Gobierno de Chile
Subsecretaria de Pesca

GOBIERNO DE CHILE
SERVICIO NACIONAL DE PESCA

# MANUAL TÉCNICO

# CURSO TEORICO-PRÁCTICO PARA EL MUESTREO, IDENTIFICACIÓN Y ENUMERACIÓN DE *Alexandrium catenella* Y OTROS TAXA NOCIVOS

**Puerto Montt**
**Enero - Marzo**
**2009**

# MANUAL TÉCNICO

# CURSO TEORICO-PRÁCTICO PARA EL MUESTREO, IDENTIFICACIÓN Y ENUMERACIÓN DE *Alexandrium catenella* Y OTROS TAXA NOCIVOS


**Autores:**

**Ximena Vivanco T.**

**Instituto de Fomento Pesquero**

**Miriam Seguel L.**

**CERAM – Universidad Austral de Chile**

## INDICE DE CONTENIDOS

**I. Antecedentes**..... 1

**II. Manual Técnico** ..... 3

1. Metodologías de Muestreo ..... 3

1.1 Muestras Cualitativas ..... 3

1.1.1 Requerimientos PSMB: LAB-NT5..... 3

1.1.2 Requerimientos REPLA: Informe Técnico Nº 2168/2008..... 4

1.1.3 Observaciones y comentarios..... 4

1.2 Muestras cuantitativas de fitoplancton ..... 6

1.2.1 Requerimientos PSMB: LAB-NT5..... 6

1.2.2 Requerimientos REPLA: Informe Técnico Nº 2168/2008..... 6

1.2.3 Observaciones y comentarios..... 6

1.3 Sedimentos para quistes fitoplancton..... 9

1.3.1 Método de la Trampa de sedimento .....10

1.3.2 Método de la Sonda sacatestigo .....10

1.3.3 Método del Succionador de sedimentos.....11

2. Metodologías de Análisis .....13

2.1 Muestras Cualitativas.....13

2.1.1 Requerimientos PSMB: LAB-NT5.....13

2.1.2 Requerimientos REPLA: Informe Técnico Nº 2168/2008.....14

2.1.3 Observaciones y comentarios.....15

2.2 Muestras cuantitativas.....18

2.2.1 Requerimientos PSMB: LAB-NT5.....18

2.2.2 Requerimientos REPLA: Informe Técnico Nº 2168/2008.....18

2.2.3 Observaciones y comentarios.....18

2.3 Sedimentos para quistes.....20

2.3.1 Técnica de Matsuoka & Fukuyo, 2000 (extracto) .....20

2.3.2 Almacenamiento y fijación de las muestras de sedimento ....21

3. Identificación de dinoflagelados de interés .....22

3.1 Técnicas de identificación de dinoflagelados en microscopía óptica ....22

3.1.1 Separación de placas .....22

3.1.2 Tinción de placas .....23

3.1.3 Campo claro – contraste de fases - epifluorescencia .....23

3.2 Fase vegetativa .....24

3.2.1 Tabulación en dinoflagelados .....24

Comparación entre Gonyaulacales y Peridiniales .....25

3.2.2 Gonyaulacales .....27

*Alexandrium catenella* .....28

*Alexandrium ostenfeldii* .....30

*Alexandrium tamarense*.....32

*Protoceratium reticulatum*.....33

3.2.3 Dinophysiales .....34

*Dinophysis acuta* .....35

*Dinophysis acuminata* .....37

3.3 Fase de resistencia (quistes).....38

3.3.1 Características generales .....38

3.3.2 *Alexandrium catenella* .....43

3.3.3 *Protoceratium reticulatum* .....43

**III. Referencias bibliográficas.....45**

## INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Red de fitoplancton ..... 4

Fig. 2 Modificaciones a red estándar de fitoplancton ..... 5

Fig. 3 Toma de muestras con red ..... 5

Fig. 4 Toma de muestras con red ..... 5

Fig. 5 Esquema de manguera para muestreo ..... 7

Fig. 6. Toma de muestras con manguera ..... 7

Fig. 7 Toma de muestras con manguera ..... 7

Fig. 8 Fijación de muestras cualtitativas (Formalina) y cuantitativa (Lugol) ..... 9

Fig. 9 Sonda Sacatestigo diseñada por el Laboratorio de Oceanografía Pesquera de la Universidad de Tokio .....10

Fig. 10 Succionador de sedimentos utilizado para colectar las primeras capas de los sedimentos marinos .....11

Fig. 11 Comparación entre estimaciones de Abundancia relativa y Densidad (cél/L) de ***Alexandrium catenella*** para estaciones de monitoreo en la región de Aysén para el período 2007-2008 .....16

Fig. 12 Preparación de muestras de fitoplancton cualitativo para el análisis de abundancia relativa.....17

Fig. 13 Microscopio con contraste de fases, para análisis de muestras cualitativas .....17

Fig. 14 Cilindros de sedimentación .....19

Fig. 15 Preparación de muestras de fitoplancton cuantitativo para análisis con el método de Utermöhl .....19

Fig. 16 Metodología de Análisis de Quistes de Dinoflagelados en Sedimento.....21

Fig. 17 Separación de placas.....22

Fig. 18 Placas desarmadas y teñidas .....23

Fig. 19 Comparación de dinoflagelados observados con las técnicas descritas .....24

Fig. 20 Esquema de tabulación de un dinoflagelado peridinioide .....25

Fig. 21 Diferencias entre las placas de dinoflagelados peridiniales y gonyaulacales ....26

Fig. 22 Tabulación apical de dinoflagelados peridiniales y gonyaulacales .....26

Fig. 23 Arreglo de la s placas en el género ***Alexandrium*** .....27

Fig. 24 ***Alexandrium catenella***.....28

Fig. 25 ***Alexandrium catenella***.....29

Fig. 26 ***Alexandrium catenella*** en muestra de la región de Aysén.....29

Fig. 27 ***Alexandrium ostenfeldii***. Observación de forma general y características diagnósticas de la especie .....30

Fig. 28 ***Alexandrium ostenfeldii***.....31

Fig. 29 ***Alexandrium ostenfeldii***.....31

Fig. 30 ***Alexandrium tamarense.*** Observación de forma general y características diagnósticas de la especie .....32

Fig. 31 ***Alexandrium tamarense***.....33

Fig. 32 ***Protoceratium reticulatum.*** Observación de aspecto general.....33

Fig. 33 ***Protoceratium reticulatum***.....34

Fig. 34 Terminología ***Dinophysis***.....34

Fig. 35 ***Dinophysis acuta***. Forma general .....35

Fig. 36 ***Dinophysis acuta***.....36

Fig. 37 ***Dinophysis acuminata.*** Forma general.....37

Fig. 38 Comparación entre la nomenclatura utilizada en la fase vegetativa y en los quistes de los dinoflagelados.....39

Fig. 39 Quiste de resistencia de ***Alexandrium catenella,*** proveniente de sedimentos de la X región .....43

Fig. 40 Quistes de resistencia de ***Protoceratium reticulatum***.....44

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Comparación entre fijadores más usados para muestras de fitoplancton ..... 8

Tabla 2 Métodos de muestreo utilizados en estudios sobre la distribución quistes de ***Alexandrium*** sp en sedimentos.....12

Tabla 3 Escala de abundancia relativa según LAB-NT5.....13

Tabla 4 Escala de abundancia relativa en Informe Técnico Nº 2168/2008.....14

# I. ANTECEDENTES

Los programas de monitoreo de Floraciones Algales Nocivas reflejan en su diseño la estructura y función del mismo, y depende de las demandas específicas de sus usuarios, como también de las reglas generales y regulaciones impuestas por la autoridad competente (Andersen, 1996; Anderson *et al*, 2001; Andersen *et al*, 2004, Guzmán *et al*, 2007). Si bien Smayda (2004) propone que los protocolos no deben ser fijos; también enfatiza que las mediciones realizadas deben ser confiables, lo cual concuerda con lo planteado por Andersen (1996), mediante definiciones de controles de calidad o niveles de precisión (Andersen & Throndsen, 2004). Además, no puede establecerse un único procedimiento estándar para la evaluación de la composición y abundancia del fitoplancton dado que las cuestiones que abordan los programas de seguimiento son de distinta naturaleza y, por consiguiente, exigen protocolos específicos (UNE-EN15204, 2007). Por otra parte, mientras mayor sea la base de datos, mayor será la posibilidad de identificar patrones que expliquen estos eventos (Franks & Keafer, 2004), o que permitan tomar decisiones más oportunas; ya que se ha reconocido que el análisis de fitoplancton en monitoreos de toxinas permite identificar en forma temprana la presencia de especies productoras de floraciones y de asociar niveles de abundancia de éstas con acciones de prevención de impactos (Todd, 2004); pero para ello se requiere contar con analistas entrenados que apliquen metodologías comparables entre sí. Esto no necesariamente implica que una metodología es mejor que otra en sí, sino que como se menciona previamente, debe responder las interrogantes que el programa de monitoreo ha definido como relevantes, y si hay diversas aproximaciones operativas o metodológicas para abordarlas, se debe optar por alguna de ellas, y generar actividades integrativas, como talleres de capacitación que logren este objetivo.

Para el caso de Chile, y de sus programas de monitoreo dirigidos hacia microalgas marinas nocivas, ya sea para garantizar la calidad sanitaria de los moluscos bivalvos de exportación o el control de la dispersión de especies nocivas (plagas), o para proteger la salud pública; deben realizarse esfuerzos tendientes a homogeneizar o estandarizar las metodologías empleadas; en beneficio de una mejor comprensión de estos fenómenos y de un uso más eficiente de la información recopilada. En forma adicional han surgido las obligaciones asociadas al Reglamento de Plagas Hidrobiológicas (D.S. MINECON Nº 345/2005) que requiere disponer de información confiable y oportuna, respecto de la distribución y abundancia de los taxones nocivos, a fin de que la Autoridad pueda adoptar las medidas más apropiadas según los requerimientos de este cuerpo normativo.

Debido a esta necesidad, se requiere contar con profesionales entrenados en la identificación de la especie ***Alexandrium catenella***, recientemente declarada como plaga de acuerdo al Reglamento precitado, y en las metodologías propuestas dentro de este marco normativo y el desarrollo de habilidades para el reconocimiento e identificación de la forma vegetativa y quiste de este dinoflagelado, sin perjuicio de la inclusión de otros taxones nocivos.

El presente Manual recopila la información requerida en el cumplimiento de estos requerimientos, y ha sido elaborado como parte de las actividades del Proyecto "Curso teorico-práctico para el muestreo, identificación y enumeración de ***Alexandrium***

***catenella*** y otros taxa nocivos" , encargado por la SubSecretaría de Pesca al Instituto de Fomento Pesquero, en colaboración con el CERAM de la Universidad Austral de Chile .

# II. MANUAL TÉCNICO

## Consideraciones previas

Este Manual tiene como objetivo principal entregar las metodologías y criterios requeridos para el cumplimiento de la normativa vigente, Reglamento de Plagas Hidrobiológicas o REPLA (D.S. MINECON Nº 345/2005), y lo establecido en el Informe Técnico Nº 2168/2008, en cuanto a la propuesta de programa de vigilancia y seguimiento de ***Alexandrium catenella***. Por su parte, el Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos (PSMB) también cuenta con monitoreos de fitoplancton, con protocolos establecidos en Normas Técnicas, específicamen te LAB/NT5 (Enero 2009), el cual ha sido modificado recientemente. Se ha considerado conveniente presentar ambas metodologías y realizar una comparación entre ellas, y a través de comentarios u observaciones derivadas de la revisión de literatura, entrega r una visión integradora y que facilite la comprensión y aplicación de dichas metodologías.

1. Metodologías de Muestreo

1.1 Muestras Cualitativas de fitoplancton

1.1.1 Requerimientos PSMB : LAB-NT5

Antes de sumergir la red en el agua, es necesario ten er certeza de la profundidad en el punto, para evitar tocar el fondo con la red y resuspender sedimentos.

Se ha determinado pasar de tomar 1 muestra en un punto con 3 arrastres a 30 m a una muestra integrada de 2 puntos. La di stancia entre ambos puntos depende de la hidrografía del área, pero debe apuntar a ser de 100 m. Con 2 arrastres verticales de 20 m de profundidad en cada punto. De esta manera se da un mayor sustento estadístico al muestreo de un área y se disminuye el número de arrastres de 3 a 2.

Respecto de la red para la obtención de la muestra, se amplía el diámetro de tramado de la malla de 23 μm a un rango de 20 – 25 μm (espacio filtrante). Las entidades de muestreo deberán implementar programas de mantención de las mallas, que consideren una calibración periódica de acuerdo al nivel de uso que se le dé a la red. Cuando exista uso mensual, se recomienda efectuar una verificación de calidad, mínimo una vez al año.

La muestra cualitativa obtenida será fijada con formalina suficiente para que la muestra quede con una concentración del 3% al 4%. Esto es aproximadamente 15 ml de formalina 100% para una muestra de 450 ml de agua de mar.

El rótulo de las muestras debe indicar sólo el código del formulario. La procedencia de las muestras debe ser desconocida para el analista, de manera de evitar cualquier sesgo en la evaluación de la muestra. Asimismo, se considera importante que el muestreador consigne las condiciones de muestreo en el formulario PSMB.

### 1.1.2 Requerimientos Reglamento Plagas: Informe Técnico Nº 2168/2008

Se deberán usar redes de =25 micrones (el PSMB recomienda 23 micrones). En cada estación se harán 3 lances por cada uno de los dos puntos de muestreo, separados aproximadamente de 500 m. El arrastre se hará entre 20 m y superficie. El remanente del filtrado se colectará y la suma de todos ellos pasará a conformar la muestra integrada de una estación determinada. Las muestras se recolectarán en frascos, con doble tapa para evitar evaporación. Se puede utilizar formalina o solución lugol y mantener en oscurid ad. El diámetro de la red no es definido; pero las redes más utilizadas tienen de 20 a 30 cm de diámetro. Es necesario informar el tamaño a fin de poder estimar el volumen total de agua filtrado.

### 1.1.3 Observaciones y comentarios

Las redes son uno de los elementos más comunes para muestrear plancton en general, pero debido a su filtración selectiva y la variabilidad de la eficiencia de filtrado frente a muestras con mayor o menor cantidad de organismos mucilaginosos, no es adecuada para muestreo cuantitativo de fitoplancton, aún cuando el volumen filtrado sea estimado con flujómetro, el cual fue desarrollado primariamente para muestreo de zooplancton. Sin embargo, el material colectado con red es útil para propósitos cualitativos y de detección de especies que suelen ser poco abundantes en muestras cuantitativas (Reguera, 2002).

La red estándar usada para muestreo de fitoplancton es la que se indica en la Figura 1; sin embargo, cuando la trama de la red es muy fina, se hace recomendable realizar modificaciones a este diseño que permitan aumentar el área de filtrado y disminuir la obstrucción de la malla con el material filtrado. Algunas de estas modificaciones son: incorporar un cono invertido de tela no filtrante, reduciendo el área de la boca de la red o aumentando la longitud del cono de malla (Fig. 2) .

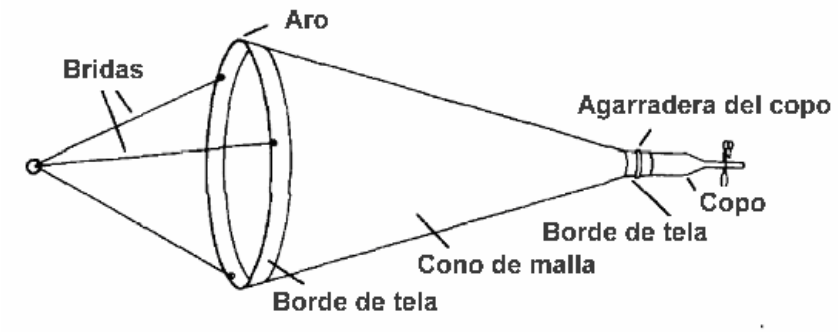



Figura 1. Red de fitoplancton (adaptado de Tangen, 1978).

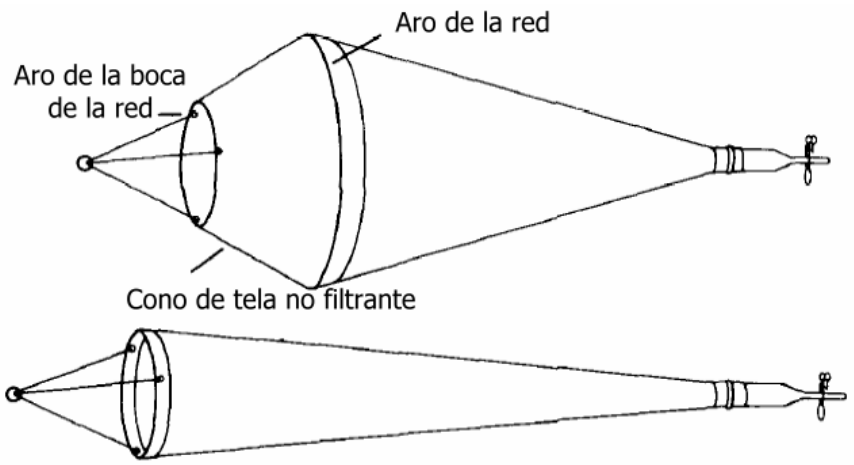



Figura 2. Modificaciones a red estándar de fitoplancton (adaptado de Tangen, 1978).

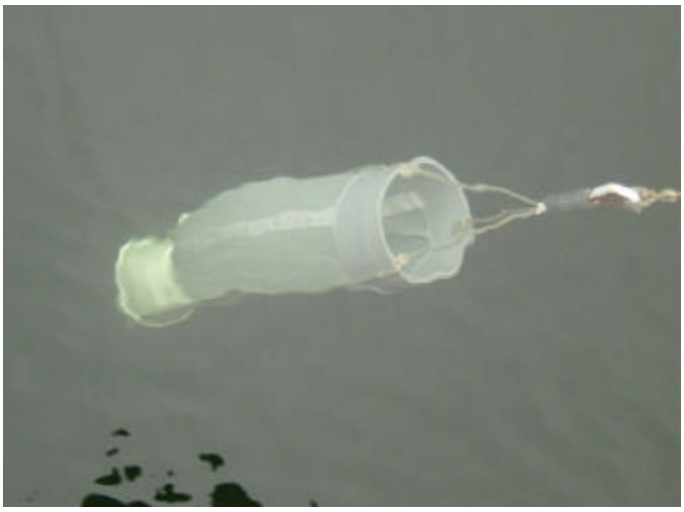


Figura 3 y 4. Toma de muestras con red (Archivo IFOP).

Es conveniente además que los arrastres se realicen lentamente y sin tirones bruscos, para evitar al máximo la pérdida de muestras por resuspensión del filtrado o por taponamiento de la malla de la red.

Las metodologías definidas en cada normativa difieren principalmente en el número de arrastres por punto de muestreo; mientras que el PSMB establece sólo 2 arrastres por punto, el REPLA indica 3 arrastres.

Respecto de la fijación de la muestra, el reactivo que se usa generalmente es formaldehído, de preferencia neutralizado con bórax o ligeramente ácido ( Anderson *et al*, 2001; Andersen & Throndsen, 2004). Los volúmenes y concentraciones finales propuestas por la Norma Técnica del PSMB LAB-NT5 es más elevada al compararla con lo indicado por

Throndsen (1978) que indica una concentración final en la muestra del 1%; es decir, unos 5 ml por 500 ml de muestra.

## 1.2 Muestras cuantitativas de fitoplancton

### 1.2.1 Requerimientos PSMB: LAB-NT5

La toma de muestras se hará usando una manguera (ej. 2,5 cm de diámetro). La muestra se obtendrá entre los 0 y 15 m de profundidad y se fija con 7 – 10 gotas de lugol. La muestra debe quedar de un color transparente.

El recipiente que recibe la muestra debe permitir que quede un espacio de cabeza suficiente para homogeneizar la muestra.

### 1.2.2 Requerimientos Reglamento Plagas: Informe Técnico Nº 2168/2008

Se sugiere la toma de muestras integradas, usando manguera (ej. 2,5 cm de diámetro), separando los estratos superficie -10m y 10-20m. Sin embargo, para un programa de vigilancia de emergencia se considera que no es necesario incluir el muestreo cuantitativo. Estas muestras deben fijarse con solución lugol y mantenerse en oscuridad para evitar la discoloración y degradación del lugol.

### 1.2.3 Observaciones y comentarios

Los muestreadores de tubo han sido una solución simple para la necesidad de contar con muestras de volumen adecuado para un muestreo representativo de la abundancia de organismos fitoplanctónicos (Venrick, 1978), desde que fue propuesta por Lindahl (1986). La longitud máxima que se considera adecuada para este elemento es de 20 m, y puede estar subdividido en segmentos de hasta 1-5 m (Reguera, 2002; Figs. 5-7). Su efectividad es mayor cuando se usa en sectores s omeros y aguas relativamente calmas (Franks & Keafer, 2004).

Las muestras que se toman según cada Normativa difieren en los estratos considerados: para el PSMB se requiere sólo una muestra tomada entre superficie y 15m, y para el REPLA se debe tomar una m uestra entre superficie y 10 m y otra entre 10 y 20 m.

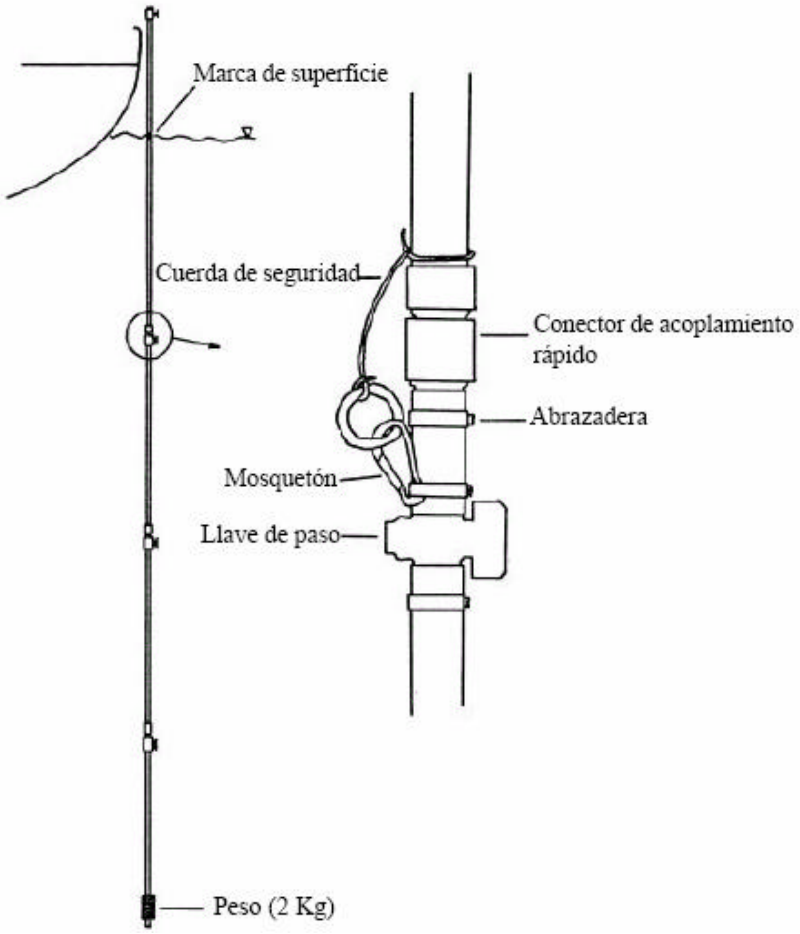



Figura 5. Esquema de manguera para muestreo (Reguera, 2002).

Figura 6 y 7. Toma de muestras con manguera (Archivo IFOP).

La fijación más común se realiza con lugol, de preferencia ácido (Throndsen, 1978). La cantidad de fijador a agregar a la muestra lo indica el color que toma la muestra, el que es descrito como café pálido (Throndsen, 1978), o color brandy o coñac (Andersen & Throndsen, 2004); generalmente este color se alcanza al agregar entre 8 a 12 gotas por 125 ml de muestra (Fig. 8).

Relacionado con los reactivos de mayor uso en la fijación de muestras de fitoplancton, se presenta la siguiente tabla comparativa de las caracterísitcas y ventajas entre la formalina y el lugol:

| **Característica** | **Lugol** | **Formaldehído** |
|---|---|---|
| Costo por volumen | Relativamente barato | Barato |
| Cantidad a usar | Gotas por 500 ml de muestra. | ml por 500 ml de muestra. |
| Toxicidad por manipulación de muestras | Levemente tóxico, puede ser dañíno en contacto directo con la piel y si se es ingerido. | Volátil, vapores tóxicos, se debe evitar contacto directo con la piel y mucosas, potencial carcinógeno y alérgeno. |
| Decantación organismos | Aumenta el peso de las células, lo cual produce una mejor y más rápida decantación. | No acelera decantación, la decantación de una muestra puede tomar hasta 4-5 veces más que una muestra fijada con lugol. |
| Alteración organismos | Menor destrucción celular, retiene mayor cantidad de flagelos. | Altera y destruye células, flagelos se pierden fácilmente. |
| Coloración de muestras | Cambia coloración de las células, dificulta observación de organelos y placas. | No cambia coloración de las muestras; pero se produce decoloración de muestras preservadas por mucho tiempo. |
| Grupos más adecuados para trabajar | Dinoflagelados atecados, otros flagelados, cianobacterias (estimación de biomasa). | Diatomeas, dinoflagelados tecados, cocolitofóridos, cianobacterias (identificación especies). |
| Duración de la fijación | Las muestras fijadas requieren atención cada cierto tiempo por oxidación del fijador. | Pueden durar años sin mantención; sólo se debe evitar evaporación de las muestras. |

Tabla 1. Comparación entre fijadores más usados para muestras de fitoplancton (información obtenida de Hasle, 1978; Throndsen, 1978; Andersen & Throndsen, 2004; Cronberg & Annadotter, 2006).

Figura 8. Fijación de muestras cualtitativas (Formalina) y cuantitativa (Lugol) (Archivo IFOP).

## 1.3 Sedimentos para quistes

El Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos no incluye monitoreo de quistes en sedimento, mientras que según el Informe Técnico Nº 2168/2008, para el REPLA se considera que "Sería de interés conocer la presencia de bancos o depósitos de quistes, en especial en áreas donde habitan recursos bentónicos; sin embargo, falta información básica local que permita inferir que la presencia de bancos de quistes constituye un riesgo de dispersión de la especie. Para la toma de muestras se sugiere seguir el procedimiento indicado por Lembeye (2004) "; sin embargo, en la publicación citada no se especifica claramente la metodología de muestreo empleada, a excepción de que se menciona que "los muestreos se realizaron manualmente mediante buceo autónomo". Por ello, en este punto se entregarán los métodos más reconocidos y presentados en diferentes publicaciones científicas que han sido usados para la obtención de muestras cuali o cuantitativas de quistes en sedimento.

Para el muestreo superficial se pueden utilizar diferentes métodos , dependiendo de los objetivos planteados en el estudio. Las trampas de sedimento se utiliza n cuando se quiere conocer el número y la tasa de producción de quistes de una especie. Si se desea conocer la presencia de ciertas especies o las variaciones de las comunidades de quistes es preferible utilizar un sacatestigo o un box core. Las dragas, ya sea de arrastre o de mandíbulas no son recomendables ya que pueden perder material ligero, en los cuales se

encuentran muchos quistes recién formados. A continuación se detalla los p rincipales métodos de muestreo.

### 1.3.1 Método de la Trampa de sedimento

Este método esta diseñado para colectar los quistes que se están hundiendo en la columna de agua antes de que se depositen en el fondo marino y para obtener información sobre la comunidad planctónica que se refleja en la comunidad de quistes recogida en la trampa. Las muest ras tomadas con trampa de sedimento se recomienda utilizarla para sólo para análisis cualitativos por las siguientes razones 1) No existe un diseño estándar ampliamente aceptado de trampa de sedimento, ni de protocolos de sedimentación. Las corrientes mari nas afectan el comportamiento de los quistes en su hundimiento, la forma de la trampa y su posición en la columna darán diferencias cuantitativas en la concentración de los quistes, 2) Los materiales resuspendidos del fondo podrían depositarse en la trampa , lo cual complica la interpretación de los datos de sedimentación.

### 1.3.2 Método de la Sonda sacatestigo (core)

Es un instrumento utilizado en geología, que permite recuperar una columna de sedimento de los primeros metros del fondo marino. Se utiliza p rincipalmente en sedimentos finos y no consolidados que no deforma ni distorsiona la muestra al extraerla. Por lo tanto se recomienda cuando se desee conocer el número y distribución de los quistes de una especie. En la figura se muestra un core de graveda d TFO que fue diseño por el Laboratorio de Oceanografía Pesquera de la Universidad de Tokio (TUFOL). Este equipo es apto para zonas costera someras a las que se puede acceder con pequeñas embarcaciones. Algunos investigadores prefieren utilizar diámetros mayores que los diseñados por TUFOL (5 cm en vez de 2,2 cm). Si se desea tomar muestras de sedimentos de mayor longitud, también es útil los saca testigos de pistón.

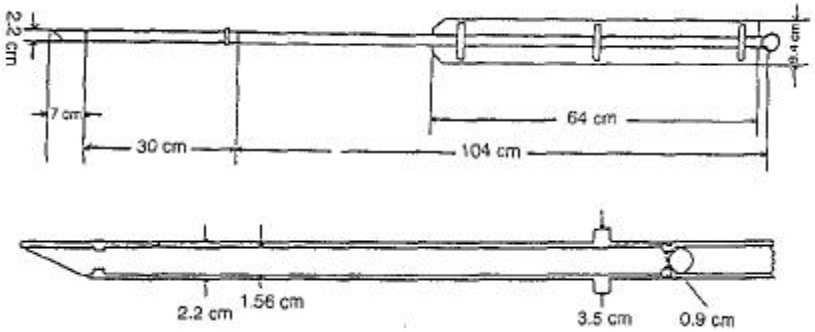



Figura 9. Sonda Sacatestigo diseñada por el Laboratorio de Oceanografía Pesquera de la Universidad de Tokio. Matsuoka & Fukuyo (2000).

### 1.3.3 Método del Succionador de sedimentos

Este es un sistema descrito por Dale & Dale (2002) y de muy fácil uso. Está fabricado con un bulbo de una propipeta y un embudo con peso pegado en el extremo o puesto a un tubo plástico de casi 20 m longitud. El embudo se baja cuidadosamente hasta el fondo del mar, luego se succiona el sedimento con la ayuda del bulbo y de las válvulas de compresión hasta que el sedimento llegue al embudo y a la parte inferior del tubo de polietileno. Una vez tomada la muestra, el sedimento, está se vacía a un conteiner plástico con la ayuda del bulbo y de las válvulas de compresión por un mecanismo reverso. Este sistema puede ser manipulado desde un bote o desde la playa y per mite succionar los primeros centímetros de los sedimentos incluyendo la capa floculante.

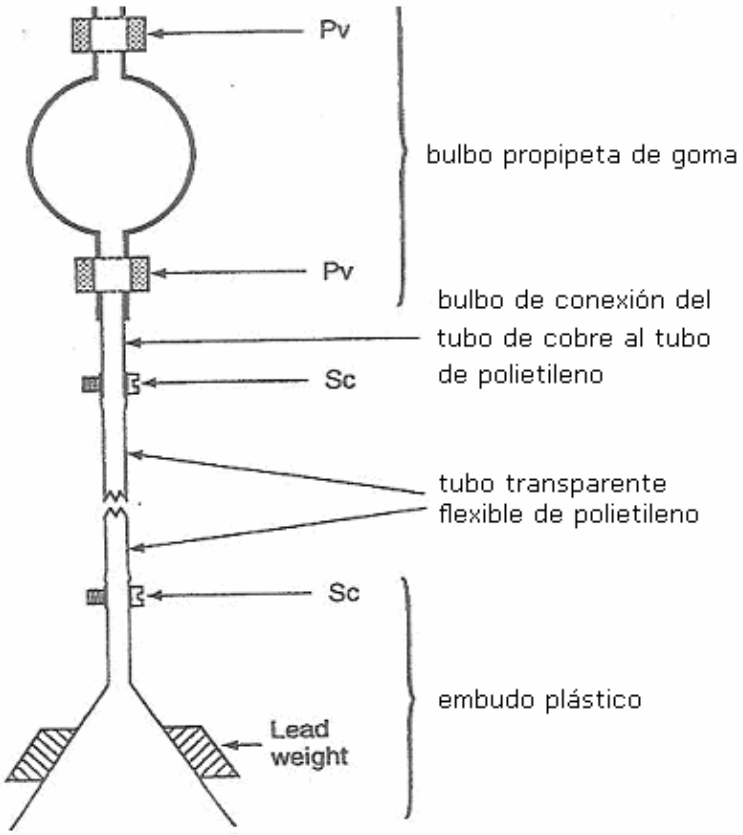



Figura 10. Succionador de sedimentos utilizado para colectar las primeras capas de los sedimentos marinos (Pv: válvula de compresión ; Sc: Abrazadera). (Dale & Dale, 2002).

En la tabla que se adjunta se muestra un resumen de las técnicas de muestreos, metodologías de preparación de muestras, concentraciones y unidad de expresión de los resultados utilizadas en los estudios de quistes de *Alexandrium* sp.

| *Alexandrium* sp. | Sites | Sampling | Layer (cm) | Sediment preparation method | RC density | Unit** | References |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *A. tamarense* | USA | Hand coring | * | Sonication and sieving (80–20 μm or 64–20 μm) | 700 to 800 | a | Anderson et al. (1982) |
| *A. fundyense* | USA | Hydraulically damped corer | 0–3 | Sonication and sieving (75–20 μm), primuline staining direct count | Up to 635 | a | Anderson et al. (2005) |
| *A. tamarense/catenella* | China | Gravity core sampler | 0–3 | HCl and HF treatments, sonication and sieving (125–20 μm), primuline staining direct count | Up to 3778 | b | Cho and Matsuoka (2001) |
| *A. minutum* | France | Spatula or hand-core | * | Sieving (100–60–20 μm), most probable number (MPN) technique | 170 to 16 × $10^3$ | b | Erard-Le-Denn et al. (1993) |
| *A. minutum* | Spain | Scuba divers using core sampler | * | Sonication and sieving (100–10 μm), Ludox TM density gradient | >3270 | a | Garcés et al. (2004) |
| *A. minutum* and *A. tamarense* | Sweden | Box corer | 0–1 | Sonication and sieving (100–25 μm) | n.a. | b | Godhe and Mcquoid (2003) |
| *A. minutum* and *A. tamarense* | India | sediment sucker and gravity corer | 0–2 | Sonication and sieving (100–25 μm) | n.a. | b | Godhe et al. (2000) |
| *A. catenella* | South Africa | Van Veen grab | _ | Sonication and sieving (100–25 μm) | 138 | c | Joyce and Pitcher (2004) |
| *A. catenella* | South Africa | Van Veen grab | _ | sonication and sieving (125–25 μm) | Up to 175 | c | Joyce et al. (2005) |
| *A. tamarense* | Korea | Hand corer | 0–2 | Sonication and sieving (100–20 μm) | 43 to 185 | d | Kim et al. (2002) |
| *A. catenella* | France | Eckman grab sampler | 0–3 | sonication and Sieving (100–20 μm), Ludox CLX density gradient or MPN | Up to 175 | b | Laabir et al. (2004) |
| *A. tamarense* | Celtic sea | Multicorer or Shipek grab | 0–0.5 | Sieving (118–20 μm), acid treatment,sodium polytungstate density gradient | n.a. | b | Marret and Scourse (2002) |
| *A. tamarense/catenella* | Japan | KK type corer | 0–5 | HCl and HF treatments, sieving (125–20 μm) | 7 | b | Matsuoka et al. (2003) |
| *A. fundyense* | USA | Craib corer | 0–1 | Sonication and sieving, primuline staining direct count method | Up to 400 | a | McGillicuddy et al. (2003) |
| *A. tamarense/catenella* | Japan | Handy piston corer | * | Sonication and sieving (125–20 μm), primuline staining direct count method | 4 to 3353 | b | Mizushima and Matsuoka (2004) |
| *A. minutum* and *A. tamarense* | Sweden | Box corer | 0–1 | Sonication and sieving (100–25 μm) | n.a. | b | Persson et al. (2000) |
| *A. tamarense* | USA | Grab corer and mini-piston corer | 0–2 | HCl and HF treatment and sieving (125–10 μm) | n.a. | a | Pospelova et al. (2004) |
| *A. tamarense* | Japan | Gravity core sampler | 0–3 | Sonication and sieving (100–20 μm), primuline staining direct count method | 800 to 1300 | c | Tsujino et al. (2002) |
| *A. tamarense/catenella* | China | Gravity corer | 0–2 | HCl and HF treatment, sonication and sieving (125–20 μm) | Up to 398 | b | Wang et al. (2004a) |
| *A. tamarense/catenella* | China | n.a. | * | HCl and HF treatment, sonication and sieving (125–20 μm) | Up to 503 | b | Wang et al. (2004b) |
| *A. tamarense/catenella* | China | n.a. | 0–2 | Sonication and sieving (125–20 μm) | Up to 81 | b | Wang et al. (2004c) |
| *A. tamarense* and *A. catenella* | Japan | Gravity corer or grab sampler | 0–3 | Sonication and sieving (150–20 μm), primuline staining direct count method | Up to 869 | a | Yamaguchi et al. (1996) |

*Vertical profile; **Resting cyst density in: cysts $cm^{-3}$ (a), cysts $g^{-1}$ dry sediment (b), cysts $g^{-1}$ wet sediment (c), cysts $g^{-1}$ of sediment (d); n.a., not available data.

Tabla 2. Métodos de muestreo utilizados en estudios sobre la distribución quistes de ***Alexandrium*** sp en sedimentos (Genovesi *et al,* 2007). RC: quistes de resistencia.

# 2. Metodologías de Análisis

## 2.1 Muestras Cualitativas

### 2.1.1 Requerimientos PSMB: LAB-NT5

Se sugiere trabajar con la muestra sedimentada. Tiempo mínimo de sedimentación: 3 horas. Se analizarán 3 réplicas de la muestra de red decantada de 0,1 ml c/u, usando cubreobjeto de 18 x 18 mm. Se promediará el número de células por répl ica.

La observación y análisis microscópico debe hacerse en microscopio con contraste de fase. Se permitirá el uso de otros tipos de microscopios siempre y cuando permita una imagen igual o mejor que el microscopio de contraste de fase y su tecnología se encuentre validada para el análisis por publicaciones científicas reconocidas.

El resultado se asigna al nivel que corresponda de la tabla de abundancia relativa (ver escala).

Escala de abundancia relativa

Debido a las diferencias entre taxones y sus in terrelaciones, la escala no puede ser única. Se debe implementar escalas para las principales especies nocivas.

| | Escala | D. acuta, D. acuminata, Alexandrium ostenfeldii, Protoperidinium crassipes, Prorocentrum micans. | A. catenella, Protoceratium reticulatum | Pseudo-nitzschia spp., australis y pseudodelicatissima |
|---|---|---|---|---|
| Ausente | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Raro | 1 | 1 – 5 | 1 – 2 | 1 – 10 |
| Escaso | 2 | 6 – 15 | 3 – 10 | 11 – 50 |
| Regular | 3 | 16 – 35 | 11 – 42 | 51 – 210 |
| Abundante | 4 | 36 – 75 | 43 – 170 | 211 – 850 |
| Muy abundante | 5 | 76 – 155 | 171 – 682 | 851 – 3410 |
| Extremadamente abundante | 6 | 156 – 315 | 683 – 2730 | 3411 – 13650 |
| Hiper abundante | 7 | 316 - 635 | 2731 - 10922 | 13651 – 54610 |

Tabla 3. Escala de abundancia relativa según LAB-NT5.

Estas escalas se mantendrán hasta que se puedan implementar escalas propias de las macrozonas norte y sur del país.

### 2.1.2 Requerimientos Reglamento Plagas: Informe Técnico Nº 2168/2008

Se sugiere trabajar con muestra sedimentada. Se analizarán 3 réplicas de 0,1 ml c/u de la muestra de red decantada, usando cubre objeto de 18 x 18 mm. Se promediará el número de células por réplica. La observación y análisis microscópico debe hacerse en microscopio con contraste de fase. Para la definición y escala de abundancia se usarán los niveles descritos en la tabla siguiente:

Escala de Abundancia Relativa

| Definición de nivel de abundancia | ESCALA | *A. catenella* (cél./L) |
|---|---|---|
| Ausente | 0 | 0 |
| Raro | 1 | 1 – 2 |
| Escaso | 2 | 3 – 10 |
| Regular | 3 | 11 – 42 |
| Abundante | 4 | 43 – 170 |
| Muy abundante | 5 | 171 – 682 |
| Extremadamente abundante | 6 | 683 – 2730 |
| Hiper abundante | 7 | 2731 – 10922 |

Tabla 4. Escala de abundancia relativa en Informe Técnico Nº 2168/2008.

### 2.1.3 Observaciones y comentarios

El análisis cualitativo de la muestra de red es esencial en programas de seguimiento de especies potencialmente nocivas, ya que, según Reguera (2002), permite:

- Registrar especies de interés que se encuentran en concentraciones inferiores a los niveles de detección (10 - 40 $cel^{x}L^{-1}$) de los análisis cuantitativos con cámaras de sedimentación;
- Detección inmediata de advecciones rápidas de densas poblaciones de organismos nocivos, lo que puede dar lugar a tomar decisiones urgentes, tal como el «cierre cautelar» de la extracción de bivalvos, sin esperar a los resultados de los análisis;
- Observar *in vivo* la morfología y comportamiento natatorio de flagelados desnudos difíciles de identificar en muestras fijadas;
- Permite manipulaciones y tratamientos, necesarios para la identificación taxonómica de ciertas especies, imposibles de llevar a cabo en los individuos sedimentados en las cámaras.

La escala de abundancia relativa fue utilizada por primera vez por Avaria (1965); y ha sido modificada por Guzmán *et al* (2002) y Molinet *et al* (2003), entre otros. La escala propuesta para ambas Normas Técnicas corresponde a las modificaciones realizadas por Guzmán *et al* (2007).

La escala propuesta no posee un número elevado de niveles (del orden de 7 u 8 niveles), y los rangos han sido establecidos usando un criterio objetivo, en el que el nivel más alto de la escala (en este caso hiperabundante) al calificar la abundancia relativa no incorpor a

estimaciones numérica que excedan el límite máximo de este rango superior. Se usa una progresión geométrica de la escala para cada nivel, intentando simular en forma empírica el crecimiento de poblaciones fitoplanctónicas del tipo logaritmico o exponenc ial; y que reflejan en el ambiente la alta variabilidad entre muestreos consecutivos que pueden iniciar con una abundancia escasa o regular para rápidamente alcanzar niveles muy abundantes o extremadamente abundantes.

La estimación de abundancia relativa es una herramienta que se aplica en los monitoreos de la región de Magallanes desde 1994 hasta la fecha, y ha mostrado ser eficiente para representar más apropiadamente la distribución de ***Alexandrium catenella***, además de proveer una estimación semi -cuantitativa de la abundancia del taxón. Los resultados muestran la mejor representatividad de las estimaciones de abundancia relativa por sobre aquellas de la densidad de ***A. catenella***, aunque estas últimas son más precisas, pero las estimaciones de densidad en muchos casos son inconsistentes debido a que la forma vegetativa de esta microalga no es detectada en los muestreos integrados, y menos aún en los muestreos a profundidades discretas. Las gráficas que se presentan en la figura 11 reflejan las diferencias entre ambas estimaciones, evidenciando la mayor sensibilidad en la detección del método de abundancia relativa respecto del de la densidad. Por tanto, las estimaciones de abundancia relativa permiten establecer con mayor certidumbre las áreas de distribución geográfica del taxón, y además presentarlas en una escala ordinal consistente con la abundancia de la especie en la naturaleza. Estos antecedentes son relevantes para la adopción de deci siones para especies plaga FAN. Aunque las estimaciones de abun dancia relativa y densidad están correlacionadas, no existe entre ambas variables una relación única, por lo que no es posible predecir la densidad a partir de estimaciones de la abundancia relativa. Pero se ha mostrado que a partir de estimaciones de la abundancia relativa es factible disponer de una alerta temprana del comportamiento de toxicidad en los mariscos.

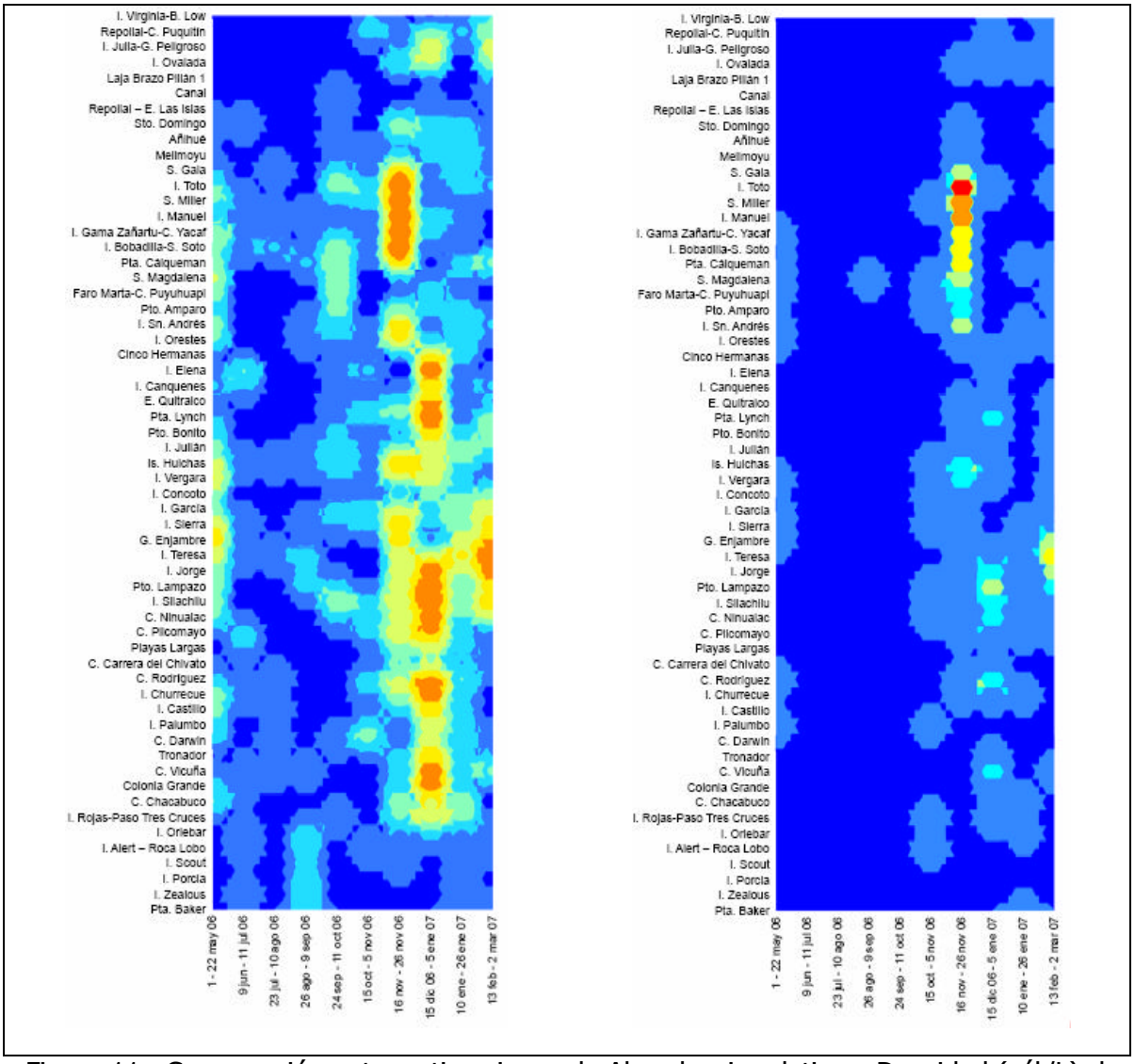



Figura 11. Comparación entre estimaciones de Abundancia relativa y Densidad (cél/L) de ***Alexandrium catenella*** para estaciones de monitoreo en la región de Aysén para el período 2007-2008.

Por lo tanto, la abundancia relativa es un estimador semicuantitativo de la abundancia registrada en un área y período determinado. La escala propuesta se ha ajustado a los resultados obtenidos dentro de la macrozona de la X a la XII región, durante un período de monitoreo de casi 3 años, y se han adaptado las escalas adecuadas para cada especie, de acuerdo a los propios rangos de variación obtenidos con la metodología de análisis descrita (Guzmán *et al*, 2007).

Las principales consideraciones para este método se refieren a que se debe trabajar con la muestra sedimentada, lo que implica un mayor tiempo de decantación, el cual puede variar entre 4 a 12 horas. Las alícuotas de 0,1 ml que se toman del fondo del frasco que contiene la muestra, pueden ser difíciles de obtener cuando la pipeta o gotario que se usa se tapa por exceso de material aglomerado; pero se debe insistir hasta obtener una alícuota que recoja la cantidad de muestra requerida (Figs. 12 y 13). Finalmente, si la

muestra se encuentra muy concentrada, es recomendable realizar diluciones que faciliten la identificación y contaje de los organismos nocivos, pero no se deben alcanzar diluciones muy elevadas en las que se pierdan las células de organismos nocivos que se pueden encontrar en bajos números. En esas ocasiones, se pueden realizar diluciones de entre 3 a 5 veces, pero es necesario tener presente que esta dilución debe ser usada como un factor de corrección para obtener los valores reales de abundancia relativa de las especies nocivas detectadas (en este caso de ***Alexandrium catenella***), y asignar el nivel de abundancia relativa correspondiente.

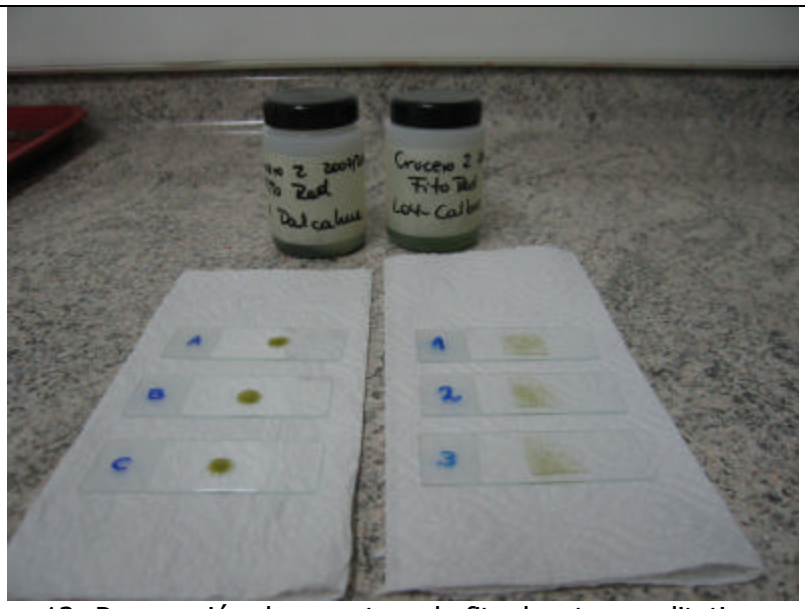


Figura 12. Preparación de muestras de fitoplancton cualitativo para el análisis de abundancia relativa (Archivo IFOP).

Figura 13. Microscopio con contraste de fases, para análisis de muestras cualitativas (Archivo IFOP).

## 2.2 Muestras cuantitativas

### 2.2.1 Requerimientos PSMB: LAB-NT5

Para la determinación de la concentración de células se debe aplicar el método de Utermöhl (1958), utilizando cubetas de sedimentación. El volumen utilizado (5, 10 ó 20 ml) dependerá de la abundancia de la muestra. El tiempo de decantación deberá estimarse para los distintos volúmenes. Se sugiere estandarizar el volumen utilizado en 10 ml. El tiempo de sedimentación mínimo para 10 ml de muestra es 6 horas. Para el contaje se requiere microscopio invertido y preferentemente con contraste de fase. Se debe hacer con objetivo de 10x ó 20x y debe ser total. Los resultados se deben expresar en células por litro (cél/L).

### 2.2.2 Requerimientos Reglamento Plagas: Informe Técnico Nº 2168/2008

Para la determinación de la densidad se debe aplicar el método Utermöhl (1958), utilizando cubetas de sedimentación. El volumen utilizado (5,10 ó 20 ml) dependerá de la abundancia de la muestra. El tiempo de decantación deberá estimarse para los distintos volúmenes. Se requiere para ello microscopio invertido y preferentemente con contraste de fase. Los resultados se podrán expresar en células por litro (cél/L).

### 2.2.3 Observaciones y comentarios

Esta metodología, ampliamente conocida y usada en cuantificación de fitoplancton, por su utlidad para cuantificar organismos en bajas concentraciones en muestras cuantitativas, requiere de ciertas consideraciones a fin de asegurar resultados confiables. Se entregan los más relevantes obtenidos de Hasle (1978), Alveal *et al* (1995), Reguera (2002), Andersen & Throndsen (2004), UNE-EN15204, (2007):

- Lás cámaras usadas y que son originalmente recomendadas en la literatura son las de sedimentación (Figuras 14 y 15). Otras cámaras de uso común, como Palmer-Maloney o Sedgewick-Rafter pueden ser útlies en casos de elevadas concentraciones de organismos de fácil identificación; dado que el menor volumen que pueden contener no permite detectar especies en bajas concentraciones; y los fondos gruesos de estas cámaras, especialmente la Sedgewick-Rafter no permiten una visión tan nítida de los organismos que facilite una buena identificación de algunas especies.
- Se requiere una homogenización adecuada de la muestra previo a su vertimiento en la cámara de conteo. Esto se logra con la agitación suave, volteando el frasco con muestra entre 100 a 200 veces a mano.
- La sedimentación debe ser homogénea en la cámara para lograr una distribución al azar de los organismos en la cámara; para ello, el vertimiento debe ser suave y no forzado (p. ej. uso de propipetas), se deben mantener las cámaras durante la sedimentación sobre una superficie horizontal, sin vibraciones, y en un ambiente sin grandes variaciones de temperatura.
- El tiempo de sedimentación se ve afectado por el volumen de la muestra a sedimentar, lo cual incide en la altura de la cámara a utilizar; el fijador usado y la dimensión líneal de las células a contabilizar. Algunas recomendaciones generales

entregadas por las publicaciones revisadas indican 3 a 8 horas para decantar 10 ml o bien 3-4 horas por cm de altura de cámara de decantación.

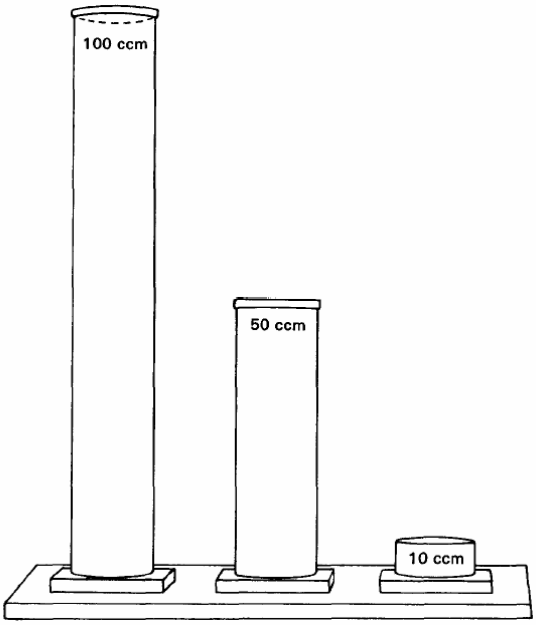



Figura 14. Cilindros de sedimentación (Hasle, 1978).

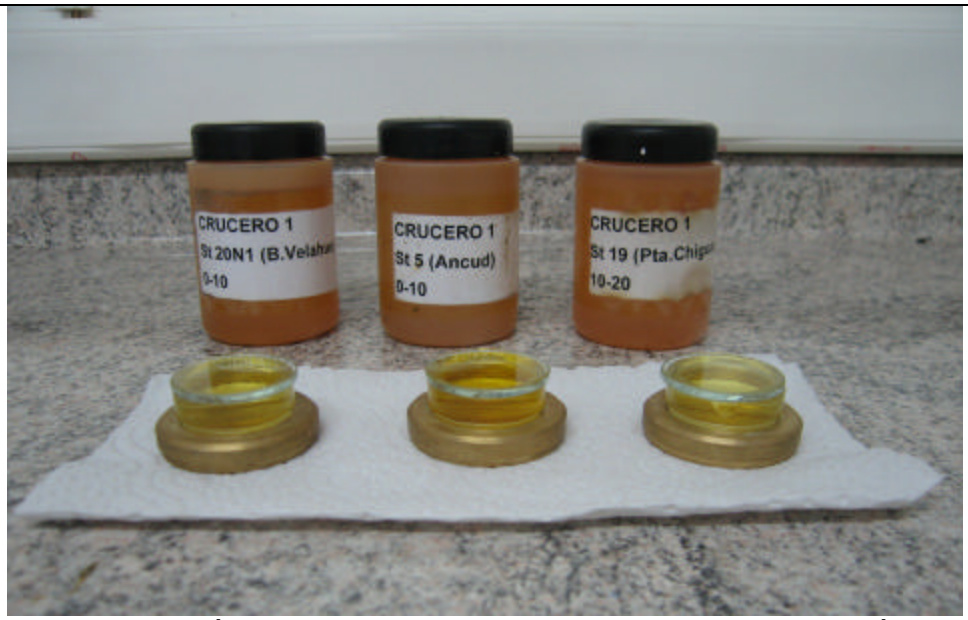



Figura 15. Preparación de muestras de fitoplancton cuantitativo para análisis con el método de Utermöhl (Archivo IFOP).

Otro aspecto altamente relevante de esta técnica es cuántas células contar para obtener una estimación confiable de la abundancia y composición de la muestra, sin incrementar el esfuerzo, y hacer con ello más eficientes los análisis. Dada la complejidad del tema, no se tratará en detalle en este punto y para obtener una buena aproximación se puede encontrar en cualquiera de las publicaciones mencionadas previamente.

Sin embargo, es recomendable y necesario que, aún cuando la abundancia total de la muestra o de algunos organismos sea tal que requiera ser diluida o contada por franjas o campos, hacer una revisión total de la cámara de conteo para detectar especies que se encuentren en bajos números y que puedan ser relevantes para el estudio en desarrollo, como el caso de un monitoreo de microalgas nocivas.

## 2.3 Sedimentos para quistes

Ninguna de las normativas propone una metodología para el análisis de las muestras de sedimento para observación de quistes de ***Alexandrium catenella***. A continuación se entrega el Protocolo de la técnica de tamizado de las muestras (extraído de Matsuoka & Fukuyo, 2000):

### 2.3.1 Técnica de Matsuoka & Fukuyo, 2000 (extracto)

Materiales:

Tamices de abertura de malla de 106 µm y 20 µm.
Espátula o cuchara metálica
Vasos precipitados- 250 mL, 100 mL y 20 mL
Agua de mar filtrada 1 micrón
Sonicador marca B. Braun Biotech, modelo Braun-Sonic
Cámaras Sedgewick-Rafter
Placa petri
Pipetas Pasteur
Microscopio de luz con contrate de fase

**Paso 1**. Extraer con un cuchara metálica sedimento del envase plástico, para depositarlo en un vaso plástico hasta completar un volumen de 5 $cm^{-3}$.

**Paso 2**. Traspasar los 5$cm^{-3}$ de sedimento a un vaso precipitado de 100 mL. Limpiar el contenido del vaso con agua de mar filtrada, para asegurar que toda la muestra se haya extraído. Aforar a un volumen de 80 mL con agua de mar filtrada.

**Paso 3**. Llevar el vaso precipitado al sonicador marca B. Braun Biotech, modelo Braun – Sonic, para realizar el proceso de sonicación, por un periodo de 60 segundos, a una frecuencia aproximada de 40 TL. La finalidad del sonicado es separar los quistes de las partículas adheridas.

**Paso 4**. Una vez finalizado el proceso de limpieza, se procede a filtrar la muestra. Para ello, la muestra debe pasar por dos tamices, uno de 106 µm y el otro 20 µm. La filtración se puede ayudar con agua de mar filtrada. Los quist es y las partículas finas pasan a través del tamiz de 106 µm y se acumulan en el tamiz de 20 micras.

**Paso 5**. Transferir el material retenido en el tamiz de 20 micras a una placa Petri, removiendo las partículas con agua de mar filtrada.

**Paso 6.** La placa se gira con movimientos circulares, formando un remolino, de forma que los quistes y las partículas ligeras se separen de los granos arena más pesados. Tras este proceso, los quistes y otras partículas finas se concentran en el centro de la placa.

**Paso 7**. Verter cuidadosamente el agua sobrenandante con los quistes en suspensión a un vaso precipitado y aforar con agua de mar filtrada a un volumen final de 20 mL.

**Paso 8**. Cuantificar el número de quistes utilizando una cámara Sedgewick Rafter bajo un microscopio de contrate de fase. Se recomienda contar un total de tres réplicas por muestras.

**Paso 9**. Para obtener el número de quistes $cm^{-3}$, se multiplica el promedio de los quistes encontrados por el volumen de aforo (20 mL) y luego se divide por el volumen de la muestra (5 $cm^{-3}$).

Figura 16. Metodología de Análisis de Quistes de Dinoflagelados en Sedimento Extraído de Matsuoka y Fukuyo (2000).

2.3.2 Almacenamiento y fijación de las muestras de sedimento:

Las muestras de sedimento para análisis de quistes se pueden mantener sin fijación por un periodo de tiempo, si son almacenadas a temperaturas bajas, condiciones an óxicas y oscuridad. El rango de temperatura de almacenamiento para las especies de ambientes temperados es de 2-4 ºC. Para evitar los estímulos luminosos se recomienda envolver los frascos con papel aluminio. Las condiciones an óxicas se mantienen llenando los frascos hasta el borde con agua de mar, para luego cerrarlos en forma apretada, tomando la

precaución de no dejar burbujas en el frasco. Sin embargo, el método más idóneo para prevenir la germinación de los quistes es introducir gas nitrógeno en los viales de las muestras.

Como los quistes pueden mantenerse vivos por un largo periodo de tiempo, la fijación no se utiliza comúnmente. Además, los fijadores pueden modificar la apariencia del contenido de ellos, carácter que es importante en la identificación. En el caso que se decida fijar la muestra, se utilizan formalina neutra y glutaraldehído (Matzuoka & Fukuyo, 2002). Para muestras refinadas (después de la limpieza) es recomendable el uso de la formalina neutra (2 -3%) o glutaraldehído (10%) . Si se desea fijar la muestra de sedimentos, se adiciona formalina (37%) a una concentración final de 5 -10%.

## 3. Identificación de dinoflagelados de interés

### 3.1 Técnicas de identificación de dinoflagelados en microscopía óptica

Casi todos los géneros de dinoflagelados tecados son clasificados de acuerdo a la configuración de sus placas (Taylor *et al.*, 2004). Por ello, estas características son en algunos casos esenciales para la correcta identificación de especies, sin embargo, la microscopía de luz convencional no siempre es adecuada para estos propósitos. Es necesario realizar algunas modificaciones o actividades extra, las cuales se entregan a continuación:

#### 3.1.1 Separación de placas

El método más simple y barato, pero el que requiere más esfuerzo y dedicación es la separación de placas, por medio de secado de la muestra o de la adición de hipoclorito de sodio, y posterior presión del cubreobjeto para desarmar y observar las placas (Fig. 17).

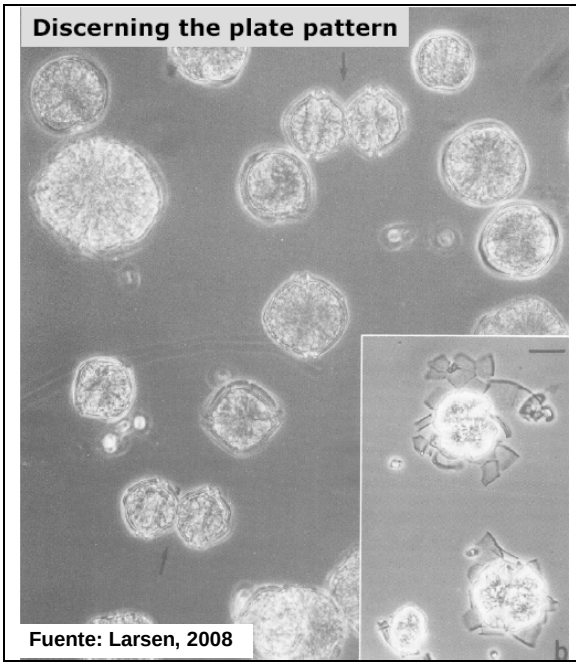



Figura 17. Separación de placas.

### 3.1.2 Tinción de placas

La solución para tinción IF (Imamura y Fukuyo), de acuerdo a Taylor *et al*. (2004), es preparada con:

2.6 g yodo
5.0 g potasio de yodo
4.0 g hidrato de cloral
10 ml agua destilada

Esta solución facilita la observación de placas cuando son separadas siguiendo las indicaciones del punto 3.1.1 (Fig. 18)

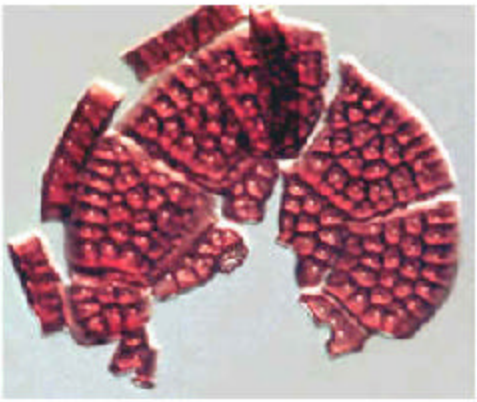


Figura 18. Placas desarmadas y teñidas (Fukuyo, 2000).

### 3.1.3 Campo claro – Contraste de fases - Epifluorescencia

Estas técnicas de microscopía son aplicadas para la visualización de dinoflagelados y otros organismos, arrojan distintos resultados . Como ya se ha mencionado, la microscopía tradicional de campo claro no permite distinguir claramente las placas de los dinoflagelados; mientras que el contraste de fase, aúnque útill para muchos otros organismos, en dinoflagelados . Mientras que la epifluorescencia, cuando se aplica Calcofluor u otro compuesto similar de acuerdo a la técnica descrita en Fritz & Triemer (1985) y Taylor *et al* (2004), las placas son fácilmente discernibles sin mayor esfuerzo o preparación extra (Fig. 19). Sin embargo, el costo de este equipamiento aún hace que la técnica no sea accesible para la mayoría de los laboratorios.

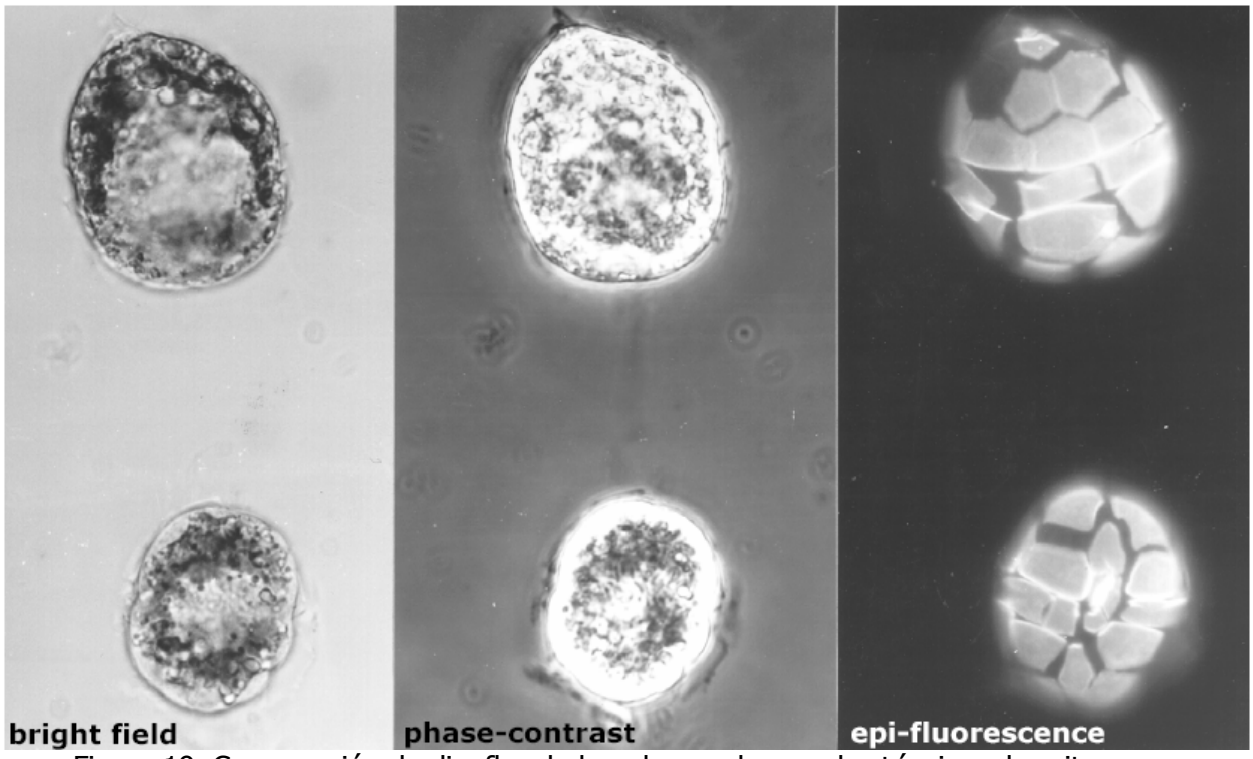



Figura 19. Comparación de dinoflagelados observados con las técnicas descritas (Larsen, 2008).

## 3.2 Fase vegetativa

### 3.2.1 Tabulación en dinoflagelados

La tabulación se refiere al conteo e identificación de placas en una serie específica. El sistema Kofoidiano de nomenclatura de placas hay 6 series transversales principales: apical ('), intercalar anterior (a), precingular ("), postcingular "'), intercalar posterior (p) y antapical ""). A estas series se les asigna un número de acuerdo a la cantidad de placas que el dinoflagelado tiene en ellas, y se le denomina Fórmula de placas a la tabulación de estas series para un dinoflagelado.

Otros componentes se han agregado a la fórmula, como el APC (complejo del poro apical), compuesto por Po (placa del poro), y placa X (o preapical); además de las placas sulcales y cingulares (Steidinger & Tangen, 1997; Fig. 20).

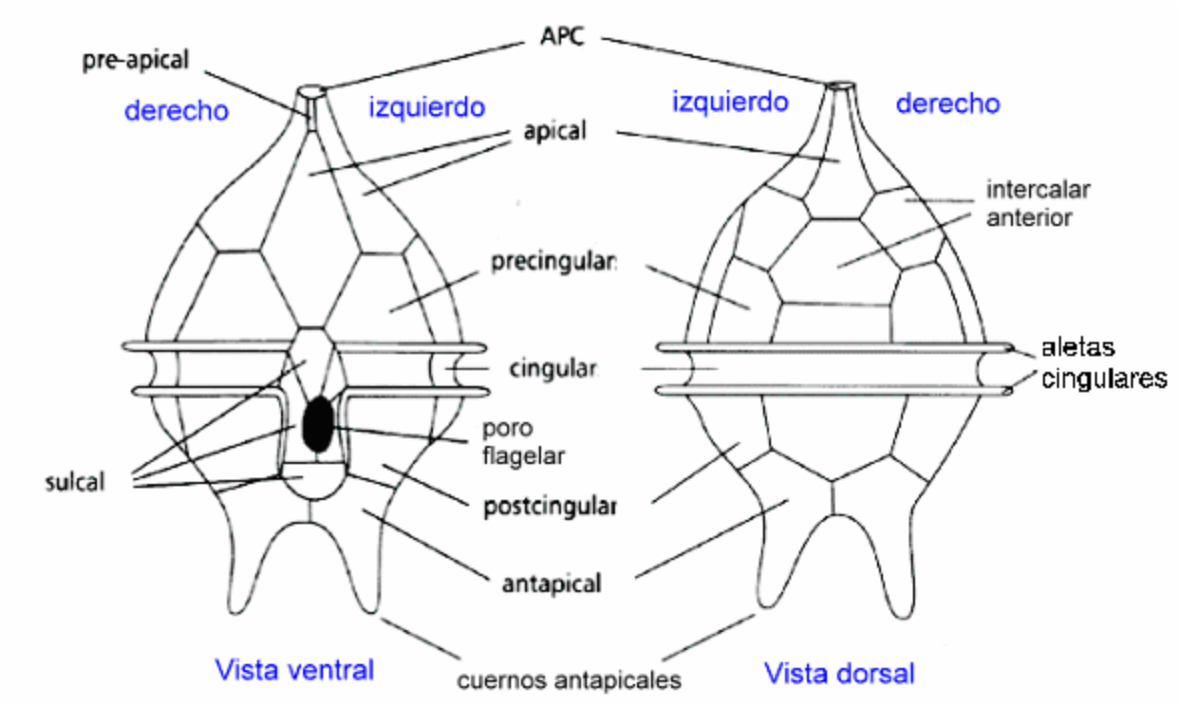



Figura 20. Esquema de tabulación de un dinoflagelado peridinioide (Adaptado de Larsen, 2008).

- Comparación entre Gonyaulacales y Peridiniales

Muchas especies tóxicas pertenecen al grupo de dinoflagelados gonyaulacales. Por su similitud con los peridiniales, y porque éstos los últimos se encuentran dentro de los componentes más comunes de dinoflagelaods tecados en muestras de fitoplancton en la zona, es relevante presentar ciertos aspectos básicos que permitan distinguirlos.

Algunas de las diferencias principales entre dinoflagelados peridiniales y gonyaulacales se muestran en la Figura 21. Los dinoflagelados gonyaulacales presentan asimetría general en el arreglo de sus placas (Fig. 21A y B); la placa X o preapical nunca está presente (Fig. 21C) (Larsen, 2008).

La tabulación general de la zona apical de los peridiniales se expresa como 4', 3a, 7"; mientras que la de los gonyaulacales se expresa como 4', 6" (Fig. 22)

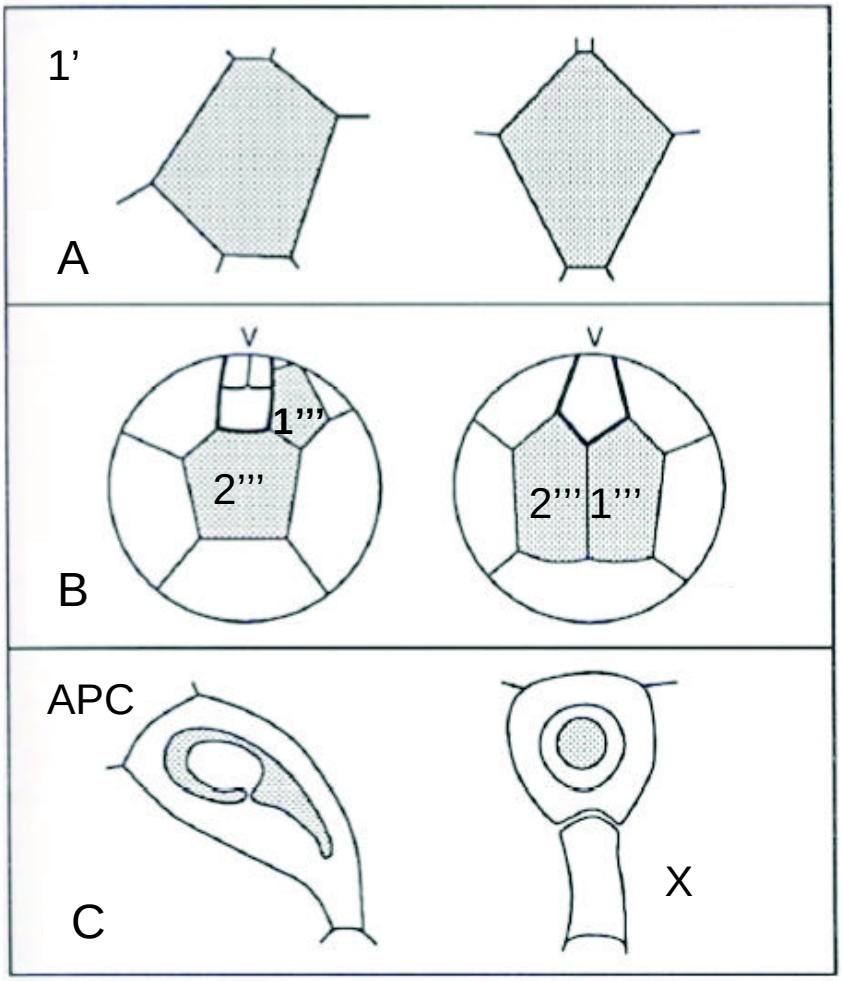



Figura 21. Diferencias entre las placas de dinoflagelados peridinioides (der) y gonyaulacoides (izq) (Adaptado de Larsen, 2008).

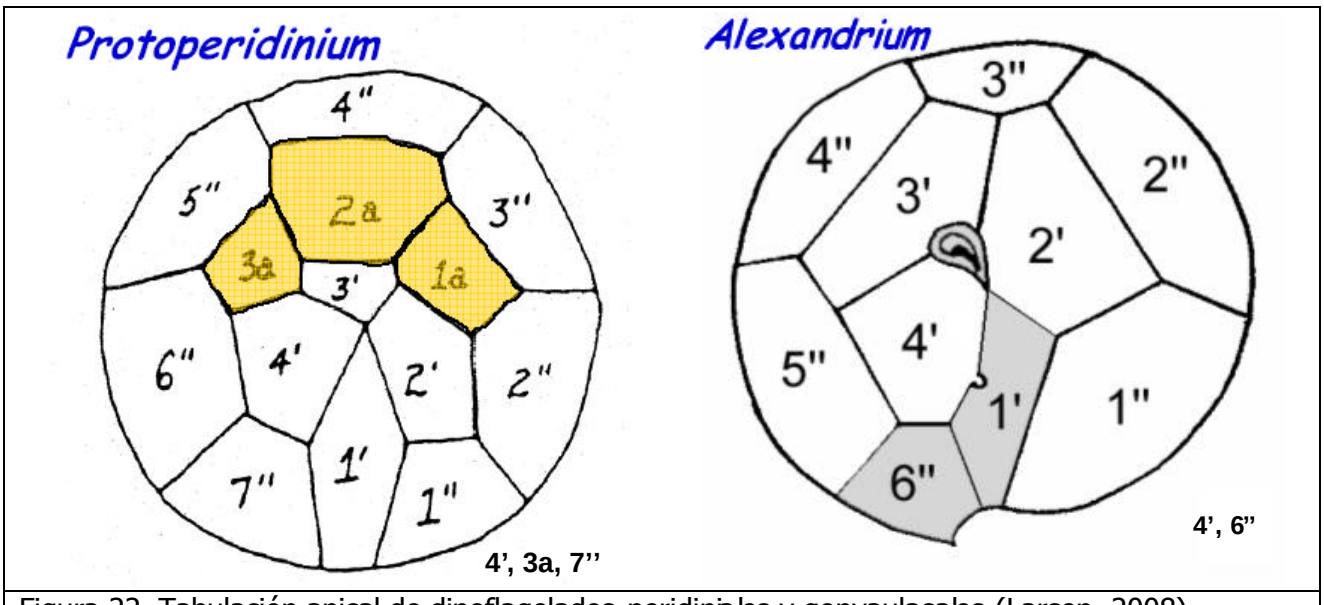



Figura 22. Tabulación apical de dinoflagelados peridiniales y gonyaulacales (Larsen, 2008).

### 3.2.2 Gonyaulacales

Dentro de este grupo, el género ***Alexandrium*** es el que cuenta con mayor cantidad de especies productoras de veneno paralizante, aunque no todos sus miembros son tóxicos (Taylor *et al*, 2004).

Presenta la fórmula de tabulación apical descrita para el grupo de gonyaulacales (4', 6'') y aunque se observa, como en otros géneros del grupo, un grado de torsión que genera asimetría en las placas, no hay sobreposición del cingulum, sino que sólo un leve desplazamiento de alrededor 1 a 1 ,5 anchos del cingulum (Steidinger & Tangen, 1997; Fig. 23A). El APC tiene una placa en forma triangular que es la placa del poro o Po y una abertura como ranura en forma de coma (poro apical), en algunas especies se presenta un segundo poro ubicado en la placa o poro de unión anterior (Taylor *et al*, 2004; Fig. 23C).

Las principales características que permiten identificar especies dentro de este grupo son la morfología de la placa 1' y 6''; la presencia/ausencia del poro ventral, morfología de APC, sa y p (zonas en gris en la Fig. 23), forma y tamaño general y formación de cadenas. Las medidas que se realizan para estimar tamaños son la longitud (ápice -antápice) y el transdiámetro (medida del cingulum sin considerar los bordes o listas sulcales)

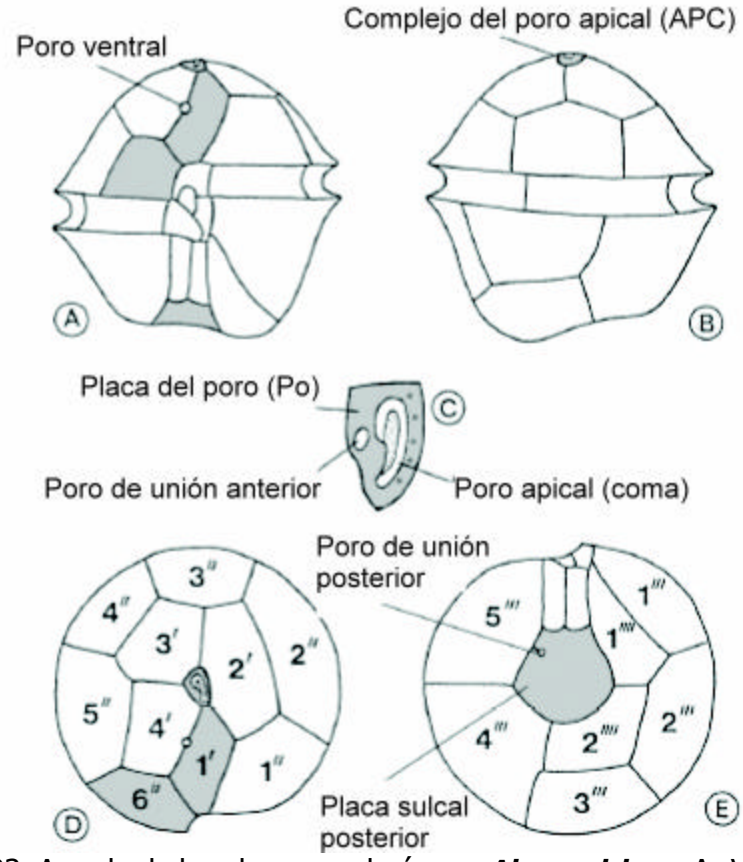



Figura 23. Arreglo de las placas en el género ***Alexandrium***. A: Vista ventral; B: Vista dorsal; C: Complejo del poro apical (APC); D: Vista apical; E: Vista antapical (adaptado de Balech, 1995 y Larsen, 2008).

### *Alexandrium catenella*

El Informe Técnico Nº 2168/2008 indica que "Para el estudio de dinoflagelados se sugiere utilizar como guía taxonómica el trabajo de Fukuyo & Taylor (1989); y también, en Internet se pueden encontrar direcciones de orientación al tema (e.g. www.nmnh.si.edu/botany/projects/dinoflag/Taxa/Acatanella.htm)". Esta última referencia es la más útil, al contener una buena descripción de la especie y lámina con figuras de las principales características de la especie, las que se entregan en la Figura 24.

Otras descripciones se encuentran en Steidinger & Tangen (1997); Balech (1995, 2002) y Taylor *et al* (2004); todas éstas resaltan que se presenta en largas cadenas, es de tamaño medio a pequeño (longitud 20-40µm, transdiámetro 18-37 µm), presenta compresión antero posterior, con Po ancha, y con poro de unión anterior ubicado en la zona dorsal derecha de la placa Po, y la ausencia de poro ventral en la placa 1'. Estas características también se destacan en la Figura 25 y una fotografía de una típica cadena observada en muestras de la XI región se entrega en la Figura 26 .

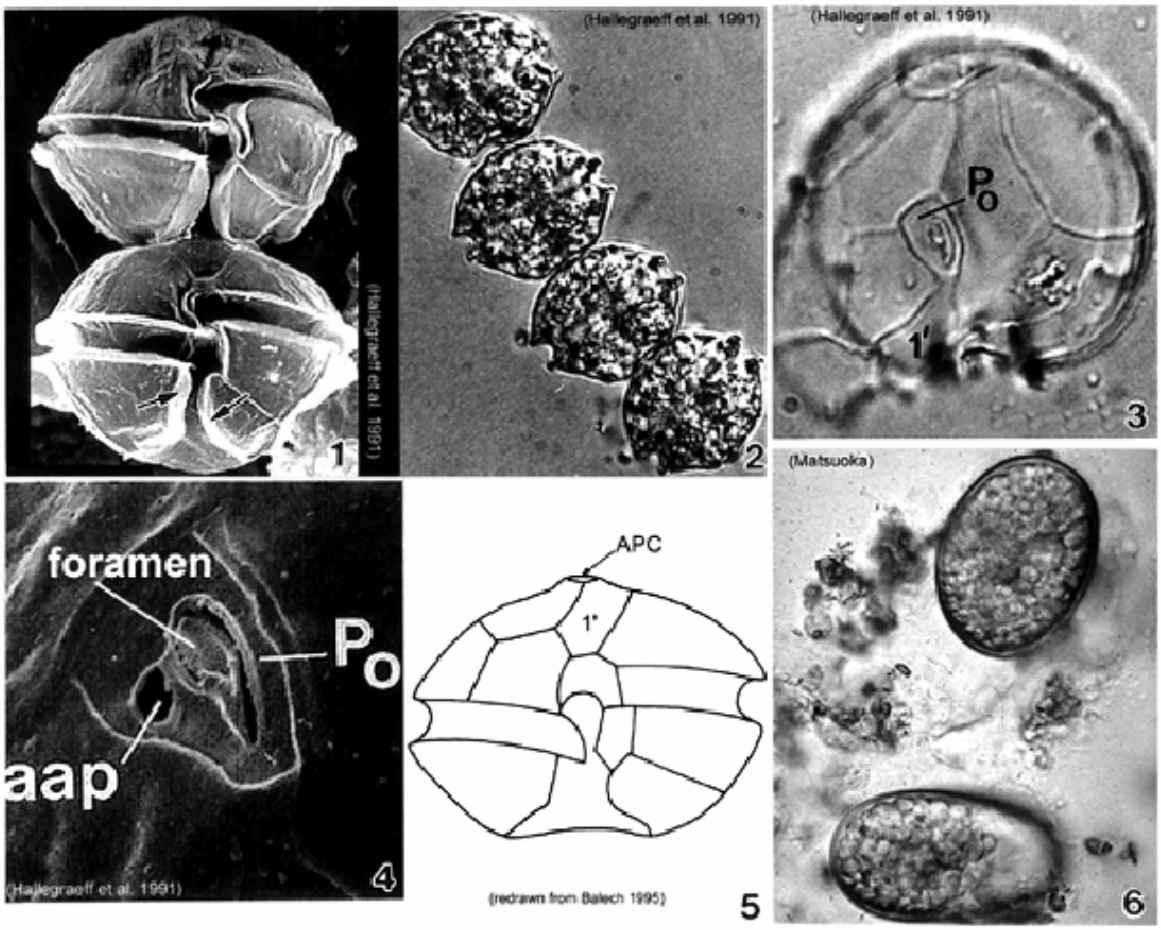



Figura 24. ***Alexandrium catenella*. 1**: MEB: vista ventral; **2**: MO: cadena de 4 células; **3**. MO: vista apical y Po; **4**. MEB: APC con Po, aap (poro de unión anterior); **5**: esquema con detalle de placas; **6**: MO: quistes de resistencia
(Fuente: www.nmnh.si.edu/botany/projects/dinoflag/Taxa/Acatanella.htm).

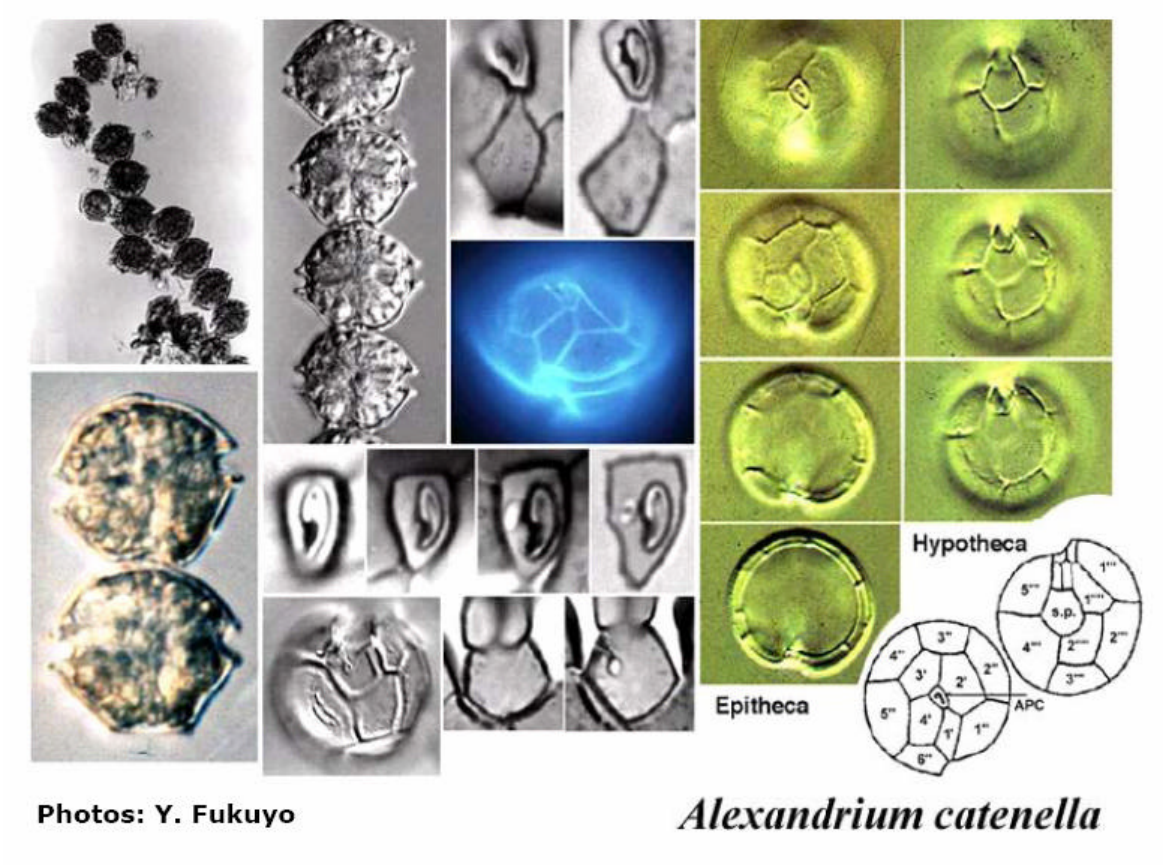



Figura 25. ***Alexandrium catenella*** (Fukuyo, 2000).

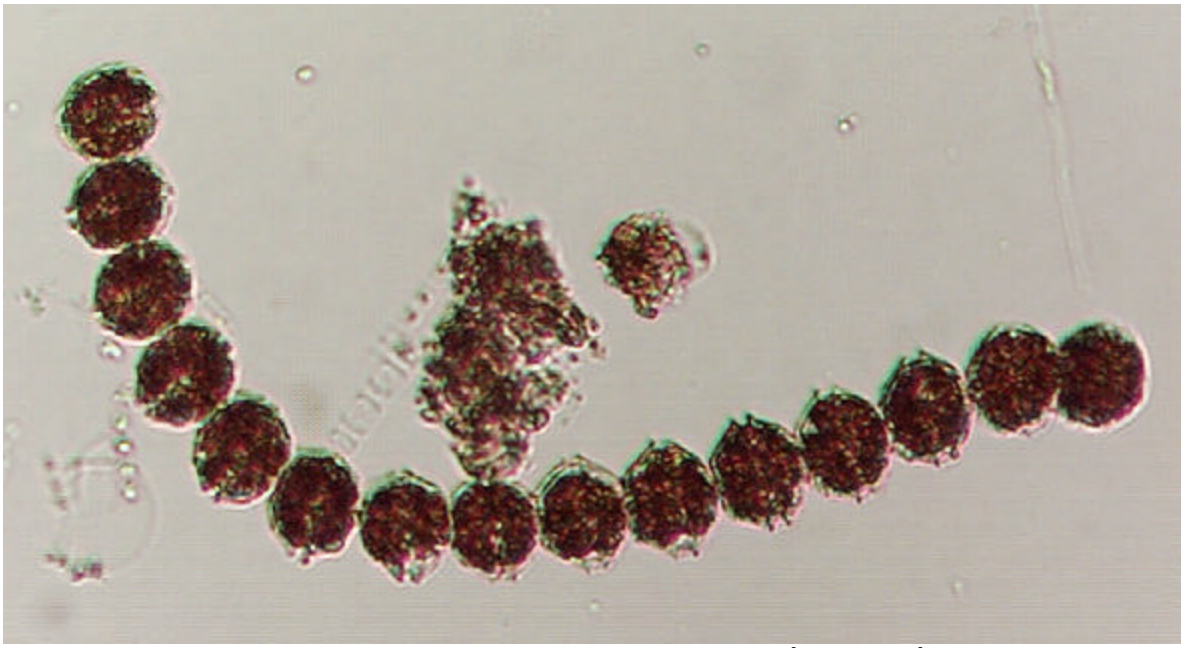


Figura 26. ***Alexandrium catenella*** en muestra de la región de Aysén (Archivo IFOP) .

### *Alexandrium ostenfeldii*

La descripción que entrega Taylor *et al* (2004) destaca que tiene una forma globosa, y la primera placa apical (1') se distingue por tener el margen superior derecho abruptamente cóncavo con un gran poro ventral excavado en el borde, en el punto de inflexión (Figs. 27-29). Su longitud es en promedio mayor que el de ***A. catenella***, con 40-56 µm de longitud y 40-50 µm de transdiámetro. Se asemeja a ***A. peruvianum***, y Balech (2002) considera que ambas pueden ser variedades de la misma especie.

Esta especie ha sido detectada en la zona en forma poco frecuente y en bajas abundancias; y por el hecho de no formar cadenas, es más difícil su identificación, es probable que esta especie pueda ser confundida con otros dinoflagelados tecados como ***Protoperidinium*** o ***Scrippsiella***. Sólo la revisión de sus placas, especialmente la 1', permite identificarla correctamente (Fig. 29b).

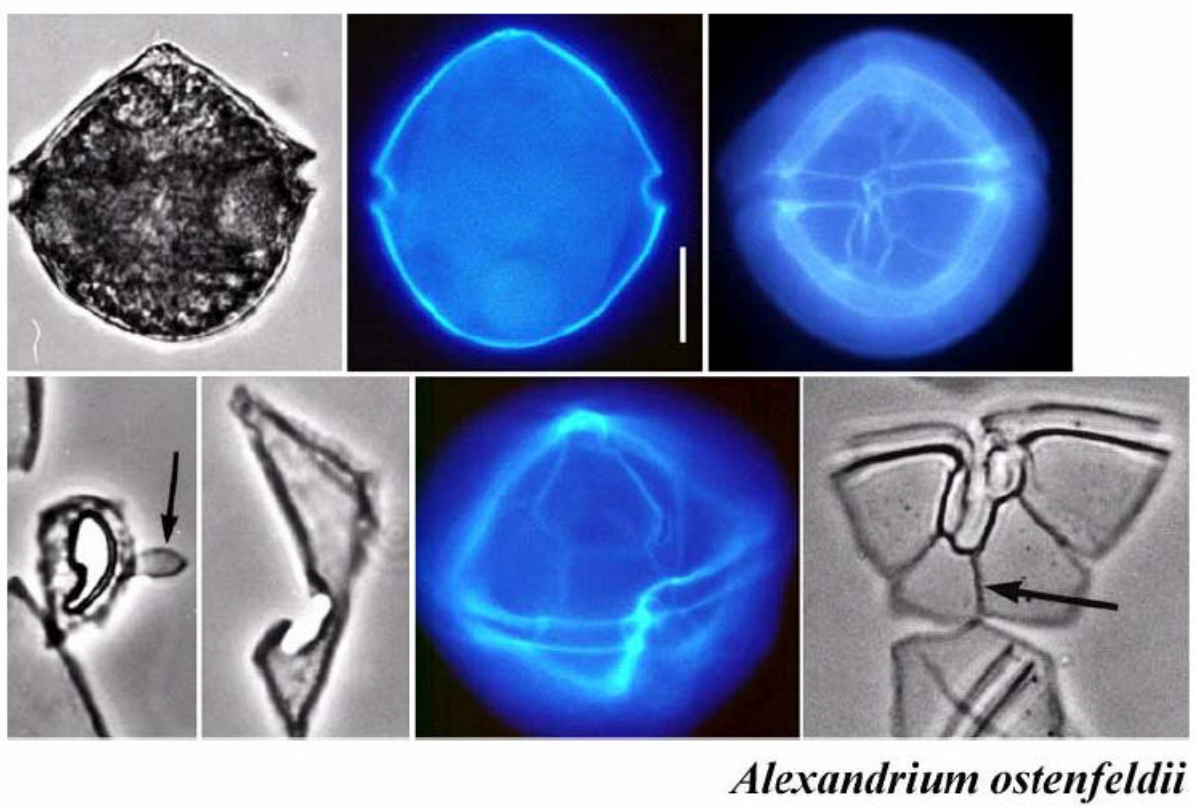



Figura 27. ***Alexandrium ostenfeldii***. Observación de forma general y características diagnósticas de la especie (Larsen, 2008).

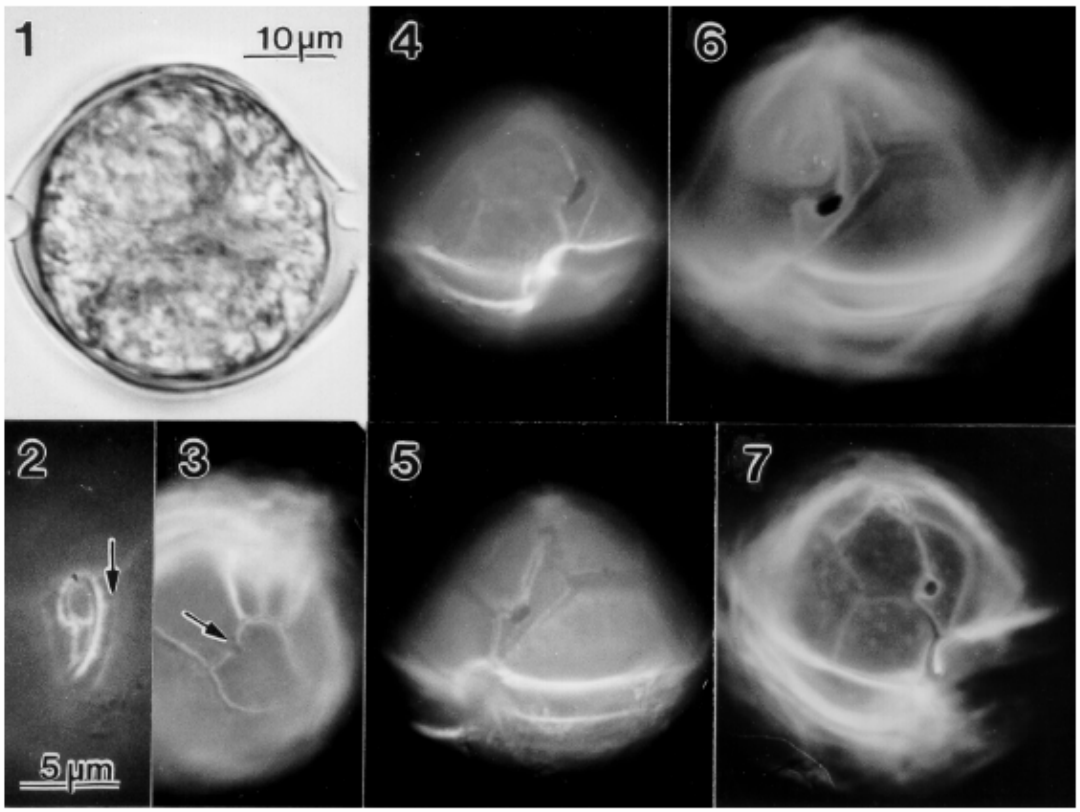



Figura 28. ***Alexandrium ostenfeldii***. (Larsen, 2008).

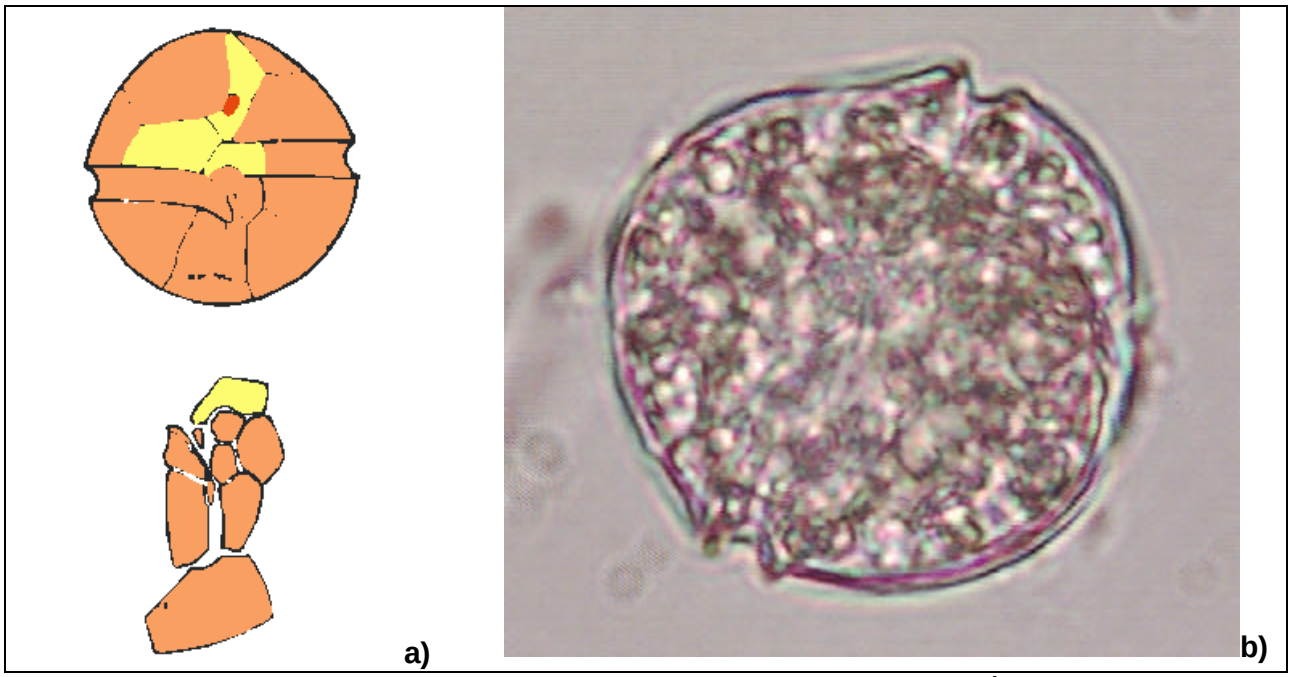



Figura 29. ***Alexandrium ostenfeldii***. **a)** Diagrama de las placas según Balech (1995); **b)** Fotografía de un especimen dudoso, probable ***A. ostenfeldii*** encontrado en muestras de la región de Los Lagos (Archivo IFOP).

### *Alexandrium tamarense*

Steidinger & Tangen (1997) y Taylor *et al* (2004) la describen como una especie de tamaño mediano a pequeño, con forma variable, algo pentagonal y la hipoteca es algo trapezoidal, a veces el lado izquierdo es más largo que el derecho. La primera placa apical (1') tiene un pequeño poro ventral. Es solitaria, pero puede ocurrir en pares (Figs. 30 y 31).

Esta especie no ha sido registrada en la zona, pero es detectada en la costa de Argentina hasta el Canal Beagle, siendo entonces probable que también esté presente al menos en la zona sur del país.

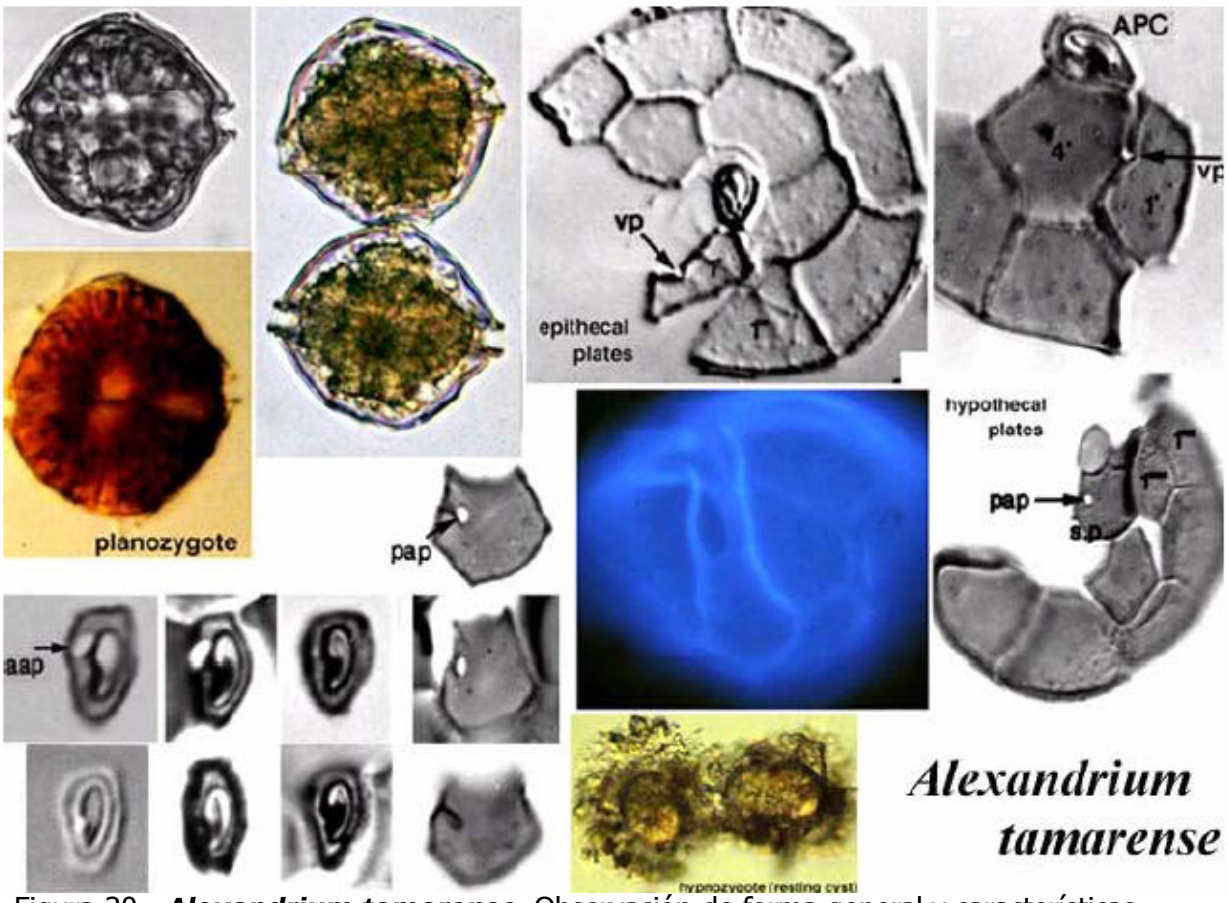



Figura 30. ***Alexandrium tamarense.*** Observación de forma general y características diagnósticas de la especie (Larsen, 2008) .

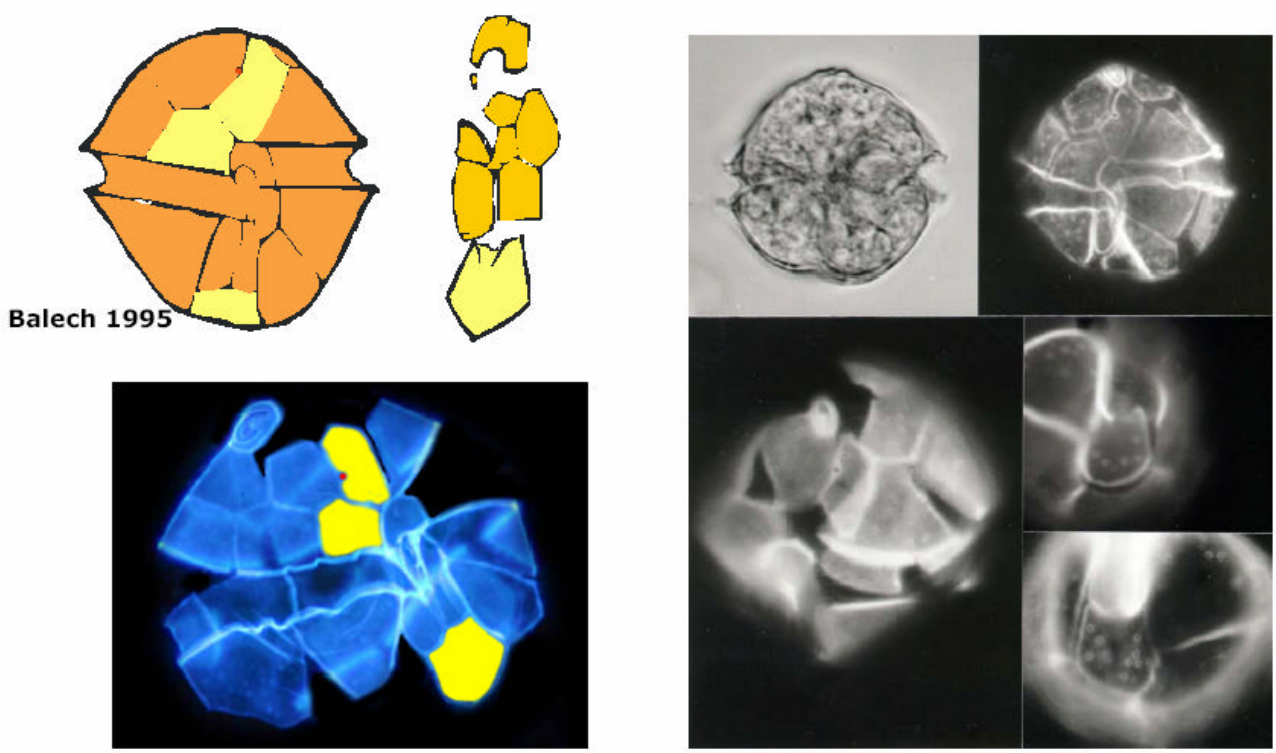



Figura 31. ***Alexandrium tamarense.*** (Larsen, 2008).

### *Protoceratium reticulatum*

El género ***Protoceratium*** también pertenece al grupo de los gonyaulacales; pero la tabulación de la epiteca es distinta, su fórmula se expresa como 3', 6'' . La especie ***Protoceratium reticulatum*** tiene como sinónimo la especie ***Gonyaulax grindleyi*** (Steidinger & Tangen, 1997). Taylor *et al*. (2004) la describen como células ovales y fuertemente pigmentadas, con un desplazamiento cingular del tipo gpnyaulacal. El cingulum es anterior al punto medio de la célula (la hipoteca es mayor que la epiteca). La superficie está densamente reticulada de tal forma que las suturas de las placas son difíciles de ver en una célula intacta (Figs. 32 y 33) . La primera placa apical (1') es angular con lados largos y paralelos y un poro ventral prominente en su lado izquierdo, también está presente el APC. Longitud 28-53 μm, transdiámetro 25-45 μm.

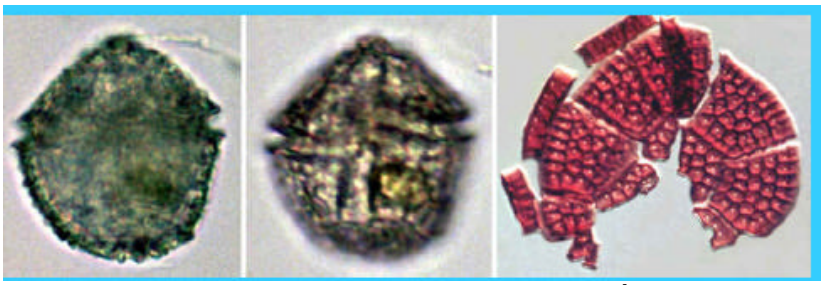


Figura 32. ***Protoceratium reticulatum.*** Observación de aspecto general (Fukuyo, 2000).

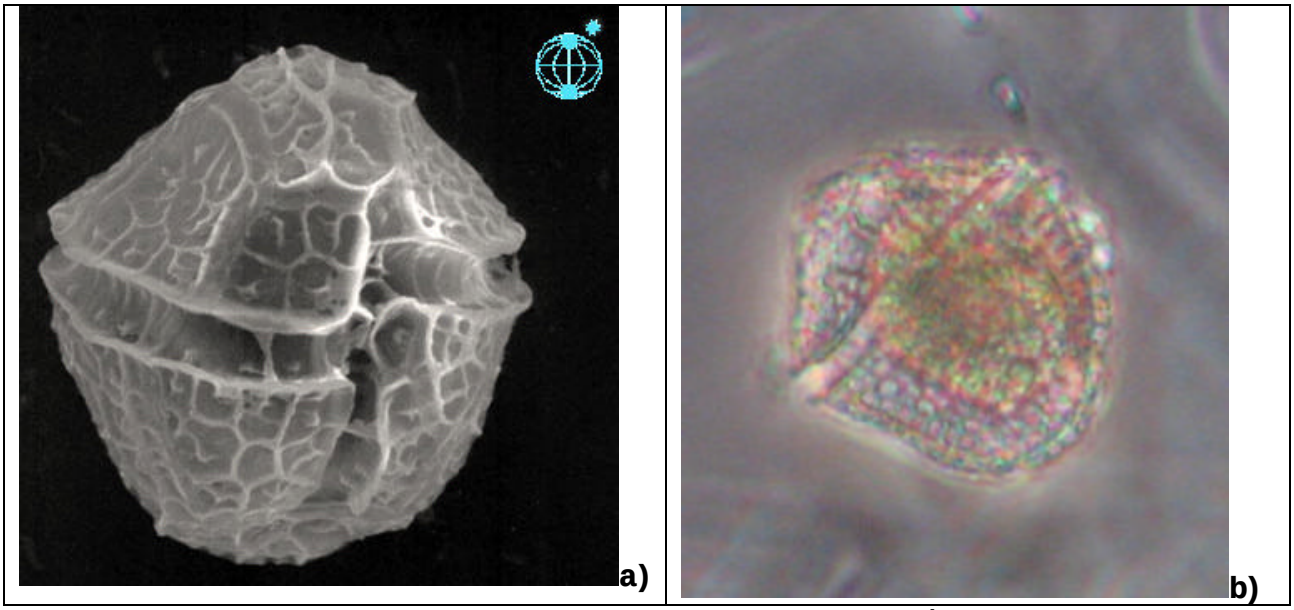



Figura 33. ***Protoceratium reticulatum.*** **a)** Aspecto general a través de MEB (© Alfred Wegener Institute); **b)** Fotografía de especímen encontrado en muestras de la XI región (Archivo IFOP).

### 3.2.3 Dinophysiales

Este grupo, junto con los prorocentrales, pertenece a los denominados como "bivalvos", los cuales presentan la teca usu almente aplastada bilateralmente, está formada por dos valvas, derecha e izquierda. En los dinophysiales, el cingulum está bordeado por un par de formaciones membranosas o aletas. En el borde ventral, generalmente estrecho, se ubica el sulcus, delimitado a ambos lados por las aletas sulcales (Balech, 2002). Una representación de estas características se entrega en la Figura 34.

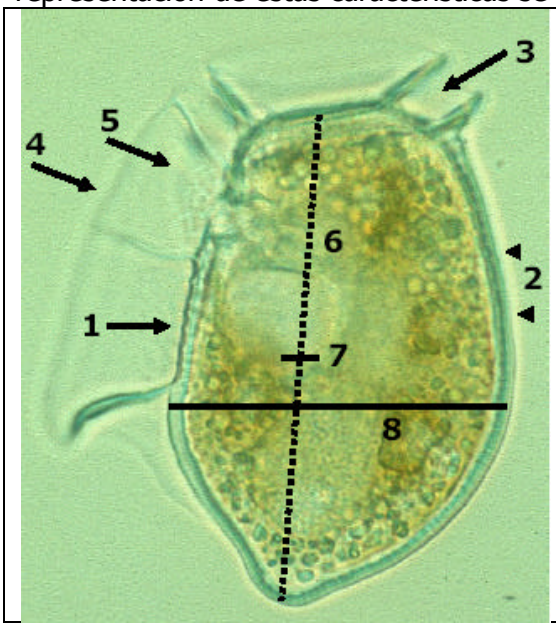



Figura 34.
**Terminología *Dinophysis***

1. Lado ventral
2. Lado dorsal
3. Cingulum
4. Lista sulcal izquierda
5. Lista sulcal derecha
6. Longitud célula
7. Línea media
8. Ancho célula

(Adaptado de Larsen, 2008).

Las características morfológicas que identifican a las especies dentro del grupo son el contorno general en vista lateral; relaciones entre los eje s longitudinal y medio, apéndices o espinas posteriores profundida y espesor de la epiteca en vista lateral, forma de las aletas sulcales (Balech, 2002) . La configuración de las placas y caracterísitcas morfológicas de las placas pueden tener importancia en taxonomía, pero es prematuro separar especies sobre la base de variaciones menores (Taylor *et al*, 2004). En todo caso, el género requiere una revisión para distinguir o unificar ciertas especies que presentan variaciones morfológicas que las hacen similares entre sí.

### *Dinophysis acuta*

Células grandes, en vista lateral, células ovoides con extremo posterior puntudo. La parte posterior de la hipoteca muestra una forma triangular. Profundidad dorso -ventral máxima bajo la mitad de la longitud de la célu la (Fig. 35). Longitud 54-94 μm, y profundida dorso ventral 43-60 μm.

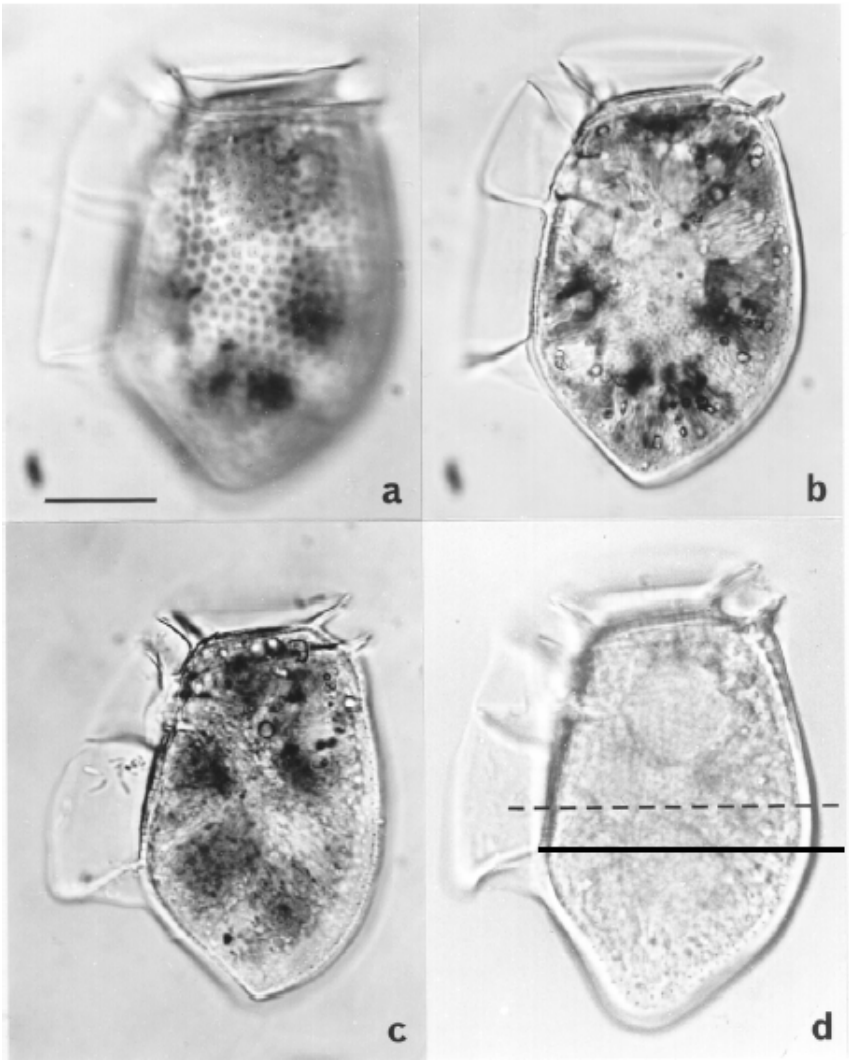



Fig. 35. ***Dinophysis acuta***. Forma general (Larsen, 2008).

Se ha observado que existen algunas diferencias entre ejemplares de Noruega y Japón (Taylor *et al*, 2004), y Hemisferio Norte y Chile (Lassus *et al*, 1998; Fig. 36)).

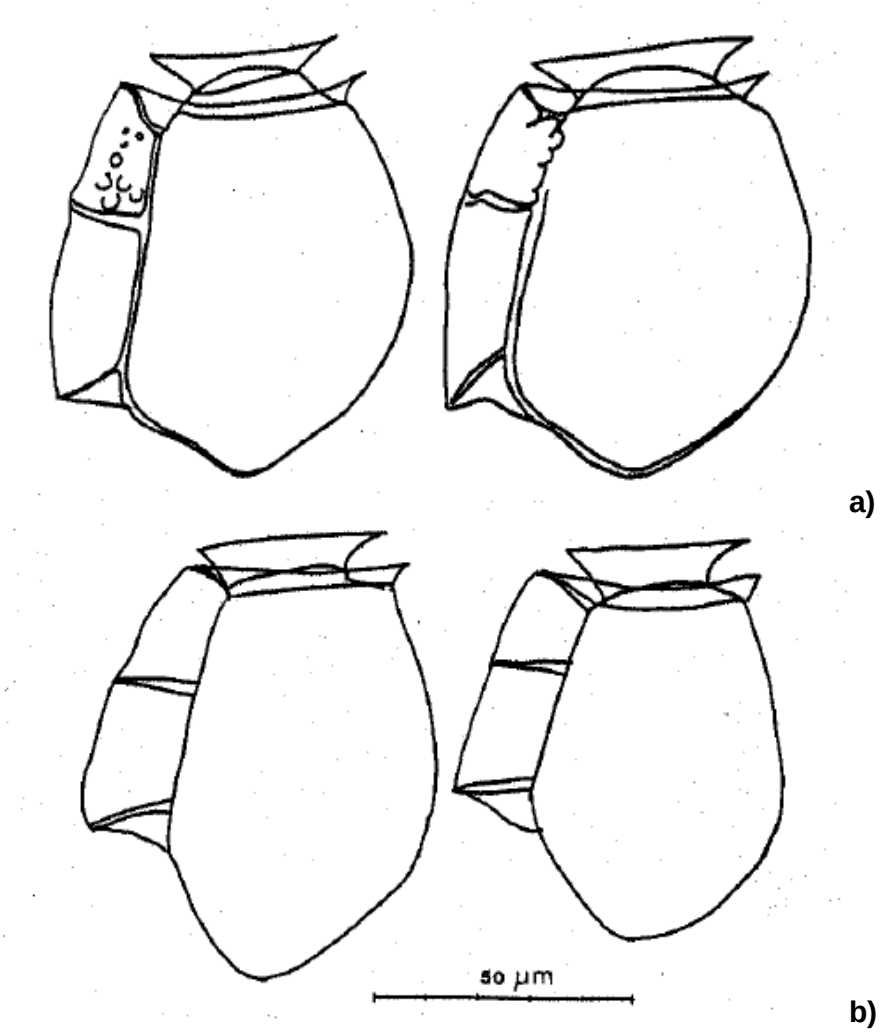



Figura 36. ***Dinophysis acuta***. **a)** ejemplares de Chile; **b)** ejemplares del Hemisferio Norte (Lassus *et a*l, 1998).

### *Dinophysis acuminata*

Son células ovales o a menudo oval elongadas en vista lateral. Profun didad dorso ventral máxima cerca de la longitud media. Epiteca baja, plana o débilmente convexa, invisible en vista lateral. Antápice es redondeada y suave, o con algunas pequeñas protuberancias (Fig. 37). Longitud 40-50 μm, profundidad dorso-ventral 30-40 μm.

La morfología de esta especie es variable, y pueden encontrarse formas que se asemejen a otras especies.

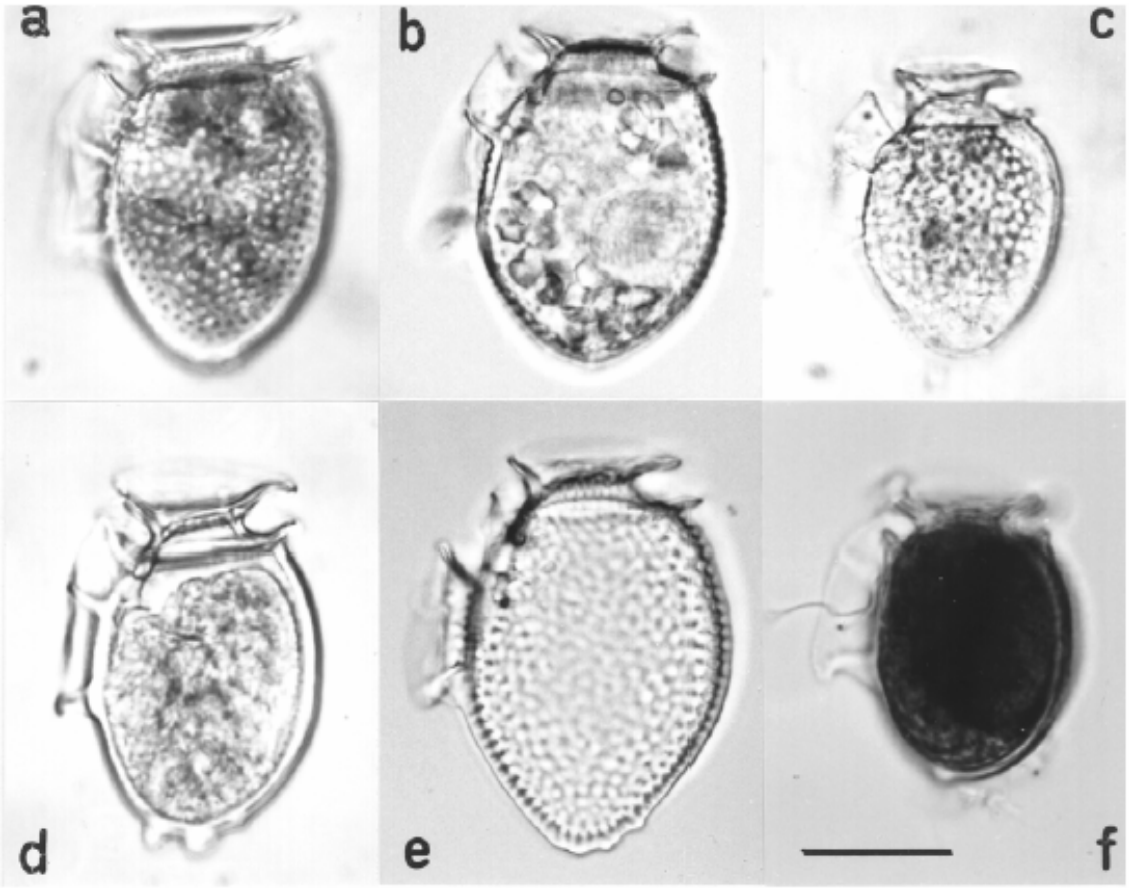



Figura 37. ***Dinophysis acuminata.*** Forma general (Larsen, 2008).

## 3.3 Fase de resistencia (quistes)

### 3.3.1. Características generales

Los dinoflagelados se presentan la mayor parte de su ciclo de vida como organismos flagelados libres que se reproducen en forma asexual por división binaria. En ciertas condiciones ambientales se producen los gametos, los cuales se unen para dar origen a un zigoto móvil (planozigoto). Los planozigotos de algunas especies puede producir una meiosis en plancton, mientras otros dinoflagelados, después de algunos días en plancton, pierden sus flagelos y forman una pared celular nueva, resistente a las condiciones ambientales adversas. Estas células se depositan en los sedimentos como un hipnozigoto o quiste de resistencia.

Se conoce que alrededor del 20% de las especies de dinoflagelados producen quistes de resistencia, incluyendo varias especies que producen FAN: ***Alexandrium andersonii***, ***Alexandrium affine***, ***Alexandrium fundyense***, ***Alexandrium catenella***, ***Alexandrium minutum***, ***Alexandrium tamarense***, ***Pyrodinium bahamense***, ***Lingulodinium polyedra***, ***Protoceratium reticulatum***, ***Gymnodinium catenatum***. En el caso del género ***Dinophysis***, se han observado quistes de resistencia en dos especies, ***D. acuta*** y ***D. tripos*** (Moita & Sampayo, 1993) pero éstos no han sido estudiados en detalle en su morfología, ni la estructura de la pared y del arqueopilo. Tampoco nunca se han observado en sedimentos recientes.

Las características encontradas en las paredes de algunos quistes pueden reflejar características de los estadios vegetativos, por ejemplo sulcus, cingulum o los patrones de las placas. Sin embargo, estas características son estructuras independientes de las paredes de los estados vegetativos. En la terminología de quistes es común usar el prefijo "para" para describir estas características morfológicas (e.g. parasulcus, paracingulum).

Las principales características morfológicas utilizadas para la identificación de quistes son la forma del quistes y su ornamentación, estructura y color de la pared, y tipo de arqueopilo o abertura a través de la cual sale al exterior la célula de germinación. En general, la forma de los quistes es simple, lo que hace imprescindible emplear una combinación de caracteres, tales como el tipo de arqueopilo, morfología de las ornamentaciones, estructura y color de la pared celular, y paratabulación.

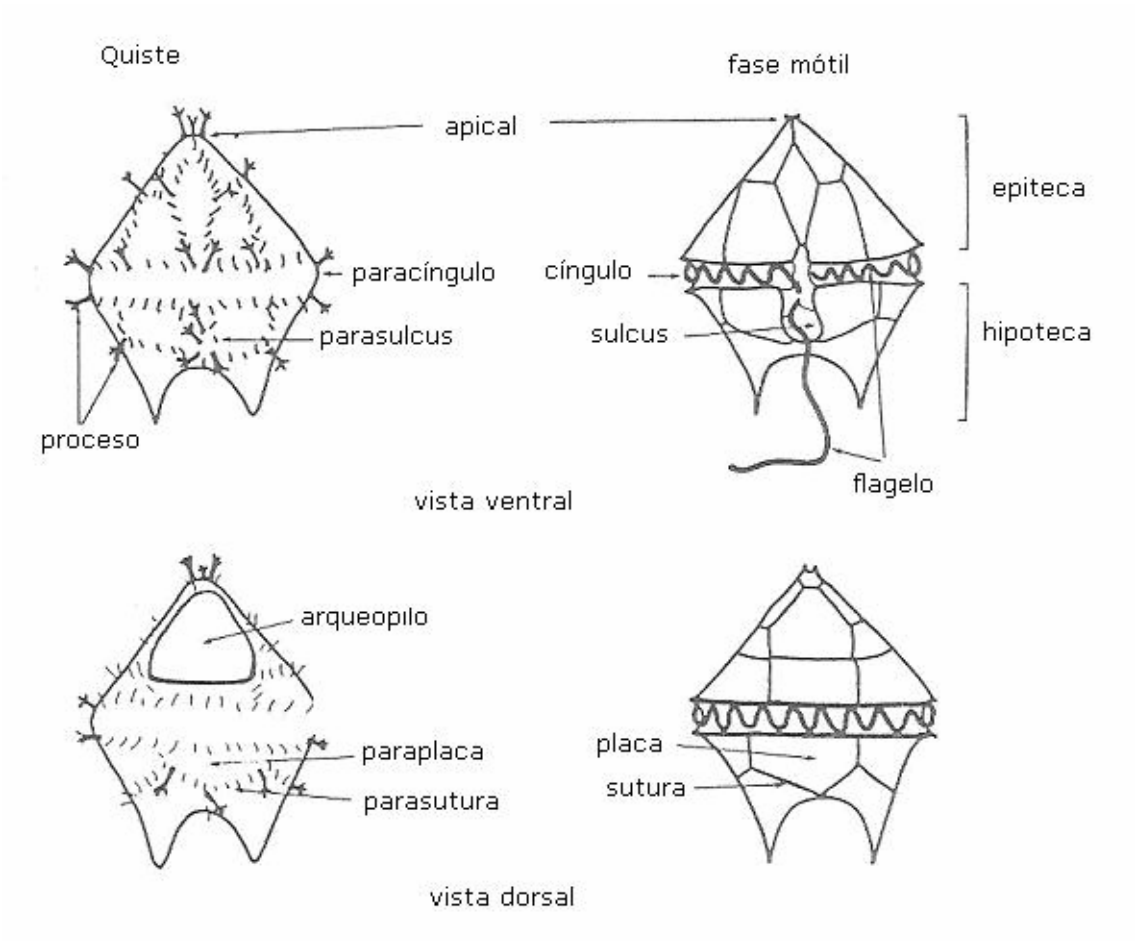
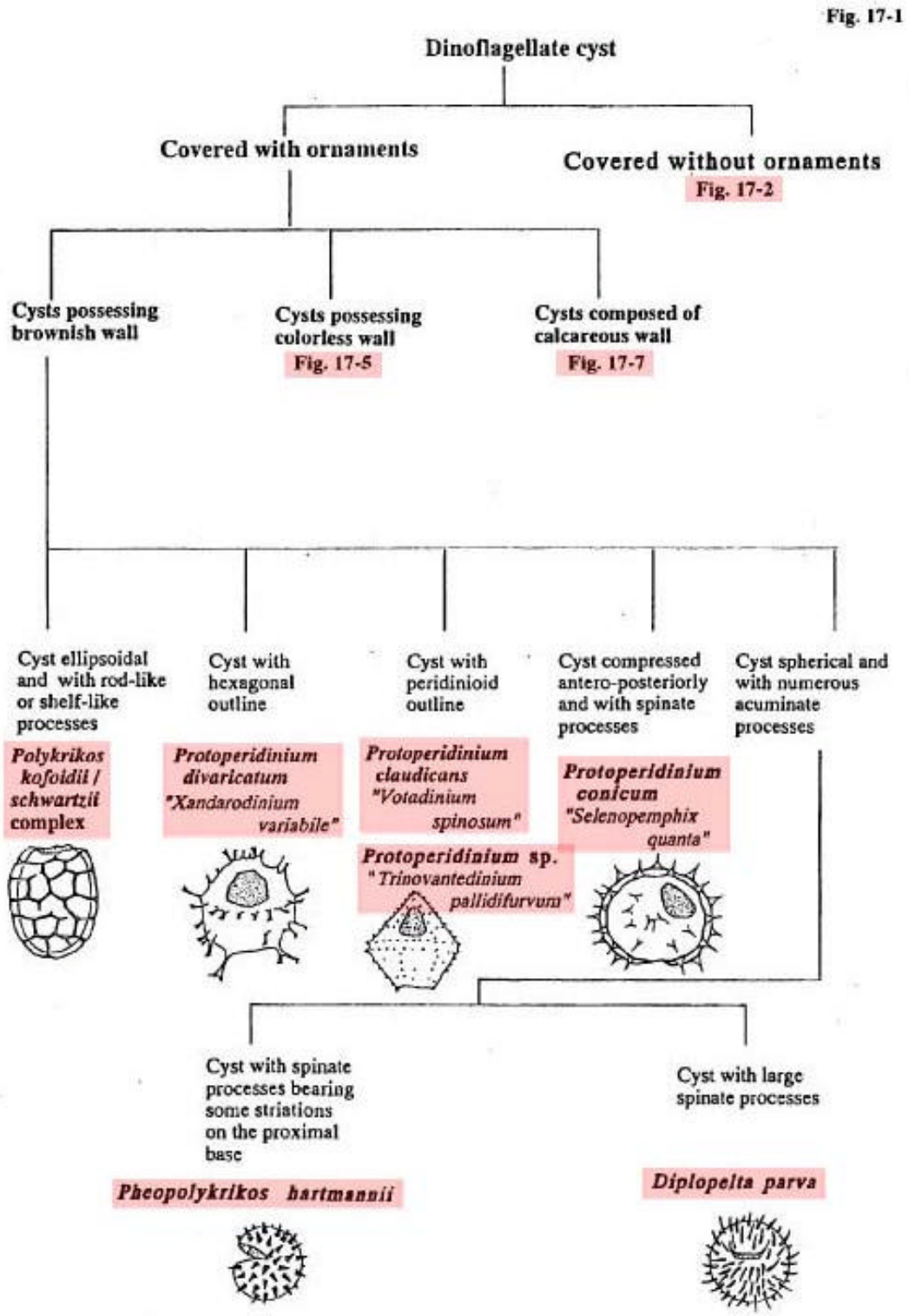



Figura 38. Comparación entre la nomenclatura utilizada en la fase vegetativa y en los quistes de los dinoflagelados.

La pared celular está constituida por un biopolímero, de estructura similar a la esporopolenina de las esporas y de los gra nos de polen de las plantas superiores, y rara vez de carbonato de calcio (e.g. *Scrippsiella*). La pared de los quistes puede ser lisa u ornamentada, estas últimas son prolongaciones de la pared celular parecidas a procesos y levantamientos. El color de la pared es variable, pero la mayoría de las veces es transparente, amarillo pálido, marrón o marrón pálido.

Matsuoka & Fukuyo (2000), proponen una clave para la identificación de quistes de dinoflagelados en base al color de la pared celular, forma del quiste y ornamentaciones. A continuación se muestran las Figuras 17 -1, 17-2 y 17-5 que permiten la identificación de los quistes de ***A. catenella*** y ***P. reticulatum***. Si desea obtener el resto de las claves debe dirigirse a Matsuoka & Fukuyo (2000) y/o westpac-Hab.

## CLAVE DE IDENTIFICACIÓN DE QUISTES DE DINOFLAGELADOS (Matsuoka & Fukuyo, 2000)



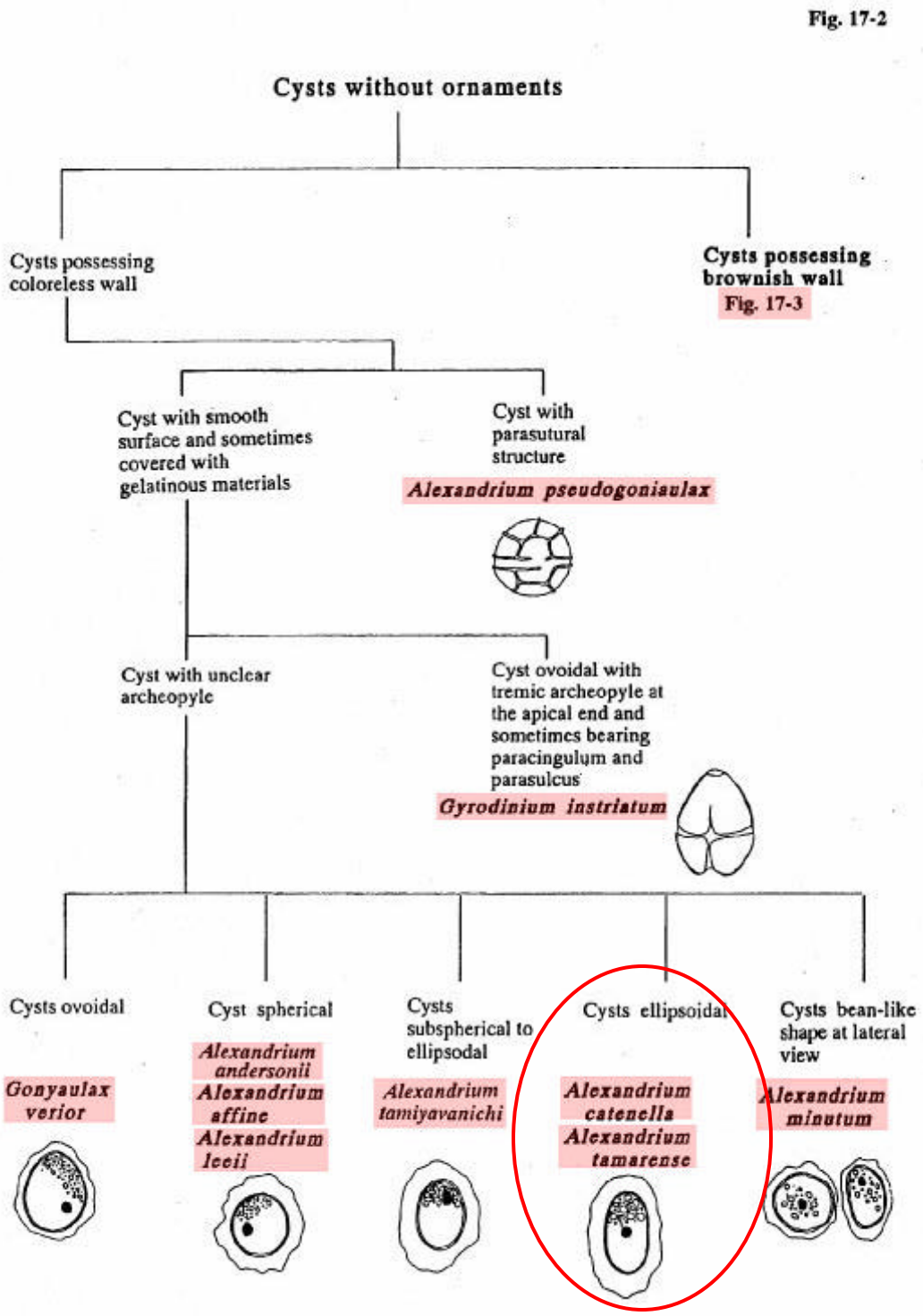


Fig. 17-2
Cysts without ornaments
Cysts possessing coloreless wall
Cysts possessing brownish wall
Fig. 17-3
Cyst with smooth surface and sometimes covered with gelatinous materials
Cyst with parasutural structure
Alexandrium pseudogoniaulax
Cyst with unclear archeopyle
Cyst ovoidal with tremic archeopyle at the apical end and sometimes bearing paracingulum and parasulcus
Gyrodinium instriatum
Cysts ovoidal
Gonyaulax verior
Cyst spherical
Alexandrium andersonii
Alexandrium affine
Alexandrium leeii
Cysts subspherical to ellipsodal
Alexandrium tamiyavanichi
Cysts ellipsoidal
Alexandrium catenella
Alexandrium tamarense
Cysts bean-like shape at lateral view
Alexandrium minutum

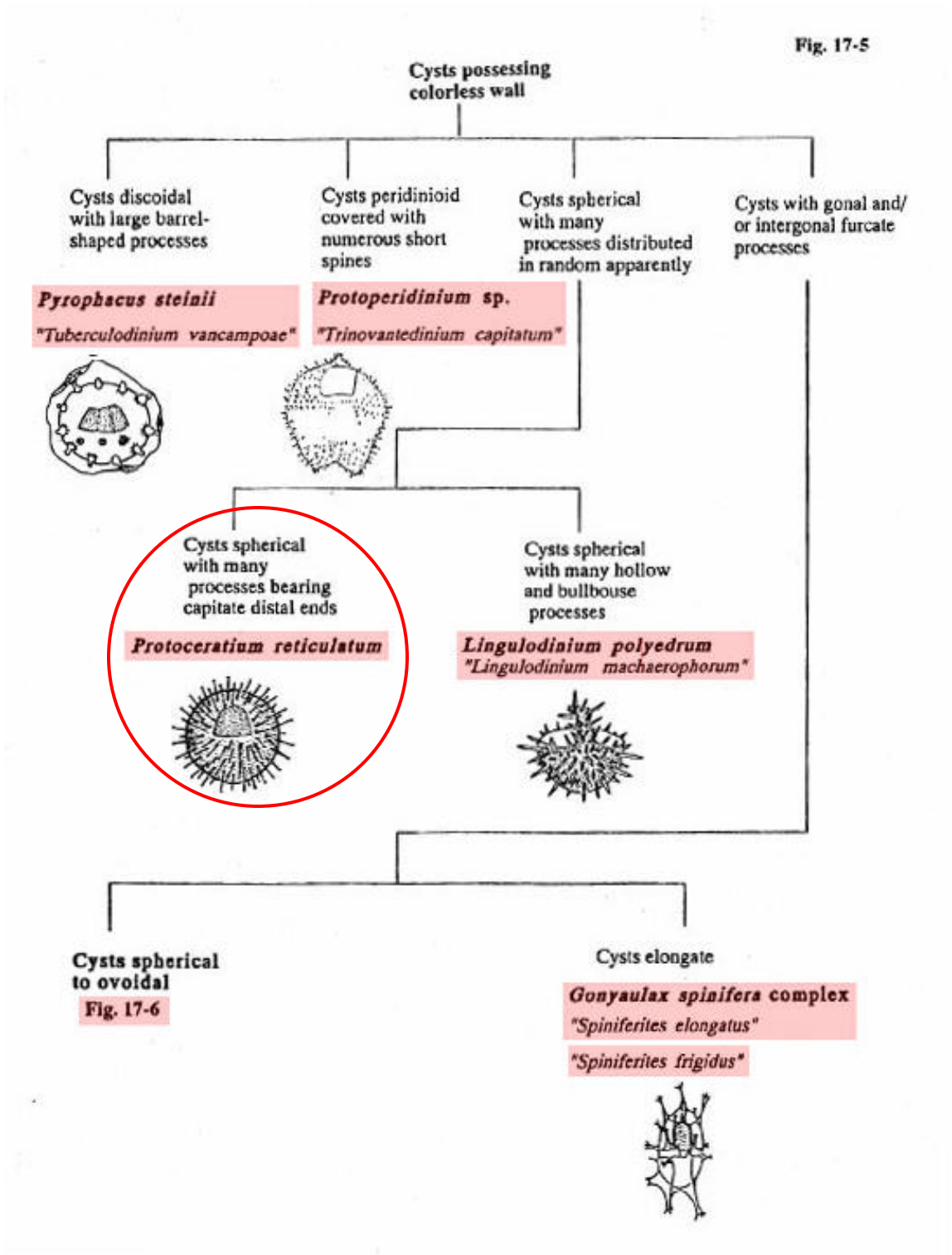


Fig. 17-5
Cysts possessing colorless wall
Cysts discoidal with large barrel-shaped processes
Cysts peridinioid covered with numerous short spines
Cysts spherical with many processes distributed in random apparently
Cysts with gonal and/ or intergonal furcate processes
Pyrophacus steinii
"Tuberculodinium vancampoae"
Protoperidinium sp.
"Trinovantedinium capitatum"
Cysts spherical with many processes bearing capitate distal ends
Protoceratium reticulatum
Cysts spherical with many hollow and bullbouse processes
Lingulodinium polyedrum
"Lingulodinium machaerophorum"
Cysts spherical to ovoidal
Fig. 17-6
Cysts elongate
Gonyaulax spinifera complex
"Spiniferites elongatus"
"Spiniferites frigidus"

### 3.3.2 ***Alexandrium catenella***

**Características Morfológicas**: Los quistes de resistencia son cilíndricos con extremos redondeados, pared celular transparente y compuesta por dos capas, sin ornamentaciones, cubiertos por una capa de mucílago. Los quistes vivos contienen numerosos gránulos incoloros de almidón y gotas de aceite, y uno o dos cuerpos pigmentados de color rojo. Tamaño: pequeño, 38 -56 µm de largo, 23 -32 µm de ancho (Matsuoka & Fukuyo 2003). En Chile, se determino una longitud de 40 -54 µm y de 25 - 37.5 µm en muestras provenientes de Aysén y Magallanes (Lembeye 2004). Arqueopilo: se desconoce en detalle, probablemente por su pared celular frágil.

Figura 39. Quiste de resistencia de ***Alexandrium catenella***, proveniente de sedimentos de la X región.

**Comentarios:** Los quistes de ***A. catenella*** son morfológicamente iguales a los de *A. tamarensis*, y no es posible distinguirlos en bases a sus características morfológicas. Una manera de diferenciarlos es a través de experimentos de germinación. Estos quistes también son similares a los de ***A. ostenfeldii*** excepto por el diámetro de los quistes.

### 3.3.3 ***Protoceratium reticulatum***

**Características morfológicas**: quistes esféricos con numerosos procesos con el extremo capitado. Procesos son largos y simple, generalmente huecos. Es posible observar especimenes con procesos reducidos, a veces aparecen como pequeños nódulos en la superficie de los quistes. Pared celular incolora . Tamaño: diámetro: 38 µm, procesos 8-10 µm. El arqueopilo es simple y está formado por la pérdida de la tercera precingular paraplaca.

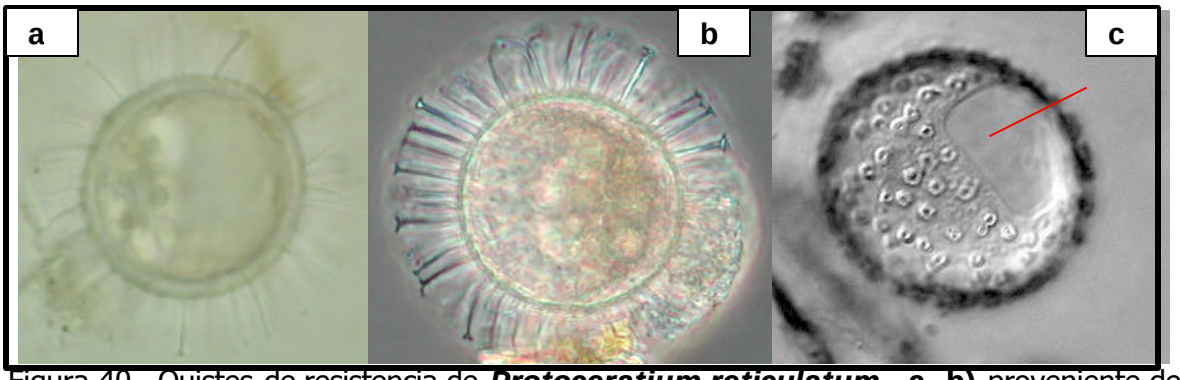



Figura 40. Quistes de resistencia de ***Protoceratium reticulatum***. **a- b)** proveniente de los sedimentos de la X Región **c)** espécimen con procesos muy cortos y arqueopilo visible (flecha).

# III. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Alveal, K., M. E. Ferrario, E. C. Oliveira & E. Sar. 1995**. Manual de métodos ficológicos. Universidad de Concepción, Chile. 863 pp.

**Andersen, P. 1996**. Design and Implementation of Some Harmful Algal Monitoring Systems. IOC Technical Series vol. 44, Paris, IOC-UNESCO. 102 pp.

**Andersen, P., H. Enevoldsen, & D. Anderson. 2004**. Harmful Algal Monitoring programme and action plan design. En: Hallegraeff, G.M., D. M. Anderson, & A. D. Cembella (eds.), Manual on Harmful Marine Microalgae. Monographs on oceanographic methodology 11, Unesco, Paris. pp. 627-648.

**Andersen, P., & J. Throndsen. 2004.** Estimating Cell Numbers. En: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., & Cembella, A.D. (eds.), Manual on Harmful Marine Microalgae. Monographs on oceanographic methodology 11, Unesco, Paris. pp. 99-130.

**Anderson, D.M., A. D. Cembella & G. M. Hallegraeff. (eds), 1998**. Physiological ecology of harmful algal blooms, NATO ASI series, Series G, Ecological sciences, vol. 41, Springer-Verlag, Berlin. 662 pp.

**Anderson, D.M., P. Andersen, V. M. Bricelj, J. J. Cullen & J. E. Rensel. 2001**. Monitoring and Management Strategies for Harmful Algal Blooms in Coastal Waters, APEC #201-MR-01.1, IOC Technical Series Nº 59, Paris, IOC-UNESCO. 268 pp.

**Anderson, D., Y. Fukuyo & K. Matsuoka. 2003.** Cyst Methodologies. En: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., & Cembella, A.D. (eds.), Manual on Harmful Marine Microalgae. Monographs on oceanographic methodology 11, Unesco, Paris. pp.165-189.

**Avaria, S. 1965.** Diatomeas y silicoflagelados de la Bahía de Valparaíso. Rev. Biol. Mar., 12(1,2 y 3), 61-119, 8 láms.

**Balech, E. 1995**. The genus ***Alexandrium*** Halim (Dinoflagellata). Sherkin Island Marine Station, 151 pp.

**Bravo, I., M. Vila, M. Masó, R.I. Figueroa & I. Ramilo. 2008.** ***Alexandrium catenella*** and ***Alexandrium minutum*** blooms in the Mediterranean Sea: Toward the identification of ecological niche. Harmful Algae 7: 515-522.

**Cox, A.M., D. H. Shull & R. A. Horner. 2008.** Profiles of ***Alexandrium catenella*** cysts in Puget Sound sediments an d the relationship to paralytic shellfish poisoning events. Harmful Algae 7:379-388.

**Cronberg G. & H. Annadotter. 2006.** Manual on aquatic cyanobacteria. A photo guide and a synopsis of their toxicology. International Society for the Study of Harmful Algae and the United Nations Educational, Scientific and Cultural Organisation, Copenhagen, Paris. 106 pp.

**Dale, B. & A. L. Dale. 2002.** Environmental applications of dinoflagellate cyst and acritarchs. En: Quaternary environmental micropalaeontology, S. Haslett (ed), Edward Arnold (Publishers) London, 207-240.

**Franks, P. J. S. & B. A. Keafer. 2004**. Sampling techniques and strategies for coastal phytoplankton blooms. En: Hallegraeff, G.M., D. M. Anderson, & A. D. Cembella (eds.), Manual on Harmful Marine Microalgae. Monographs on oceanographic methodology 11, Unesco, Paris. pp. 51-76.

**Fritz, L. & R. Triemer. 1985.** A rapid simple technique utilizing calcofluor white M2R for the visualization of dinoflagellate thecal plates. J. Phycol. 21, 662-664.

**Fukuyo, Y. & F.J.R. Taylor. 1989.** Morphological characteristics of dinoflagellates, p. 201-205. In: G.M. Hallegraeff & J.L. Maclean (eds.). Biology, epidemiology and management of ***Pyrodinium*** red tide, ICLARM Conference Proceedings 21, 286p. Fisheries Department, Ministry of Development, Brunei Darussalam, and International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines.

**Fukuyo, Y. 2000.** Atlas of Dinoflagellates. http://dinos.anesc.u-tokyo.ac.jp/atlas_ver1_5/main.htm.

**Garcés, E., I. Bravo, M. Via, R.I. Figueroa, M. Masó & N. Sampedro. 2004.** Relationship between vegetative cells and cyst production during ***Alexandrium minutum*** bloom in Arenys de Mar harbour (NW Mediterranean). J. Plankton Res. 26 (6) 637-645.

**Genovesi, B., D. Mouillot, A. Vaquer, M. Laabir & A. Pastoureaud. 2007.** Toward an optimal sampling strategy for ***Alexandrium catenella*** (Dinophyceae) benthic resting cysts. Harmful Algae 6: 837-848.

**Genovesi-Giunti, B., M. Laabir & A. Vaquer. 2006.** The benthic resting cyst: a key actor in harmful dinoflagellate blooms- A review. Vie et Milieu- life and Environment. 56(4):327-337.

**Guzmán, L., H. Pacheco, G. Pizarro & C. Alarcón. 2002.** ***Alexandrium catenella*** y veneno paralizante de los mariscos en Chile. En: E. A. Sar., M. E. Ferrario y B. Reguera (eds), Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano. Instituto Español de Oceanografía, pp. 235-255.

**Guzmán, L., G. Vidal, X. Vivanco, M. Palma, C. Espinoza, P. Hinojosa, P. Mejías, L.. Iriarte, V. Arenas, S. Mercado, A. Burgos, E. Fernández-Niño, C. Alarcón, P. Salgado & C. Zamora. 2007**. Manejo y monitoreo de las mareas rojas en las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes, Informe final, Anexos I, II & III, 141p.

**Hallegraeff, G.M., D. M. Anderson & A. D. Cembella (eds). 2004**. Manual on Harmful Marine Microalgae. Monographs on oceanographic methodology 11, Unesco, Paris. 793 pp.

**Hasle, G. 1978.** The inverted-microscope method. En: Sournia, A. (ed.). Phytoplankton Manual. Paris, UNESCO Publisinhg (Monographs on Oceanographic Methodology, 6). pp.88-96.

**Larsen, J. 2008.** Gonyaulacales, ***Dinophysis.*** Course lectures. IOC Certificate of Proficiency in Identification of Harmful Marine Microalgae. University of Copenhagen, 18-28 August.

**Lassus, P., M. Seguel & P. Truquet. 1998.** Morphological Study of Atypical Dinophysis acuta Ehrenberg from Chilean Coastal Waters by a Digital Pattern-Recognition System. Botanica Marina 44:435-441.

**Lembeye, G. V. 2004**. Distribución de quistes de ***Alexandrium catenella*** y otros dinoflagelados en sedimentos de la zona Sur- Austral de Chile. Ciencia y Tecnología del Mar 27 (4): 21-31.

**Lindahl, O. 1986**. A divisable hose for phytoplankton sampling. International Council for the Exploration of the Sea(ICES) C. M., 1986/L:26, Annex III.

**Matsuoka, K & Y. Fukuyo, 2000**. Guía Técnica para el Estudio de Quistes de Dinoflagelados Actuales. WESTPAC-HAB/WESTPAC/IOC. 30 pags + plates.

**Matsuoka, K. & Y. Fukuyo 2003**. Taxonomy of cysts. En: Hallegraeff, G.M., D. M. Anderson, & A. D. Cembella (eds.), Manual on Harmful Marine Microalgae. Monographs on oceanographic methodology 11, Unesco, Paris. pp. 563-592.

**Mizushima, K. & K. Matsuoka. 2004.** vertical distribution and germination ability of ***Alexandrium*** spp. Cysts (Dinophyceae) in the sediments collected from Kure Bay of the Seto Inland Sea, Japan. Phycological Research 52:408-413.

**Moita, M.T. & M.A. de M. Sampayo. 1993.** Are there cysts in the genus ***Dinophysis***?. En: Smayda, T.J. & Shimizu Y. (eds). Toxic Phytoplankton Blooms in the seas, 143-146. Elsevier Science Publisher B.V. New York.

**Molinet, C., A. Lafon, G. Lembeye & C. Moreno. 2003.** Patrones de distribución espacial y temporal de floraciones de ***Alexandrium catenella*** (Whedon & Kofoid) Balech 1985, en aguas interiores de la Patagonia noroccidental de Chile. Rev. Chil. Hist. Nat., 76: 681-698.

**Orlava D. T., T. V. Morozova, K. E. Gribble, D. M. Kulis & D. M. Anderson. 2004.** Dinoflagellate cysts in recent marine sediments from the east coast of Russia. Botanica Marina 47: 184-201.

**Reguera, B., 2002.** Establecimiento de un Programa de Seguimiento de Microalgas Tóxicas. En: E. A. Sar., M. E. Ferrario y B. Reguera (eds), Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano. Instituto Español de Oceanografía, pp. 21-54.

**Sar, E. A., M. E. Ferrario & B. Reguera (eds.), 2002**. Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano. Instituto Español de Oceanografia, 311 pp.

**Seguel, M., M. A. Tocornal & A. Sfeir. 2005.** Floraciones algales nocivas en los canales y fiordos del sur de Chile. Cienc. Tecnol. Mar. 28(2):5-13.

**Smayda, T. J. 2004**. Environmental monitoring. En: Hallegraeff, G.M., D. M. Anderson, & A. D. Cembella (eds.), Manual on Harmful Marine Microalgae. Monographs on oceanographic methodology 11, Unesco, Paris. pp. 595-626.

**Sournia, A. 1978**. Phytoplankton Manual. Paris, UNESCO Publisinhg (Monographs on Oceanographic Methodology, 6). 337 pp.

**Steidinger, K. & K. Tangen. 1997.** Dinoflagellates. En: Tomas, C. (ed.) 1997. Identifying Marine Phytoplankton, Academic Press. pp 387-584.

**Tangen, K. 1978.** Nets. En: Sournia, A. (ed.). Phytoplankton Manual. Paris, UNESCO Publisinhg (Monographs on Oceanographic Methodology, 6). pp 50-58.

**Throndsen, J. 1978.** Preservation and storage. En: Sournia, A. (ed.). Phytoplankton Manual. Paris, UNESCO Publisinhg (Monographs on Oceanographic Methodology, 6). pp. 69-74.

**Todd, K. 2004**. Role of phytoplankton monitoring in marine biotoxin programmes. En: Hallegraeff, G.M., D. M. Anderson, & A. D. Cembella (eds.), Manual on Harmful Marine Microalgae. Monographs on oceanographic methodology 11, Unesco, Paris. pp. 649-656.

**Tomas, C. (ed.) 1997**. Identifying Marine Phytoplankton, Academic Press. 858 pp.

**Tommasa, L., R. Danovaro, G. Belmonte & F. Boero. 2004.** Resting stage abundance in the biogenic fraction of surface sediments from the deep Mediterranean Sea. SCI. MAR. 68 (Suppl. 1): 103-111.

**UNE-EN15204. 2007.** Calidad del agua. Guía para el recuento de fitoplancton por microscopía invertida (técnica de Utermöhl). Norma Europea. 44 pp.

**Utermöhl, H. 1958.** Zur vervollkomnung der quantitativen phytoplankton metodik. Mitt. Int. Ver. Limnol., Nº 9, pp. 1-38.

**Venrick, E. 1978.** Water-bottles. En: Sournia, A. (ed.). Phytoplankton Manual. Paris, UNESCO Publisinhg (Monographs on Oceanographic Methodology, 6). pp. 33-40.

**Yamaguchi, M., S. Itakura, K. Nagasaki & Y. Kotani. 2002.** Distribution and abundance of resting cysts of the toxic ***Alexandrium*** spp. (Dinophyceae) in sediments of the western Seto Inland Sea, Japan. Fisheries Science: 10.

## Normativa

Departamento de Sanidad Pesquera, Servicio Nacional de Pesca, Enero 2009. Programa de Laboratorios. Norma Técnica Sección 5. LAB-NT5. Métodos de análisis de Fitoplancton.

DCTO. Nº 345/2005 MINECON. Reglamento sobre Plagas Hidrobiológicas.

Informe Técnico D. Ac N2168/2008. Florecimiento Algal Nocivo causado por ***Alexandrium catenella***. Propuesta Area FAN (D.S. MINECON Nº 345/2005). Preparado por Georgina Lembeye, Departamento de Acuicultura. Noviembre de 2008.