un río se considera como la distancia (expresada en metros) recorrida por una partícula, por unidad de tiempo (expresada en segundos). Entendiendo como partículas al plancton, la velocidad de la corriente debe ser estimada en el punto de muestreo para calcular el tiempo que debe permanecer sumergida la red de plancton, o bien, si el tiempo es constante para todos los puntos de muestreo, para conocer posteriormente el tramo del río (distancia en metros) que ha sido muestreada. Esta velocidad puede ser idealmente estimada mediante instrumentos como el “flujómetro” o mediante derivadores flotantes registrando el tiempo gastado en recorrer una distancia conocida. Además se debe registrar la profundidad de la sección comprometida en el muestreo, para junto a la velocidad registrada del tramo determinado, estimar el caudal.

### 1.5.3. Obtención de muestras para análisis químico

Idealmente, se deben tomar muestras para un amplio número de variables químicas (Fig. 6 a-b), entre las que se deben considerar al menos: composición iónica, nutrientes, sílice y turbidez (variable física, pero con determinación en laboratorio junto con los análisis químicos). El número y tipo de muestras a coleccionar va a depender exclusivamente de los objetivos del estudio y de los recursos disponibles para ejecutarlos. Sin embargo, las variables químicas mencionadas son las mínimas a considerar en un plan de vigilancia según indique el programa de vigilancia de *D. geminata*. Éstas deben ser revisadas y evaluadas periódicamente, a modo de disponer de una mayor base de datos para la interpretación de resultados.

El procedimiento para la obtención de las muestras de agua debe ser llevado a cabo bajo metodologías estandarizadas disponibles en el país, las cuales especifican claramente

cada paso a seguir. Estas son las siguientes: NCh 411/1 relacionada con programas de muestreo; NCh-ISO 411/2 del muestreo de aguas superficiales; NCh-ISO 411/3 de preservación de las muestras; NCh-ISO 411/6 específica para muestreo de ríos. Se destaca el transporte bajo cadena de frío (4°C) al laboratorio para su posterior análisis, los requerimientos metodológicos para cada analito, completar la cadena de custodia, la cual debe ser entregada al laboratorio. La cadena de custodia registra toda la información necesaria para identificar cada muestra ingresada al laboratorio, documento que es proporcionado por el laboratorio de análisis correspondiente. Es recomendable elegir laboratorios químicos que posean acreditación a la NCh-ISO 17025 (normativa sobre requisitos para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, INN-Chile) y conocer el límite de detección de los análisis.

*IMPORTANTE: los sistemas fluviales son altamente variables y heterogéneos, lo que genera una incertidumbre para la actividad de muestreo. Por esta razón, el muestreo debe realizarse siguiendo rigurosos procedimientos metodológicos, a fin de que los datos obtenidos puedan finalmente ser útiles para el estudio en desarrollo y sean comparables espacial y temporalmente.*



Figura 6 a-b. Obtención de muestras para análisis químico.



• *Didymo, moco de roca, cubriendo vegetación litoral en río Espolón*

## 1.6 Muestreo biológico

### 1.6.1. Estimación de cobertura de Didymo

En cada transecto, según lo especificado en el ítem 1.4.1. "Actividades generales", la estimación de cobertura se realiza visualmente según las siguientes 5 categorías basadas en el color y grosor.

- **Categoría 1:** no observado.
- **Categoría 2 (Fig. 7a y 7b):** células formando colonias de pequeño tamaño (2-10 mm). Corresponde a un crecimiento inicial, cuyo desarrollo alcanza unos pocos milímetros, y se visualizan las colonias de un color pardo.
- **Categoría 3 (Fig. 7c y 7d):** expansión de la colonia entre un 10 y 30 %. Puede cubrir el sustrato de rocas individuales completamente por medio de parches, las colonias coalescen y el grosor aumenta a unos pocos centímetros.
- **Categoría 4 (Fig. 7e a 7g):** proliferación dominante mayor a 30 % y hasta un 80 % de cobertura. El pie de mucílago aumenta varias veces su longitud, presentando una menor proporción de células respecto de éste. Puede tomar aspecto de papel mojado en condiciones de sequedad.
- **Categoría 5 (Fig. 8a a 8f):** cobertura completa de más de un 80 % del lecho del río. Se observa un envejecimiento de la colonia, donde incluso las células pueden morir persistiendo el mucílago sobre el sustrato del río hasta un par de meses. También estas masas mucilaginosas pueden encontrarse sobre el sustrato o vegetación ribereña de manera aislada.

La presencia de floraciones de *D. geminata*, se reconoce por su gran desarrollo mucoso, que llega a cubrir grandes extensiones de sustrato principalmente rocoso. En algunos casos, la observación se realiza cuando el crecimiento consiste aún en células individuales, no siendo posible la distinción a simple vista. Mientras que, registrar mucílago sobre el sustrato rocoso no siempre está relacionado con *Didymo*, ya que otras especies de diatomeas pueden formar estructuras mucilaginosas macroscópicas similares a ésta (ver ítem 5), llegando a confundir estadios de desarrollo tardíos de mucílago de otras diatomeas con estadios tempranos de *Didymo*. Por estas razones, es fundamental realizar un análisis microscópico para confirmar que se trata de *D. geminata*.

Variadas formas en las que *Didymo* puede ser observado macroscópicamente, se ilustran en las siguientes figuras (Fig. 7 y Fig. 8).



Figura 7: Estimación de cobertura de *Didymo*.



Figura 7 a: categoría 2.



Figura 7 d: categoría 3.



Figura 7 b: categoría 2.



Figura 7 e: categoría 4.



Figura 7 c: categoría 3.



Figura 7 f: categoría 4.



Figura 7 g: categoría 4.

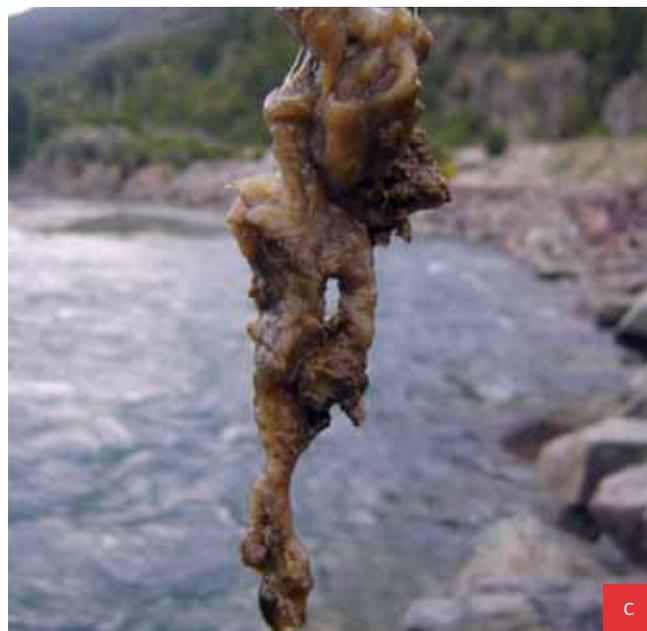


Figura 8 c: categoría 5.



Figura 8 a: categoría 5.



Figura 8 b: categoría 5.

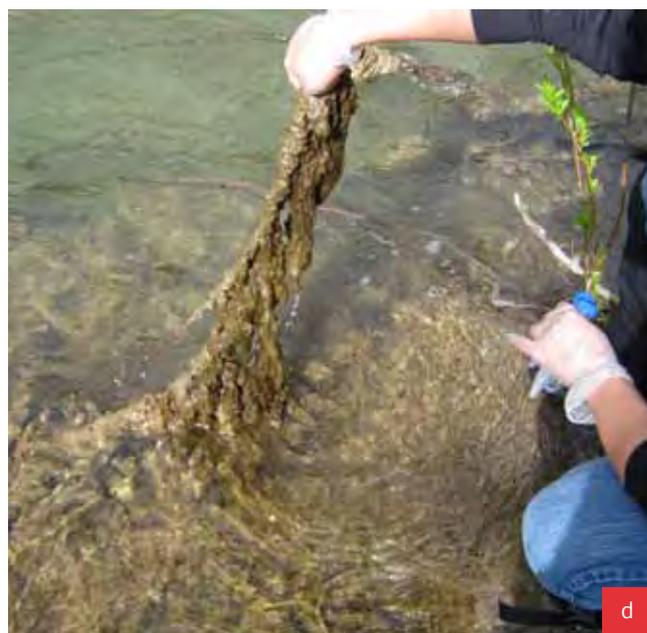


Figura 8 d: categoría 5.



Figura 8 e: categoría 5.



Figura 8 f: categoría 5.

## 1.6.2. Obtención de muestras de microalgas planctónicas

### 1.6.2.1. Materiales

- **Sistema de muestreo:** consiste en una red de fitoplancton adaptada específicamente para muestreo de *Didymo* (Fig. 9). Tal como se observa en la figura 13, este sistema consta de una red (cono receptor) de 40 micrones de malla, protegida en el extremo superior por una malla de 250 micrones para evitar el ingreso de partículas de gran tamaño y en el extremo inferior por una malla de 40  $\mu\text{m}$ . Esta última se encuentra retenida entre dos tubos de PVC con rosca, cuyo fin es mantener la malla tensa y firme durante el muestreo y de esta forma llegar a retener una cantidad representativa de fitoplancton. Toda esta estructura se fija a una profundidad adecuada bajo el agua, mediante una barra de metal que permanece enterrada en el lecho del río.



Figura 9: Red de fitoplancton

- **Fascos:** los frascos deben ser plásticos, con contratapa (Fig. 10), y no se requiere que sean esterilizados. NO UTILIZAR MATERIAL USADO EN MUESTREOS PREVIOS. Además, para asegurar el cierre hermético de estos, se sugiere utilizar Parafilm® o cinta adhesiva para evitar posibles filtraciones.

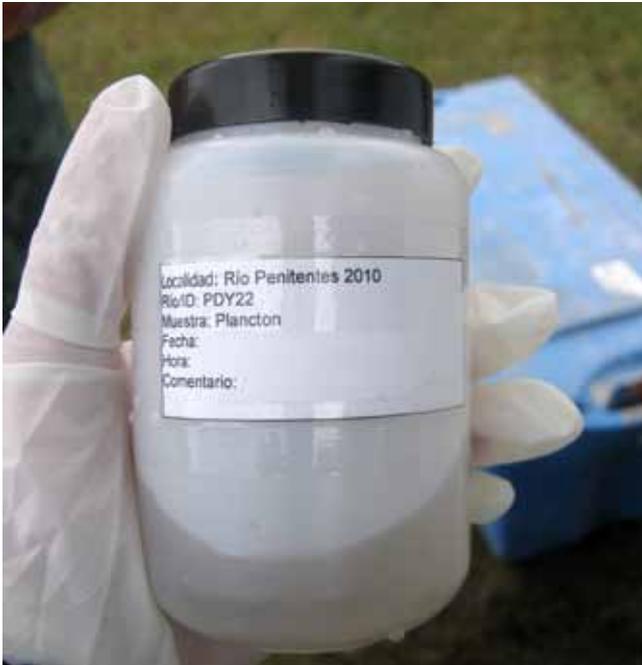


Figura 10. Frascos fitoplancton.

- **Fijador:** la muestra debe ser fijada de inmediato para detener la reproducción y la descomposición de las microalgas y el resto de contenido orgánico presente en la muestra. Para ello, se agregan unas gotas de Lugol (Fig. 11), que es el fijador menos agresivo para la conservación de células frágiles. Generalmente es necesario que las muestras sean re-fijadas, dependiendo del tiempo que tomará su análisis en el laboratorio.



Figura 11. Fijación de muestra de fitoplancton.

- **Rótulo para muestras:** se deben utilizar marcadores permanentes o etiquetas resistentes al agua. Se sugiere llevar el material ya rotulado desde el laboratorio. La etiqueta debe tener un código que represente, o que especifique el lugar de muestreo o proyecto, punto de muestreo, número de réplica, tipo de muestra, fecha y hora.

### 1.6.2.2. Muestreo de microalgas planctónicas



Figura 12 a. red de plancton con boya para la obtención de muestra de fitoplancton.



Figura 12 b. Obtención de muestra de microalgas planctónicas.

El objetivo de este análisis, además de capturar las células en deriva de *D. geminata*, es conocer el fitoplancton acompañante de Didymo en busca de establecer patrones que expliquen su distribución.

La red de fitoplancton (Fig. 12 a-b y Fig. 13) se debe suspender contra la corriente durante al menos 10 minutos, teniendo presente que el tiempo de muestreo depende de la velocidad de la corriente estimada en cada punto de muestreo. Más detalles en el ítem 1.5.2: “Velocidad de la corriente”; por lo anterior, se fija en su extremo posterior, un flotador.

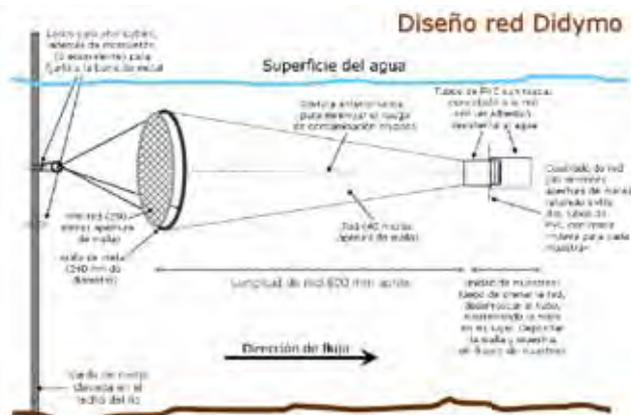


Figura 13. Esquema de red de muestreo de fitoplancton, diseñada específicamente para muestreo de Didymo.

Es importante que el cono recolector de la red quede completamente sumergido y a una distancia apropiada del fondo para no coleccionar parte del bentos y del sedimento que arrastra la corriente en las zonas más profundas.

La pequeña malla de 40 micrones que captura el plancton, retenida entre las dos piezas de PVC que se encuentran al final del cono, es depositada en un frasco plástico, debidamente etiquetado y con contratapa. La muestra debe quedar sumergida en agua del mismo río para que las gotas de Lugol, utilizadas como fijador inmediatamente después de obtenida la muestra, puedan actuar en todas las células colectadas por la red.

### 1.6.3. Diatomeas bentónicas

#### 1.6.3.1. Materiales

- Sistema de muestreo:** si se realiza en sustrato rocoso (o cualquier otro sustrato no sedimentario), se requiere extraer las diatomeas de un área conocida, para lo que se necesita un instrumento que permita realizar un barrido de la superficie (cepillo, espátula, bisturí, etc.) y una cuadrícula limitando el área a barrer. También se puede diseñar un instrumento que incorpore ambos elementos como constante. Para el muestreo directo de floraciones de Didymo se recomienda la utilización de un objeto que permita obtener directamente un volumen conocido de la muestra que contenga el alga, tal como una jeringa despuntada (Fig. 14).

**IMPORTANTE:** en lo posible, se debe utilizar MATERIALES DESCARTABLES, para evitar la contaminación de muestras y/o la propagación de Didymo. De no ser posible, se recomienda utilizar materiales de fácil desinfección.



Figura 14. Materiales utilizados para recolectar muestras bentónicas.



Figura 15. Tubo para muestra de diatomeas bentónicas.

- **Fascos o tubos:** los frascos o tubos para contener las muestras deben ser plásticos y no se requiere que estén esterilizados (Fig. 15). NO UTILIZAR MATERIAL USADO EN MUESTREOS PREVIOS. Para la obtención de muestras con el método de raspado se recomienda la utilización de frascos de 250 ml (igual a los utilizados para contener las muestras planctónicas), ya que es más cómodo para enjuagar el cepillo con el que se obtiene la muestra de la superficie. En cambio, para las muestras de floraciones de *Didymo*, se sugiere la utilización de los mismos tubos graduados que se usan en el laboratorio para el posterior tratamiento de digestión ácida de la muestra: polipropileno, 15 ml, graduados, punta cónica y tapa rosca. Utilizar los mismos tubos evitará la pérdida de muestra entre ambas etapas y facilitará el procedimiento de digestión. Además, para asegurar el cierre hermético de los frascos o tubos, se sugiere utilizar Parafilm® o cinta adhesiva para evitar posibles filtraciones.
- **Fijador:** la muestra debe ser fijada para detener la reproducción y descomposición de las diatomeas y del resto del contenido orgánico de la muestra. Se recomienda fijar la muestra con Formaldehído al 4%, ya que éste es un fijador eficaz y permite guardar la muestra sin adicionar más cantidad de él por largo tiempo. Etanol al 70% o Lugol son también una alternativa, pero de menor eficacia. Se sugiere utilizar guantes y micropipeta apropiados para esta etapa.
- **Rótulo para muestras:** se debe utilizar marcadores permanentes o etiquetas resistentes al agua. Se sugiere llevar el material ya rotulado desde el laboratorio. La etiqueta debe tener un código que represente, o que especifique el lugar de muestreo o proyecto, punto de muestreo, número de réplica, tipo de muestra, fecha y hora.

### 1.6.3.2. Obtención de muestras de diatomeas bentónicas

**Sustrato:** El sustrato a lo largo del río no es homogéneo y las comunidades de diatomeas asociadas a los distintos tipos de sustrato varían considerablemente. Razón por la que se recomienda muestrear siempre en el mismo tipo de sustrato, de hecho, se sugiere como muestreo regular en sistemas lóticos, la colecta en sustratos rocosos (Fig. 16 y Fig 17 a-b) y siempre protegido de la corriente. En el caso particular de búsqueda de *D. geminata*, que es una eficiente colonizadora de sustratos rocosos debido a que produce un pie mucilaginoso para mantenerse adherida al sustrato y resistir eficazmente la velocidad de la corriente, se recomienda siempre obtener muestras de diatomeas epilíticas, a menos que esto no sea posible por el desarrollo excesivo de la floración. Si el muestreo se realiza en sustratos diferentes, se debe considerar en el análisis de los datos (ficha de muestreo). Entre estas alternativas, se encuentran las siguientes: diatomeas epipéllicas, asociadas a los sedimentos y generalmente de vida libre; diatomeas episámnicas, que viven asociadas a granos de arena y para ello tienen formas aplanadas y ligeramente curvadas que les permiten adherirse con mayor facilidad a estos pequeños sustratos; diatomeas epifíticas, que viven adheridas a otras algas y/o animales (sustrato en el cual *D. geminata* ha sido colectada en otros países).

**Obtención de la muestra:** se deben extraer todas las algas de un área conocida (y, en lo posible, constante) de una roca (epilíton). En el caso de floraciones, se debe extraer 1 cm<sup>3</sup> de la mucosidad, según especificaciones del punto 1.6.3.1. En ambos casos, la muestra debe ser fijada con Formaldehído al 4 %.

Idealmente, cada unidad de área o volumen muestreado corresponde a una réplica. Sin embargo, puede obtenerse



Figura 16. muestreo de diatomeas bentónicas-área

una o más muestras integradas para disminuir el tiempo de análisis sin sacrificar variabilidad. De esta manera, pueden juntarse las algas colectadas de varias unidades de área o de volumen, provenientes de distintas rocas dentro de la zona de muestreo.

Para esta toma de muestra se utilizan preferentemente tubos de 15 ml, para realizar en ellos directamente la digestión ácida en laboratorio. Cada tubo debe ser debidamente etiquetado como se indica en el punto 1.6.3.1.

*IMPORTANTE: se recomienda muestrear siempre el mismo tipo de sustrato, en zonas protegidas de la corriente y no sombreadas natural o artificialmente. No tomar muestras en zonas intervenidas (extracción de áridos, puentes, descargas, etc.), a menos que se considere relevante y de acuerdo con la pregunta de estudio. Se deben obtener todos los detalles posibles de la etapa de toma de muestras, para lo que resulta fundamental llenar una ficha para cada punto de muestreo y fotografiar el área. Además, se sugiere que el material de muestreo sea totalmente descartable para evitar el riesgo de una posible contaminación pese a la desinfección de dicho material.*



Figura 17 a-b. Muestreo de diatomeas bentónicas: volumen.

An aerial photograph of a wide river valley in autumn. The river flows through the center, surrounded by hillsides covered in trees with vibrant orange, red, and yellow foliage. In the distance, rugged mountains with patches of snow are visible under a clear sky. A small cluster of buildings is situated on the left bank of the river.

## 2. BIOSEGURIDAD EN MUESTREO

• Río Cáceres, Región de Aysén

## 2.1. Materiales (Fig. 18)

- Agua: preferentemente potable, en grandes cantidades para preparar soluciones de desinfección. El agua del mismo río puede servir en caso de no contar con agua potable, pero no es recomendable.
- Agua destilada: para enjuagar electrodos.
- Sal: para la solución de desinfección.
- Cloro: para la solución de desinfección.
- Lavalozas: para la solución de desinfección.
- Recipiente plástico: para preparar la solución y realizar la desinfección de los implementos de mayor tamaño.
- Pissetas plásticas: para preparar solución y desinfectar los instrumentos utilizados, tales como electrodos. También con agua destilada para enjuagar estos instrumentos previamente desinfectados.
- Pulverizador: para limpieza y desinfección de neumáticos.



Figura 18 a: cloro, recipiente plástico, escobilla plástica y pulverizador.



Figura 18 b: tanque plástico con agua.



Figura 18 c: tanque plástico, cloro y sal.

## 2.2. Medidas preventivas

Para la ejecución del muestreo se deben tomar acciones tendientes a evitar la propagación de *Didymo*. Se recomiendan las siguientes medidas:

### 2.2.1 Segregación de funciones

En el equipo de terreno todas las actividades relacionadas que no requieran contacto directo con el agua (parte seca del equipo), deben ser realizadas por parte profesionales distintos de los que realizarán la obtención de las muestras (parte húmeda). Esto significa que hay dos grupos con funciones diferenciadas en el muestreo para evitar los riesgos de contaminación (Fig. 19).



Figura 19. Segregación de funciones. Izquierda: equipo seco, derecha: equipo húmedo.

#### Funciones del equipo seco:

- Provee y recibe los instrumentos y las muestras.
- Completa la ficha de terreno.
- Registra toda la información obtenida *in situ*.
- Realiza la georreferenciación del sitio de muestreo.
- Calcula los tiempos de duración de los procedimientos.
- Prepara el material, antes y después del muestreo, tal como: revisa el material, etiqueta frascos, sella, fija las muestras, se encarga de la mantención de cadena de frío y adecuado transporte de la muestra.
- Debe utilizar guantes descartables.

#### Funciones del equipo húmedo:

- Obtención de muestra química.
- Determinación de parámetros obtenidos *in situ*.
- Recolección de material biológico bentónico y planctónico.
- Realiza toda actividad que requiera tomar contacto con el agua y eventualmente con *Didymo*.
- Debe usar guantes descartables.
- Se recomienda la utilización de chaleco salvavidas como medida de seguridad general.

### 2.2.2. Otras medidas preventivas

Guantes descartables (Fig. 20 a-b): además de los guantes de vinilo se sugiere utilizar guantes de uso veterinario, que cubren todo el brazo. De esta manera, quien muestrea puede utilizar vestimenta con manga evitando la desinfección posterior de ésta. Los guantes cortos deben ser usados tanto por la parte seca como húmeda, para evitar el contacto directo con la plaga al manipular los implementos y muestras.



Figura 20 a: guantes descartables largos.



Figura 20 b: guantes descartables cortos.

**Materiales de muestreo descartables (Fig. 20c):** se sugiere que la mayor cantidad posible de implementos de muestreo sean utilizados sólo en un punto de muestreo, por lo que utilizar este tipo de materiales ayudaría a evitar la propagación o la determinación de falsos positivos, por ejemplo, instrumento para recolección de diatomeas bentónicas.

**Contenedor de implementos descartables:** incluso los implementos descartables utilizados deben ser desinfectados, separados del resto y depositados posteriormente en la basura, en bolsas exclusivas para este objetivo, cuidando que se encuentren cerrada y aislada adecuadamente, de modo que no exista riesgo de propagación de *Didymo*.



Figura 20 c: set de muestreo biológico descartable.

## 2.3. Procedimiento de limpieza y desinfección

### 2.3.1. Medidas de desinfección

El proceso de desinfección consiste en tres etapas: remover, lavar y secar (basado en Plan de Bioseguridad de Nueva Zelanda).

- **Remover:** antes de abandonar la zona de muestreo, hacer una inspección visual en los implementos que estuvieron en contacto con el cuerpo de agua (ropa, equipos, embarcaciones, etc.) con el fin de eliminar cualquier residuo visible del alga o sedimento, removiéndolo manualmente. De registrar residuos después de abandonar la zona de muestreo, depositarlos en la basura y en ningún caso deshacerse de ellos por desagües domiciliarios.
- **Lavar:** etapa que considera todo objeto que estuvo en contacto con el cuerpo de agua, diferenciando entre los que absorben agua y los que no. Los que absorben agua deben ser sumergidos en una solución de desinfección hasta que se saturan de ésta. Los que no absorben, deben ser limpiados sólo en superficie. En cuanto a vehículos y medios de transporte, se recomienda rociarlos con abundante solución desinfectante en toda su superficie y luego dejar secar naturalmente.

- a.- Solución de cloro al 2% (Fig. 21a): 200 ml de cloro de uso doméstico (~ un vaso) por cada 10 litros de agua. El tiempo de desinfección es de al menos 1 minuto.
- b.- Solución salina al 5% (Fig. 21b): 500 gr de sal de uso doméstico por cada 10 litros de agua. El tiempo de desinfección es al menos 1 minuto.
- c.- Solución de lavalozas biodegradable al 5%: 500 ml de lavalozas (~ 2 vasos) por cada 10 litros de agua.

Tiempo de desinfección: al menos 1 minuto.

- d.- Agua caliente: sobre 45 °C (incómoda al tacto) durante 20 minutos y sobre 60 °C durante al menos 1 minuto.

Los equipos que absorban agua (chalecos salvavidas, botas botas y *waders*) deben dejarse en remojo al menos 30 minutos, en algunas de estas soluciones, para asegurar su limpieza. En caso que ninguna medida de desinfección de las mencionadas pueda ser realizada, se debe restringir la utilización de los implementos de muestreo a sólo un punto de muestreo.

- **Secar:** todo lo sometido a desinfección debe estar completamente seco al tacto, por dentro y por fuera. Una vez seco al tacto, se debe esperar al menos 48 horas antes de volverlo a utilizar. Si la limpieza no es posible se deberá proceder a secar rigurosamente todo el material. Las células de *Didymo* sobreviven a la humedad durante meses.



Figura 21 a: solución de cloro al 2%.



Figura 21 b: solución salina al 5%.

*IMPORTANTE: se recomienda la utilización de solución salina (aumentando el tiempo de desinfección), ya que ésta no produce daño para la salud de quien la utiliza, para la vestimenta y hay menor riesgo de daño para los instrumentos y el medio ambiente, respecto de la utilización de la solución de cloro. En ningún caso verter al río la solución utilizada para limpieza y desinfección.*

*La Dirección General de Aguas del Gobierno de Chile, hace las siguientes recomendaciones:*

*“En caso que se disponga de la infraestructura, otra alternativa que también mata a las células de esta alga, es congelar cualquier artículo hasta que se solidifique. Si la limpieza, el secado o el congelamiento no se pueden practicar, se debe restringir el equipo a un sólo ambiente o punto de contacto con el río”.*

### 2.3.2. Desinfección de equipos de muestreo (Fig. 22)

Una vez finalizada la etapa de muestreo, en el mismo punto se debe realizar la limpieza y desinfección de los siguientes instrumentos y materiales de muestreo:

- **Electrodos:** lavar con solución de desinfección y luego lavar con agua destilada, antes de poner en contacto con la solución de almacenamiento.
- **Red de plancton:** una vez extraída la red contenedora de la muestra, la red de plancton debe ser lavada en el mismo río. Luego debe ser sumergido completamente en la solución de desinfección. En el siguiente punto de muestreo la red debe ser lavada nuevamente con agua del río antes de ser usada para tomar la muestra en éste.
- **Frascos y tubos con muestras:** deben ser rociados externamente con solución desinfectante para evitar que sobrevivan células de *D. geminata* que pudieron quedar en el momento de obtención de la muestra.
- **Vestimenta:** (incluyendo las botas de pescador o waders utilizadas por el profesional encargado del muestreo perteneciente al equipo húmedo) deben ser sumergidas en un recipiente con solución de desinfección y con una escobilla plástica debe realizarse la limpieza del traje hasta donde pudo tener contacto con el agua. El profesional del equipo seco, debe desinfectar el calzado utilizado durante el muestreo por razones preventivas, ya que éste no tuvo contacto directo con el agua.
- **Neumáticos del vehículo:** deben ser rociados con solución desinfectante en toda su superficie. Se recomienda utilizar un pulverizador.

- **Otros:** huinchas de medir, muestreador de bentos (no recomendado reutilizar muestreador), cuerdas y cualquier otro implemento utilizado que pudo tener contacto con el agua y que volverá a ser utilizado en otro punto. Los implementos más absorbentes, tales como cuerdas, *waders*, alfombras, etc, aún cuando sean desinfectados, deben ser secados según el procedimiento anteriormente descrito en el ítem 2.3.1 “Medidas de desinfección”.

*IMPORTANTE: esta etapa de limpieza y desinfección se realiza con guantes y luego estos deben ser eliminados en un contenedor destinado exclusivamente para ello. Allí también deben ser descartados todos los implementos utilizados por única vez en cada punto de muestreo (muestreador de bentos). La solución de limpieza sobrante debe ser vertida en el suelo del sitio de muestreo, a una distancia tal que no haya peligro de que entre en contacto con el curso de agua.*



Figura 22a: lavado de red de fitoplancton.



Figura 22b: limpieza de neumáticos con pulverizador.



Figura 22c: bolsa de desechos.



Figura 22d: limpieza de huincha de medir.



Figura 22e: limpieza de electrodos.



Figura 22f: limpieza de vestimenta de equipo húmedo.

## 2.4. Desinfección de embarcaciones

### 2.4.1. Embarcaciones con motor

**Remover:** limpiar la embarcación y bomba de enfriamiento de motores fuera de borda de restos de algas, material orgánico, sedimentos, agua, antes de salir del agua. Cualquier resto de material debe ser depositado en la basura, en contenedores cerrados sin riesgo de dispersión.

**Lavar:** una vez que la embarcación esté fuera del agua, se procede al lavado de ésta. Se recomienda contar con una hidrolavadora (con motor a gasolina, que no dependa de corriente eléctrica) con solución desinfectante de Cloro al (2 %). Debe alcanzar perfectamente todas las partes que se necesite lavar, de manera que se recomienda que la hidrolavadora esté provista de una manguera de varios metros de longitud. También debe considerarse el lavado de todos los equipos que hayan estado en contacto con el agua, como salvavidas, implementos y artes de pesca, botas, entre otros.

A los puntos más críticos que hayan estado en contacto con el agua, aplicarles el lavado a presión. Todas las superficies de la embarcación deben estar en contacto con la solución de limpieza por unos 30 minutos.

Para el lavado del motor se puede utilizar agua caliente a 60°C, haciéndolo funcionar dentro de un contenedor y transferirlo a otro contenedor con agua limpia. Puede ayudarse con rociadores.

**Secar:** dejar secar la embarcación al menos 48 horas, hasta que quede completamente seca al tacto, por dentro y por fuera, para asegurarse que las células de *D. geminata* mueran con este procedimiento.

### 2.4.2. Embarcaciones sin motor

**Remover:** limpiar la embarcación y todos los implementos que estén libres en su interior, de restos de algas, material orgánico, sedimentos y agua, antes de salir del agua. Cualquier resto de material debe ser depositado en la basura, en contenedores cerrados sin riesgo de dispersión. Es importante vaciar el agua de toda la embarcación antes de salir a tierra.

**Lavar:** lavar todas las superficies, interiores y exteriores, con solución desinfectante de Cloro (2%) o sal (5%); un rociador puede resultar de ayuda. Todas las superficies deben estar en contacto con la solución de limpieza alrededor de 30 minutos. Puede ayudarse con una hidrolavadora si es necesario. También considerarse el lavado de todos los equipos que hayan estado en contacto con el agua, como salvavidas, implementos y artes de pesca, botas, entre otros.

**Secar:** dejar secar la embarcación al menos 48 horas, hasta que quede completamente seca al tacto, por dentro y por fuera, para asegurarse que las células de *D. geminata* mueran con este procedimiento.

### 2.4.3. Formulario de limpieza

Es importante completar un formulario de limpieza que considere: procedencia de la embarcación, fecha de desinfección, tipo de solución desinfectante, punto de muestreo, responsable del procedimiento, etc. Este formulario servirá para demostrar la correcta ejecución del proceso de desinfección de la embarcación ante la autoridad fiscalizadora.

### Medidas de Bioseguridad: extracto de pendón de la Subsecretaría de Pesca

**Digamos NO a Didymo!**

Didymosphenia geminata es una "alga" de "roca" común Didymo o "moche de roca", que se fija al sustrato rocoso por medio de un pie de mucilago.

Esta microalga tiene un alto poder de proliferación, puede invadir en cortos períodos de tiempo extensas áreas formando una cubierta viscosa sobre el fondo.

Didymo es una plaga que con su presencia afecta las actividades recreativas de los ríos y lagos, tales como de pesca deportiva, deportes náuticos, entre otros.

**MEDIDAS A SEGUIR AL TOMAR CONTACTO CON EL CUERPO DE AGUA**

**REVISAR**  
Al salir del Lago o Río, revisar sus implementos, limpiar y deshechar en la basura.

**LAVAR**  
Sumerja su ropa, zapatos e implementos en solución de cloro al 5% o sal doméstica.

**SECAR**  
Secar por 48 horas antes de usar nuevamente.

**NO DEVUELVA AL RÍO EL AGUA QUE UTILIZÓ PARA LAVAR.**  
Transporte los peces u otras especies en contenedores herméticos.

## 2.5 Consideraciones importantes

- Las células de *D. geminata* pueden seguir siendo viables durante más de un mes fuera del agua, en ambientes frescos y húmedos.
- Los medios de transporte, embarcaciones, vehículos, etc. son potenciales vectores de dispersión. Todo medio de transporte acuático debe ser estrictamente revisado y desinfectado antes de tomar contacto con el agua.
- Se debe contar con medios para la desinfección y facilitar su disposición en los lugares donde se realizan actividades de pesca recreativa.
- Comunique la procedencia de los medios de transporte, tales como embarcaciones kayak, y ser particularmente rigurosos si vienen de países donde se haya detectado *Didymo*.
- Viaje siempre con un set de limpieza compuesto por un recipiente grande, detergente, en lo posible biodegradable u otro desinfectante (cloro o sal doméstica), una escobilla y bolsas descartables.
- Todo el material a desechar debe mantenerse en bolsas selladas que serán posteriormente depositadas en un lugar sin riesgo de dispersión.
- Los diversos servicios públicos del país relacionados con las aguas continentales, entre los cuales están: Subsecretaría de Pesca; Servicio Nacional de Pesca; Servicio Agrícola y Ganadero, Dirección General de Aguas y el Ministerio del Medio Ambiente , han desarrollado actividades tendientes a difundir acciones de prevención. Infórmese al respecto y reporte sospechas de la presencia de *Didymo* a:

INFORMACIÓN Y DENUNCIA EN:

[www.subpesca.cl](http://www.subpesca.cl)

<http://pescarecreativa.sernapesca.cl>

[www.sernapesca.cl](http://www.sernapesca.cl)

Fono: 800 320 032

A scenic landscape featuring a river with a unique tree in the foreground and a forest of tall trees on a hillside in the background. The tree in the foreground has a thick, gnarled trunk and a dense, rounded canopy of small, green, needle-like branches. The river flows through the center of the image, reflecting the sky and the surrounding vegetation. In the background, a line of tall, slender trees stands on a grassy slope under a clear blue sky. The overall scene is peaceful and natural.

### 3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

• Nacimiento Río Bío-Bío, Región de La Araucanía

## 3.1. Microalgas planctónicas

### 3.1.1. Materiales de laboratorio (Fig. 23)

- Tubos Eppendorf.
- Pipetas Pasteur.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Tubos plásticos de 10 ml.
- Puntas azules para micropipeta P1000.
- Micropipeta P1000, volumen variable o jeringa.
- Cámara Sedgewick Rafter: para análisis cuantitativo (Fig. 25).



Figura 23: Materiales para análisis de microalgas planctónicas.

### 3.1.2. Procedimiento

La o las muestras planctónicas obtenidas en terreno para cada punto de muestreo deben ser analizadas cualitativa y cuantitativamente.

**Análisis cualitativo:** se utiliza una submuestra de la muestra obtenida en terreno. Ésta debe ser previamente homogeneizada mediante agitación. Luego, una gota es depositada entre un portaobjetos y cubreobjetos con una Pipeta Pasteur, de modo que pueda ser observada de inmediato al microscopio óptico, generalmente sin necesidad de dilución.

**Análisis cuantitativo (Fig.24a-b):** utilizando una micropipeta o jeringa se deposita 1 ml de muestra en una cámara Sedgewick Rafter. Al igual que en el análisis cualitativo, la muestra debe ser previamente homogeneizada y diluida si es necesario.



Figura 24a.

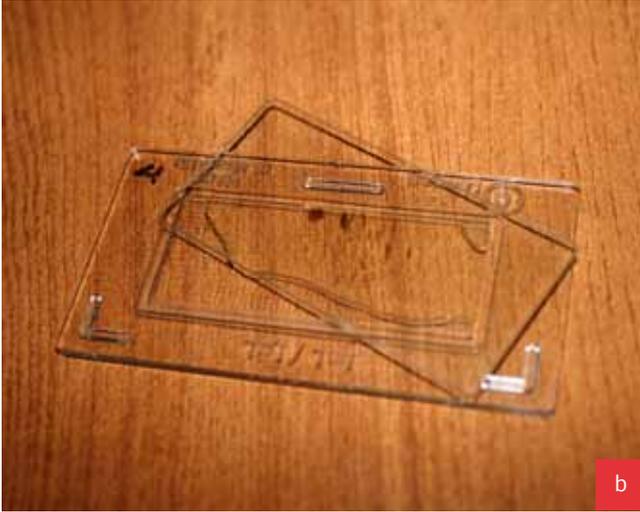


Figura 24 a-b. Procedimiento de análisis cuantitativo de microalgas planctónicas: montaje de la muestra en cámara Sedgewick Rafter.

**IMPORTANTE:** el volumen total de cada muestra planctónica colectada en terreno, debe ser distribuido de la siguiente manera:

- Muestra de respaldo: tubo Eppendorf con 1 ml de muestra previamente homogeneizada, desde donde fueron obtenidas las gotas para el análisis cualitativo.
- Muestra para análisis cuantitativo de microalgas planctónicas: tubo plástico con 7 ml de muestra, previamente homogeneizada.
- Muestra para análisis de células viables de diatomeas planctónicas: tubo Eppendorf con 1 ml de muestra previamente homogeneizada.
- Muestra para identificación taxonómica de diatomeas planctónicas: todo el resto de la muestra de terreno, concentrada hasta el menor volumen posible para posterior digestión ácida.

## 3.2. Diatomeas bentónicas y planctónicas: células viables

### 3.2.1. Materiales de laboratorio

- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Puntas azules para micropipeta P1000.
- Micropipeta P1000, volumen variable.
- Agitador vórtex.

### 3.2.2. Procedimiento

Una gota obtenida directamente de la muestra original colectada en terreno, previamente homogeneizada, se deposita entre un portaobjetos y cubreobjetos con una micropipeta, para ser observada inmediatamente al microscopio óptico. Esta simple y breve etapa de preparación de muestra ocurre de manera conjunta con la observación, debiendo cada una de las muestras ser preparada en el momento en que van a ser observadas.

## 3.3. Digestión ácida para observación de diatomeas planctónicas y bentónicas

### 3.3.1. Equipos y materiales de laboratorio

- Campana de extracción de gases.
- Centrífuga con temporizador, 4000 rpm.
- Dispensadores para ácidos.
- Micropipeta P1000, volumen variable.
- Placa calefactora de temperatura regulable bajo 50°C.
- Agitador vórtex.
- Pisetas plásticas.
- Reactivos: ácido sulfúrico y clorhídrico, agua oxigenada, etanol, tolueno, KOH (o neutralizante alternativo).
- Agua destilada.
- Papel pH.
- Gradillas metálicas para tubos de 15 ml.

- Tubos de polipropileno, 15 ml, punta cónica, graduados, tapa rosca.
- Puntas azules para micropipeta P1000.
- Portaobjetos (se sugieren con bordes esmerilados) y cubreobjetos (18x18 mm recomendados).
- Resina como medio de montaje para el preparado permanente. Se recomienda Naphrax® o equivalente, que posea un índice de refracción de aproximadamente, 1,7.
- Cajas porta muestras.
- Guantes descartables resistentes al ácido.
- Guantes de vinilo.
- Mascarillas de seguridad para trabajar con ácidos.
- Delantal protector para trabajar con ácidos.

#### 3.3.2. Tratamiento de las muestras

##### 3.3.2.1. Tratamiento pre-digestión de las muestras

El volumen de muestra recibido en el laboratorio es un dato de suma importancia para los cálculos posteriores. Se recomienda generar una planilla con esta información antes de iniciar cualquier procedimiento.



Figura 25: Tratamiento pre-digestión de muestras de diatomeas: centrifugado.

Cada muestra se centrifuga durante 3 min., a 4000 rpm (Fig. 25). Se elimina el sobrenadante para obtener el pellet, que será sometido a digestión. En el caso de la muestra proveniente de la red de fitoplancton cuyo volumen es superior a los 15 ml, se sugiere no submuestrear sino realizar el procedimiento de centrifugación y eliminación de sobrenadante tantas veces como sea necesario. La red incluida en la muestra se someterá a un enjuague reiterado que permita obtener la totalidad del fitoplancton atrapado. Este procedimiento tiene como finalidad obtener, en un tubo de 15 ml, la totalidad del material colectado por la red que será descartada una vez finalizado el procedimiento. En caso de submuestreo (no recomendado), se debe registrar el volumen utilizado para los cálculos posteriores.

##### 3.3.2.2. Digestión de muestras

Dependiendo del tipo de muestras obtenidas, se realiza el tratamiento ácido apropiado siguiendo los procedimientos descritos en la literatura. Algunos autores recomiendan utilizar métodos complicados como el de Hasle & Fryxell (1970) con ácido oxálico o el método usando "agua regia" ( $H_2SO_4 + HNO_3$ ).

En este protocolo se sugiere seguir la metodología descrita en Battarbee 1986, en el que se entregan alternativas para los distintos tipos de muestras, por ejemplo, muestras con alto contenido de carbonato se deben tratar con HCl, mientras que si hay mucha materia orgánica es recomendable un pre-tratamiento con  $H_2SO_4$  o usar una combinación de HCl y  $HNO_3$ .

Como procedimiento estándar se recomienda el siguiente:

**Tratamiento con  $H_2O_2$  (peróxido de oxígeno):** agregar 2 ml de  $H_2O_2$  y calentar los tubos con muestra a baño María, durante el tiempo y a temperaturas suficientes para

observar la acción del peróxido sobre la materia orgánica de la muestra. Se debe tener la precaución de destapar los tubos, indicando en la tapa el nombre de muestra de la cual proviene o dejar ligeramente destapados para que la presión del gas liberado por la digestión no haga explotar el tubo. Se dejan enfriar y luego se procede a eliminar el peróxido centrifugando los tubos, descartando el sobrenadante y reemplazándolo con agua destilada, hasta que la solución se neutralice.

**Tratamiento con ácidos (Fig. 26):** agregar 2 o 3 ml de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) o alternativo, gota a gota, poniendo atención en cómo va reaccionando el ácido con la muestra, evitando así que la reacción sea demasiado violenta, que haya pérdida de muestra o que explote el tubo. Ésta es una reacción exotérmica, por lo que el tubo alcanzará temperaturas elevadas (se recomienda que los tubos estén lo suficientemente separados para evitar inconvenientes en caso de que parte de una muestra se disperse fuera del tubo). Cada tubo debe ser agitado (en Vórtex y bien tapado) para que el ácido actúe sobre la totalidad de la muestra. Posteriormente, se dejan reposar los tubos durante aproximadamente 35 minutos, debiendo quedar semitapados o destapados, bajo la campana de extracción de gases.



Figura 26: Ácido empleado en la etapa de digestión de muestras de diatomeas.

**PRECAUCIONES:** toda la etapa de digestión debe ser realizada bajo campana de extracción de gases. Se deben utilizar guantes adecuados para el trabajo con ácidos, delantal de mangas largas, zapatos cerrados y, en general, vestimenta que no deje descubierta la piel. Además, es necesaria la utilización de mascarilla para el tratamiento con ácidos, que proteja tanto la inhalación como la irritación de ojos y piel por gases.

Después de transcurrido el tiempo de espera, llevar los tubos bien tapados a la centrífuga por 3 minutos a 4000 rpm, botar el sobrenadante en una botella exclusiva para desechos de ácido sulfúrico (o del ácido alternativo que se utilice), debidamente etiquetada para su posterior neutralización y descarte sin daño al medio ambiente. Luego aforar con agua destilada hasta 15 ml, agitar en Vórtex y centrifugar nuevamente. Este procedimiento se realiza al menos 4 veces y tantas veces como sea necesario hasta que cada muestra llegue a pH neutro o al pH del agua destilada que se está utilizando. Para ello, se mide con papel pH (Fig. 27) en cada una de las muestras, previa agitación. No todas las muestras alcanzan el pH buscado con el mismo número de lavados, de modo que, en la medida que los tubos queden fuera de este paso es preciso mantener un número par para no desequilibrar la centrífuga.

Una vez finalizado el lavado de las muestras, éstas pueden quedar en ese estado hasta que se realicen los preparados permanentes.



Figura 27: Papel pH utilizado en la etapa de digestión de muestras de diatomeas.

### 3.3.3. Montaje de preparados permanentes

#### 3.3.3.1. Dilución de la muestra (Fig. 28 a-c)

El tubo con muestra proveniente del proceso de digestión es llevado a un volumen conocido de 2 a 15 ml, agregando agua destilada, de manera que al montar esa muestra tenga una dilución apropiada. En caso que la muestra sea llevada al máximo de 15 ml y se requiera que esté aún más diluida, se realizarán diluciones seriadas hasta alcanzar la óptima para que la muestra sea montada. Con una micropipeta P1000, se toma un volumen conocido (se sugiere 0,5 ml = 500  $\mu$ l) de muestra del primer tubo para depositarlo en un segundo tubo (debidamente etiquetado), que es llevado al volumen que se estime conveniente. Si este tubo es llevado al máximo de 15 ml nuevamente y requiere aún más dilución, el proceso se repite cuantas veces sea necesario.

**PRECAUCIONES:** las puntas utilizadas en las micropipetas deben ser nuevas y descartadas después de su utilización para evitar contaminación o alteración de la concentración. Los tubos de polipropileno utilizados también deben ser nuevos y descartados después de su uso. El material plástico no debe ser reutilizado, aún cuando éste se lave con detergente o con ácido muy diluido, ya que las diatomeas resisten el deterioro a todo tipo de solvente y reactivo, excepto el ácido fluorhídrico, que debido a su alta toxicidad y capacidad corrosiva no puede ser utilizado con este fin.





Figura 28 a,b,c: Dilución de muestras de diatomeas bentónicas.

Todos los volúmenes obtenidos de este proceso, finales e intermedios, deben ser consignados en la planilla para calcular el factor de dilución para cada muestra, considerando además los volúmenes de muestra tomados en terreno. El cálculo de este factor es la multiplicatoria de los cocientes entre los volúmenes iniciales y finales de cada dilución:

volumen final (aforo post-digestión= tubo1) / volumen inicial (terreno) \* volumen final dilución 1 (tubo 2) / volumen inicial tomado de tubo 1 \*  
volumen final dilución 2 (tubo 3) / volumen inicial tomado de tubo 2 \*

Ejemplo (Fig. 29).

Se tomaron 10 ml de muestra obtenida en terreno (tubo 1) y al finalizar el procedimiento de digestión y lavados, se llevaron a 15 ml con agua destilada. De allí se tomaron 0,5 ml y fueron llevados nuevamente a 15 ml (tubo 2). Por último, del tubo 2 se extrajeron 0,5 ml para ser llevados a 7 ml (tubo 3). El cálculo se realiza de la siguiente manera:

$$15/10 * 15/0,5 * 7/0,5 = 630$$

Esto implica que la muestra fue diluida 630 veces respecto de la concentración que tenía en terreno.

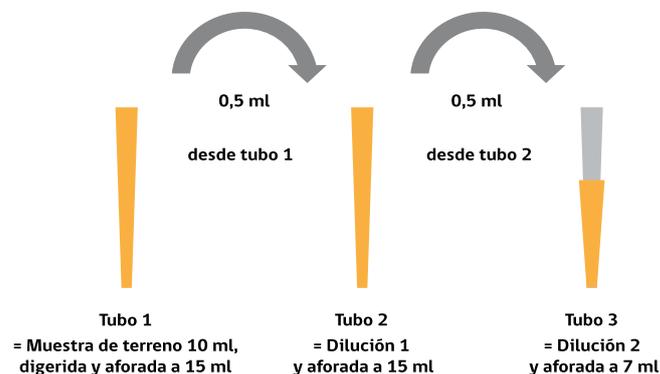


Figura 29. Diluciones seriadas para la obtención de preparados con concentración apropiada de diatomeas.

### 3.3.3.2. Preparados permanentes

Es necesario limpiar los cubreobjetos y portaobjetos a utilizar, con alcohol al 96% y papel absorbente, procurando desengrasar la superficie para que la muestra se esparza lo más homogéneamente posible. Además, los portaobjetos deben ser debidamente rotulados con marcadores permanentes y cubiertos con cinta adhesiva transparente para evitar que dicho rútilo sea borrado por los solventes utilizados en esta etapa del procedimiento.

Las muestras se agitan en el Vórtex para luego extraer una submuestra representativa. Con la micropipeta P1000 se extrae un volumen conocido (se sugiere 0,7 ml= 700  $\mu$ l), el que será depositado lenta, cuidadosa y lo más inmediatamente posible en un cubreobjetos (se sugiere que la medida de este sea de 18x18 mm, para que no afecte a los cálculos posteriores) dispuesto en una placa calefactora (Fig. 30). Para cada muestra se utiliza una punta nueva y luego se desecha. Es importante cubrir con la muestra la totalidad de la superficie del cubreobjetos. Se deja evaporar a temperatura baja y controlada, SIN QUE LLEGUE A HERVIR. Este procedimiento se repite para cada una de las muestras, poniendo especial cuidado en que haya una separación entre ellas, en la superficie de la placa calefactora. También se debe tener total conocimiento de la disposición de las muestras en la placa y el orden correspondiente de acuerdo a los tubos originales, ya que los cubreobjetos no son etiquetados.

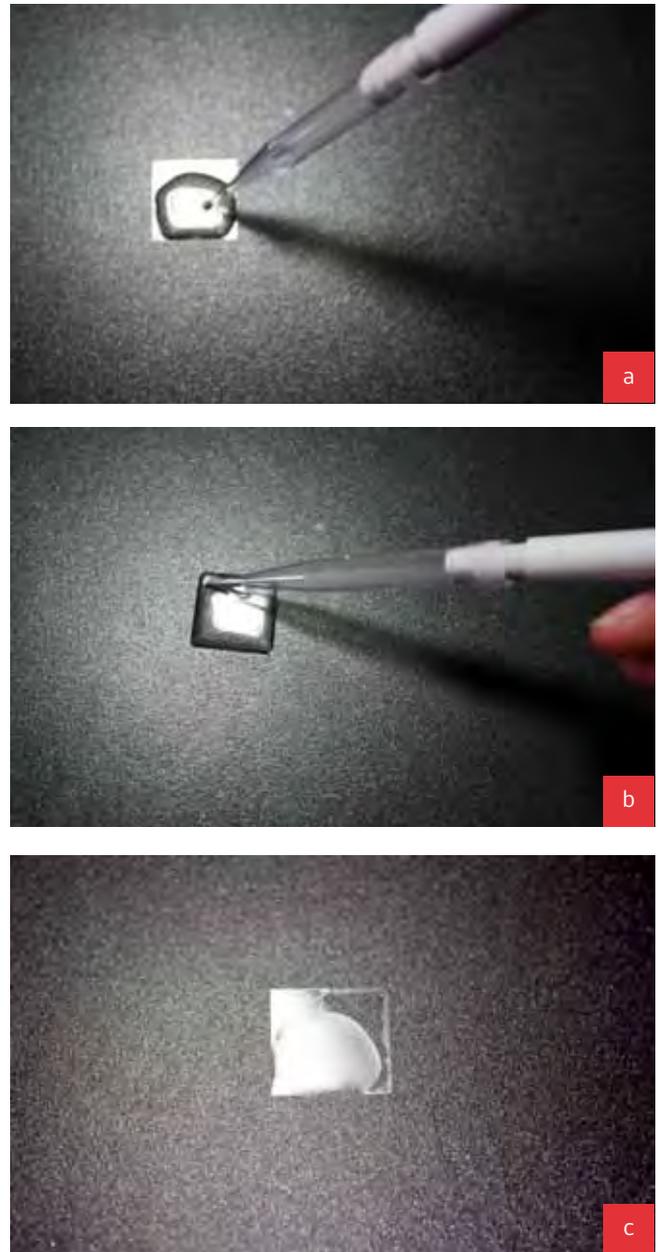
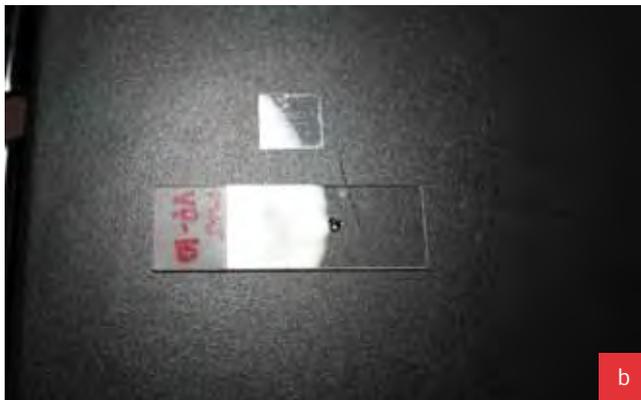


Figura 30 a,b,c: Montaje de la muestra de diatomeas.

Luego que la muestra ha sido deshidratada, se monta con una resina que posee un índice de refracción adecuado para la observación de los frústulos de diatomeas (Fig. 31 a-c). En el centro del portaobjetos se pone una gota pequeña, o cinco gotitas (una al centro y cuatro para cada punta), de resina según las especificaciones del ítem 3.3.1. Esta resina debe ser previamente disuelta en Tolueno, por lo que debe ser utilizada con mucha precaución, evitando la inhalación del vapor que emana de ella al calentar el preparado y el contacto con la piel.



a



b



c

Figura 31 a,b,c: Realización de preparados permanentes. a: Resina Naphrax®, b-c: muestra deshidratada en portaobjetos puesta en resina (cubreobjetos).

A continuación, posar el portaobjetos invertido sobre el cubreobjetos con la muestra deshidratada. Luego se debe esparcir la resina haciendo una suave presión con una varilla de punta roma, de madera o metal, tratando de cubrir toda la superficie del preparado. Al presionar la muestra, se elimina por los bordes del cubreobjetos el exceso de resina, mientras ésta continua calentándose en la placa calefactora a baja temperatura. Se deben eliminar todas las burbujas que se produzcan en el preparado, revisar al microscopio que las diatomeas estén en la concentración adecuada, distribuidas más o menos homogéneamente y en un mismo plano de observación, con el fin de facilitar la identificación taxonómica y el posterior recuento.

Una vez revisada la calidad de la muestra con el microscopio óptico, limpiar los excesos de resina que pudieran haber quedado en el contorno del cubreobjetos, raspando la resina o utilizando un poco de Xilol si fuera necesario. En el preparado terminado, si la resina está completamente solidificada, el cubreobjetos no debe desplazarse. Para controlarlo, hay que probar moviéndolo con el dedo. Si se produce desplazamiento, se debe calentar la muestra nuevamente para eliminar el exceso de resina.

### 3.3.3.3. Consideraciones importantes

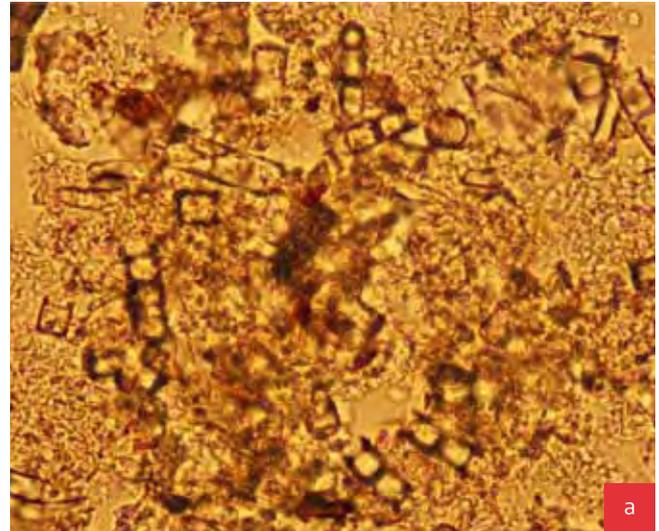
El procedimiento de digestión y/o de montaje, debe ser repetido en caso que las muestras queden mal preparadas (Fig. 32). Para ello es necesario revisar cada uno de los preparados permanentes al microscopio óptico, antes de dar por finalizado completamente el proceso de montaje.

Las muestras están mal preparadas en los siguientes casos:

- **Mal digeridas (Fig. 32 a, b y c):** los restos orgánicos que persistan en las muestras permiten o favorecen que se formen aglomeraciones de diatomeas y en consecuencia se dificulta la identificación y el recuento de las especies que ahí se encuentran.
- **Concentradas (Fig. 32 a, b y e):** la abundancia de diatomeas en la muestra no permite identificar correctamente las especies presentes.
- **Diluidas:** la escasez de diatomeas no permite obtener una representación real de la variedad de especies de la zona de estudio.
- **Diatomeas en más de un plano de observación:** requieren eliminar más resina.
- **Sobrecalentadas (Fig. 32 d):** la resina se fractura dentro de la muestra y se adquiere una coloración indeseada lo que dificulta distinguir las especies.
- **Portaobjetos o cubreobjetos parcialmente roto:** la zona trizada puede impedir la correcta visualización y posterior identificación de las diatomeas.
- **Diatomeas aglutinadas en los bordes del cubreobjetos:** la muestra no se distribuyó homogéneamente y por lo tanto los recuentos no son

confiables, además de que se dificulta la observación de las valvas.

- **Burbujas de resina:** la muestra se debe calentar y presionar lo suficiente para eliminar todas las burbujas que impidan posteriormente observar las diatomeas.
- **Resina no solidificada:** impide la correcta identificación y cuantificación de las especies de diatomeas contenidas, dado que el medio que aún se encuentra líquido moviliza a las diatomeas contenidas en él.
- **Cúmulos de diatomeas por agitación deficiente de la muestra:** la distribución homogénea de las diatomeas en la muestra se obtiene con una adecuada agitación de la muestra antes de cada procedimiento de extracción (diluciones y montaje). No agitar adecuadamente puede producir cúmulos, donde las diatomeas quedan sobrepuestas de modo que no permiten una correcta identificación ni recuento.



a

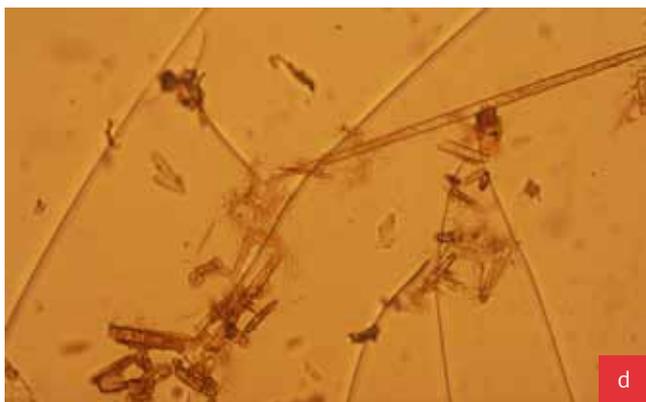
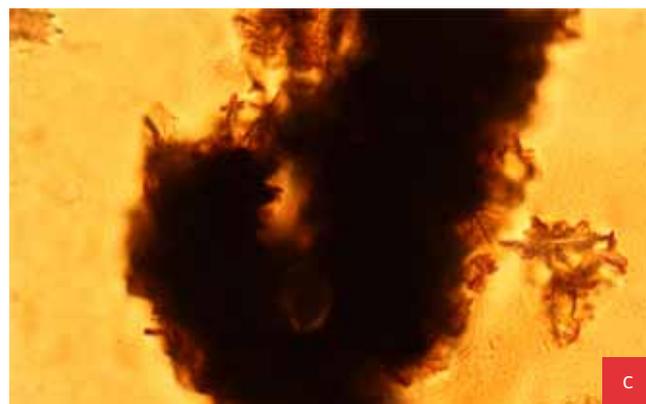


Figura 32 a-e. Preparados permanentes en mal estado. 32a, b y c: con restos de materia orgánica; 32 a, b y e: muy concentrados, 32d: resina sobrecalentada.





## 4. ANÁLISIS MICROSCÓPICO

• *Río de Los Palos, Región de Aysén*

## 4.1. Microalgas planctónicas: recuento de fitoplancton acompañante

### 4.1.1. Equipos y materiales de laboratorio

- Cámara Sedgewick Rafter: para análisis cuantitativo.
- Microscopio óptico: con objetivos de 10X y 40X.
- Cámara Digital: conectada al microscopio óptico para dejar registro fotográfico de los ejemplares encontrados.

### 4.1.2. Identificación taxonómica

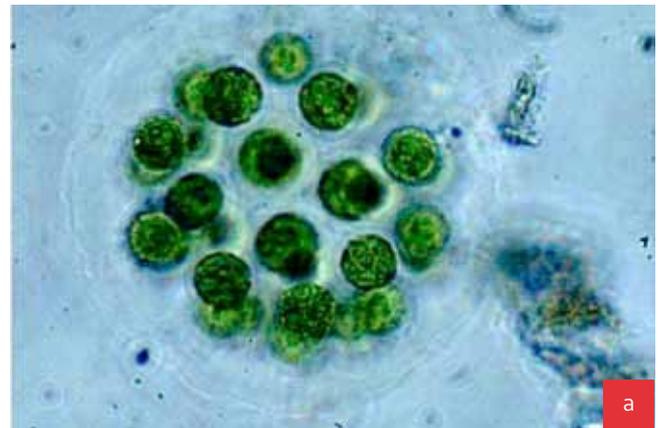
La identificación taxonómica, con un aumento de 40X, es posible a nivel de género regularmente para todos los grupos de microalgas, excepto para las diatomeas que requieren la observación bajo un aumento mayor.

Para la identificación taxonómica de diatomeas planctónicas es necesario realizar preparados permanentes que permitan la identificación tal como se realiza para el bentos. De esta manera, con el objetivo de apoyar el análisis de diatomeas realizado en las muestras para análisis de microalgas planctónicas, se relacionan los resultados de ambos procedimientos (ver ítems 3.1. y 4.3) y así realizar la identificación y recuento de los ejemplares pertenecientes a este grupo con la mayor precisión taxonómica posible, llegando en muchos casos a nivel de especie.

### 4.1.3. Criterios de Cuantificación

- Sólo serán contabilizados como individuos las células completas con cloroplastos en su interior (Fig. 33 a-b).
- Se contará un número mínimo de 100 células del taxón más abundante.
- Se contarán los individuos que caen en la raya izquierda de cada celda, pero no los de la derecha.

- En el caso de organismos coloniales, se contará el número de células que compone cada colonia. Si esto no es factible, se contará el número de individuos de 20 colonias y luego se obtendrá un promedio por colonia, para expresar el resultado final en cel/l (Fig. 33 a-b).
- Los filamentos se cuentan de acuerdo con un largo promedio, como un solo individuo.
- Las diatomeas sólo se diferencian a nivel de orden o familia y en algunos casos a nivel de género.



a



b

Figura 33 a-b. Microalgas planctónicas observadas en fresco: células completas con cloroplastos en su interior.

#### 4.1.4. Recuento de microalgas

Tal como fue descrito en el ítem de preparación de muestras, la o las muestras planctónicas obtenidas en terreno para cada punto de muestreo son analizadas cualitativa y cuantitativamente.

**Análisis cualitativo:** las muestras se observan al microscopio óptico con objetivo de 40X, recorriéndola completamente. Se identifican los taxa encontrados, dejando registro fotográfico de todos ellos. Para ello se requiere un conocimiento taxonómico que sólo se alcanza después de años de trabajo, por lo que para especialistas en formación se recomienda hacerlo en orden inverso, primero fotografiar los ejemplares para luego poder identificarlos correctamente (Fig. 34 a-b).

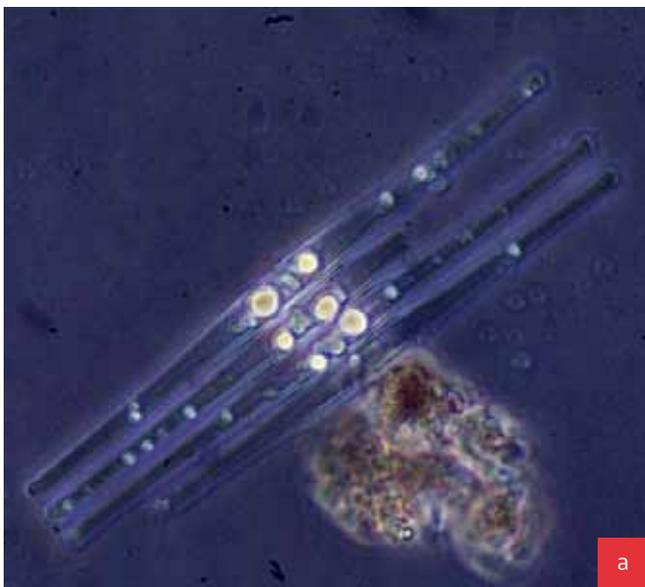


Figura 34 a-b. Registro fotográfico de microalgas planctónicas observadas en fresco, para su posterior identificación.

**Análisis cuantitativo:** la muestra se observa al microscopio óptico con objetivo 10 o 20X, recorriendo grillas verticales de 20 celdas, donde cada una corresponde a 1 microlitro (anotando para recuento total en ml).

#### 4.1.5. Expresión de resultados

Los resultados cualitativos se representan en una tabla general de presencia/ausencia de taxones de todas las muestras, mientras que los cuantitativos se consignan en dos tablas con las abundancias absolutas expresadas en cel/l y abundancias relativas (%), respectivamente. Con estos datos se obtiene la riqueza y abundancia total y además se calcula la diversidad, la dominancia o equitatividad y la similitud entre los diferentes sistemas muestreados. De estas tablas se obtienen los taxa más abundantes en cada muestra.

## 4.2. Diatomeas: recuento de células viables

### 4.2.1. Equipos y materiales de laboratorio

- Microscopio óptico con aumentos de 400X y 1000X. Tubo trinocular para conectar cámara digital que capture imágenes. Se recomienda óptica Carl Zeiss o de calidad similar.
- Cámara digital conectada al computador para captura y manejo de imágenes.
- Computador con tarjeta de video adecuada para el trabajo con imágenes.
- Aceite de inmersión para objetivo 100X.
- Papel de óptica para la limpieza de lentes del microscopio.

### 4.2.2. Identificación taxonómica

Con esta metodología, sólo algunos ejemplares pueden ser identificados a nivel de género, así es que sólo se realiza el recuento a nivel de abundancia total de diatomeas, contabilizando por separado sólo *Didymo* que es claramente diferenciable del resto, por su tamaño y características morfológicas reconocibles aún cuando conserven su contenido celular (Fig. 35).

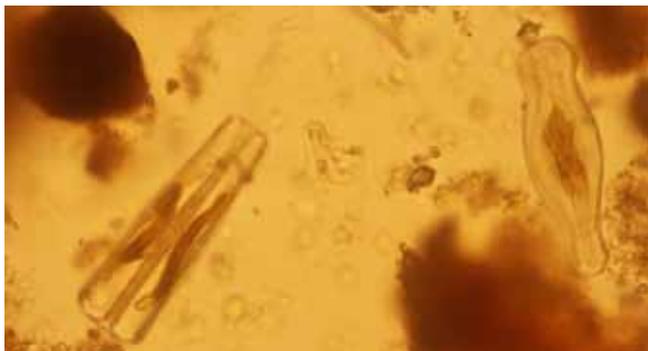


Figura 35. Células viables de *Didymosphenia geminata*.

### 4.2.3. Cuantificación

- Sólo se contabilizan como células viables las células completas con cloroplastos en su interior.
- Sólo se contabilizan como células muertas aquellos frústulos completos sin cloroplastos o valvas que cumplan con el criterio señalado en el ítem 4.3.3: “En el caso de diatomeas rotas, si el trozo encontrado corresponde a más del 50% de la valva o incluye estructuras clave como el nódulo central del rafe, deben ser identificadas y contadas. En este caso se debe tener la certeza de que al encontrar las partes restantes de la valva no se las considerará como otra valva a contar”.
- En esta etapa no se realiza otra identificación taxonómica, más que la diferenciación de *D. geminata* del resto de las diatomeas.

### 4.2.4. Recuento de diatomeas (Fig. 36)

La muestra se observa al microscopio óptico con objetivo de 40X. Se recorre, registrando la proporción de diatomeas con cloroplastos (células viables: estaban vivas al momento de ser colectadas) y frústulos de diatomeas vacíos (las que estaban muertas al momento de ser colectadas), contando al menos 100 diatomeas.

Se debe dejar registro fotográfico de *D. geminata*, del pie de mucílago de ésta y de las otras diatomeas halladas en el plancton.

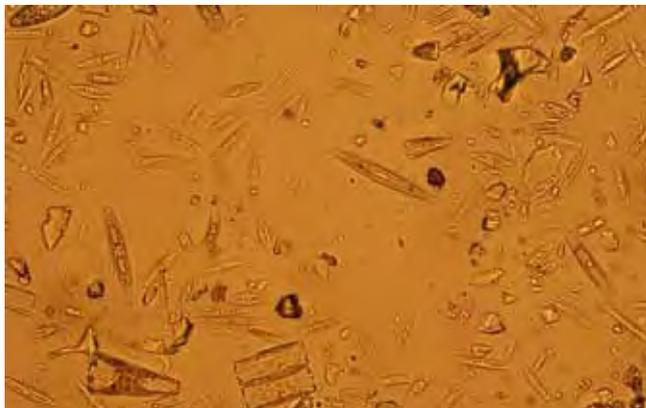


Figura 36. Recuento de células viables de diatomeas bentónicas.

#### 4.2.5. Expresión de resultados

El porcentaje calculado de células viables se utiliza para corregir posteriormente las abundancias totales por punto de muestreo. El porcentaje de células viables contadas con este método, debe ser multiplicado por el valor de abundancia total (absoluta) por sitio de muestreo, obtenido a partir del recuento e identificación de diatomeas realizado con el método tradicional (que incluye digestión previa de las muestras).

Ejemplo: para una muestra determinada:

Células viables = 80%

Abundancia total = 2400 cel/mm<sup>2</sup>

Abundancia corregida =  $2400 \times (80/100) = 1920 \text{ cel/mm}^2$

En la tabla de resultados se entregan los valores de abundancia absoluta (por especie y para cada estación) obtenida a partir de los recuentos con el método tradicional. Estas nuevas abundancias corregidas se registran a continuación de las abundancias absolutas totales por punto de muestreo (estimadas con el método tradicional) y del % de células viables obtenido a partir de los recuentos con la metodología descrita en este ítem.

### 4.3. Diatomeas bentónicas y planctónicas: Preparados permanentes

#### 4.3.1. Equipos y materiales de laboratorio

- Microscopio óptico con aumentos de 400X y 1000X. Tubo trinocular para conectar cámara digital que capture imágenes. Se recomienda óptica Carl Zeiss o de calidad similar (Fig. 37).
- Cámara digital.
- Computador con tarjeta de video adecuada para el trabajo con imágenes.
- *Software* para análisis digital de imágenes que permita medir y contar todas las estructuras posibles en diatomeas. El *Software* debe ser calibrado para realizar las mediciones en micrones.
- En algunos casos, la microscopía óptica no es suficiente para las determinaciones taxonómicas de diatomeas por lo que puede ser necesaria la utilización de Microscopía Electrónica de Barrido.
- Aceite de inmersión para objetivo 100X.
- Papel de óptica para la limpieza de lentes del microscopio.



Figura 37. Microscopio óptico con sistema de captura de imágenes y análisis digital incorporado.

### 4.3.2. Bibliografía recomendada para identificación taxonómica

- **KRAMMER K & LANGE-BERTALOT H.** 1986-1991. *Bacillariophyceae* 1. (1986); *Bacillariophyceae* 2 (1988); *Bacillariophyceae* 3 (1991); *Bacillariophyceae* 4 (1991). En: Ettl, H. et al. (Eds.), *Süswasserflora von Mitteleuropa*, G. Fischer, Jena.
- **LANGE-BERTALOT H.** 2001. *Diatoms of Europe. Navicula sensu stricto* 10 Genera Separated from *Navicula sensu lato. Frustulia*. Lange Bertalot (ed.). 526 pp.
- **RIVERAP.** 1983. A Guide for References and Distribution for the Class *Bacillariophyceae* in Chile between 18°28'S and 58°S. *Bibliotheca Diatomologica* Vol. 3, 386 pp.
- **ROUND FE & BUKHTIYAROVA L.** 1996. Four New Genera Based on *Achnanthes* (*Achnantheidium*) together with a Re-definition of *Achnantheidium*. *Diatom Research*, Vol 11 (2), 345-361.
- **ROUND FE, CRAWFORD RM & MANN DG.,** 1996. *The Diatoms. Biology and morphology of the genera*. Cambridge Univ. Press. Cambridge. 735 pp.
- **RUMRICH U, LANGE-BERTALOT H & RUMRICH M.** 2000. *Iconographia Diatomologica* 9. *Diatomeen der Anden (von Venezuela bis Patagonien/ Tierra del Fuego)*. Lange Bertalot (ed.). 671 pp.
- **SIMONSEN R.** 1987. *Atlas and Catalogue of the Diatom Types of Frederich Hustedt*, Vol 1, 2 y 3. J. Cramer, Gerbrüder Borntraeger Berlin - Stuttgart.
- **RIVERA, P.** 2000. *Índice Bibliográfico de las diatomeas (Bacillariophyceae) de Chile*. *Gayana Botánica* 57(1): 19-27.

### 4.3.3. Identificación taxonómica de las diatomeas

La identificación taxonómica de las diatomeas se basa principalmente en la morfología de los frústulos. Para ello

es necesario un entrenamiento teórico y mucha práctica. Además, es importante el reconocimiento de los otros especialistas, para lo cual es fundamental que exista una intercalibración entre estos, de manera que los resultados sean confiables.

**PRECAUCIONES:** Una Imprecisa Identificación Taxonómica Llevará A Conclusiones Erróneas E Inferencias Ambientales Totalmente Equívocas.

La identificación y recuento se realizan por valva pero muchas veces es necesario observar varios ejemplares, sus vistas valvares, cingulares y vistas internas.

En cada diatomea se miden y cuentan todos los caracteres posibles de importancia taxonómica (Fig. 38), por ejemplo:

- largo
  - ancho
  - número de estrías en 10  $\mu\text{m}$
  - número de areolas en 10  $\mu\text{m}$
- y en el caso en que lo hubieren
- número de costillas en 10  $\mu\text{m}$
  - número de fíbulas en 10  $\mu\text{m}$
  - número de cámaras en 10  $\mu\text{m}$

Con los caracteres observados, se consultan descripciones y claves taxonómicas en publicaciones científicas, como las sugeridas en el ítem 4.3.2

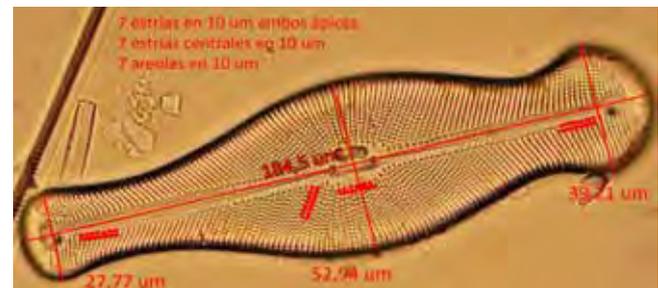


Figura 38. Frústulo de *D. geminata* indicando dimensiones y recuento de estructuras necesarios a considerar para su identificación taxonómica.

#### 4.3.4. Cuantificación

Uno de los puntos más importantes en la identificación y recuento de diatomeas, son los criterios a utilizar. Estos tienen directa relación con la formación recibida y la experiencia del especialista. Dos especialistas, pertenecientes a distintas escuelas, pueden tener diferentes criterios y asignar a un mismo taxón dos nombres diferentes. Debido a esto se recomienda que sólo un especialista analice un grupo de muestras en su totalidad o se haga cargo del análisis diatomológico de planes de seguimientos completos, ya que el cambio de especialista implica un cambio de criterio que puede llevar a diagnosticar falsos cambios comunitarios que lleven finalmente a inferencias ambientales erróneas. Sin embargo, dos o más especialistas al ser intercalibrados llegan a compartir criterios de identificación y recuento de diatomeas, resolviéndose así todos los problemas ya descritos.

Algunos ejemplos de criterios a considerar son los siguientes:

- Identificar y contar diatomeas cuyas valvas queden con más del 50% de ellas dentro del transecto fijado.
- En el caso de diatomeas rotas, si el trozo encontrado corresponde a más del 50% de la valva o incluye estructuras claves como el nódulo central del rafe, deben ser identificadas y contadas. En este caso se debe tener la certeza que al encontrar partes restantes de la valva no se considerarán como otra valva a contar.
- Si no es posible identificar el ejemplar a nivel de especie, se ubicará esta diatomea en una categoría taxonómica superior pero de la que se tenga certeza y por lo tanto se mantenga la precisión. Ej: género, género "sp x", familia, orden, etc.
- Cuando una diatomea no se puede identificar en ningún nivel taxonómico se debe anotar en la categoría "otras

diatomeas". No pueden haber en la muestra diatomeas sin ser contabilizadas en alguna categoría.

#### 4.3.5. Recuento de diatomeas

Se cuenta el número de valvas de diatomeas por muestra, por ello es necesario poner especial atención en si el ejemplar encontrado está formado por ambas valvas o si éstas se separaron. Para saber cuántas valvas se deben contar, se recomienda diseñar curvas de rarefacción para cada caso en particular. Sin embargo, Battarbee (1986), entre otros autores, recomiendan contar al menos 200 valvas por muestra, para el cumplimiento de cualquier objetivo, con un óptimo de 400.

Se barren un número determinado de transectos de modo de contar al menos las 200 valvas recomendadas (Fig. 39). El número de transectos contados corresponde a una proporción del total de los posibles a barrer en el cubreobjetos. Este número es variable, depende de la amplitud de campo de los oculares del microscopio, por ello este valor debe obtenerse realizando varias pruebas hasta definir un número X de transectos para el tipo de microscopio, de oculares y de cubreobjetos a utilizar. Una vez definidos estos, se deben mantener constantes o bien modificar los valores en la fórmula que se utilizará para calcular las abundancias de diatomeas.

Es importante considerar que nunca deben analizarse los transectos trazados en los primeros y últimos 5 campos.

Ejemplo: para un microscopio Axiostar Plus Zeiss, con oculares W-PI 10x/23, objetivo 100x y cubreobjetos utilizados para hacer el preparado permanente de 18\*18 mm, el número total posible de transectos verticales a analizar es de 65, de manera que si se cuentan 200 valvas de diatomeas en 2 transectos, es posible saber cuántas diatomeas hay de cada especie en los 65 transectos.

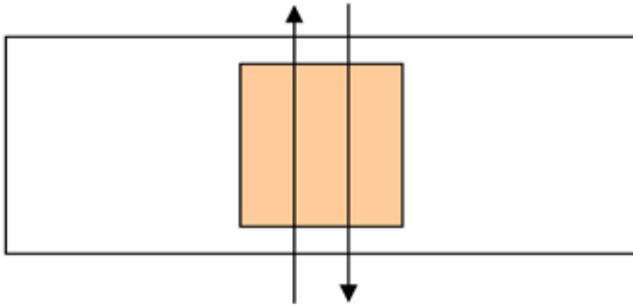


Figura 39. Transectos de recuento de diatomeas en los preparados permanentes.

#### 4.3.6. Expresión de resultados

Los resultados se expresan en número de células / unidad de área o de volumen ( $\text{cél}/\text{mm}^2$ ,  $\text{cél}/\text{mm}^3$ ). Para muestras de algas epilíticas, como es el caso de *Didymo*, se recomienda expresar los resultados de abundancia por unidad de área. La expresión es en número de células ( $N$  valvas/2), pese a que la unidad de conteo es la valva, ya que la unidad de vida de una diatomea es la célula. Sin embargo, esta diferencia entre la unidad taxonómica y la biológica, lleva a un cálculo con un error importante que debe ser asumido como tal y fluctúa entre 0 y 50%. Por ejemplo, de un total de 200 valvas contadas podría cada una de ellas corresponder a una diatomea distinta o, en el otro extremo, pudieron contarse siempre ambas valvas correspondiendo a un total 100 diatomeas (que es lo que se asume al dividir las valvas por 2, sin saber qué porcentaje hay realmente de coincidencia entre las valvas).

Un ejemplo de cálculo de abundancia expresada en  $\text{cél}/\text{mm}^3$  es el siguiente:

$$\text{cel}/\text{mm}^3 = \frac{\text{n}^\circ \text{ de valvas contadas} * \text{n}^\circ \text{ tot transectos posibles} * \text{Factor de dilución}}{2 * \text{n}^\circ \text{ transectos barridos} * \text{volumen de alícuota del preparado} * 1000}$$

Cada muestra se analiza independientemente del número de réplicas por cada punto de muestreo. Sin embargo, se genera una matriz para cada estación de muestreo que incluye todas las especies registradas en las distintas réplicas. Se determina la media de las abundancias obtenidas para las réplicas correspondientes a cada punto de muestreo, obteniéndose un valor promedio de abundancia absoluta con su desviación estándar.

Se obtiene una matriz con la media de las abundancias para cada especie en cada punto de muestreo. Además, se calculan todos los índices comunitarios posibles, tales como diversidad, equitatividad y similitud. Todos los datos de esta matriz, al estar georreferenciados los puntos de muestreo, permitirán desarrollar un análisis espacial, tan detallado como los datos lo permitan. Si el procedimiento se repite para los mismos puntos de muestreo en otros períodos, se puede realizar también un análisis temporal. Finalmente, si se tienen las matrices de datos físicos y químicos, se pueden establecer relaciones entre las especies de diatomeas y las distintas variables medidas en el sistema. Cuando se cuenta con este análisis completo, para al menos 30 sistemas de un tipo particular (lagos patagónicos, ríos de igual tipología, salares altoandinos, etc.), se pueden estimar los rangos de tolerancia de los distintos taxa y así utilizar índices bióticos calibrados para nuestro país y para el tipo de sistema en el que se está trabajando.



## 5. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Didymosphenia geminata* (LYNGBYE) M. SCHMIDT 1899

• Río Baker, Región de Aysén

*D. geminata* es una diatomea pennada con rafe en ambas valvas, perteneciente al Orden *Cymbellales* (más emparentada con *Cymbella* y *Encyonema* que con *Gomphonema*). Se caracteriza por tener células de gran tamaño, alcanzando los 80-130  $\mu\text{m}$  de largo y 30-50  $\mu\text{m}$  de ancho. Sus frústulos son asimétricos respecto del eje transapical (vista valvar: Fig. 40 a y c) y pervalvar (vista cingular: Fig. 40 b y d). Presenta valvas planas, a veces con un borde marginal ligeramente sobresaliente en el límite con el ancho manto, además son lanceoladas al centro y con extremos capitados. Posee en el extremo capitado más angosto un campo poroso apical, por el que secretan polisacáridos. Con esta secreción forman un pie de mucílago mediante el cual se adhieren al sustrato (Fig. 40 c y d).

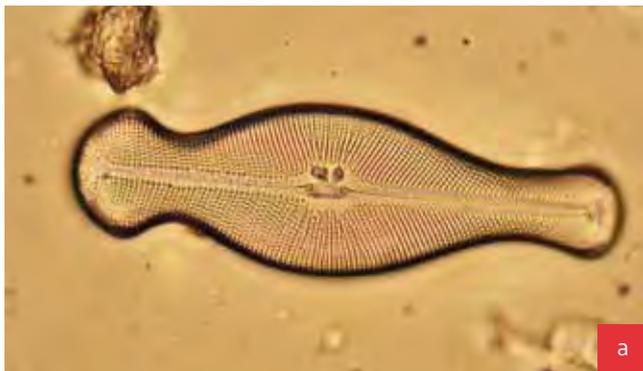


Figura 40. *Didymosphenia geminata*. 41a y c: vista valvar, 41b y d: vista cingular, 41c y d: con pie de mucílago.

*D. geminata* tiene grandes areolas que forman estrías uniseriadas (Fig. 40 a y 41). Estas estrías son paralelas en los extremos y radiales en el centro, convergentes hacia el nódulo central del rafe (Fig. 41 c), donde pueden observarse algunas estrías de menor longitud. El rafe es recto y central, con la costilla axial (o esternón) de aspecto ligeramente granuloso en la vista externa valvar (Fig. 41 c). Las fisuras terminales del rafe tienen forma de gancho mientras que estas fisuras en el nódulo central terminan

en poros expandidos (Fig. 41). En la zona del nódulo central del rafe tiene un área axial pequeña redondeada, con varios estigmas en uno de sus lados. Los estigmas se ven externamente como simples poros redondeados de mayor tamaño que las areolas pero internamente son estructuras silíceas complejas (Fig. 41 c). El cingulo está formado por 4 bandas planas por teca.

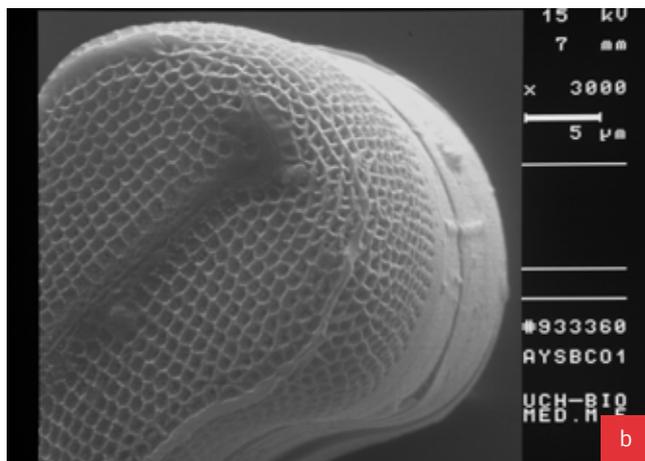
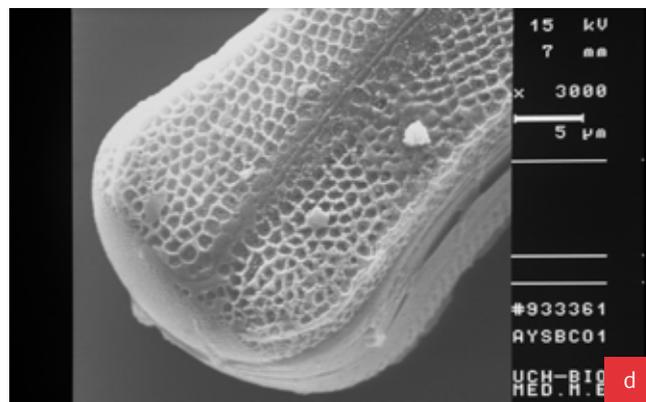
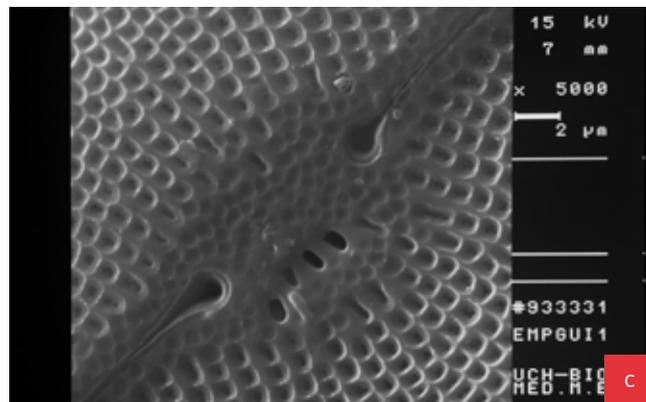


Figura 41: Ultraestructura externa de *Didymosphenia geminata*, observada con Microscopía Electrónica de Barrido. 41a: frústulo completo, 900X de aumento; 41b: polo superior, 3000X; 41c: nódulo central, 5000X; 41d: polo inferior, 3000X.

Un no especialista en taxonomía de diatomeas podría confundir *D. geminata* con alguna especie del género *Gomphonopsis* (Fig. 42 y 43), particularmente si se encuentra realizando observaciones en muestras sin digestión y con bajo aumento (Fig. 43). Esto puede ocurrir porque ambos géneros producen un pie de mucílago para adherirse al sustrato, por lo que suelen vivir en el mismo tipo de microhábitat epilítico (Fig. 44b). Además, ambos géneros tienen en común la asimetría respecto de ambos ejes,

transapical y perivalvar, sin embargo las valvas de *Gomphoneis* tienen los extremos menos capitados que *D. geminata*, con una forma más lanceolada y, también, los rangos de tamaño celulares son inferiores (Fig. 42 y 43).

Respecto de caracteres morfológicos del frústulo, *D. geminata* se diferencia de las especies de *Gomphoneis* porque estas últimas tienen estrías biseriadas, fácilmente observables al microscopio óptico y generalmente poseen un solo estigma (*G. minuta*), estructuralmente muy diferente a los de *D. geminata*. Las fisuras terminales del rafe de *Gomphoneis*, son generalmente rectas o levemente curvadas, mientras que las fisuras en el nódulo central terminan en poros marcadamente circulares.



Figura 42. *Didymosphenia geminata* versus *Gomphoneis minuta*, previa digestión y en vista valvar.



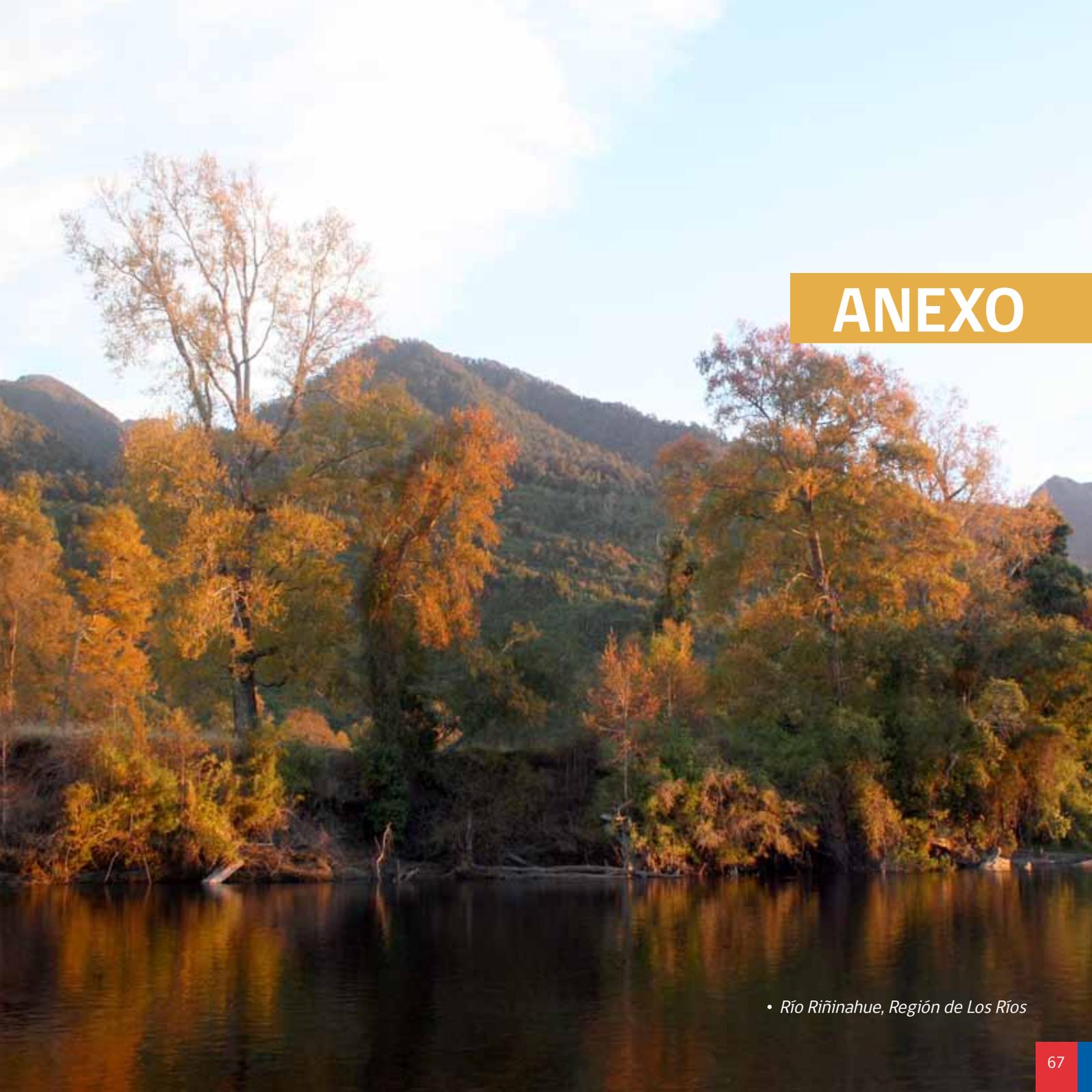
Figura 43. *Didymosphenia geminata* versus *Gomphoneis minuta*, células viables. 43a: en vista valvar: *G. minuta* a la izquierda y *D. geminata* a la derecha, 43b: *D. geminata* a la izquierda y *G. minuta* a la derecha, ambas con pie de mucilago.



## 6. REFERENCIAS

• *Río Allipén, Región de La Araucanía*

- AENOR. 2004. Calidad del agua. Guía para el muestreo en rutina y el pretratamiento de diatomeas bentónicas de ríos. 2004. UNE-EN 13946.
- BATTARBEE R (1986) Diatoms analysis. Handbook of Holocene palaeoecology and palaeohydrology. John Wiley & Sons, New York, New York, USA. 570 pp.
- Bioseguridad de Nueva Zelanda  
<http://www.biosecurity.govt.nz/pests/didymo/cleaning>
- Kelly, M.G., Yallop, M.L., Hirst, H. & Bennion, H. (2005). Sample collection. Versión 2.1. 11 pp. Unpublished DARES (Diatoms for Assessing River Ecological Status)/DALES ((Diatoms for Assessing Lake Ecological Status) protocol. <http://craticula.ncl.ac.uk/dares/methods.htm>.
- Duncan, M., Kilroy, C., Vieglais, C. & Velvin, F.. 2007. Protocol for the collection of samples for delimiting surveys for *Didymosphenia geminata* for microscopic analysis. NIWA Client Report: CHC2007-110. September 2007.
- D.S (MINECON 345)/2005. Reglamento sobre plagas Hidrobiológicas. Publ. D.O.14/12/2006.
- INN, 1996. Norma Chilena oficial NCh-ISO 411/1 Of. 96. Calidad del Agua, Muestreo Parte 1: Guía para el diseño de programas de muestreo.
- INN, 1996. Norma Chilena oficial NCh-ISO 411/2 Of. 96. Calidad del Agua, Muestreo-Parte 2: Guía sobre técnicas de muestreo continentales superficiales.
- INN, 1996. Norma Chilena oficial NCh-ISO 411/3 Of. 96. Calidad del agua-Muestreo-Parte 3: Guía sobre la preservación y manejo de las muestras.
- INN, 1996. Norma Chilena oficial NCh-ISO 411/6 Of. 98. Calidad del Agua, Mu estreo- Parte 6: Guía para el muestreo de ríos y cursos de agua.
- NCh-ISO 17025.c 2005. Requisitos para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
- CEN TC230/WG2/TG3. 2003. Water Quality: Guidance for routine sampling of benthic algae in shallow swift running waters. Comité Europeo de Normalisation.
- Kilroy, C. 2004. A new alien diatom, *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) Schmidt: its biology, distribution, effects and potential risks for New Zealand fresh waters. National Institute of Water & Atmospheric Research Ltd, NIWA Client Report: CHC2004-128, 34p. November 2004.
- Kilroy, C. & Dale, M. 2006 A comparison of sampling methods for the detection of the invasive alga *Didymosphenia geminata* in New Zealand rivers. NIWA Client Report: CHC2006-078. September 2006.
- Resolución Exenta (Subpesca) 3064/2010 y sus modificaciones que declara plaga a la especie *D. geminata* en los ríos Espolón y Río Futaleufú. Publ. D.O.13 de octubre de 2010.
- Resolución Exenta (SERNAPESCA) 1866/2010. Establece programa de vigilancia y control para el área declarada. D.O. 02 de Noviembre de 2010.
- Resolución Exenta (Sernapesca) 332/2011 Establece protocolo de limpieza y desinfección de fómites de la microalga *Dymosphenia geminata*.
- Spaulding, S.A., and Elwell, L., 2007, Increase in nuisance blooms and geographic expansion of the freshwater diatom *Didymosphenia geminata*: U.S. Geological Survey Open-File Report 2007-1425, 38 p.
- Subsecretaría de Pesca, 2010. Presencia de *Dymosphenia geminata* en Río Espolón y Río Futaleufú, región de Los Lagos. Propuesta de área de plaga (D.S 345/2005). Informe técnico D.A.C. 1681, 19 p.

A scenic landscape photograph showing a calm river in the foreground, reflecting the surrounding environment. The middle ground is dominated by a dense forest of trees with vibrant autumn foliage in shades of yellow, orange, and brown. In the background, rolling mountains are visible under a clear, light blue sky with a few wispy clouds. The overall atmosphere is peaceful and natural.

# ANEXO

• *Río Riñinahue, Región de Los Ríos*



## Ficha de terreno

### Ficha de muestreo prospección *Didymosphenia geminata*

Región: \_\_\_\_\_ ; Cuenca: \_\_\_\_\_ ; Subcuenca: \_\_\_\_\_

Código de Muestra: \_\_\_\_\_

Coordenadas límite del tramo:

E \_\_\_\_\_ ; N \_\_\_\_\_ ; E \_\_\_\_\_ ; N \_\_\_\_\_

Fecha muestreo: \_\_\_\_\_ Hora Inicio: \_\_\_\_\_ ; Hora Término: \_\_\_\_\_

Condiciones meteorológicas: \_\_\_\_\_ despejado, \_\_\_\_\_ cubierto, \_\_\_\_\_ lluvioso, \_\_\_\_\_ otro.

Longitud del Tramo seleccionado \_\_\_\_\_ ; Altitud: \_\_\_\_\_

	Tipo hábitat	Crecimiento alga	Cobertura % Según color y profundidad
Inspección visual Total de transectas visualizadas dentro del tramo	1. Rápido Profundo 2. Rápido somero 3. Lento profundo 4. Lento somero 5. Poza	1. Inicial (film) 2. Mediana (espesor < 2 cm) 3. Alta 5. Ausente	1. Pequeñas colonias 2. Mediana (10-30) 3. Alta (30 a 80) 4. Muy alta (100) 5. Ausente

#### Observaciones:

Claridad del agua: \_\_\_\_\_ Clara, \_\_\_\_\_ Ligeramente turbia, \_\_\_\_\_ Muy Turbia, \_\_\_\_\_ Otros.

Forma del canal donde se ubica el tramo:

\_\_\_\_\_ Serpenteante, \_\_\_\_\_ Sinuoso, \_\_\_\_\_ Trenzado, \_\_\_\_\_ Encajonado, \_\_\_\_\_ Con alteración de cauce.

## VARIABLES FÍSICO-QUÍMICAS

Variable	Lectura1	Lectura2	Observación
T° C aire			
T° C agua			
Oxígeno (%)			
Oxígeno (mg/l)			
pH			
CE			

Variable /Parámetro	Medición	Variable /Parámetro	Medición
Velocidad (m/s)		Ancho río (m)	
Distancia naciente a punto de muestreo (m)		Profundidad sitio muestreo (cm)	

Flujo rápido: \_\_\_\_\_; Flujo lento \_\_\_\_\_ Agua Estancada: \_\_\_\_\_

Condiciones del cuerpo de agua

Espumas en superficie;

Descargas en cuerpo de agua o riberas,

Basura en el cuerpo de agua;

Material alóctono en el río.

Porcentaje de sombra del tramo:

Sombreado con ventanas; Sombreado total; Grandes claros; Expuestos

Sustrato	< 10 %	10-50 %	> 50 %
Bloques y piedras $\geq$ 256 mm			
Bolones y gravas: 64-256 mm			
Arena: $\geq$ 2 mm			
Limo-arcilla: $<$ 2 mm			

### Actividad entorno

Agrícola \_\_\_\_\_; Ganadero \_\_\_\_\_ Industrial \_\_\_\_\_; Urbano: \_\_\_\_\_;

Servicio: \_\_\_\_\_; Acuicultura; \_\_\_\_\_ Embalse \_\_\_\_\_; Eutroficación \_\_\_\_\_

Desagües, ductos \_\_\_\_\_; Poblados \_\_\_\_\_; Otro \_\_\_\_\_.

Recreativo: Especificar algunos (pesca, rafting, kayak, camping, etc)

### Ubicación del sistema

1. Bajo Lago
2. Afluente
3. Otro

**Zona del río muestreada: - nacimiento, zona media del río; zona baja**

Biota	Observaciones
Fitoplancton	
Fitobentos	







Subsecretaría  
de Pesca

Gobierno de Chile

**OIRS Valparaíso**

FONO: 800-330-066

MAIL: [oirsvalpo@subpesca.cl](mailto:oirsvalpo@subpesca.cl)

[oirs@subpesca.cl](mailto:oirs@subpesca.cl)

[www.subpesca.cl](http://www.subpesca.cl)