

# DIATOMEAS EPILÍTICAS DE LOS ANDES ECUATORIANOS



## Protocolos para su empleo como bioindicadores de la calidad del agua

Pablo Castillejo  
Isabel Ballesteros  
Blanca Ríos-Touma

Sofía Ortiz  
Carla Heinrich  
Eduardo Lobo



*udla*  
ediciones

### **Pablo Castillejo Pons**

PhD en Biología, con mención en Biología Molecular. Docente investigador en la Universidad de Las Américas (Quito, Ecuador). Investiga la presencia de genes para estudios de biodiversidad y calidad de aguas (unidades operacionales taxonómicas), bioprospección (enzimas de interés biotecnológico) y salud pública (resistencia antibiótica, virulencia, toxinas)..

### **María Isabel Ballesteros Redondo**

PhD en Biología, con mención en Genética. Su línea principal de investigación ha sido la genética molecular de plantas. En la UDLA fue miembro del Equipo de Investigación en Biodiversidad, Medio Ambiente y Salud (BIOMAS), donde llevó a cabo trabajos relacionados con la obtención de códigos de barras genéticos de microalgas de cuerpos de agua dulce en Ecuador.

### **Blanca Patricia Ríos Touma**

Doctora en Biología. Docente investigadora en la Universidad de Las Américas (Quito, Ecuador). Su investigación actual se centra en la biodiversidad de ríos, el efecto de la urbanización en los ríos tropicales y la restauración, conservación y regeneración de espacios fluviales.

### **Sofía Ortiz Cabrera**

Ingeniera en Ambientales. Asistente de investigación en proyectos en la Universidad de Las Américas (Quito, Ecuador). Actualmente trabaja para la gestión ambiental de la empresa DIMABRU.

### **Carla Heinrich**

MSc en Biología. Técnica de laboratorio en la Universidade de Santa Cruz do Sul (Brasil). Ha desarrollado actividades de investigación con enfoque en el seguimiento biológico de los recursos hídricos, utilizando algas diatomeas epilíticas como organismos bioindicadores.

### **Eduardo Alexis Lobo Alcayaga**

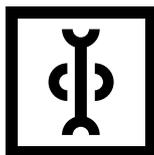
PhD en Biología. Docente Investigador en la Universidad de Santa Cruz do Sul, Brasil. La limnología se destaca como una de sus principales líneas de investigación, en particular los estudios de monitoreo ambiental (físico, químico y biológico) en cuencas hidrográficas subtropicales y templadas.

ud/a.



# **DIATOMEAS EPILÍTICAS DE LOS ANDES ECUATORIANOS**

Protocolos para su empleo como  
bioindicadores de la calidad del agua





# DIATOMEAS EPILÍTICAS DE LOS ANDES ECUATORIANOS

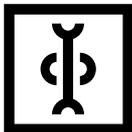
Protocolos para su empleo como  
bioindicadores de la calidad del agua

## Autores

Pablo Castillejo  
Isabel Ballesteros  
Blanca Ríos-Touma  
Sofía Ortiz  
Carla Heinrich  
Eduardo Lobo

FACULTAD DE INGENIERÍA  
Y CIENCIAS APLICADAS





**eje**

La colección *Eje* presenta una serie de conocimientos y saberes fundamentales que permiten al lector sobrepasar diversas etapas para comprender los enunciados y explicaciones técnicas sobre un elemento específico.

**Diatomeas epiliticas de los Andes ecuatorianos.  
Protocolos para su empleo como bioindicadores  
de la calidad del agua**

© Pablo Castillejo, Isabel Ballesteros, Blanca Ríos-Touma,  
Sofía Ortiz, Carla Heinrich, Eduardo Lobo

© Universidad de Las Américas  
Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas  
Campus UDLA Park  
Redondel del Ciclista  
Vía a Nayón, s/n  
www.udla.edu.ec  
Facebook: @udlaQuito  
Primera edición: agosto, 2022

**EDICIÓN**

Susana Salvador Crespo  
Coordinación Editorial UDLA

**CUIDADO DE LA EDICIÓN**

Fabrizio Cerón Rivas  
Analista Editorial UDLA

**CORRECCIÓN DE ESTILO**

La Caracola Editores

**DISEÑO DE CUBIERTA**

Juan Villacís, Estudio Nueve

**FOTOGRAFÍA DE PORTADA**

Xavier Amigo

**DIAGRAMACIÓN**

Estudio Nueve

**ISBN:** 978-9942-779-57-1

Gracias por respetar las leyes del copyright al no reproducir, escanear ni distribuir ninguna parte de esta obra, sin la debida autorización. Al hacerlo está respetando a los autores y permitiendo que la UDLA continúe con la difusión del conocimiento. Reservados todos los derechos. El contenido de este libro se encuentra protegido por la ley y es publicado bajo licencia exclusiva mundial.

Antes de su publicación, esta obra fue evaluada bajo la modalidad de revisión por pares anónimos.

Impreso en Quito, Ecuador, 2022

# Contenido

Introducción	11	Visualización e identificación de las cepas de referencia	34
<b>Capítulo 1</b>	<b>15</b>	Aislamiento de ADN de cultivos axénicos	36
Muestreo, tratamiento de muestras en el laboratorio e identificación taxonómica de diatomeas	15	Materiales y equipo	36
		Procedimiento	36
Cuándo y dónde muestrear	15	Valoración de la calidad y cantidad del ADN aislado	37
Material para tomar muestras de diatomeas	16	Materiales y equipo para electroforesis en geles de agarosa	37
Recolección de muestras de diatomeas	16	Procedimiento de electroforesis en geles de agarosa	37
Materiales y equipos para el tratamiento de muestras para la observación de frústulas	17	Amplificación de secuencias de código de barras	
Procedimiento para la observación de frústulas	17	genético, 18S rRNA V4 y rbcL	39
Preparación de la muestra	17	Materiales y equipos	39
Materiales y equipos para la elaboración de preparaciones permanentes de diatomeas	20	Reacción de amplificación	40
Procedimiento para la elaboración de preparaciones permanentes de diatomeas	21	<b>Capítulo 4</b>	<b>42</b>
Materiales y equipo para la observación de diatomeas al microscopio óptico, la identificación taxonómica y el recuento de valvas	21	<b>Obtención del código de barras genético de cinco especies de diatomeas epilíticas ecuatorianas bioindicadoras de la calidad del agua</b>	<b>42</b>
Observación de individuos al microscopio óptico, identificación taxonómica y recuento de valvas	23	Sitios de muestreo	42
<b>Capítulo 2</b>	<b>25</b>	Resultados	43
<b>Índice trófico de calidad del agua (ITCA)</b>	<b>25</b>	Conclusiones	45
Aplicación del ITCA en las cuencas del río Pita y Santa Clara (Cuenca alta del río Guayllabamba)	26	<b>Trayectorias profesionales</b>	<b>46</b>
Área de estudio	26	Pablo Castillejo Pons	46
Muestreo y análisis de datos	27	María Isabel Ballesteros Redondo	46
Resultados y discusión	28	Blanca Patricia Ríos Touma	47
<b>Capítulo 3</b>	<b>32</b>	Sofía Ortiz Cabrera	47
<b>Caracterización de códigos de barras genéticos de diatomeas epilíticas</b>	<b>32</b>	Carla Heinrich	47
Aislamiento de cepas de diatomeas epilíticas	33	Eduardo Alexis Lobo Alcayaga	48
Materiales y equipo para el cultivo de diatomeas	33	Bibliografía	49
Metodología para el aislamiento de cultivos puros	33	<b>ANEXOS</b>	<b>55</b>
		Anexo 1	55
		Anexo 2	56



# Introducción

El presente trabajo aspira a ser una referencia para el uso de las algas diatomeas epilíticas (que crecen en la superficie de las piedras) como indicadores de la calidad del agua de los ríos andinos en Ecuador. Escuelas de educación superior, centros de investigación y organismos municipales y estatales podrán utilizar esta guía en programas de seguimiento ambiental.

Las diatomeas (clase Bacillariophyceae) son organismos unicelulares fotosintéticos que conforman uno de los grupos de algas más importantes de la comunidad del fitoplancton (Reynolds, 2006). En los océanos, corresponden al componente más grande del plancton, que representa entre el 20 % y el 45 % de la producción primaria total del planeta (Smol y Stoermer, 2010). Las diatomeas de los ambientes acuáticos continentales que no son planctónicas, a su vez, incluyen individuos que crecen en otras plantas (epifiton), en rocas (epiliton), en granos de arena (episamon) o en el sedimento (epipelon). Generalmente conforman el grupo dominante de estos ambientes, acompañados de otros grupos de algas (Round, 1993).

En los cuerpos de agua dulce, las diatomeas pueden emplearse como bioindicadores del estado trófico del agua (Reid et al., 1995; Lobo et al., 2016a y 2019), es decir, de la producción de biomasa acuática presente en el cuerpo de agua en un momento determinado,

con relación a la proporción entre el fósforo, el nitrógeno y los productores primarios (Naumann, 1919). El estado trófico es una condición utilizada para definir la calidad del agua que generalmente se deteriora por la presencia de productos orgánicos provenientes de la naturaleza, o generados por el ser humano a través de desechos de explotaciones agrícolas o ganaderas y aguas servidas (heces, sangre, orina, lixiviados, fertilizantes, jabones, etc.), lo que da lugar al proceso conocido como *eutrofización*.

La presencia de estas sustancias en el agua provoca la proliferación de microorganismos aeróbicos que disminuirán considerablemente los niveles de oxígeno disuelto. Además, la degradación de la materia orgánica por parte de estas bacterias también libera nitrógeno y fósforo en forma de nitritos, nitratos y fosfatos (conocidos como *nutrientes vegetales*), que provocan la proliferación de algas. El aumento exagerado de la cantidad de algas forma en la superficie del agua una capa gruesa que evita que la luz penetre en la vegetación sumergida y por lo tanto provoca su muerte. Con la disminución de la cantidad de oxígeno disuelto y la acumulación de materia orgánica animal y vegetal muerta, empiezan a proliferar microorganismos anaerobios que degradan esta materia y producen sustancias con intenso olor, como el sulfuro de hidrógeno (Le Moal et al., 2019; Vinçon-Leite y Casenave, 2019).

La eutrofización puede ser natural o antropogénica. Cuando es natural, es un proceso lento que resulta del aporte de nutrientes por las lluvias y las aguas que erosionan y lavan la superficie de la Tierra. Cuando es antropogénica, se convierte en un proceso agresivo, cuya principal característica es la ruptura de la estabilidad del ecosistema (homeostasis). La homeostasis en los ecosistemas acuáticos se caracteriza por el equilibrio existente entre la producción de materia orgánica y su mineralización. Cuando una cuenca está intervenida por actividades antropogénicas, se da un desequilibrio ecológico que tiene como consecuencia cambios profundos en la estructura y función del ecosistema (Le Moal et al., 2019). La eutrofización artificial es un problema global y tiene como resultados la alteración de la calidad ecológica, la pérdida de biodiversidad y la extinción de especies, así como el incremento del número de individuos de especies tolerantes, entre otros (Glibert, 2017; Wurtsbaugh et al., 2019).

Además de las microalgas, los nutrientes vegetales favorecen la proliferación de macrofitas acuáticas, lo que puede restringir el acceso a lagos o embalses recreativos o de pesca, así como bloquear canales que suministran agua para el riego y las centrales hidroeléctricas (Farley, 2012). Otro impacto importante de la eutrofización es el crecimiento masivo de cianobacterias potencialmente tóxicas que ponen en riesgo la salud pública y el ecosistema, además de implicar un incremento en el costo del tratamiento del agua para suministro (Cooper et al., 2020). Si la eutrofización es consecuencia de la liberación de aguas residuales humanas sin tratar, uno de sus impactos importantes puede ser la propagación de las enfermedades (Guerrero-Latorre et al., 2018).

De acuerdo con Vollenweider (1968), Rolich (1969) y Rast et al. (1989), es posible caracterizar cuatro

etapas de eutrofización del agua según la carga total estimada de fósforo y nitrógeno:

1. Oligotrófico: Baja productividad biológica y baja concentración de nutrientes.
2. Mesotrófico: Características intermedias entre oligotrófico y eutrófico.
3. Eutrófico: Producción excesiva de biomasa y alta concentración de nutrientes.
4. Hipereutrófico: Se utiliza para caracterizar altos grados de eutrofización.

Cuando el agua alcanza el nivel eutrófico o hipereutrófico, su calidad cae drásticamente y algunos efectos se perciben claramente. Tundisi (2003) resume lo anterior al enumerar las principales consecuencias de la eutrofización:

1. Anoxia (ausencia de oxígeno en el agua), que causa mortalidad masiva de peces e invertebrados y también produce liberación de gases olorosos y tóxicos como el ácido sulfhídrico, o altamente inflamables como el metano.
2. Floración de algas y crecimiento incontrolado de plantas acuáticas.
3. Producción de toxinas por parte de algunas especies de algas tóxicas (cianobacterias).
4. Deterioro de los valores recreativos de lagos o presas debido a la disminución de la transparencia.
5. Acceso restringido a actividades pesqueras y recreativas debido a la acumulación de plantas acuáticas que dificultan la locomoción y el transporte.
6. Fuerte caída de la biodiversidad y del número de especies vegetales y animales.

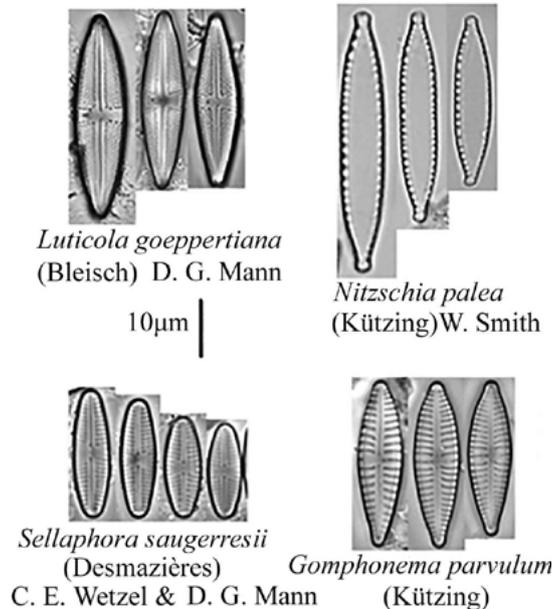
7. Cambios en la composición de las especies de peces, con disminución de su valor comercial.
8. Disminución de la concentración de oxígeno disuelto.
9. Disminución de las poblaciones de peces causada por el agotamiento de oxígeno disuelto en agua y en las regiones más profundas de lagos y presas.
10. Efectos sobre la salud humana (crónicos y agudos).

Además de la eutrofización, influenciados por el cambio climático, los fenómenos de floración de microalgas en los cuerpos de agua dulce están aumentando en magnitud, frecuencia y duración (Paerl et al., 2016), lo que agrava las consecuencias de esta

contaminación orgánica. En Ecuador, los fenómenos de eutrofización natural y antropogénica son ubicuos y abundantes debido a las condiciones biogeográficas, a la multitud de explotaciones agropecuarias y a la falta de tratamiento de aguas residuales.

Por estos motivos, desde el año 2018 se ha trabajado en la validación del índice trófico de la calidad del agua (ITCA), propuesto por Lobo et al. (2014 y 2015) para sistemas lóticos brasileños subtropicales y templados, y que tiene como base la comunidad de diatomeas epilíticas, con el objetivo de aplicarlo a sistemas lóticos de los Andes ecuatorianos. La Figura 1 muestra imágenes de microscopía óptica de algunas especies de diatomeas tolerantes a la eutrofización en todo el mundo, actualmente utilizadas para calcular el ITCA desarrollado en Brasil (Lobo et al., 2016a).

**Figura 1.** Taxones de algas diatomeas tolerantes a la eutrofización en todo el mundo (Lobo et al., 2016a).



Para calcular este índice, fue imprescindible identificar correctamente las diatomeas epilíticas presentes. Su taxonomía tradicional se basa en la morfología de la pared de sílice, llamada *frústula*, finamente esculpida y dividida en dos mitades (valvas) que encajan como una placa de Petri. La valva más grande de la frústula se llama *epiteca*, y la menor, *hipoteca* (Raven et al., 1996). Entre los principales caracteres utilizados en la taxonomía de las diatomeas de agua dulce destacan la forma de la frústula (extremos de la valva, manto); las ondulaciones y los giros de la valva; las estructuras del manto interno (estigma y otros); las áreas hialinas; el engrosamiento interno del margen de la valva (pseudosepto y otros); la estructura de estrías, areolas y poros (forma, tamaño y relleno); el patrón de organización de los surcos en céntrica y penadas; los poros apicales; las pórtulas (rimopórtulas, carinopórtulas y fultopórtulas); las estructuras externas (espinas, verrugas, conopeo, ocelos, setas); el rafe (tipo, extensión, ubicación de estructuras asociadas, caracterización de extremidades internas y externas, proximales y distales); y las bandas (septos). Algunas de estas características se muestran de forma esquemática en las figuras 2 a 10 en el trabajo de Lobo et al. (2014).

Cabe destacar que la identificación morfológica es complicada y requiere de equipo especializado y del apoyo de expertos en la materia. Por ello, las nuevas tendencias taxonómicas se complementan con técnicas de biología molecular. A cada especie se le asigna un código de barras genético que consiste en una secuencia específica de ADN. En multitud de genes se han identificado regiones que sirven para este propósito, dado que su secuencia varía de una especie a otra, pero se mantienen invariables dentro de la misma. Ejemplos de ello son el gen que codifica la enzima

RuBisCO (*rbcL*), esencial para la fotosíntesis, y regiones internas del gen que codifica el ribosoma (18S rRNA) (Hering et al., 2018). Para asignar este código de barras genético, previamente es necesaria una identificación morfológica y una caracterización ecológica exhaustivas de la especie. De esta manera se pueden generar secuencias de referencia que sirvan para futuras identificaciones moleculares.

El objetivo de este manual ilustrado es la formación de personal cualificado —sean estudiantes, técnicos o científicos— que pueda ayudar a generar y enriquecer una base de datos de diatomeas del Ecuador, tanto a nivel taxonómico como de sus secuencias de códigos de barras genéticos. Para ello, hemos dividido el documento en cuatro capítulos. El primero trata sobre el procedimiento del muestreo, la recolección de muestras, el tratamiento del laboratorio de muestras y el montaje de preparaciones permanentes para la observación de individuos en el microscopio óptico, siguiendo los protocolos de procedimientos para el tratamiento de muestras de diatomeas epilíticas, la identificación taxonómica y el conteo de valvas. El segundo explica la formulación del ITCA, que tiene como base la comunidad de diatomeas epilíticas, ejemplificándolo con un caso práctico en la cuenca alta del río Guayllabamba, provincia de Pichincha, en los Andes del Ecuador. El tercer capítulo versa sobre la identificación de diatomeas a partir de los códigos de barra genéticos, y el cuarto expone la aplicación del proceso en sistemas lóticos de Ecuador.

# Capítulo 1

## Muestreo, tratamiento de muestras en el laboratorio e identificación taxonómica de diatomeas

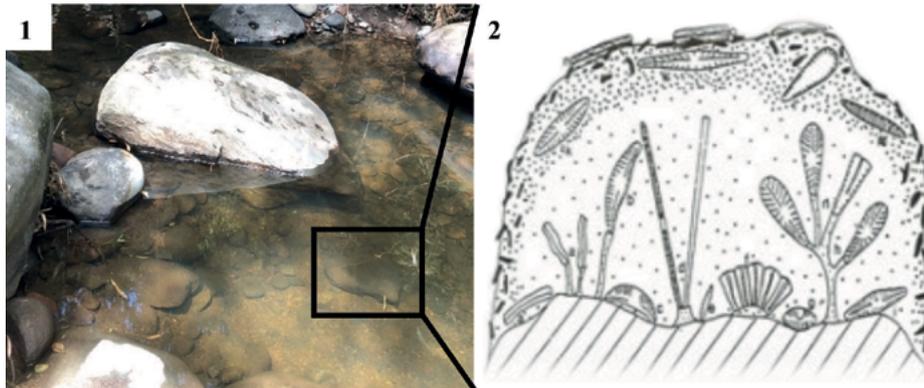
Los procesos descritos en este capítulo están adaptados de Lobo et al. (2016b), Kelly et al. (1998) y Kobayasi y Mayama (1982).

### Cuándo y dónde muestrear

El muestreo de diatomeas epilíticas debe realizarse en períodos de flujo constante, evitando la recolección después de fuertes lluvias, que pueden perturbar a la comunidad y aumentar la turbidez del agua. Se recomienda que el muestreo se realice en condiciones de visibilidad del sustrato sumergido (Figura 2), es decir, entre una y dos semanas luego de precipitaciones intensas según el Instituto de Agua de Brasil (INAG, 2008). Los muestreos pueden realizar-

se trimestralmente para que queden representadas la temporada de lluvias y la temporada seca. Preferentemente, se seleccionan puntos de muestreo en los tramos superior, medio e inferior de una cuenca, con el fin de caracterizar gradientes ambientales. Si las variaciones altitudinales son considerables, deben usarse puntos de referencia, o mínimamente alterados, y puntos alterados a distintas elevaciones. Los puntos de colecta deberán ser fotografiados y georreferenciados utilizando un equipo de sistema de posicionamiento global (GPS). Además, el formulario de laboratorio debe completarse con las características de cada punto de muestreo, según el modelo adaptado de INAG (2008) (Anexo 1).

**Figura 2.** En la imagen de la izquierda se enmarca en negro una piedra cuya superficie es apta para realizar el raspado de diatomeas. El dibujo de la derecha representa esquemáticamente una comunidad de diatomeas epilíticas. Adaptado de Round (1993).



## Material para tomar muestras de diatomeas

1. Cepillo dental con cerdas de nailon
2. Bandeja metálica o de polietileno esmaltado
3. Frascos estériles de 100 mL
4. Formaldehído
5. Agua destilada
6. Etanol absoluto
7. Etiquetas adhesivas
8. Marcador
9. Guantes de goma
10. Botas de goma
11. Nevera portátil (cooler) y bolsas acumuladoras de frío (ice packs)

## Recolección de muestras de diatomeas

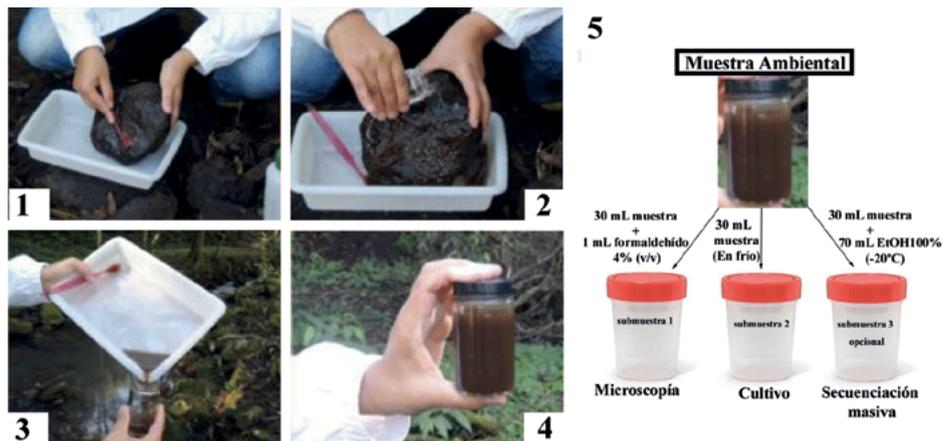
La recolección de diatomeas epilíticas debe realizarse sobre sustratos naturales o artificiales sumergidos a una profundidad de entre 10 y 20 cm, en presencia de luz solar. Estos sustratos, preferiblemente rocas de unos 20 cm de diámetro, deben presentar una película de color marrón, que es el resultado de la colonización de las diatomeas (Figura 3). Para recoger las diatomeas del sustrato, se cepilla la superficie colonizada (la orientada al sol) de tres a cinco rocas. La piedra debe lavarse con agua destilada para ir arrastrando las diatomeas cepilladas. Después del cepillado, se pasa la muestra de la bandeja a un frasco estéril con un volumen mínimo de 100 mL. Los frascos estériles de toma de muestra de orina son útiles y económicos para esta tarea. Cada vez que se cambie el punto de muestreo, es importante lavar el cepillo y la bandeja con agua destilada para evitar la mezcla

de muestras. Luego, se etiqueta con cinta adhesiva el frasco que contiene la muestra, y se identifica el lugar de muestreo. Las muestras se han de mantener en frío para su traslado al laboratorio en una nevera portátil (*cooler*) con bolsas acumuladoras de frío (*ice packs*).

En cada punto, la muestra se dividirá en dos submuestras (Figura 3.5). Una se usará para la observación de frústulas al microscopio, por lo que se le agregará 1 mL de solución de formaldehído al 4 % (v/v) para la fijación del material. La segunda se conservará a cuatro grados, de uno a tres días como máximo, para el aislamiento y la caracterización molecular de las cepas de diatomeas presentes en la muestra. Adicionalmente, puede tomarse una tercera submuestra para realizar un análisis metagenómico, cuya metodología no está descrita en el manual. Para ello, a esta submuestra se le añadirá etanol a una concentración final del 70 % (si se han obtenido 30 mL de volumen de muestra, se añadirán 70 mL de etanol absoluto). En ausencia de rocas, se pueden utilizar sustratos artificiales dispuestos en los lugares de muestreo aproximadamente cuatro semanas antes de la recolección (tiempo suficiente para la colonización de la comunidad de diatomeas). O bien, en última instancia, el muestreo puede realizarse sobre la vegetación acuática presente (en este caso, correspondiente a una comunidad epífita) o sobre troncos sumergidos.

En ríos o arroyos potencialmente contaminados, se deben emplear guantes de goma para evitar el contacto directo con el agua. Aun así, se sugiere desinfectar las manos con alcohol etílico al final de la toma de las muestras. En lugares con aguas profundas y fuerte corriente, es aconsejable utilizar chaleco salvavidas.

**Figura 3.** Procedimiento para recolectar muestras de diatomeas epilíticas. (1) Raspado del sustrato (roca) para eliminar las algas diatomeas. (2) Lavado del sustrato (roca) con agua destilada. (3) Recolección y almacenamiento de la muestra en un frasco colector. (4) Frasco que contiene una muestra de algas diatomeas epilíticas. (5) Submuestras a partir de la muestra ambiental original. Adaptado de Lobo et al. (2016b).



### Materiales y equipos para el tratamiento de muestras para la observación de frústulas

1. Centrífuga (opcional)
2. Tubos de ensayo pequeños (tamaño sugerido: 16 × 100 mm)
3. Tubos de ensayo grandes (tamaño sugerido: 18 × 150 mm)
4. Pipetas graduadas de 10 mL
5. Piseta con agua destilada
6. Vasos de precipitado
7. Ácido sulfúrico 1N
8. Ácido clorhídrico 1N
9. Dicromato de potasio
10. Bastones de vidrio
11. Trozos de porcelana
12. Campana de extracción

13. Gafas protectoras
14. Máscara de protección
15. Frascos de vidrio de 10 mL con tapa
16. Mechero de gas o placa calefactora

### Procedimiento para la observación de frústulas

#### Preparación de la muestra

Para observar las características de las frústulas, el primer paso es oxidar toda la materia orgánica presente en los especímenes recolectados, con el fin de facilitar la identificación bajo el microscopio.

Un paso previo indispensable es identificar los tubos de ensayo grandes correspondientes a cada submuestra. Para ello, llene una pipeta con 10 mL de muestra que contenga el sedimento y colóquela en el respectivo tubo de ensayo (Figura 4).

Luego, añada 6 mL de ácido sulfúrico 1 normal apoyando la punta de la pipeta contra la pared del tubo de ensayo, para que el ácido se deslice lentamente sobre la muestra. Ponga los tubos de ensayo a hervir en un baño de agua durante 60-90 minutos; después, apague el fuego o la placa calefactora y deje enfriar. Agregue fragmentos de porcelana

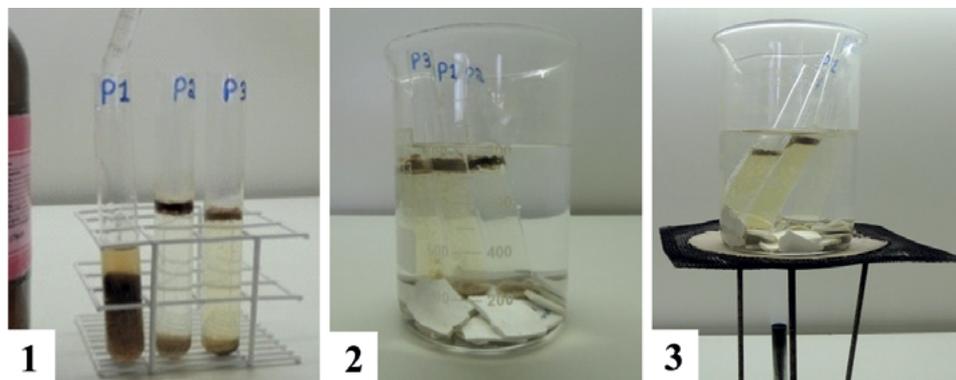
como reguladores de ebullición, para reducir el riesgo de rotura de los tubos de ensayo (Figura 5).

Nota: Cuando manipule ácido sulfúrico, use guantes y mascarilla protectora para evitar quemaduras e inhalaciones. Ponga las muestras a baño maría en la campana de extracción encendida.

**Figura 4.** Procedimiento de identificación y distribución de la muestra. (1) Tubos debidamente identificados. (2) Toma del sedimento con la ayuda de una pipeta. (3) Disposición de sedimentos en los respectivos tubos de ensayo. Adaptado de Lobo et al. (2016b).



**Figura 5.** Procedimiento de tratamiento de muestras con ácido sulfúrico. (1) Adición de ácido sulfúrico en los tubos de ensayo (2) Muestras en vaso de precipitado que contiene fragmentos de porcelana y agua por encima de la altura del sedimento, para su posterior ebullición. (3) Hervido de muestras en la campana extractora. Adaptado de Lobo et al. (2016b).

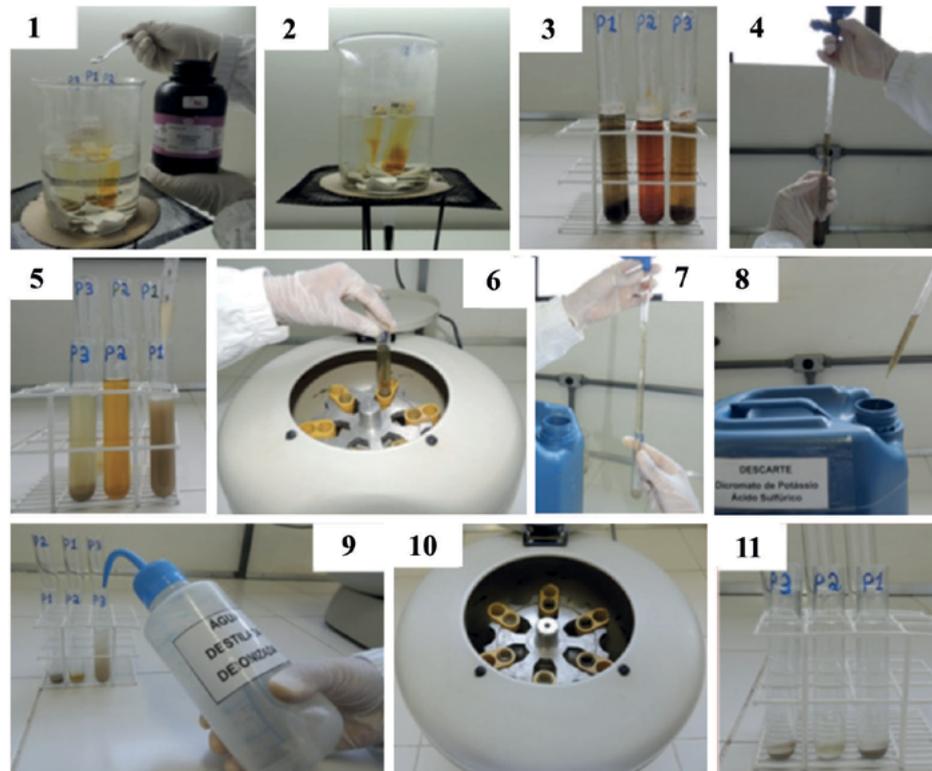


Luego, añada 0,8 g de dicromato de potasio en cada tubo. Hierva de nuevo durante 30 a 60 minutos en la campana de extracción. Después de apagar el gas (o plancha calefactora), espere 24 horas para continuar el tratamiento (Figura 6.1-6.3).

Al día siguiente, centrifugue las muestras durante 2 minutos a 3000 rotaciones por minuto (rpm) para separar el dicromato de potasio y el ácido sulfúrico (Figura 6.4-6.6). Este paso puede realizarse sin centrifuga, esperando unos veinte minutos para que la materia sedimente.

Tome las muestras de la centrifuga y retire el sobrenadante de cada uno de los tubos con una pipeta, sin tocar el sedimento del fondo. Este sobrenadante no debe ser descartado en el fregadero, sino colocarse en una botella adecuada para neutralización (Figura 6.7-6.8). Llene cada uno de los tubos nuevamente con agua destilada, agitando la muestra con el propósito de eliminar todo el dicromato de potasio y el ácido sulfúrico. Lleve los tubos de vuelta a la centrifuga durante 2 minutos a 3000 rpm. Repita la operación hasta que el agua esté clara (Figura 6.9-6.11). En caso de no disponer de centrifuga, bastará con dejar sedimentar las diatomeas durante 10 minutos después de cada lavado.

**Figura 6.** Procedimiento de tratamiento de muestras con dicromato de potasio y ácido sulfúrico. (1) Adición de dicromato de potasio a las muestras. (2) Hervido de las muestras en la campana extractora. (3) Muestras después de hervir. (4) Retiro del sobrenadante. (5) Transferencia del sedimento a un tubo apto para la centrifuga. En caso de tener una centrifuga para tubos grandes, obviar este paso. (6) Colocación de muestras en la centrifuga. (7 y 8) Extracción y eliminación de agua que contenga dicromato de potasio y ácido sulfúrico. (9) Adición de agua destilada a las muestras. (10) Colocación de la muestra nuevamente para centrifugar y repetir los pasos 6, 7 y 8 hasta que el agua se vuelva transparente. (11) Tubos con agua clara, que muestran la extracción total de dicromato de potasio y ácido sulfúrico. Adaptado de Lobo et al. (2016b).

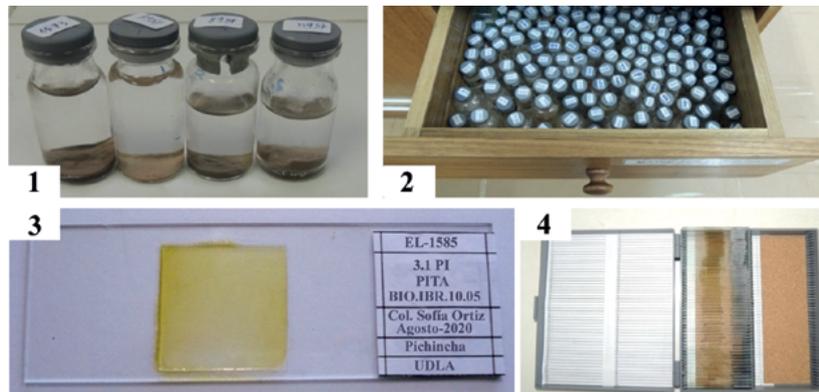


Pase 10 mL de cada muestra a los tubos grandes identificados, y póngalos nuevamente en el vaso de precipitado con agua. Dentro de la campana, con el extractor encendido y con guantes, agregue 2 mL de ácido clorhídrico a cada tubo y caliente el vaso de precipitado durante 30 minutos. Apague el fuego o la placa y espere a que enfríe. Coloque las muestras en la centrifuga equilibrando pesos, todos con el mismo volumen de muestra. Centrifugue durante 2 minutos a 3000 rpm. En este paso existe la opción de dejar sedimentar de 10 a 20 minutos. Nuevamente, retire el sobrenadante de cada tubo sin tocar el sedimento del fondo, y co-

lóquelo correctamente identificado en un recipiente adecuado, para su eliminación. A continuación, llene cada tubo otra vez con agua destilada y agite la muestra con el objetivo de eliminar todo el ácido clorhídrico. Repita esta operación seis veces, al igual que con el ácido sulfúrico (Figura 6.6-6.8). Al finalizar este procedimiento, las muestras estarán listas y deberán ser almacenadas en frascos de vidrio con la identificación adecuada (Figura 7).

Nota: Cuando manipule ácido clorhídrico, use guantes y mascarilla protectora para evitar quemaduras e inhalaciones. Realice el procedimiento de ebullición en la campana con el extractor encendido.

**Figura 7.** Almacenamiento de las láminas permanentes y de las muestras tratadas. (1) Frascos identificados. (2) Frascos almacenados. (3) Lámina permanente debidamente identificada. (4) Caja de almacenamiento de las láminas. Adaptado de Lobo et al. (2016b).



### **Materiales y equipos para la elaboración de preparaciones permanentes de diatomeas**

- |   |   |
|---|---|
| 1. Portaobjetos de microscopio (26 × 76 mm)   | 6. Medio de montaje (Naphrax o Pleurax) |
| 2. Cubreobjetos para microscopio (22 × 22 mm) | 7. Pinzas metálicas                     |
| 3. Pipeta graduada de 10 mL                   | 8. Placa calefactora                    |
| 4. Agua destilada                             | 9. Pesos                                |
| 5. Etanol                                     |   |

## **Procedimiento para la elaboración de preparaciones permanentes de diatomeas**

Las preparaciones para la identificación y cuantificación de diatomeas deben contener una densidad óptima que evite la superposición de frústulas para poder observarlas al microscopio. Una apariencia turbia o lechosa denota una alta densidad de diatomeas, por lo que en estos casos debe diluirse con agua destilada. Primero agite la muestra para que esté homogénea. Coloque un cubreobjetos en una placa calefactora a 50 °C. Con una pipeta, transfiera de dos a tres gotas de muestra al cubreobjetos. Con la ayuda de otra pipeta, vierta gotas de agua destilada hasta llenar toda la superficie del cubreobjetos. Si la muestra no está bien distribuida, vierta unas gotas de alcohol al 70 % (antes de secar completamente). La temperatura de la placa calefactora hará que el agua hierva y se evapore. Espere unos minutos para que el cubreobjetos se seque completamente (Figura 8.1-8.6).

Luego, deje caer una gota de medio de montaje (hay varias marcas disponibles en el mercado, como Naphrax o Pleurax) en el centro del portaobjetos. Con la ayuda de unas pinzas, coloque el cubreobjetos en el portaobjetos con la cara que contiene las diatomeas en contacto con el medio de montaje. Sitúe el portaobjetos ya montado con el cubreobjetos en la placa caliente para que evapore el alcohol del medio de montaje (use una máscara). Espere hasta que las burbujas de aire se vuelvan menos frecuentes. Retire el portaobjetos de la placa calefactora e inmediatamente, con ayuda de unas pinzas, presione el cubreobjetos sobre el portaobjetos para evitar que se formen burbujas de aire. Coloque pesas de plomo sobre el cubreobjetos hasta que se solidifique el medio de montaje (24 horas, aproximadamente) (Figura 8.7-8.15). En

este paso es importante que la capa del medio de montaje presente entre el cubre- y el portaobjetos sea lo más fina posible para forzar que las frústulas se dispongan horizontalmente en el portaobjetos y así se facilite su observación.

Las láminas permanentes y los viales que contienen las muestras tratadas deben estar debidamente etiquetados con la información que se indica a continuación (Figura 6):

1. Institución
2. Fecha de colección
3. Lugar de muestreo
4. Código de muestra/punto de recogida
5. Nombre de la persona que recogió las muestras
6. Nombre de la persona que preparó las muestras y los portaobjetos permanentes

Finalmente, guarde los portaobjetos permanentes en cajas apropiadas para futuras observaciones. Las muestras tratadas deben guardarse en un herbario diatomológico, en pequeños frascos de vidrio, de tal manera que, si es necesario, permitan preparar nuevos portaobjetos para la observación (Figura 7).

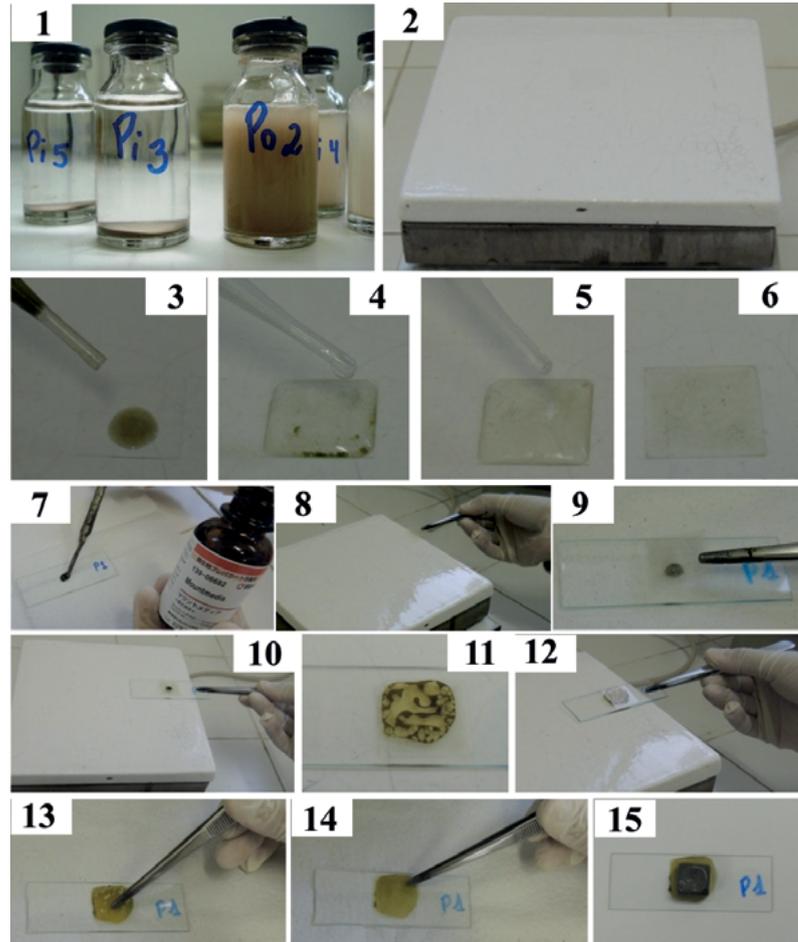
## **Materiales y equipo para la observación de diatomeas al microscopio óptico, la identificación taxonómica y el recuento de valvas**

1. Microscopio óptico equipado con objetivo de inmersión (100x) y contraste de fase con escala micrométrica
2. Cámara fotográfica
3. Aceite de inmersión

4. Ficha de laboratorio para registrar las especies identificadas y los respectivos cálculos, según modelo adjunto

5. Guías de identificación y bibliografías especializadas para identificación de la taxonomía de especies de diatomeas

**Figura 8.** Procedimiento para preparar muestras permanentes. (1) Agitación de la muestra contenida en el frasco de vidrio para homogeneización. (2) Placa calefactora conectada a 50 °C. (3) Goteo de la muestra sobre el cubreobjetos. (4) Llenado del cubreobjetos con agua destilada. (5) Distribución homogénea de la muestra. (6) Muestra en el cubreobjetos completamente seca. (7) Disposición del medio de montaje en el portaobjetos. (8) Retirada de la placa de la placa calefactora. (9) Colocación del cubreobjetos en el portaobjetos con la cara que contiene las diatomeas en contacto con el montaje. (10) Disposición de la cuchilla sobre la placa calefactora. (11) Formación de burbujas por la evaporación del medio de montaje. (12) Retirada del portaobjetos de la placa de calentamiento. (13) Presión del cubre- sobre el portaobjetos. (14) Cubreobjetos sin presencia de burbujas. (15) Peso de plomo sobre el cubreobjetos. Adaptado de Lobo et al. (2016b).



### Observación de individuos al microscopio óptico, identificación taxonómica y recuento de valvas

Utilice el objetivo 100x con aceite de inmersión, a ser posible con contraste de fase y escala micrométrica, para medir el tamaño de las valvas (Figura 9). Si no tuviéramos la escala micrométrica, sería posible extrapolar las medidas a partir de la foto de una cámara de Neubauer, ya que las medidas son importantes para diferenciar a las especies.

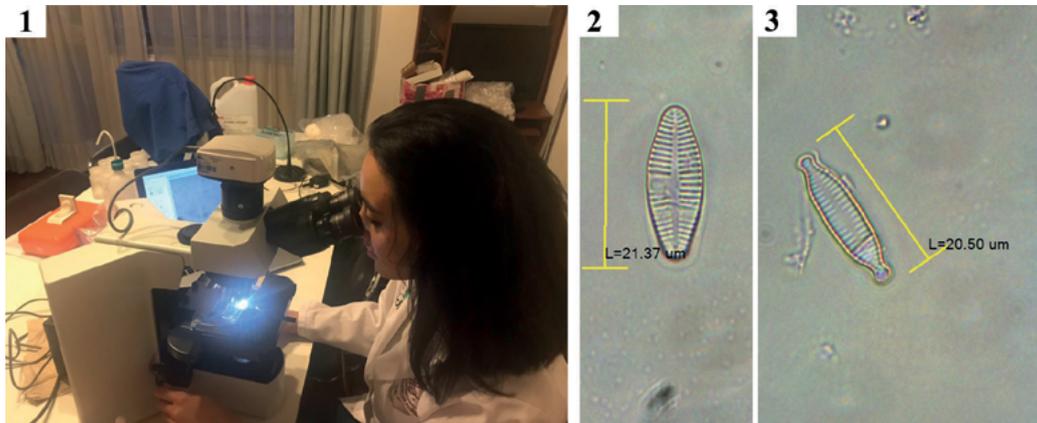
Antes de contar, elabore una lista de los taxones que se encuentran en la muestra. En la etapa de identificación es conveniente el uso de la bibliografía de referencia en cuerpos de agua del neotrópico, tales como Metzeltin y Lange-Bertalot (2007), Rumrich y Lange-Bertalot (2000), Metzeltin y García-Rodríguez (2003), Bes et al., (2012) y Lobo et al., (2014 y 2016b).

El conteo se realiza en un transecto lineal dispuesto en el medio del cubreobjetos, comenzando en el

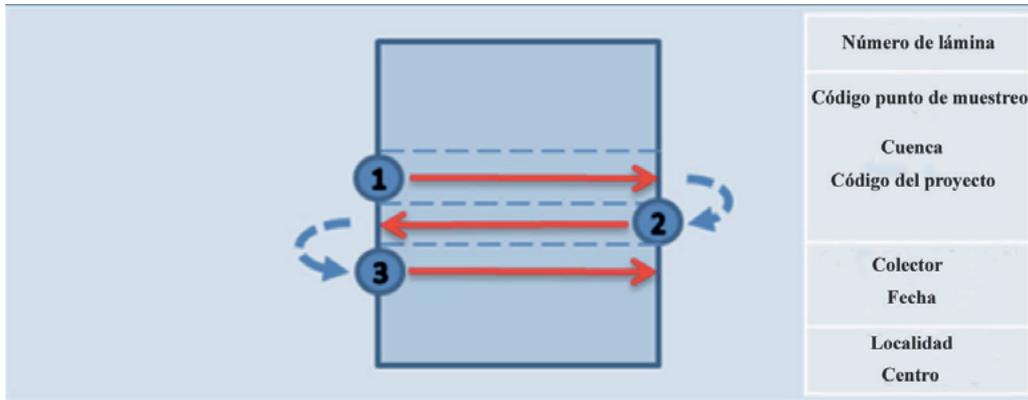
margen izquierdo (en relación con la etiqueta de identificación), hacia el margen derecho, contando todos los individuos que aparecen en él (Figura 10). Cabe recalcar que una frústula se compone de dos valvas, es decir, dos unidades de conteo. Una vez que se completa el transecto lineal, disponga un campo de visión abajo en el margen derecho y comience un nuevo transecto lineal hacia el margen izquierdo. Repita esta operación sucesivamente, tanto en el margen derecho como en el izquierdo, hasta que registre al menos 600 valvas, según la técnica descrita en Kobayasi y Mayama (1982). Tenga cuidado de no solapar los campos de visión. Excluya del conteo todos los individuos que no estén completos y en vista pleural (Figura 11) o vista lateral de la frústula (Ludwig y Tremarin, 2013), con el fin de sobreestimar el conteo.

Si tiene alguna pregunta o si no puede identificar una especie, se recomienda medir, obtener fotografías, imágenes digitales o dibujos detallados y consultar con un experto.

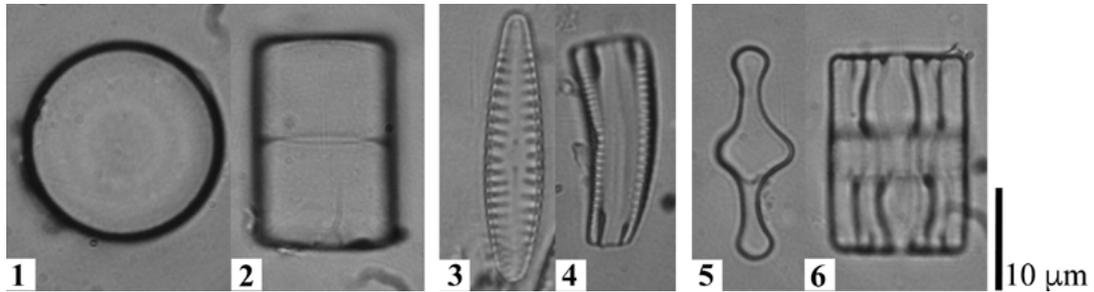
**Figura 9.** Identificación de algas diatomeas recolectadas. (1) Observación de los portaobjetos con la ayuda de un microscopio óptico, utilizando aceite de inmersión y objetivo 100x. (2) Observación de la microalga *Planothidium bagualense* C. E. Wetzel & L. Ector. (3) *Fragilaria recapitellata* Lange-Bertalot & Metzeltin.



**Figura 10.** Conteo usando transecto lineal. Adaptado de Lobo et al. (2016b).



**Figura 11.** Fotomicrografías de especies de algas diatomeas que muestran vista valvar y vista pleural, respectivamente. (1 y 2) *Melosira varians*. (3 y 4) *Rhoicosphenia abbreviata*. (5 y 6) *Tabellaria flocculosa*.



## Capítulo 2

### Índice trófico de calidad del agua (ITCA)

El índice trófico de calidad del agua (ITCA) fue propuesto por Lobo et al. (2014 y 2015) para sistemas lóticos brasileños subtropicales y templados, a partir de una revisión de las tolerancias a la eutrofización de especies de diatomeas epilíticas en relación con una serie de variables ambientales (físicas, químicas y microbiológicas) de estudios regionales realizados entre 2005 y 2013. En esta investigación, un total de 140 muestras biológicas y 211 muestras abióticas fueron recolectadas y analizadas por medio de técnicas multivariadas (análisis de conglomerados y análisis de correspondencia canónica). Los resultados indicaron 405 especies pertenecientes a 62 géneros; 133 especies fueron consideradas abundantes y, de estas, 70 participaron de la elaboración del índice. Según el criterio de Lobo y Leighton (1986), especies abundantes son aquellas cuya ocurrencia numérica supera el valor promedio (aritmético) del número total de individuos de las especies en una muestra, mientras que las especies dominantes corresponden a aquellas cuya ocurrencia numérica supera el 50 % del número total de individuos de las especies en una muestra.

A partir de los resultados obtenidos, se determinaron los distintos grados de tolerancia a la eutrofización de las especies abundantes, y se atribuyeron valores tróficos iguales a 1, 2,5 y 4, correspondientes a niveles de tolerancia definidos como bajo, medio y alto, respectivamente. El índice incorporó

un total de 70 taxones, de los cuales 16 especies mostraron una baja tolerancia a la eutrofización, 28 especies mostraron una tolerancia intermedia y 26 especies mostraron una alta tolerancia. Utilizando estos valores tróficos para cada una de las especies de diatomeas, se calcula el ITCA, adaptado de la fórmula de Pantle y Buck (1955):

$$ITCA = \frac{\sum (vt \cdot h)}{\sum h}$$

donde  $vt$  es el valor trófico de las especies y  $h$ , el porcentaje de ocurrencia (abundancia) de cada una de las especies en la muestra. El valor del ITCA varía de 1 a 4 en los ambientes acuáticos, como se muestra en la Tabla 1. Para calcular el ITCA para una determinada muestra y fecha, se asigna un valor trófico  $vt = 1$  a las especies que no están incluidas en la lista de los 70 taxones de la Tabla 5 del trabajo de Lobo et al. (2014).

**Tabla 1.** Relación entre el índice trófico de calidad del agua y la calidad del agua.

ITCA	Nivel de contaminación
1,0-1,5	Oligotrófico (contaminación despreciable)
1,5-2,5	$\beta$ -mesotrófico (contaminación moderada)
2,5-3,5	$\alpha$ -mesotrófico (contaminación fuerte)
3,5-4,0	Eutrófico (contaminación excesiva)

Trabajos previos realizados en la cuenca del río Pita (Castillejo et al., 2018) demuestran que el valor trófico asignado a las especies de diatomeas abundantes en Brasil son válidos para esas mismas especies que habitan los sistemas lóticos de los Andes de Ecuador.

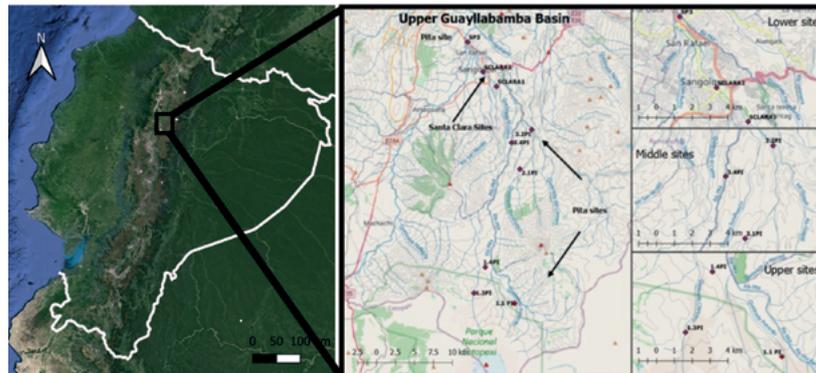
## Aplicación del ITCA en las cuencas de los ríos Pita y Santa Clara (cuenca alta del río Guayllabamba, provincia de Pichincha, Ecuador)

### Área de estudio

La cuenca del Guayllabamba está ubicada en la parte suroeste de la provincia de Pichincha, en las cercanías de Quito, capital de Ecuador (Figura 12). La parte más alta se encuentra en las faldas del volcán Cotopaxi (5897 m. s. n. m.) y baja hasta los 100 m. s. n. m., en la confluencia con el río Blanco, donde se transforma en el río Esmeraldas. En total, se seleccionaron nueve estaciones de muestreo a lo largo de la parte alta de la cuenca, desde los 3800 hasta los 2450 m. s. n. m., en los afluentes Pita y Santa Clara, y se les dieron los siguientes códigos: estaciones 1.1PI (ubicación GPS:  $-0.59613$   $-78.45234$ ; 3818 m. s. n. m.), 1.3PI (ubicación GPS:  $-0.59613$   $-78.45234$ ; 3781 m. s. n. m.) y

1.4PI (ubicación GPS:  $-0.56532$   $-78.439$ ; 3684 m. s. n. m.) en los tramos superiores; estaciones 2.1PI (ubicación GPS:  $-0.44802$   $-78.3979$ ; 3331 m. s. n. m.), 3.2PI (ubicación GPS:  $-0.40096$   $-78.38373$ ; 2865 m. s. n. m.) y 3.3PI (ubicación GPS:  $-0.41648$   $-78.40763$ ; 2865 m. s. n. m.) en los tramos inferiores intermedios; y estaciones SCLara1 (ubicación GPS:  $-0.34931$   $-78.42563$ ; 2463 m. s. n. m.), SCLara2 (ubicación GPS  $-0.33203$   $-78.44158$ ; 2463 m. s. n. m.) y SP3 (ubicación GPS:  $-0.29614$   $-78.45988$ ; 2454 m. s. n. m.) en los tramos inferiores (Figura 12). El diseño de muestreo tuvo como objetivo capturar la variación de eutrofización entre los diferentes tramos de la cuenca hidrográfica. Además, su calidad ecológica ha sido previamente estudiada, lo cual permite tener un gradiente de uso, representado en estos nueve puntos (Acosta et al., 2009; Ríos-Touma et al., 2014). Las estaciones 1.1, 1.2 y 1.3PI están rodeadas de vegetación de páramo y el 1.4PI está rodeado de páramo alterado por pastoreo, mientras que 3.2, 3.3 y 3.4PI están ubicadas en áreas con vegetación correspondiente a bosque andino, con presencia de especies introducidas como el eucalipto, y SCLara1, SCLara 2 y SP3 están ubicadas en áreas urbanas que contienen parques lineales al río (Figura 13).

**Figura 12.** Mapa del área de estudio con los puntos de muestreo en los ríos Pita y Santa Clara, pertenecientes a la cuenca del Guayllabamba (Ortiz, 2021).



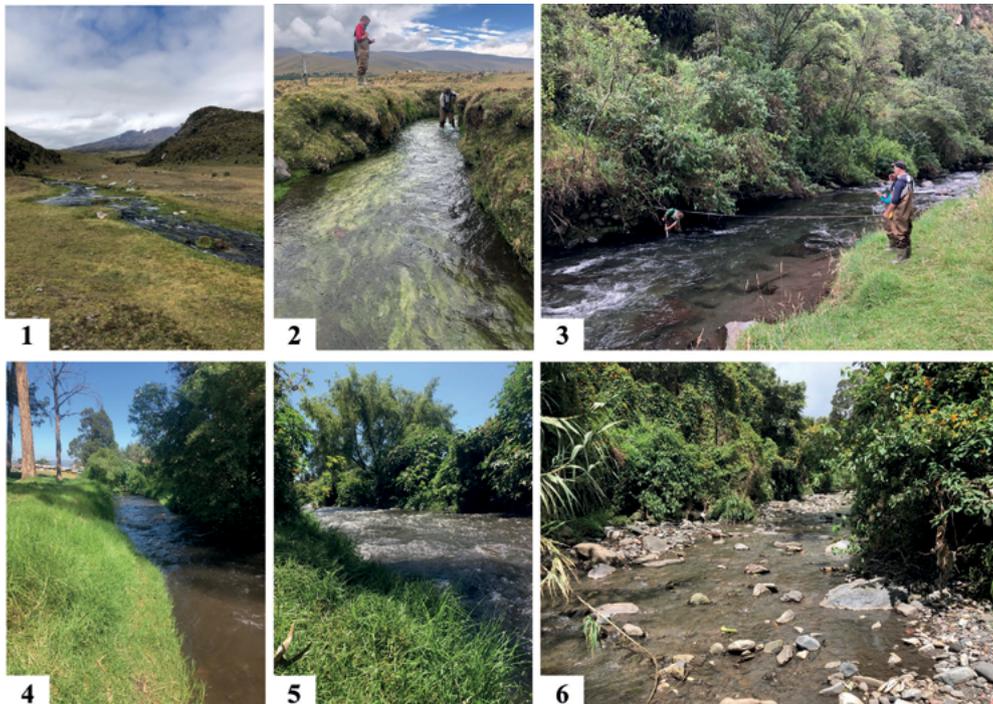
## Muestreo y análisis de datos

El muestreo se llevó a cabo el mes de agosto de 2020 (época de sequía), siguiendo los procedimientos anteriormente explicados. En cada sitio de muestreo se tomaron las siguientes variables ambientales: pH, nitritos, nitratos, nitrógeno amoniacal, fosfatos, sulfatos, oxígeno disuelto, demanda biológica de oxígeno, demanda química de oxígeno, turbidez, conductividad, índice de calidad del hábitat fluvial (IHF), índice de calidad del bosque de ribera andino (QBR-And) —que mide el grado, la calidad y la estructura de la cobertura de vegetación riparia— y el grado de alteración del canal del río (Acosta et al., 2009)

Para la identificación, se utilizó un microscopio Olympus BX-40, a partir de las obras taxonómicas citadas en el capítulo anterior. Las especies abundantes fueron seleccionadas según el criterio de Lobo y Leighton (1986), validado para Ecuador por Castillejo et al. (2018).

Luego de la identificación y cuantificación de las especies de diatomeas epilíticas, se realizó la evaluación de la calidad del agua de los puntos de muestreo aplicando el ITCA, basado en la clasificación de diatomeas para los ríos del sur de Brasil propuesto por Lobo et al. (2015).

**Figura 13.** (1) 1.1PI: afluente río Pita, zona El Salitre, Parque Nacional Cotopaxi. (2) 1.4PI: río Pita, quebrada Chilcahuaycu. (3) 3.4PI: río Pita en el Molinuco. (4) SClara1: río Santa Clara en Selva Alegre. (5) SClara2: río Santa Clara en Sangolquí. (6) SP3: río Pita en San Rafael.



## Resultados y discusión

En total, se identificaron 65 especies de diatomeas pertenecientes a 29 géneros; en el Anexo 2 se incluyen sus imágenes. De las especies identificadas, 22 fueron consideradas como abundantes, es decir, con un número por encima de la media de individuos

por especie, según el criterio de Lobo y Leighton (1986). En la Tabla 2 se muestra como ejemplo un recuento de algas diatomeas presentes en una lámina permanente del punto SClara 2 para la posterior aplicación de ITCA con los valores tróficos para cada especie recopilados en el *software* OMNDIA.

**Tabla 2.** Conteo de diatomeas en el punto SClara 2 para el cálculo del ITCA. En rojo se destaca el número de valvas de las especies abundantes.

Especies	Valvas	% de ocurrencia (h)	Valor trófico (vt)
<i>Navicula lanceolata</i> (C. Agardh) Ehrenberg	97	16,2	4
<i>Gomphonema parvulum</i> (Kützing) Kützing sensu lato	44	7,3	2,5
<i>Gomphonema pumilum</i> var. <i>rigidum</i> E. Reichardt & Lange-Bertalot	117	19,5	2,5
<i>Gomphonema</i> sp.1	5	0,8	1
<i>Gomphonema</i> sp.2	10	1,7	1
<i>Nitzschia soratensis</i> Morales & Vis	91	15,2	2,5
<i>Navicula tripunctata</i> (O.F. Müller) Bory	28	4,7	4
<i>Cocconeis lineata</i> Ehrenberg	26	4,3	2,5
<i>Melosira varians</i> C. Agardh	6	1,0	2,5
<i>Navicula</i> cf. <i>cryptotenella</i> Lange-Bertalot	6	1,0	2,5
<i>Rhoicosphenia abbreviata</i> (C. Agardh) Lange-Bertalot	69	11,5	4
<i>Nitzschia palea</i> (Kützing) W. Smith	13	2,2	4
<i>Navicula gregaria</i> Donkin	11	1,8	4
<i>Tabellaria flocculosa</i> (Roth) Kützing	2	0,3	1
<i>Planothidium</i> cf. <i>biporum</i> (M.H. Hohn & Hellerman) Lange-Bertalot	1	0,2	2,5
<i>Planothidium lanceolatum</i> (Brébisson) Lange-Bertalot	16	2,7	1
<i>Fragilaria tenera</i> (W. Smith) Lange-Bertalot	2	0,3	1
<i>Fragilaria vaucheriae</i> (Kützing) J.B.Petersen	1	0,2	2,5
<i>Fragilaria recapitellata</i> Lange-Bertalot & Metzeltin	2	0,3	1
<i>Ulnaria ulna</i> (Nitzsch) Compère	2	0,3	1

<i>Sellaphora seminulum</i> (Grunow) D. G. Mann	10	1,7	2,5
<i>Nitzschia linearis</i> (C. Agardh) W. Smith	4	0,7	4
<i>Nitzschia</i> cf. <i>fonticola</i> (Grunow) Grunow	4	0,7	1
<i>Encyonema silesiacum</i> var. <i>altensis</i> Krammer	4	0,7	2,5
<i>Encyonema minutum</i> (Hilse) D. G. Mann	1	0,2	2,5
<i>Eolimna</i> sp.	5	0,8	1
<i>Reimeria sinuata</i> (W. Gregory) Kociolek & Stoermer	1	0,2	1
<i>Gomphonema turgidum</i> Ehrenberg	3	0,5	1
<i>Nitzschia amphibia</i> Grunow	6	1,0	2,5
<i>Nitzschia clausii</i> Hantzsch	1	0,2	4
<i>Pinnularia</i> sp.	1	0,2	1
<i>Fragilaria arcus</i> (Ehrenberg) Cleve	1	0,2	1,75
<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kützing	2	0,3	4
<i>Luticola goeppertiana</i> (Bleisch) D.G. Mann	1	0,2	4
<i>Sellaphora pupula</i> (Kützing) Mereschkowsky	2	0,3	3,25
<i>Placoneis undulata</i> (Østrup) Lange-Bertalot	1	0,2	1
<i>Nitzschia ovalis</i> H. J. Arnott	3	0,5	1
<b>Total</b>	<b>600</b>	<b>100</b>	<b>ITCA:2,9</b>

Para seguir ampliando información sobre la posibilidad de aplicar el ITCA en Ecuador, se llevaron a cabo análisis multivariados de datos de dos formas diferentes. Primero, las especies versus los puntos de muestreo. Los resultados de los conteos de diatomeas por sitio se analizaron mediante el análisis de grupos (*clusters*) basado en el método de Ward (1963), con el fin de clasificar las estaciones de muestreo según la similitud cuantitativa de las especies encontradas en cada sitio. En segundo lugar, se aplicó el análisis canónico de correspondencia (ACC) para revelar cómo la composición de las especies se relaciona con las variables ambientales, que a su vez cambian con los procesos de

alteración humana de los sitios. Esto se realizó con el objetivo de identificar las variables ambientales que mejor explican la distribución de las distintas especies de diatomeas en los puntos de muestreo y evaluar su utilidad como indicadores del cambio ambiental (Ortiz, 2021).

El análisis de grupos (*clusters*) realizado a partir de las especies de diatomeas presentes en cada estación de colecta agrupó los puntos sin contaminación visual y contaminados (según los parámetros ambientales medidos) en dos grandes grupos (Figura 14): dos subgrupos de puntos limpios, 1.1PI y 1.4PI, y 1.3PI y 2.1PI; y el resto, en otros dos subgrupos:



y moderadas (2,5), ya que en todos los puntos se identificaron fuentes de nutrientes vegetales como ganado, más los sulfatos provenientes de la actividad volcánica, factor para tener en cuenta cuando se aplica el ITCA en los Andes ecuatorianos. El número de especies aumentó en los sitios más bajos a excepción del SP3, posiblemente debido al exceso de contaminación por vertidos urbanos. El sitio con la mayor riqueza de especies fue SClara1, con 34 (Tabla 2), y la menor cantidad de especies se encontró en 1.1PI y 3.2PI, con 15 cada una (Anexo 2). El ITCA se correlacionó directamente con la temperatura, la turbidez, la demanda química de oxígeno, el amonio y los nitritos (Ortiz, 2021).

Todos los puntos, exceptuando los situados en entornos urbanos (SClara2 y SP3), obtuvieron un ITCA de entre 1,5 y 2,5, lo que refleja un nivel de contaminación moderada  $\beta$ -mesotrófico (Tabla 3).

**Tabla 3.** Evaluación de la calidad del agua utilizando el ITCA en los puntos de la parte alta de la cuenca del Guayllabamba (agosto de 2020).

Puntos	ITCA	Nivel de contaminación
1.1 PI	2.1	$\beta$ -mesotrófico (contaminación moderada)
1.3 PI	2.0	$\beta$ -mesotrófico (contaminación moderada)
1.4 PI	1.7	$\beta$ -mesotrófico (contaminación moderada)
2.1 PI	2.4	$\beta$ -mesotrófico (contaminación moderada)
3.2 PI	2.3	$\beta$ -mesotrófico (contaminación moderada)
3.4 PI	2.3	$\beta$ -mesotrófico (contaminación moderada)
SClara 1	2.4	$\beta$ -mesotrófico (contaminación moderada)
SClara 2	2.9	$\alpha$ -mesotrófico (contaminación fuerte)
SP3	2.6	$\alpha$ -mesotrófico (contaminación fuerte)

## Capítulo 3

### Caracterización de códigos de barras genéticos de diatomeas epilíticas

La identificación tradicional de las diatomeas se fundamenta en taxonomía clásica basada en la estructura y ornamentación de la frústula. Esta identificación requiere gran experticia y consume mucho tiempo de análisis microscópico (Morales et al., 2001). En la actualidad, cada vez más se está imponiendo la identificación de especies basada en secuencias de ADN, lo que se conoce como código de barras genético (*barcoding*) (Hebert et al., 2003). Esta herramienta consiste en una secuencia corta de ADN que puede ser amplificada fácilmente y es característica de cada especie. En el caso de diatomeas se han propuesto varios genes como candidatos para la identificación de especies, como el gen de la subunidad 1 de la citocromo oxidasa c (CO1), el gen de la subunidad pequeña ribosomal (18S rRNA), el espaciador transcrito interno 2 (ITS2) y el gen de la subunidad grande de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (*rbcL*) (Pawlowski et al., 2016).

La combinación del código de barras de ADN con las nuevas tecnologías de secuenciación masiva ha conducido al desarrollo de una nueva metodología, conocida como *metabarcoding*, para la identificación de múltiples especies a partir de una muestra ambiental compleja (Kermarrec et al., 2013; Pawlowski et al., 2018). Varios autores han aplicado esta herramienta y obtenido una buena correlación entre los datos moleculares y los morfológicos, lo que de-

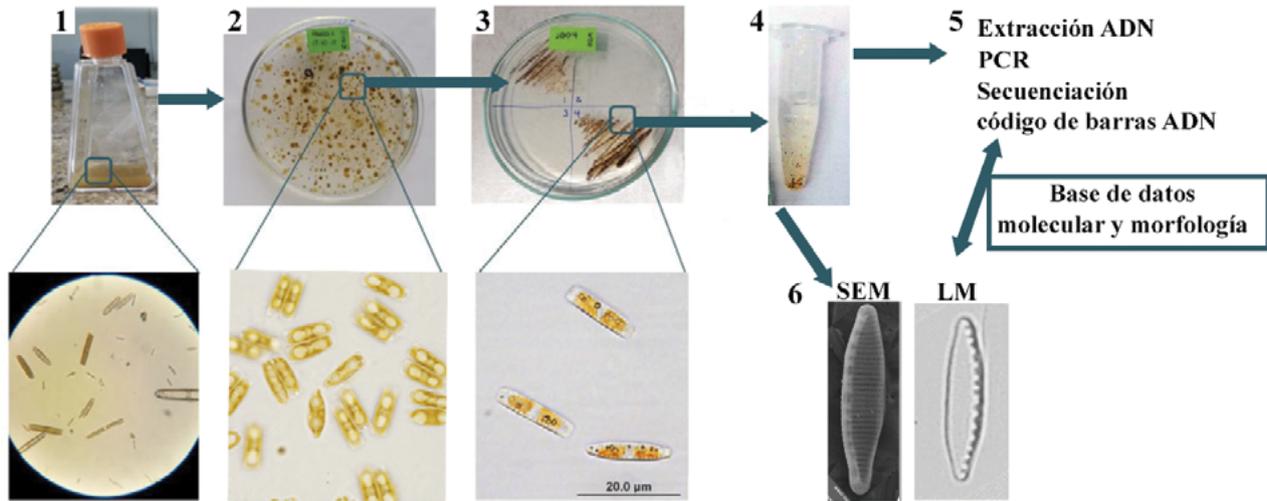
muestra su potencial para la identificación y cuantificación de diatomeas en muestras ambientales empleando principalmente como marcadores el gen de la *rbcL* y una región hipervariable del gen 18S rRNA (Apothéloz-Perret-Gentil et al., 2017; Kermarrec et al., 2013; Vasselon et al., 2017; Zimmermann et al., 2014). Por tanto, tal y como sugieren Hering et al. (2018) los métodos de identificación basados en secuencias de ADN suponen un buen complemento e incluso un posible reemplazo a los métodos tradicionales, pues son capaces de detectar la presencia de especies con un buen nivel de precisión. La principal limitante en la aplicación de estos marcadores es la falta de secuencias de referencia de diatomeas epilíticas, especialmente en el caso de Ecuador.

En este capítulo se explicará cómo obtener códigos de barras de especies de diatomeas cuya morfología ha sido previamente identificada a través del microscopio óptico y/o electrónico de barrido. Los marcadores moleculares 18SV4 y *rbcL* son los más utilizados en la actualidad (Vasselon et al., 2018; Zimmermann et al., 2014). De esta manera se podrá contribuir al desarrollo de una base de datos de referencia de códigos de barras de ADN de diatomeas aisladas de cuerpos de agua de Ecuador que permita la implementación de nuevas aproximaciones basadas en ADN en los protocolos de biomonitorio ambiental.

Los principales pasos para la generación de los códigos de barras genéticos son el aislamiento y el cultivo puro de una especie de diatomea, la extracción del ADN de la especie, la amplificación de los

marcadores por PCR, la secuenciación, la preparación de láminas permanentes del cultivo y la toma de imágenes digitales (Figura 16).

**Figura 16.** Flujograma de los procesos a seguir para obtener el código de barras de ADN. En la parte inferior se muestra la visualización de los cultivos por microscopía. (1) Siembra de muestras ambientales en cultivo sólido. (2) Colonias crecidas a partir de la muestra ambiental. (3) Obtención de cepa unialgal. (4) Crecimiento en cultivo líquido (opcional). (5) Extracción de ADN, amplificación y secuenciación del gen código de barras. (6) Captura de imágenes de la cepa aislada por microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía óptica (LM).



## Aislamiento de cepas de diatomeas epilíticas

### Materiales y equipo para el cultivo de diatomeas

1. Reactivos para elaborar el medio de cultivo
2. Balanza
3. Medidor de pH
4. Placas Petri
5. Matraces

6. Autoclave
7. Asa de siembra de Drigalsky
8. Cámara de cultivo
9. Cabina de flujo laminar

### Metodología para el aislamiento de cultivos puros

Las muestras de diatomeas epilíticas se colectan como se describe en la sección correspondiente. La submuestra destinada al cultivo se mantiene en frío

sin la adición de preservadores. De uno a tres días después de ser colectada, la muestra se siembra en placas de Petri (90 mm) con medio de cultivo sólido (1 % agar). Para el crecimiento de diatomeas epilíticas, se usan distintos medios de cultivo para algas de agua dulce suplementados con metasilicato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) 10 mM; los más utilizados son el Bold's Basal Medium (BBM) (Bold, 1949), el Wright's Cryptophyte (WC) (Guillard y Lorenzen, 1972) y el Chu #10 (Chu, 1942). Sin embargo, se ha reportado que para el crecimiento de especies oligotróficas es conveniente la modificación de los medios, disminuyendo un décimo de la cantidad indicada el contenido de nitrógeno y/o fosforo (Kelly et al., 2018; Mora et al., 2019).

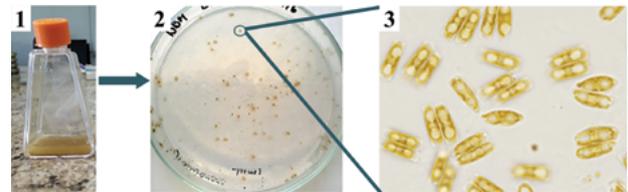
La manipulación de los cultivos se realiza en condiciones de esterilidad, en cámara de flujo laminar horizontal.

Antes del aislamiento se debe asignar a la muestra ambiental un código que nos ayude a identificar los cultivos aislados a partir de ella. Para el aislamiento se inoculan las placas con medio sólido con 500  $\mu\text{L}$  de la muestra ambiental original y de tres diluciones seriadas (10-1, 10-2, 10-3) de manera independiente. Se extiende el inóculo sobre toda la superficie de la placa con un asa de Drigalsky. Otra estrategia es el aislamiento de células individuales de la muestra original con micropipeta bajo el microscopio invertido o una lupa. En este caso, a veces, es mejor partir de la muestra diluida (Mora et al., 2019).

Las células aisladas se siembran en placas de Petri. Las placas inoculadas se ponen a crecer a 15-22 °C bajo luz fluorescente blanca y fría en un fotoperíodo de 12:12 (luz:oscuridad), replicando el fotoperíodo de la latitud ecuatorial. Al cabo de tres o cuatro semanas se observará crecimiento de pequeñas colonias pardas. Para confirmar si las colonias visibles son

cultivos puros de una única especie de diatomea, se toma una pequeña muestra de células con un asa de siembra redonda estéril. En un portaobjetos se deposita una gota de agua, se añaden las células, se monta el cubre y observamos al microscopio óptico con un aumento de 100x (Figura 17). La colonia que se comprueba que es pura se siembra en una nueva placa de Petri con medio sólido con el fin de obtener suficiente cantidad de células para su identificación morfológica y molecular. Las colonias en las que se observen varias especies se siembran de nuevo por agotamiento en estría y se repiten los pasos de cultivo hasta la obtención de colonias puras. Una vez establecido los cultivos unialgales, se les asigna el código de la muestra ambiental y un número.

**Figura 17.** Comprobación de colonia con una única especie de diatomea. (1) Siembra de muestras ambientales en cultivo sólido. (2) Colonias crecidas a partir de la muestra ambiental. (3) Imagen a microscopía óptica de células de la colonia.



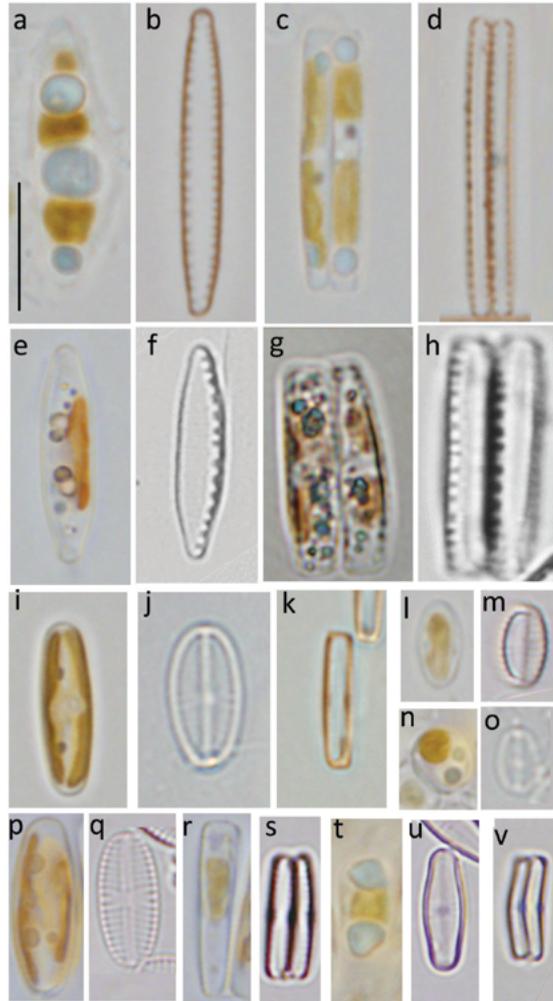
### Visualización e identificación de las cepas de referencia

Para la visualización de las frústulas se realiza un tratamiento de oxidación de la materia orgánica más sencilla que la descrita previamente, ya que no tenemos necesidad de eliminar las impurezas de las muestras ambientales. Para ello se inoculan células del cultivo puro en un tubo de 1,5 mL con 500  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo líquido, y se ponen a crecer en las mismas condiciones que los cultivos sólidos. Cuando se observe el crecimiento de células de co-

lor pardo, se oxida la materia orgánica con ácido nítrico al 50 % (se añaden 500  $\mu\text{L}$  de ácido nítrico a los 500  $\mu\text{L}$  de cultivo). Luego, se incuba a 90  $^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos y se centrifuga a 2000 rpm durante un minuto. Se desecha el sobrenadante y el sedimento se lava dos veces con agua destilada,

tras lo cual se resuspende en unos 200  $\mu\text{L}$  de agua destilada (Potapova y Charles, 2002). Esta muestra se usa para visualizar al microscopio electrónico de barrido o para preparar láminas permanentes con Naphrax, como se describe previamente en el libro (Figura 18b, d, f, h, j, k, m, o, q, s, u, v).

**Figura 18.** Cultivos de diatomeas in vivo y sus frústulas. (a, b, c, d) *Nitzschia palea*. (e, f, g, h) *Nitzschia fonticola*. (i, j, k, p, q, r) *Sellaphora seminulum*. (l, m, n, o) *Eolimna mínima*. (s, t, u, v): *Achnantidium minutissimum*. Barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ .



## Aislamiento de ADN de cultivos axénicos

Actualmente existen en el mercado distintos kits comerciales que pueden emplearse para el aislamiento de ácidos nucleicos. En este apartado vamos a describir un método de extracción rápido y económico, basado en el protocolo de Edwards et al. (1991), que puede ser usado para obtener ADN de los cultivos de diatomeas.

### Materiales y equipo

1. Tampón de extracción (200 mM tris-HCl pH8, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS)
2. Isopropanol
3. Etanol 70 %
4. Agua ultrapura libre de DNAsas
5. Tubos de 1,5 mL
6. Micropipetas y puntas de micropipetas (100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L)
7. Agitador (tipo Vortex)
8. Termobloque para tubos de 1,5 mL o baño caliente
9. Ultracentrífuga

### Procedimiento

En primer lugar, hay que coleccionar las células del cultivo puro. Se pueden tomar del cultivo en placa o de las células creciendo en cultivo líquido, con ligeras modificaciones en los pasos iniciales de la extracción.

Si partimos del cultivo en placa, se recoge una superficie de células de unos 0,5 cm<sup>2</sup> con un asa de siembra redonda estéril y se la inocula en un tubo

de 1,5 mL con 400  $\mu$ L de tampón de extracción. Si partimos de las células en cultivo líquido, se toma una alícuota de unos 200  $\mu$ L del cultivo líquido en un tubo de 1,5 mL, se centrifuga 3 minutos a 4000 rpm, se elimina el sobrenadante y se añaden 400  $\mu$ L de tampón de extracción.

Una vez que tenemos las células en el tampón de extracción, se mezclan con un agitador tipo Vortex durante 15 segundos. Después se incuban a 90 °C durante 10 minutos; este paso ayuda a la lisis celular. Tras la incubación, se centrifuga a 13 000 rpm durante 10 minutos. Se toma el sobrenadante (350 mL) con cuidado de no arrastrar el precipitado y se lo traspara a un tubo nuevo de 1,5 mL. Posteriormente se añaden 300  $\mu$ L de isopropanol frío y se mezcla bien por inversión del tubo. Con el objetivo de precipitar el ADN, se deja reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifuga a 13 000 rpm durante 10 minutos y se desecha el sobrenadante con cuidado de no perder el precipitado, ya que es donde se encuentra el ADN. Para lavar el exceso de sales se añaden 500  $\mu$ L de etanol 70 % al precipitado, procurando despegarlo pero no disolverlo. De nuevo, se centrifuga a 13 000 rpm durante 10 minutos y se desecha el sobrenadante con cuidado de no perder el precipitado. En este paso es importante que se elimine todo el líquido: si quedan restos de etanol, podrán interferir en la amplificación de los genes marcadores.

Una vez eliminado el sobrenadante, se dejan los tubos abiertos un rato para que se evapore completamente el etanol; también se los puede dejar boca abajo, escurriendo en un papel absorbente. Tras comprobar que los tubos están secos, se añaden 50  $\mu$ L de agua ultrapura, y se los deja 5 minutos a temperatura ambiente para que se disuelva el ADN (no disolvemos pipeteando).

## Valoración de la calidad y cantidad del ADN aislado

La cantidad y la calidad del ADN obtenido se analiza mediante espectrofotometría y/o electroforesis en gel de agarosa.

El análisis por espectrofotometría se basa en la absorción (A) de los ácidos nucleicos a una longitud de onda de 260 nm, mientras que las proteínas presentan un máximo de absorción a 280 nm. Una unidad de densidad óptica (DO), medida a 260 nm, corresponde a 50 µg/mL de ADN de doble cadena. La proporción de la lectura a 260 y a 280 nm (260/280) proporciona una estimación de la pureza del ácido nucleico. Las preparaciones puras de ADN tienen un ratio 260/280 de 1,8 a 2. Por otro lado, posibles contaminantes del proceso de extracción, como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos, absorben a 230 nm. En general, se considera que el ADN es de buena calidad cuando la relación A260/230 se sitúa en el rango 1,8-2,2.

Para cuantificar y evaluar la pureza del ADN, se emplea un espectrofotómetro NanoDrop™ que permite el uso de microvolúmenes de muestra (0,5-2 µL). Este equipo nos da el espectro completo de absorbancia de la muestra, desde 220 a 350 nm. El programa del equipo calcula la concentración y la relación 260/280 y 260/230.

También podemos evaluar el ADN mediante visualización por electroforesis en un gel de agarosa.

### Materiales y equipo para electroforesis en geles de agarosa

1. Agarosa purificada
2. Tampón de electroforesis: TBE 0,5x o TAE 1x

3. Receta de 1 L de solución stock TBE 5x: tris base 54 g; ácido bórico 27,5 g; 20 mL de 0,5 M de EDTA pH 8
4. Receta de 1 L de solución stock TAE 50x: tris base 242 g; 57,1 mL de ácido acético glacial y 100 mL de 0,5 M de EDTA pH 8
5. Tampón de carga de electroforesis (glicerol y azul de bromofenol)
6. Solución de tinción de ácidos nucleicos (SYBR Safe, GelRed, bromuro de etidio, etc.)
7. Marcador de peso molecular y cuantificación de ácidos nucleicos
8. Probetas y matraz
9. Microondas
10. Sistema de electroforesis horizontal y fuente de alimentación
11. Transiluminador de luz UV y/o sistema de fotografía

### Procedimiento de electroforesis en geles de agarosa

La visualización en gel de agarosa nos permite cuantificar la cantidad de ADN comparándola con un marcador de concentración conocida, y comprobar si el ADN extraído está íntegro o si ha habido degradación durante la extracción.

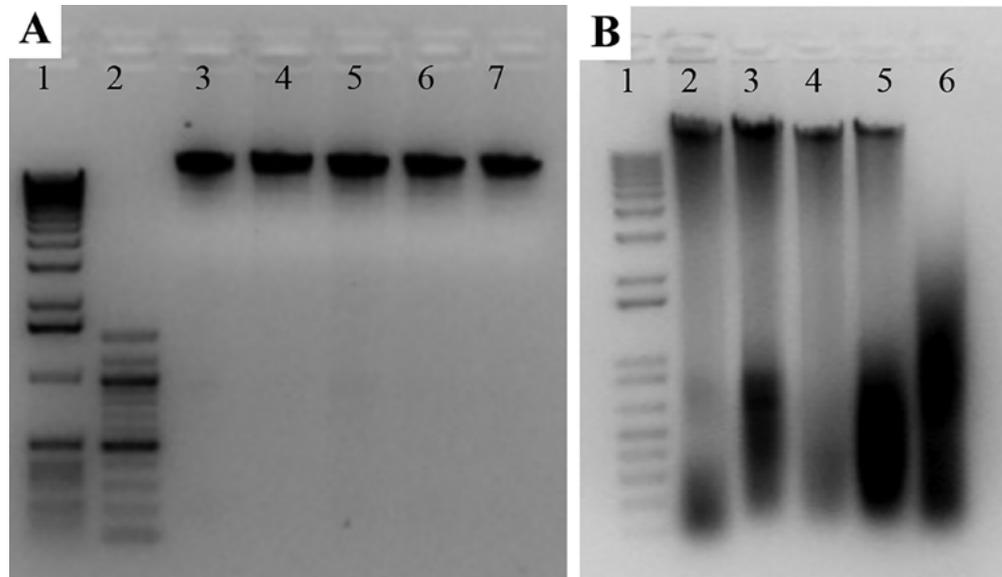
En primer lugar, preparamos el gel de agarosa. Pese la cantidad necesaria para preparar un gel al 1 % (p/v). El volumen dependerá de la bandeja de electroforesis que vayamos a utilizar. Mezcle la agarosa en el tampón de electroforesis (TAE 1x o TBE 0,5x). Funda la solución en el microondas, evitando que hierva. Selle los bordes de la bandeja y ponga los peines. Cuando la solución de agarosa

sa haya alcanzado una temperatura soportable por la mano, agregue la solución de tinción de ácidos nucleicos elegida en la dilución recomendada por el proveedor. Vierta la solución en la bandeja lentamente, para que no queden burbujas ni se muevan los peines. Espere a que la solución gelifique completamente. Quite los peines y el sellado de los bordes e introduzca la bandeja con el gel en la cubeta de electroforesis con el tampón correspondiente.

Después, prepare las muestras para cargarlas en el gel de agarosa. Para ello, mezcle de 5 a 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra de ADN extraído con el *buffer* de carga en el volumen recomendado por el fabricante. Cargue todo el volumen en el gel, cada muestra en un pocillo distinto. En otro pocillo cargue un marcador de peso molecular.

Desarrolle la electroforesis a 80 V durante 45-60 minutos y fotodocumente el resultado en un transiluminador de luz UV. Al visualizar el gel en el transiluminador esperamos ver una banda de alto peso molecular en cada pocillo. La intensidad de la banda es proporcional a la cantidad de ADN. Comparamos la intensidad de la banda con el marcador de concentración conocida para determinar cuál es la cantidad de ADN de cada muestra. Si en lugar de una única banda observamos un rastro a lo largo del gel, significa que la muestra de ADN está fragmentada y degradada, lo que puede afectar a la amplificación del código de barras genético (Figura 19).

**Figura 19.** Visualización de las muestras de ADN en electroforesis en gel de agarosa 1 %. (A) Carriles 1 y 2: marcadores de peso molecular; 3 a 7: muestras de ADN con buena integridad. (B) Carril 1: marcador de peso molecular; 2 a 5: muestras de ADN con degradación parcial; 6: muestra de ADN completamente degradada.



## Amplificación de secuencias de código de barras genético, 18S rRNA V4 y *rbcL*

Los estudios de monitoreo ecológico basados en el análisis de la estructura de la comunidad requieren que se identifiquen y cuantifiquen los organismos presentes en una muestra, se los relacione con su valor trófico y, a partir de esta información, se infiera la calidad ecológica. En el caso de los análisis moleculares, la guía de identificación se sustituye por una base de datos de códigos de barras de ADN de procedencia conocida, con la que se pueden cotejar las secuencias de ADN mediante algoritmos bioinformáticos. Los marcadores más usados como código de barras en evaluación ecológica con diatomeas epilíticas son una región corta del gen de la *rbcL* (marcador cloroplástico) y la región hipervariable V4 del gen 18S rRNA (marcador ribosomal) (Zimmermann et al., 2014; Mora et al., 2017; Kelly et al., 2020; Rivera et al., 2020). Ambos marcadores presentan regiones conservadas dentro de los filos de las diatomeas que permiten la amplificación efectiva de una alta proporción de especies analizadas. La región 18S V4 tiene mayor rendimiento de amplificación; sin embargo, su capacidad de discriminación es ligeramente inferior a la del *rbcL* (Kelly et al., 2020; Kermarrec et al., 2013). Cuando las diatomeas son el único objetivo del estudio, se necesita una región con gran capacidad

de discriminación y la *rbcL* parcial ha demostrado ser adecuada. Por otro lado, el uso de cebadores universales para la región 18S V4 permite cubrir un rango de diversidad mayor que el de las diatomeas exclusivamente, por lo que podría abrir el camino a la evaluación integrada de micro- y macrofauna de sistemas acuáticos.

### Materiales y equipos

1. Taq ADN polimerasa (existen distintas opciones comerciales de ADN polimerasa; es recomendable utilizar el formato de mezcla maestra de PCR [Mastermix], que lleva todos los componentes necesarios para la amplificación [polimerasa, dNTPs, tampón de reacción], excepto los cebadores y la muestra de ADN: por ejemplo, Platinum Green Hot Start PCR Master Mix 2x de Invitrogen, que también incluye un colorante para su carga directa en gel)
2. Cebadores (Tabla 4)
3. Tubos de 1,5 mL y 0,2 mL
4. Micropipetas (10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L) y puntas de micropipeta
5. Contenedor con hielo picado o gradilla refrigeradas
6. Termociclador o máquina de PCR

**Tabla 4.** Listado de cebadores para amplificar los marcadores *rbcl* y 18S.

Marcador	Nombre	Secuencia 5'-3'	T.a	Tamaño	Referencia
rbcl	rbcl-646F	ATGCGTTGGAGAGARCGTTTC	55 °C	331 pb	Kelly et al., 2020
	rbcl-998R	GATCACCTTCTAATTTACWACAAGT			
	Diat_rbcl_708F	AGGTGAAGTTAAAGGTTCACTTDA	55 °C	312 pb	Stoof-Leichsenring et al., 2012
	Reverse primer R3	CCTTCTAATTTACCAACAAGT			Vasselon et al., 2017
					Bruder y Medlin, 2007
		Vasselon et al., 2017			
	DPrbcL1 (forward)	AAGGAGAAATHAATGTCT	50 °C	1400 pb	Jones et al., 2005
	DPrbcL7 (reverse)	AARCAACCTTGTGTAAGTCTC			Kelly et al., 2020
	DtrbcL2F	TCAGAACGGACTCGAATTA	59 °C	600 pb	Lang y Kaczmariska, 2011
	DtrbcL1R	TTATACGTTTGCTGTTGGTGT			
18S	18S-F	TCYAAGGAAGGCAGCAGGCGC	59 °C	720 pb	Guo et al., 2015
	18S-R	GTTTCAGHCTTGCGACCATACTCC			
18SV4 region	DIV4for	GCGGTAATTCCAGCTCCAATAG	50 °C	420 pb	Apothéoz-Perret-Gentil et al., 2017
	DIV4rev3	CTCTGACAATGGAATACGAATA			
		D512for 18S	ATT CCA GCT CCA ATA GCG	52 °C	420 pb
	D978rev 18S	GAC TAC GAT GGTATC TAATC			

## Reacción de amplificación

Cada reacción de PCR para la amplificación de los marcadores se realiza en 20 µL de volumen final y contiene 50 ng de ADN (10 ng/µL), 1x de Platinum Green Hot Start PCR Master Mix y 0,25 µM de cada cebador. Se prepara una mezcla maestra para todas las muestras que contiene todos los componentes menos el ADN. En la Tabla 5 se muestra un ejemplo de cantidades para amplificar un conjunto de seis muestras y un control negativo (muestra sin ADN). Siempre se calculan las cantidades de reactivos para más muestras por el error de pipeteo al repartir. Se mezclan bien todos los componentes en un tubo de 1,5 mL y se reparten 15 µl por cada

muestra en tubos de 0,2 µl. A cada tubo se añaden 5 µl de cada muestra de ADN y en el blanco se añaden 5 µl de agua ultrapura.

**Tabla 5.** Componentes y cantidades de los reactivos de la mezcla maestra para la PCR.

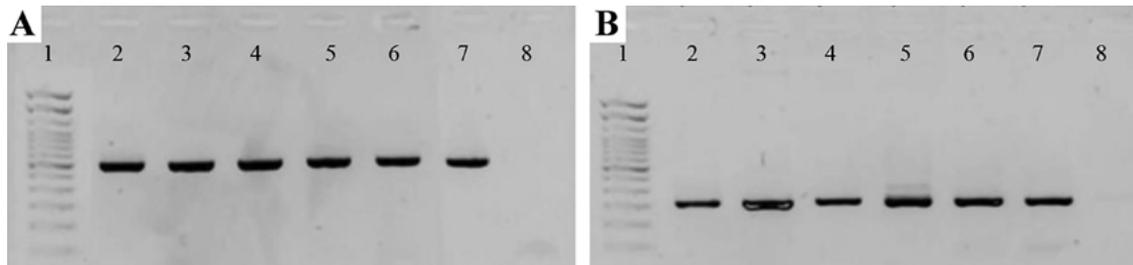
Componentes	Cantidades por tubo	8x
Mastermix (2x)	10 µl (1x)	80 µl
Cebador <i>forward</i> (5 µM)	1 µl (0,25 µM)	8 µl
Cebador <i>reverse</i> (5 µM)	1 µl (0,25 µM)	8 µl
Agua ultrapura	3 µl	24 µl

Una vez preparados los tubos con las reacciones, se introducen en el termociclador. El programa de PCR se inicia con una desnaturalización a 94 °C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos en los que se repiten los siguientes pasos: desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación de los cebadores a 50-55 °C (dependiendo de la pareja de cebadores) durante 30 segundos y elongación a 72 °C durante 30-90 segundos (dependiendo del tamaño del fragmento amplificado). Por último, se añade un paso de elongación a 72 °C durante 2 minutos. En la Tabla 4 se detalla la lista de ceba-

dores usados para amplificar los dos marcadores en diatomeas; en ella se indican la temperatura de hibridación de la pareja de cebadores y el tamaño del fragmento amplificado.

Una vez terminada la PCR, se visualiza el resultado de la amplificación en un gel de agarosa al 1,5 % (p/v). En este caso se cargan en el gel 8 µL de cada reacción de PCR, y el resto se reserva para enviar a secuenciar. En uno de los pocillos se carga el marcador de peso molecular. En cada muestra se debe observar una banda del tamaño esperado (Figura 20).

**Figura 20.** Visualización de las muestras tras la amplificación por PCR. (A) Fragmento parcial *rbcL*. Carril 1: marcador de peso molecular; 2 a 7: muestras con amplificación positiva (aprox. 600 pb); 8: muestra control negativo (blanco). (B) Fragmento 18S V4. Carril 1: marcador de peso molecular; 2 a 7: muestras con amplificación positiva (aprox. 300 pb); 8: muestra control negativo (blanco).



Las muestras positivas para la PCR se envían a un servicio para su secuenciación. Las secuencias obtenidas se editan con un software de análisis de secuencias, por ejemplo MEGAX (Kumar et al., 2018), disponible en <https://www.megasoftware.net>. Una vez editadas las secuencias, se las compara con las bases de datos de secuencias GenBank en NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y Boldsystems ([http://www.boldsystems.org/index.php/Public\\_BINSearch?searchtype=records](http://www.boldsystems.org/index.php/Public_BINSearch?searchtype=records)).

En la página del Instituto Nacional de Investigación en Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de Francia (INRA) se encuentra una base de datos de secuencias de diatomeas denominada Diat.barcode. Se trata de una biblioteca de referencia dedicada a las diatomeas con una taxonomía curada a nivel de género y especie, que se mantiene desde 2012. Diat.barcode recoge datos y metadatos para el marcador *rbcL* y también, en menor medida, para 18S. Se puede acceder libremente a través de [https://www6.inra.fr/carrtel-collection\\_eng/Barcoding-database](https://www6.inra.fr/carrtel-collection_eng/Barcoding-database) (Rimet et al., 2019).

## Capítulo 4

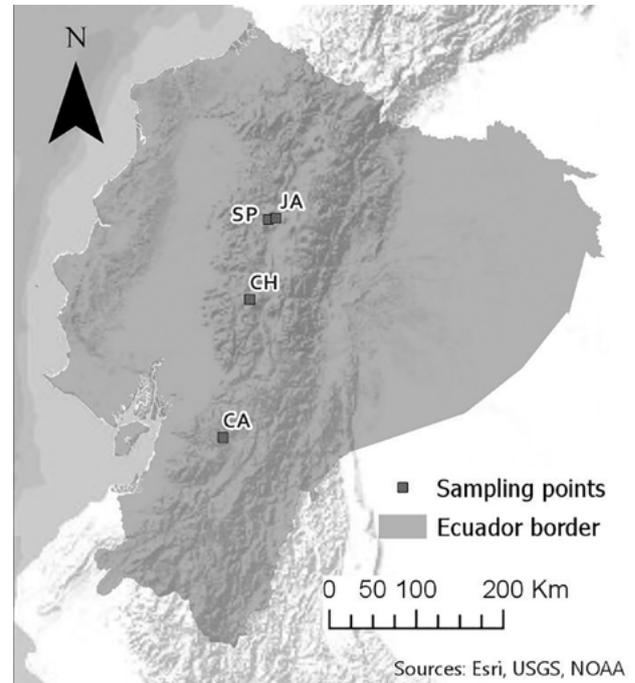
# Obtención del código de barras genético de cinco especies de diatomeas epilíticas ecuatorianas bioindicadoras de la calidad del agua

El objetivo principal de este caso fue obtener el código de barras del ADN de diatomeas epilíticas ecuatorianas con una amplia distribución geográfica, un rango ecológico bien definido y características que les permiten ser especies indicadoras confiables (Ballesteros et al., 2020). Para ello se aplicaron todas las técnicas previamente descritas.

### Sitios de muestreo

Se tomaron muestras de diatomeas de cuatro puntos de ríos distintos: río Jambelí ( $-0.57296$   $-78.59418$ ; 3162 m. s. n. m.), en la provincia de Pichincha, rodeado de zonas agrícolas y ganaderas; quebrada Corazón ( $-0.58661$   $-78.67343$ ; 3601 m. s. n. m.), en la Reserva Ecológica Ilinizas (Pichincha); un arroyo dentro de la Reserva Ecológica Chimborazo ( $-1.41337$   $-78.86458$ ; 3978 m. s. n. m.); y un arroyo dentro del Parque Nacional Cajas ( $-2.84271$   $-79.14182$  3165 m. s. n. m.) (Figura 21). La toma de muestras y su movilización se hizo bajo el permiso MAE-DNB-CM- 2018-093, otorgado por el Ministerio del Ambiente de Ecuador.

**Figura 21.** JA: río Jambelí; SP: quebrada Corazón; CH: arroyo de deshielo del volcán Chimborazo; CA: arroyo del Parque Nacional Cajas. Tomada de Ballesteros et al. (2020).

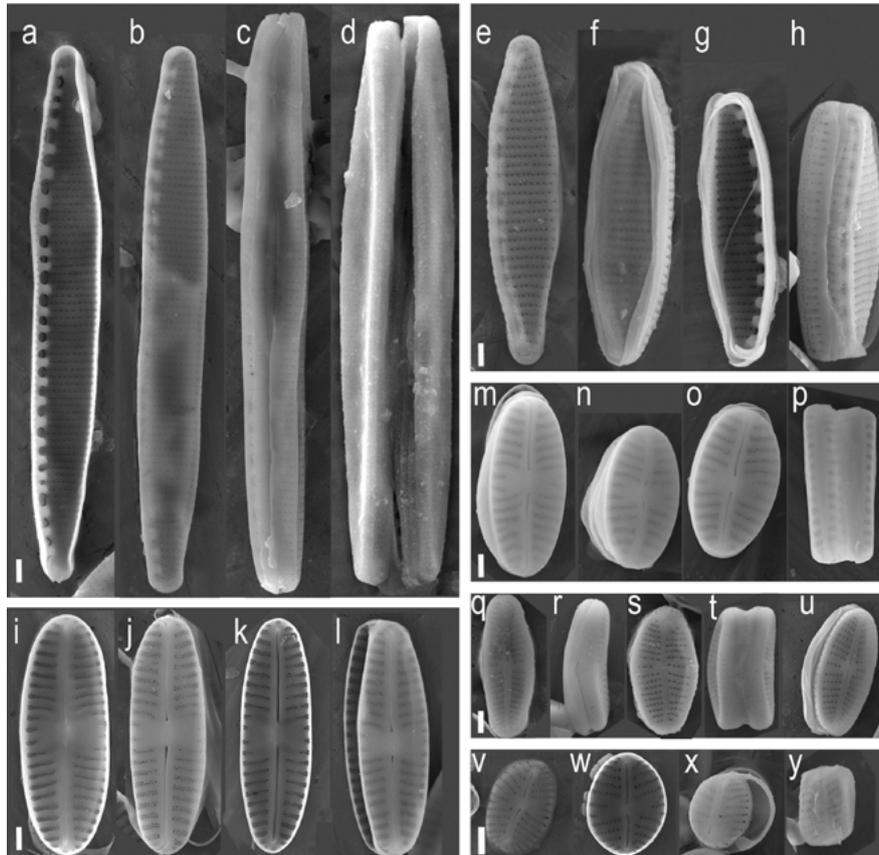


## Resultados

De las muestras ambientales se obtuvieron seis cultivos puros, a los que se dio un código en referencia al sitio de muestreo: cepa JA01a, JA01b, JA01c (Río Jambelí), CA01a (arroyo P. N. Cajas), CH02a (arroyo Chimborazo) y SP02a (quebrada Corazón). La identificación morfológica se llevó a cabo mediante microscopía electrónica (Figura 22). Las cepas

correspondieron a cinco especies de interés: *Nitzschia palea* (Kützing) W. Smith (CA01a), *Nitzschia fonticola* (Grunow) Grunow (SP01a) y *Sellaphora seminulum* (Grunow) D. G. Mann (JA01a y b), como especies tolerantes a la eutrofización; *Eolimna minima* (Grunow) (CH02a), bioindicadora de aguas mesotróficas; y *Achnantidium minutissimum* (Grunow) (JA01c), de aguas oligotróficas.

**Figura 22.** Frústulas de las diatomeas aisladas bajo el microscopio electrónico. (a-d) CA01a *Nitzschia palea* (Kützing) W. Smith). (e-h) SP02a *Nitzschia fonticola* (Grunow) Grunow). (i-l) JA01a y (m-p) JA01b *Sellaphora seminulum* (Grunow) D. G. Mann). (q-u) JA01c *Achnantidium minutissimum* (Grunow). (v-y) CH02a *Eolimna minima* (Grunow). Barra de escala: 1  $\mu\text{m}$  (Ballesteros et al., 2020).



De los cultivos aislados se extrajo el ADN y se llevó a cabo la amplificación de los marcadores *rbcl* y 18S V4. Para el gen *rbcl* se amplificó un fragmento de unas 300 pb, con los cebadores Diat\_*rbcl*\_708F y R3 (Tabla 4). La región 18S V4 rRNA se amplificó con los cebadores DIV4For y Div4rev3 (Tabla 4). Los amplificaciones se secuenciaron en el servicio de secuenciación de la UDLA (Quito, Ecuador) con el equipo Biosystems® 3130 Genetic Analyzer. Las secuencias se editaron con el *software* MEGAX (Kumar et al., 2018) y los números de acceso del GenBank para las secuencias de 18SV4 rRNA y *rbcl* de este estudio son MN589666-MN589670 y

MN603956-MN603960, respectivamente. Una vez editadas, se compararon con la base de datos GenBank del NCBI con la herramienta Blastn. Los resultados de la comparación con las bases de datos se muestran en la Tabla 6. Las identificaciones basadas en los códigos de barras en general coinciden con las identificaciones mediante análisis morfológico. Para los dos marcadores, las secuencias de los códigos de barras obtenidos coincidieron con un alto porcentaje de identidad con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank para las mismas especies provenientes de lugares tan dispares como Australia o Alemania.

**Tabla 6.** Resultados de la comparación de las secuencias de cada cepa aislada encontrada en el GenBank mediante BLASTN. % id.: porcentaje de identidad. N: número de secuencias con el porcentaje de identidad indicado.

Cepa	18SV4	% id.	N	Resultado más similar	<i>rbcl</i>	% id.	N	Resultado más similar
CA01a	<i>Nitzschia palea</i>	99-100 %	37	KU341755.1	<i>Nitzschia palea</i>	98-100 %	104	HF675122
CH02a	<i>Eolimna minima</i>	95-100 %	7	KM084877.1	<i>Eolimna minima</i>	95-97 %	3	KM084939.1
JA01c	<i>Achnanthydium minutissimum</i>	93-100 %	24	KY863464	<i>Achnanthydium minutissimum</i>	97-100 %	15	KY863482.1
JA01b	<i>Sellaphora seminulum</i>	93-100 %	6	KR150677.1	<i>Sellaphora seminulum</i>	95-100 %	4	KM084937.1
JA01a	<i>Sellaphora seminulum</i>	93-100 %	5	KR150677.1	<i>Sellaphora seminulum</i>	95-100 %	4	KM084937.1
SP02a	<i>Nitzschia fonticola</i>	90-98 %	3	AJ867022.1	<i>Nitzschia fonticola</i>	99-100 %	4	HF675068.1

## Conclusiones

Este trabajo pone de relieve la complementariedad de la taxonomía clásica y la basada en códigos de barras genéticos. Las secuencias de referencia presentadas aquí están vinculadas a imágenes morfológicas detalladas, con el fin de iniciar una biblioteca de referencia de códigos de barras para las diatomeas de la región neotropical. Además, este estudio demuestra que sería factible utilizar los datos de códigos de barras ya existentes para diatomeas epilíticas en el biomonitorio de los ecosistemas acuáticos en la región andina ecuatoriana, utilizando herramientas moleculares como el *metabarcoding*.

Con este manual pretendemos animar a los estudiantes, técnicos y científicos ecuatorianos a aislar y obtener nuevos códigos de barras genéticos de las especies de diatomeas epilíticas de la región, para poder crear una base de datos de referencia que nos permita estudiar la biodiversidad de diatomeas y las condiciones ambientales de los cuerpos de agua ecuatorianos. Esto es clave para biomonitorio las comunidades de diatomeas epilíticas de forma eficaz y precisa mediante herramientas moleculares.

## Trayectorias profesionales

### Pablo Castillejo Pons

Sevilla (España), 1977

PhD en Biología, con mención en Biología Molecular

Docente investigador en la Universidad de Las Américas (Quito, Ecuador)

Obras publicadas: <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=56047144600>

Luego de licenciarse en bioquímica por la Universidad de Sevilla, obtuvo un MPhil en la Heriot-Watt University (Reino Unido) por el proyecto «Studies into the location and function of PAP111, a putative membrane protein». En la Universidad Autónoma de Madrid, obtuvo su PhD cum laude por el proyecto de tesis «Dinámica de ORC6 durante el ciclo celular en *Arabidopsis thaliana*».

Trabajó en el proyecto TRANSPLANTA para la caracterización de los factores de transcripción en *Arabidopsis thaliana*, en el Centro de Biología y Genómica de Plantas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), en Madrid.

Investiga la presencia de genes para estudios de biodiversidad y calidad de aguas (unidades operacionales taxonómicas), bioprospección (enzimas de interés biotecnológico) y salud pública (resistencia antibiótica, virulencia, toxinas).

### María Isabel Ballesteros Redondo

Toledo (España), 1975

PhD en Biología, con mención en Genética.

Profesora ayudante doctora en la Universidad Complutense (Madrid, España)

Obras publicadas: <https://orcid.org/0000-0001-6633-3607>

Scopus Author ID: 14036755100

Su línea principal de investigación ha sido la genética molecular de plantas. Dentro de su experiencia investigadora ha trabajado en el Real Jardín Botánico de Madrid, en el Centro Nacional de Biotecnología, en el Departamento de Ciencias Ambientales de la Universidad de Castilla La Mancha y en el Departamento de Tecnología de Alimentos del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Ha sido docente e investigadora en dos universidades de Ecuador: la Universidad Técnica de Cotopaxi y la Universidad de las Américas. En la UDLA fue miembro del Equipo de Investigación en Biodiversidad, Medio Ambiente y Salud (BIOMAS), para el que llevó a cabo trabajos relacionados con la obtención de códigos de barras genéticos de microalgas de cuerpos de agua dulce de Ecuador.

## **Blanca Patricia Ríos Touma**

Quito (Ecuador), 1978

Doctora en Biología

Docente investigadora en la Universidad de las Américas (Quito, Ecuador)

Obras publicadas: <https://scholar.google.com/citations?user= pAbGDBwAAAAJ&hl=en&oi=ao>

Estudió biología en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Realizó sus estudios de maestría y doctorado en la Universitat de Barcelona (UB), España, donde se especializó en ríos tropicales, con énfasis en su biodiversidad y funcionamiento y en el impacto de las actividades humanas en ellos. También realizó un posdoctorado en Funcionamiento de Ríos Altoandinos en un proyecto colaborativo entre la UB y la Universidad San Francisco de Quito. Realizó asimismo una investigación posdoctoral en la Universidad de California, Berkeley, enfocándose en la efectividad ecológica de la restauración de ríos urbanos y paisajes altamente degradados. Su investigación actual se centra en la biodiversidad de ríos, el efecto de la urbanización en los ríos tropicales y la restauración, conservación y regeneración de espacios fluviales. Tiene 21 años de experiencia en el estudio de ríos, además de 35 publicaciones indexadas y capítulos de libros en temas de biodiversidad, ecología y medio ambiente, incluido el índice biótico andino, el índice de calidad biológica de ríos más usado en ríos andinos. Es docente de Ecología en la Universidad de Las Américas y miembro de la Academia de las Ciencias de Ecuador.

## **Sofía Ortiz Cabrera**

Quito (Ecuador), 1999

Ingeniera en Ambientales

Asistente de investigación en proyectos en la Universidad de Las Américas (Quito, Ecuador)

Obras publicadas: Ortiz, S. (2021). *Response of Macroinvertebrate and Epilithic Diatoms Communities to Pollution of Ecuadorian Andean River*. Facultad de Ingeniería Ambiental, Universidad de Las Américas.

Actualmente trabaja para la gestión ambiental de la empresa DIMABRU.

## **Carla Heinrich**

Santa Cruz do Sul (Brasil), 1985

MSc en Biología

Técnica de laboratorio en la Universidade de Santa Cruz do Sul (Brasil)

Obras publicadas: <https://www.researchgate.net/profile/Carla-Heinrich>.

Licenciada en Ciencias Biológicas en la Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC) y magíster en la misma universidad. Obtuvo una Beca de Iniciación Científica PIBIC/CNPq del Laboratorio de Limnología de la UNISC (2011-2016). Allí desarrolló actividades de investigación con enfoque en el seguimiento biológico de los recursos hídricos, utilizando algas diatomeas epilíticas como organismos bioindicadores.

## **Eduardo Alexis Lobo Alcayaga**

Viña del Mar (Chile), 1959

**PhD en Biología**

**Docente Investigador en la Universidade de Santa Cruz do Sul, Brasil**

**Obras publicadas:** [https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\\_sdt=0%2C5&q=eduardo+lobo&btnG=](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=eduardo+lobo&btnG=)

Biólogo egresado de la Universidad de Chile, magíster en Ciencias Biológicas por la Universidad Federal de San Carlos (SP) y PhD en Ciencias Biológicas por la Universidad Marina de Tokio, Ciencias y Tecnología (Japón). En 2000 realizó su posdoctorado en el área de Control de Contaminación Ambiental del Instituto Nacional de Recursos y Medio Ambiente (Tsukuba, Japón). Actualmente es profesor titular e investigador de la Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), y desde 2005 es docente e investigador del Programa de Posgrado en Tecnología Ambiental (Maestría y Doctorado) de la UNISC. Obtuvo una beca de productividad en investigación de CNPq. La limnología se destaca como una de sus principales líneas de investigación, en particular los estudios de monitoreo ambiental (físico, químico y biológico) en cuencas hidrográficas subtropicales y templadas.

# Bibliografía

- Acosta, R., Ríos, B., Rieradevall, M., & Prat, N.** (2009). Propuesta de un protocolo de evaluación de la calidad ecológica de ríos andinos (CERA) y su aplicación a dos cuencas en Ecuador y Perú. *Limnetica*, 28(1), 35–64.
- Apothéloz-Perret-Gentil, L., Cordonier, A., Straub, F., Iseli, J., Esling, P., & Pawlowski, J.** (2017). Taxonomy-free molecular diatom index for high-throughput eDNA biomonitoring. *Molecular Ecology Resources*. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12668>
- Ballesteros, I., Castillejo, P., Haro, A. P., Montes, C., Heinrich, C., & Lobo, E. A.** (2020). *Comptes Rendus Biologies Genetic barcoding of Ecuadorian epilithic diatom species suitable as water quality bioindicators Genetic barcoding of Ecuadorian epilithic diatom species suitable as water quality bioindicators Code-barres génétique des espèces de diatomées épilithiques équatoriennes susceptibles de servir de bioindicateurs de la qualité de l'eau*. 343(1), 41–52. <https://doi.org/10.5802/crbiol.2>
- Bernat, P., & Noga, T.** (2012). Różnorodność zbiorowisk okrzemek potoku Trzcianka. *Rocznik Przemyski*. 47(3): 29–44.
- Bes, D., Ector, L., Torgan, L. C., & Lobo, E. A.** (2012). Composition of the epilithic diatom flora from a subtropical river, Southern Brazil. *Heringia Série Botânica, Porto Alegre*, 1, 93–125.
- Bold, H. C.** (1949). The Morphology of *Chlamydomonas chlamydogama*, Sp. Nov. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 76(2), 101. <https://doi.org/10.2307/2482218>
- Bruder, K., & Medlin, L. K.** (2007). *Molecular assessment of phylogenetic relationships in selected species / genera in the naviculoid diatoms ( Bacillariophyta ). I. The genus Placoneis by. November*. <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2007/0085-0331>
- Castillejo, P., Chamorro, S., Paz, L., Heinrich, C., Carrillo, I., Salazar, J. G., Navarro, J. C., & Lobo, E. A.** (2018). Response of epilithic diatom communities to environmental gradients along an Ecuadorian Andean River. *Comptes Rendus - Biologies*, 341(4), 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2018.03.008>
- Chu, S. P.** (1942). The Influence of the Mineral Composition of the Medium on the Growth of Planktonic Algae: Part I. Methods and Culture Media. *The Journal of Ecology*, 30(2), 284. <https://doi.org/10.2307/2256574>

- Cooper, R. J., Hawkins, E., Locke, J., Thomas, T., & Tosney, J.** (2020). Assessing the environmental and economic efficacy of two integrated constructed wetlands at mitigating eutrophication risk from sewage effluent. *Water and Environment Journal*, 34(4), 669–678. <https://doi.org/10.1111/wej.12605>
- Edwards, K., Johnstone, C., & Thompson, C.** (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 19, Issue 6).
- Farley, M.** (2012) Eutrophication in Fresh Waters: An International Review. En L. Bengtsson, R. W. Herschy, & R. W. Fairbridge R.W. (Eds), *Encyclopedia of Lakes and Reservoirs. Encyclopedia of Earth Sciences Series*. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4410-6\\_79](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4410-6_79)
- Glibert, P. M.** (2017). Eutrophication, harmful algae and biodiversity — Challenging paradigms in a world of complex nutrient changes. *Marine Pollution Bulletin*, 124(2), 591–606. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.04.027>
- Guerrero-Latorre, L., Romero, B., Bonifaz, E., Timoneda, N., Rusiñol, M., Girones, R., & Rios-Touma, B.** (2018). Quito's virome: Metagenomic analysis of viral diversity in urban streams of Ecuador's capital city. *Science of the Total Environment*, 645, 1334–1343. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.213>
- Guillard, R. R. L., & Lorenzen, C. J.** (1972). Yellow-green algae with chlorophyllide C 1, 2. *Journal of Phycology*, 8(1), 10–14. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1972.tb03995.x>
- Guo, L., Sui, Z., Zhang, S., Ren, Y., & Liu, Y.** (2015). Comparison of potential diatom 'barcode' genes (The 18S rRNA gene and ITS, COI, rbcL) and their effectiveness in discriminating and determining species taxonomy in the Bacillariophyta. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(Pt\_4), 1369–1380. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000076>
- Hering, D., Borja, A., Jones, J. I., Pont, D., Boets, P., Bouchez, A., Bruce, K., Drakare, S., Hänfling, B., Kahlert, M., Leese, F., Meissner, K., Mergen, P., Reyjol, Y., Segurado, P., Vogler, A., & Kelly, M.** (2018). Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. *Water Research* (Vol. 138, pp. 192–205). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.003>
- Jones, H.M., Simpson, G.E., Stickle, A.J., & Mann, D.G.** (2005). Life history and systematics of *Petronis* (Bacillariophyta) with special reference to British waters. *European Journal of Phycology*, 40 (1), 61-87. <https://doi.org/10.1080/09670260400024675>
- Kelly, M.** (2016). *Use of the Trophic Diatom Index to Monitor Eutrophication in Rivers The Trophic Diatom Index : a new index for monitoring eutrophication in rivers*. 32, 236–242. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00157-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00157-7)
- Kelly, M., Boonham, N., Juggins, S., Kille, P., Mann, D. G., & Pass, D.** (2018). *A DNA based diatom metabarcoding approach for Water Framework Directive classification of rivers*. Ed. Environment Agency, Bristol.

- Kelly, M. G., Cazaubon, A., Coring, E., Dell'Uomo, A., Ector, I., Goldsmith, B., Guasch, H., Hürlimann, J., Jarlman, A., Kawecka, B., Kwadrans, J., Laugaste, J., Lindstrøm, E. A., Leitao, M., Marvan, P., Padisák, J., Pipp, E., Prygiel, J., Rott, S., Sabater, S., Van Dam, H., & Vizinet, J. (1998). Recommendations for ÁGUA, the routine sampling of diatoms for water quality assessments in Europe. *Journal of Applied Phycology*, 2, 215–224.
- Kelly, M. G., Juggins, S., Mann, D. G., Sato, S., Glover, R., Boonham, N., Sapp, M., Lewis, E., Hany, U., Kille, P., Jones, T., & Walsh, K. (2020). Development of a novel metric for evaluating diatom assemblages in rivers using DNA metabarcoding. *Ecological Indicators*, 118, 106725. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106725>
- Kermarrec, L., Franc, A., Rimet, F., Chaumeil, P., Humbert, J. F., & Bouchez, A. (2013). Next-generation sequencing to inventory taxonomic diversity in eukaryotic communities: A test for freshwater diatoms. *Molecular Ecology Resources*, 13(4), 607–619. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12105>
- Kobayasi, H., & Mayama, S. (1982). Most pollution-tolerant diatoms of severely polluted rivers in the vicinity of Tokyo. *Jap. J. Phycol*, 30, 188–196.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lang, I., & Kaczmarska, I. (2011). A protocol for a single-cell pcr of diatoms from fixed samples: Method validation using *Ditylum brightwellii* (T. West) grunow. *Diatom Research*, 26(1), 43–49. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2011.573703>
- Lecoïnte, C., Coste, M., & Prygiel, J. (1993). “Omnia”: software for taxonomy, calculation of diatom indices and inventories management. *Hydrobiologia*. 269-270. 509-513. 10.1007/BF00028048.
- Le Moal, M., Gascuel-Odoux, C., Ménesguen, A., Souchon, Y., Étrillard, C., Levain, A., Moatar, F., Pannard, A., Souchu, P., Lefebvre, A., & Pinay, G. (2019). Eutrophication: A new wine in an old bottle? *The Science of the total environment*, 651(Pt 1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.139>
- Lobo, E.A., Heinrich, C., Schuch, M., Düpont, A., Costa, A.B., Wetzel, C., & Ector, L. (2016). *Índice trófico da qualidade da água Guia ilustrado para sistemas lóticos subtropicais e temperados Brasileiros*. Santa Cruz do Sul. EDUNISC.
- Lobo, E. A., Schuch, M., Heinrich, C. G., Da Costa, A. Ben, Düpont, A., Wetzel, C. E., & Ector, L. (2015). Development of the Trophic Water Quality Index (TWQI) for subtropical temperate Brazilian lotic systems. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187, 354 (2015). <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4586-3>
- Lobo, E. A., Wetzel, C. E., Schuch, M., & Ector, L. (2014). *Diatomáceas epilíticas como indicadores da qualidade da água em sistemas lóticos subtropicais e temperados brasileiros*. Santa Cruz do Sul. EDUNISC.

- Lobo, E., & Leighton, G.** (1986). Estructuras comunitarias de la fitocenosis planctónicas de los sistemas de desembocaduras de ríos y esteros de la zona central de Chile. *Revista de Biología Marina*, 22, 1–29.
- Ludwig, T. A. V., & Tremarin, P. I.** (2013). *Chave de identificação dos gêneros de diatomáceas (Diatomeae - Ochrophyta) mais comumente encontrados no perifiton e metafiton de ambientes aquáticos continentais.* (A. Schwarzbald, A. L. Burliga, & L. C. Torgan (Eds.)). Ecologia do Perifiton.
- Metzelin, D., & García-Rodríguez, F.** (2003). *Las diatomeas Uruguayas.* DIRAC/ Facultad de ciencias.
- Metzelin, D., & Lange-Bertalot, H.** (2007). *Tropical Diatoms of South America II. Special remarks on biogeographic disjunction.* A.R.G. Gantner Verlag Kommanditgesellschaft.
- Mora, D., Abarca, N., Proft, S., Grau, J. H., Enke, N., Carmona, J., Skibe, O., Jahn, R., & Zimmermann, J.** (2019). Morphology and metabarcoding: a test with stream diatoms from Mexico highlights the complementarity of identification methods. *Freshwater Science*, 38(3), 448–464. <https://doi.org/10.1086/704827>
- Mora, D., Carmona, J., Jahn, R., Zimmermann, J., & Abarca, N.** (2017). Epilithic diatom communities of selected streams from the Lerma-Chapala Basin, Central Mexico, with the description of two new species. *PhytoKeys*, 88, 39–69. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.88.14612>
- Naumann, E.** (1919). Nagra synpunkter angående limnoplanktons okologi med sarskild hansyn till fytoplankton. *Sv. Bot. Tidskr.* 13, 129-163
- Ortiz, S.** (2021). *Response of Macroinvertebrate and Epilithic Diatoms Communities to Pollution of Ecuadorian Andean River.* Facultad de Ingeniería Ambiental. Universidad de Las Américas.
- Paerl, H. W., Otten, T. G., & Joyner, A. R.** (2016). Moving towards adaptive management of cyanotoxin-impaired water bodies. *Microbial Biotechnology*, 9(5), 641–651. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12383>
- Pawlowski, J., Lejzerowicz, F., Apotheloz-Perret-Gentil, L., Visco, J., & Esling, P.** (2016). Protist metabarcoding and environmental biomonitoring: Time for change. *European Journal of Protistology*, 55, 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2016.02.003>
- Pawlowski, J., Kelly-Quinn, M., Altermatt, F., Apotheloz-Perret-Gentil, L., Beja, P., Boggero, A., Borja, A., Bouchez, A., Cordier, T., Domaizon, I., Feio, M. J., Filipe, A. F., Fornari, R., Graf, W., Herder, J., Van der Hoorn, B., Iwan Jones, J., Sagova-Mareckova, M., Moritz, C., et al.** (2018). The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e) DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, 637–638, 1295–1310. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.002>
- Potapova, M. G., & Charles, D. F.** (2002). Benthic diatoms in USA rivers : distributions along spatial and environmental gradients. *Journal of Biogeography*, 167–187.

- Rast, W., Holland, M., & Olof, R. S.** (1989). *Eutrophication: management framework for the policy maker*.
- Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E.** (1996). *Biologia Vegetal* (5th ed.). Guanabara Koogan.
- Reid, M. A., Tibby, J. C., Penny, D., & Gell P. A.** (1995). The use of diatoms to assess past and present water quality. *Austral Ecology* 20(1), 57-64. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1995.tb00522.x>
- Reynolds, C.** (2006). *Ecology of Phytoplankton* (Cambridge University Press (ed.)). Cambridge University Press.
- Rimet, F., Gusev, E., Kahlert, M., Kelly, M. G., Kulikovskiy, M., Maltsev, Y., Mann, D. G., Pfannkuchen, M., Trobajo, R., Vasselon, V., Zimmermann, J., & Bouchez, A.** (2019). Diat.barcode, an open-access curated barcode library for diatoms. *Scientific Reports* 9, 15116. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51500-6>
- Ríos-Touma, B., Acosta, R., & Prat, N.** (2014). The Andean biotic index (ABI): Revised tolerance to pollution values for macroinvertebrate families and index performance evaluation. *Revista de Biología Tropical*, 62, 249–273.
- Rivera, S. F., Vasselon, V., Bouchez, A., & Rimet, F.** (2020). Diatom metabarcoding applied to large scale monitoring networks: Optimization of bioinformatics strategies using Mothur software. *Ecological Indicators*, 109, 105775. <https://doi.org/10.1016/j.ecoind.2019.105775>
- Rolich, G. A.** (1969). Eutrophication: causes, consequences and correctives. *Washington, DC: The National Academies Press*. <https://doi.org/10.17226/20256>.
- Round, F. E.** (1993). *A Review and Methods for the Use of Epilithic Diatoms for Detecting and Monitoring Changes in River Water*. HMSO.
- Rumrich, U., & Lange-Bertalot, H.** (2000). *Diatomeen der Anden. Von Venezuela bis Patagonien/Feuerland*. A.R.G. Gantner Verlag Kommanditgesellschaft.
- Schneider, S., Schranz, C., & Melzer, A.** (2000). Indicating the Trophic State of Running Waters by Submersed Macrophytes and Epilithic Diatoms: Exemplary Implementation of a New Classification of Taxa into Trophic. *Limnologica* 30 (2000) 1-8. [https://doi.org/10.1016/S0075-9511\(00\)80033-X](https://doi.org/10.1016/S0075-9511(00)80033-X)
- Smol, J. P., & Stoermer, E. F.** (2010). *The Diatoms: Applications for Environmental and Earth Sciences* (segunda edición). Cambridge University Press.
- Stoof-Leichsenring, K. R., Epp, L. S., Trauth, M. H., & Tiedemann, R.** (2012). Hidden diversity in diatoms of Kenyan Lake Naivasha: a genetic approach detects temporal variation. *Molecular Ecology*, 21(8), 1918–1930. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05412.x>
- Tundisi, J. G.** (2003). *Água no século XXI: Enfrentando a escassez*.
- Vasselon, V., Bouchez, A., Rimet, F., Jacquet, S., Trobajo, R., Corniquel, M., Tapolczai, K., & Domaizon, I.** (2018). Avoiding quantification

bias in metabarcoding: Application of a cell biovolume correction factor in diatom molecular biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(4), 1060–1069. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12960>

**Vasselon, V., Domaizon, I., Rimet, F., Kahlert, M., & Bouchez, A.** (2017). Application of high-throughput sequencing (HTS) metabarcoding to diatom biomonitoring: Do DNA extraction methods matter? *Freshwater Science*, 36(1), 162–177. <https://doi.org/10.1086/690649>

**Vinçon-Leite, B., & Casenave, C.** (2019). Modelling eutrophication in lake ecosystems: A review. *Science of the Total Environment*, 651, 2985–3001. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.320>

**Vollenweider, R. A.** (1968). Scientific Fundamentals of the Eutrophication of Lakes and Flowing Waters, with Particular Reference to Nitrogen and Phosphorous as Factors in Eutrophication. *Organization for Economic Co-Operation and Development*.

**Ward, J. H.** (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, 301, 236–244.

**Wurtsbaugh, W. A., Paerl, H. W., & Dodds, W. K.** (2019). Nutrients, eutrophication and harmful algal blooms along the freshwater to marine continuum. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water*, 6(5), e1373. <https://doi.org/10.1002/wat2.1373>

**Zimmermann, J., Abarca, N., Enk, N., Skibbe, O., Kusber, W. H., & Jahn, R.** (2014). Taxonomic reference libraries for environmental barcoding: A best practice example from diatom research. *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108793>

**Zimmermann, J., Jahn, R., & Gemeinholzer, B.** (2011). Barcoding diatoms: Evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols. *Organisms Diversity and Evolution*, 11(3), 173–192. <https://doi.org/10.1007/s13127-011-0050-6>

# ANEXOS

## Anexo 1

Modelo de ficha de laboratorio para registro de información referente a la toma de muestras, identificación y conteo

### Ficha de laboratorio: Algas diatomeas epilíticas

#### 1. Punto de muestreo

1.	Código
2.	Punto de muestreo
3.	Curso de agua
4.	Cuenca hidrográfica
5.	Coordenadas UTM
6.	Datos del muestreo
7.	Responsable de la toma de muestras
8.	Condiciones climáticas

#### 2. Preparación de las láminas

1.	Institución
2.	N.º de lámina
3.	Datos de la preparación
4.	Responsable de la preparación

#### 3. Identificación taxonómica y conteo del número de valvas

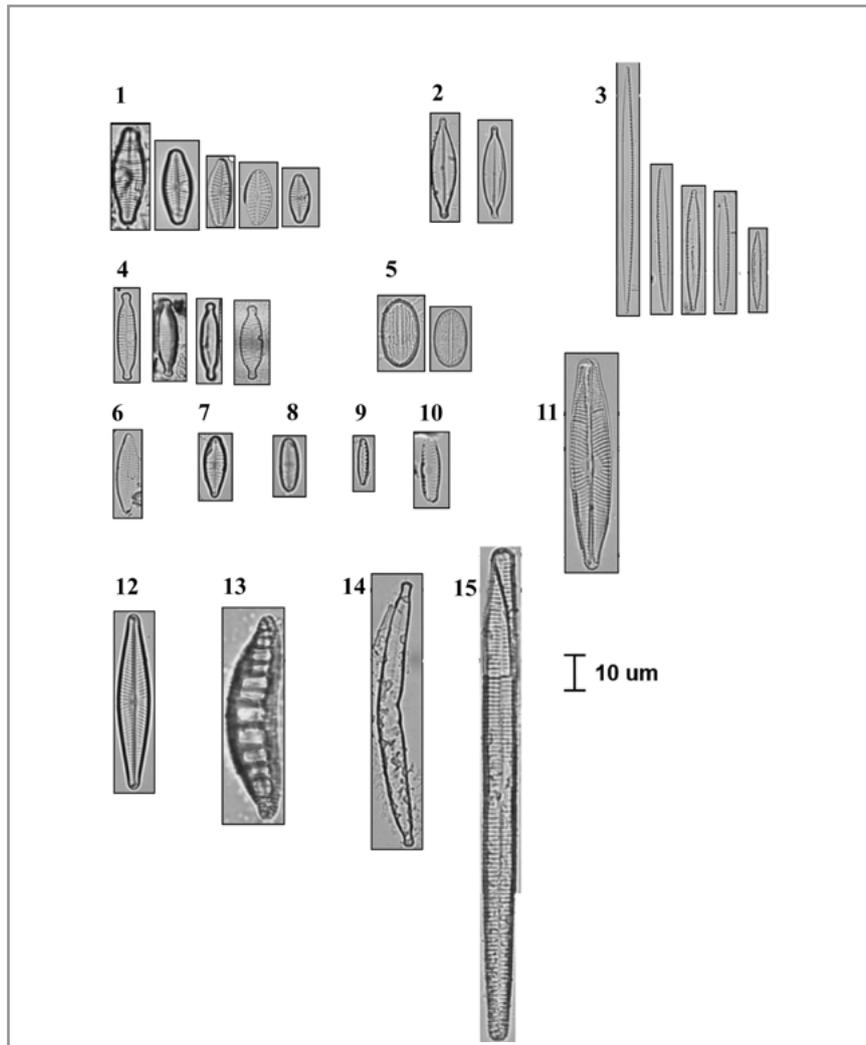
Responsable de la identificación y el conteo
--

Taxón	N.º de valvas

## Anexo 2

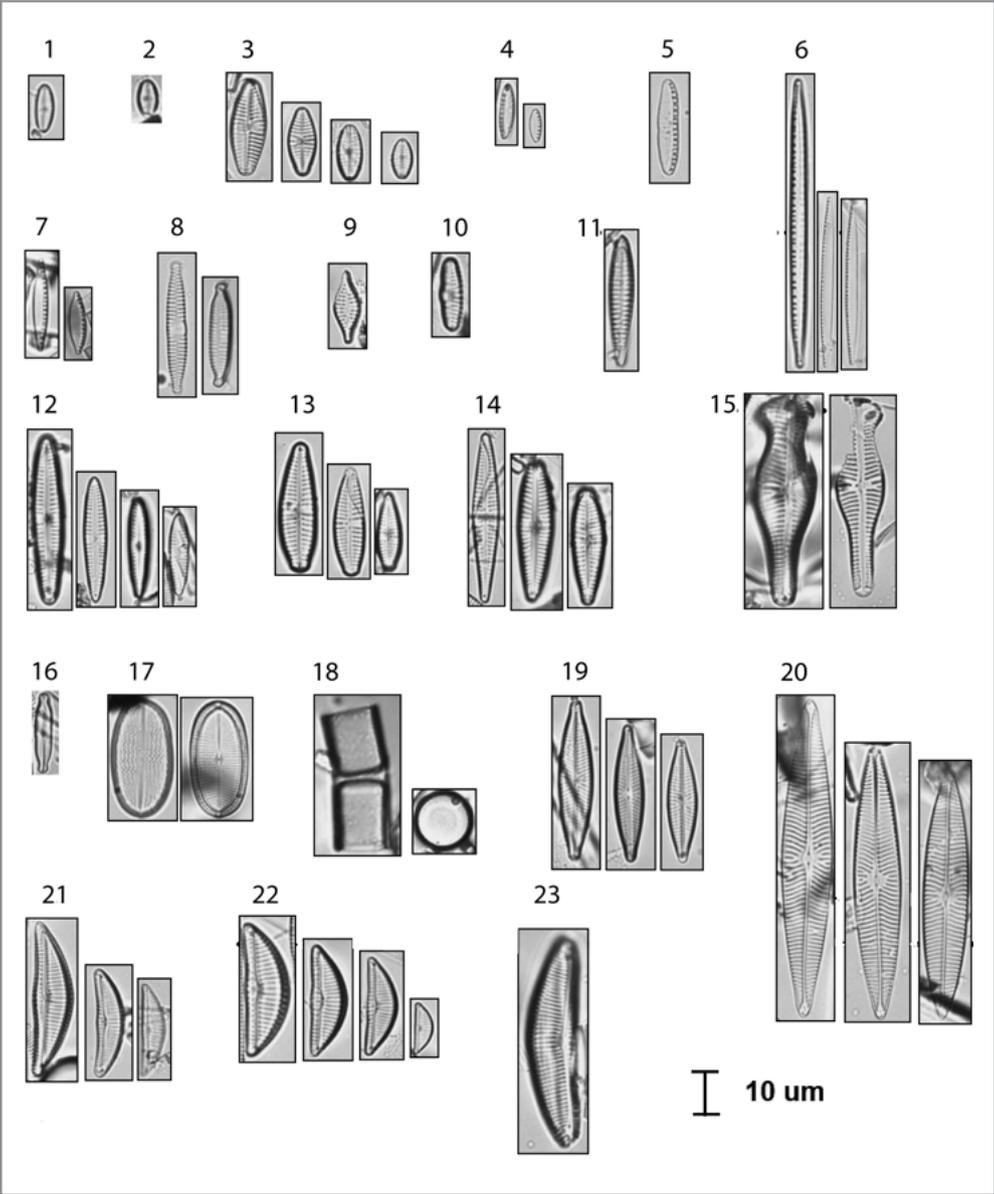
Especies de diatomeas encontradas en los ríos Pita, Santa Clara y San Pedro (cuenca alta del río Guayllabamba)

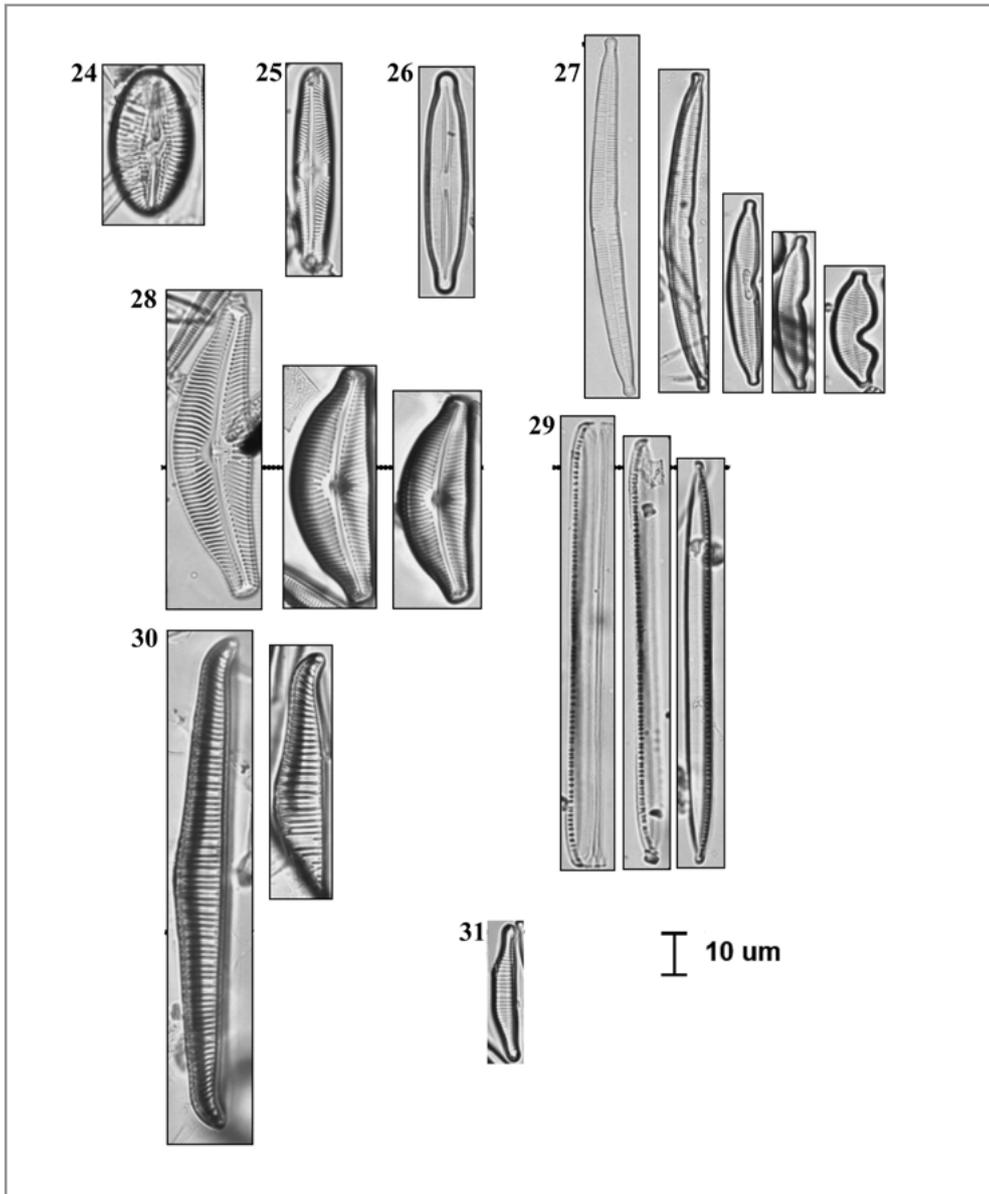
Lámina 1. Especies de diatomeas encontradas en el punto 1.1 PI de la cuenca del río Pita, agosto de 2020



ID	SPECIES	LENGTH (um)	WIDTH (um)
1	<i>Planothidium lanceolatum</i> (Brébisson) Lange-Bertalot	27.37; 22.49; 19.79; 14.29; 14.94;	7.8; 7.3; 5.9; 5.3; 4.9
2	<i>Navicula</i> cf. <i>gregaria</i> Donkin	26.91; 28.36	6.6; 6.2
3	<i>Nitzschia palea</i> (Kützing) W. Smith	73.73; 39.65; 36.92; 34.34; 23.31	2.8; 3; 3.1; 3.5; 2.5
4	<i>Fragilaria recapitellata</i> Lange-Bertalot & Meltzeltin	25.45; 23.29; 22.97; 21.01	4.8; 4.6; 3.9; 6
5	<i>Cocconeis lineata</i> Ehrenberg	19.27; 16.60	9.5; 8.4
6	<i>Navicula cryptotenella</i> Lange-Bertalot	22.14	6.1
7	<i>Gomphonema parvulum</i> (Kützing) Kützing sensu lato	15.82	5.5
8	<i>Sellaphora seminulum</i> (Grunow) D. G. Mann	14.15	4.3
9	<i>Nitzschia soratensis</i> Morales & Vis	13.50	2.6
10	<i>Reimeria sinuata</i> (W. Gregory) Kociolek & Stoermer	18.12	4.3
11	<i>Navicula</i> sp.	58.87	10.2
12	<i>Navicula cryptocephala</i> Kützing	46.81	8.7
13	<i>Epithemia adnata</i> (Kützing) Brébisson	55.01	12.3
14	<i>Fragilaria arcus</i> (Ehrenberg) Cleve	71.50	6.1
15	<i>Ulnaria ulna</i> (Nitzsch) Compère	93.16	133.82

Lámina 2. Especies de diatomeas encontradas en el punto 1.3 PI de la cuenca del río Pita, agosto de 2020

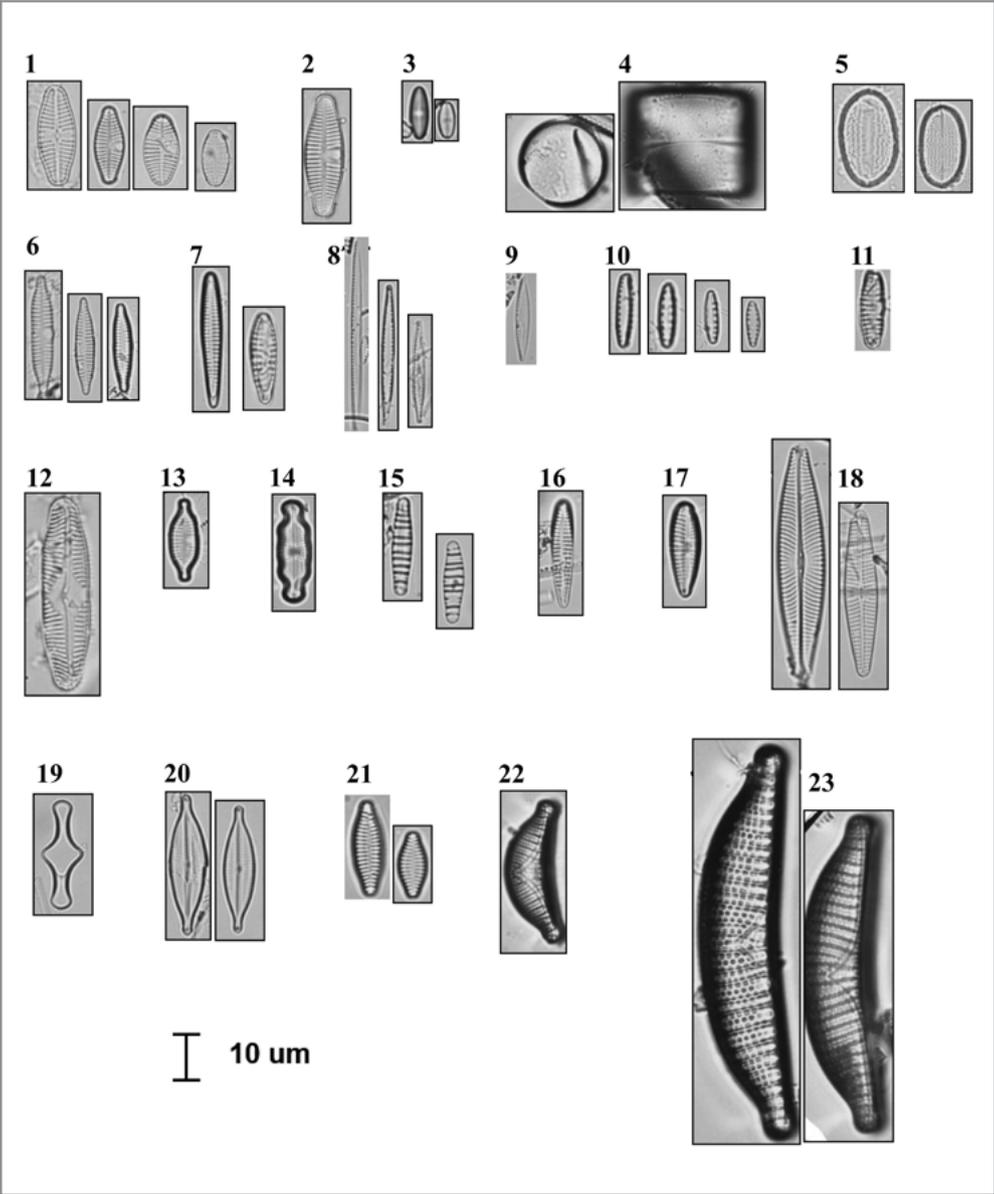




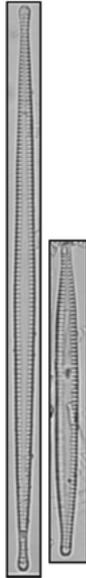
ID	SPECIES	LENGTH (um)	WIDTH (um)
1	<i>Sellaphora seminulum</i> (Grunow) D. G. Mann	11.95	3.5
2	<i>Eolimna</i> sp.	7.87	4.1
3	<i>Planothidium lanceolatum</i> (Brébisson) Lange-Bertalot	22.33; 14.35; 13.47; 11.04	7.1; 5.8; 5; 4.3
4	<i>Nitzschia soratensis</i> Morales & Vis	11.36; 8.40	3.2; 2.6
5	<i>Nitzschia ovalis</i> H. J. Arnott	21.61	4.1
6	<i>Nitzschia palea</i> (Kützing) W. Smith	66.67; 39.55; 38.10	3.1; 2.8; 2.3
7	<i>Nitzschia</i> cf. <i>fonticola</i> (Grunow) Grunow	20.97; 14.99	3; 3.2
8	<i>Fragilaria recapitellata</i> Lange-Bertalot & Meltzeltin	29.02; 23.71	4.1; 4.2
9	<i>Fragilaria martyi</i> (Héribaud-Joseph) Lange-Bertalot	16	5.3
10	<i>Reimeria sinuata</i> var. <i>sinuata</i> (W. Gregory) Kociolek & Stoermer	15.31	4.8
11	<i>Rhoicosphenia abbreviata</i> (C. Agardh) Lange-Bertalot	30.75	4.6
12	<i>Gomphonema pumilum</i> var. <i>rigidum</i> E. Reichardt & Lange-Bertalot	37.83; 29.73; 21.23; 18.35	6.1; 4.9; 4.1; 4.3
13	<i>Gomphonema parvulum</i> (Kützing) Kützing sensu lato	29.61; 21.86; 17.51	7.9; 6; 5
14	<i>Gomphonema</i> sp.	34.78; 32.10; 26.23	5.7; 7.2; 7.1
15	<i>Gomphonema truncatum</i> Ehrenberg	46.57; 46.28	13.4; 10.6
16	<i>Achnantheidium minutissimum</i> (Kützing) Czarnecki	18.07	3.1
17	<i>Cocconeis lineata</i> Ehrenberg	27; 26	13.7; 12.2

18	<i>Melosira varians</i> C. Agardh	28 (D=13.88)	11.2
19	<i>Navicula cryptocephala</i> Kützing	37.77; 32.93; 27.80	7.1; 5.9; 6.2
20	<i>Navicula radiosa</i> Kützing	71.83; 62.96; 57.32	11.2; 10.1; 9.7
21	<i>Encyonema lange-bertalotii</i> Krammer	36.91; 24.69; 21.60	13.2; 10.6; 4.7
22	<i>Encyonema silesiacum</i> var. <i>altensis</i> Krammer	30.58; 25.11; 23.54; 11.90	9.4; 7.2; 6.1; 3.8
23	<i>Encyonema</i> sp.	48.16	9.8
24	<i>Diploneis ovalis</i> (Hilse) Cleve	35.93	18.7
25	<i>Pinnularia microstauron</i> var. <i>angusta</i> Krammer	49.61	8.2
26	<i>Sellaphora bacillum</i> (Ehrenb.) D.G.Mann	53.09	9.5
27	<i>Fragilaria arcus</i> (Ehrenberg) Cleve	86.91; 77.40; 46.57; 38.82; 28.67	6.1; 12.1; 12.9; 11.7; 18.3
28	<i>Cymbella tumida</i> (Brébisson) Van Heurck	70; 58.32; 49.90	19.2; 18.5; 15.3
29	<i>Nitzschia linearis</i> (C. Agardh) W. Smith	104.27; 101.49; 95.75	6.1; 4.4; 5.8
30	<i>Rhopalodia gibberula</i> Mereschkowsky	126.98; 58.96	10.8; 11.2
31	<i>Eunotia andinofrequens</i> Lange-Bertalot & U.Rumrich	35.77	4.3

Lámina 3. Especies de diatomeas encontradas en el punto 1.4 PI de la cuenca del río Pita, agosto de 2020



24



25



10 um

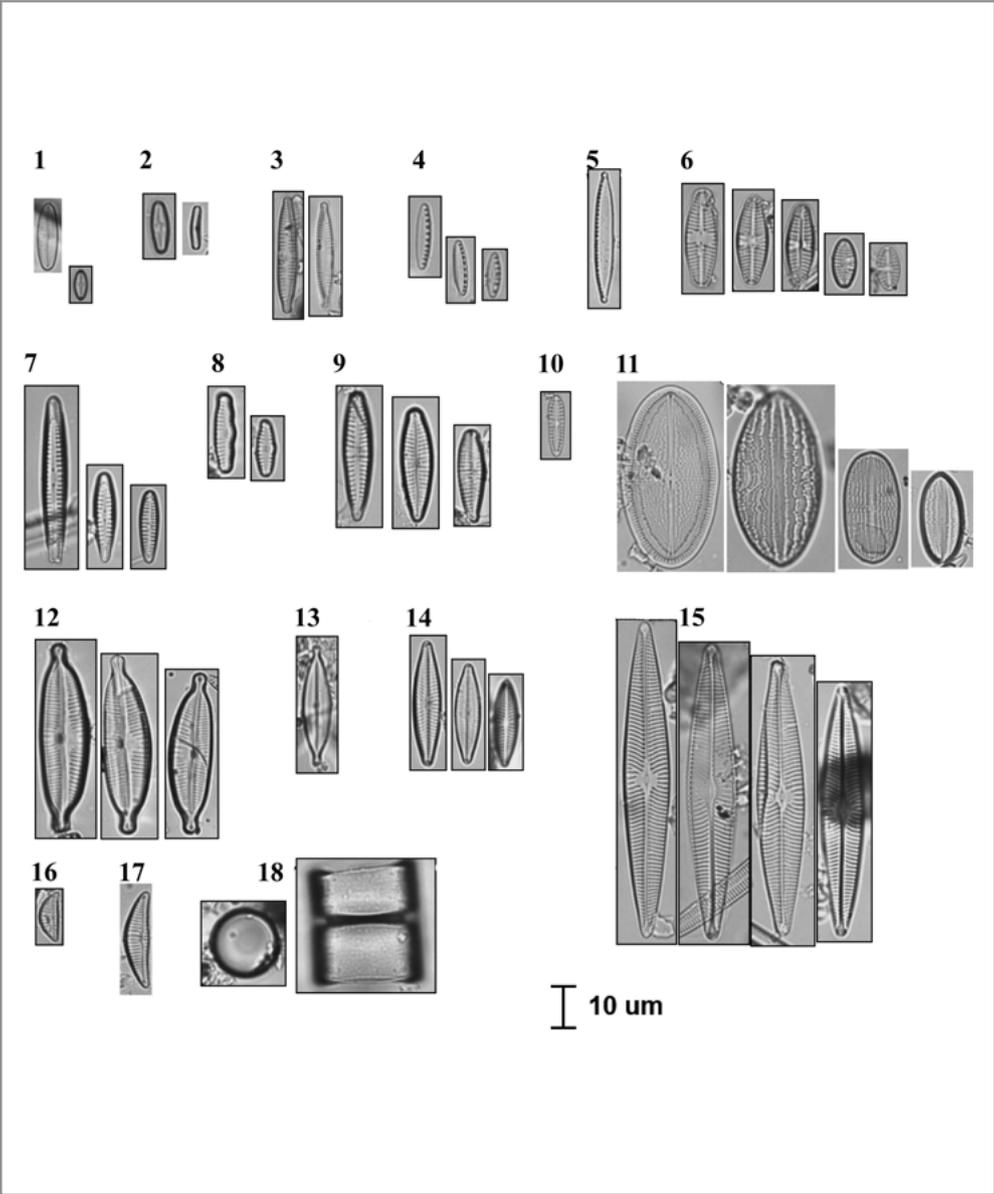
26

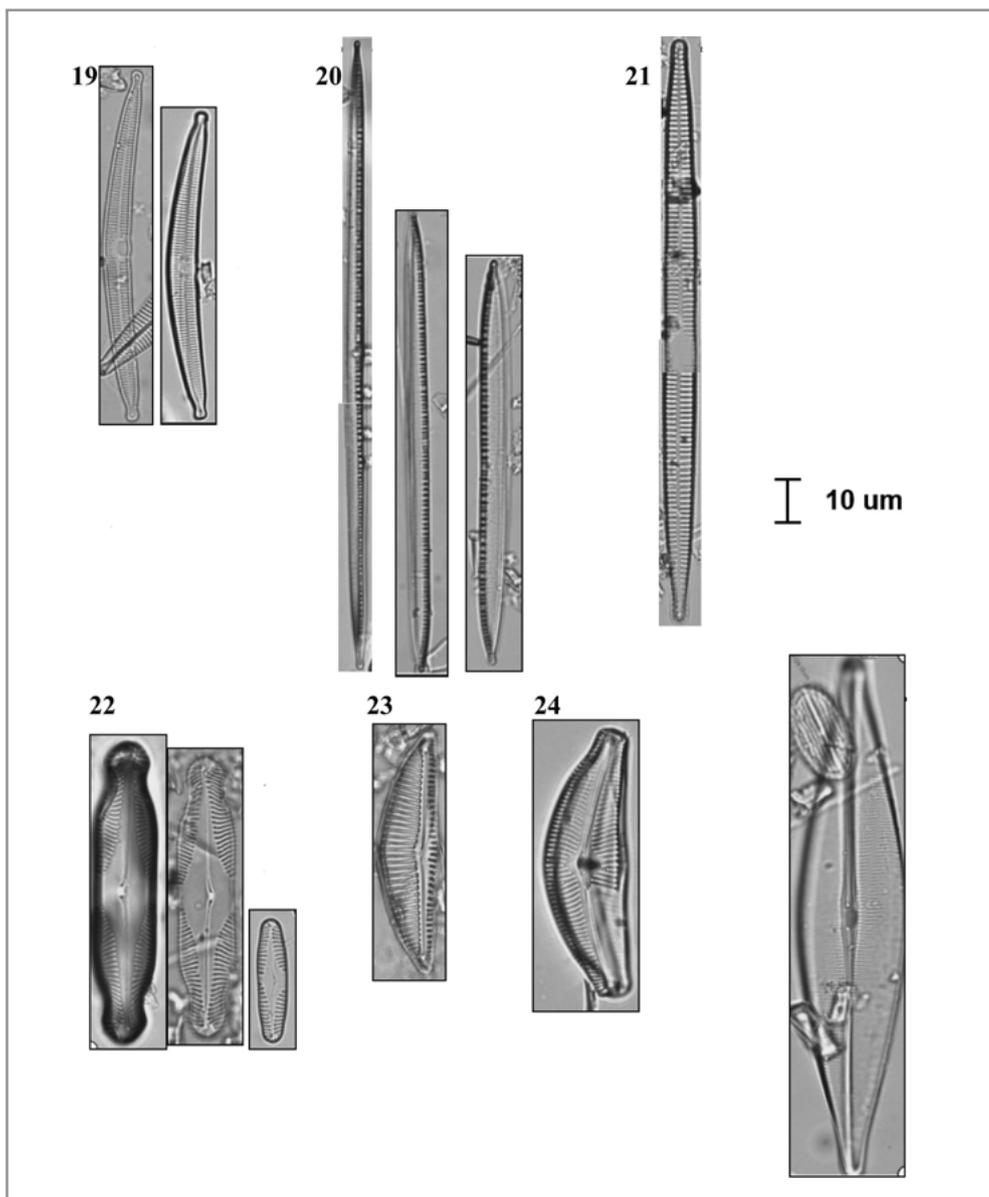


ID	SPECIES	LENGTH (um)	WIDTH (um)
1	<i>Planothidium lanceolatum</i> (Brébisson) Lange-Bertalot	22.18; 16.76; 16.2; 12.98	7.9; 6.1; 7.2; 5.2
2	<i>Planothidium</i> sp.	28.28	8.2
3	<i>Sellaphora seminulum</i> (Grunow) D. G. Mann	12.58; 8.21	3.2; 2.5
4	<i>Melosira varians</i> C. Agardh	24.77 (D=19.18)	26.7
5	<i>Cocconeis lineata</i> Ehrenberg	20.21; 18.05	11.9; 8.7
6	<i>Fragilaria vaucheriae</i> (Kützing) J.B.Petersen	27.28; 22.85; 20.96	4.7; 3.9; 3.7
7	<i>Rhoicosphenia abbreviata</i> (C. Agardh) Lange-Bertalot	24.33; 17.86	4.3; 5.1
8	<i>Nitzschia</i> sp.	43.61; 33.03; 24.25	2; 2.1; 2.3
9	<i>Nitzschia</i> cf. <i>fonticola</i> (Grunow) Grunow	19.39	2.7
10	<i>Nitzschia inconspicua</i> Grunow	17.06; 15; 1 1.56; 9.80	2.8; 2.8; 2.1; 2.2
11	<i>Reimeria sinuata</i> var. <i>sinuata</i> (W. Gregory) Kociolek & Stoermer	13.13	4.8
12	<i>Pinnularia microstauron</i> var. <i>angusta</i> Krammer	43.03	9.8
13	<i>Fragilaria recapitellata</i> Lange-Bertalot & Meltzeltin	18.15	6.1
14	<i>Luticola mollis</i> Lange-Bertalot & U.Rumrich	21.06	7.2
15	<i>Diatoma moniliformis</i> (Kützing) D.M Williams	20.22; 18.92	4; 4.1
16	<i>Gomphonema pumilum</i> var. <i>rigidum</i> E. Reichardt & Lange-Bertalot	24.33	4.3
17	<i>Gomphonema parvulum</i> (Kützing) Kützing sensu lato	21.13	11.2
18	<i>Navicula</i> sp.	53.90; 37.37	10.1; 6.2
19	<i>Tabellaria flocculosa</i> (Roth) Kützing	24.31	8.2

20	<i>Navicula cf. gregaria</i> Donkin	29.52; 28.94	8; 6.7
21	<i>Fragilaria cf. leptostauron</i> (Ehrenberg) Hustedt	20.70; 14.87	6.1; 5.8
22	<i>Epithemia sorex</i> Kützing	32.95	8.7
23	<i>Epithemia turgida</i> (Ehrenberg) Kützing	87.75; 70.93	14; 12.4
24	<i>Fragilaria tenera</i> (W. Smith) Lange-Bertalot	113.93; 63.35	3.9; 4.1
25	<i>Rhopalodia gibberula</i> Mereschkowsky	43.25	12.3
26	<i>Ulnaria ulna</i> (Nitzsch) Compère	172.09; 128.98; 125.1	7.5; 7.9; 7.9

Lámina 4. Especies de diatomeas encontradas en el punto 2.1 PI de la cuenca del río Pita, agosto de 2020

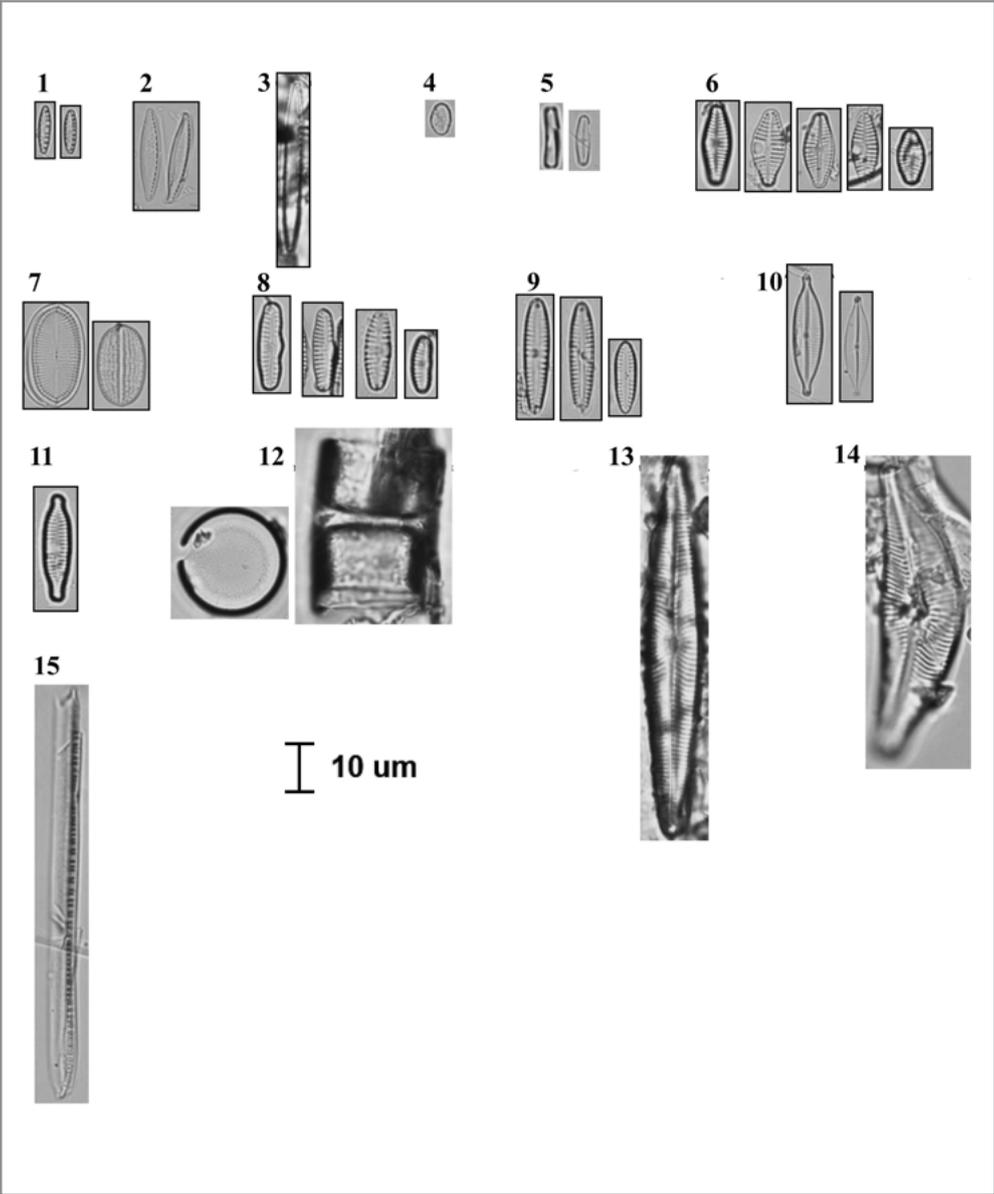




ID	SPECIES	LENGTH (um)	WIDTH (um)
1	<i>Sellaphora seminulum</i> (Grunow) D. G. Mann	18; 7.67	4.1; 2.8
2	<i>Achnantheidium minutissimum</i> (Kützing) Czarnecki	12; 10.08	1.6
3	<i>Fragilaria vaucheriae</i> (Kützing) J.B. Petersen	28.39; 26.58	4.7; 3.9
4	<i>Nitzschia soratensis</i> Morales & Vis	16.23; 13.68; 11.44	3; 2.8; 3.1
5	<i>Nitzschia palea</i> (Kützing) W. Smith	33.47	4
6	<i>Planothidium lanceolatum</i> (Brébisson) Lange-Bertalot	23.76; 21.63; 19.61; 12.49; 10.50	7.1; 7.3; 6.2; 5.1; 5.2
7	<i>Rhoicosphenia abbreviata</i> (C. Agardh) Lange-Bertalot	40.14; 21.87; 18.84	5.1; 4.8; 4.1
8	<i>Reimeria sinuata</i> var. <i>sinuata</i> (W. Gregory) Kociolek & Stoermer	20.07; 13.37	5; 4.1
9	<i>Gomphonema parvulum</i> (Kützing) Kützing sensu lato	29.90; 26.99; 23.69	6.1; 7.1; 7
10	<i>Gomphonema pumilum</i> var. <i>rigidum</i> E. Reichardt & Lange-Bertalot	15.86	3.7
11	<i>Cocconeis lineata</i> Ehrenberg	45.73; 42.81; 28.57; 21.97	22.1; 19.9; 13.2; 9.8
12	<i>Cymbella naviculiformis</i> (Auerswald) Krammer	47.61; 41.95; 40.20	10.8; 10.7; 10
13	<i>Navicula</i> cf. <i>gregaria</i> Donkin	30.57	6.7
14	<i>Navicula cryptotenella</i> Lange-Bertalot	29.93; 24.18; 22.43	6; 6.1; 5.3

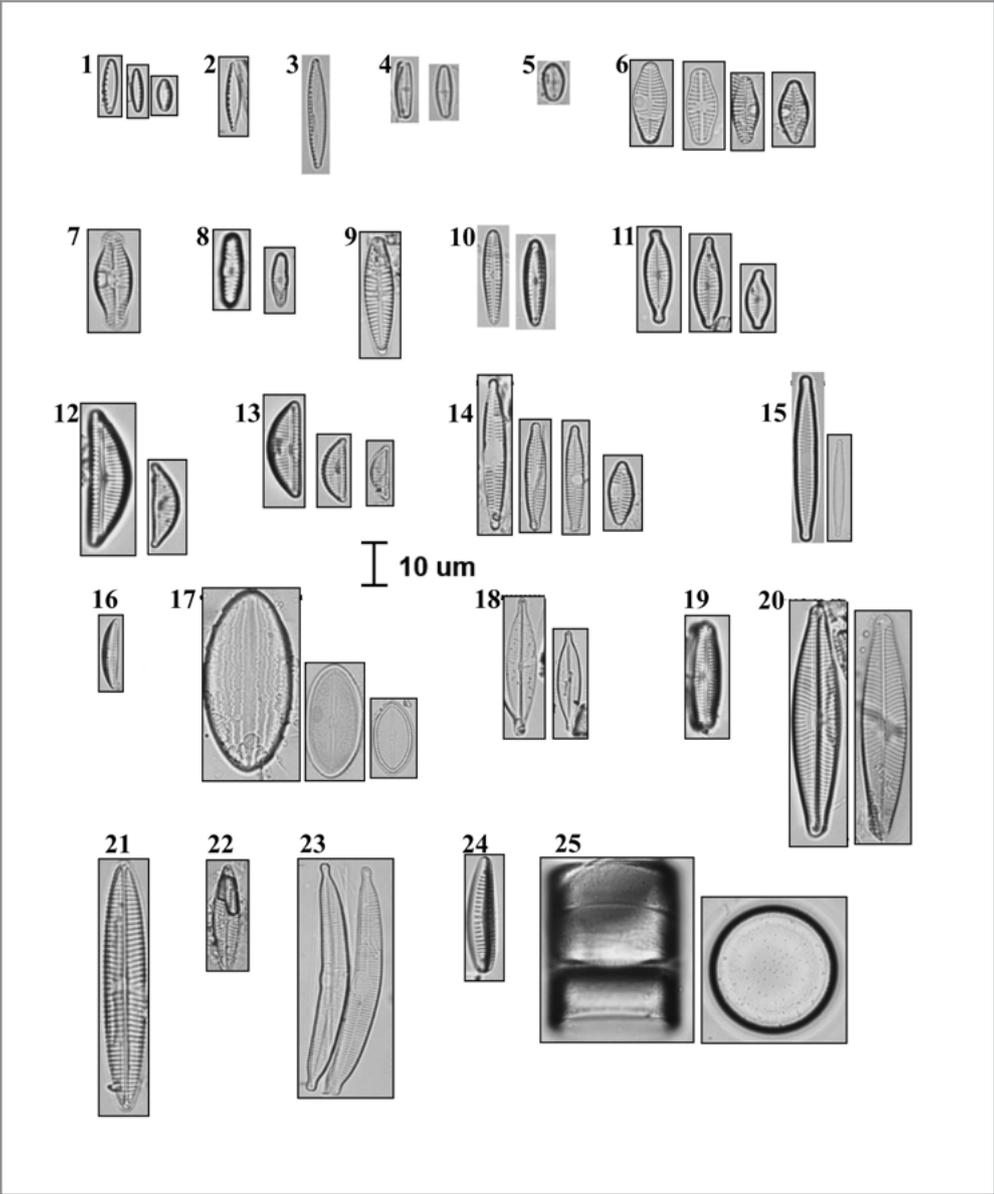
15	<i>Navicula radiosa</i> Kützing	79.12; 1.08; 68.34; 62.76	10.3; 11; 11.1; 9.2
16	<i>Encyonema minutum</i> (Hilse) D. G. Mann	12.94	4.7
17	<i>Encyonema</i> sp.	24.37	5.5
18	<i>Melosira varians</i> C. Agardh	29.37 (D=16.31)	23.4
19	<i>Fragilaria arcus</i> (Ehrenberg) Cleve	83.17; 71.87	5.9; 5.3
20	<i>Nitzschia linearis</i> (C. Agardh) W. Smith	157.41; 119.94; 95.36	3.2; 4.8; 5
21	<i>Ulnaria ulna</i> (Nitzsch) Compère	148.37	6.9
22	<i>Pinnularia microstauron</i> (Ehrenb.) Cleve	72.29; 65.48; 29.09	13.1; 12.8; 11.2
23	<i>Ecyonema chilense</i> Krammer	57.94	14.3
24	<i>Cymbella tumida</i> (Brébisson) Van Heurck	61.34	18.3
25	<i>Frustulia corneliae</i> H. Lange-Bertalot & Rumrich	124.16	20.08

Lámina 5. Especies de diatomeas encontradas en el punto 3.2 PI de la cuenca del río Pita, agosto de 2020



ID	SPECIES	LENGTH (um)	WIDTH (um)
1	<i>Nitzschia soratensis</i> Morales & Vis	10.51; 9.96	2.6; 2.6
2	<i>Nitzschia</i> cf. <i>fonticola</i> (Grunow) Grunow	20.63; 22.15	4.1; 3.7
3	<i>Nitzschia palea</i> (Kützing) W. Smith	36.31	3
4	<i>Eolimna</i> sp.	6.76	5.3
5	<i>Achnanthydium minutissimum</i> (Kützing) Czarnecki	13.47; 9.60	2.3
6	<i>Planothydium frequentissimum</i> (Lange-Bertalot) Lange-Bertalot	16.88; 16.56; 15.77; 14.29; 12.04	5; 6.2; 5.8; 5; 4.8
7	<i>Cocconeis lineata</i> Ehrenberg	19.82; 17.03	9.7; 9.2
8	<i>Reimeria sinuata</i> var. <i>sinuata</i> (W. Gregory) Kociolek & Stoermer	17.02; 15.09; 15.17; 12.75	4.1; 4.8; 5.1; 3.2
9	<i>Gomphonema pumilum</i> var. <i>rigidum</i> E. Reichardt & Lange-Bertalot	22.42; 21.87; 14.18	4.9; 5; 4.1
10	<i>Navicula</i> cf. <i>gregaria</i> Donkin	26.04; 23.78	5.8; 5
11	<i>Fragilaria recapitellata</i> Lange-Bertalot & Meltzeltin	21	5.1
12	<i>Melosira varians</i> C. Agardh	34.44 (D=21.09)	21.3
13	<i>Navicula radiosa</i> Kützing	81.37	11.1
14	<i>Cymbella tumida</i> (Brébisson) Van Heurck	63.22	16.1
15	<i>Nitzschia linearis</i> (C. Agardh) W. Smith	86.59	7.22

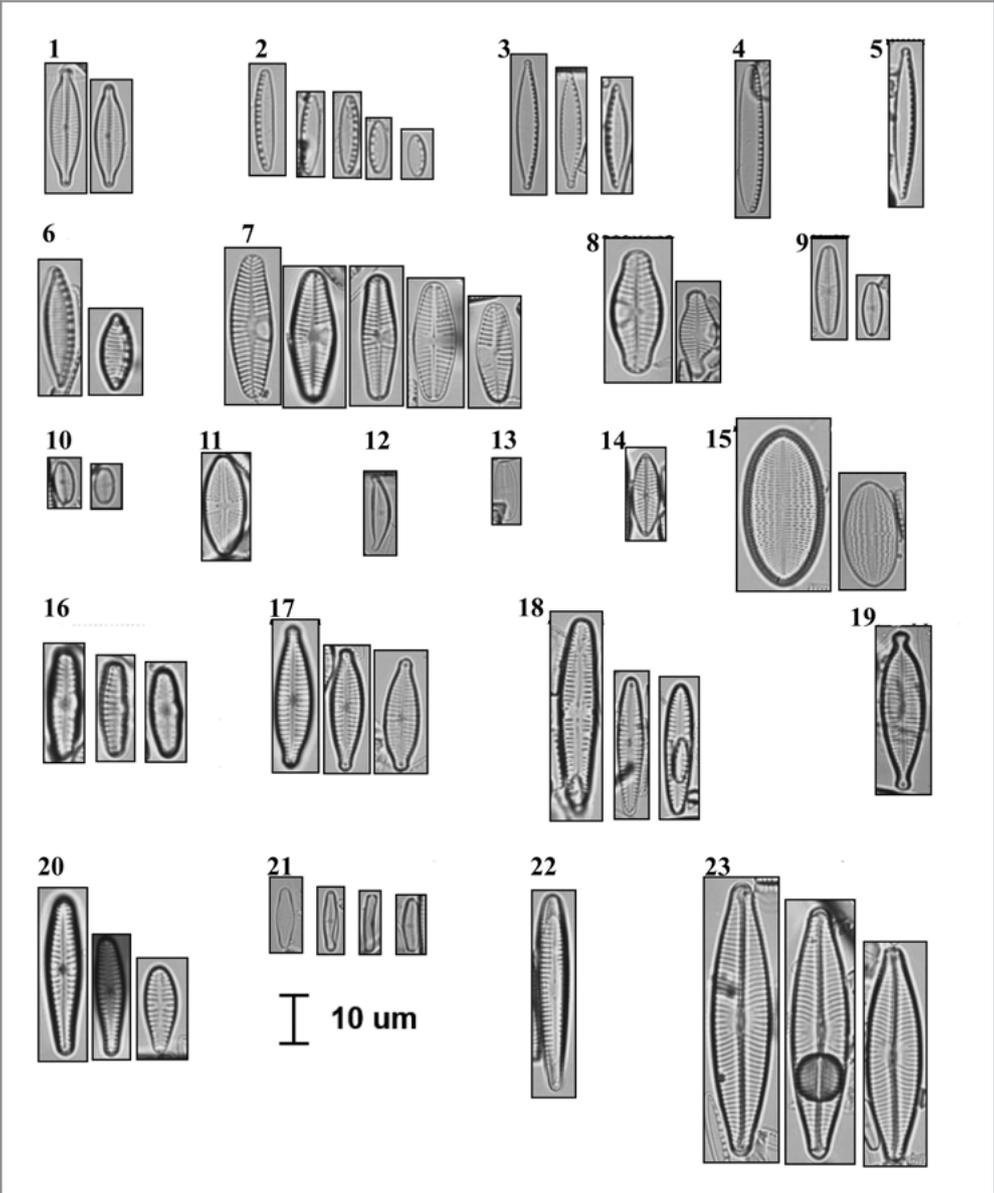
Lámina 6. Especies de diatomeas encontradas en el punto 3.4 PI de la cuenca del río Pita, agosto de 2020

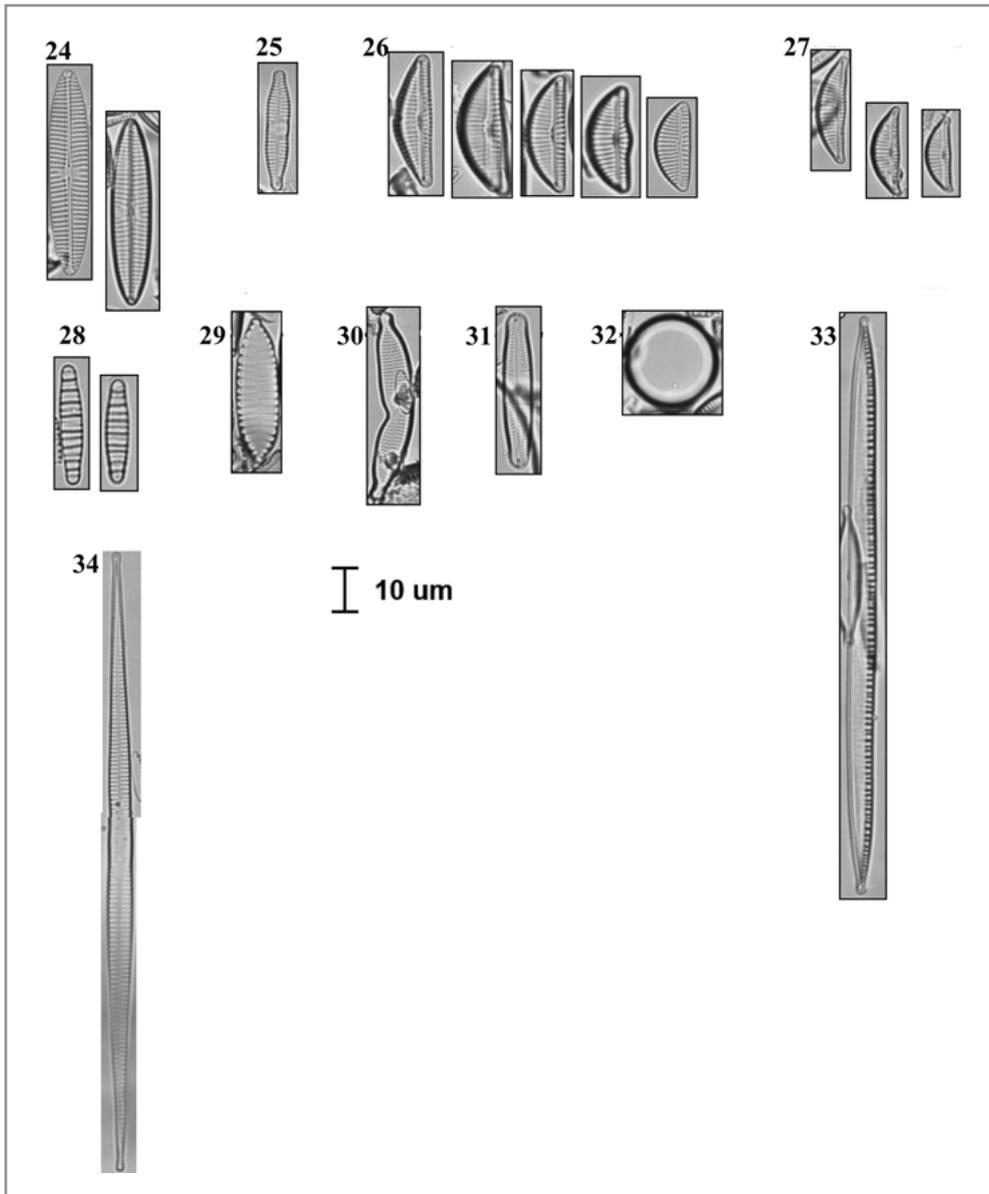


ID	SPECIES	LENGTH (um)	WIDTH (um)
1	<i>Nitzschia soratensis</i> Morales & Vis	13.56; 10.30; 7.16	2.9; 2; 3.1
2	<i>Nitzschia cf. fonticola</i> (Grunow) Grunow	18.59	2.8
3	<i>Nitzschia palea</i> (Kützing) W. Smith	24.36	4
4	<i>Achnantheidium minutissimum</i> (Kützing) Czarnecki	12.90; 10.31	3.1; 2.9
5	<i>Eolimna sp.</i>	7.38	4.2
6	<i>Planothidium lanceolatum</i> (Brébisson) Lange-Bertalot	19.52; 16.19; 15.68; 15.48	7.1; 6.7; 5.5; 6.2
7	<i>Planothidium cf. biporumum</i> (M.H.Hohn & Helleman) Lange-Bertalot	21.19	8.1
8	<i>Reimeria sinuata</i> var. <i>sinuata</i> (W. Gregory) Kociolek & Stoermer	16.50; 13.54	4.2; 3.3
9	<i>Rhoicosphenia abbreviata</i> (C. Agardh) Lange-Bertalot	27.48	6.1
10	<i>Gomphonema pumilum</i> var. <i>rigidum</i> E. Reichardt & Lange-Bertalot	22.41; 20.53	4; 4.9
11	<i>Gomphonema lagenula</i> Kützing	22.87; 22.49; 13.54	5.4; 5.9; 5.1
12	<i>Encyonema lange-bertalotii</i> Krammer	32.76; 20.06	8.8; 5.4
13	<i>Encyonema minutum</i> (Hilse) D. G. Mann	23.51; 15.81; 12.41	5.3; 5.1; 3.9
14	<i>Fragilaria recapitellata</i> Lange-Bertalot & Meltzeltin	33.67; 28.38; 27.64; 14.36	4.8; 4.1; 4; 5.1
15	<i>Fragilaria capucina</i> Desmazières	23.91	2.1
16	<i>Amphora copulata</i> (Kützing) Schoeman & R.E.M. Archibald	16.60	3.2

17	<i>Cocconeis lineata</i> Ehrenberg	42.53; 26.55; 16.76	19.2; 12.3; 7.7
18	<i>Navicula</i> cf. <i>gregaria</i> Donkin	32.14; 24.45	6.8; 5
19	<i>Pinnularia microstauron</i> var. <i>angusta</i> Krammer	25.37	5.3
20	<i>Navicula lanceolata</i> Ehrenberg	55.39; 54.53	10.2; 9.9
21	<i>Navicula tripunctata</i> (O.F. Müller) Bory	50.68	8.9
22	<i>Navicula cryptotenella</i> Lange-Bertalot	23.88	5.8
23	<i>Fragilaria arcus</i> (Ehrenberg) Cleve	55.74	5.9; 5.1
24	<i>Eunotia</i> sp.	26.19	
25	<i>Melosira varians</i> C. Agardh	42.70 (D=29.18)	23.5

Lámina 7. Especies de diatomeas encontradas en el punto SC1 de la cuenca del río Santa Clara, agosto de 2020

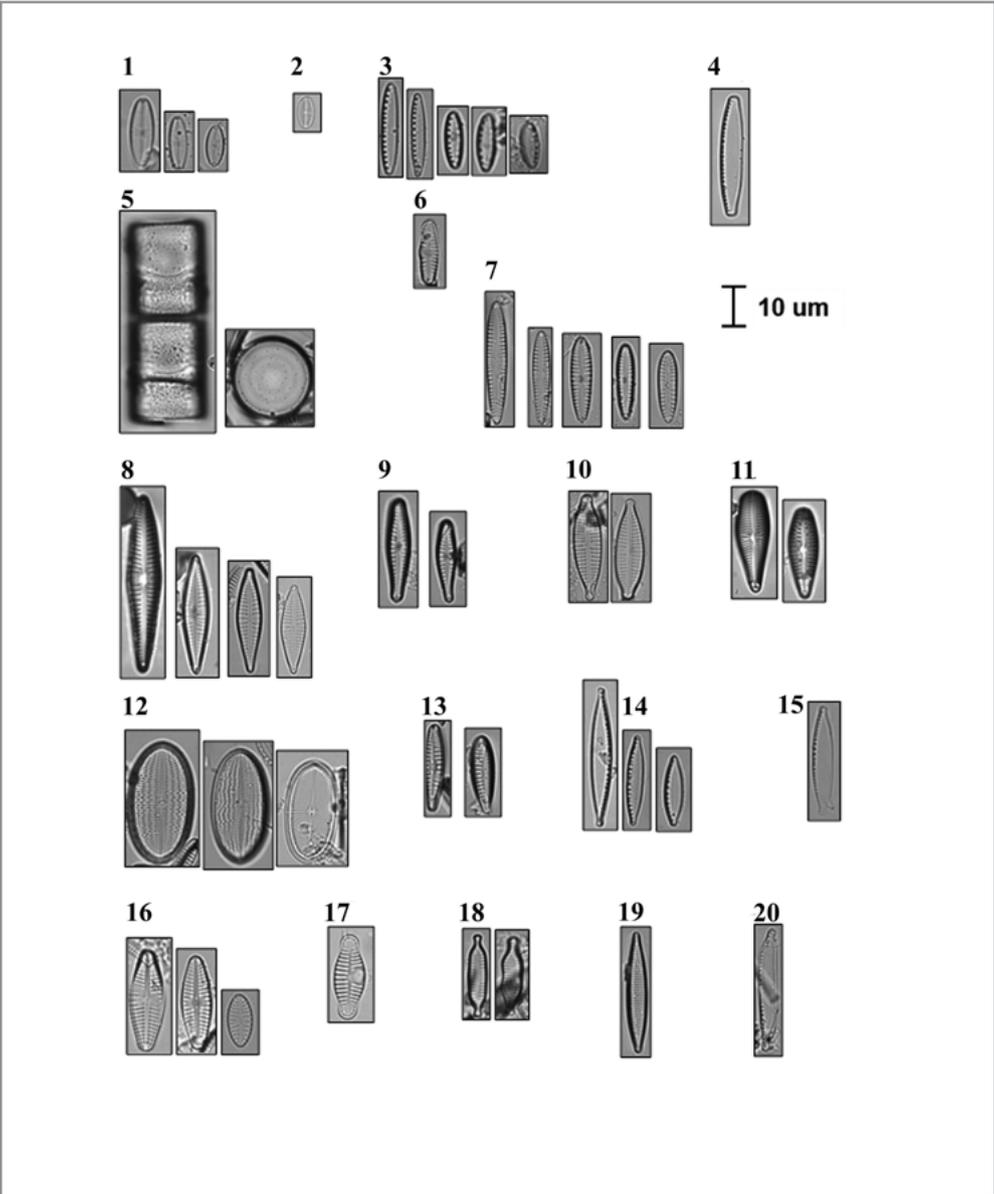


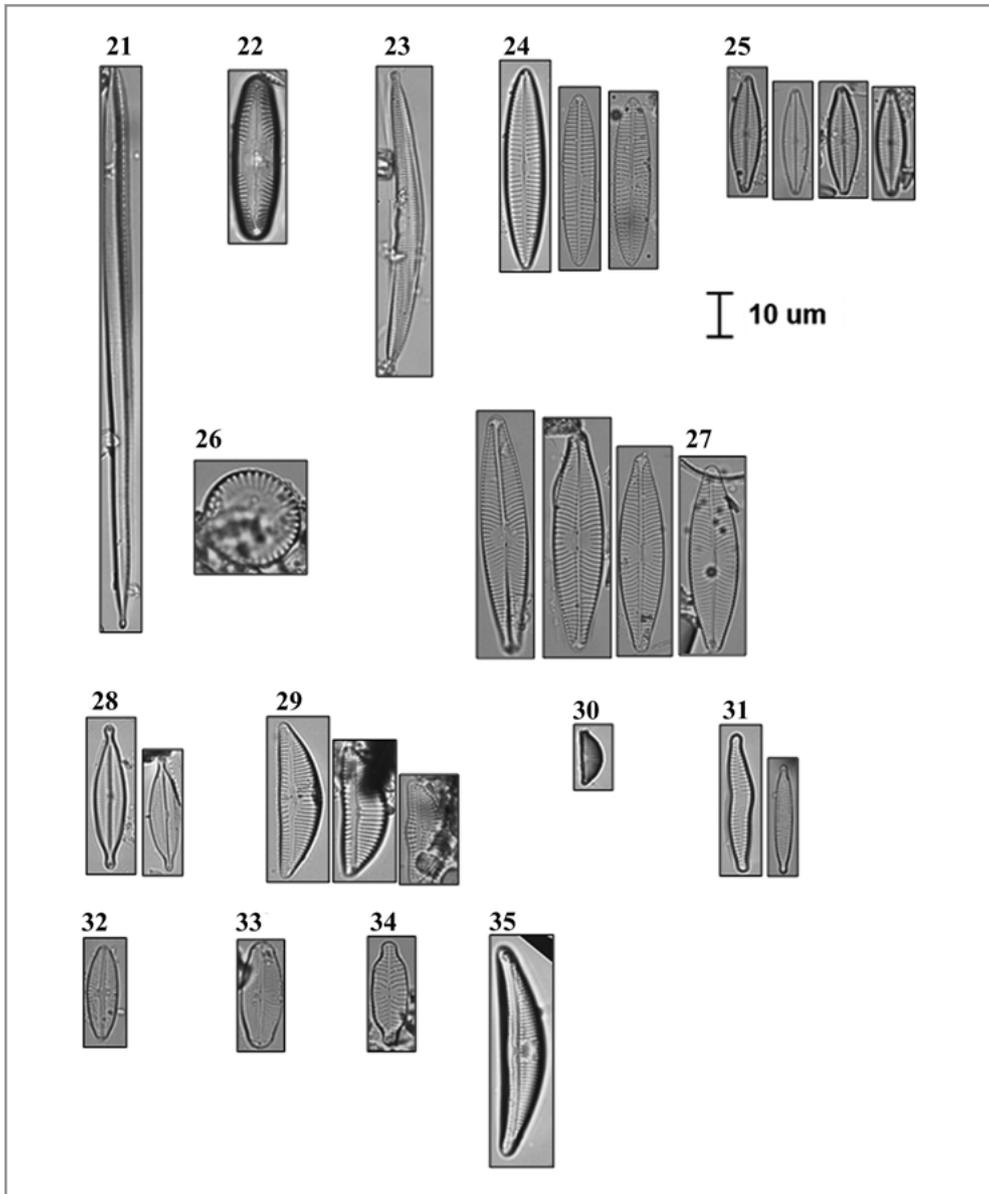


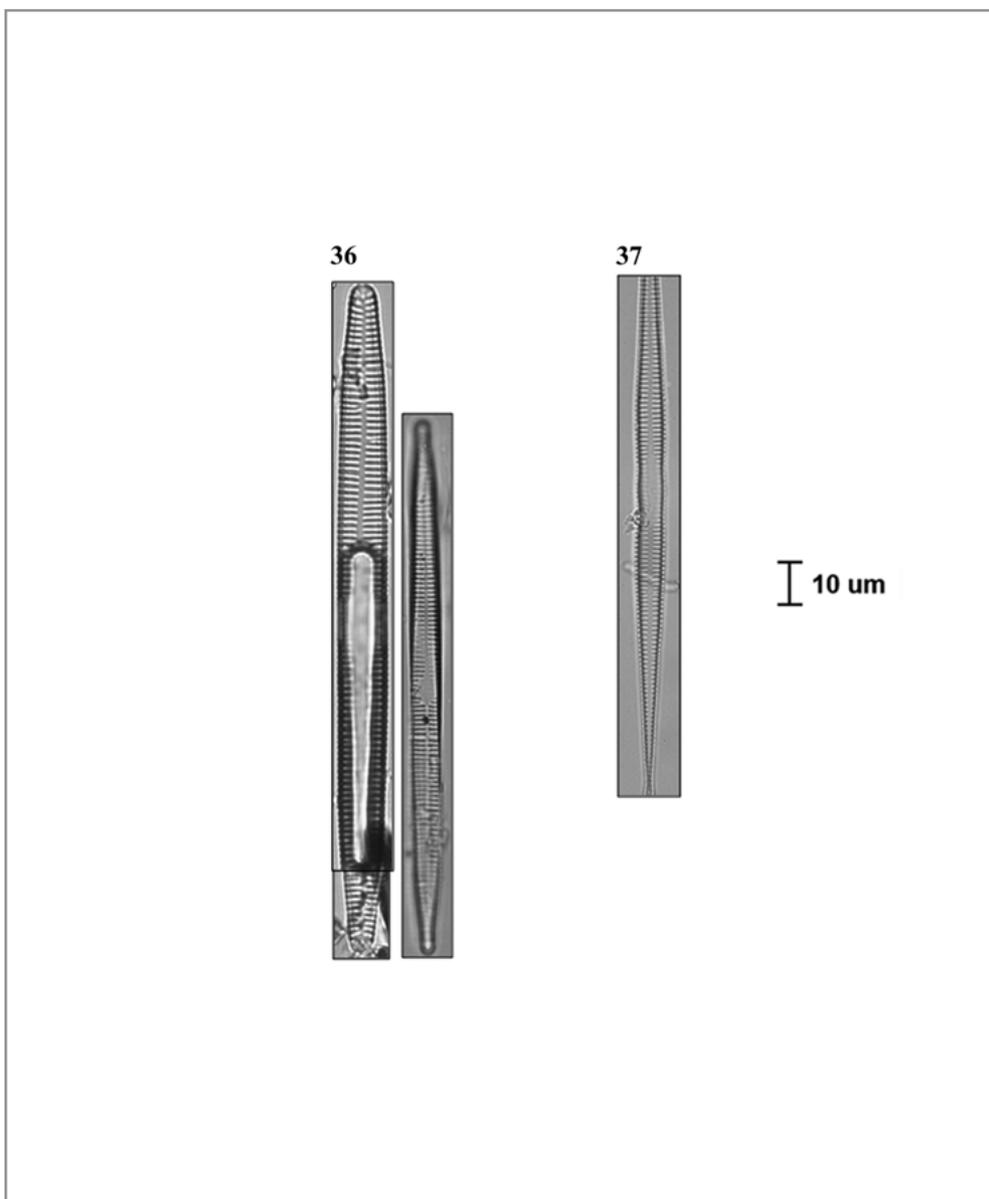
ID	SPECIES	LENGTH (um)	WIDTH (um)
1	<i>Navicula cf. gregaria</i> Donkin	23.98; 19.47	6.1, 5.8
2	<i>Nitzschia soratensis</i> Morales & Vis	20; 14.96; 14.86 10.51; 8.17	3.5; 3.9; 3.3 3.1; 3.2
3	<i>Nitzschia cf. fonticola</i> (Grunow) Grunow	26.06; 24.2; 18.36	4.1; 4; 3.8
4	<i>Nitzschia ovalis</i> H.J.Arnott	29.77	4.8
5	<i>Nitzschia palea</i> (Kützing) W. Smith	29.63	3.8
6	<i>Nitzschia amphibia</i> Grunow	25.30; 14.71	5.5; 5.3
7	<i>Planothidium lanceolatum</i> (Brébisson) Lange-Bertalot	27.19; 25.37; 24; 23.23; 18.33	7.8; 8.1; 6.7; 7.9; 7.2
8	<i>Planothidium cf. biporumum</i> (M.H.Hohn & Hellerman) Lange-Bertalot	24.50; 16.53	7; 7
9	<i>Sellaphora seminulum</i> (Grunow) D. G. Mann	17.76; 10.79	4.1; 3.2
10	<i>Eolimna</i> sp.	8.02; 6.75	3.1; 3.3
11	<i>Luticola goeppertiana</i> (Bleisch) D.G.Mann	19.97	8.7
12	<i>Halamphora montana</i> (Krasske) Levkov	16	3.1
13	<i>Fallacia</i> sp.	12.51	4.7
14	<i>Navicula cryptotenella</i> Lange-Bertalot	15.62	4.8
15	<i>Cocconeis lineata</i> Ehrenberg	31.96; 21.27	14.3; 10.5
16	<i>Reimeria sinuata</i> var. <i>sinuata</i> (W. Gregory) Kociolek & Stoermer	18.1; 17; 16.42	5.1; 4.8; 5.1

17	<i>Gomphonema parvulum</i> Kützing	26.62; 24.39; 23.71	6.1; 5.3; 6.2
18	<i>Gomphonema pumilum</i> var. <i>rigidum</i> E. Reichardt & Lange-Bertalot	37.24; 27.34; 25.87	6.1; 4.8; 5.1
19	<i>Gomphonema lagenula</i> Kützing	31.98	8
20	<i>Gomphonema</i> sp.	30.66; 23.60 16.19	7.1; 6.3; 6.9
21	<i>Achnantheidium minutissimum</i> (Kützing) Czarnecki	13.55; 12.98; 12.87; 10.37	3.2; 2.1; - 2.4
22	<i>Rhoicosphenia abbreviata</i> (C. Agardh) Lange-Bertalot	38.69	5.6
23	<i>Navicula lanceolata</i> Ehrenberg	54.29; 48.09; 42.67	11.3; 12.1
24	<i>Navicula tripunctata</i> (O.F. Müller) Bory	45.56; 41.47	9.1; 8.5
25	<i>Fragilaria vaucheriae</i> (Kützing) J.B. Petersen	26.19	5
26	<i>Encyonema silesiacum</i> var. <i>altensis</i> Krammer	26.36; 23.92; 22.29; 19.66	7.8; 10.1; 8.4; 10.2; 7.9
27	<i>Encyonema lange-bertalotii</i> Krammer	23.19; 19.59; 17.84	6.1; 6; 5.2
28	<i>Diatoma moniliformis</i> (Kützing) D.M Williams	26.69; 21.03	4.0; 4.8
29	<i>Surirella angusta</i> Kützing	32.25	9.3
30	<i>Fragilaria arcus</i> (Ehrenberg) Cleve	42.23	6.8
31	<i>Pinnularia</i> sp.	34.24	6.1
32	<i>Melosira varians</i> C. Agardh	(D=20.08)	
33	<i>Nitzschia linearis</i> (C. Agardh) W. Smith	127.06	5.5
34	<i>Fragilaria tenera</i> (W. Smith) Lange-Bertalot	140.15	5.1

Lámina 8. Especies de diatomeas encontradas en el punto SC2 de la cuenca del río Santa Clara, agosto de 2020



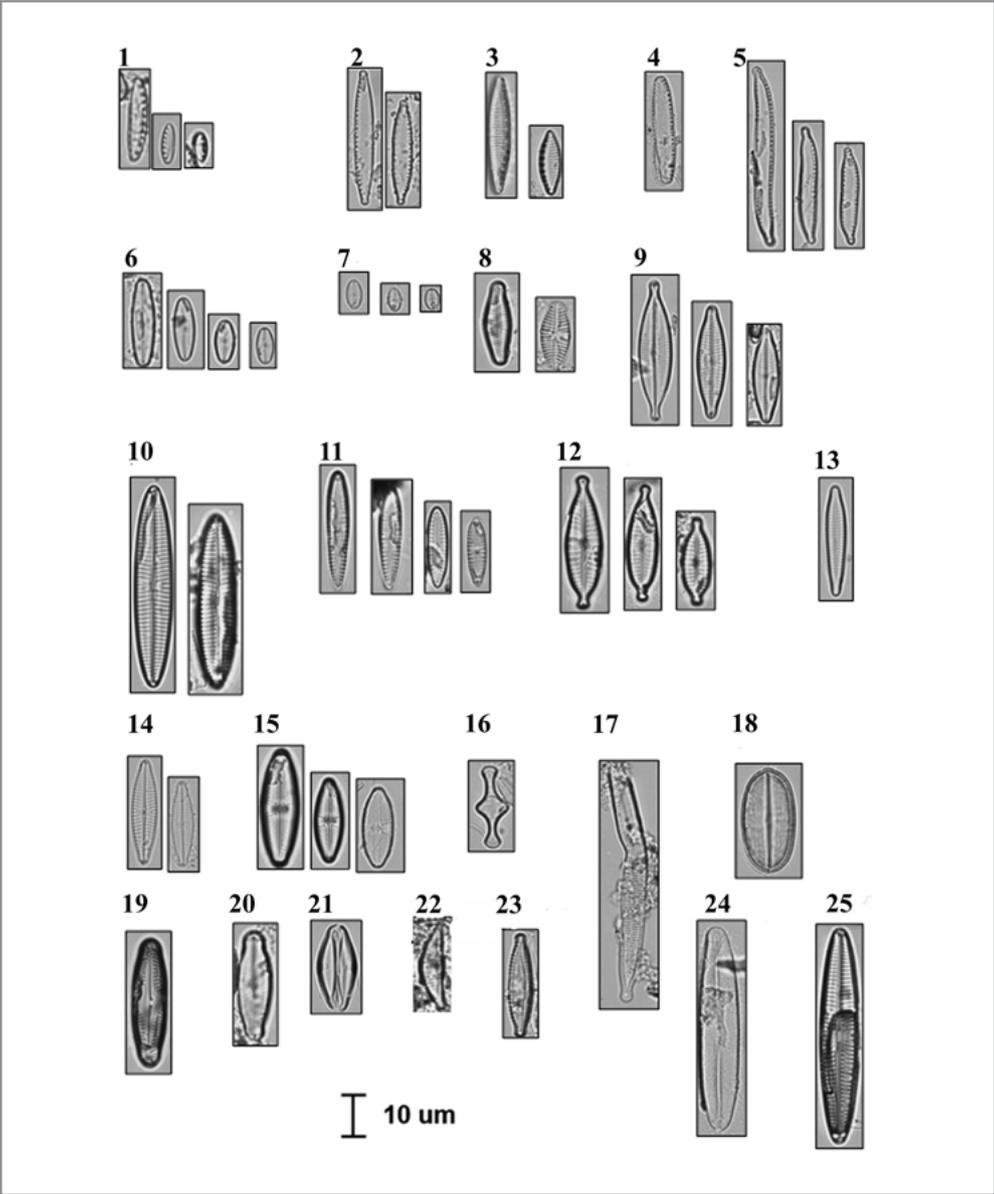




ID	SPECIES	LENGTH (um)	WIDTH (um)
1	<i>Sellaphora seminulum</i> (Grunow) D. G. Mann	14.08; 11.20; 9.96	2.8; 3.4; 4.1
2	<i>Eolimna</i> sp.	7.13	4.2
3	<i>Nitzschia soratensis</i> Morales & Vis	20.42; 18.87 12.41; 11.15; 8.79	3.14; 3.2 3.2; 4; 3.8
4	<i>Nitzschia ovalis</i> H. J. Arnott	30.67	4.1
5	<i>Melosira varians</i> C. Agardh	52.57 (D=20.59)	15.2
6	<i>Reimeria sinuata</i> var. <i>sinuata</i> (W. Gregory) Kociolek & Stoermer	14.20	3.8
7	<i>Gomphonema pumilum</i> var. <i>rigidum</i> E. Reichardt & Lange-Bertalot	30.33; 23.37; 20.43; 19.70; 17.77	4.1; 3.5; 4.2; 3.8; 3.4
8	<i>Gomphonema</i> sp.1	45.75; 28.36; 27.33; 25.37	8.3; 6.1; 5.8; 6.4;
9	<i>Gomphonema</i> sp.2	25.66; 24.48	6.4; 5.1
10	<i>Gomphonema parvulum</i> (Kützing) Kützing sensu lato	26.30; 24.85	9.1; 9.3
11	<i>Gomphonema turgidum</i> Ehrenberg	23.95; 25.5	7.6; 7
12	<i>Cocconeis lineata</i> Ehrenberg	31.78; 29.01; 23.54	15.2; 13.5; 11.3
13	<i>Rhoicosphenia abbreviata</i> (C. Agardh) Lange-Bertalot	22.87; 18.27	3.8; 4.3
14	<i>Nitzschia fonticola</i> (Grunow) Grunow	34.16; 23.43; 16.04	5.1; 4.2; 4.2
15	<i>Nitzschia palea</i> (Kützing) W. Smith	26.19	4.1

16	<i>Planothidium lanceolatum</i> (Brébisson) Lange-Bertalot	25.54; 24.07; 12.89	6.7; 6.6; 6.1
17	<i>Planothidium</i> cf. <i>biporumum</i> (M.H.Hohn & Hellerman) Lange-Bertalot	19	6.7
18	<i>Fragilaria recapitellata</i> Lange-Bertalot & Meltzeltin	20.80; 19.84	4.8; 5.3
19	<i>Nitzschia amphibia</i> Grunow	30.80	5.1
20	<i>Nitzschia clausii</i> Hantzsch	31.75	4.3
21	<i>Nitzschia linearis</i> (C. Agardh) W. Smith	134	5.1
22	<i>Pinnularia</i> sp.	38.94	10.3
23	<i>Fragilaria arcus</i> (Ehrenberg) Cleve	73.82	12.3
24	<i>Navicula tripunctata</i> . (Müller) Bory	47.61; 40.99; 40.11	8.7; 7.1; 8
25	<i>Navicula cryptotenella</i> Lange-Bertalot	26.75; 24.04; 23.05; 21.91	6.1; 5.3; 7; 6.2
26	<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kützing	(D=22.01)	-
27	<i>Navicula lanceolata</i> Ehrenberg	54.69; 52.75; 46.95; 42.05	9.7; 10.8; 11.5; 11,6
28	<i>Navicula</i> cf. <i>gregaria</i> Donkin	32.69; 26.52	6.3; 6.5
29	<i>Encyonema silesiacum</i> var. <i>altensis</i> Krammer	31.28; 23.01; 27.41	9.7; 9.3; 9.5
30	<i>Encyonema minutum</i> (Hilse) D. G. Mann	13.53	4.9
31	<i>Fragilaria vaucheriae</i> (Kützing) J.B. Petersen	30; 26.8	5.1; 3.9
32	<i>Luticola goeppertiana</i> (Bleisch) D.G.Mann	21.77	7.3
33	<i>Sellaphora pupula</i> (Kützing) Mereschkovsky	21	8.3
34	<i>Placoneis undulata</i> (Krasske) Lange-Bertalot	23.70	8
35	<i>Amphora meridionalis</i> Levkov	47.61	8.5
36	<i>Ulnaria ulna</i> (Nitzsch) Compère	121.64; 133.11	11.7; 6.3
37	<i>Fragilaria tenera</i> (W. Smith) Lange-Bertalot	113.3	7.7

Lámina 9. Especies de diatomeas encontradas en el punto SP3 de la cuenca del río Pita, agosto de 2020



ID	SPECIES	LENGTH (um)	WIDTH (um)
1	<i>Nitzschia soratensis</i> Morales & Vis	19.04 9.12; 7.68	3.6 3.1; 2.3
2	<i>Nitzschia palea</i> (Kützinger) W. Smith sensu lato	31.60; 26.01	4; 4
3	<i>Nitzschia amphibia</i> Grunow	28.35; 14.63	3.2; 4.5
4	<i>Nitzschia ovalis</i> H. J. Arnott	27.03	4.8
5	<i>Nitzschia clausii</i> Hantzsch	46.61; 29.51; 26.44	4; 3.8; 4
6	<i>Sellaphora seminulum</i> (Grunow) D. G. Mann	19.85; 14.85; 9.81; 9.31	5.2; 4.8; 4.2; 3.9
7	<i>Eolimna minima</i> (Grunow) Lange-Bertalot & W.Schiller	7.93; 7.71; 5.91	3.1; 3; 3
8	<i>Planothidium lanceolatum</i> (Brébisson) Lange-Bertalot	20.07; 15.50	6; 6.2
9	<i>Planothidium lanceolatum</i> (Brébisson) Lange-Bertalot	31.36; 26.33; 21.49	7; 6.7; 6
10	<i>Navicula tripunctata</i> (O.F. Müller) Bory	50.93; 40.01	8.3; 8.2
11	<i>Gomphonema pumilum</i> var. <i>rigidum</i> E. Reichardt & Lange-Bertalot	27.65; 23.93; 18.80; 17.59	4.1; 4.1; 4.8; 4.3
12	<i>Gomphonema lagenula</i> Kützinger	33.69; 30.43; 22.65	7; 6.5; 6.6
13	<i>Gomphonema exilissimum</i> (Grunow) Lange-Bertalot & E.Reichardt	25.66	4.1
14	<i>Navicula cryptotenella</i> Lange-Bertalot	24.54; 21.76	5.1; 4.8

15	<i>Luticola goeppertiana</i> (Bleisch) D.G.Mann	28.21; 20.93; 20	7.3; 6.3; 6.8
16	<i>Tabellaria flocculosa</i> (Roth) Kützing	19.97	7.9
17	<i>Fragilaria arcus</i> (Ehrenberg) Cleve	60.33	5.8
18	<i>Cocconeis lineata</i> Ehrenberg	26.59	6.8
19	<i>Pinnularia microstauron</i> var. <i>angusta</i> Krammer	33.31	7.9
20	<i>Sellaphora</i> cf. <i>pupula</i> (Kützing) Mereschkovsky	27.05	6.8
21	<i>Amphora montana</i> Krasske	19.39	-
22	<i>Encyonema</i> sp.	20.25	5.1
23	<i>Fragilaria vaucheriae</i> (Kützing) J.B. Petersen	24.75	5
24	<i>Sellaphora bacillum</i> (Ehrenb.) D.G.Mann	50.35	9.5
25	<i>Navicula lanceolata</i> Ehrenberg	51.31	9.1

## Colecciones de UDLA Ediciones



ars

El término latino *ars*, que se refiere tanto a la habilidad técnica como al talento creativo del ser humano, da nombre a esta colección que acoge obras de arte que aportan al desarrollo cultural de la comunidad.



eje

La colección *eje* presenta una serie de conocimientos y saberes fundamentales que permiten al lector sobrepasar diversas etapas para comprender los enunciados y explicaciones técnicas sobre un elemento específico.



ethos

*Ethos*, término griego que describe el conjunto de rasgos y modos de comportamiento que conforman la identidad de una comunidad, es la colección de textos de carácter científico, sustentados en productos de proyectos de vinculación.



imago

El término *imago*, de origen latino y que significa «imagen», da nombre a la colección de obras académicas de gran formato donde priman la imagen, la fotografía y la ilustración.



-logía

*-logía* es una partícula lingüística de origen griego cuyo concepto vincula términos como «tratado», «ciencia» o «estudio», palabras fundamentales que caracterizan esta colección de escritos teóricos sobre diversas materias, dentro de las diferentes áreas del conocimiento.



núcleo

La colección *núcleo* reúne obras clave que concentran y sistematizan el conocimiento para el continuo estudio y desarrollo de la humanidad.



origo

La colección *origo* comprende investigaciones que registran el patrimonio cultural: el pasado, la memoria social, la historia y el origen de nuestra identidad. De ahí su nombre latino, que significa «origen», «comienzo», «inicio» y «nacimiento».



pre-

La colección *pre-* toma su denominación del prefijo que indica «anterioridad local o temporal», recoge los mejores ensayos académicos o trabajos finales de las carreras de pregrado de la UDLA.



post-

La colección *post-* toma su nombre del prefijo que significa «detrás de» o «después de» y abarca las mejores tesis provenientes de la Facultad de posgrados de la UDLA.



racimo

La colección *racimo* contiene antologías de obras originales científicas, culturales o artísticas, completas o fragmentadas, que se consolidan alrededor de un hilo temático común.



ruta

*Ruta* es la colección de textos didácticos y cualquier material de apoyo que enriquezca el proceso de enseñanza-aprendizaje continuo de estudiantes de educación media y superior.



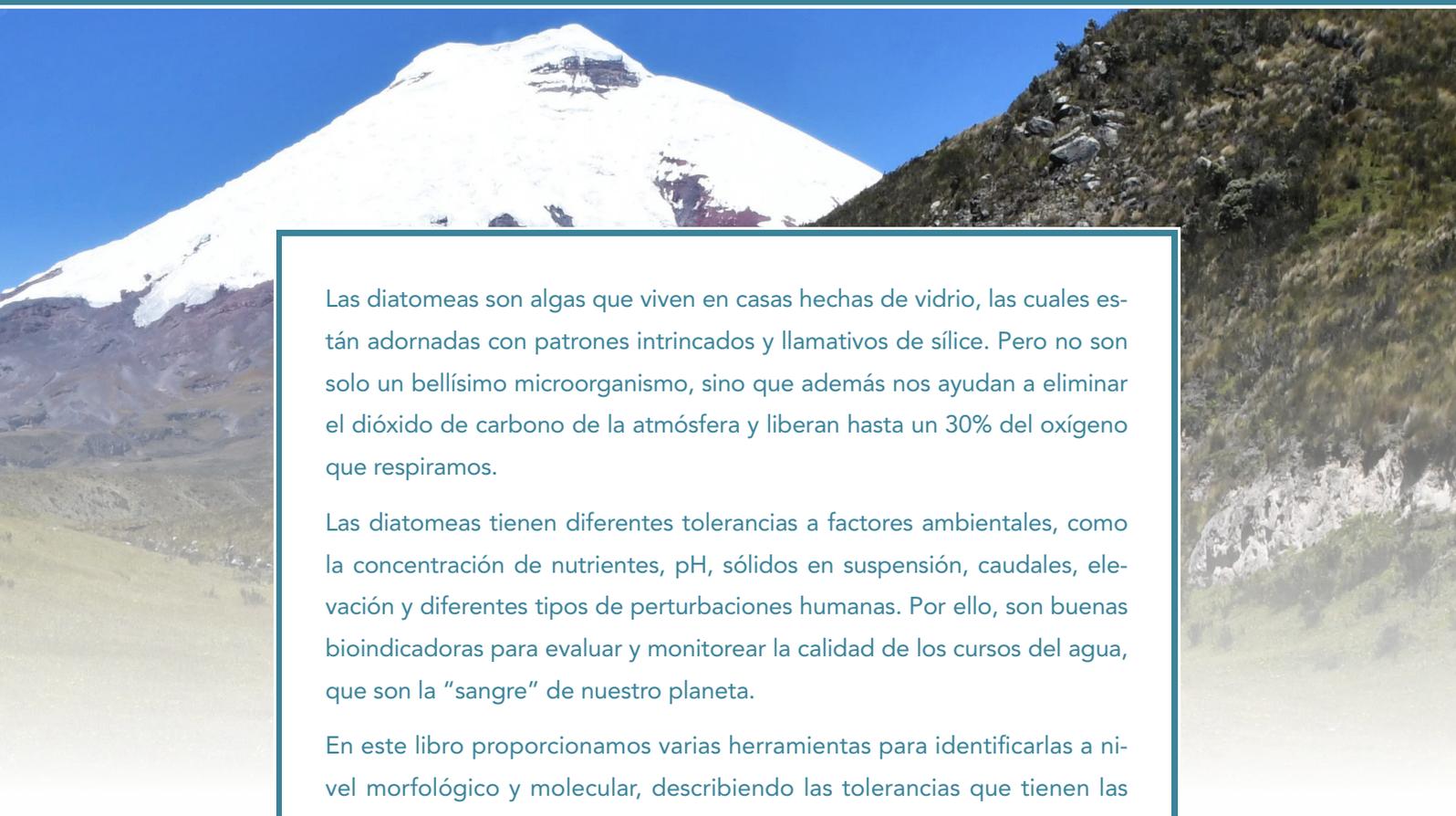
símil

*Símil* representa la colección de libros académicos literarios, los cuales exponen tanto textos de análisis y crítica literarios como obras narrativas y poéticas que evidencian la importancia y el impacto de la cultura literaria en la sociedad.

ISBN: 978-9942-779-57-1



9 789942 779571



Las diatomeas son algas que viven en casas hechas de vidrio, las cuales están adornadas con patrones intrincados y llamativos de sílice. Pero no son solo un bellissimo microorganismo, sino que además nos ayudan a eliminar el dióxido de carbono de la atmósfera y liberan hasta un 30% del oxígeno que respiramos.

Las diatomeas tienen diferentes tolerancias a factores ambientales, como la concentración de nutrientes, pH, sólidos en suspensión, caudales, elevación y diferentes tipos de perturbaciones humanas. Por ello, son buenas bioindicadoras para evaluar y monitorear la calidad de los cursos del agua, que son la “sangre” de nuestro planeta.

En este libro proporcionamos varias herramientas para identificarlas a nivel morfológico y molecular, describiendo las tolerancias que tienen las especies autóctonas de la sierra ecuatoriana. Las diatomeas nos cuentan los problemas de salud de nuestros ríos andinos, solo tendremos que aprender a escucharlas. El futuro de la Tierra está en tus manos.