

2^{da} Edición

**Manual para el monitoreo e
identificación de la microalga bentónica
*Didymosphenia geminata***



Subsecretaría
de Pesca y
Acuicultura

Gobierno de Chile

Imagen de portada : Río Espolón, Región de Los Lagos



**Manual para el monitoreo e
identificación de la microalga bentónica
*Didymosphenia geminata***

2^{da} Edición

PROPIEDAD INTELECTUAL:

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

AUTOR :



AMAKAIK CONSULTORIA AMBIENTAL SPA

E-mail: contacto@amakaik.cl

Web: www.amakaik.cl

Desarrollado en el marco del Proyecto FIP 2013-25:
"Evaluación de *Didymosphenia geminata* (Didymo) en cuerpo de agua de la zona centro-sur", del Fondo de Investigación Pesquera y Acuicultura, de la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura.

Autor
AMAKAIK, CONSULTORIA AMBIENTAL

Equipo de autores, edición y fotografía

Carolina A. Díaz P.

Flavia T. F. Salcedo D.

Magaly P. Olivares O.

Nora I. Maidana

Edición, diseño y diagramación original

Cristián Henríquez P.

Agencia Oops!!

Propuesta metodológica modificada de la primera edición del manual homónimo. Versión revisada y actualizada según juicio de experto.

AGRADECIMIENTOS

El equipo de AMAKAIK agradece a los profesionales del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura y la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, que han apoyado todo el proceso de estudio de la Plaga *Didymosphenia geminata* en Chile: Leonardo Núñez M.(*), Alicia Gallardo L., Érika Silva F., Gonzalo Malhue F., Ricardo Sáez P., Georgina Lembeye V.(*), Daniela Guajardo V., Eugenio Zamorano V., Natacha Valenzuela y Alejandro Barrientos P. Las metodologías plasmadas en este manual se han visto mejoradas gracias a la permanente discusión generada en los distintos proyectos ejecutados con dichas instituciones a las que pertenecen o pertenecían (*) los profesionales mencionados.

PRÓLOGO

En agosto del año 2010, se declaró la primera área de plaga a causa de la microalga bentónica *Didymosphenia geminata*, de acuerdo al D.S. (MINECON) N°345 de 2005, posteriormente el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura promulgó el correspondiente Programa de Vigilancia, Detección y Control para esta especie plaga. En vista de ello, a fines de 2011 la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura financió la elaboración de la primera edición del manual para el monitoreo e identificación esta microalga.

Este manual es de libre acceso y se encuentra disponible tanto en formato papel como en formato digital en la página web de la Subsecretaría (www.subpesca.cl). El objetivo es entregar un documento basado en el conocimiento científico y técnico que sirva como guía para la realización del monitoreo y/o la identificación de esta microalga, ya sea para fines de investigación, docencia, como también para monitoreos oficiales. Cabe destacar que tras la primera detección de la especie en territorio chileno no existía material de este tipo.

Actualmente esta microalga presenta una distribución que comprende desde la Región del Biobío hasta la Región de Magallanes, realizándose continuos monitoreos respecto de su presencia en diferentes cuerpos de agua, a lo que se suman las campañas de prevención de dispersión de la especie plaga, tareas desarrolladas por esta Subsecretaría y por el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura.

Esta nueva edición del manual busca seguir entregando una herramienta práctica que permita llevar a cabo una correcta toma de muestra y análisis de la misma, para la vigilancia, detección y control de *Didymosphenia geminata* en cuerpos de agua terrestre en territorio nacional.

Raúl Súnico Galdames
Subsecretario de Pesca y Acuicultura
Vaparaíso, septiembre 2016



Alto Biobío, Región de la Araucanía

CONTENIDOS

1.	ANTECEDENTES.....	13
2.	MUESTREO.....	15
2.1.	Preparación en gabinete del muestreo en terreno.....	18
2.1.1.	Selección área de muestreo.....	18
2.1.2.	Materiales de muestreo.....	19
2.2.	Muestreo en terreno.....	19
2.2.1.	Inspección visual de Didymo.....	19
2.2.2.	Selección del tramo de muestreo.....	19
2.2.3.	Georreferenciación.....	22
2.2.4.	Descripción del sitio de muestreo.....	22
2.3.	Muestreo físico y químico.....	22
2.3.1.	Parámetros físico-químicos <i>in situ</i>	24
2.3.2.	Variables hidromorfológicas.....	26
2.3.3.	Variables químicas.....	27
2.4.	Muestreo biológico.....	29
2.4.1.	Estimación del crecimiento mucoso.....	29
2.4.2.	Materiales de muestreo biológico.....	34
2.4.3.	Muestreo de fitobentos.....	35
2.4.4.	Muestreo de fitoplancton.....	37
2.4.5.	Fijación de muestras.....	40
3.	BIOSEGURIDAD.....	43
3.1.	Conceptos generales.....	44
3.2.	Materiales.....	45
3.3.	Barreras de contención.....	46
3.3.1.	Barrera primaria.....	46
3.3.2.	Barrera de procedimiento.....	48
3.3.3.	Barrera microbiológica.....	49
4.	PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y ANÁLISIS MICROSCÓPICOS.....	53
4.1.	Comunidad de microalgas.....	54
4.1.1.	Equipos y materiales de laboratorios.....	54

4.1.2. Procedimiento.....	54
4.2. Fitoplancton.....	56
4.2.1 Equipos y materiales de laboratorios.....	56
4.2.2. Procedimiento.....	56
4.3. Diatomeas bentónicas.....	57
4.3.1. Análisis de células viables.....	57
4.3.1.1 Equipos y materiales de laboratorios.....	57
4.3.1.2 Procedimiento.....	58
4.3.2. Oxidación de muestras para observación de diatomeas bentónicas.....	58
4.3.2.1 Equipos y materiales de laboratorio.....	58
4.3.2.2. Procedimiento.....	60
4.3.3 Obtención de preparados permanentes de diatomeas bentónicas.....	62
4.3.3.1. Equipos y materiales de laboratorio.....	63
4.3.3.2. Procedimiento.....	63
5. ANÁLISIS TAXONÓMICOS	69
5.1. Comunidad de microalgas.....	70
5.1.1. Identificación taxonómica.....	70
5.1.2. Recuento.....	72
5.1.3. Cuantificación.....	72
5.2. Diatomeas bentónicas.....	73
5.2.1. Identificación taxonómica.....	73
5.2.2. Recuento.....	74
5.2.3. Cuantificación.....	75
5.3. <i>Didymosphenia geminata</i>	77
6. MACROINVERTEBRADOS BENTÓNICOS.....	81
6.1. Materiales de muestreo y laboratorio.....	82
6.2. Metodología de muestreo.....	82
6.2.1. Muestreo cuantitativo.....	83
6.2.1. Muestreo cualitativo.....	85
6.3. Análisis en laboratorio.....	85
7. GLOSARIO.....	89
8. REFERENCIAS.....	93
9. ANEXOS.....	99
9.1 Anexo 1: <i>Checklist</i> de materiales de monitoreo de <i>Didymosphenia geminata</i>	100
9.2 Anexo 2: Ficha de muestreo.....	103

1. ANTECEDENTES

Río Baker, Región de Aysén

Didymosphenia geminata (Lyngbye) Schmidt es una diatomea unicelular bentónica que habita principalmente en sustratos rocosos, a los que se adhiere mediante un pie de mucílago, formando una masa mucosa conocida como “Didymo” o “moco de roca”. Si bien no afecta la salud humana, puede alcanzar a cubrir hasta un 100% de los sustratos, afectando la salud de los ecosistemas y, por lo tanto, la sustentabilidad ambiental de la cuenca. Así, su gran capacidad invasiva tendría implicancias ecológicas, económicas, sociales y estéticas.

Fue considerada como endémica del Hemisferio Norte, sin embargo, *D. geminata* se ha propagado alrededor del mundo, constituyéndose como plaga en varios países. En Chile fue documentada por primera vez en 1962 en el Río Cisnes (Región de Aysén) y el Lago Sarmiento (Región de Magallanes) (Asprey et al., 1964) y en el año 2010 se registró el primer afloramiento masivo en la subcuenca de Futaleufú en la Región de Los Lagos. Desde entonces se han declarado áreas de plaga desde la VIII Región del Biobío hasta la XII Región de Magallanes. Las causas más probables de la invasión serían las actividades antrópicas ligadas principalmente al turismo, tales como la pesca con mosca, kayaking y rafting.

Desde que se detectó la presencia de Didymo en Chile, varias instituciones públicas y privadas han estado a cargo de estudios para evaluar el avance de la plaga y determinar las condiciones en las que se establece. Uno de estos estudios, financiado por la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura (Subpesca) a través del Fondo de Investigación Pesquera y Acuicultura (Fipa), corresponde al proyecto “Evaluación de *Didymosphenia geminata* (Didymo) en cuerpos de agua de la zona centro-sur”, ejecutado por AMAKAIK Consultoría Ambiental.

En el marco de este proyecto, se realizó una actualización del “Manual para el monitoreo e identificación de la microalga bentónica *Didymosphenia geminata*”, desarrollado en el año 2012 a cargo de Subpesca. Esta herramienta tiene el objetivo de indicar el procedimiento adecuado para el muestreo de *D. geminata*, dando cuenta de las medidas de bioseguridad y la efectiva identificación de la especie. El presente manual señala los lineamientos para el correcto muestreo de *D. geminata* en ríos de la zona centro-sur de Chile. Primero, se indican las actividades realizadas en la preparación del terreno y se describen los muestreos físico, químico y biológico. Luego, se hace referencia al procedimiento de desinfección y consideraciones de bioseguridad. Continúa con la preparación de muestras y análisis microscópico, además de la identificación taxonómica de *D. geminata*. Finalmente, se señala el análisis de macroinvertebrados bentónicos como complemento en el estudio de la plaga.

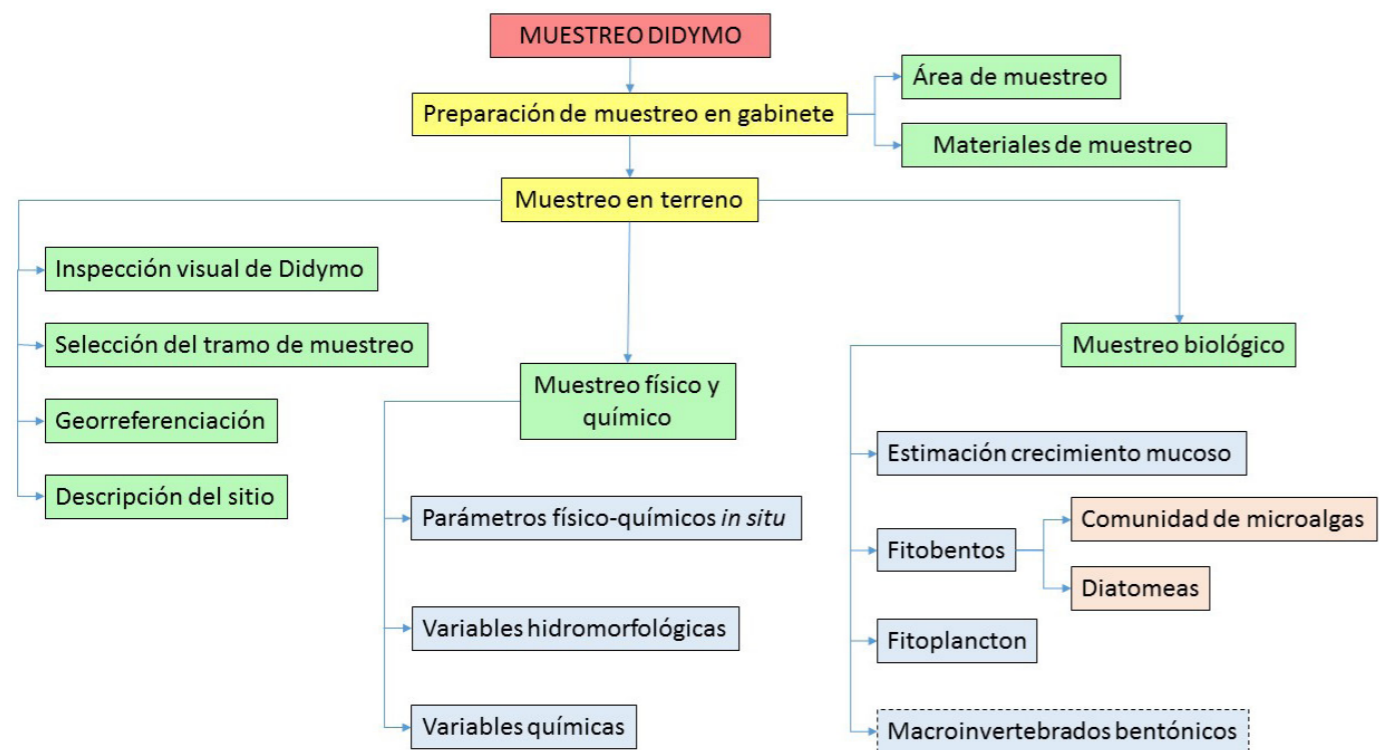
2. MUESTREO



Río Blanco, Región de los Lagos

En este capítulo se distinguen las actividades de preparación y metodología *in situ* del muestreo, indicando las etapas de preparación, parámetros a medir y consideraciones en terreno. El resumen de las actividades se encuentra en el esquema de la Figura 1.

Figura 1. Actividades de muestreo Didymo.



Río Pucón, Región de la Araucanía

2.1. Preparación en gabinete del muestreo en terreno

Previo al muestreo en terreno, es necesario preparar algunos aspectos en gabinete con el fin de asegurar las actividades a realizar y el equipo en terreno. En primer lugar, se deben preseleccionar los ríos a muestrear, principalmente considerando las presiones antrópicas y logísticas. La factibilidad de muestreo se evalúa durante la ejecución de la campaña.

Cabe señalar, que los ríos preseleccionados idealmente se ubican en la parte alta de la cuenca o corresponden a tramos altos de ríos de gran extensión. Esto, debido a que *D. geminata* se ha registrado como plaga principalmente en la zona más cordillerana, tanto por sus características hidráulicas como físico-químicas.



Figura 2. Actividad asociada a la dispersión del Didymo (kayaking).

2.1.1. Selección área de muestreo

Para seleccionar el área de muestreo es importante considerar las actividades realizadas en los sitios, ya que el vector antrópico es indicado como el principal responsable de la dispersión de Didymo, es decir, la propagación de la plaga a otros ríos. Históricamente, actividades como kayaking, rafting, trekking, pesca deportiva y recreativa, se han señalado como los vectores de dispersión y se considera un factor fundamental al momento de seleccionar el punto de muestreo. Sin embargo, no existen estudios respecto del aporte que cada una de estas actividades podría tener en la dispersión real de la plaga.

Además, se debe tener en cuenta el régimen fluvial, la existencia de zonas con vulnerabilidad ambiental y la influencia de los afluentes de mayor importancia, entre otros.

A partir de esto se deben definir los puntos a muestrear, idealmente aguas arriba y aguas abajo de un afluente de importancia, identificando su acceso y representatividad de los distintos hábitats del río.

Cada punto de muestreo se caracteriza en función del estado de la plaga, así se distinguen puntos de prospección, de vigilancia y de monitoreo (Res. Ex. N°1070). Aquellos puntos que no se han muestreado previamente corresponden a puntos de prospección; los puntos que han sido muestreados y no han presentado Didymo anteriormente son puntos de vigilancia y los puntos que han sido muestreados y han presentado Didymo, corresponden a puntos de monitoreo.

2.1.2. Materiales de muestreo

Para poder cumplir con el objetivo de terreno se debe contar, por lo menos, con los siguientes materiales:

- GPS
- Electrodo para medir pH, conductividad eléctrica (CE), oxígeno y temperatura
- Soluciones de calibración para los electrodos
- Huincha métrica (> 50 m)
- Flujómetro
- Fichas de terreno, idealmente impresas en papel resistente al agua
- Cámara fotográfica
- Frascos para muestreo químico
- Contenedores herméticos y aislantes
- Set de muestreo para muestras biológicas
- Vestuario e implementos de seguridad

En el Anexo I se puede encontrar un *checklist* con todos los materiales necesarios para el muestreo de *D. geminata*.

2.2. Muestreo en terreno

Una vez en terreno, se deben realizar actividades dirigidas a identificar la presencia de Didymo en el área, seleccionar el tramo de muestreo y realizar su descripción.



Figura 3. Preparación en terreno

2.2.1. Inspección visual de Didymo

La selección previa del área de muestreo señalada en la sección 2.1.1 no garantiza el muestreo de puntos idóneos en terreno. Es por esto que la primera actividad en el sitio de muestreo corresponde a una inspección visual, con el objetivo de maximizar la posibilidad de encontrar Didymo si la zona estuviera infectada. Para ello, se recorre el área buscando indicios (mucosidad sospechosa) de la plaga en el sustrato rocoso o en la vegetación ribereña.

2.2.2. Selección del tramo de muestreo

Una vez realizada la inspección del sitio de muestreo, se debe evaluar el tramo a muestrear y verificar si cumple con las siguientes características.

- Accesibilidad que garantice las condiciones de seguridad impuestas para el trabajo en terreno.
- Que el tramo represente de los distintos hábitats del río.
- Condiciones hidráulicas y físicas que sean características para el desarrollo de afloramientos de Didymo.

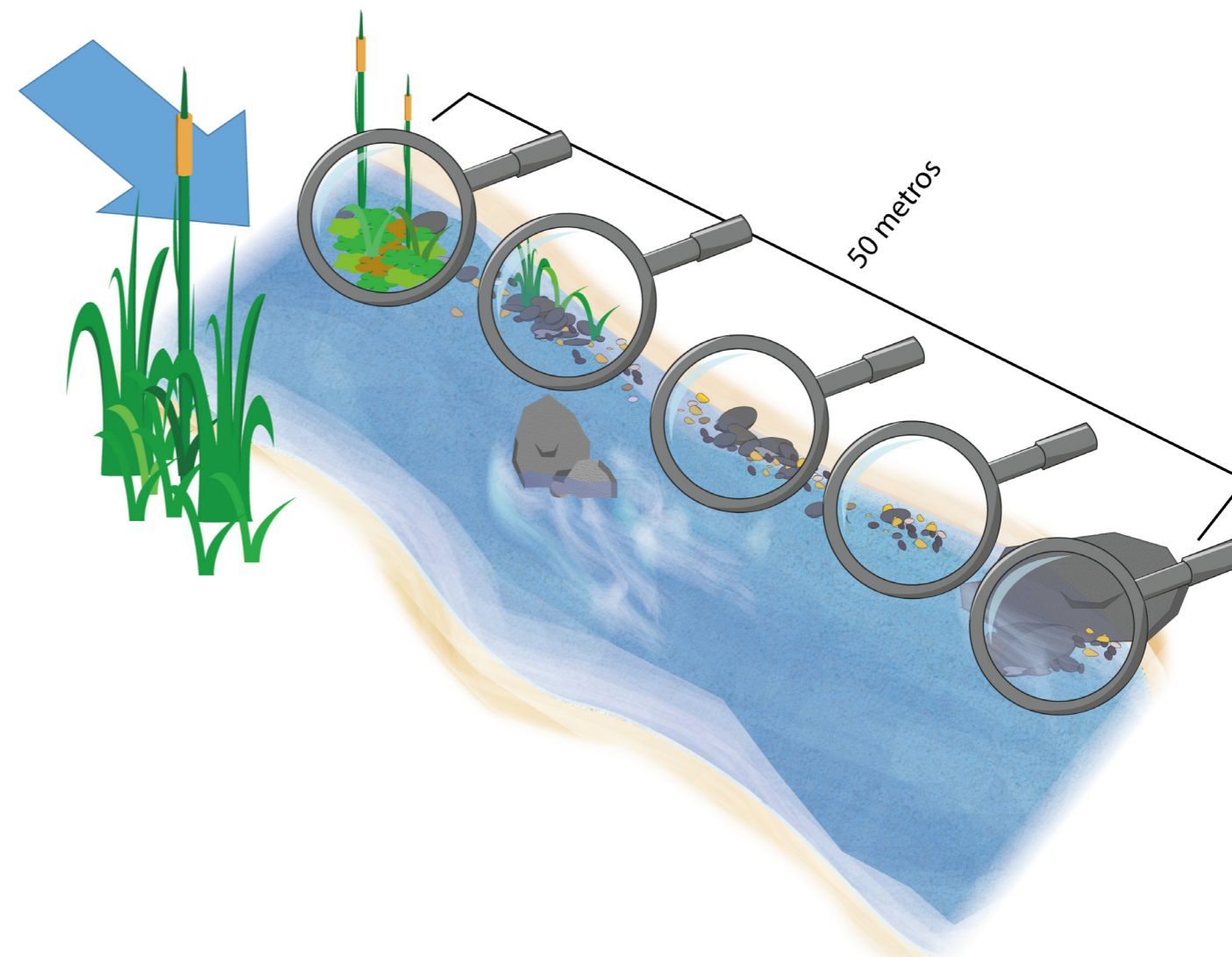
- Tipo de sustrato (rocoso) y profundidad (somera) favorables para las actividades de muestreo.
- Que el tramo sea lo menos sombreado, natural o artificialmente, posible.
- Que el tramo seleccionado no esté en zonas intervenidas (extracción de áridos, puentes, descargas, etc.), a menos que se considere relevante y de acuerdo con la pregunta de estudio.

A partir de estas consideraciones, se selecciona un tramo representativo de aproximadamente 50 metros paralelos a la línea de costa del río, de manera de capturar la variabilidad del sitio.

Figura 4. Tramo de línea de costa del río



Figura 5. Tramo de muestreo de un río



La Figura 5 representa un tramo de muestreo. Generalmente, el tramo es heterogéneo, con distintos hábitats que deben ser señalados en la ficha de muestreo, tales como presencia de vegetación, bolones, arena, etc.

Sin embargo, para efectos del estudio de Didymo, el tramo debe presentar sustrato rocoso y una profundidad menor a 0.6 m, características que se relacionan con el desarrollo de la plaga.

2.2.3. Georreferenciación

El inicio y fin del tramo deben ser georreferenciados para reducir la posibilidad de error en el registro de un único dato. Cada registro debe ser anotado en la ficha de muestreo (ANEXO II), información que es utilizada posteriormente en la elaboración de cartografía.

2.2.4. Descripción del sitio de muestreo

El sitio de muestreo debe ser caracterizado de acuerdo a sus condiciones ecológicas, hidromorfológicas y ambientales, según los parámetros indicados en la ficha de muestreo (ANEXO II).

En esta ficha se debe indicar información relevante sobre el sitio, que eventualmente pueda ayudar en el análisis de resultados. Los ítems a completar corresponden a información general del sitio de muestreo, como el código del punto, nombre del río, ubicación espacial y temporal; georreferenciación indicando altitud y longitud del tramo; descripción de la actividad del entorno; descripción visual del tramo, condiciones meteorológicas, tipo de hábitat, presencia o ausencia de Didymo, entre otros; parámetros *in situ* como temperatura del agua; variables hidromorfológicas, como velocidad de la corriente, profundidad y sustrato; tipo de muestras obtenidas, ya sean de diatomeas bentónicas, macroinvertebrados bentónicos, microalgas planctónicas o bentónicas y observaciones generales sobre acceso al sitio de muestreo, presencia de turistas, condición de la ribera, etc.

Se debe especificar el volumen o área muestreada, tiempo de recolección de la muestra de plancton y cualquier detalle respecto a la toma de muestras que pueda influir en su posterior preparación y análisis.

2.3. Muestreo físico y químico

Todas las variables descritas a continuación deben ser medidas para conocer el contexto físico y químico en el que se puede encontrar o no a la plaga. Si no se hiciera, se perdería la posibilidad de comparar estos resultados en el tiempo.

Los parámetros físico-químicos y las variables hidromorfológicas deben ser medidas al inicio y término del tramo, de modo de reducir la probabilidad de error de una única medición.

Es importante destacar que una vez utilizados los instrumentos de medición, estos deben ser desinfectados, mediante la remoción y lavado de cada electrodo o equipo. Luego de realizar el protocolo de desinfección, los electrodos deben ser lavados con agua destilada y ser sometidos a la solución que indique el fabricante. Las instrucciones de bioseguridad se detallan en el Capítulo 3.



Río Pedregoso, Región de Aysén

2.3.1. Parámetros físico-químicos *in situ*

Los parámetros mínimos a registrar son temperatura, pH, conductividad, oxígeno disuelto y saturación de oxígeno. Los instrumentos a utilizar para su medición deben ser adecuados para el trabajo en terreno, es decir rápidos, precisos y con compensación de temperatura (ATC). En este sentido, existe una diversidad de equipos en el mercado como sondas multiparamétricas y equipos específicos para cada parámetro. Es esencial calibrar los electrodos previo al muestreo en terreno y mantener los equipos con las soluciones indicadas por el fabricante.

A continuación se detalla el procedimiento de medición de cada parámetro y algunas recomendaciones.

Tabla 1. Parámetros físico-químicos *in situ* y metodología de muestreo.

Parámetro	Metodología
Temperatura del agua (°C)	Lo ideal es utilizar un equipo multiparamétrico con rango de temperatura de 0°C - 60°C; resolución 0,1°C y precisión ±0,5°C.
pH	El equipo debe tener compensación automática y ser resistente a la contaminación por sales y otras sustancias que entren en contacto con electrodo. El rango ideal del equipo es pH 0,0 - 14,0; resolución de 0,01 y precisión ±0,02. Para su correcta calibración, utilizar el manual del fabricante y las soluciones buffer pH 4,01; pH 7,01 y pH 10,01. Además, se debe registrar la fecha y hora de calibración.
Conductividad eléctrica (CE)	El equipo debe tener compensación automática. El rango adecuado del equipo es 0 - 3999 uS/cm; resolución de 1 US/cm y precisión ±2% F.S. Para su correcta calibración, utilizar el manual del fabricante y la solución adecuada al electrodo. Además, se debe registrar la fecha y hora de calibración.
Oxígeno disuelto (mg/l)(CE)	El equipo debe ser de alta precisión con medidor de temperatura y compensación automática de altura y salinidad, además de poseer cubierta protectora de membrana. El rango adecuado del equipo es 0,00 a 45,00 mg/L o 0a 300 % (saturación de oxígeno).



Figura 6. Preparación de sonda multiparamétrica



2.3.2. Variables hidromorfológicas

Un parámetro importante a considerar es la velocidad de corriente. Mediante su medición es posible caracterizar los distintos mesohabitats en un tramo de río y conocer la distancia muestreada de microalgas planctónicas usando la red de fitoplancton (ver sección 2.2.4). Para obtener una medida más precisa de la velocidad, se requieren instrumentos digitales como el “flujómetro”. Si bien se han usado otras metodologías, como derivadores flotantes, estas no son confiables (alta variabilidad), registran solo velocidad superficial y no son comparables con las metodologías actuales. Se recomienda medir las velocidades de fondo, media y superficial, tanto al comienzo como al final del tramo. Es importante siempre registrar la profundidad del punto en que se mide la velocidad, ya que indica el contexto en el que se realiza la medición.



Figura 7. Medición de velocidad de corriente utilizando flujómetro

“Método de los puntos” para medición de velocidad de corriente

La velocidad media en la columna de agua se determina mediante el método de los puntos, en el que se realizan varias mediciones a lo largo de la columna de agua según la profundidad que tenga (Charlton, 2008). Para profundidades menores a 50 cm, se mide la velocidad a 0.6 veces la profundidad. En este caso, la velocidad media es igual a la medida. Para profundidades comprendidas entre 50 cm y 150 cm la velocidad es medida a dos profundidades distintas, a 0.2 y 0.8 veces la profundidad. La velocidad media se determina mediante la siguiente fórmula:

$$V_m = \frac{V_{0,2} + V_{0,8}}{2}$$

Donde:

V_m es la velocidad media de la columna de agua (m/s)

$V_{0,2}$ es la velocidad medida a 0,2 veces la profundidad (m/s)

$V_{0,6}$ es la velocidad medida a 0,6 veces la profundidad (m/s)

$V_{0,8}$ es la velocidad medida a 0,8 veces la profundidad (m/s)

Otra variable a considerar es el tipo de sustrato del tramo de río. Las metodologías para definirlo van desde caracterizaciones en laboratorio hasta la descripción cualitativa *in situ*. Actualmente, el método utilizado en la mayoría de los muestreos es el Sistema Unificado de Clasificación de Suelos (USCS) que se encuentra indicado en la ficha de muestreo del ANEXO II.

2.3.3. Variables químicas

Entre las numerosas variables químicas a medir, las más consideradas son fósforo, fosfato, calcio, hierro, nitrato, nitrito y silicato, debido a su importancia en estudios de la plaga. Se recomienda realizar también un análisis de turbidez, variable física que puede determinarse *in situ* o en laboratorio. Las metodologías empleadas para la medición en laboratorio de estos parámetros deben ser revisadas constantemente, según su nivel de detección, normas aplicadas, etc.

Si bien la cantidad de muestras y los parámetros a medir dependen de aspectos generales como los objetivos del estudio, las condiciones del muestreo en terreno y los recursos disponibles, la medición de las variables químicas es esencial en un programa de vigilancia. Generalmente se obtiene solo un set de muestras de agua para análisis químicos por río, sin réplica.

Para la toma de muestras de agua existen metodologías estandarizadas para cada país. En este caso, el detalle sobre programas de muestreo se encuentra en la norma NCh 411/1, muestreo de aguas superficiales y preservación de muestras en la norma NCh-ISO 411/10 y muestreo de ríos en la norma NCh-ISO 411/6.

Ante cualquier duda, debe consultar con el laboratorio encargado del análisis de muestras.

Generalmente, el laboratorio seleccionado para realizar el análisis de las muestras exige el transporte de estas bajo cadena de frío (4°C) y completar la cadena de custodia, la que permite identificar cada muestra ingresada al laboratorio. Se recomiendan laboratorios químicos con acreditación a la NCh-ISO 17025 (normativa sobre requisitos para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, INN-Chile) que siguen las metodologías estándar de análisis.

Al momento de seleccionar el laboratorio de análisis químicos se deben evaluar los límites de detección de cada analito. Generalmente los sistemas límnicos estudiados poseen concentraciones muy bajas de nutrientes, por lo que es recomendable que el laboratorio trabaje dentro de los límites de detección adecuados. Además, debe estar certificado.



2.4. Muestreo biológico

Este debe considerar como mínimo el muestreo de la comunidad de fitobentos (comunidad de microalgas completa a nivel de género y diatomeas bentónicas a nivel de especie) y fitoplancton. Para una mayor comprensión del fenómeno Didymo, es recomendable muestrear otras comunidades específicas, como macroinvertebrados bentónicos, como se detalla en el Capítulo 6.

Para comenzar, previo al muestreo biológico, se debe indicar la presencia o ausencia de mucosidad sospechosa, indicando la estimación de su espesor y cobertura. Posteriormente, el análisis microscópico permitirá determinar si se trata de Didymo u otra microalga con desarrollo mucoso.

2.4.1. Estimación del crecimiento mucoso

Se conoce como Didymo al desarrollo mucoso macroscópico producido por *Didymosphenia geminata*, la que forma un pie de mucílago compuesto por polisacáridos para adherirse al sustrato. Este material mucilaginoso puede proliferar en grandes extensiones del lecho del río, principalmente sobre sustratos rocosos. A su vez, existen otras diatomeas que también producen pedúnculos mucilaginosos, como especies de los géneros *Gomphoneis*, *Gomphonema*, *Rhoicosphenia* y *Cymbella*, las que pueden coexistir o no con la especie plaga.

En cada hábitat del tramo de muestreo, se debe estimar visualmente el crecimiento mucoso,

clasificándolo en una de las siguientes categorías: Ausente, Inicial, Mediano, Alto y Muy Alto, según Espesor y Cobertura:

Espesor: se mide el grosor de la mucosidad en centímetros, estimando la situación general del tramo.

1. **Ausente:** no se observa mucosidad.

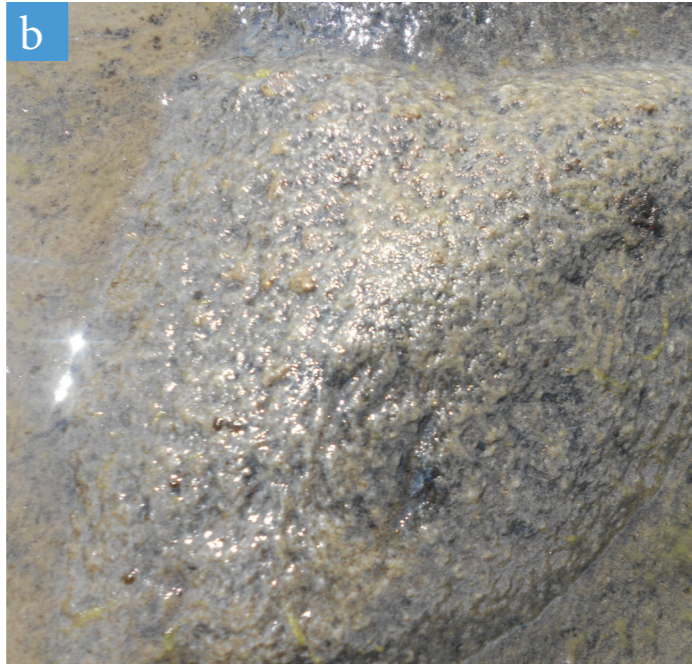
2. **Inicial:** espesor no supera los 0.2 cm. Corresponde a un film de microalgas en el sustrato.

3. **Mediano:** espesor mayor o igual a 0.2 cm y no supera 1 cm. La mucosidad puede presentarse parchosa o cubriendo una amplia zona del sustrato.

4. **Alto:** espesor mayor o igual 1 centímetro y no supera 2 cm. Generalmente en esta categoría presenta una cobertura alta, aunque puede presentarse en pequeñas agregaciones.

5. **Muy alto:** el espesor es igual o mayor a 2 cm.

Figura 8. Espesor de Didymo a) Ausente, b) Inicial, c) Mediano, d) Alto, e) Muy alto



Cobertura: se estima la extensión de la mucosidad sobre el sustrato en porcentaje.

1. **Ausente:** no se observa mucosidad.

2. **Inicial:** cobertura menor a un 20% de pequeñas agregaciones de mucosidad. Corresponde a un crecimiento inicial de coloración pardosa.

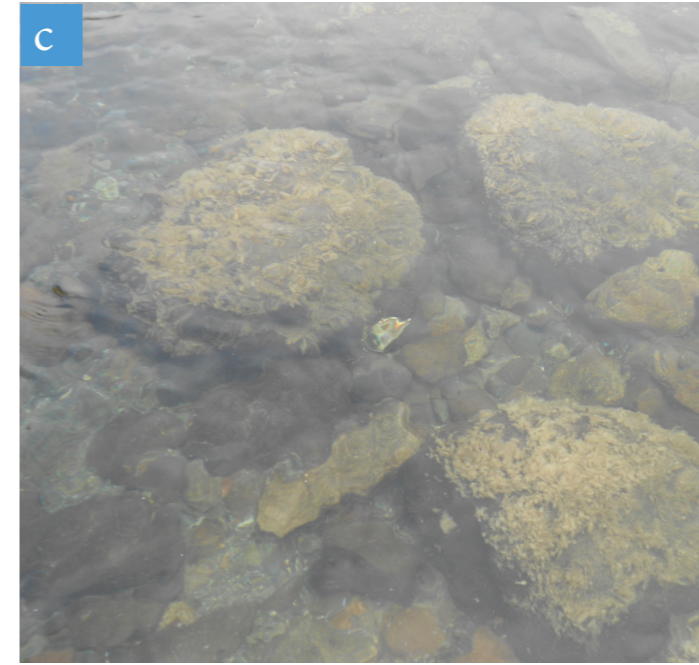
3. **Mediana:** cobertura mayor o igual a un 20% y no supera el 50%. Los parches pueden coalescer hasta cubrir completamente rocas individuales.

4. **Alta:** cobertura mayor o igual a un 50% y no supera el 80%. En el caso de *Didymo*, al aumentar la longitud y grosor, puede haber una menor proporción de células. Además, en condiciones de sequedad adquiere el aspecto de papel mojado.

5. **Muy alta:** cobertura completa, más del 80% del lecho de río se encuentra cubierta de mucosidad. Mientras la colonia celular envejece y muere, el mucílago puede persistir meses. La vegetación ribereña y otros sustratos pueden presentar mucosidad.

Es esencial el análisis microscópico de las muestras, ya que la ausencia de mucosidad no significa que *Didymosphenia geminata* no se encuentre en el tramo. Por ello, se debe confirmar en laboratorio la presencia o ausencia de la plaga y además, evaluar la presencia de otras diatomeas que produzcan mucílago.

Figura 9. Cobertura de *Didymo* a) Ausente, b) Inicial, c) Mediano, d) Alto, e) Muy alto, f) Muy altos



2.4.2. Materiales de muestreo biológico

Considerando la comunidad de fitobentos y fitoplancton, los materiales necesarios para el muestreo son los siguientes:

- Cepillos para áreas de 4 cm² de raspado (puede ser una espátula o bisturí de longitud conocida)
- Frascos plásticos de 40 ml, con contratapa (para las muestras raspadas y las de fitoplancton)
- Jeringas despuntadas para muestreo de material mucoso
- Espátulas de madera (por ejemplo, palos de helado o similar) para depósito de mucosidad en la jeringa
- Tubos de polipropileno de 15 ml (para muestras de material mucoso)
- Red Didymo (plancton)
- Redes de apertura de malla de 40µm para captura de muestra en cono de red Didymo
- Vástago para red Didymo
- Guantes de vinilo
- Huincha aisladora
- Etiquetas resistentes al agua
- Lápiz con mina de grafito o especial para papel de etiquetas
- Lugol
- Formalina



Figura 10. Kit de muestreo biológico

Como medida de bioseguridad, utilizar en lo posible materiales descartables, como frascos, tubos, guantes, etc. El resto de los materiales debe ser desinfectado en caso que entren en contacto con el agua. Para más detalles, ver el Capítulo 3.

2.4.3. Muestreo de fitobentos

El muestreo de fitobentos consiste en la recolección de microalgas bentónicas desde un área o un volumen conocidos de una superficie. Para lograr una mayor representatividad de la comunidad, los muestreos Didymo consideran la obtención de una muestra integrada compuesta por 5 réplicas. Mediante este muestreo es posible realizar análisis de la comunidad de microalgas completas y/o específicamente de diatomeas bentónicas. La diferencia entre estas radica en la preparación de la muestra y el nivel de identificación taxonómica. Por un lado, en el análisis de la comunidad de microalgas completa se pueden distinguir géneros de varias Clases como *Bacillariophyceae*, *Cyanobacteria*, *Ulvophyceae*, etc., mediante una preparación simple de la muestra, descrita más adelante. En cambio, el análisis de diatomeas bentónicas solo considera la identificación de especies de la Clase *Bacillariophyceae* (al cual pertenece *D. geminata*), luego de un complejo procedimiento de preparación, descrito en la sección 4.3.

D. geminata suele encontrarse en sustratos rocosos, que coloniza eficazmente debido a la producción de un pie de mucílago por el que se adhiere fuertemente al sustrato y le permite resistir a la velocidad de la corriente. Es por esto que para el muestreo de *D. geminata* y la comunidad de microalgas bentónicas asociada, se recomienda elegir rocas protegidas de la corriente, cada una correspondiente a una réplica. Dado que el tramo de muestreo suele ser heterogéneo, con diversos hábitats, lo ideal es muestrear rocas asociadas a cada microhábitat (Fig. 5).

Cada réplica se obtiene mediante el raspado del film de microalgas adherido a la roca, cubriendo un área de 4 cm², utilizando un cepillo (u otro material de área conocida). Si hay abundante material mucoso, se debe extraer un volumen de 1 cm³ por roca, utilizando una jeringa despuntada (Fig. 12). Si bien el área y volumen señalados en este manual son solo una referencia, es importante registrar siempre en la ficha de muestreo cual fue el método de muestreo y la cantidad de muestra. Las 5 réplicas raspadas se depositan en un solo frasco plástico de 40 ml mientras que en el caso de muestreo de volumen, las 5 réplicas se depositan en un solo tubo de propileno. Ambos tipos de análisis, comunidad de microalgas completas y diatomeas bentónicas, requieren de una muestra integrada independiente.

Todas las muestras deben ser fijadas *in situ* previo a su transporte, con lugol para el caso de la comunidad de microalgas completa y formalina para las diatomeas bentónicas. Los detalles del procedimiento de fijación de muestras se encuentran en el punto 2.5 de este capítulo.



Figura 10. Raspado de film de microalgas

Cada frasco y tubo deben ser etiquetados con marcadores apropiados, registrando el código de estación, tipo de muestra, cantidad de réplicas (áreas o volúmenes), fecha, hora y cualquier información relevante para el posterior procesamiento y análisis de las muestras.

Finalmente, se deben sellar todos los frascos y tubos utilizados para el muestreo, cuidando que no se produzcan filtraciones.



Figura 12. Extracción de volumen de mucosidad

Todo el procedimiento de toma de muestra debe ser realizado con guantes de vinilo y no se pueden utilizar materiales de recolecta usados previamente.

Consideraciones al momento del muestreo

- El sustrato muestreado debe estar lo más protegido de la corriente que sea posible y en zonas no sombreadas artificial o naturalmente.
- La muestra integrada debe contener réplicas de un mismo tipo de sustrato, por ejemplo, rocas. En caso de observar mucosidad en vegetación, sedimento, lecho del río, etc. tomar una muestra extra y etiquetarla adecuadamente, indicando tipo de muestra y área/volumen recolectado.
- Se recomienda tomar registro fotográfico de todos los sustratos muestreados, ya sea si presentan mucosidad sospechosa o no.
- Anotar cualquier detalle relevante sobre el sustrato muestreado, indicando las características del film, color de la mucosidad, etc.
- Todo el material de muestreo debe ser descartable o haber sido desinfectado previamente para evitar contaminación.

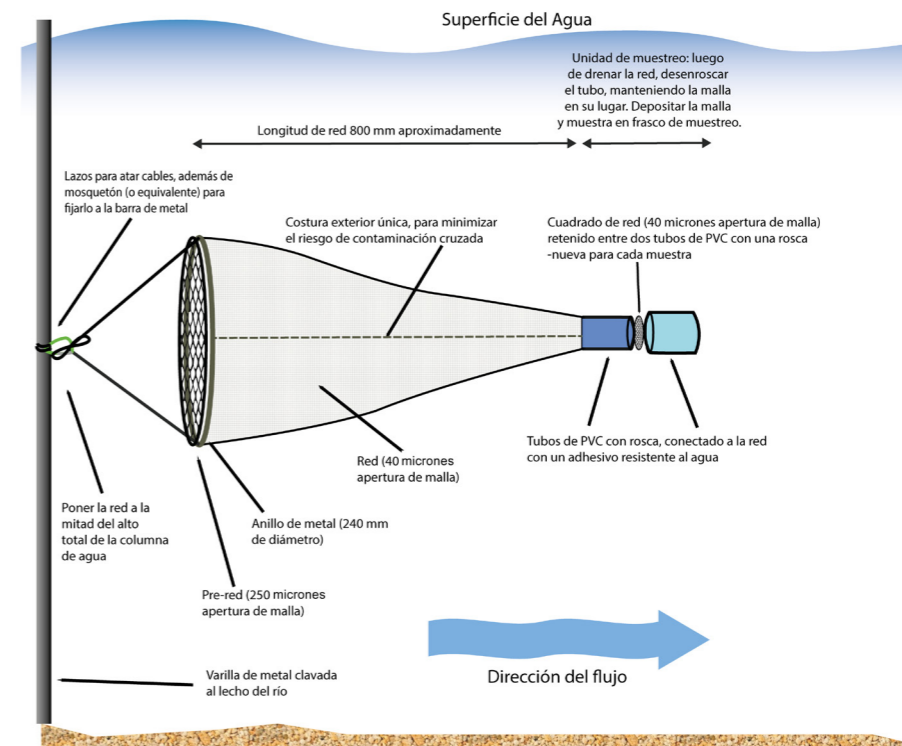


2.4.4. Muestreo de fitoplancton

La muestra de fitoplancton se obtiene solo como diagnóstico de presencia o ausencia de *D. geminata* aguas arriba del tramo muestreado. Preferentemente, esta muestra se analiza *in situ*, de manera que sirva como herramienta de planificación de los sitios de muestreo, permitiendo así, acotar el área de distribución de la plaga. Debido a que las microalgas planctónicas provienen de distintos puntos aguas arriba del tramo muestreado, estas pueden no coexistir con *D. geminata*, por lo que el análisis completo de esta comunidad no se realiza.

El sistema de muestreo consiste en una red de fitoplancton especial, llamada red Didymo, que cuenta con un tubo de PVC o cilindro receptor con una malla de apertura de 40 µm. En el extremo superior posee una malla protectora de 250 µm que evita que ingresen partículas de gran tamaño que perjudiquen la obtención de la muestra planctónica mientras que en el extremo inferior posee una malla receptora de 40 µm. Esta malla receptora se encuentra inserta entre dos tubos de PVC con rosca, los que la mantienen tensa y firme para retener las células de fitoplancton que entren al cono receptor (Fig. 13).

FIGURA 13. Sistema de obtención de muestras de *Didymosphenia geminata* en el plancton.



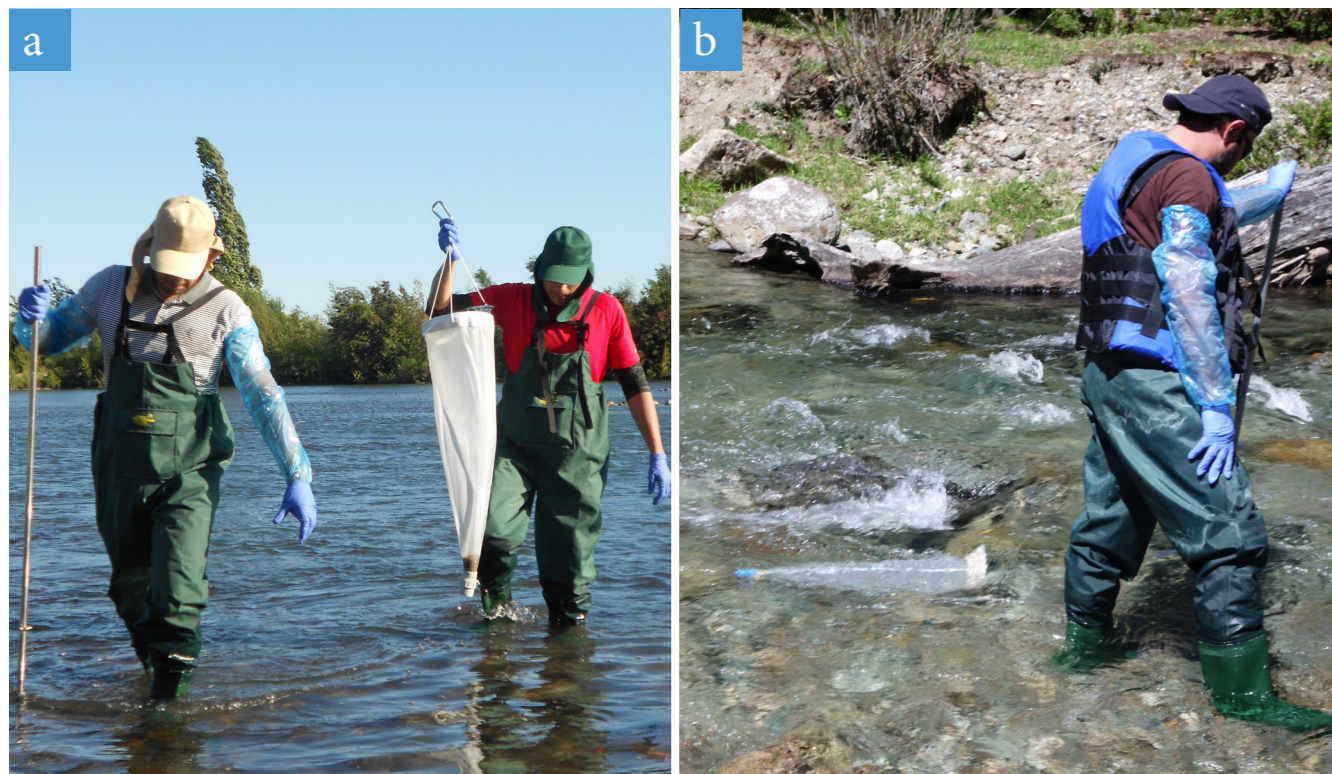
Fuente: modificado de Duncan *et al.*, 2007

La red de fitoplancton se suspende en el agua fijándola a un vástago contra la corriente por 10 minutos (de preferencia) a una profundidad tal que quede completamente sumergida, pero no en contacto con el fondo para que los sedimentos no ingresen a la muestra (Fig. 14).

El tiempo de muestreo depende de la velocidad de corriente y la cantidad de sedimento suspendido en el agua, ya que bajo condiciones severas, se saturaría, poniendo en riesgo la integridad de la red.

La malla receptora de 40 μm que recolecta la muestra se extrae del sistema y se almacena en un frasco de plástico de 40 ml, junto con un poco de agua del mismo río para que el fijador actúe sobre todas las células. Al igual que la muestra de la comunidad de microalgas bentónicas, el fijador utilizado es lugol. Por último, se debe etiquetar debidamente el frasco y sellar con cinta adhesiva. Se debe medir la profundidad y la velocidad de corriente (ver metodología en sección 2.3.2) en el punto en que se instala el sistema de muestreo, para posteriormente estimar la longitud (distancia en metros) del tramo de río que ha sido muestreado.

Figura 14 a,b. Muestreo de fitoplancton utilizando red Didymo



2.4.5. Fijación de muestras

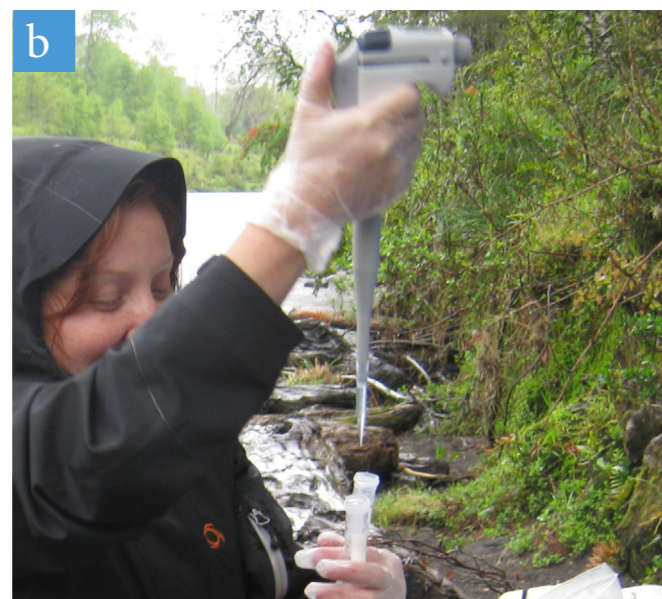
Todas las muestras biológicas obtenidas deben ser fijadas *in situ*, evitando así alteraciones en la estructura comunitaria de las microalgas (por descomposición, reproducción o depredación).

En el caso de las muestras que serán observadas frescas, es decir, sin tratamiento previo, el método de fijación no debe dañar las células de paredes blandas, siendo más apropiado el uso de lugol. Este debe adicionarse en gotas hasta que la muestra tome una coloración ámbar (Hötzl & Croome, 1999) (Fig. 15a). Se recomienda no excederse en el uso del lugol, ya que este fijador puede alterar las células, dificultando la identificación. Este método se recomienda para las muestras de comunidad de microalgas completa y fitoplancton.

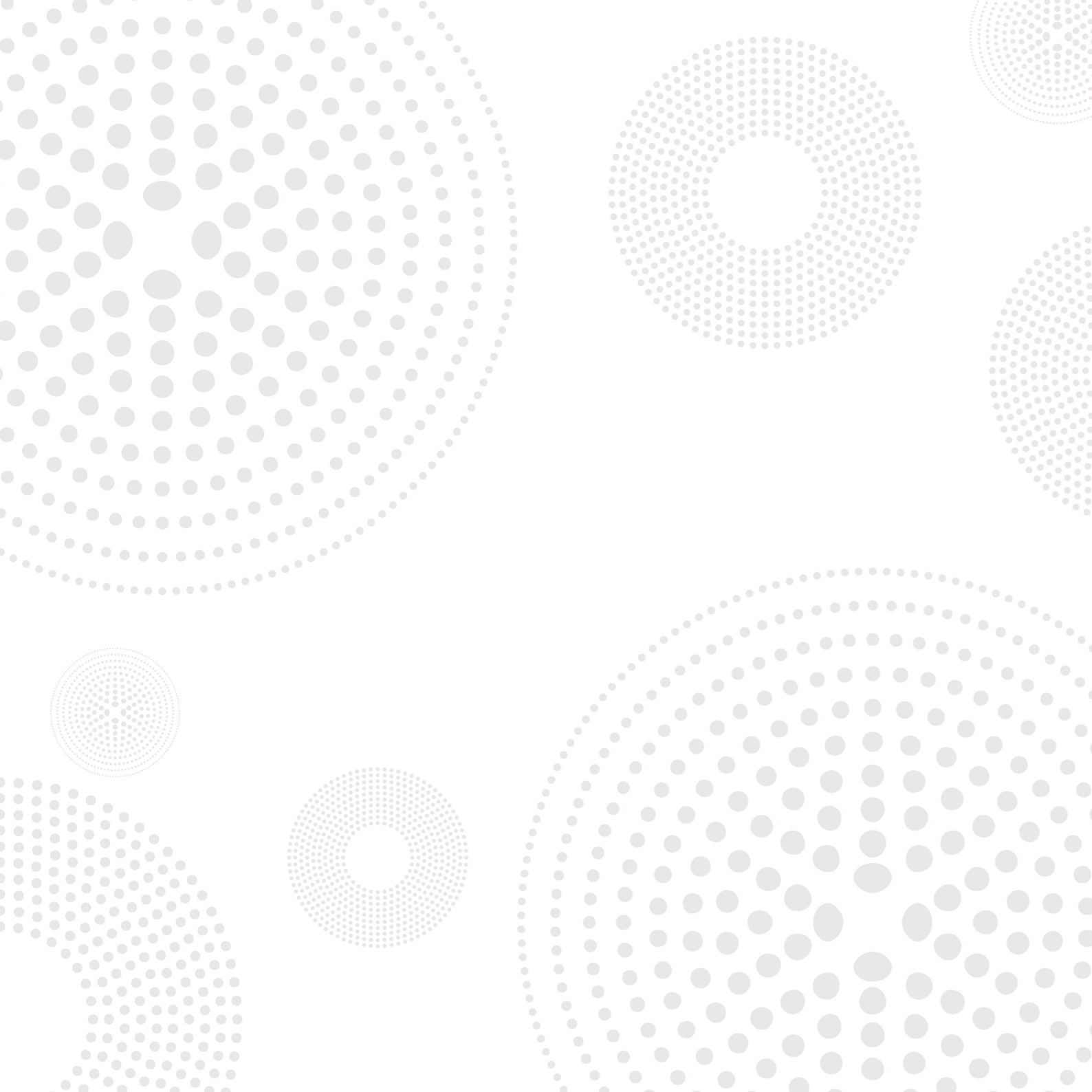
Por su parte, para las diatomeas, dado que poseen una cubierta silíceica, se recomienda el uso de formalina al 4%. Este fijador es muy eficiente y tóxico a la vez, por lo que se deben utilizar implementos de seguridad apropiados, tales como mascarilla, antiparras y guantes. Este método de fijación se recomienda tanto para muestras de diatomeas bentónicas como planctónicas (Fig. 15b).

Si no se cuenta con los fijadores mencionados, las muestras de comunidad de microalgas completa y fitoplancton pueden ser fijadas con alcohol común (de farmacia), en abundante cantidad, debiendo ser refijadas periódicamente, ya que es muy volátil y poco eficiente como fijador. En el caso de las muestras de diatomeas, se recomienda conservarlas sin fijar en un lugar fresco y oscuro, hasta su procesamiento en laboratorio.

Figura 15 a,b. Fijación de muestras utilizando lugol y formalina



Parque Nacional Vicente Pérez Rosales, Región de Los Lagos



3. BIOSEGURIDAD

Río El Salto, Región de Los Lagos

3.1. Conceptos generales

En ecología, el concepto de bioseguridad busca asegurar la permanencia ecológica de los componentes locales de un ecosistema, tanto bióticos como abióticos y sus interacciones naturales ante una actividad antrópica en desarrollo. La aplicación sistemática de dicho concepto, considera una serie de aspectos en la realización de las actividades, que buscan en conjunto y por sí solas, su sustentabilidad, además de garantizar la salud del medio ambiente y cada uno de sus elementos.

Un aspecto fundamental a considerar en los muestreos hidrobiológicos respecto de la seguridad biológica, es que el conjunto de actividades que se realizan presentan un alto potencial de propagación de especies introducidas, es decir, evolutivamente ajenas al sistema, causando no solo la dispersión de especies a nuevas áreas geográficas, sino también facilitando la generación de su condición biológica de plaga (Ministerio del Medio Ambiente, 2007; Chile, Res. Ex. 1070, 2014). Esto hace necesaria la implementación de barreras de contención durante la actividad del muestreo, que sean capaces de prevenir dicho efecto nocivo al medio ambiente (Conicyt, 2008; Chile, Res. Ex. 332, 2011).

Por otra parte, el material a ser usado en el muestreo, además de otorgar seguridad al personal durante el trabajo (cuerdas, salvavidas), debe cumplir con condiciones de higiene ambiental (mantener las condiciones naturales del área y evitar peligros a la salud humana) y sustentabilidad ecosistémica (minimizar alteraciones sobre el normal desarrollo de los procesos ambientales, como liberación de residuos; Universidad de Salamanca, 2014).

Figura 16. Preparación del equipo en terreno para bioseguridad.

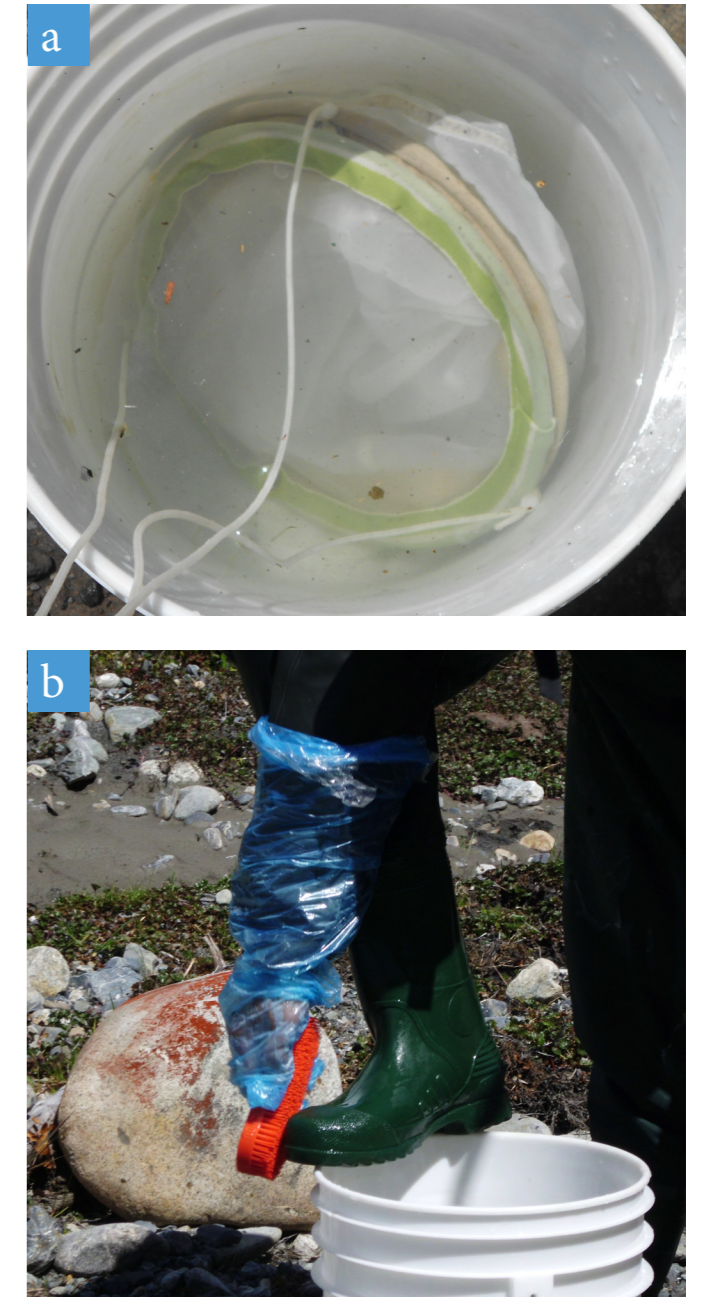


3.2. Materiales

A continuación se indica una selección de artefactos seguros para la recolecta y almacenamiento de muestras, sin que estos interfieran en la salud del medio ambiente ni negativamente en el posterior análisis de las muestras.

1. Agua potable: suficiente para realizar la desinfección de los elementos utilizados en todos los puntos de muestreo del día. Como todo muestreo biológico, se debe considerar siempre el caso extremo de escasez de recursos, en localidades aisladas.
2. Agua destilada: necesaria para limpieza de artefactos electrónicos.
3. Lavalozas: en cantidades necesarias para generar la mezcla suficiente para realizar la desinfección de todos los materiales utilizados en cada área de muestreo.
4. Balde: este es necesario para la preparación de la mezcla desinfectante y para realizar la desinfección por inmersión.
5. Escobilla: para lavar los utensilios de muestreo.
6. Pissetas plásticas: a utilizar en el lavado con agua destilada de artefactos electrónicos y el enjuague del lavalozas.
7. Fumigador manual: facilita la aplicación de la mezcla desinfectante.
8. Cuerda: utilizada, de ser necesario, para asegurar al equipo húmedo en el curso de agua. Se recomienda una cuerda de nylon de al menos 10 mm de grosor.
9. Salvavidas: indispensable en la prevención de accidentes en el interior de cuerpos de agua riesgosos.

Figura 17 a,b. Desinfección del equipo



3.3. Barreras de contención

Las barreras de contención se establecen con el fin de evitar tanto la contaminación del personal como la dispersión de la especie muestreada. Su clasificación depende del nivel de aplicación y los objetivos buscados. En el muestreo hidrobiológico de la especie *D. geminata* se establecen las barreras primaria, de procedimiento y microbiológica.

3.3.1. Barrera primaria

Esta se aplica directamente sobre el personal y corresponde al uso de ropa especial para evitar así la contaminación directa y la consecuente propagación de *D. geminata*. La selección de ropas y accesorios plásticos y lisos busca minimizar la superficie de contacto que pueda facilitar la adherencia y traslado de la especie en estudio. Los elementos seleccionados son:

- Vadeadores de PVC con botas lisas, sin antideslizante
- Guantes cortos de vinilo
- Guantes largos plásticos de uso veterinario
- Huincha adhesiva

La utilización de vadeadores permite el normal desplazamiento del muestreador dentro del curso de agua, evitando la contaminación de la ropa restante. El uso de guantes largos permite al muestreador hacer uso de ropa abrigada (mangas largas), sin correr riesgo de contaminarla (Fig. 19). Además, si las condiciones ambientales lo permiten, es posible realizar el muestreo sin hacer uso de guantes de plástico, sí y solo sí se utiliza ropa sin mangas. De esta forma es posible minimizar el riesgo de contagio de ropas y cumplir con las condiciones de higiene y sustentabilidad, tanto ambiental como del trabajo realizado.

Figura 18. Preparación del equipo utilizando vadeadores de PVC



Figura 19. Materiales de muestreo descartables



Figura 20. Barrera de procedimiento. Equipo seco y equipo humedo

3.3.2. Barrera de procedimiento

Esta se aplica sobre la metodología de trabajo, con el fin de evitar contaminación cruzada entre el equipo humano y los elementos utilizados en el muestreo hidrobiológico de la especie *D. geminata*.

a) **Generación de equipos de trabajo:** se considera la división del personal en dos equipos, según su ubicación respecto del cuerpo de agua (Fig. 20):

Equipo seco: el personal realiza funciones propias del muestreo sin contacto con el cuerpo de agua, tales como:

- Selección de área de muestreo
- Llenado de fichas de terreno y registro de información *in situ*

- Preparación de material de muestreo
- Preparación, sellado, etiquetado y almacenamiento en frío de muestras tomadas

Equipo húmedo: el personal realiza funciones propias del muestreo al interior del cuerpo de agua, tales como:

- Medición de parámetros físico-químicos
- Muestreo químico
- Muestreo biológico en bentos y plancton

b) **Generación de set de muestreo:** se separan los implementos en sets destinados para cada punto de muestreo, de tal forma que no tengan contacto entre sí. Siguiendo este mismo procedimiento, se separa en compartimentos especiales el material sobrante no utilizado y en tachos de basura los descartables ya utilizados.

3.3.3. Barrera microbiológica

Tiene como finalidad evitar el transporte de la especie en estudio por contaminación, directa o cruzada, realizando una descontaminación por desinfección química, tanto de artefactos como de ropa utilizada en el muestreo. La descontaminación se realiza en un procedimiento de tres etapas:

1. Remover: terminado el muestreo se debe realizar una inspección visual de cada elemento que permaneció en contacto con el cuerpo de agua y su cercanía, revisando cualquier resto visible de alga o sustrato como posible contaminante. Estos deben ser extraídos y descartados únicamente en un recipiente de basura.

2. Lavar: todo elemento que haya tenido contacto con el cuerpo de agua, con o sin presencia de algas o sustratos contaminantes, debe ser lavado por inmersión completa en agua con dilución de lavalozza biodegradable al 5% (50 ml de lavalozza por cada 1 L de agua) por lo menos por 1 minuto (Ministry for Primary Industries, New Zealand). En la desinfección de redes, flujómetro, vadeador, zapatos y otros elementos de tamaño menor, se debe realizar junto a la inmersión una friega abrasiva con el fin de eliminar todo residuo de alga o sustrato posiblemente contaminante. Especial cuidado se debe tener con elementos electrónicos, como los sensores multiparamétricos, que han de lavarse muy bien con agua destilada luego de la desinfección, previniendo así su deterioro por detergente residual. Para el caso de los elementos que no son sumergibles por su gran tamaño (ca-

rros de tiro, autos, etc.), estos deben ser restregados con un elemento abrasivo de superficie suficientemente efectiva, tal como un escobillón, al mismo tiempo que es rociado con la solución desinfectante por medio de un fumigador manual.

Una vez realizada la desinfección por inmersión, la mezcla química debe ser eliminada en una zona alejada del cuerpo de agua, asegurando así no contaminarlo y eliminar los restos de *Didymo* existentes.

3. Secar: como las células de *D. geminata* son capaces de sobrevivir en condiciones de humedad por varios meses, si el procedimiento de lavado no se puede realizar, es indispensable realizar el secado completo, de modo tal que los aparejos e instrumentos permanezcan totalmente secos, por al menos un periodo de 48 horas. Solo luego de esto es posible reutilizarlos. Sin embargo, este procedimiento podría no ser necesario cuando el proceso de lavado se realizó adecuadamente, de modo que ya no queden células viables de microalgas.

Figura 21 a,b. Barrera microbiológica. Desinfección química



La etapa de lavado es indispensable para asegurar la correcta descontaminación y desinfección de los artículos utilizados en el proceso de muestreo. Si no es posible realizarla, entonces el muestreo debe detenerse obligatoriamente o utilizar elementos completamente nuevos en lo sucesivo. Esto, debido a que, por condiciones propias de terreno, es poco probable realizar el procedimiento de secado durante una campaña de muestreo.

Figura 22. Campaña de difusión

¿Cómo prevenir el Didymo?

Para evitar su dispersión solo tienes que realizar estas simples medidas en cada actividad de pesca y excursión hacia un río: Remover siempre todo el material orgánico de tus artículos de pesca. Lavar con alguna solución desinfectante, ya sea Detergente, Sal o Cloro, todo lo que haya estado en contacto con el agua, y en caso de no poder lavar deja Secar tus artículos de pesca por un periodo de 48 hrs. Con estas simples medidas, estas ayudando a prevenir la dispersión del Didymo en la región.

SEÑOR PESCADOR, PARA MANTENER VUESTRA PASIÓN POR LA PESCA, AYÚDENOS A PREVENIR LA EXPANSIÓN DEL DIDYMO, CUIDANDO Y UTILIZANDO RESPONSABLEMENTE NUESTROS RÍOS Y LAGOS.

Ante cualquier duda, consulta o información,
programa.didymo.magallanes@gmail.com
 Didymosphenia geminata
 Fundación CEQUA, 61-224794

WWW.PROGRAMADIDYMOGALLANES.CL

PROGRAMA DIDYMO MAGALLANES

REMOVER
 Absolutamente todo el material orgánico adherido a su calzado, vestimenta, aparejos y vehículos.

LAVAR
 Cualquier objeto que entre en contacto con el agua, sumergiéndolo en un recipiente por 2 minutos que contenga 10 litros de agua, más 1 taza de cloro doméstico, o ½ kilo de sal, o medio litro de detergente líquido o lavalozas.

SECAR
 El Didymo puede sobrevivir en ambientes húmedos. Si no es posible lavar, debe secar como mínimo 48 horas sus aparejos de pesca para eliminarlo.

*Transferencia Técnica para Generar Medidas de Prevención y Evitar el Ingreso de la Plega Didymo (Didymosphenia geminata) en la Región (Programa Didymo Magallanes).

SR. PESCADOR, PARA EVITAR LA PROPAGACIÓN DEL DIDYMO ES NECESARIO QUE LEA LOS SIGUIENTES PUNTOS:

REMOVER
 • Antes de dejar el río, arroyo o lago, remueve toda presencia visible de algas de tu calzado, vestimenta, aparejos de pesca y vehículos. Deja todo lo removido en el lugar o si es posible bote a la basura.

LAVAR
 • Viaje siempre con un set de limpieza en un bote grande, detergente (idealmente biodegradable), desinfectante (por ejemplo cloro doméstico), o bien sal, escobilla y botas desechables.
 • Evita usar botas con felpa y calzado o winers (membranas de pesca) hechos de material absorbente.
 • Después de utilizarlos, limpia tus implementos de pesca (vestimenta y aparejos) de 1 a 2 minutos en un bote con 10 litros de agua y una taza (200 ml) de cloro doméstico o medio kilo de sal. No devuelvas al río el agua que usas para lavar.
 • Los vehículos y embarcaciones que estacionan en contacto con el agua, deberían limpiarse con una solución desinfectante.
 • Limpia también las neumáticas y la parte baja de su vehículo, si están en contacto con el agua.
 • Transporte los peces a otros espacios en contenedores herméticos para evitar el escape y la posible contaminación de vehículos o equipos.
 • No se desheche de los peces en otros ríos.

SECAR
 • Los ambientes secos matan al Didymo, pero éste puede sobrevivir por meses en ambientes húmedos.
 • Evita usar sus aparejos de pesca hasta que estén secos.



4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y ANÁLISIS MICROSCÓPICOS



Río Tranquilo, Región de Los Lagos

Una vez completado el trabajo en terreno, las muestras deben ser derivadas al laboratorio de análisis biológicos, para corroborar la presencia de *D. geminata* e identificar los taxa que componen las muestras de fitobentos y fitoplancton. En el caso de las muestras de fitobentos, es posible analizar las comunidades de microalgas completa y de diatomeas, para lo cual se realizan diferentes procedimientos de preparación.

En este capítulo también se explica el procedimiento para analizar *in situ* la muestra de fitoplancton, de modo que se pueda acotar el área de influencia de la plaga, utilizando este procedimiento como una herramienta de gestión (Fig. 23). Este análisis *in situ* se recomienda también para las muestras de la comunidad de microalgas, lo que permitiría reportar oportunamente a la autoridad la presencia de la especie plaga en nuevos puntos. Para ello, se requiere transportar un microscopio óptico durante toda la ejecución de la campaña de muestreo, siendo necesaria además, la presencia de un profesional que realice dichos análisis.

Figura 23 a,b. Análisis microscópico *in situ*



4.1. Comunidad de microalgas

El análisis de la comunidad de microalgas es esencial en el estudio comunitario de la plaga, ya que la muestra de fitobentos no solo se compone de diatomeas como *D. geminata* (Clase *Bacillariophyceae*), sino que también de otros grupos algales como son las *Cyanobacteria*, *Chrysophyceae* y *Clorophyceae*. Entre otras ventajas, este análisis permite identificar géneros de microalgas que bajo las condiciones adecuadas desarrollan mucosidad, que a nivel macroscópico se pudiera confundir con *Didymo*. A continuación se señalan los equipos y materiales necesarios para el análisis de microalgas y el procedimiento a seguir.

riophyceae), sino que también de otros grupos algales como son las *Cyanobacteria*, *Chrysophyceae* y *Clorophyceae*. Entre otras ventajas, este análisis permite identificar géneros de microalgas que bajo las condiciones adecuadas desarrollan mucosidad, que a nivel macroscópico se pudiera confundir con *Didymo*. A continuación se señalan los equipos y materiales necesarios para el análisis de microalgas y el procedimiento a seguir.

4.1.1. Equipos y materiales de laboratorio

- Microscopio invertido con objetivos de 20x y 40x
- Microscopio óptico con objetivo de 40x
- Micropipeta P1000 (volumen variable)
- Cámara Sedgewick-Rafter (para análisis cuantitativo)
- Puntas azules para micropipeta P1000
- Tubos plásticos 15 ml
- Piseta con agua destilada
- Portaobjetos y cubreobjetos limpios y desengrasados

4.1.2. Procedimiento

En esta etapa se pueden diferenciar dos tipos de análisis: cualitativo y cuantitativo. Para definir la presencia/ausencia de *Didymosphenia* y los géneros de microalgas acompañantes, se recomienda realizar un análisis de tipo cualitativo. En cambio, para realizar un estudio de la comunidad acompañante de la diatomea plaga se debe realizar un análisis de tipo cuantitativo. A continuación se detallan ambos análisis.

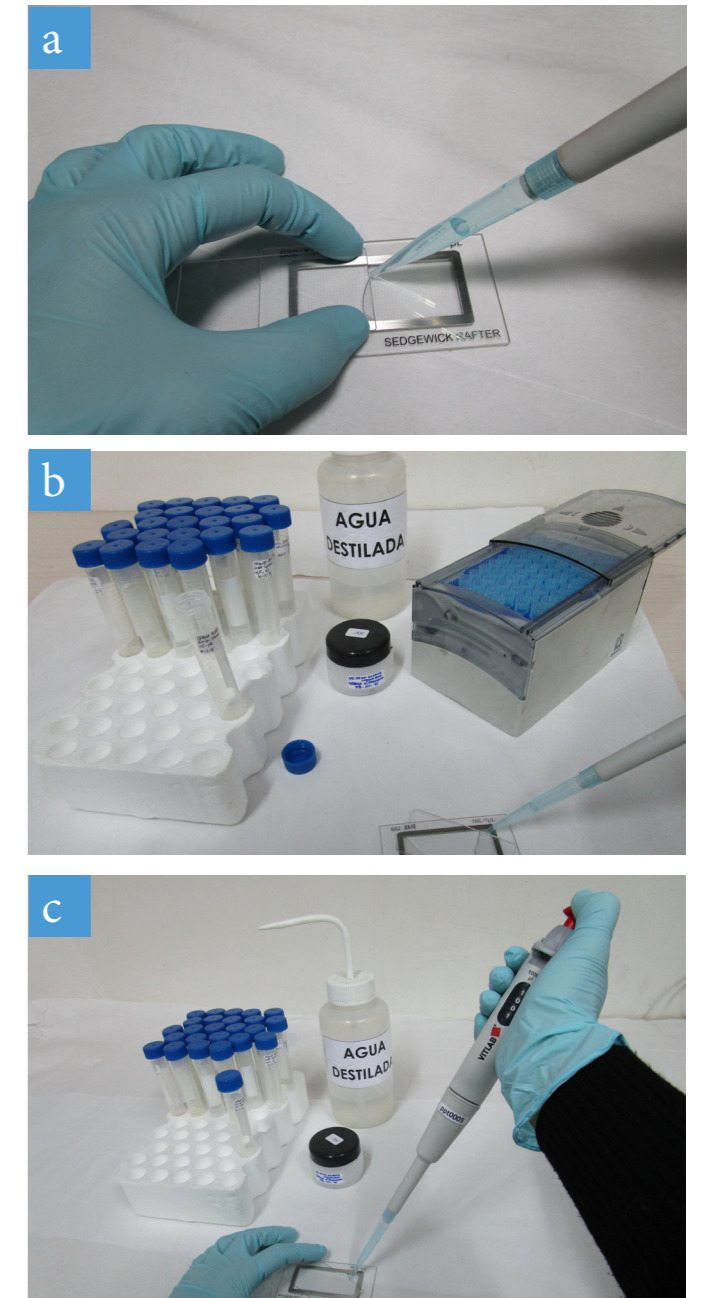
• **Análisis cualitativo:** para obtener una submuestra representativa del total del contenido, se homogeneiza la muestra recolectada en terreno. Luego, se extrae rápidamente una alícuota que se deposita entre un porta y un cubreobjetos utilizando la micropipeta con punta azul. La muestra se analiza en fresco con un microscopio óptico con objetivo de 40x.

• **Análisis cuantitativo:** al igual que en el análisis cualitativo se procede a homogeneizar la muestra con el objetivo de obtener una submuestra de 1 ml, que es depositada en su totalidad en la cámara Sedgewick-Rafter, cuidando de no dejar burbujas al llenarla. La muestra se analiza con microscopio invertido a 40x.

Con el fin de observar con claridad la comunidad de microalgas, en ocasiones es necesario diluir la muestra. Para ello, se procede a submuestrear 1 ml de la muestra, que se coloca en un tubo plástico de 15 ml y se afora hasta obtener la dilución adecuada. Si se llega al límite del tubo contenedor, nuevamente se obtiene una submuestra de 1 ml y se repite el procedimiento hasta lograr la dilución adecuada. El criterio para alcanzar esta dilución adecuada se basa en la cantidad de células, colonias o filamentos que se encuentren en el campo visual, cuidando que se distingan claramente entre sí.

No se recomienda el uso del vórtex en este análisis ya que este tipo de agitación rompe las células con paredes blandas, liberando el contenido celular e impidiendo la correcta identificación de los géneros.

Figura 24 a-c. Preparación de muestra en cámara Sedgewick Rafter



4.2. Fitoplancton

Como se mencionó previamente, en este tipo de estudio el análisis de fitoplancton es un procedimiento solo para diagnosticar la presencia o ausencia de *D. geminata* aguas arriba del tramo muestreado, por lo que es preferible realizarlo *in situ*.

4.2.1. Equipos y materiales de laboratorio

- Microscopio óptico con objetivo 40x
- Micropipeta P1000 (volumen variable)
- Puntas azules para micropipeta P1000
- Piseta con agua destilada
- Portaobjeto y cubreobjeto

4.2.2. Procedimiento

El procedimiento para la observación de la muestra de fitoplancton es similar al análisis cualitativo de la muestra de la comunidad de microalgas. La muestra de fitoplancton recolectada en terreno se homogeneiza para extraer una alícuota con la micropipeta (Fig. 25). Luego se deposita entre un porta y un cubreobjetos para observarla en fresco, con un microscopio óptico de 40x (Fig. 26).

Figura 25. Preparación de muestra de fitoplancton

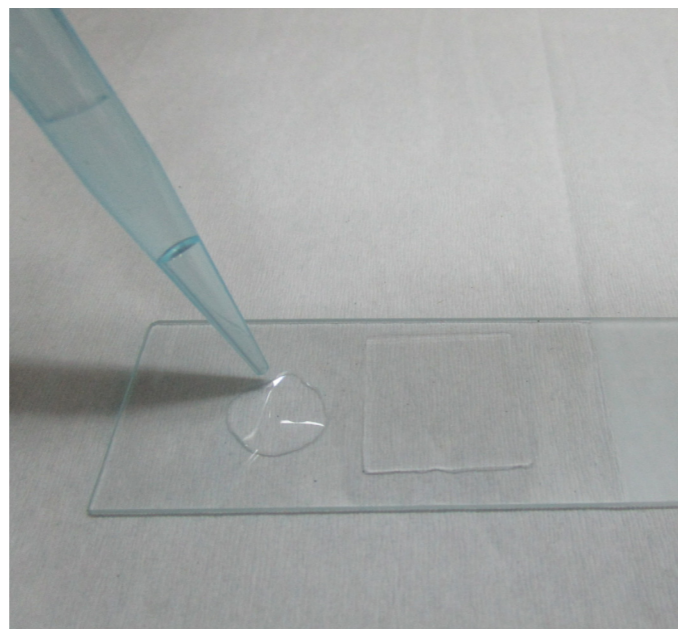
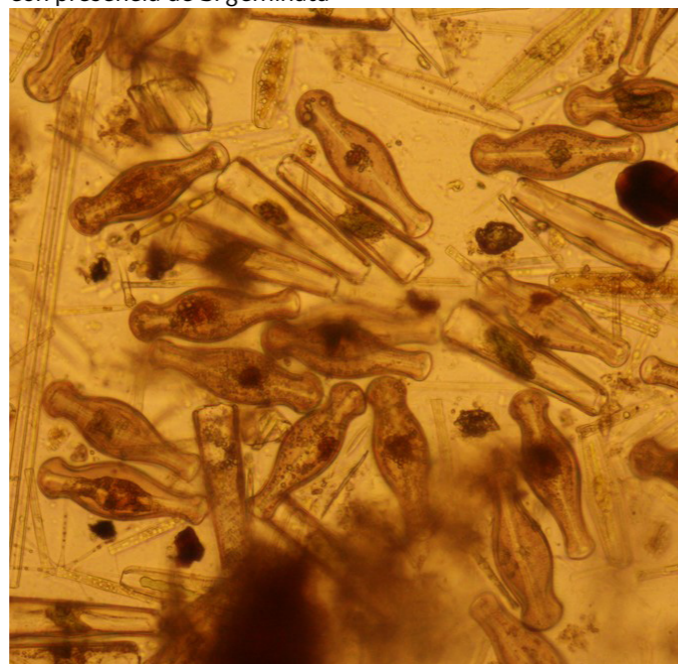


Figura 26. Muestra de fitoplancton observada al microscopio con presencia de *D. geminata*



4.3. Diatomeas bentónicas

Mediante el análisis de diatomeas bentónicas es posible determinar la densidad de *D. geminata*, en términos de células/ml. Por otra parte, permite identificar la comunidad de diatomeas acompañante de esta especie, además de determinar la presencia de otras algas que produzcan pedúnculo.

La clase *Bacillariophyceae* a la que pertenecen las diatomeas, se caracteriza porque los individuos tienen una cubierta celular compuesta fundamentalmente por sílice, cuyos patrones de deposición son la base principal para la taxonomía de géneros y especies. Esta particularidad determina el procedimiento de preparación y análisis de la muestra, diferente del análisis de fitobentos en general.

4.3.1. Análisis de células viables

El reconocimiento taxonómico de diatomeas requiere la remoción total de la materia orgánica contenida tanto en las células como en su exterior (Fig. 27). Este procedimiento impide discriminar entre las células que se encontraban viables e inviables al momento de recolectar la muestra. El análisis de células viables se realiza con el fin de obtener esta proporción, permitiendo corregir posteriormente las densidades totales obtenidas del análisis de diatomeas y, específicamente, el porcentaje de células viables de *D. geminata*.

Figura 27. Células de *D. geminata*



4.3.1.1. Equipos y materiales de laboratorio

- Microscopio óptico con objetivo de 40x
- Micropipeta P1000 (volumen variable)
- Agitador vórtex
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Puntas azules para micropipeta P1000

4.3.1.2. Procedimiento

Utilizando el vórtex, se homogeneiza la muestra recolectada en terreno y se obtiene una submuestra utilizando una micropipeta. Esta operación se debe realizar lo más rápido posible para evitar que decanten las diatomeas de mayor tamaño, como es el caso de *D. geminata*. Se extrae una alícuota de la muestra y se deposita entre un porta y un cubreobjetos para ser analizada al microscopio óptico bajo un aumento de 40x.

Este procedimiento no requiere conocer el volumen de muestra analizado. La proporción de células viables se obtiene contabilizando al menos 100 ejemplares y registrando su estado de viabilidad. En algunas muestras no es posible llegar al recuento de 100 células, por lo que se contabiliza la mayor cantidad posible de células para estimar dicha proporción. Para muestras con *D. geminata*, se registra su estado de viabilidad por separado.

4.3.2. Oxidación de muestras para observación de diatomeas bentónicas

Las características de la morfología de los frústulos de diatomeas son imprescindibles para su identificación taxonómica. Para poder observar al microscopio estas características, es necesario eliminar toda la materia orgánica existente en la muestra, es por ello que se realiza la oxidación de las muestras.

El proceso de oxidación se divide en dos etapas, el tratamiento pre-oxidación de las muestras y la oxidación de las muestras propiamente tal, ambas etapas se describen a continuación.

4.3.2.1. Equipos y materiales de laboratorio

- Campana extractora de gases
- Microscopio óptico, objetivos de 40x y 100x
- Baño termostático
- Centrífuga 4000 rpm
- Agitador vórtex
- Dispensador de ácido
- Micropipeta P1000 (volumen variable)
- Delantal para el trabajo con ácidos
- Mascarillas de seguridad para el trabajo con ácidos
- Antiparras
- Guantes descartables resistentes a los ácidos
- Puntas azules para micropipeta P1000
- Gradillas para tubos de 15 ml
- Tubos de polipropileno, punta cónica, graduados, 15 ml y tapa rosca
- Pissetas plásticas
- Agua destilada
- Papel pH
- Portaobjetos con bordes esmerilados
- Cubreobjetos de 18x18 mm
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄)
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)



Figura 28. Equipos y materiales de laboratorio para preparación de muestras de diatomeas bentónicas

4.3.2.2. Procedimiento

Paso 1: Tratamiento preoxidación de las muestras

El objetivo de la oxidación de las muestras es eliminar toda la materia orgánica que impida reconocer las especies de diatomeas presentes en ella. Sin embargo, este procedimiento también elimina información relevante que podría aportar, por ejemplo, la morfología de los cloroplastos. Por otra parte, es fundamental mantener un registro del volumen de muestra recibido en laboratorio, ya que este dato es imprescindible para la realización de los cálculos posteriores.

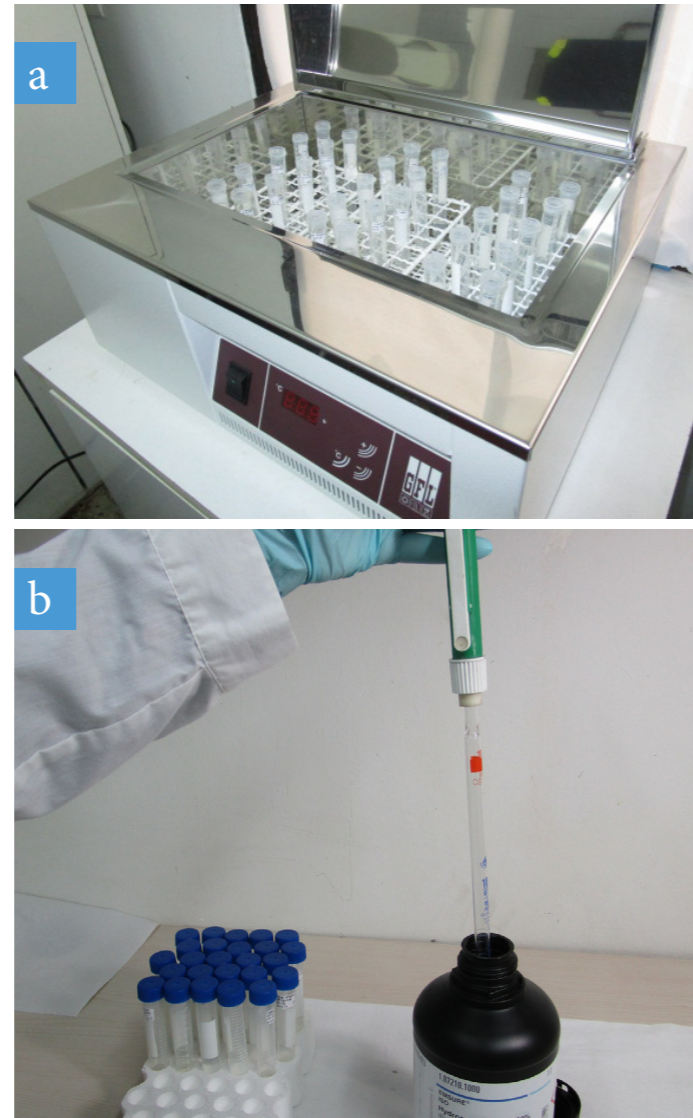
Para calcular el volumen de las muestras se trasvasija la totalidad de la muestra en un tubo de 15 ml, el que es utilizado para la oxidación de la materia orgánica en pasos posteriores. Ya que usualmente la cantidad de muestra proveniente de terreno excede la capacidad del tubo, se procede a llenar el tubo hasta los 15 ml, centrifugar por 3 minutos a 4000 rpm y eliminar el sobrenadante, para luego rellenar el tubo. La operación se repite hasta trasvasiar la totalidad de la muestra al tubo. En esta etapa es importante registrar cada volumen, tanto de la eliminación del sobrenadante, como del rellenado, para finalmente obtener el volumen total de la muestra.

La eliminación del sobrenadante se debe realizar con extremo cuidado a fin de no eliminar parte de la muestra.

En el caso en que la muestra que llegue al laboratorio sea de un volumen de mucosidad (obtenido con jeringa), la información del volumen tiene que

ser informada al laboratorio, ya que no es posible calcularlo a partir del análisis de la muestra.

Figura 29 a,b. Baño termoregulado y aplicación de agua oxigenada



Paso 2: Oxidación de muestras

Existen diversos tipos de procedimientos para la oxidación de la materia orgánica de las diatomeas, que van de los más simples, como es el tratamiento con cloro (Carret al., 1986), a los más complejos que utilizan mezclas de distintos reactivos, como es el procedimiento que proponen Hasle & Fryxell (1970). La elección del tratamiento adecuado dependerá del tipo de muestras que lleguen al laboratorio, el grado de silicificación de las diatomeas, la cantidad de materia orgánica, la cantidad de sedimentos y el objetivo del estudio a realizar.

Balech & Ferrando (1964) proponen dos métodos, uno rápido y cruento y otro lento y débil. El primero de ellos utiliza una mezcla de ácidos sulfúrico (H_2SO_4) y nítrico (HNO_3), método eficaz aunque puede llegar a eliminar los frústulos menos silicificados. El método lento y débil es recomendado para materiales delicados y se utiliza permanganato de potasio ($KMnO_4$) en medio ácido y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), sin embargo, sus resultados no son óptimos.

Hasle & Fryxell (1970) proponen un método que incluye diferentes etapas de ejecución. En principio se agrega el mismo volumen de H_2SO_4 concentrado que la cantidad de muestra existente. A esta mezcla se le agrega una solución saturada de $KMnO_4$, en este paso la muestra burbujea y se torna de color café. Se continúa agregando la solución saturada hasta que el líquido tome un color púrpura. Posteriormente, se adiciona una solución saturada de ácido oxálico ($H_2C_2O_4$), lentamente, hasta que la muestra se decolore. Finalmente, en continuos lavados se neutraliza la muestra hasta alcanzar el pH del agua destilada utilizada

(aproximadamente pH 7).

La metodología en este manual considera elementos de las propuestas de Hasle & Fryxell (1970) y de Battarbee (1986). Este último propone diferentes métodos según el tipo de muestra a tratar, los que se describen a continuación:

- Para el tratamiento de muestras con alto contenido de sales se propone el uso de ácido clorhídrico (HCl). En un tubo de 15 ml con la muestra se adiciona 10% de HCl. La solución se agita suavemente, para luego llevarla a temperatura baja por 15 minutos.
- Para muestras con alto contenido de materia orgánica recomienda el tratamiento con H_2O_2 . A la muestra se agrega 30% de H_2O_2 y se calienta en un baño termorregulable por 1 hora, a $80^\circ C$. Luego de este procedimiento se neutraliza la muestra. Para resultados óptimos se recomienda realizar una segunda etapa de oxidación, agregando a la muestra 1 ml de H_2SO_4 por 1 hora.
- Para muestras con altos niveles de minerales gruesos, Battarbee recomienda el uso de métodos físicos de separación, mediante un tamiz con apertura de malla de 500 μm . Este método permite retener los sedimentos de mayor tamaño, sin eliminar con ellos las diatomeas presentes.

La degradación de la materia orgánica utilizando ácidos libera gases dañinos para la salud, por lo que se recomienda trabajar bajo campana extractora de gases o en un ambiente muy ventilado. Por otra parte, la adición de cualquier reactivo exige extrema precaución en su manipulación. Así, se debe cuidar de agregar el reactivo controladamente y por las paredes del tubo, observando siempre la reacción de cada muestra.

Para finalizar el proceso de digestión de las muestras, cualquiera sea el método utilizado, se neutraliza la muestra hasta llegar a pH 7 o al pH del agua destilada utilizada en el procedimiento. La neutralización de las muestras se logra a través de lavados consecutivos, en los que se centrifuga la muestra a 4000 rpm por 3 minutos, se elimina el sobrenadante de una vez y con extremo cuidado de no eliminar parte de la muestra. Al concentrado obtenido se le agrega agua destilada hasta completar la capacidad del frasco contenedor y se agita en vórtex para volver a centrifugar. El proceso se repite al menos 4 veces hasta llegar al pH deseado.

Figura 30 a-b. Aplicación de ácido sulfúrico

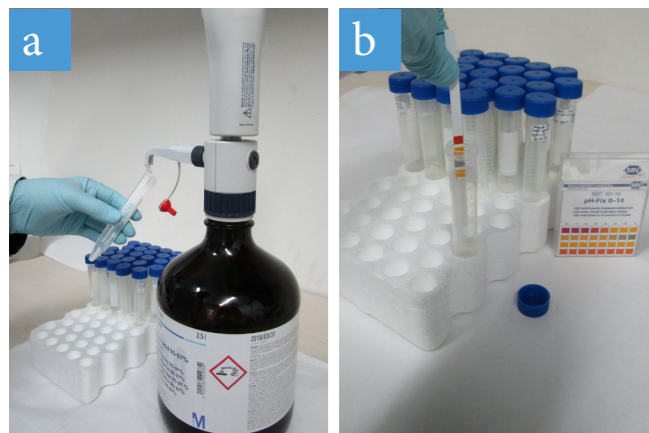


Figura 31. Centrifugado de muestra



4.3.3. Obtención de preparados permanentes para observación de diatomeas bentónicas

Con el fin de observar la muestra al microscopio se realizan preparados permanentes, que consisten en la desecación, preferentemente a temperatura ambiente, de las muestras oxidadas. Este procedimiento se compone de dos etapas la dilución y el montaje de preparados permanentes. Ambas etapas se describen a continuación.

4.3.3.1. Equipos y materiales de laboratorio

- Microscopio óptico, con objetivos de 40x y 100x
- Agitador vórtex
- Placa calefactora
- Micropipeta P1000 (volumen variable)
- Puntas azules para micropipeta P1000
- Gradillas para tubos de 15 ml
- Tubos de polipropileno, punta cónica, graduados, 15 ml y tapa rosca
- Portaobjetos con bordes esmerilados
- Cubreobjetos de 18x18 mm
- Espátula con punta roma
- Resina con índice de refracción de aproximadamente 1,7 (Naphrax® o equivalente)
- Cajas para preparados histológicos

4.3.3.2. Procedimiento

Paso 1: Dilución

Una vez realizado el proceso de oxidación y luego de haber verificado que la muestra haya quedado libre de materia orgánica, se realizan los preparados permanentes. Para ello, se debe efectuar el proceso de dilución, esencial para el análisis taxonómico de diatomeas ya que permite al taxónomo observar los caracteres de importancia para la identificación.

En primera instancia, se estima a simple vista la cantidad de sedimento disuelto en la muestra, para agregar agua destilada hasta obtener el aspecto translúcido deseado. Si en esta etapa el tubo contenedor llega al máximo de su capacidad (15 ml) y aún no se ha conseguido la dilución deseada, se procede a submuestrear 500 ul de la

Nunca utilizar material reciclado (todo material se usa por única vez y es descartado), en las distintas etapas de preparación de muestras de diatomeas. Esto porque los frústulos persisten a cualquier método de lavado y se producirá contaminación de las muestras, llevando a interpretaciones erróneas. Al estar trabajando con una plaga hidrobiológica, esta medida es aún más relevante, evitando así falsos positivos en el análisis de dispersión

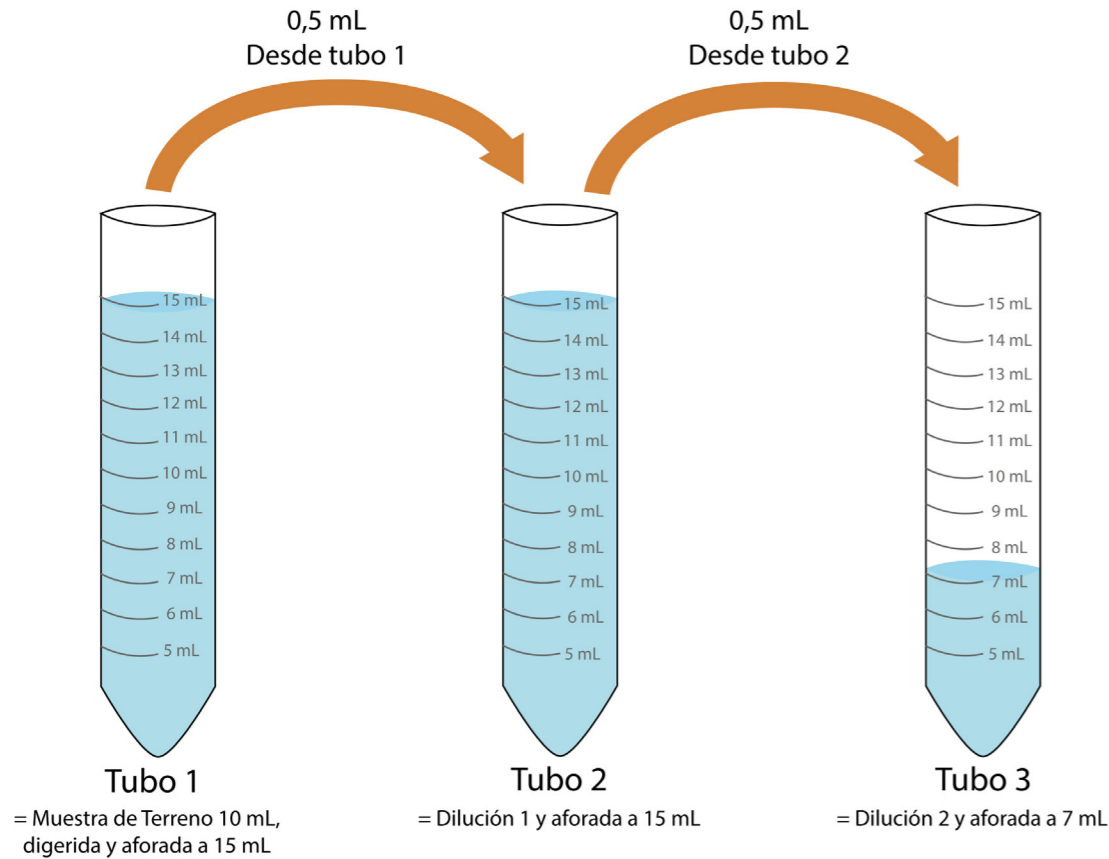
muestra y se colocan en un segundo tubo 15 ml y se completa con agua (Fig. 32). Esta operación se repite las veces que sea necesario, hasta lograr la dilución deseada. El criterio de dilución se basa en la cantidad de frústulos observados en el campo visual del microscopio, bajo 40 aumentos, cuidando que se distingan claramente entre sí y sean fácilmente enumerables.

Cada etapa de dilución se debe registrar en una planilla. Con este registro, además de los volúmenes de muestra tomados en terreno, se genera el cálculo de los factores de dilución (FD) para cada una de las muestras.

El cálculo de los FD se obtiene a través de la multiplicación de los cocientes entre los volúmenes iniciales y finales de cada dilución. La siguiente ecuación representa el cálculo realizado.

$$\frac{\text{Volumen Final (aforo post-digestión= tubo1)}}{\text{Volumen Inicial (terreno)}} * \frac{\text{Volumen Final dilución 1 (tubo 2)}}{\text{Volumen Inicial tomado de tubo 1}} * \frac{\text{Volumen Final dilución 2 (tubo 3)}}{\text{Volumen Inicial tomado de tubo 2}}$$

Figura 32. Diluciones seriadas de muestras de diatomeas para realizar preparados permanentes.



La Figura 32 muestra diluciones seriadas, asumiendo que en terreno se obtuvo una muestra de 10 ml y se diluyó en tres etapas. Siguiendo la ecuación, esta muestra tendría una dilución de 630 veces respecto de la concentración de la muestra inicial donde:

$$\frac{15}{10} * \frac{15}{0.5} * \frac{7}{0.5}$$

Paso 2: Montaje de preparados permanentes

Una vez obtenida la dilución apropiada, se da comienzo al montaje de los preparados permanentes. Este consiste en disponer una alícuota de volumen conocido en un cubreobjetos, la que se deshidrata sobre una placa calefactora. La muestra deshidratada se fija con resina en un portaobjetos. Se recomienda el uso de una resina con un índice de refracción de 1.7.

Antes de utilizar los cubre y portaobjetos, se debe cuidar que estén libres de grasa. Para ello, se repasan con alcohol al 96% y un papel absorbente que no libere pelusas. Cada portaobjetos debe ser rotulado con la mayor cantidad de información posible (nombre de estación, réplica, fecha de muestreo, dilución y nombre del proyecto). Se recomienda escribir esta información en una etiqueta de papel autoadhesivo y cubrirla con cinta adhesiva transparente.

La muestra obtenida luego de la última dilución se agita en un vórtex y se extrae con micropipeta graduada una submuestra de volumen conocido (para un cubreobjetos de 18x18 mm se recomiendan 700 ul). La submuestra se deposita cuidadosamente sobre un cubreobjetos dispuesto sobre una placa calefactora, con temperatura controlada. Es importante registrar la medida del cubreobjetos para los cálculos posteriores y cuidar que la submuestra cubra la totalidad de la superficie de este.

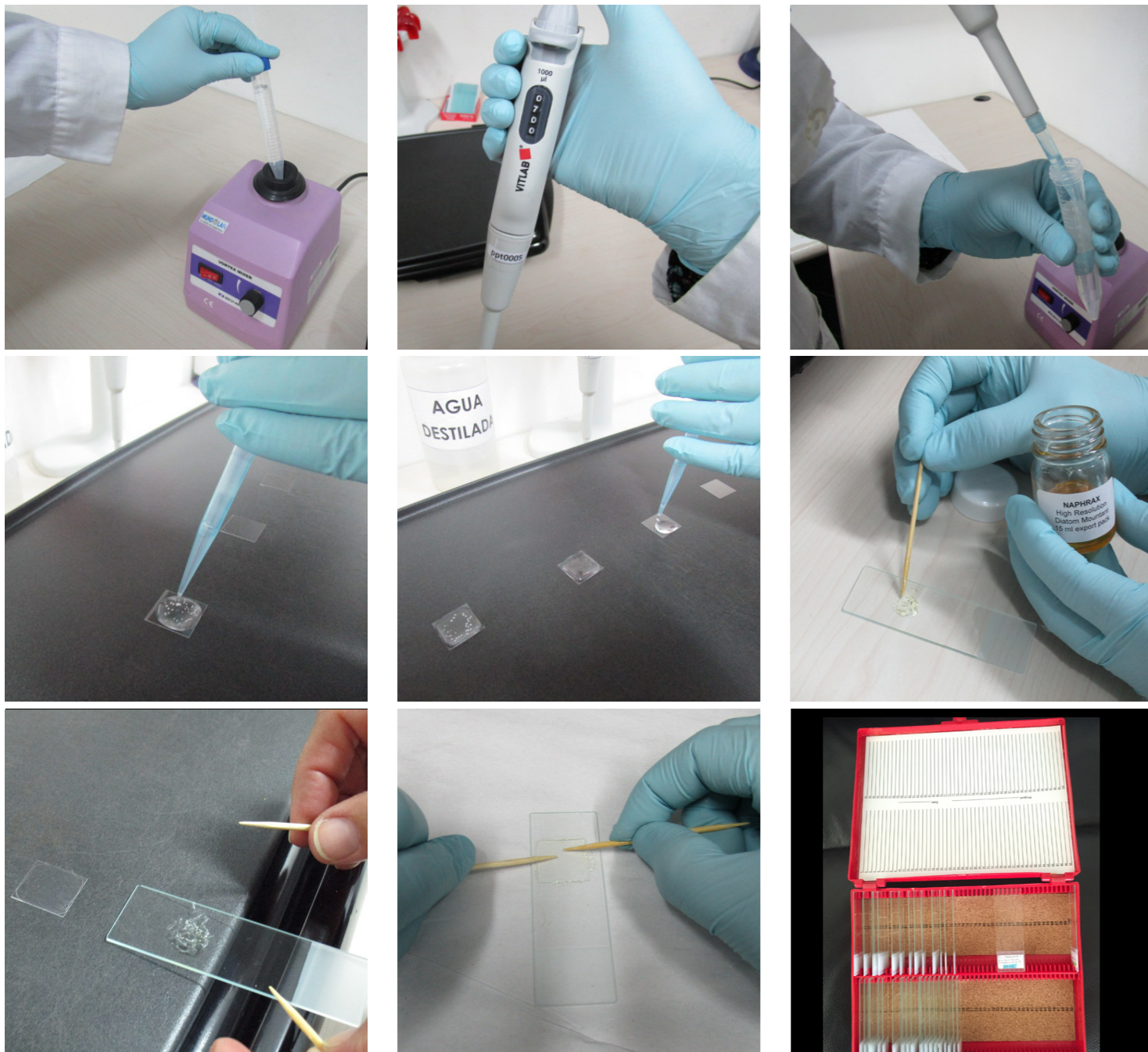
La evaporación de la muestra se debe realizar a temperatura controlada, evitando que llegue al punto de ebullición, de manera de no perder parte de la muestra en el proceso. El procedimiento se

realiza para cada una de las muestras, teniendo total conocimiento de la disposición de las muestras en la placa calefactora y su correspondencia con los tubos originales. El recambio de las puntas azules entre muestras es indispensable para evitar la contaminación cruzada.

Una vez se haya evaporado la totalidad del líquido, se confecciona el preparado permanente utilizando la resina especificada, previamente disuelta en tolueno. Se deposita una gota pequeña de resina en el centro del portaobjetos ya rotulado o cinco gotas, una en cada esquina de lo que correspondería a la posición cubreobjetos y otra en el centro. Una vez hecho esto, se voltea sobre el cubreobjetos con la muestra seca. Luego, utilizando una espátula de madera o metal con punta roma, se presiona suavemente para obligar a la resina a extenderse por toda la superficie del cubreobjetos y a eliminar el excedente de resina. En esta etapa se deben eliminar todas las burbujas que se hayan formado y observar que las diatomeas se mantengan en un mismo plano de observación. Para terminar, y una vez verificada la calidad del preparado, se retiran los excesos de resina raspando con una cuchilla y repasando con un pañuelo de papel embebido en tolueno si fuese necesario. Para corroborar que la resina se haya solidificado adecuadamente se ejerce una ligera presión con el dedo sobre el cubreobjeto y se observa que este no se desplace.

En cada etapa del proceso hay que verificar la eficacia y calidad del producto obtenido. Una falla en el procedimiento impide la correcta identificación taxonómica de las diatomeas contenidas en la muestra.

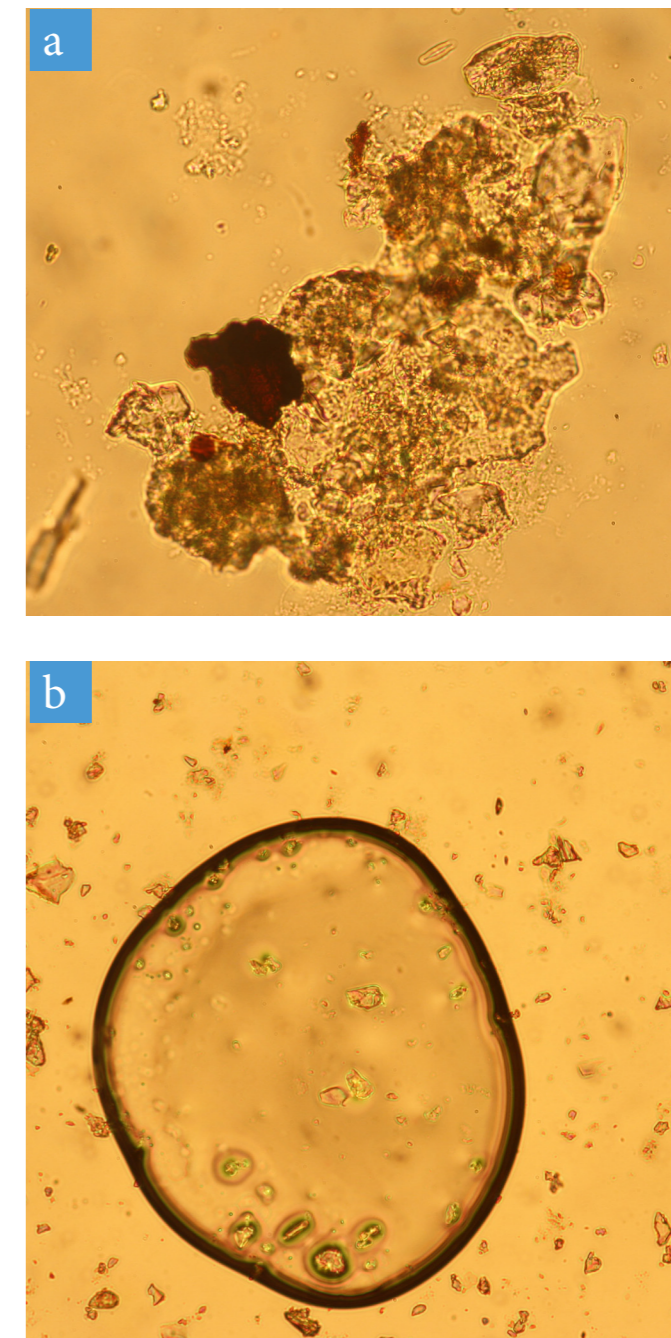
Figura 33. Montaje de preparados permanentes

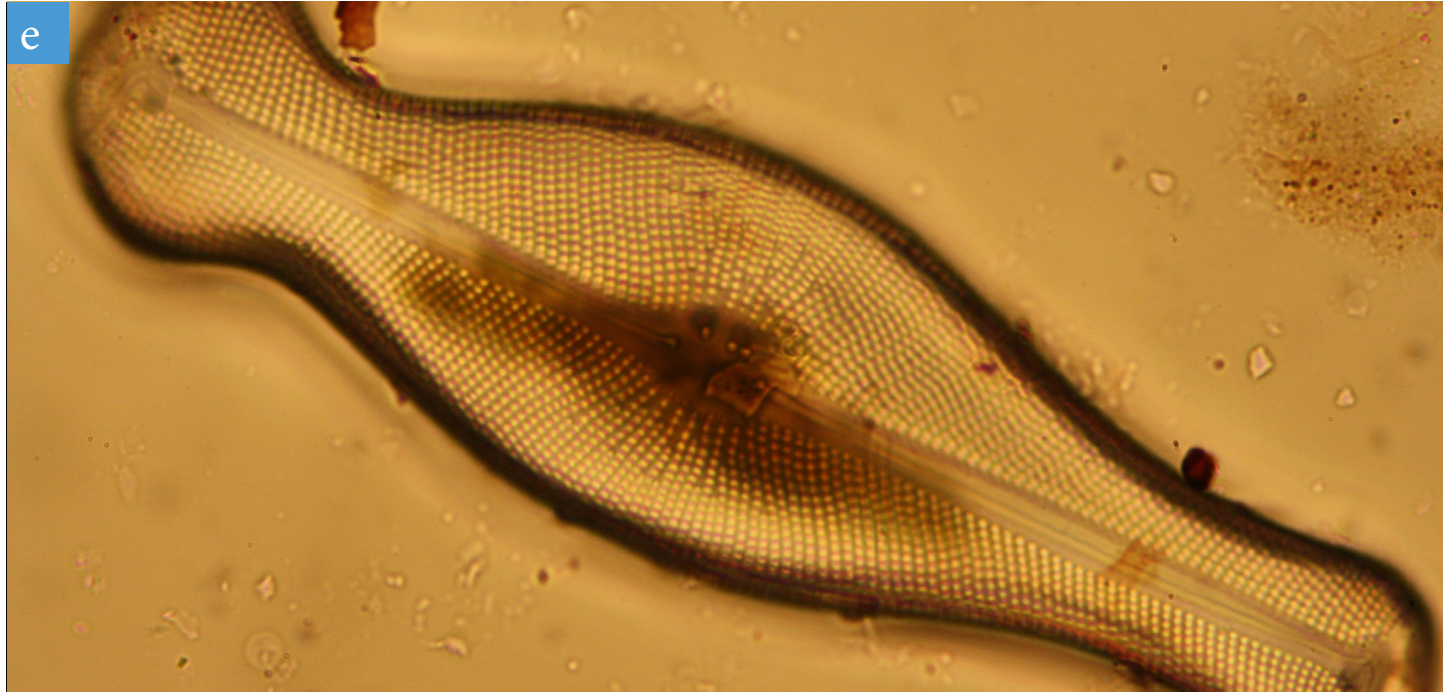
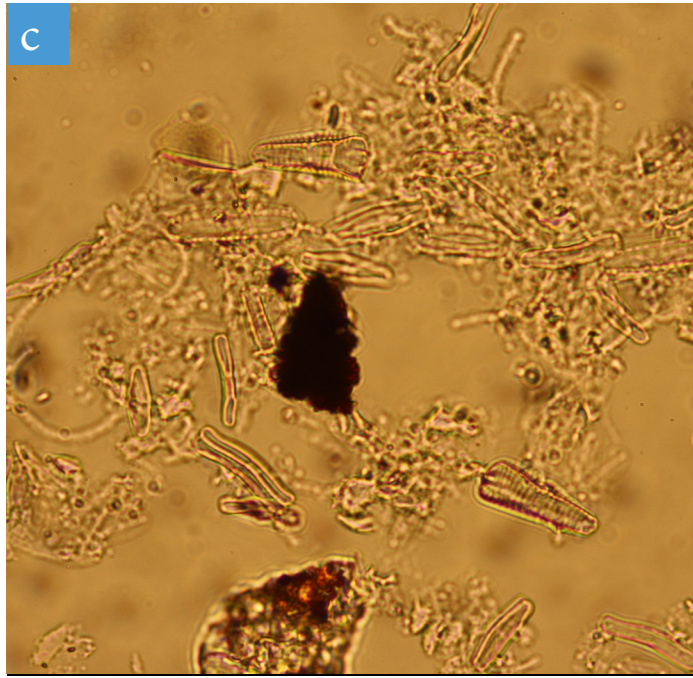


De presentarse algunos de los siguientes casos, es necesario repetir la etapa.

- Mal oxidadas: la persistencia de materia orgánica en la muestra no permite observar claramente los caracteres de importancia para la identificación, además de favorecer la formación de cúmulos (Fig. 34 a y e).
- Concentradas: el exceso de diatomeas favorece la superposición de los frústulos de las diatomeas lo que dificulta la identificación y recuento y entorpece la pronta obtención de resultados.
- Diluidas: en el caso del estudio de *D. geminata*, es de vital importancia que se pueda obtener una muestra en la que se registre la presencia de la plaga, en caso que existiese. Una muestra muy diluida puede dar una falso negativo.
- Sobrecalentadas: los preparados pueden fracturarse o adquirir una coloración que impide la refracción de la resina (Fig. 34c).
- Porta o cubreobjetos trizado: dificulta o impide la visualización de las valvas y la resina, si entra en contacto con las lentes, puede deteriorarlas (Fig. 34d).
- Diatomeas aglutinadas en el cubreobjetos: el aglutinamiento dificulta la individualización de las valvas. Las muestras no se encuentran distribuidas homogéneamente y por lo tanto, los recuentos obtenidos no son confiables.
- Situaciones en las que haya diatomeas en más de un plano, burbujas (Fig. 34b) o que la resina no haya solidificado adecuadamente, impiden la visualización de las diatomeas presentes. Para evitar estos problemas se debe controlar la temperatura y la presión ejercida en la muestra.

Figura 34 a-e. Muestras mal montadas.





El instrumental para el análisis taxonómico y el recuento se encuentra descrito en el Capítulo 4 "Preparación de muestras y análisis microscópicos", tanto para la comunidad fitobentónica completa como para el análisis específico de diatomeas bentónicas, incluyendo *D. geminata*. En el capítulo señalado también se describe la metodología de análisis de células viables, de modo que este capítulo se centra netamente en las herramientas de identificación taxonómica y el análisis cuantitativo de cada grupo. *D. geminata* se aborda por separado, dada la importancia de su reconocimiento como la especie que constituye la plaga Didymo.

5.1. Comunidad de microalgas

5.1.1. Identificación taxonómica

La comunidad microalgal bentónica puede llegar a ser muy diversa, aún en ríos oligotróficos, registrándose géneros de las clases *Chlorophyceae*, *Cyanobacteria*, *Chrysophyceae* y *Bacillariophyceae*, principalmente. **Es importante destacar que la determinación taxonómica es a nivel genérico, dadas las restricciones impuestas por la metodología utilizada.** Este análisis se realiza en muestras frescas, sin tratamientos previos, a fin de conservar los caracteres de importancia para la identificación, como la morfología de los cloroplastos. Si bien las diatomeas se incluyen en este análisis, solo es posible, en muchos casos identificarlas al mismo nivel que el resto de las microalgas, dado que los caracteres taxonómicos de relevancia para este grupo en particular no se observan con esta metodología (muestras frescas

y microscopía invertida). Sin embargo, la complejidad de este análisis requiere entrenamiento en la identificación de microalgas, además de conocimiento de la flora local.

Para la clasificación taxonómica, el apoyo de claves y monografías es fundamental, tales como las de Bourrelly (1968, 1970) o Patrick & Reimer (1966), Parra & Bicudo (1996), Parra et al. (1982), Rivera (1983), Round (1993), así como trabajos de Patricio Rivera para Chile, Guillermo Tell para Argentina, entre otros.

Figura 35. *Melosira* sp., perteneciente al grupo *Bacillariophyta*

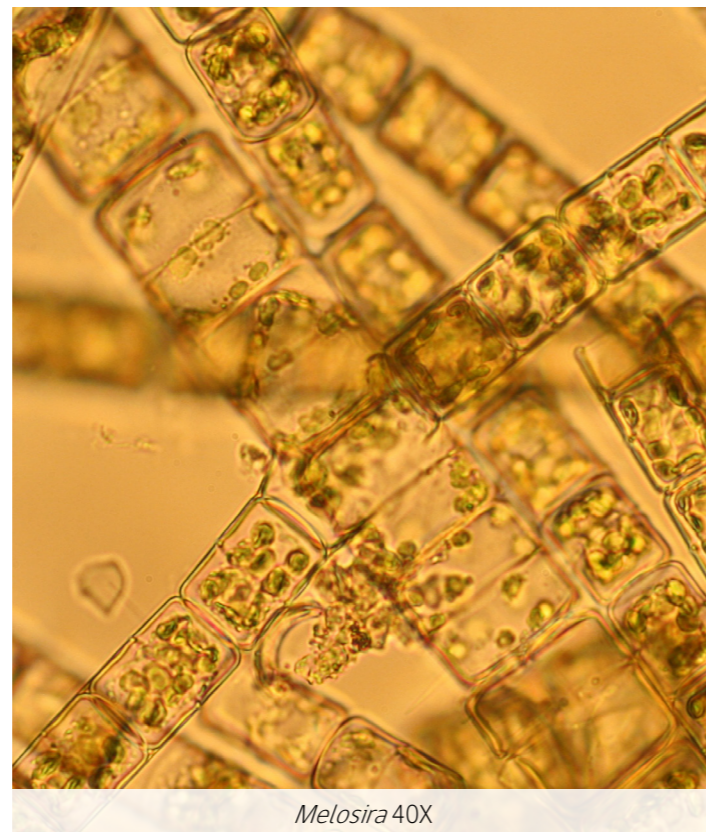
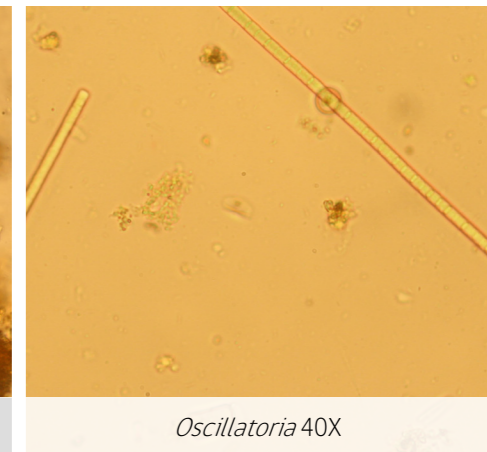
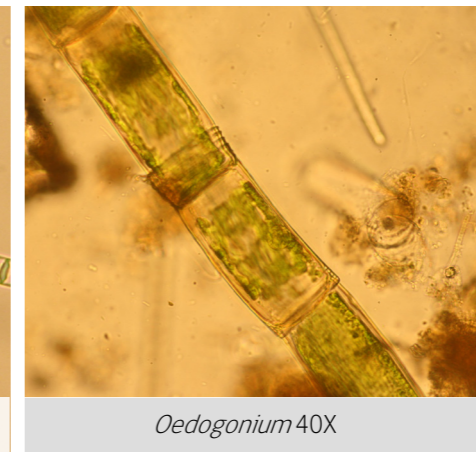
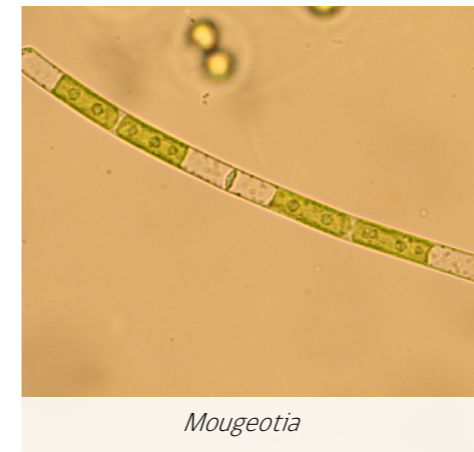
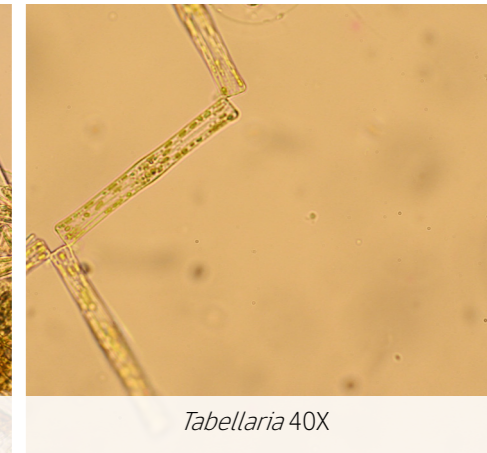
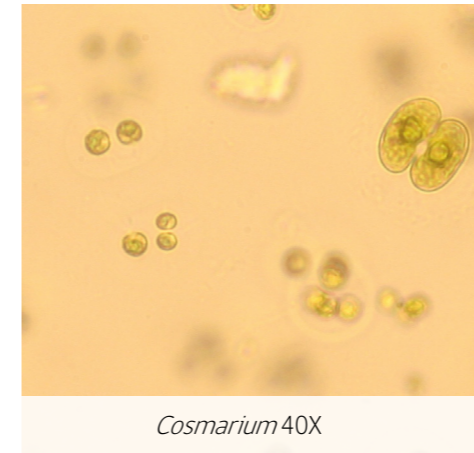


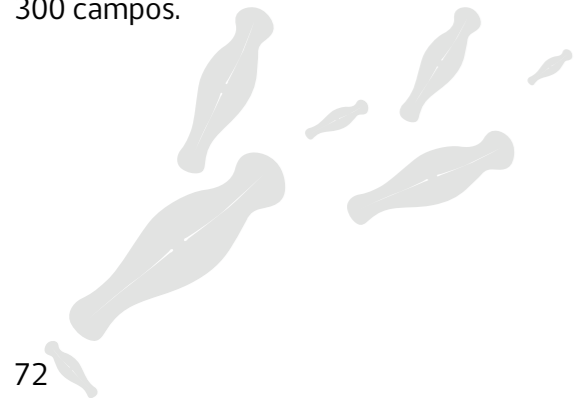
Figura 36. Géneros de microalgas



5.1.2. Recuento

El recuento de ejemplares se realiza preferentemente utilizando microscopía invertida. Sin embargo, es posible utilizar microscopios compuestos, es decir, que siendo de óptica tradicional, posean objetivos de microscopía invertida. En ambos casos, el recuento de microalgas bentónicas se realiza utilizando cámaras de sedimentación para muestras muy diluidas o cámaras Sedgewick-Rafter para muestras con mayor concentración de microalgas. Estas últimas poseen una capacidad de 1 ml de muestra para ser analizada.

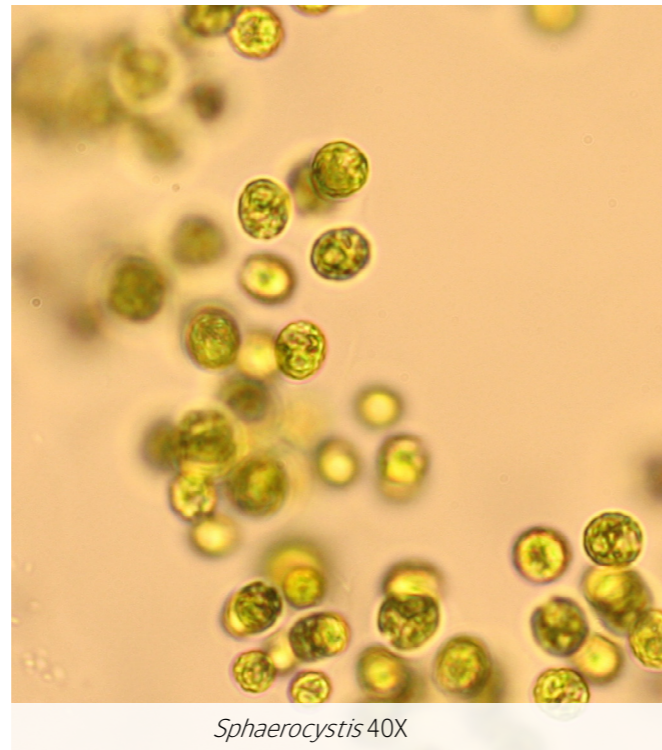
Si bien las muestras de río presentan una baja concentración de microalgas, las muestras de microalgas bentónicas obtenidas en el contexto de la plaga Didymo, alcanzan una elevada concentración de organismos, materia orgánica y /o sedimento, por lo que la metodología adecuada para realizar el análisis cuantitativo es mediante la utilización de una cámara de Sedgewick-Rafter cuadrículada. Dependiendo de la densidad de microalgas, se deberá optar por contar transectos o campos. En este caso se realizan recuentos de un mínimo de 150 campos o los que sean necesarios para que la especie más abundante alcance un número de 100 individuos pero sin superar los 300 campos.



5.1.3. Cuantificación

Para cuantificar la densidad bentónica se registra el número de superficies y/o volúmenes muestreados. Al conocer el área y/o volumen muestreado, los resultados son expresados como células/mm² o células/mm³, mediante una fórmula en que la densidad final se obtiene multiplicando o dividiendo por el factor correspondiente (ya sea dilución o concentración). Con los datos obtenidos es posible calcular índices comunitarios, realizar análisis exploratorios y aplicar estadísticos más específicos.

Figura 37. *Sphaerocystis* sp., perteneciente al grupo *Chlorophyta*



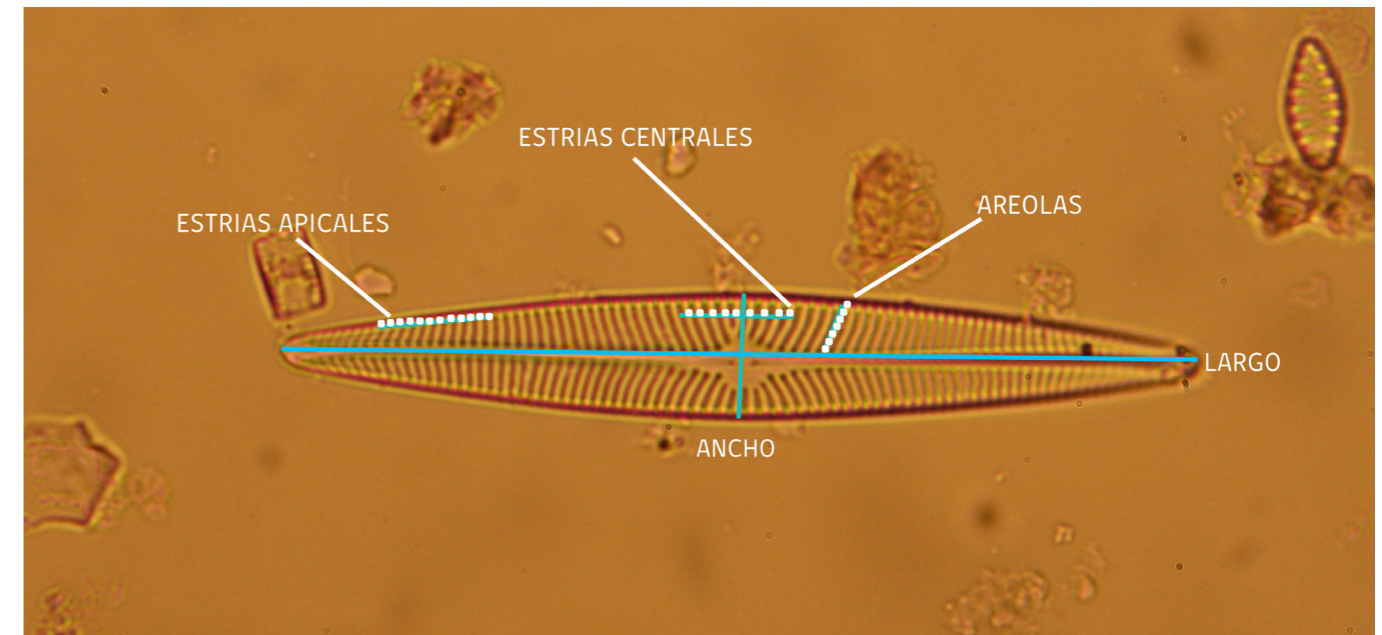
5.2. Diatomeas bentónicas

5.2.1. Identificación taxonómica

Tal como ya se ha expuesto, la taxonomía de diatomeas se basa en caracteres morfológicos del frústulo, que no son distinguibles con la metodología utilizada para la observación de fitobentos en general. Por ello, se requiere contar con un microscopio óptico de aumento no inferior a 1000X. Este aumento puede no ser suficiente aun como para identificar a nivel de especie muchos ejemplares registrados, llegándose a necesitar el uso de software para análisis digital de imágenes o, incluso, debiéndose recurrir al uso de microscopía electrónica de barrido.

La identificación taxonómica de diatomeas requiere además la realización de un detallado procedimiento químico en laboratorio para la producción de preparados permanentes, sin materia orgánica y montadas en un medio adecuado para la observación de los caracteres de importancia taxonómica del grupo, procedimiento descrito previamente en el capítulo 4.3 "Diatomeas bentónicas", de modo que sea posible contar y medir todas las estructuras posibles de observar (largo, ancho, número de estrías, areolas, costillas, fibras, cámaras, etc., en 10 micrones).

Figura 38. Características para reconocimiento de especies de diatomeas



Las diatomeas son un grupo muy diverso y complejo en su taxonomía, por ello es que su análisis debe ser realizado por especialistas en el grupo, con amplia experiencia, particularmente en las floras locales. Si bien las especies en general tienen una amplia distribución en una variedad de ambientes, sus requerimientos específicos pueden llegar a ser muy restringidos, lo que las convierte en buenos indicadores de calidad de agua. Así, una incorrecta identificación taxonómica puede llevar a inferencias ambientales totalmente erróneas. La bibliografía recomendada para la identificación de diatomeas es muy amplia y principalmente consiste en trabajos desarrollados por los escasos pero reconocidos especialistas locales, destacando el trabajo de Rivera (1983), estudios de varios especialistas sudamericanos (Maidana, Frenguelli, Ferrario y Sala, entre otros) y monografías americanas (Rumrich et al, 2000) o europeas (Kraske, 1939; Archibald, 1983; Krammer & Lange-Bertalot, 1986a, 1986b, 1991; Simonsen, 1987; Lange-Bertalot & Krammer, 1989; Round et al., 1990; Lange-Bertalot, 1993; Lange-Bertalot & Metzeltin, 1996; Hartley, 1996; Round & Bukhtiyarova, 1996; Krammer, 1997; Lange-Bertalot, 1999, 2000, 2001; Kellogg & Kellogg, 2002; Metzeltin et al., 2005), incluyendo especialistas que han publicado trabajos basados en flora subantártica (Van de Vijver et al., 2002, 2004) y otros realizados en salares altoandinos (Díaz & Maidana, 2005).

5.2.2. Recuento

La unidad de recuento es la valva (1 frústulo = 2 valvas). En cada preparado permanente se realiza un recuento mínimo de 200 valvas, criterio estadístico promedio utilizado para el cumplimiento de cualquier objetivo planteado que requiera de un análisis diatomológico (Battarbee, 1986). La identificación y recuento se realizan en transectos verticales paralelos, tantos como sean necesarios para cumplir con el número requerido de valvas. La concentración de valvas en la muestra es un factor determinante para los recuentos por las razones ya señaladas en el capítulo "Preparación de muestras y análisis microscópicos". Cabe destacar que los criterios de recuento deben ser claros y sistemáticos, de modo que siempre un ejemplar sea considerado como tal, dadas ciertas características o condiciones (ejemplo: porcentaje del fragmento de una valva que será considerado como unidad, estructuras únicas que representen a una valva, porcentaje de la valva que quede dentro del transecto, etc.).



5.2.3. Cuantificación

Al igual que en el caso de la comunidad de microalgas, para cuantificar la densidad de diatomeas bentónicas se registra el número de áreas y/o volúmenes muestreados. Los resultados son expresados en células/mm² o células/mm³, mediante una fórmula cuyo resultado se multiplica o divide por el factor correspondiente (dilución o concentración).

Cabe señalar que pese a que la unidad de recuento es la valva, la unidad de expresión son células por unidad de área o volumen. Eso implica un error sistemático, ya que no necesariamente dos valvas registradas de manera independiente corresponden a la misma célula. Así, 200 valvas podrían corresponder tanto a 200 diatomeas diferentes, como a 100, en el otro extremo. De este modo, el error en la estimación de densidades podría llegar al 100%. Sin embargo, esto es un consenso entre los especialistas ya que la unidad de vida es la célula y expresarlo en valvas también asumiría un porcentaje de error.

En esta etapa se aplica la corrección por el porcentaje de células viables estimado en la etapa previa de cuantificación, descrito en el capítulo "Preparación de muestras y análisis microscópicos". El objetivo de este análisis previo es, dado que el análisis de muestras digeridas no permite discriminar entre células que estaban vivas o no al momento de obtener la muestra, corregir por este factor de viabilidad las densidades obtenidas. Finalmente, con los datos obtenidos es posible calcular índices comunitarios, realizar análisis exploratorios y aplicar estadísticos más específicos.





5.3. *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) Schmidt

El género de diatomeas bentónicas *Didymosphenia* M. Schmidt, pertenece al orden *Cymbellales*, que son diatomeas pennadas, con rafe en ambas valvas. Se conocen actualmente 29 especies, incluyendo taxa infraespecíficos, variedades y formas, de los cuales solo 8 son aceptados taxonómicamente (*Didymosphenia clava-herculis* (Ehrenberg) D. Metzeltin & Lange-Bertalot; *Didymosphenia dentata* (Dorogostaisky) Skvortzov & Meyer; *Didymosphenia geminata* var. *dorogostaiskyi* Skvortzov & Meyer; *Didymosphenia geminata* var. *neocaledonica* E. Manguin; *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) M. Schmidt - TIPO; *Didymosphenia geminata* var. *baicalensis* Skvortzov & Meyer; *Didymosphenia pumila* D. Metzeltin & Lange-Bertalot; *Didymosphenia tatrensis* Mrozinska, Czerwik-Marcinkowska & Gradzinski). En tanto, algunos autores señalan que existirían 11 especies aceptadas

Figura 39. *Didymosphenia geminata* con pedúnculo

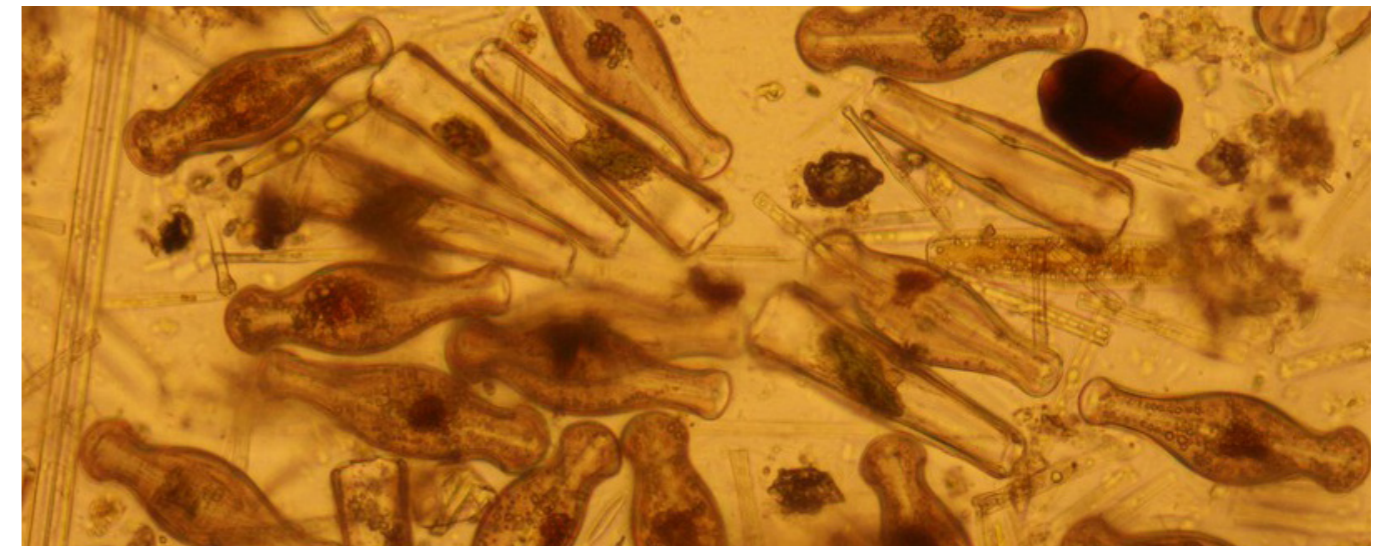
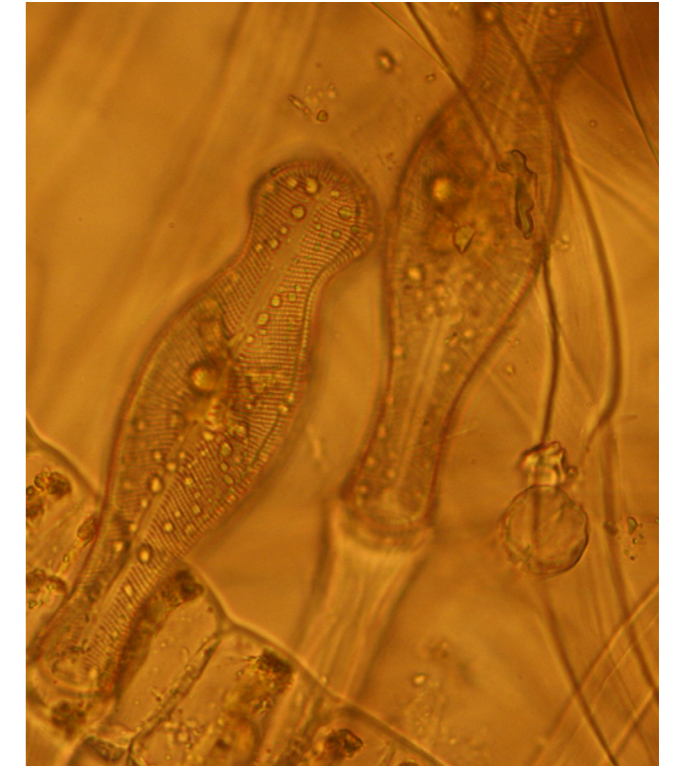
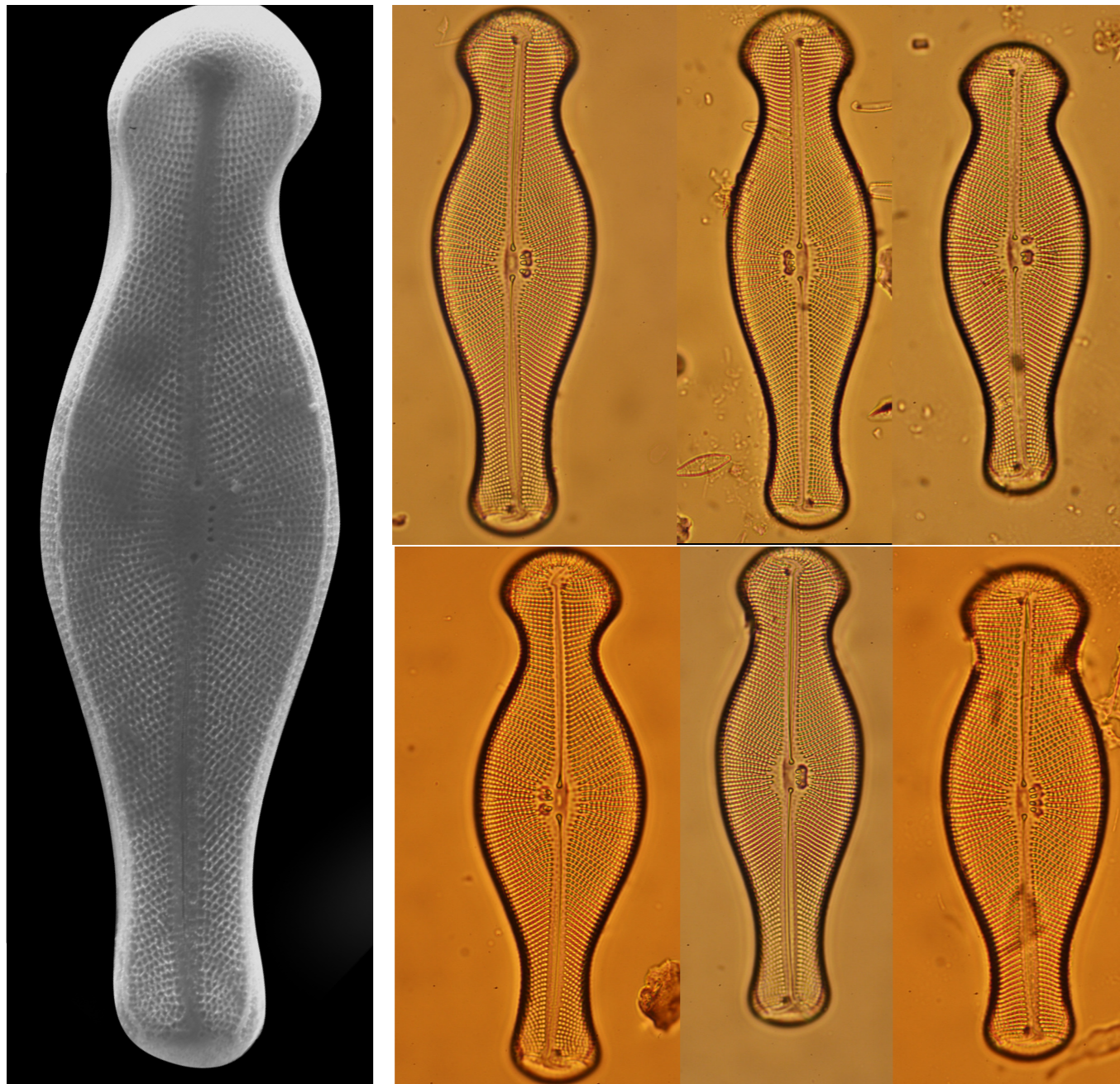


Figura 40. Variedad morfológica de *D. geminata*.



taxonómicamente (Witthon, Ellwood & Hawecka, 2009), mientras otros aceptan solo 5 (Metzelin & Lange-Bertalot, 1995). Las principales diferencias entre ellas serían morfológicas. En general, el género *Didymosphenia* se caracteriza por ser de gran tamaño. Los ejemplares chilenos de *D.geminata*, única especie del género registrada en el país, alcanzan los 203 μm de largo y 58 μm de ancho. Sin embargo, presenta una alta variabilidad de sus caracteres morfológicos, sin que ello implique que se trate de otra especie.

Dentro de los caracteres morfológicos más relevantes, se encuentran un campo poroso apical, por el cual la célula produce polisacáridos que forman un pedúnculo con el cual se adhiere al sustrato, principalmente rocoso. Esto le confiere a la célula la capacidad de resistir la velocidad de la corriente en los sistemas lóticos, en los que su rápida expansión la ha llevado a convertirse en plaga.

A nivel taxonómico, la especie puede ser reconocida principalmente por las siguientes características morfológicas:

- Valvas asimétricas respecto de sus ejes transapical y pervalvar.
- Valvas planas, con un reborde marginal ligeramente sobresaliente en el límite con el manto.



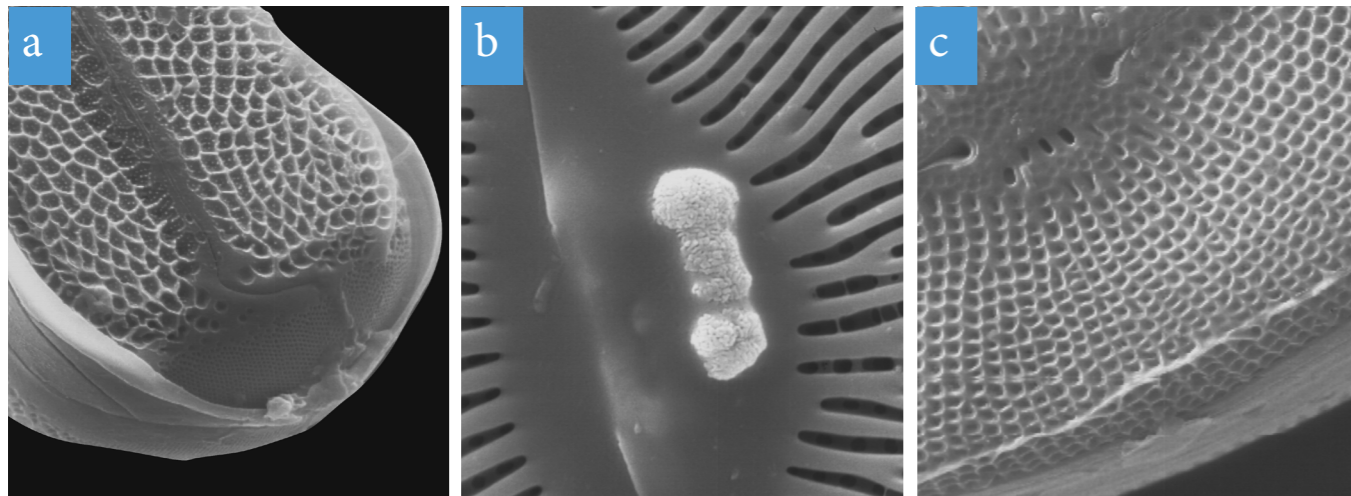
Figura 41. Nódulo central y estigmas del frústulo de *D. geminata*

- Con forma lanceolada y extremos capitados.
- El ápice menos capitado es el que posee el campo poroso apical.
- Campo poroso apical completo, no interrumpido por el rafe.
- Estrías uniseriadas, radialmente orientadas hacia el nódulo central (con estrías de menor longitud) y paralelas hacia los nódulos terminales.
- Cíngulo formado por 4 bandas planas por teca.
- Estrías internas con cavidades alargadas y externas con velo complejo.
- Rafe recto y central, en un esternón que puede estar ornamentado.
- Fisuras terminales del rafe en forma de ganchos, curvados hacia el mismo lado.
- Rafe con fisuras proximales que terminan en poros expandidos en el nódulo central.

- Varios estigmas a un lado del nódulo central, visibles externamente como poros redondeados, pero internamente cubiertos con complejas estructuras silíceas.
- Área axial pequeña y redondeada.

Si bien todos estos caracteres permiten al especialista determinar que se trata de *D. geminata*, su identificación no debería representar mayor dificultad para un profesional con cierto entrenamiento en el área, ya que es la única especie del género registrada en Chile hasta el momento y posee características morfológicas particulares que la diferencian del resto de la comunidad de diatomeas bentónicas presentes en los ríos chilenos. No obstante, es necesario realizar el ejercicio completo para tener certeza de la correcta identificación, particularmente porque cualquier error podría llevar a la determinación de falsos positivos de la plaga, como ya ha ocurrido en Chile al ser confundida con el género *Gomphoneis*.

Figura 42 a) Campo poroso apical y terminación del rafe, b) Vista interna de la célula, c) Manto de la célula



6. MACROINVERTEBRADOS BENTÓNICOS

El muestreo de macroinvertebrados bentónicos (MIB) en el monitoreo de *D. geminata* se da debido al progresivo aumento de estudios comunitarios de la plaga. Varios resultados indican un impacto de *Didymo* sobre la comunidad de macroinvertebrados, por lo que es ideal realizar estudios en Chile para determinar su efecto en los ecosistemas fluviales locales.

6.1. Materiales de muestreo y laboratorio

- Red de 0.25 m x 0.50 m y 250 μ m de malla
- Red Surber de 0.3 m x 0.3 m de área y 250 μ m de malla
- Frascos y etiquetas
- Lápiz con mina de grafito
- Agenda para registrar cualquier suceso importante del tramo (aluvión, disminuciones o crecidas considerables de caudal, etc.)
- Etanol 96% y 70%
- Pinzas
- Guantes de vinilo
- Tamiz (0,075 m de diámetro, 1,5 mm de grosor, 1,2 m de largo y malla 250 μ m de diámetro)
- Agua destilada
- Placa de Petri y bandeja diseñada para el recuento e identificación de MIB bajo la lupa.
- Lupa estereoscópica de aumento máximo 40X
- Literatura especializada para la identificación de los taxa

6.2. Metodología de muestreo

La metodología de muestreo para la obtención de MIB depende principalmente de dos factores: (1) del tipo de sustrato dominante a lo largo del tramo seleccionado (sustratos duros, detritos vegetales, orillas vegetadas, macrófitas sumergidas, lodo, arena, etc.) y (2) del tipo de sistema acuático que se desea muestrear (lótico o léntico).

El tipo de muestreo también depende del objetivo del estudio. Si se trata de la cuantificación de la densidad, abundancia, riqueza de los taxa o se desea conocer el volumen que se muestrea, se debe escoger un método cuantitativo. En cambio, si se quisiera solamente conocer la composición de taxones se debe escoger un método cualitativo. Todo muestreo (cuantitativo o cualitativo) debe iniciarse realizando un recorrido visual a lo largo del tramo escogido para el muestreo *Didymo*, identificando los diferentes hábitats para macroinvertebrados: zonas de rápidos o remansos, presencia de macrófitas o raíces, diferentes tipos de sustratos, etc. El recolector debe ejecutar el muestreo desde aguas abajo hacia aguas arriba del tramo delimitado.

Figura 43. Red Surber



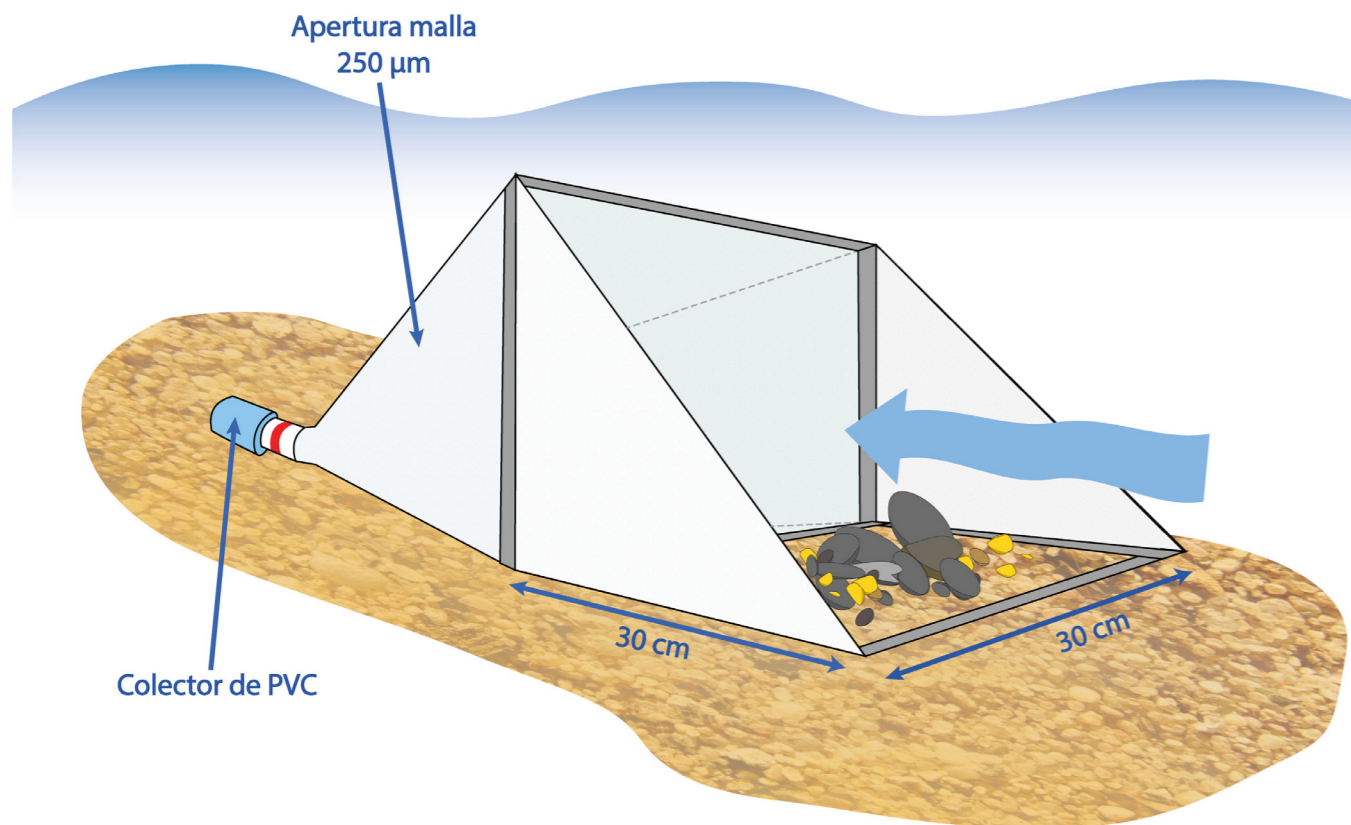
6.2.1. Muestreo cuantitativo

Para este tipo de muestreo se utiliza una red Surber, usada en sistemas acuáticos donde el sustrato es de tipo rocoso y las aguas son de baja profundidad, con corrientes que van de lentas a rápidas (Fig. 45). El área a muestrear depende del tipo de bastidor de la red, siendo más comunes los de 0.3 x 0.3 m, con una abertura de malla que se encuentra entre 250 y 500 μ m. La obtención de las muestras se realiza situando la red en contra de la corriente y lavando el sustrato rocoso bentónico dentro del área especificada, de manera que su contenido vaya hacia el interior de la red que tiene un colector en su extremo inferior. El número de réplicas a realizar en este tipo de muestreo es, preferiblemente, de seis.

Figura 44. Frasco de almacenaje



Figura 45 . Representación gráfica de muestreo de macroinvertebrados bentónicos en ríos, utilizando red Surber.



6.2.2. Muestreo cualitativo

En este caso, se utiliza una red de mano o multi-hábitat, de dimensión estándar y sección cuadrada de 0.25 m de ancho y 0.5 m de largo. Como se mencionó anteriormente, todo muestreo se inicia con la identificación de un tramo del río y de los microhábitats presentes. En este tipo de muestreo es muy importante dicha identificación, puesto que posterior a ella, se realiza un mapa esquemático de cada microhábitat reconocido, representando en porcentaje el área que ocupa cada uno de ellos dentro del tramo. Una vez realizado este mapa esquemático, se reparten 20 *kicks* con algún implemento, la mano o el pie, con el objetivo de remover el sedimento para que este quede en suspensión. Así, los individuos de macroinvertebrados que queden en la columna de agua ingresan dentro de la red, por lo que debe ubicarse en contra de la corriente.

Cada *kick* equivale a remover el sustrato ubicado a los 0.5 m de la boca de red. Por cada 5% de cobertura de un microhábitat, se realiza un *kick*, por lo que los hábitats con menor al 5% de representatividad se deben despreciar.

Una vez finalizado el muestreo, cada réplica de MIB obtenida debe ser almacenada en un contenedor plástico, debidamente etiquetado (etiquetas resistentes al agua para evitar confusión del material recolectado). Las muestras se preservan en etanol al 96% (Pardo et al., 2010; Palma, 2013) para su posterior identificación en el laboratorio.

6.3. Análisis en laboratorio

Cada réplica debe ser limpiada de cualquier otro elemento que no sea un macroinvertebrado. Para ello, se recomienda usar un tamiz, que consiste en un tubo de PVC de 0.075 m de diámetro, 1.2 m de largo y 1.5 mm de grosor que contiene en su interior una malla de 250 µm de diámetro.

Figura 46 a-e. Tamiz de filtración para muestra de macroinvertebrados





Posterior al lavado de los individuos, se procede con su separación e identificación. Para ello, la muestra debe ser vaciada en una placa de Petri o bandeja. Luego, se coloca bajo la lupa estereoscópica y, mediante el uso de pinzas, se debe separar los diferentes taxones existentes en la muestra para identificarlos con la ayuda de literatura especializada (Fig. 48). Generalmente, la identificación se realiza hasta el nivel taxonómico de familia. Cada grupo registrado debe ser contabilizado en su totalidad, si se desea obtener datos cuantitativos de número de individuos por unidad de área, o hasta 200 individuos si es cualitativa. En el caso de las muestras cualitativas se debe revisar la muestra completamente en busca de todas las familias presentes, independientemente de que se hayan contabilizado los 200 individuos.



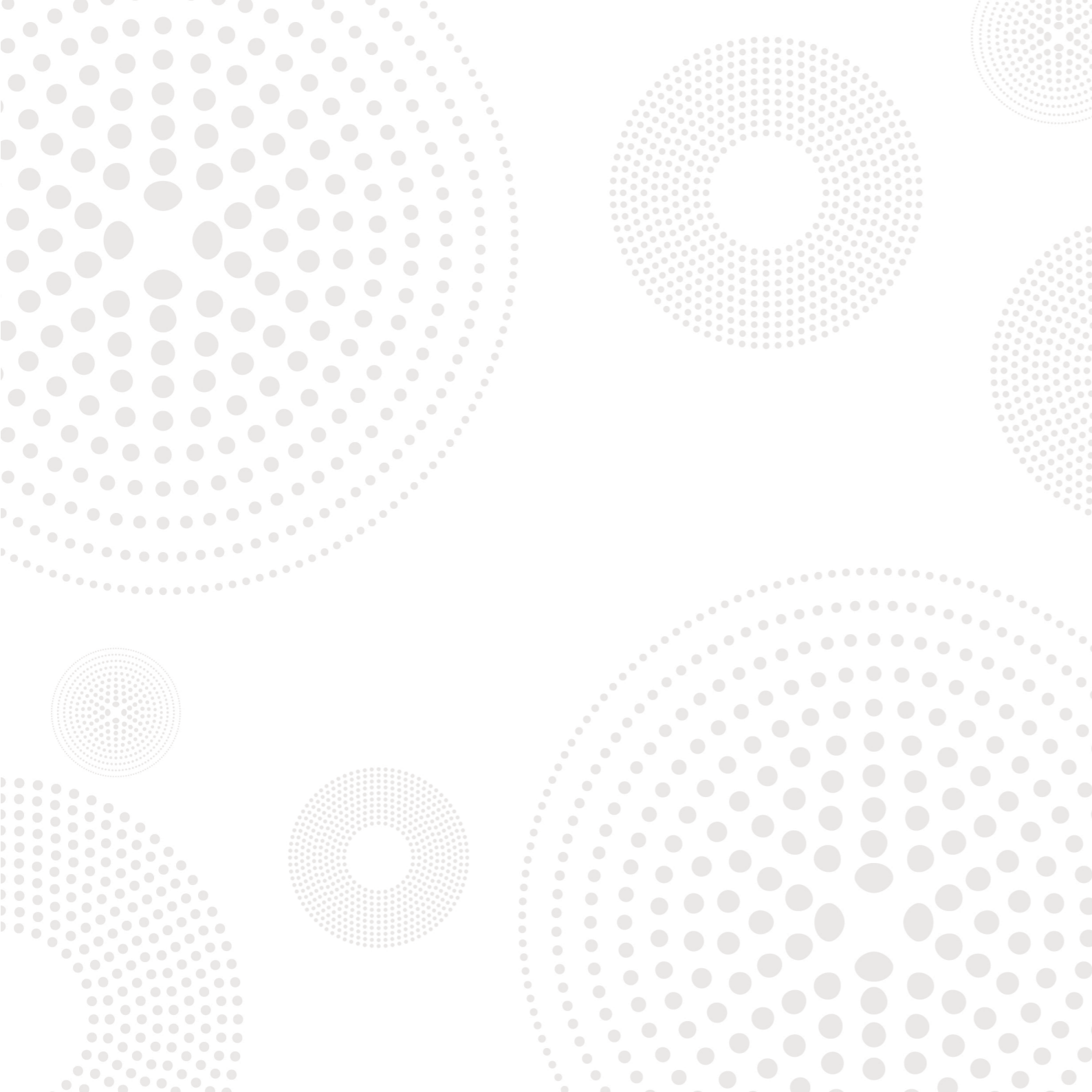
Figura 47. Placa de Petri y bandeja



Figura 48. Observación de muestras de macroinvertebrados



Los resultados de los recuentos constituyen una estimación de la abundancia relativa de los macroinvertebrados en la muestra (Palma, 2013). Una vez los individuos hayan sido separados e identificados, deberán ser guardados en recipientes con alcohol al 70%. Cada frasco debe contener como mínimo el nombre del río, la estación de monitoreo, el nombre del recolector y la fecha del muestreo.



7. GLOSARIO

Río Salto, Región de Aysén

• **Alicuota:** muestra proporcional y que representa las características de un todo.

• **Apical:** referido al extremo o punta de un cuerpo.

• **Analito:** elemento o compuesto químico de una muestra que se interesa analizar.

• **Antrópico:** referente a acciones generadas por el ser humano.

• **Afloramiento algal:** aumento explosivo y en corto tiempo de la población de algas existentes en un área determinada.

• **Afluente:** o tributario, es un curso de agua que desemboca en otro de mayor tamaño y no en el mar.

• **Bentos:** comunidad de organismos que viven en el fondo de los cuerpos de agua.

• **Bolones:** piedras que comprenden un tamaño desde los 256 mm hasta los 2048 mm de diámetro.

• **Cartografía:** conjunto de documentos con referencias geográficas, tales como mapas territoriales, hidrológicos, etc.

• **Cíngulo:** conjunto de bandas o cinturones de sílice que sirven para unir a las dos valvas que forman el frústulo.

• **Cuenca:** superficie terrestre ($\geq 500 \text{ km}^2$) que contiene un cuerpo de agua principal que desagua por lo general hacia un mar o lago.

• **Diatomeas:** grupo de algas unicelulares, también llamadas Bacillariophyceae, productoras primarias en la cadena trófica y abundantes en el fitoplancton y fitobentos.

• **Dilución:** proceso químico de disolver una solución con el fin de reducir su concentración.

• **Endémico:** exclusivo de un lugar delimitado. Referentes a un taxón que está restringido a una ubicación geográfica concreta.

• **Fitobentos:** conjunto de organismos acuáticos autótrofos fotosintéticos (como algas y plantas acuáticas) propios del bentos de un ecosistema.

• **Fitoplancton:** conjunto de organismos acuáticos autótrofos fotosintéticos propios del plancton de un ecosistema.

• **Frústulo:** cubierta celular compuesta por dos partes asimétricas de sílice opalino (dióxido de silicio hidratado). Característica de diatomeas, poseen una gran diversidad de formas.

• **Georreferenciación:** técnica geográfica que utiliza sistemas de coordenadas para determinar la ubicación espacial (localización geográfica) de un elemento o destino determinado.

• **Hábitat:** en ecología, una parte del ecosistema o un área determinada en la cual habita la población de una especie cualquiera.

• **Hidrobiológico:** se refiere a conjunto de componentes vivos (animales, plantas, etc) de los cuerpos de agua, sean estos continentales o marinos.

• **Hidromorfología:** se refiere a la morfología y dinámica de los cuerpos de agua. En ciencias, es la rama que estudia la estructura de este tipo de sistemas.

• *In situ:* expresión latina que significa "en el lugar" o "en el sitio".

• **Macroinvertebrado:** tipo de invertebrados macroscópicos, como moluscos, insectos, etc.

• **Mesohábitat:** subdivisión del concepto de hábitat utilizada en biogeografía y referida según medidas espaciales. El mesohábitat corresponde a un área macroscópica desde 1 m^2 hasta 1 Ha (10.000 m^2), diferenciándolo así de microhábitat (inferior a 1 m^2), macrohábitat (1 Ha a 106 m^2) y de megahábitat (sobre 106 m^2).

• **Microalga:** organismo microscópico ($2\text{--}200 \text{ um}$), eucariotas y fotosintéticos.

• **Mucílago:** sustancia generada por vegetales. Está compuesta por polisacáridos heterogéneos formados por diferentes azúcares y en general llevan ácidos urónicos. Se caracterizan por formar soluciones coloidales viscosas y geles en el agua.

• **Pedúnculo:** prolongación tubular del cuerpo, mediante el cual el organismo permanece adherido a un sustrato.

• **Plancton:** conjunto de organismos de pequeño tamaño ($< 3 \text{ cm}$) que flotan en la columna de agua y poseen escasa o nula motilidad.

• **Plaga:** condición ecológica que se asigna a una especie cuya población incrementa en número al punto de generar serios perjuicios al ecosistema local.

• **Rafe:** fisura longitudinal en la superficie de las valvas, relacionada con los movimientos por deslizamiento de algunas diatomeas.

• **Réplicas:** unidades experimentales de un estudio determinado, es decir, veces que se pone a prueba un experimento con el fin de determinar un parámetro en estudio.

• **Sistema límnic:** ecosistema de agua dulce, tal como un lago o un río.

• **Subcuenca:** área geográfica ($< 500 \text{ km}^2$) que contiene los afluentes a la cuenca.

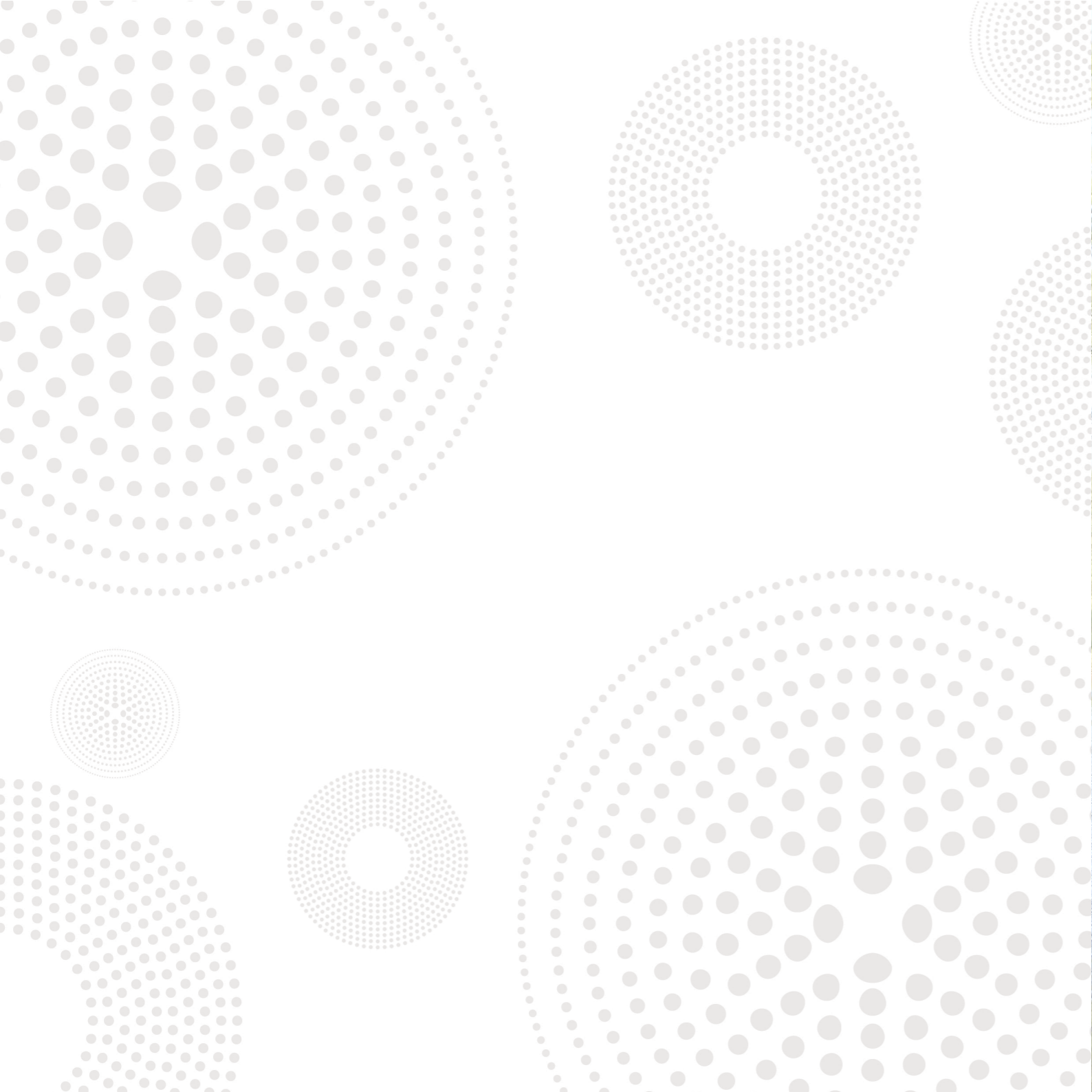
• **Submuestra:** fracción, obtenida por recolección diferenciada, de la muestra original, representativa de ésta y su equivalente en los resultados de pruebas y análisis.

• **Sustentabilidad:** o sostenibilidad, en ecología hace referencia a la mantención en el tiempo de la diversidad y productividad de un ecosistema determinado. En presencia del desarrollo de una actividad humana, la sustentabilidad se refiere a la habilidad de la generación actual para satisfacer sus necesidades sin perjuicio de las futuras.

• **Sustrato:** superficie, ya sea inorgánica u orgánica, sobre la que una especie determinada desarrolla su ciclo de vida o parte de este.

• **Tamiz:** utensilio con una superficie porosa utilizado para la separación de componentes de distintos tamaños. La talla de dichos poros, dependerá del elemento a separar.

• **Taxón** (en plural, taxa): es un término masculino, en latín, que se utiliza para denominar a un grupo de entidades biológicas emparentadas y ordenadas en categorías jerárquicamente de modo que cada categoría incluya a las demás o esté incluida en otra.



8. REFERENCIAS

Río Cua-Cua, Región de Los Ríos

Archibald F (1983) *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. FEMS Microbiology Letters 19: 29 - 32.

Asprey JF, K Benson-Evans & JE Furet (1964) A contribution to the study of South American freshwater phytoplankton. Gayana Botánica 10: 1 - 118.

Balech E. & Ferrando H (1964) Fitoplancton marino. EU-DEBA. Buenos Aires, Argentina. 157 pp.

Battarbee R (1986) Diatoms analysis. Handbook of Holocene palaeoecology & palaeohydrology. John Wiley & Sons, New York, USA.

Bourelly P (1968) Notes sur les Périidiniens d'eau douce. Protistologica 4: 5 - 14.

Bourelly P (1970) Les Algues d'eau douce: Algues bleues et rouges, Tomo III. Boubee Editores, Paris, Francia.

Carr JM, GI Hergenrader & NH Troelstrup (1986) A simple inexpensive method for cleaning diatoms. Transactions of American Microscopical Society 105: 152-157.

Charlton R (2008) Fundamentals of fluvial geomorphology. London: Routledge, 234 pp.

Chile. Resolución Exenta 1070 (2014) Establece nuevo Programa de Vigilancia, detección y control de la Plaga Didymo.

Chile. Resolución Exenta 332 (2011) Establece protocolo de limpieza y desinfección de fómites de la microalga *Didymosphenia geminata*, Didymo.

CONICYT (2008) Manual de normas de bioseguridad, segunda edición. Gobierno de Chile. Santiago, Chile. 139pp.

Díaz CA, Molina X & V Montecino (2012) Manual para el monitoreo e identificación de la microalga bentónica *Didymosphenia geminata*. Producido por POCH-Universidad de Chile y financiado por la Subsecretaría de Pesca.

Duncan M, Kilroy C, Vieglais C & F Velvin (2007) Protocol for the collection of samples for delimiting surveys for *Didymosphenia geminata* for microscopic analysis. NIWA Client Report: CHC2007-110.

Ferrario M, Sar E & Sala S (1995) Metodología básica para el estudio del fitoplancton con especial referencia a las diatomeas. Universidad de Concepción. Concepción, Chile. 23 pp.

Hartley B (1996) An Atlas of British Diatoms . Biopress Limited, Bristol.

Hasle G & Fryxell G (1970) Diatoms: cleaning and mounting for light and electron microscopy. Transactions of American Microscopical Society 89: 469-474.

Hotzel G & R Croome (1999) A phytoplankton methods manual for Australian freshwaters. Land and Water Resources and Development Corporation. Camberra, Australia.

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 411/6 of. 98. Calidad del agua, muestreo Parte 6: Guía para el muestreo de ríos y cursos de agua.

Kellogg D & Kellogg T (1987) Diatoms of the McMurdo ice shelf, Antarctica: Implications for sediment and biotic reworking. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 60: 77 - 96.

Krammer K & H Lange-Bertalot (1986) Bacillariophyceae. Süsswasserflora von Mitteleuropa 2 (1-4). VEB G. Fisher Verlag, Jena, Germany.

Krammer K & H Lange-Bertalot (1986) Süßwasserflora von Mitteleuropa. Bacillariophyceae (v.2). Naviculaceae (pt.1) Jena. Germany, Fisher.

Krammer K & Lange-Bertalot H (1991) Bacillariophyceae. 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. in Ettl H, Gerloff J, Heynig H & Mollenhauer D (eds) Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 2/3. Gustav Fischer Verlag: Stuttgart, Jena. 576 pp.

Krammer K (1997) Die cymbelloiden Diatomeen. Teil 1. Allgemeines und Encyonema Part. Bibliotheca Diatomologica 36: 1-382.

Krasske G (1939) Zur KieselalgenXora Südchiles. Archiv für Hydrobiologie 35:349-468.

Lange-Bertalot H & K Krammer (1989) *Achnanthes*, eine Monographic der Gattung. En: Bibliotheca Diatomologica. H, Lange-Bertalot (ed.). Band 18. Berlin. J. Cramer. 393 pp.

Lange-Bertalot H & Metzeltin D (1996) Indicators of oligotrophy : 800 taxa representative of three ecologically distinct lake types carbonate buffered-oligodystrophic-weakly buffered soft water. Koenigstein. Germany. 390 pp.

Lange-Bertalot H (1993) 85 new taxa and much more than 100 taxonomic clarifications supplementary to Sßwasserflora von Mitleleeuropa. Vol. 2. J. Cramer. Berlins Stuttgart.

Lange-Bertalot H (1999) Neue kombinationen von taxa aus *Achnanthes* Bory (sensu lato). Iconographia diatomologica 6: 276 - 289.

Lange-Bertalot H (2001) *Navicula sensu stricto*, 10 Genera separated from *Navicula sensu lato*, Frustulia. En Lange-Bartelot H (ed.): Diatoms of Europe, 2. ARG Gantner Verlag, KG Ruggell. 526 pp.

Lange-Bertelot H (2000) Transfer to the generic rank of *Decussata patrick* as a subgenus of *Navicula bory sensu lato*. In: Lange-Bartelot H (ed.): Iconographia Diatomologica 9: 670 - 673. Koeltz Scientific Books, Königstein, Germany.

Metzeltin D, Lange-Bertalot H & García-Rodríguez F (2005) Diatoms of Uruguay. Iconographia Diatomologica 15: 1 - 737.


Ministerio del Medio Ambiente (2007) Metodología para el establecimiento del estado ecológico según la directiva marco del agua en la confederación Hidrográfica del Ebro. Ministerio del Medio Ambiente, España. 235pp.

Ministry for Primary Industries. New Zealand Government. Bioseguridad de Nueva Zelanda <http://www.biosecurity.govt.nz/pests/didymo/cleaning>

NCh-ISO 17025.c (2005) Requisitos para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

Palma v A (2013) Guía para la identificación de invertebrados acuáticos. 1era Edición. 122 pp.

Pardo I, L García, C Delgado, N Costas & Abraín R (2010) Protocolos de muestreo de comunidades biológicas acuáticas fluviales en el ámbito de las confederaciones Hidrográficas del Miño-Sil y cantábrico. Convenio entre la universidad de Vigo y las Confederaciones Hidrográficas del Miño-Sil y Cantábrico.



Parra O & C Bicudo (1996) Algas de Aguas Continentales: Introducción a la Biología y Sistemática. Ediciones Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

Parra O, M González, V Dellarossa, P Rivera & M Orellana (1982) Manual taxonómico del fitoplancton de aguas continentales; con especial referencia al fitoplancton de Chile. Vol. 1 *Cyanophyceae*, Vol. 2 *Chrysophyceae-Xanthophyceae*, Vol. 3, Cryptophyceae, Dinophyceae y Euglenophyceae. Editorial de la Universidad de Concepción.

Patrick R & CW Reimer (1966) The diatoms of the United States, exclusive of Alaska & Hawaii, Volume 1 - *Fragilariaceae*, *Eunotiaceae*, *Achnantheaceae*, *Naviculaceae*. Monograph No. 13, Academy of Natural Sciences of Philadelphia.

Rivera P (1983) A guide for references & distribution for the class *Bacillariophyceae* in Chile between 18°28'S & 58°S. Bibliotheca Diatomologica: 1-386.

Round F & Bukhtiyarova L (1996) Four new genera based on *Achnanthes* (*Achnantheidium*) together with a redefinition of *Achnantheidium*. Diatom Research 11: 345 - 361.

Round F (1993) A review & Methods for the use of Epilithic Diatoms for Detecting & Monitoring changes in River Water Quality. Methods for the Examination of Waters & Associated Materials. HMSO, London.

Round F, Crawford R & Mann D (1990) The diatoms: biology and morphology of the genera. Cambridge University Press. 747 pp.

Universidad de Salamanca (2014) Guía de Prevención de riesgos laborales: riesgo biológico en laboratorios. Universidad de Salamanca. España. 53pp.

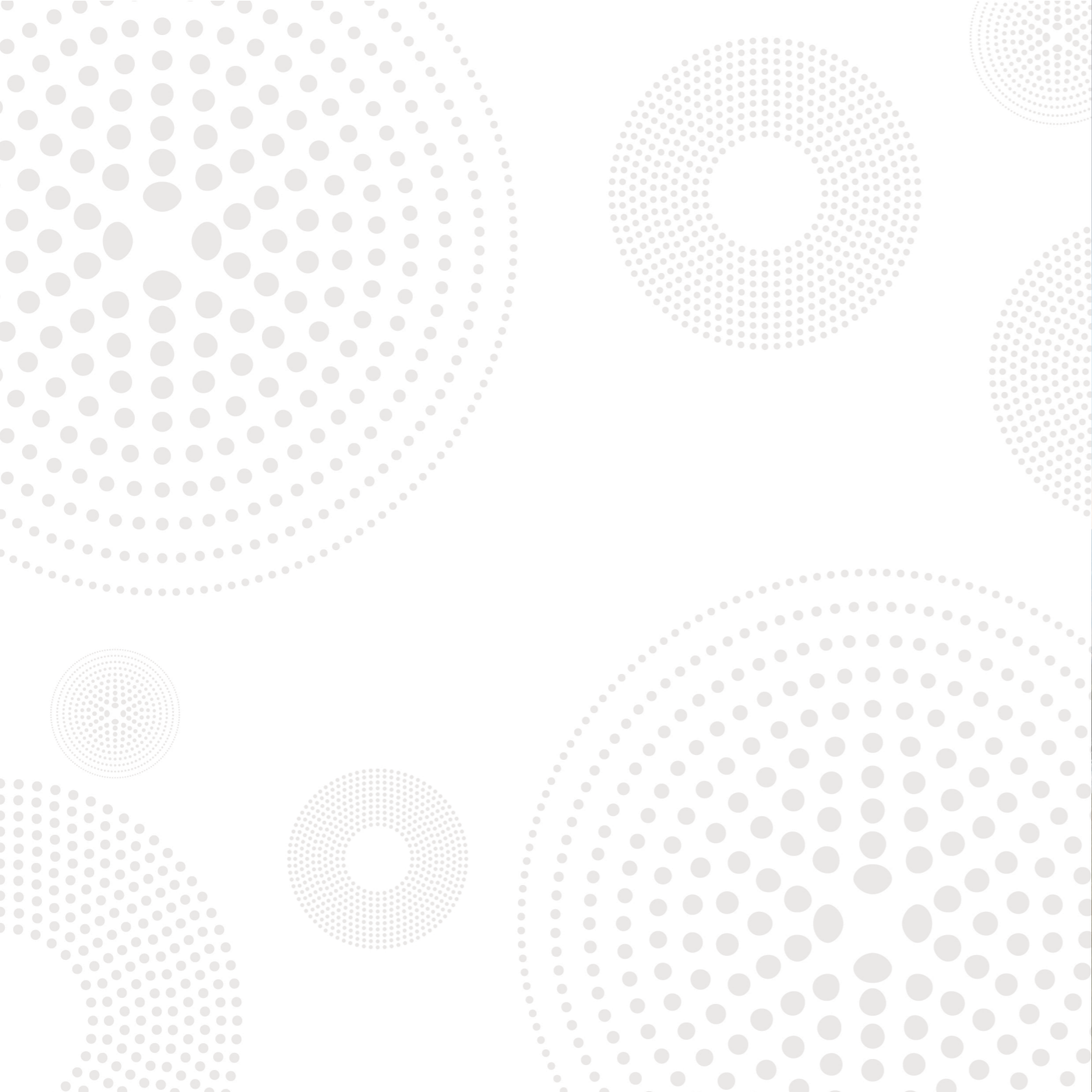
Van de Vijver B, Beyens L & Lange-Bertalot H (2004) The Genus *Stauroneis* in the Arctic and (Sub-) Antarctic Regions. Bibliography of Diatom 51: 1 - 311.

Van de Vijver B, Frenot Y & Beyens L (2002) Freshwater diatoms from Ile de la Possession (Crozet archipelago, Subantarctica). Bibliography of Diatom 46: 1 - 412.

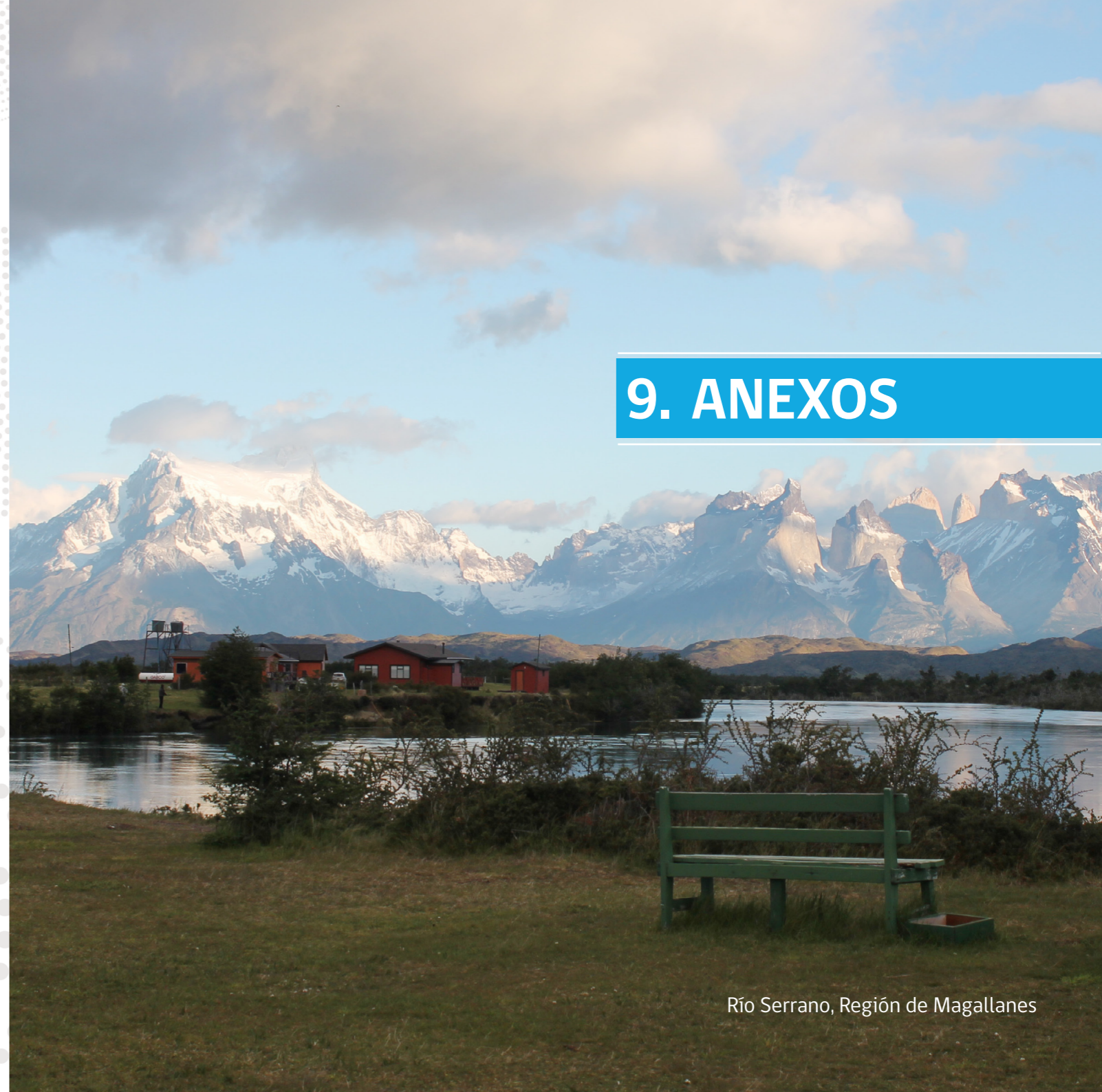
Rumrich U, Lange-Bertalot H & Rumrich M (2000) Diatoms of the Andes (from Venezuela to Patagonia/Tierra del Fuego). Iconographia Diatomologica 9: 1 - 673.

Simonsen R (1987) Atlas and Catalogue of the Diatom Types of Friedrich Hustedt Vol 1 - 3. J. Cramer, Stuttgart.





9. ANEXOS



Río Serrano, Región de Magallanes

9.1.ANEXO 1:

Checklist de materiales para monitoreo de *Didymosphenia geminata*

La lista a continuación contiene todos los materiales necesarios para monitoreo de *Didymosphenia geminata* considerando muestreo biológico (fitobentos, fitoplancton, diatomeas bentónicas y macroinvertebrados bentónicos), químico e hidromorfológico. Además, se incluyen los materiales usados en bioseguridad y para análisis de muestra en laboratorio.

EQUIPOS Y MATERIALES EN TERRENO

GPS	<input type="checkbox"/>
Equipo multiparamétrico o electrodos pH, conductividad eléctrica (CE), oxígeno y temperatura	<input type="checkbox"/>
Flujómetro	<input type="checkbox"/>
Cámara fotográfica	<input type="checkbox"/>
Soluciones de calibración para los electrodos	<input type="checkbox"/>
Huinchas métricas	<input type="checkbox"/>
Fichas de terreno	<input type="checkbox"/>
Contenedores herméticos y aislantes	<input type="checkbox"/>
Set de muestreo químico proporcionado por el laboratorio	<input type="checkbox"/>
Cepillo con área de 4 cm ² para raspado (puede ser una espátula o bisturí de área conocida)	<input type="checkbox"/>
Frascos plásticos de 40 ml con contratapa (para muestras raspadas y muestra de fitoplancton)	<input type="checkbox"/>
Jeringa despuntada para muestreo de material mucoso	<input type="checkbox"/>
Tubos de polipropileno de 15 ml (para muestras de material mucoso)	<input type="checkbox"/>
Red de fitoplancton	<input type="checkbox"/>
Vástago para red de fitoplancton	<input type="checkbox"/>
Guantes de vinilo	<input type="checkbox"/>
Huinchas aisladoras	<input type="checkbox"/>
Etiquetas resistentes al agua	<input type="checkbox"/>
Marcadores permanentes	<input type="checkbox"/>
Lugol	<input type="checkbox"/>
Formaldehído 4%	<input type="checkbox"/>

BIOSEGURIDAD

Agua potable	<input type="checkbox"/>
Agua destilada	<input type="checkbox"/>
Lavalozas	<input type="checkbox"/>
Escobilla	<input type="checkbox"/>
Balde	<input type="checkbox"/>
Pisetas plásticas	<input type="checkbox"/>
Fumigador	<input type="checkbox"/>
Cuerda de seguridad	<input type="checkbox"/>
Salvavidas	<input type="checkbox"/>
Vadeador	<input type="checkbox"/>
Guantes cortos de vinilo	<input type="checkbox"/>
Guantes largos plásticos de uso veterinario	<input type="checkbox"/>
Huinchas adhesivas	<input type="checkbox"/>

EQUIPOS Y MATERIALES DE LABORATORIO

Microscopio invertido con objetivo de 20x y 40x	<input type="checkbox"/>
Microscopio óptico con objetivo 40x	<input type="checkbox"/>
Micropipeta P1000 (volumen variable)	<input type="checkbox"/>
Agitador vortex	<input type="checkbox"/>
Cámara Sedgewick Rafter (para análisis cuantitativo)	<input type="checkbox"/>
Campana extractora de gases	<input type="checkbox"/>
Baño termostático	<input type="checkbox"/>

EQUIPOS Y MATERIALES DE LABORATORIO

Centrifuga 4000 rpm	<input type="checkbox"/>
Placa calefactora	<input type="checkbox"/>
Puntas azules para micropipeta P1000	<input type="checkbox"/>
Tubos plásticos 15 ml	<input type="checkbox"/>
Piseta con agua destilada	<input type="checkbox"/>
Portaobjeto y cubreobjeto	<input type="checkbox"/>
Dispensador de ácido	<input type="checkbox"/>
Delantal para el trabajo con ácido	<input type="checkbox"/>
Mascarillas de seguridad para ácido	<input type="checkbox"/>
Antiparras	<input type="checkbox"/>
Guantes descartables resistentes al ácido	<input type="checkbox"/>
Gradillas para tubos de 15 ml	<input type="checkbox"/>
Tubos de polipropileno, punta cónica, graduados, 15 ml y tapa rosca	<input type="checkbox"/>
Agua destilada	<input type="checkbox"/>
Papel pH	<input type="checkbox"/>
Resina con índice de refracción de aproximadamente 1,7 (Naphrax® o equivalente)	<input type="checkbox"/>
Cajas porta muestras	<input type="checkbox"/>
Ácido sulfúrico (H2SO4)	<input type="checkbox"/>
Peróxido de Hidrógeno (H2O2)	<input type="checkbox"/>

9.2. ANEXO 2:

Ficha de muestreo

CÓDIGO DE ESTACIÓN	<input type="text"/>	NOMBRE DE RÍO	<input type="text"/>
Nombre del ejecutor	<input type="text"/>	Región	<input type="text"/>
Fecha muestreo	<input type="text"/>	Hora de Inicio	<input type="text"/>
		Hora de Término	<input type="text"/>

COORDENADAS LÍMITE DEL TRAMO

Inicio tramo	S	<input type="text"/>	W	<input type="text"/>
Término tramo	S	<input type="text"/>	W	<input type="text"/>
Longitud tramo seleccionado	<input type="text"/>	Altitud	<input type="text"/>	

ACTIVIDAD ENTORNO (indicar con un ticket)

Agrícola	<input type="checkbox"/>	Urbano	<input type="checkbox"/>	Embalse	<input type="checkbox"/>	Poblados	<input type="checkbox"/>	Industrial	<input type="checkbox"/>	Recreativo	<input type="checkbox"/>
Ganadero	<input type="checkbox"/>	Servicio	<input type="checkbox"/>	Ductos	<input type="checkbox"/>	Acuicultura	<input type="checkbox"/>	Desagües	<input type="checkbox"/>	Otros	<input type="checkbox"/>

INSPECCIÓN VISUAL DEL TRAMO

Condiciones meteorológicas	Forma del canal donde se ubica el tramo*	Tipo de hábitat
1. Despejado 2. Cubierto 3. Lluvioso 4. Otro Obs.:	1. Serpenteante 2. Sinuoso 3. Trenzado (islas de tierra internamente) 4. Encajonado 5. Con alteraciones de cauce Obs.:	1. Rápido profundo 2. Rápido somero 3. Lento profundo 4. Lento somero 5. Poza
Tipo de tramo	Porcentaje de sombra sobre el tramo	Turbidez cualitativa del agua
1. Duna y estrías 2. Rabiones y poza 3. Lechos planos 4. Gradas y pozas 5. Cascadas	1. Sombreado con ventanas 2. Sombreado total 3. Grandes claros 4. Expuesto	1. Transparente 2. Ligeramente turbia 3. Muy turbia 4. Otros Obs.:

Condiciones del cuerpo de agua*	Espesor de microalgas o mucosidad	Cobertura de microalgas o mucosidad
1. Espumas en superficie 2. Basura en el cuerpo de agua 3. Descargas en el tramo o riberas 4. Material alóctono en el río 5. Otros Obs.:	1. Ausente 2. Inicial (<0,2 cm) 3. Mediano (0,2 cm ≤ x < 1 cm) 4. Alto (1 cm ≤ x < 2 cm) 5. Muy alto (≤ 2 cm)	1. Ausente 2. Inicial (<20%) 3. Mediano (20% ≤ x < 50%) 4. Alto (50% ≤ x < 80%) 5. Muy alto (≤ 80%)

* Se puede seleccionar más de una opción

MUESTREO QUÍMICO

SI	NO
Observaciones	

MUESTREO BIOLÓGICO

Sí/No	Observaciones terreno	Observaciones microscopio
	Cantidad de rocas muestreadas: Área de muestreo: 4 cm ² (2*2 cm) Volumen muestreado:	Presencia de Didymo (Sí/No): Otras observaciones:
	Tiempo de red: 10 minutos Profundidad red:	Presencia de Didymo (Sí/No): Otras observaciones:
	Cantidad de rocas muestreadas: Área de muestreo: 4 cm ² (2*2 cm) Volumen muestreado:	
	Cantidad de áreas muestreadas: Área de muestreo: 900 cm ² (30*30 cm)	

VARIABLES HIDROMORFOLÓGICAS

Velocidad de corriente	Lectura 1	Lectura 2	Observación
Velocidad superficial (m/s)			
Velocidad media (m/s) = 60% fondo			
Velocidad de fondo (m/s)			
Profundidad velocidad de fondo (cm)			

Sustrato	1 (< 10%)	2 (10% ≤ x < 25%)	3 (25% ≤ x < 50%)	4 (50% ≤ x < 75%)	5 (≥ 75%)
Bolones ≥ 256mm					
Cantos: 65-256 mm					
Grava: 9-64mm					
Gravillas: 2-8mm					
Arena-Limo- Arcilla: < 2 mm					

Observaciones generales

Completar, indicar cualquier observación útil para caracterizar el sitio, número foto, zona aledaña, nombre industria, pueblo, condición de ribera, zona del río muestreada (naciente, media, baja), Ubicación del sistema (bajo lago, afluente), etc.



**Subsecretaría
de Pesca y
Acuicultura**

Gobierno de Chile