



INFORME FINAL

Determinación de capacidad de adherencia,
mecanismos de propagación y métodos de destrucción
de *Alexandrium catenella* (célula vegetativa y quiste)

SUBPESCA / Mayo 2012



INFORME FINAL

Determinación de capacidad de adherencia,
mecanismos de propagación y métodos de destrucción
de *Alexandrium catenella* (célula vegetativa y quiste)

SUBPESCA / Mayo 2012

REQUIRENTE

SUBSECRETARÍA DE PESCA

Subsecretario de Pesca:
Pablo Galilea Carrillo

EJECUTOR

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO, IFOP

Jefe División Investigación en Acuicultura
Leonardo Guzmán Méndez

Director Ejecutivo
Jorge Antonio Toro Da'Ponte

JEFA DEL PROYECTO

Gemita Pizarro Nova

AUTORES

Gemita Pizarro Nova¹
Nicole Pesse Lastra³
Pablo Salgado Garrido¹
César Alarcón Zapata¹
Cristian Garrido Cáceres¹
Leonardo Guzmán Méndez³

1 Grupo región de Magallanes (Punta Arenas)

2 Grupo región de Aysén (Ensenada Baja)

3 Grupo región de Los Lagos (Puerto Montt, Putemún)



TÉCNICOS

Raúl Hernández Torres²
Claudia Zamora Amstein¹
Pedro Calabrano Miranda³
Renato Oyarzún Martínez³

COLABORADORES

Javier Monsalve Montecinos²
Elías Fernández-Niño Azócar²
Marina Oyarzún Vera²
Jorge Toro Mancilla¹
Alvaro Garcés Shultz¹
José Pérez Soto¹
José Maripillan Pérez¹
Moisés Alegría Tapia¹
Roberto Raimapo Raimapo¹
Claudio Mercegué Cárcamo
Lilian Díaz Galindo³
Paola Hinojosa Carrasco³
Luis Iriarte Bustamante²
Susana Mercado Leal²
Gastón Vidal Santana³
Luis Figueroa Fabrega²

1 Grupo región de Magallanes (Punta Arenas)

2 Grupo región de Aysén (Ensenada Baja)

3 Grupo región de Los Lagos (Puerto Montt, Putemún)



PREÁMBULO

- 1.- LA SUBSECRETARÍA DE PESCA, representada por su Titular, don Pablo Galilea Carrillo, y el INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO, Rut N° 61.310.000-8, representada legalmente por su Director Ejecutivo don Jorge Antonio Toro Da'Ponte suscribieron, con fecha 22 de diciembre de 2009, el Contrato de Ejecución del proyecto denominado "DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD DE ADHERENCIA, MECANISMOS DE PROPAGACIÓN Y MÉTODOS DE DESTRUCCIÓN DE *Alexandrium catenella* (CÉLULA VEGETATIVA Y QUISTE)".
- 2.- En conformidad con lo establecido en la cláusula undécima del citado convenio el INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO se obligó a entregar a la SUBSECRETARÍA DE PESCA un Informe Final.
- 3.- Mediante Carta IFOP/DIA/N° 012/2012/DIR N°135 de 14 marzo del año 2012, el INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO hizo entrega del Informe Final según lo establece la cláusula undécimo del convenio.
- 4.- LA SUBSECRETARÍA DE PESCA, a través de Oficio DA N°946, de 12 de abril del año 2012, realizó observaciones al Informe Final.
- 6.- El INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO ha efectuado las correcciones indicadas en las observaciones de la SUBSECRETARÍA DE PESCA dentro de los plazos establecidos en el Oficio DA N°946, de 12 de abril del año 2012.
- 7.- El presente documento contiene el Informe Final corregido con el propósito de que sea evaluado por LA SUBSECRETARÍA DE PESCA y proceda a efectuar la calificación pertinente de acuerdo a lo que establece el numeral 6. del Oficio DA N°946, de 12 de abril del año 2012.



RESUMEN EJECUTIVO

Este informe final incluye los resultados alcanzados durante la ejecución del proyecto que en la práctica y para comprensión del lector pueden resumirse en tres temas fundamentales: i) Estimación de la generación *in situ* de quistes de *A. catenella* y establecer los vectores y fómites fuentes potenciales de dispersión de esta microalga; ii) Evaluar la factibilidad de sistemas y procesos de servicios derivados del desarrollo de la industria de la acuicultura como fuentes dispersoras de la microalga plaga; y iii) Evaluar la efectividad de las metodologías disponibles para la eliminación efectiva de las fases vegetativa y quistes de *A. catenella* para ser aplicadas en las fuentes potencialmente dispersoras.

Para abordar el primer tema, se instaló durante un mes (30 marzo y 5 mayo 2010), un sistema de fondeo *in situ* en tres estaciones incluidas dentro del programa monitoreo regular de marea roja en la región de Aysén. La finalidad, estimar las tasas de generación de quistes de *A. catenella*. En estas mismas estaciones se recolectaron organismos bentónicos que crecen naturalmente en el lugar mientras que otros, provenientes de lugares libres de esta microalga, fueron instalados en linternas suspendidas en la columna de agua. Así también se instalaron redes anchoveteras previamente tratadas. El objetivo fue identificar los organismos bentónicos y fómites que pueden actuar como agentes de propagación. Los resultados indicaron que la generación de quistes de *A. catenella* para una intensidad de floración de nivel de abundancia de 2 es baja. Aunque bajo, más importante parece ser la constancia del flujo de quistes durante el año que la magnitud de quistes generados durante un evento acotado del periodo estival. Así también lo evidencian los quistes encontrados en los sedimentos recientes en el sector de estudio. Tanto los vectores bivalvos como los fómites son potenciales dispersores de la microalga plaga en su forma de quiste principalmente.

Dentro de las actividades realizadas, se evaluó la metodología para muestrear agua en las bodegas que transportan peces vivos y agua en el exterior de la nave (columna de agua). Esta última como referencia comparativa del contenido de fitoplancton en las muestras recolectadas en la bodega. Esta actividad fue realizada con participación de la flota de wellboats Patagón durante el trayecto comprendido entre las regiones de Aysén y Los Lagos. La finalidad, validar aquellos métodos de destrucción más adecuados en embarcaciones de traslado de peces y los costos de implementación de las eventuales técnicas a proponer, razón por la que fue necesario conocer a cabalidad el mecanismo operativo de este tipo de naves cuando se encontraban en faenas de traslado.

Primeramente se realizaron dos cruceros a bordo de dos naves wellboats con la finalidad de evaluar su potencial como agente dispersor de la microalga plaga y al mismo tiempo tomar las medidas cautelares pertinentes. Los cruceros fueron realizados durante una floración de *A. catenella* de intensidad de 2-3 en la escala de abundancia relativa. Intensidades mayores a los niveles de abundancia relativa mencionados con una persistencia temporal mayor a dos meses a lo menos, no ocurrieron durante el año 2010 ni 2011. El primer crucero fue realizado el 17 y 19 de febrero de 2010 a bordo de la nave Patagón IV mientras que el segundo fue el 22 y 23 de marzo de 2010 a bordo de la nave Patagón V. Ambos realizaron un trayecto de transporte de truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) vivas provenientes de centros de cultivo situados en el fiordo Aysén hasta un centro de acopio ubicado en Chonchi, Chiloé. Los wellboats pertenecen a la empresa Patagonia Travelling S.A., operada por



Patagonia Wellboat que realiza servicios de transporte de truchas y salmones vivos entre las regiones de Los Lagos y Aysén.

El muestreo consistió en extraer muestras concentradas de agua de mar recolectadas con bombas de succión y filtradas por tamices de redes de distinto trama, tanto desde el exterior de la nave como de una de las bodegas cerradas en las que se transportan las truchas con la finalidad de pesquisar la forma vegetativa y/o quistes de *A. catenella*.

Los resultados indicaron la presencia de *A. catenella* en su forma vegetativa tanto en el exterior como en las bodegas de la nave. Si bien no se encontraron quistes de esta microalga, se observaron quistes de otras especies en la bodega. Se recomienda automatizar el proceso la recolección de agua para facilitar el muestreo de bodegas a una escala de volumen representativo del utilizado durante los transportes.

En una segunda fase y en relación al tercer tema, SUBPESCA solicitó realizar dos cruceros extras durante los meses de diciembre de 2011 y enero de 2012 (28 de diciembre y 19 de enero, respectivamente) en condiciones de floración o no, con el fin de evaluar el efecto de las metodologías en la composición del fitoplancton en las aguas de transporte de las naves dotadas con sistemas de filtros y reactores de UV. Los cruceros se realizaron en rutas de transporte de peces existentes en el interior de la región de Los Lagos dado que la empresa estaba con una alta frecuencia de operaciones en esta región, no así en la región de Aysén. Por lo mismo el acceso a los embarques fue mucho más rápido como para cumplir con la actividad y objetivo dentro del tiempo solicitado por SUBPESCA y a la vez cumplir con los resultados para la entrega del informe final. El muestreo consistió en extraer muestras concentradas de agua de mar recolectadas con bombas de succión y filtradas por tamices de redes de distinto trama, tanto desde el exterior de la nave como de una de las bodegas cerradas en las que se transportan las truchas con la finalidad de pesquisar forma vegetativa y/o quistes de *A. catenella*. Los resultados indicaron baja efectividad de los filtros de la embarcación cuando la concentración de microalgas es baja en el ambiente. Sin embargo, la aplicación de dosis de UV con más de un 90 % de transparencia del agua, dosis nueve veces mayor a la mínima encontrada en este estudio para eliminar células y quistes de *A. catenella*, debiera ser suficiente para asegurar la inviabilidad de la microalga.

Cabe destacar que esta fue la única empresa que finalmente concretó su participación en este proyecto, otorgando todas las facilidades tanto de información como de atención requeridas a bordo durante los embarques. La empresa de transporte de truchas, salmones y smolts cuenta con una flota de seis naves, de distintas capacidad de volumen (de transporte), dimensiones, rutas y metodologías de sanitización utilizadas actualmente, que eran necesarias dimensionar en terreno.

Antecedentes físicos de las naves, en su mayoría utilizadas para las actividades antes descritas, así como las metodologías de sanitización, higiene y limpieza aplicadas por las mismas y exigidas por SERNAPESCA también son presentados en este informe.

Aunque la intensidad de la floración de *A. catenella* fue baja o nula durante la ejecución de las actividades recién descritas, los resultados son representativos para señalar que las medidas



cautelares para evitar la propagación de esta microalga deben ser aplicadas y perfeccionadas con bases científicas.

Los elementos y compuestos seleccionados para la eliminación de células vegetativas fueron evaluados experimentalmente en laboratorio así como su eficacia para inhibir el crecimiento de los quistes. La proyección de estos resultados es su aplicabilidad en el tratamiento de aguas de transporte de wellboats, de plantas de proceso (además de desarenadoras y depuradoras y otros servicios como lavado de redes y artes de pesca utilizados en el cultivo de organismos). Los elementos útiles en la inhibición del crecimiento de la fase vegetativa son temperatura $> 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, salinidades < 2 psu, dosis de radiación UVC $> 13\text{ mJ/cm}^2$, dosis de ozono $> 8\text{ mg/L}$, (dosis $< 1,5\text{ mg/L}$ por el contrario, estimulan el crecimiento), filtros con trama menor a $25\text{ }\mu\text{m}$ dispuesto al final de una serie de trama mayor, 100 ppm de cloro aplicado por 25 minutos.

Para el caso de los quistes, los resultados fueron: temperatura de $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora, salinidades < 10 psu, dosis de radiación UVC $> 2\text{ mJ/cm}^2$, filtros con trama menor a $25\text{ }\mu\text{m}$ dispuesto en una serie de trama mayor y 20 ppm de cloro aplicado por 25 minutos. En este caso el ozono no fue efectivo en las dosis aplicadas experimentalmente (máximo 18 mg/L).

La información obtenida es útil para proponer las medidas precautorias más adecuadas, previo a su eliminación al medio ambiente, con el fin de prevenir la dispersión de estas microalgas a través de las aguas de transporte de organismos, efluentes de plantas procesadoras, desarenadoras, depuradoras y de servicios de limpieza de fómites y otras artes de pesca. En este sentido y a raíz de los resultados experimentales obtenidos durante el desarrollo del proyecto, SUBPESCA propuso evaluar la efectividad de tratamientos de efluentes implementados en plantas. Para ello se diseñó un sistema a escala piloto de desarenado para realizar la experiencia. Este consistió en la disposición de tres bim con capacidad de 600 L a distintas alturas desde (altura máxima de 3.5 m) y con descenso del agua por gravedad a un flujo de 2.5 l/min . Los moluscos se dispusieron en el segundo bim, a 2 m mientras que el tercero que fue el receptor del agua (o "ril") se dispuso a nivel del suelo. Los resultados indicaron la importancia de las microalgas en el sedimento producto de la excreción de los moluscos sobre todo después de un "apozamiento", resuspensión y consumo de éstas luego de hacer circular el agua. Si bien el consumo de microalgas no se reflejó en el hepatopáncreas ni tejido corporal por cuanto las muestras fueron homogenizadas por ultrasonido para lograr una mayor probabilidad de encontrar quistes adheridos, el proceso también conduce al rompimiento de las células. También se observó que tanto las valvas como el biso actúan como atrapadores efectivos de las microalgas en suspensión. Por último, hacer notar que a pesar de no existir una floración intensa de *A. catenella* (nivel 1-2, diez días antes del muestreo) se detectó la fase vegetativa en el agua apozada y la fase quiste de resistencia en el hepatopáncreas.

Otras fuentes potenciales de dispersión son las aguas lastre, información técnica y científica de la que se carece en Chile, pero que amerita ser considerada de manera de no menoscabar el esfuerzo desplegado para prevenir la propagación de especies nocivas a través de nuestro país.



ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN EJECUTIVO	i
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
1. ANTECEDENTES	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivo específicos	3
3. METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DISCUSI3N POR OBJETIVO ESPECÍFICO	4
3.1. Objetivo específico 2.1. <i>Determinar la tasa de generaci3n de quistes de A. catenella in situ.</i>	4
3.2. Objetivo específico 2.2. Identificar los agentes (vectores y fomites), describir los mecanismos de propagaci3n de <i>A. catenella</i> (célula vegetativa y quistes) y evaluar los riesgos de dispersi3n de <i>A. catenella</i> a través de agentes de propagaci3n.	10
3.3. Objetivo específico 2.3. Evaluar los distintos mecanismos de eliminaci3n o de destrucci3n de <i>A. catenella</i> (quistes y forma vegetativa) adheridos y/o incluidos en transvectores y en estructuras (fómites).	19
3.4. Objetivo específico 2.4. Evaluar distintos mecanismos de eliminaci3n o de destrucci3n de <i>A. catenella</i> (quistes y forma vegetativa) para aplicar a las potenciales fuentes dispersoras de plagas de acuerdo al DSN°345/2005.	41
3.5. Objetivo específico 2.5. Aplicar y validar aquellos métodos de destrucci3n más adecuados en sistemas de traslado de peces (barcos cisterna o <i>wellboats</i>) y otras “fuentes potenciales dispersoras de plagas”. Evaluar los costos de implementaci3n de las medidas técnicas que se propongan.	46
3.5.1. Composici3n del fitoplancton en el agua recolectada en naves de transporte.	58
3.5.2. Características físicas de la flota de <i>wellboats</i> Patagonia.	59



3.5.3. Metodologías de sanitizaci3n. -----	-59
3.5.4. Rutas de las naves Patag3n. -----	-62
3.6. Objetivo específcico 2.6. Proponer medidas de detecci3n y certificaci3n así como medidas administrativas tendientes a asegurar la inocuidad en los traslados. -----	-64
3.6.1. Medidas generales recomendadas para aplicar en paralelo a las metodologías actualmente utilizadas para evitar el transporte de <i>A. catenella</i> por los wellboats -----	-64
3.6.2. Medidas de detecci3n, certificaci3n y administrativas -----	-65
3.6.3. Otros antecedentes técnicos a considerar al aplicar las medidas de detecci3n y certificaci3n recomendadas -----	-67
3.7. Objetivo específcico 2.6. Realizar un taller de difusi3n y validaci3n de las medidas propuestas. -----	-72
4. CONCLUSIONES -----	-74
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	-75

FIGURAS

TABLAS

ANEXOS



ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa de las estaciones de muestreo y experimento *in situ* en la región de Aysén (recuadro rojo). A30 (Isla Julián), A31 (Is. Huichas) y A32 (I. Vergara).
- Figura 2.** Esquema de trampas de sedimento dispuestas cerca del fondo a 16 m de profundidad
- Figura 3.** Densidad (superior) y abundancia relativa (inferior) de *A. catenella* registrada en años anteriores en el área de estudio. Las flechas indican los valores registrados durante la experiencia *in situ* de este estudio: I. Julián (azul), Is. Huichas (línea verde), I Vergara (línea roja).
- Figura 4.** Perfiles de variables oceanográficas registrados en el área de estudio durante la realización de los experimentos *in situ*.
- Figura 5.** Representación esquemática del sistema de fondeo con una línea suspendida desde los 5 m de profundidad en la columna de agua sosteniendo tres linternas y tres redes posicionadas en las cercanías del fondo marino (16 m de profundidad aproximadamente). Un sistema de fondeo similar fue fondeado en cada una de las estaciones experimentales seleccionadas de Aysén.
- Figura 6.** Sistema de incubación de choritos *in vitro* en diferentes concentraciones de *A. catenella*.
- Figura 7a.** Fotomicrografía superiores por microscopía óptica normal y con epifluorescencia de quistes temporales embebidos en materia orgánica en agua de incubación con 1575 cél/mL (izq.) y quistes sueltos en el agua de incubación con 2510 cél/mL (der.). Fotomicrografías inferiores por microscopía óptica normal y con epifluorescencia de quistes temporales sueltos (izq.) y célula móvil (der.) presentes en el agua de lavado de valvas de vectores incubados con 1575 y 2510 cél/mL, respectivamente.
- Figura 7b.** Fotomicrografía superiore por microscopía óptica normal y con epifluorescencia de quistes temporales sueltos y embebidos en materia orgánica presentes en el agua de lavado del biso de vectores incubados con 1575 cél/mL (izq.) y en 2510 cél/mL (der.). Fotomicrografías inferiores por microscopía óptica normal y con epifluorescencia de quistes temporales embebidos en materia orgánica en el biosustrato y pseudofecas de vectores incubados con 1575 cél/mL (izq.) y en 90 cél/mL (der.)
- Figura 8.** Efecto realzas de la temperatura en los cultivos de células vegetativas de *A. catenella*.
- Figura 9.** Efecto de diferentes concentraciones de la salinidad del agua en los cultivos de células vegetativas de *A. catenella*.



- Figura 10.** Efecto de diferentes dosis de radiación UV ($\text{mWatt cm}^{-2} \times \text{segundos}$) en cultivos de células vegetativas de *A. catenella*. Primera y segunda columna de gráficos con igual tiempo de aplicación.
- Figura 11.** Efecto de diferentes dosis de ozono (0.3 mg/L de ozono \times minutos) en los cultivos de células vegetativas de *A. catenella*
- Figura 12.** Efecto de diferentes dosis de ultrasonido ($46 \pm 2 \text{ KHz}$ \times minutos) en cultivos de células vegetativas de *A. catenella*.
- Figura 13.** Sistema a escala piloto de desarenado utilizado para realizar la experiencia de validación de muestreo y tratamiento para la eliminación de *A. catenella* implementados en plantas de desarenado o desinfección.
- Figura 14.** Nave wellboat Patagón IV utilizada para poner a prueba la metodología de muestreo de agua en bodegas de transporte de peces como de la columna de agua en el exterior de la nave.
- Figura 15.** Plano de la nave wellboat Patagón IV en la que se observan las bombas y ductos de proa y popa, la profundidad de las bodegas (plano superior) y disposición de éstas en la nave (plano inferior).
- Figura 16.** Bodegas de babor y estribor de la nave Patagón IV utilizadas para el transporte de peces vivos.
- Figura 17.** Fotografía del interior de la bodega de estribor de la nave wellboat Patagón IV en la que se observa la posición de los difusores de oxígeno en el piso de la bodega. En primer plano se observa la escalera de acceso a la bodega a través de la escotilla.
- Figura 18.** Esquema de una de las bodegas de la nave wellboat Patagón IV en la que se observan las rejillas dispuestas en la superficie vertical de proa y gran parte de la superficie vertical de estribor. Se indican las posiciones de las compuertas de entrada y de salida de agua así como las dimensiones aproximadas de la bodega.
- Figura 19.** Escotillas de acceso al interior de las bodegas de babor y estribor para el personal de la nave.
- Figura 20.** Mapa con las estaciones de monitoreo del programa sur-austral de SUBPESCA (círculos rojos) y estaciones de monitoreo del REPLA de SERNAPESCA (cuadrados amarillos). El rectángulo anaranjado destaca la posición de las estaciones experimentales A30 (I. Julián), A31 (Is. Huichas) y A32 (I. Vergara).



- Figura 21.** Tramos de la ruta (1-5) realizada por la nave Patagón IV en las que se recolectó muestras de agua tanto de bodegas (línea roja) como del exterior de la nave (fiordo Aysén, línea verde). La estación 1 es una muestra recolectada en el exterior de la nave detenida mientras se cargaban sus bodegas. En azul se muestran las estaciones de monitoreo de marea roja.
- Figura 22.** Compuerta de acceso al interior de la bodega de estribor. Se muestra la manguera de succión de agua y cabo que sostiene la bomba sumergible a 5.5 m de profundidad de la bodega cargada con peces vivos.
- Figura 23.** Sistema de tamices (superior 250, centro 100 y abajo 20 μm , respectivamente) utilizados para filtrar el agua proveniente de la bodega cargada con peces vivos.
- Figura 24.** La foto superior muestra el sistema de filtración de agua del exterior. La foto inferior muestra un detalle del set de tamices dispuestos de mayor a menor trama de la malla y sumergimiento de las mismas, utilizados para la recolecta de muestras de agua.
- Figura 25.** Mapa que muestra los cinco puntos de muestreo de agua de bodega y exterior (rectángulos verdes) durante el trayecto de la nave Patagón V. También se muestran las estaciones de monitoreo del programa sur-austral de SUBPESCA (círculos rojos).
- Figura 26.** Diseño de validación de muestreo y tratamiento de UV con y sin filtro durante cruceros en wellboats. a. con filtro. b. sin filtro.
- Figura 27.** Fotos superiores: Proceso de separación de sólidos y grasa; fotos intermedias: floculación de materia orgánica y separación de líquidos y lodos; fotos inferiores: agua tratada y lodos compactados
- Figura 28.** Fotomicrografía de *A. catenella* encontrado en muestras de agua recolectadas en el transecto 5 (Bodega) de la ruta Patagón IV. La fluorescencia fue conseguida añadiendo calcofluor a la muestra para mostrar detalle de la placa 1' (sin poro).
- Figura 29.** Fotomicrografía de *A. ostenfeldii* encontrado en muestras de agua recolectadas en el transecto 4 (Bodega) de la ruta Patagón IV. Izquierda forma vegetativa acompañada de dos probables quistes de *Protooperidinium avellanum* y *P. denticulatum*. A la derecha la misma muestra fluorescente con calcofluor para mostrar detalle del poro de la placa 1' de *A. ostenfeldii* y arqueopilo de los quistes.
- Figura 30.** Cromatogramas de las toxinas paralizantes detectadas en cultivos de *A. ostenfeldii* procedente de I. Vergara (confirmación gentileza de José Franco e Isabel Bravo, investigadores del Instituto de Ciencias Marinas y Español de Oceanografía de Vigo).



- Figura 31.** Rutas para la navegación de la flota de wellboats Patagonia en la región de Aysén (en este caso con acceso al fiordo Aysén) y salida hacia la región de Los Lagos. Ruta principal de navegación (línea negra), ruta alternativa viable (línea verde) y rutas alternativas peligrosas (líneas rojas) para la tripulación y carga de las naves. En azul se indican las estaciones de monitoreo del programa de marea roja que se lleva a cabo desde el año 2006.
- Figura 32.** Rutas de navegación de la flota de wellboats Patagonia en la región de Los Lagos. Ruta principal (línea negra) y rutas alternativas viables tanto para acceder a Quellón como para acceder a destinos más al norte de Huicha como Puerto Montt. En azul se indican las estaciones de monitoreo del programa de marea roja que se lleva a cabo desde el año 2006.
- Figura 33.** Reactor de radiación UV (cilindro transversal de acero inoxidable) y sistema de filtros pre-reactor (pistón azul) con operación automatizada desde una estación de programación situada en las cercanías del reactor.



ÍNDICE TABLAS

- Tabla 1.** Escala de abundancia relativa para *Alexandrium catenella*, número de células promedio bajo un cubreobjeto de 18x18mm en 3 alícuotas de 0.1 mL cada una.
- Tabla 2.** **a.** Abundancia relativa de *Alexandrium catenella* en las tres estaciones experimentales de Aysén del programa de monitoreo sur-austral. **b.** abundancia relativa del programa REPLA a cargo de SERNAPESCA.
- Tabla 3.** **a.** Porcentaje de enquistamiento de *A. catenella in situ* durante los cruceros de alta frecuencia y flujo de quistes durante los muestreos estimados durante los muestreos de alta y baja frecuencia. **b.** Densidad de *A. catenella* registrada durante los muestreos experimentales de alta frecuencia en los sitios estudiados y memoria de cálculo densidad integrada en la columna de agua.
- Tabla 4.** Porcentaje de enquistamiento y flujo de quistes de *A. Alexandrium minutum* en el NW del mediterráneo (tomado de Garcés *et al.* 2004).
- Tabla 5.** Abundancia relativa de *Alexandrium catenella* en el sector de experimental durante el periodo de muestreo de alta frecuencia.
- Tabla 6.** Número de quistes viables de *A. catenella* observados en los hepatopáncreas homogenizados de 5 ejemplares de cada vector natural recolectados en los tres sitios de estudio.
- Tabla 7.** Número de quistes viables de *A. catenella* en hepatopáncreas de vectores procedentes de un área libre de esta microalga e incubados *in situ* en los tres sitios de estudio durante la floración ocurrida.
- Tabla 8.** Número de células de *A. catenella* encontrados en muestras de agua de bodega y el exterior, realizados durante el crucero 1 (Patagón IV) y el crucero 2 (Patagón V).
- Tabla 9.** Contenido de *A. catenella* en partes externas e internas de chorito luego de ser incubado en tres condiciones simuladas de una floración intensa de la microalga.
- Tabla 10.** Número de quistes de resistencia viables de *A. catenella* encontrados en las redes incubadas *in situ* durante el experimento de muestreo de alta frecuencia.
- Tabla 11.** Número de quistes de resistencia viables de *A. catenella* encontrados en las linternas incubadas *in situ* durante 27 días, durante el muestreo de alta frecuencia.
- Tabla 12.** Porcentajes del radiación ultravioleta (UV) emitida por cada lámpara de utilizada en los experimentos de exposición *in vitro*.



- Tabla 13.** Células de *A. catenella* sometidas a diferentes temperaturas.
- Tabla 14.** Células de *A. catenella* sometidas a diferentes concentraciones de salinidad.
- Tabla 15.** Células de *A. catenella* sometidas a diferentes dosis de radiación UV.
- Tabla 16.** Células de *A. catenella* sometidas a diferentes dosis de ozono.
- Tabla 17.** Células de *A. catenella* sometidas a diferentes dosis de ultrasonido de baño con frecuencia media 46 ± 2 KHz.
- Tabla 18.** Células de *A. catenella* sometidas a diferentes concentraciones de cloro.
- Tabla 19.** Quistes de *A. catenella* sometidos a diferentes temperatura.
- Tabla 20.** Quistes de *A. catenella* sometidos a diferentes concentraciones de salinidad.
- Tabla 21.** Quistes de *A. catenella* a diferentes dosis de radiación UVC.
- Tabla 22.** Quistes de *A. catenella* a diferentes dosis de ozono.
- Tabla 23.** Quistes de *A. catenella* sometidas a diferentes dosis de ultrasonido de baño con frecuencia media 46 ± 2 KHz.
- Tabla 24.** Quistes de *A. catenella* sometidas a diferentes concentraciones de cloro
- Tabla 25.** Composición fitoplanctónica cuantitativa de muestras de experimentos de desarenado en planta piloto. a. Experimento 1. b Experimento 2. c. Resumen de resultados.
- Tabla 26.** Composición fitoplanctónica cuantitativa de las muestras recolectadas en la bodega (B) y en el exterior (E) de la nave Patagón IV durante el trayecto de transporte de peces entre el fiordo Aysén y Chiloé (Nº células/L) (18 febrero 2010).
- Tabla 27.** Ruta realizada durante el crucero 1 y 2, naves Patagón IV y V.
- Tabla 28.** Composición fitoplanctónica cuantitativa de las muestras recolectadas en la bodega (B) y en el exterior (E) de la nave Patagón V durante el trayecto de transporte de peces entre el fiordo Aysén y Chiloé (Nº células/L) (22-23 marzo 2010).
- Tabla 29.** Composición fitoplanctónica cuantitativa de las muestras recolectadas en diferentes secciones del proceso de pre y postratamiento de filtración y aplicación de dosis UV en las naves wellboats . **a.** crucero en nave Patagón V. **b.** Crucero en nave Patagón II. **c.** Resumen composición fitoplanctónica cuantitativa de las muestras recolectadas en diferentes secciones del proceso de de pre y postratamiento de filtración y aplicación de dosis UV en las naves wellboats Patagón V y I.



ÍNDICE ANEXOS

- ANEXO 1.** Memoria de cálculo del porcentaje de encistamiento.
- ANEXO 2.** Presencia de *A. catenella* registrada durante los muestreos experimentales de alta frecuencia en los sitios estudiados.
- ANEXO 3.** Ensamble de quistes de resistencia registrados en los sedimentos provenientes de los tres sitios de estudio durante los muestreos de baja frecuencia.
- ANEXO 4.** Variables oceanográficas y meteorológicas registradas durante los muestreos de alta frecuencia.
- ANEXO 5.** Resolución 1882/08: Medidas para el manejo de residuos sólidos y líquidos aplicables en centros de matanza en tierra y plantas de proceso que reciben salmónidos de centros de cultivo de áreas cuarentenadas por virus ISA.
- ANEXO 6.** Protocolo de limpieza y desinfección de Patagonia Wellboats.
- ANEXO 7.** Resolución 2327/10: Norma técnica que establece los requisitos de aprobación de los sistemas de tratamiento de las aguas destinados a eliminar patógenos, con que deben contar las embarcaciones que transporten peces vivos.
- ANEXO 8.** Listado de plantas autorizadas para recibir peces desde centros cuarentenados por Virus ISA.
- ANEXO 9.** Flota de naves transportadoras de peces vivos de Patagonia Wellboats.
- ANEXO 10.** Procedimientos generales de saneamiento de SERNAPESCA.
- ANEXO 11.** Ejemplo del registro automático del reactor con las dosis de radiación UV aplicados durante el trayecto del Patagón V para evaluación de tratamientos aplicados en aguas de transporte.
- ANEXO 12.** Programa de monitoreo cualitativo de *A. catenella* de SERNAPESCA en el marco del reglamento de plagas, REPLA.
- ANEXO 13.** Lista de wellboats que operan o han operado en Chile.
- ANEXO 14.** Presentación, lista de invitados y lista de asistentes al Taller de difusión de resultados (6 septiembre 2011, Puerto Montt).



1. ANTECEDENTES

En Chile, *Alexandrium catenella*, es un dinoflagelado que ha sido incorporado como especie plaga hidrobiológica (Resolución Ex. N° 177) según lo establecido por el reglamento de plagas hidrobiológicas (REPLA) (D.S. N° 345/ 2005). Esta especie se distribuye geográficamente desde Calbuco (41° 48' S), hasta el canal Beagle (54° 55' S). De acuerdo a criterios que se evalúan periódicamente dentro del REPLA, el actual límite norte del área declarada plaga incluye desde el mar interior del sur de Chiloé (43° 22' S, con referencia física correspondiente a I. Acui) hacia el sur.

A. catenella produce el denominado veneno paralizante de los mariscos (VPM), un complejo tóxico conformado por más de 20 compuestos denominados saxitoxinas. Las floraciones de esta microalga provocan serios problemas económicos y de salud pública cuando la floración es intensa, con varios casos fatales en las tres regiones más australes del país (e.g. Suárez-Isla & Guzmán 1999, Guzmán *et al.* 2009).

El efecto de la toxina en las personas que consumen bivalvos con altas concentraciones de VPM es de tipo neurotóxico. Actúa bloqueando los canales de sodio de la membrana celular, inhibiendo los impulsos nerviosos y la contracción muscular (Guo *et al.* 1987, FAO 2005) provocando la muerte por asfixia de las personas. Entre los compuestos más importantes del VPM se incluyen la saxitoxina (STX), neosaxitoxina (neoSTX) y gonyaulatoxinas (GTXs) (FAO 2005). Los perfiles de VPM descritos tanto en numerosos moluscos recolectados históricamente en Chile como en cepas cultivadas de esta microalga, han presentado siempre una mayor proporción de GTXs (e.g. Compagnon *et al.* 1998, Krock *et al.* 2007).

El ciclo de vida de esta microalga consta de dos fases. Una vegetativa o nadadora con reproducción por simple división y una fase bentónica correspondiente a un quiste de resistencia, cuyo enquistamiento depende tanto de los cruzamientos de los parentales como de las condiciones ambientales del medio acuático (Figuroa *et al.* 2005). Los quistes de resistencia pueden permanecer largos períodos latentes en el sedimento, esperando que las condiciones del medio sean las apropiadas para producir un desenquistamiento.

Existe una alta probabilidad que ambas fases sean altamente transportadas, desde un lugar con floración a otro sin floración de esta microalga, mediante aparejos de pesca (e.g. Pizarro *et al.* 2009), aguas de lastre (Hallegraeff *et al.* 1991) y traslado de recursos bentónicos vivos para apozarlos (e.g. Harper *et al.* 2002, Hégaret *et al.* 2008) por lo que no se descarta que los wellboats también puedan transportar este tipo de microalga en sus aguas de carga de peces vivos.

Con la promulgación del D.S. N° 345 de 2005 para el Reglamento sobre Plagas Hidrobiológicas o REPLA, la autoridad pesquera tiene la atribución de tomar medidas de resguardo que permitan minimizar las medidas de prohibición de traslados de recursos hidrobiológicos frente a eventos FAN y evitar su propagación geográfica.



Debido a la no ocurrencia de floraciones intensas de *A. catenella* durante el año 2010, hubo que realizar gran parte del trabajo, que era medular para el desarrollo del proyecto, en condiciones experimentales *in vitro* durante el 2011. Ello obligó a establecer cultivos de cepas cultivables de esta especie además de las que poseía IFOP y determinar aquellas capaces de generar quistes que tuvieran la condición de viabilidad, buenas condiciones fisiológicas y en un número suficiente como para emprender y validar estadísticamente las pruebas de eliminación comprometidas en el proyecto. Se señalan además las metodologías asociadas a las diferentes actividades mencionadas.

Entre las actividades realizadas, está la evaluación de los métodos de muestreo para pesquisar formas vegetativas de *A. catenella* en el agua de los estanques de transporte de peces de los wellboats, además de dar a conocer las características físicas de las naves, los medios disponibles para la sanitización rutinaria de las mismas para finalmente proponer diseños experimentales de evaluación de técnicas aplicables a base de su actual uso en la sanitización. La disponibilidad de elementos y metodologías aplicadas en la sanitización orientó el trabajo de evaluación de las mismas para ser utilizadas en la eliminación y/o desnaturalización de *A. catenella* y de sus quistes, evitando así incurrir en diseños poco prácticos en su aplicación para eliminar los riesgos de dispersión del organismo plaga.

También se llevó a cabo un experimento *in situ* de alta frecuencia de muestreo para determinar los porcentajes de generación de quistes así como para identificar los organismos bentónicos y fómites que pudiesen actuar como potenciales agentes propagadores de la microalga plaga.



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Identificar los distintos agentes (vectores y fómites) probables causantes de propagación de *Alexandrium catenella* y proponer metodologías de eliminación o destrucción de *A. catenella* que se puedan aplicar en las actividades de acuicultura, de traslados y de proceso de recursos hidrobiológicos.

2.2. Objetivo específicos

- 2.1. Determinar la tasa de generación de quistes de *A. catenella in situ*.
- 2.2. Identificar los agentes (vectores y fómites), describir los mecanismos de propagación de *A. catenella* (célula vegetativa y quistes) y evaluar los riesgos de dispersión de *A. catenella* a través de agentes de propagación.
- 2.3. Evaluar los distintos mecanismos de eliminación o de destrucción de *A. catenella* (quistes y forma vegetativa) adheridos y/o incluidos en transvectores y en estructuras (fómites).
- 2.4. Evaluar distintos mecanismos de eliminación o de destrucción de *A. catenella* (quistes y forma vegetativa) para aplicar a las potenciales fuentes dispensoras de plagas de acuerdo al DSN°345/2005.
- 2.5. Aplicar y validar aquellos métodos de destrucción más adecuados en sistemas de traslado de peces (barcos cisterna o wellboats) y otras “fuentes potenciales dispensoras de plagas”. Evaluar los costos de implementación de las medidas técnicas que se propongan.
- 2.6. Proponer medidas de detección y certificación así como medidas administrativas tendientes a asegurar la inocuidad en los traslados.
- 2.7. Realizar un taller de difusión y validación de las medidas propuestas.



3. METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN POR OBJETIVO ESPECÍFICO

En esta sección se describen las metodologías asociadas a las actividades realizadas, o por realizar, para el logro de los objetivos así como también los conceptos e ideas que la fundamentan. La presentación de este capítulo se organiza por objetivo específico según los términos técnicos de referencia.

3.1. Objetivo específico 2.1. *Determinar la tasa de generación de quistes de A. catenella in situ.*

Metodología

Para lograr este objetivo, se fondearon trampas de sedimentos en tres estaciones de Aysén al momento de producirse una floración importante y sostenida de *A. catenella* en el tiempo. Estas permanecieron en el lugar durante más de un año. En el momento de la floración más intensa, las trampas fueron muestreadas con una alta frecuencia según lo permitió el acceso al lugar (aproximadamente cada 10 días) entre el 29 marzo y 5 mayo de 2010, mientras que en el resto del año, ésta fueron muestreadas mensualmente utilizando la plataforma del monitoreo regular de marea roja, a la espera de una eventual floración significativa y sostenida en el tiempo, ambas condiciones de una floración que son necesarias para dar inicio nuevamente a un muestreo de mayor frecuencia.

Las estaciones fueron seleccionadas por presentar la mayor frecuencia histórica de ocurrencias de floraciones de *A. catenella* en la región. Estas estaciones son Isla Julián (A30), Islas Huichas (A31) e Isla Vergara (A32), cuyo código de identificación numérico corresponde al establecido dentro del programa manejo y monitoreo de las mareas rojas en las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes, en adelante referido como programa de monitoreo regular (Fig. 1). En un estudio anterior (Pizarro *et al.* 2009), estas estaciones presentaron altas concentraciones de quistes viables en fómites experimentales (5 quistes por cm² de red) y en choritos (17 quistes g⁻¹ de hepatopáncreas) luego de una de las más intensas floraciones de *A. catenella* ocurrida entre marzo y abril de 2009. Estas estaciones presentan además la ventaja de ser las más cercanas al laboratorio, situación que facilita el traslado y condiciones de preservación mínimas de las muestras de moluscos para su análisis.

Diseño experimental

Las trampas fueron confeccionadas con tubos de PVC (Fig. 2) de 14 cm de diámetro y 50 cm de largo. El diseño está basado en estudios experimentales de captación de quistes *in situ* señalados en la literatura (e.g. Garcés *et al.* 2004; Bravo *et al.* 2009). Cada trampa estuvo conformada por dos



tubos de PVC (trampa duplex). Tres de estas trampas duplex fueron fondeadas a 16 m de profundidad en cada una de las tres estaciones, cuya posición fue señalizada con una boya. El inicio del experimento se realizó con un nivel de abundancia relativa de *A. catenella* sobre el nivel 2 (Tabla 1). Así al momento de instalar las trampas en los sitios de muestreo, el nivel de abundancia relativa era de 3 en dos de las estaciones experimentales y nivel 1 en la estación restante (Tabla 2a). Los sedimentos acumulados en las trampas fueron recuperados entre 8 y 11 días después de cada fondeo de las trampas en los sitios de muestreo (29 marzo 2010). El periodo de muestreo perduró entre el 8 de abril y el 5 de mayo de 2010 mientras permaneció la floración. Al cabo de este periodo se realizó un muestreo adicional, efectuado 15 días después (20 de mayo de 2010) del muestreo de mayor frecuencia. Al lapso de muestreo (8 de abril- 20 de mayo de 2010) se le denominó periodo de alta frecuencia para diferenciarlo del periodo comprendido entre el 20 de mayo de 2010 al 20 de junio de 2011 durante el cual las trampas permanecieron fondeadas y muestreadas durante los monitoreos rutinarios del programa de monitoreo regular, todo a la espera de una floración intensa y sostenida de *A. catenella* que finalmente no se produjo (Tabla 2a). A este último periodo de muestreo de trampas se le denominó de baja frecuencia.

En cada muestreo de las trampas, el contenido de los cilindros fue vaciado sobre dos copos con red 250 y 25 μm dispuestos consecutivamente de arriba hacia abajo para recuperar los sedimentos atrapados, mientras que el agua fue recogida en un recipiente plástico. Con el agua filtrada del recipiente, se enjuagaron los cilindros y se vaciaron nuevamente a los tamices para asegurar que la totalidad del material atrapado fuera recogido en la malla de 25 μm . Una vez finalizado el proceso de limpieza de los cilindros, cada trozo de malla de 25 μm fue removido del copo, colocado en un frasco plástico pequeño (50 mL) con doble tapa y el frasco enraizado con agua del recipiente para evitar golpes violentos de la muestra durante el transporte. Los frascos fueron cubiertos con papel aluminio y conservados a 4° C hasta su análisis en el laboratorio. Para el análisis de las muestras, identificación y cuantificación de los quistes, se utilizó el método de Matsuoka & Fukuyo (2000, 2003) modificado. En breve, este método modificado consiste en que una vez en el laboratorio, el contenido del frasco plástico con el trozo de red de 25 μm fue sonificado durante 2 minutos. En seguida, se recogió el trozo de red con pinzas y se lavó con agua de mar filtrada, recogiendo el agua de lavado en el mismo frasco. La muestra de agua del frasco y material particulado fue entonces filtrado por un tamiz de 106 y 25 μm consecutivamente. El material retenido en el tamiz de 25 μm se transfirió a una placa petri pequeña, removiendo las partículas adheridas al tamiz mediante una pisseta con agua de mar filtrada. Luego, la placa petri se giró manualmente con movimientos circulares, formando un remolino de modo que los quistes y las partículas ligeras se separasen del material particulado mientras este último permaneció en el centro de la placa. Cuidadosamente, el agua de mar con los quistes fue vaciado a un vaso precipitado y se enrasó a un volumen conocido. Un mL de esta muestra de volumen conocido se vació a una cámara Sedgewick-Rafter para contabilizar el número de quistes. Se utilizó el conteo de tres cámaras por muestras bajo un microscopio de contraste de fase Olympus BX- 41. Los resultados se expresan como número total de quistes por cilindro.



- a) El cálculo del porcentaje de enquistamiento fue realizado (Garcés *et al.* 2004, Montresor & Marino, 1996, Lewis 2002) según la siguientes expresión:

$$\%E = [2Q/(Ce + 2Q)] \times 100, \text{ en que}$$

Q representa los quistes de resistencia recolectados por área de trampa por día (n° quistes/ m^2 d¹). Este número es multiplicado x 2 debido a que cada quiste de resistencia es producto de dos células vegetativas; **Ce** representa el número de células vegetativas por área en la columna de agua inmediatamente por encima de las trampas (n° quistes/ m^2) que en el caso de este estudio es de 15 m, y corresponde a la media de células registradas al momento de instalar la trampa y el día en que se retira. 2Q es sumada a Ce para estimar el número total de células involucradas en el enquistamiento para cada periodo entre instalación y retiro de la trampa o sedimentos.

Desde el inicio del experimento de alta frecuencia y durante cada visita a los puntos de fondeo de las trampas, se realizaron los siguientes muestreos y registros de variables de acuerdo a contrato: Fitoplancton cualitativo, fitoplancton cuantitativo, registro de variables de temperatura, salinidad, sigma-t y oxígeno de la columna de agua, además de la temperatura ambiente y nubosidad.

- b) El muestreo de fitoplancton cualitativo se realizó mediante el arrastre vertical de una red de fitoplancton de 25 μ m de trama de malla desde la máxima profundidad que permitiera el lugar (16 m). Los arrastres fueron realizados en triplicado en cada punto de muestreo. Las muestras fueron fijadas con formalina neutralizada al 2% y de cada punto se conformó una sola muestra (i.e. una muestra integrada de tres arrastres). Una vez en el laboratorio, la identificación de los taxa en las muestras de agua fue realizada con microscopios ópticos de campo luminoso, a 100x y 400x, dotados con condensador de contraste de fase y equipo de epifluorescencia.
- c) En las mismas muestras de red, se estimó la abundancia relativa de *A. catenella*. Para ello se cuantificó el número de células de *A. catenella*, en una alícuota de 0,1 ml tomada desde una muestra sedimentada, bajo un cubreobjeto de 18 x 18 mm (3 réplicas). El número de células se llevó a un escalafón de abundancia de nueve rangos, de acuerdo a la abundancia que presenta esta especie en la naturaleza (Tabla 1).
- d) Para el muestreo de fitoplancton cuantitativo, se recolectaron muestras de la columna de agua entre los 20 m de profundidad y superficie, utilizando una manguera de 2,5 cm de diámetro. La manguera se fraccionó en cuatro estratos; superficie y 5 m; 5 -10 m; 10 – 15 m y 15 y 20 m. Las muestras de agua recolectadas en los respectivos estratos fueron fijadas con gotas de lugol. Una vez en el laboratorio, la cuantificación de *A. catenella* fue realizada con cámaras de sedimentación HYDRO-BIOS KIEL de 10 ml de volumen bajo un microscopio invertido dotado con equipo de contraste de fase (Utermöhl 1958).
- e) Las variables oceanográficas fueron registradas en cada sitio experimental. Se realizaron mediciones de temperatura, salinidad y densidad de la columna de agua utilizando un STD/CTD modelo 204 SAIV A/S desde la superficie hasta la profundidad máxima que permitiera la topografía del lugar. La posición de cada estación fue georreferenciada utilizando un GPS Garmin con el Datum WGS-84.



Resultados y discusión

Los rangos de porcentajes de enquistamiento estimados durante el periodo de alta frecuencia de muestreo en general fueron bajos para las tres localidades de estudio. Éstos oscilaron entre 0.002 y 0.906 % de la población total de *A. catenella* (Tabla 3a, Anexo 1). Las excepciones la constituyeron incrementos de un 100% cuando la población de células vegetativas no fue detectable. El flujo o tasa de producción de quistes fue de 2284 quistes /m² d¹ como máximo cuando la densidad celular máxima fue de 200.000 cél/mL (Tabla 3b, incluye memoria de cálculo).

Aunque existen pocos datos de porcentajes de enquistamiento en la literatura con los cuales comparar, los porcentajes de enquistamiento obtenidos en este estudio son similares a los reportados para *Alexandrium minutum* en el NW del mediterráneo, mientras que los valores densidad celular y flujo o producción de quistes son muy dispares. Así el porcentaje de enquistamiento (quistes de resistencia) de *A. minutum* fue menor al 1% de la población cuando la densidad celular de esta especie aumentó por sobre los 18 x 10⁶ cél/L mientras que el flujo de quistes fue de 22 a 69 x 10⁶/m² d¹ como máximo (ver Tabla 4 tomada de Garcés *et al.* 2004). Valores similares fueron encontrados para la misma especie en la Bahía de Baiona en Galicia, donde el porcentaje de enquistamiento (quistes de resistencia y pellicle) fue entre 0.01 y 0.001 % de la población cuando sus densidades máximas alcanzaron 4.2 x 10⁵ cél/L (Bravo *et al.* 2010). También se han reportado altas tasas de producción de quistes multiespecíficos, 59 morfotipos, con valores de 1.7 x10⁶ / m² d¹ en el mar Mediterráneo con variabilidad estacional e interanual (Montresor *et al.* 1998).

Sin embargo, considerando conjuntamente los muestreos de alta y baja frecuencia de este estudio, los flujos acumulados de quistes de *A. catenella* alcanzaron los 35000 quistes/m² en 36 días (i.e. I. Huichas, Tabla 3a) mientras que *A. minutum* alcanzó los 80.000 x10⁴ quistes/m² en un tiempo similar (38 días) (Tabla 4 tomada de Garcés *et al.* 2004). Siguiendo con el ejercicio, el máximo flujo acumulado por *A. minutum* durante un periodo de estudio de 51 días cuando se produjo la floración máxima de esta especie, el flujo acumulado total fue de 90.000 x10⁴ quistes/m² mientras que *A. catenella* logró llegar solo a los 133.000 quistes/m² y en el doble de tiempo, 100 días (i.e. I. Vergara, Tabla 3a).

Ambas especies parecen poseer diferentes estrategias de vida, una con floraciones intensas en periodos muy cortos mientras que la otra es estacional, pero en ambas solo una parte de la población está envuelta en el proceso de enquistamiento como se refleja en los bajos porcentajes obtenidos, ambas poseen flujos de quistes acumulados similares (sino consideramos el tiempo) y en ambas la tendencia es a mayor densidad celular mayor es la cantidad de quistes formados (nº quistes/m²). Sin embargo la interpretación de los resultados de experimentos *in situ* sigue siendo compleja debido a los siguientes factores que deben considerarse además de la falta información con la cual comparar:

- 1) Concentración celular. Aunque los resultados obtenidos y de la literatura muestran que la concentración de células vegetativas es un factor proporcional (a menor o mayor nº de células menor o mayor número de quistes), también puede actuar como factor limitante para el enquistamiento. Especies como *A. minutum* requieren de un umbral mínimo de nº de células



para que se produzca la reproducción sexual necesaria para la formación de quistes de resistencia (Tabla 4 tomada de Garcés *et al.* 2004). Si para *A. catenella* ocurriera lo mismo, es esperable entonces que a bajas concentraciones no se produzca el enquistamiento y como resultado se obtenga una muy baja tasa de producción de quistes (*i.e.* solo 2.284 quistes /m² d¹ como máximo en este estudio). Sin embargo, un flujo bajo pero constante durante el año podría ser suficiente como para mantener una población residente de *A. catenella* al menos en las localidades de Is. Huichas e I. Vergara.

Así aunque la densidad de células vegetativas sigue siendo poco representativa (o sensible) de una floración (Tabla 3b) respecto de la abundancia relativa o presencia de la microalga en la columna de agua (Tabla 5, Anexo 2), a pesar de los muestreos de alta frecuencia de 8-11 días de muestreo (bastante más que los del monitoreo que son cada 28-30 días o más) y el empleo de secciones integradas más pequeñas de la columna de agua (5 m de profundidad), los % de enquistamiento *in situ* obtenidos parecen ser representativos de los lugares de estudio. Así lo sugieren la similitud entre la abundancia relativa y densidad celular obtenidos durante el lapso experimental de alta frecuencia (Tabla 3a) si se comparan con las obtenidas durante el resto del año y en años anteriores a este estudio (ver Fig. 3)- salvo excepciones muy puntuales mayores al nivel 5 de abundancia relativa- desde que se iniciara el monitoreo en la región de Aysén en el año 2006. Otro antecedente que apoya esta hipótesis es la similitud en el contenido de quistes en los sedimentos durante el periodo baja frecuencia comparado al observado en las trampas (Tabla 3a).

- 2) Localización (características geográficas). Las altas floraciones de *A. minutum* descritas por Garcés *et al.* (2004) y Bravo *et al.* (2010), han sido en zonas muy estables (bahías cerradas) de baja profundidad (<2 m) por lo tanto es esperable que la sedimentación de quistes en las trampas sea mayor. En consecuencia, las condiciones ambientales (profundidad, intercambio de aguas) para los lugares de estudio son otro factor a considerar en las tres localidades en las que se llevó a cabo este estudio.
- 3) Ambientales. Los bajos valores de flujo de quistes obtenidos durante los muestreos de baja frecuencia a pesar de las altas densidades celulares registradas sugieren la influencia de corrientes o movimientos advectivos. Así lo sugiere también el bajo n° de quistes en los sedimentos (Tabla 3a, Anexo 3). Las tres localidades tuvieron las mismas tendencias bajas en el n° de quistes/m² de las trampas. Los muestreos de alta frecuencia probablemente minimizaron los impactos hidrodinámicos de corto plazo pues es precisamente durante el periodo de alta frecuencia de muestreo que se registró el máximo de flujo o tasa de producción de quistes en las tres localidades de estudio, el 15 de abril de 2010 (Tabla 3a), cuando comenzó a romperse la estratificación térmica observada en los 10 m superficiales la fecha anterior de muestreo (Fig. 4, Anexo 4). La tendencia hacia un aumento de la salinidad, densidad y oxígeno desde el 8 al 15 de abril, posterior descenso, observado especialmente en los 10 m superficiales con variaciones de acuerdo a la estación de muestreo, sugieren la entrada de masas de agua con una menor temperatura pero mayor salinidad, densidad y oxígeno respecto a la observada al inicio de la experiencia (Fig. 4). Hacia el final del periodo (25 de mayo 2010), las cuatro variables



registradas presentaron valores superficiales menores al iniciar el muestreo, probablemente debido a la influencia de aguas dulces.

- 4) Momento de la floración. Para *A. minutum* está descrito tanto para el trabajo del Mediterráneo (Garcés *et al.* 2004) como de Baiona donde aparece más claramente (Bravo *et al.* 2010, Fig.3 de su trabajo) que la mayor formación de quistes de resistencia ocurre hacia el final del periodo de la floración. En el caso de este estudio, existe una tendencia a un aumento del flujo o producción de quistes luego de finalizar el periodo de floración estival tardía u otoñal temprana, I. Vergara (máximo flujo de quistes de 2265 quistes/ m² d¹ el 9 julio de 2010), seguida por Is. Huichas mientras que en I. Julian se mantuvo (Tabla 3a).

Dada la falta de información al respecto con la cual comparar para el lugar de estudio, se recomienda continuar realizando experiencias en condiciones de mayor intensidad de floración, menor frecuencia de muestreo en lo posible, y con un registro de variables ambientales también de alta frecuencia o de registro continuo minimizando al máximo los efectos hidrodinámicos, de modo de determinar con mayor precisión cuál de los factores incide mayormente en los % de enquistamiento obtenidos para el lugar de estudio.



3.2. Objetivo específico 2.2. *Identificar los agentes (vectores y fómites), describir los mecanismos de propagación de A. catenella (célula vegetativa y quistes) y evaluar los riesgos de dispersión de A. catenella a través de agentes de propagación.*

Metodología

Para cumplir con los diferentes puntos de este objetivo se identificaron los vectores existentes en el ambiente natural de las tres estaciones y también se instalaron de vectores provenientes de Putemún (Centro tecnológico para la acuicultura Putemún, reserva marina), una zona ubicada en un área libre de *A. catenella* de acuerdo al REPLA.

Vectores recolectados en ambiente natural

En las mismas estaciones en que se instalaron las trampas de sedimentos y solo durante los muestreos de alta frecuencia de trampas, se recolectaron las especies bentónicas naturalmente existentes en las inmediaciones. Cholga, chorito, almeja y culengue fueron recolectadas en la estación A30 (Isla Julián) mientras que en las estaciones A31 y A32 (Islas Huichas e Isla Vergara, respectivamente) sólo fue posible recolectar chorito. La recolección de vectores se realizó mediante buceo semiautónomo y se analizó los hepatopáncreas de 4-5 ejemplares de cada vector, conjuntamente homogenizados, para cada fecha de muestreo. De esta manera cada análisis conlleva la variabilidad individual dentro de cada especie. También se analizó el cuerpo de entero de un ejemplar de cada vector solo con la finalidad de obtener antecedentes de la posible presencia de quistes en otros órganos de los vectores en estudio, y que hubiese que considerar para la interpretación de los resultados finales.

Fómites y vectores en sistema experimental *in situ*

En cada una de las estaciones en las que se fondearon las trampas de sedimentos, se instalaron tres linternas suspendidas a 16 m de profundidad y tres redes anchoveteras previamente biologizadas suspendidas cerca del fondo. El sistema de fondeo utilizado se muestra en la figura 5 y anteriormente había sido probado con éxito en un estudio que incluía un objetivo similar (Pizarro *et al.* 2009). Este sistema de fondeo fue instalado el 8 de abril de 2010 y permaneció aproximadamente 30 días en los tres sitios de muestreos. Cada 7-11 días se recolectó un número de vectores y fómites (redes) para analizar en el laboratorio con el fin de determinar la capacidad de adherencia de quistes y células de *A. catenella* en los elementos suspendidos. El sistema de fondeo utilizado se describe brevemente como sigue.

Cabe señalar que el consultor estimó la necesidad de controlar variables como la eventual permanencia de quistes “históricos” producto de la ocurrencia de floraciones anteriores, migración o emigración de los mismos en los lugares experimentales. Todo con el fin de validar la comparación



de los niveles de riesgo de fómites y vectores enfrentados a un mismo nivel de floración de *A. catenella*. Con esta experiencia se logró cruzar la totalidad de los factores involucrados en un mismo espacio - tiempo y validar los resultados.

Sistema de fondeo

El fondeo consistió en un sistema suspendido compuesto de un peso a modo de ancla de 30 kg ubicado a 16 metros de profundidad aproximadamente, sujeto a la costa (en el intermareal inferior) mediante un cabo de 8 mm. Este cabo se mantiene sumergido mediante un peso de fondeo. Desde este fondeo principal o ancla de 16 m de profundidad, se extendió una línea de suspensión principal en la columna cuyo extremo superior quedó sumergido a 5 metros de profundidad mediante una boya. Entre 3-6 linternas fueron suspendidas en las cercanías del fondo marino por medio de un mosquetón adosado a la línea principal de sujeción. De igual modo tres redes anchoveteras fueron posicionadas en el fondo, a la altura de las trampas de sedimento (16 m de profundidad). En promedio, las dimensiones de las redes fueron aproximadamente de 100 cm de largo y 30 cm de ancho. Uno de estos sistemas de fondeo fue instalado en cada una de las estaciones experimentales.

Linternas

Las linternas fueron confeccionadas con mallas comunes para almacenar cebollas y sus dimensiones fueron: base de 40 cm de diámetro moldeada con un anillo de PVC y su altura, de forma cónica, fue de 50 cm aproximadamente.

En cada linterna se colocaron entre 10-20 ejemplares tamaño comercial de cada especie de vector con la finalidad de evaluar su capacidad de captadores de células vegetativas y quistes de resistencia. Los vectores fueron choritos, almejas y choros zapato que fueron las especies disponibles en Putemún. Las linternas permanecieron en el agua por 27 días. Tras 7-11 días de permanencia *in situ*, entre 1-5 vectores que estuviesen vivos y evidentemente en buenas condiciones de sobrevivencia y aspecto, fueron recuperados, almacenados íntegramente en bolsas (con concha y viso con el fin de manipular mínimamente los individuos en terreno), etiquetados con el nombre de la estación, fecha, hora, especie de vector y puestos en una caja de plumavit con hielo y trasladados al laboratorio para su análisis.

Al cabo de los 30 días, la totalidad de las linternas (mallas) fueron extraídas y tratadas con el mínimo de manipulación y almacenadas en bolsas nylon, etiquetadas y enviadas a análisis de quistes en el laboratorio. La finalidad de esta actividad fue identificar otro tipo de medio de propagación de quistes de *A. catenella* u otra especie de microalga nociva, además de las redes anchoveteras.



Redes

Tras 7-11 días de permanencia *in situ*, se recuperó una de un total de tres redes por estación experimental. Estas fueron almacenadas íntegra e individualmente en bolsas ziploc para evitar la mayor manipulación posible al ser transportados al laboratorio para el análisis de quistes y formas vegetativas de *A. catenella*. Las muestras fueron debidamente etiquetadas con el número y nombre de la estación, el número de la red y la fecha de su retiro desde el sistema de fondeo, y conservadas en frío y oscuridad hasta su análisis en el laboratorio.

Metodología de análisis de quistes y fase vegetativa adheridos a vectores, fómites y pseudofecas

Vectores

La metodología de extracción de hepatopáncreas utilizada, es la descrita para la detección de las toxinas lipofílicas en hepatopáncreas por el bioensayo de ratón utilizada por el Laboratorio de Referencia de la Comunidad Europea (2007). La metodología había sido probada anteriormente con éxito pero ante una intensidad de floración de *A. catenella* nivel 8 que ocurrió en abril de 2009 (Pizarro *et al.* 2009). Ante la baja abundancia relativa de *A. catenella* encontrada en general en el lugar de estudio, se consideró poner a prueba el nivel de toxicidad de los moluscos del lugar que arroja el monitoreo de marea roja regular en el sector de estudio (44-131, promedio $66 \pm 19 \mu\text{g STX eq} * 100 \text{ g}^{-1}$, Guzmán *et al.* 2011) como indicador de la alta probabilidad de encontrar quistes de la microalga en el interior de los moluscos. Efectivamente, esta suposición fue positiva lo que nos permitió evaluar la metodología para la estimación de quistes en los hepatopáncreas frente a una intensidad de floración de *A. catenella* menor al 50% de la intensidad máxima histórica ocurrida en Aysén durante el 2009. Además de los análisis realizados en el hepatopáncreas de los moluscos recuperados desde las linternas, se analizaron los hepatopáncreas y el cuerpo entero de moluscos provenientes naturalmente de los lugares de estudio.

Se debe recordar que los quistes de resistencia son parte del ciclo de vida de *A. catenella* y su formación se produce naturalmente en el medio ambiente. En consecuencia es poco probable que se produzcan en el interior de los moluscos. Esta circunstancia hace suponer que los quistes son en su mayoría filtrados desde el medio ambiente. Por lo mismo, niveles bajos de *A. catenella* en el ambiente como los mostrados en las Tablas 2a y 2b, hacían presagiar una baja probabilidad de encontrar quistes en el interior de los moluscos y probabilidades nulas cuando los niveles de abundancia relativa eran “ausencia” de la microalga. Bajo estas circunstancias era importante probar otro indicador de encontrar quistes en el interior de los hepatopáncreas, aun cuando la abundancia fuera baja o nula.

Bajo estas circunstancias, durante el experimento *in situ* tampoco se realizó un lavado externo de los ejemplares a bordo de la embarcación inmediatamente después de recolectados *in situ* para evitar al



m3ximo la manipulaci3n de los individuos sometidos a una baja intensidad de floraci3n ocurrida durante el periodo experimental como estaba propuesto inicialmente (niveles de abundancia relativa entre 1-3, Tabla 2a, b). Como tampoco se produjo una floraci3n intensa de *A. catenella* posterior a los muestreos experimentales *in situ* de alta frecuencia, el examen de biso y valvas se realiz3 luego de someter a mitilidos (choritos) a altas concentraciones de cultivo *in vitro* de mezcla de cepas de *A. catenella* de manera de cumplir con la actividad comprometida en la propuesta t3cnica inicial. Una mezcla de cepas de *A. catenella* es la mejor aproximaci3n de la condici3n de las poblaciones de esta microalga en el medio ambiente, adem3s de asegurar la formaci3n de quistes viables (e.g. Figueroa *et al.* 2005, H3garet *et al.* 2008) y evitar la variabilidad de las cepas si se utilizaran aisladamente. Con esta estrategia experimental se aseguraba minimizar el efecto de otras variables difciles de controlar sobre las partes externas y especialmente pseudofecas (rica en materia org3nica) de modo que los resultados reflejaran el nivel de abundancia relativa de *A. catenella in situ* y no fueran producto de un artefacto de manipulaci3n o descomposici3n r3pida o por la lejanía de los lugares de recolecci3n al laboratorio, proceso que ocurre en los mismos una vez sacados del agua.

Valvas, biso, pseudofecas y partes internas del vector (metodología aplicada *in vitro*)

Par lograr describir los mecanismos de propagaci3n de la microalga (c3lula vegetativa y quistes) tanto interna como por las partes externas de los vectores, se analizaron los siguientes aspectos:

La no ocurrencia de una floraci3n intensa y sostenida en el tiempo de *A. catenella* y en estaciones cercanas al laboratorio para evitar descomposici3n o procesos enzim3ticos durante el periodo de estudio, determin3 que esta actividad fuera realizada en condiciones experimentales controladas *in vitro* en vez de utilizar un sistema cerrado de piscinas experimentales con circulaci3n permanente de agua filtrada ubicadas en Putem3n, lugar lejano al sector de estudio. En este lugar los vectores identificados como agentes portadores de esta microalga serían mantenidos en ayuna controlando los quistes y eventuales c3lulas vegetativas contenidas en las pseudofecas mediante observaci3n bajo microscopio 3ptico. Tambi3n se evalu3 la no conveniencia de realizar estos experimentos en una reserva marina como la propuesta inicialmente debido a que los vol3menes de cultivo de *A. catenella* debían ser al menos similares a los que ocurren en condiciones naturales en periodos de intensa floraci3n. Otra dificultad fue que el escalamiento de los cultivos debía ser un volumen tal como para que alcanzara a cubrir el volumen de la infraestructura, a3n en un sistema cerrado, ofrecida en la reserva marina de Putem3n. Por estos motivos es que se opt3 como alternativa, realizar la actividad a una escala menor y con condiciones controlables *in vitro*.

Así, la recolecci3n de choritos vivos (*Mytilus chilensis* Hup3 1854) fue realizada en el Estrecho de Magallanes y mantenidos en agua de mar filtrada (filtros Whatman 0.7 μm nominal) con burbujeo al menos durante 48 horas y a temperatura de 16 $^{\circ}\text{C}$, 12:12 horas luz: oscuridad, para que depuraran las algas consumidas previamente y aclimatarlas a condiciones experimentales.

Luego del periodo de aclimataci3n, los ejemplares seleccionados (1-3 seg3n concentraci3n de microalga) fueron puestos en vasos precipitados de 500 mL con 350-400 mL de mezcla de cepas de



A. catenella procedentes de Aysén (ACA12₂ x ACA12₃ = m1) y de Aysén y Magallanes (ACM43₄ x ACM35₃ x ACA12₃ = m2), respectivamente, por 48-72 horas sin burbujeo (Fig. 6).

Las concentraciones de la mezcla de cepas de *A. catenella* fueron similares o mayores a las ocurridas durante una intensa de floración: sobre los 534 células/mL, valor máximo de densidad reportado durante el 2009 para el nivel de toxicidad de 9 en el caso de Aysén, o sobre las 91 células/mL que fue el valor máximo de densidad para un nivel 6 de toxicidad en el caso de Magallanes (Guzmán *et al.* 2010). Así se obtuvieron tres concentraciones de acuerdo a los cultivos disponibles: 90 y 1575 células/mL de m1, y 2510 células/mL de m2.

Acabado el periodo de exposición de los choritos a *A. catenella*, los ejemplares fueron trasvasijados a recipientes con agua de mar filtrada por 24 horas para finalmente analizar el bio-sustrato bajo microscopio (luz normal y epifluorescencia) en busca de las células y/o quistes y estado de éstos. A los ejemplares trasvasijados se les extrajo el biso y enseguida se lavó cada ejemplar individualmente, con sus valvas cerradas, en agua de mar filtrada limpia. En ejemplares réplicas fueron extraídas las branquias, el manto y el hepatopáncreas y puestos individualmente en tubos plásticos prepesados con 5 mL de agua de mar filtrada. También se observó el agua de los contenedores tras retirar los ejemplares de choritos incubados en *A. catenella* para confirmar la presencia de células en el agua.

El agua de mar conteniendo las pseudofecas y aquella del lavado de valvas fueron filtradas por red de 103 y 25 µm consecutivamente mientras el biso, branquias y manto fueron sonicados por 2-3 min antes de filtrar. La fracción retenida en la malla de 25 µm fue vertida a un vaso precipitado. Entonces se extrajo una alícuota de cada muestra para ser observados bajo microscopio óptico. El hepatopáncreas fue molido antes de sonicar y filtrar para ser observado por microscopía óptica según se describe en el siguiente punto.

En el caso de las pseudofecas, el filtrado de agua se realizó directamente sobre la red de 25 µm y el concentrado fue vertido en un vaso precipitado, mezclado con intensidad para disgregar el material orgánico y entonces enrasado a un volumen conocido. Luego de homogenizar, se contabilizó el número de quistes en una cámara de Sedgewick-Rafter, analizando tres cámaras por muestra bajo microscopio. Los resultados se promediaron y se extrapolaron al volumen inicial conocido. Los resultados se expresan en número total de quistes por ejemplar.

Extracción y análisis de hepatopáncreas de moluscos (metodología aplicada)

Para el análisis de los hepatopáncreas, estos se extrajeron en un determinado número de ejemplares por vector y periodo de muestreo, y homogenizados conjuntamente de modo que los resultados de cada análisis incorporan la variabilidad individual de las especies de vectores utilizados en este estudio. La extracción de los hepatopáncreas se realizó como sigue. Las valvas de cada vector fueron abiertas cortando el músculo aductor, evitando dañar los tejidos blandos. Los hepatopáncreas se extrajeron con una tijera tratando de remover toda la porción del manto, para



luego ser secados con papel absorbente. De esta manera se aseguró que la procedencia de los quistes fuera única y exclusivamente del contenido digestivo y no de otras partes blandas del ejemplar.

Los hepatopáncreas se pesaron utilizando una balanza con precisión de 0.1 gramo y fueron homogenizados con agua de mar filtrada (1 μm) utilizando un Ultra-Turrax por un periodo de 1 minuto. La mezcla fue filtrada a través de un tamiz de 106 y 25 μm consecutivamente. El material retenido en el tamiz de 25 μm se traspasó a un vaso precipitado, y se procedió a sonicar por un periodo de 30 segundos. Luego se filtró por segunda vez con un tamiz de 25 μm . El material retenido fue transferido a un vaso precipitado para enrasar a un volumen final de 10 mL con agua de mar filtrada. Se contabilizó el número de quistes en una cámara de Sedgewick-Rafter, analizando tres cámaras por muestra bajo un microscopio de contraste de fase. Los resultados se promedian y se extrapolan al volumen inicial de 10 mL. Los resultados se expresarán en número total de quistes por gramo de hepatopáncreas por especie de vector.

Fómites: Redes y mallas de linternas como otros elementos de propagación de *A. catenella* (metodología aplicada)

Para extraer los quistes de las redes y mallas de linternas (fómites), cada una de éstos se colocó en un recipiente plástico cubriéndolas con agua de mar filtrada. Cada recipiente se sonicó por un periodo de tiempo variable dependiendo de las dimensiones de los elementos y de la cantidad de material particulado adherido. Cada elemento se lavó en forma individual y en su totalidad (sin extraer trozos de los mismos). Después del lavado se procedió a medir las dimensiones: Largo, ancho, alto o diámetro de la trama según procedía.

El agua de mar de lavado de las redes y mallas de linternas fue filtrada por un tamiz de 106 y 25 micrones consecutivamente. El material retenido en el tamiz de 25 μm se traspasó a un vaso precipitado para enrasar a un volumen final conocido con agua de mar filtrada. Se contabilizó el número de quistes en una cámara de Sedgewick-Rafter, analizando tres cámaras por muestra bajo un microscopio de contraste de fase y promediando. Los resultados se expresarán como número total de quistes por fómite.

Resultados y discusión

Vectores

Los quistes de resistencia de *A. catenella* en hepatopáncreas de cinco ejemplares de cada especie de molusco (cholga, chorito, almeja y culengue) naturalmente presentes en los tres lugares de estudio para cada fecha de muestreo se muestran en la Tabla 6. Los quistes de resistencia solo fueron observados en los hepatopáncreas de tres de los cuatro vectores: Cholga, chorito y culengue, siendo la cholga el vector con mayor registro de quistes (25 quistes/g) seguidos por chorito y culengue (1 y 1 quistes/g, respectivamente). Dada la baja abundancia relativa de *A. catenella* en la



columna de agua, no se observa una relación estrecha con el contenido de quistes en los vectores (Tabla 6) aun considerando la abundancia relativa en la columna de agua previo a la fecha del primer muestreo de moluscos (Tabla 5).

El contenido de quistes de *A. catenella* en los moluscos analizados en cuerpo entero fue nulo. Las diferencias observadas entre el número de quistes encontrados en el hepatopáncreas y el molusco entero probablemente se deban a un artefacto por efecto de dilución de las muestras de cuerpos enteros cuyo volumen es mayor respecto al del hepatopáncreas. Así lo sugiere el bajo número de quistes encontrados en los hepatopáncreas, órgano donde se concentra el material particulado que filtran los moluscos.

Cabe hacer notar que si bien las abundancias relativas (< 2 durante el periodo de experimentación *in situ* en este estudio) no fueron de la intensidad esperada en referencia a las floraciones ocurridas durante marzo-abril de 2009 (> 5), mientras que los niveles de toxicidad encontrados en los moluscos centinelas aunque bajos y sub-letales (< 131 µg STX eq * 100 g⁻¹), los resultados aquí obtenidos sugieren que el nivel de toxicidad es un buen indicador de la presencia de quistes en los hepatopáncreas de los moluscos especialmente cuando las abundancias relativas observadas son residuales, vale decir observadas al término de un periodo de floración de mayor abundancia relativa, hipótesis que puede ser evaluada con estudios dirigidos específicamente para este propósito.

De los moluscos transportados desde el Estero de Putemún, Chiloé: Choro zapato, chorito y almeja, expuestos experimentalmente durante la floración de *A. catenella* en las tres localidades de estudio, todos presentaron quistes en sus hepatopáncreas (Tabla 7), siendo el choro zapato el vector con mayor registro de quistes de resistencia en las tres localidades (5-33 quistes/g), seguido por el chorito (en dos localidades, 1-3 quistes/g) y finalmente la almeja (en una localidad, 3 quistes/g).

Estos resultados sugieren diferentes niveles naturales de resistencia a *A. catenella*: Chorito y culengue más resistentes a *A. catenella* que la cholga. Tal sugerencia es apoyada al observar una mayor frecuencia de quistes en los hepatopáncreas de los vectores introducidos que en los vectores locales frente a las mismas abundancias relativas (Tablas 7 y 8). Tal “resistencia” pudiese ser reflejo de una menor tasa de filtración, sea natural o bien provocada por el cierre de valvas. Sin embargo, tales diferencias son difíciles de explicar por la falta de antecedentes en este aspecto para el sector de estudio. En base a trabajos realizados en otras partes del mundo la diferencia observada podría deberse a una resistencia adquirida por los moluscos expuestos constantemente a especies productoras de veneno paralizante de los mariscos (e.g. Bricelj *et al* 2005, 2010), en nuestro caso *A. catenella*. De modo que además de la resistencia natural, una resistencia específica adquirida podría estar ocurriendo aunque los mecanismos se desconocen. Así la diferencia adquirida por las especies procedentes del sector de estudio podrían traducirse en la rapidez en la expulsión de los quistes y células, o evitar la filtración mediante el cierre de sus valvas (e.g. Bricelj *et al* 2005) o filtrar agua con altas densidades de fitoplancton (e.g. Guéguen *et al.* 2008) ya que es conocido el bajo porcentaje de células de *A. catenella* frente al fitoplancton total. Un ejemplo lo constituye el bajo porcentaje de *A.*



catenella (< 2 %) respecto del total de fitoplancton filtrado encontrado en un alto volumen filtrado durante los cruceros en wellboats realizados en este proyecto (Tabla 8).

Tanto las partes internas y externas analizadas en los choritos expuestos *in vitro* en las tres concentraciones de cultivo de *A. catenella* (Tabla 9) solo presentaron quistes temporales y en buen estado fisiológico de acuerdo a la epifluorescencia emitida (Figs. 7a,b). Las valvas, biso y bio-sustrato (más pseudofecas) fueron los componentes que registraron quistes, no así las branquias, manto ni hepatopáncreas. Luego las valvas presentaron tanto presencia de quistes como células vivas mientras en el biso se contabilizaron hasta 300 quistes/biso. En el bio-sustrato generado por los choritos 24 horas después de permanecer en agua de mar filtrada sin *A. catenella*, se logró contabilizar hasta 7467 quistes/chorito y 800 cél vivas/chorito. A las 72 horas, el bio-sustrato presentó entre 30 y 140 quistes/chorito.

Fómites

Los fómites: Redes y linternas, ambos tipos de implementos presentaron quistes de resistencia viables de *A. catenella*. Las redes (n=1) presentaron entre 167 y 308 quistes/m² (Tabla 10) mientras las linternas presentaron entre 62-261 quistes/m² (n=3-6) (Tabla 11). La captación de quistes por ambos tipos de fómites parece ser dependiente tanto del lugar como del material de los fómites. Así, en I. Julián, tanto redes como linternas presentaron quistes aunque el mayor número de quistes fue observado en las primeras, mientras que en I. Vergara el mayor número de quistes fue observado en las linternas. Distinta fue la situación en Is. Huichas donde solo las linternas presentaron quistes.

Descripción y evaluación

Aunque existen diferencias específicas entre los vectores analizados y entre aquellos que son residentes del lugar respecto a los que no, las cuatro especies de moluscos representan un riesgo potencial de propagación de *A. catenella* como lo sugieren los diferentes contenidos de quistes encontrados en el hepatopáncreas, valvas, biso y sobre todo en los pellets fecales. Esta última parece ser la vía más efectiva de expulsión de *A. catenella* como lo registraron los datos de choritos expuestos a cultivos de cepas de *A. catenella in vitro* incluso después de 72 horas. Sin embargo, esta vía de evacuación puede ser extrapolada a las otras especies de moluscos analizadas en este estudio. Hégaret *et al.* (2008) encontró abundantes quistes temporales y células móviles de *A. fundyense* en pellets fecales de *Mercenaria mercenaria* (almeja), *Argopecten irradians* (ostión), *Crassostrea virginica* (ostra) y *Mytilus edulis* (chorito) luego de 24 horas de ser removidas a agua de mar ultrafiltrada desde condiciones que simulaban una intensa floración.

Externamente, las valvas y el biso, también constituirían potenciales riesgos de propagación de *A. catenella* así como aparejos de pesca y acuicultura como: redes y linternas, aún cuando la floración ocurrida durante el periodo de experimentación fue solo de nivel 3 (regular, Tabla 2a) como máximo. Durante el 2009 para las mismas localidades se encontraron magnitudes dos y tres veces mayores:



214-5334 quistes/red luego de ocurrida una floración de intensidad 8 (ultra abundante) (Pizarro *et al.* 2009). Estos datos sugieren nuevamente que el factor concentración o intensidad de la floración es importante en el caso de los fómites.

Igualmente para los moluscos también es significativo el factor concentración, aunque no en la misma magnitud. En el caso de los choritos, si se compara el contenido de quistes de resistencia/g hepatopáncreas obtenidos en este estudio (nivel regular 3) con aquellos valores obtenidos durante la floración nivel 8 (11-17 quistes/g hepatopáncreas) (Pizarro *et al.* 2009), los valores fueron solo un orden de magnitud menores. No hay duda que los mecanismos que poseen los moluscos para eliminar las microalgas o cerrarse ante floraciones intensas, es un factor que puede responder a las diferencias de magnitud observadas entre los contenido de quistes en moluscos y fómites.



3.3. Objetivo específico 2.3. *Evaluar los distintos mecanismos de eliminación o de destrucción de A. catenella (quistes y forma vegetativa) adheridos y/o incluidos en transvectores y en estructuras (fómites).*

Metodología

Para cumplir con este objetivo se realizó una revisión bibliográfica disponible. Aunque la mayor parte de ella está relacionada con el tratamiento de aguas lastre, las metodologías en su mayoría son aplicables para el tratamiento de vectores y fómites como potenciales riesgos de propagación de especies declaradas plagas por el REPLA.

En este punto es necesario recalcar, que la revisión bibliográfica confirma la carencia de información y evaluaciones en general en nuestro país y para nuestras cepas, orientadas a la eliminación de *A. catenella*, de modo que lo más efectivo para el logro del objetivo del proyecto era tener referentes de problemas similares o análogos con medidas de mitigación para el medio ambiente y la industria de la acuicultura en nuestro país que estuviesen operando actualmente. Si bien no necesariamente eran aplicables a los propósitos de este proyecto, tampoco eran descartables *a priori* sin una comprobación técnico científica adecuada. En este sentido, es que se han utilizado los valores considerados en las actuales resoluciones vigentes para la protección del medio ambiente frente al fuerte desarrollo de la acuicultura en nuestro país. Estos valores fueron utilizados para establecer los valores umbrales de los diferentes elementos considerados a evaluar o de lo contrario resulta en una situación altamente dependiente del azar con implicancias importantes de inversión de tiempo y recursos que son limitados. Mediante esta estrategia, la evaluación de los elementos de eliminación, entrega los antecedentes necesarios a la hora de cruzar normativas que están operando en nuestro país, que aunque destinadas a objetivos diferentes, repercuten en los costos de su implementación en el corto plazo, y además presentan ventajas comparativas comprobadas de viabilidad, oportunidad, servicios técnicos y eficacia por su aplicabilidad a más de un propósito, todos elementos considerados importantes a la hora de implementar tales metodologías en países como el nuestro. La búsqueda de los umbrales de los elementos ha requerido la repetición de varios experimentos durante el transcurso de desarrollo del proyecto y por ello las concentraciones de cultivos de mezclas de cepas aunque diferentes son similares, trabajo que lleva inversión de tiempo para establecer los cultivos hasta alcanzar su fase exponencial (12-16 días después de realizada la inoculación) cada vez que se han requerido.

Tras la revisión bibliográfica se procedió a evaluar el acceso y disponibilidad de diferentes elementos (sección que sigue) para establecer experimentalmente su grado de efectividad para ser utilizados en la eliminación y/o desnaturalización de quistes y células de *A. catenella*, así como las técnicas más adecuadas para tratar recursos vivos sin alterar sus condiciones de salubridad, aspecto, sabor y valor alimenticio.



Técnicas utilizadas mundialmente

Las más comunes, efectivas y factibles de aplicar rápidamente han sido los tratamientos físicos (Doblinand & Dobbs 2006) y así lo constatamos durante nuestras evaluaciones. No obstante su aplicación dependerá del tipo de elemento que debe ser sometido a tratamiento de modo de no alterar, como en el caso de los moluscos u otro recurso para el consumo, su aspecto, sabor y salubridad, alteraciones que para el caso de los fómites no representan un problema.

Tratamiento de fómites

Las técnicas están basadas en el trabajo de Gavand *et al.* (2007) para ser aplicadas a aguas de lastre. Este autor utilizó tratamientos individuales y combinados de ultrasonido, peróxido de hidrógeno y ozono para destruir células nocivas y quistes de *Dunaliella tertiolecta* y *Artemia salina*. La mortalidad a los 5 min fue entre 14 y 17% para cualquiera de los 3 tratamientos. A los 20 minutos de tratamientos individuales la mortalidad aumentó a más de 40% mientras que al utilizar tratamientos combinados (ultrasonido y peróxido de hidrógeno; ultrasonido y ozono; peróxido de hidrógeno y ozono) la mortalidad aumentó alrededor de 80%. Valores cercanos al 100% de mortalidad fueron observados al utilizar la mezcla de los tres tratamientos.

También existe el empleo de filtros para tratar las aguas a través de una serie de tamices, desde 250 a 20 μm que ha resultado efectivo (SWRCB, 2002). Este es aplicable principalmente en aguas de lastre o de transporte de organismos vivos. La técnica ha demostrado que el uso de 2 filtros de 2 μm remueve efectivamente un 95 % de zooplancton y entre un 70 y 80% de fitoplancton (<http://www.vemw.org/abstracts.htm>).

Otra técnica descrita en la literatura, utilizada mayormente en el tratamiento de aguas para cultivos en Hatchery, microalgas y de lastre, es la radiación UV por sus efectos germicidas. Su efectividad depende de rango de longitud de onda del UV (A, B, C), tiempo, intensidad de la exposición (Cairns 2001, Sutherland *et al.* 2001) y de la transparencia del agua debido a que el material en suspensión absorbe fuertemente la radiación UV (e.g. SWRCB 2002; Montecino & Pizarro 1995). Estas técnicas son altamente factibles de ser utilizadas en la destrucción de las células y quistes de *A. catenella* en aguas de wellboats y barcos cisternas en general así como en aguas efluentes de plantas procesadoras y de desarenado.

Alzas de la temperatura de agua de 40-45 °C por 30 a 90 segundos también han probado ser efectivas para la mortalidad de quistes de *Gymnodinium catenatum* (Bolch & Hallegraef 1993).

En la actualidad, existen medidas de bioseguridad en Chile con la finalidad de inactivar el virus causante de la anemia infecciosa del salmón (ISAV). Estas medidas son normadas y fiscalizadas por la Unidad de Acuicultura de SERNAPESCA (Resolución N°776, 2008, SERNAPESCA) a todo equipo, buzo, material y embarcación que entra y sale de los centros de cultivo. En este caso los



elementos de bioseguridad utilizados son el di3xido de cloro, hipoclorito de sodio, yodof3ros, temperaturas por sobre los 55 °C, radiaci3n UV y/o ultrasonido.

Todas estas t3cnicas son aplicables a f3mites y agua (efluentes de plantas procesadoras, de desarenado, de wellboats) pero no todas son aplicables directamente a los recursos vivos.

Tratamiento de recursos vivos

En el caso de los recursos vivos, una vez identificados los vectores y descritos los mecanismos por los cuales podr3an constituir un riesgo para la propagaci3n de *A. catenella*, pueden dividirse en dos tipos de tratamiento: aquellos aplicados directamente sobre los organismos y aquellas aplicadas sobre sus desechos org3nicos (i.e. pseudofecas, bio-sustratos generados despu3s de procesos depuraci3n, desarenado) o riles derivados de su procesamiento. Entre las primeras est3n las t3cnicas f3sicas: lavado, UV, ozono, ultrasonido mientras que para los desechos org3nicos y riles pueden aplicarse las t3cnicas f3sicas y qu3micas, o combinaci3n de ellas, como las utilizadas en el tratamiento de aguas lastre, y que podr3an ser utilizadas en aguas residuales y transporte de organismos vivos o wellboats.

Evaluaci3n experimental de t3cnicas seleccionadas en la destrucci3n de c3lulas y quistes de *A. catenella*

Considerando la literatura disponible y las normativas vigentes en Chile en relaci3n a tratamiento de aguas de transporte de organismos acu3ticos vivos, los diferentes elementos seleccionados para ser evaluados experimentalmente fueron: **1) Temperatura >20 °C; 2) salinidad <25 ppm; 3) ozono ; 4) radiaci3n UV (A, B, C); 5) ultrasonido; 6) filtros y 7) Cloraci3n (hipoclorito de sodio).**

Aunque el per3xido de hidr3geno ha sido aplicado experimentalmente con 3xito en laboratorio para la destrucci3n de c3lulas vegetativas y quistes de dinoflagelados entre ellos *A. catenella* (i.e. Ichikawa *et al.* 1993, Montani *et al.* 1995) y en aguas de lastre (Bolch & Hallegraeff 1993), la falta de estudios de sus efectos en el medio ambiente as3 como la capacidad de carga de los cuerpos de agua y falta de especificidad este elemento, no fue considerado finalmente para evaluaci3n experimental en este estudio.

En general, los yodof3ros son aplicados para pediluvio y maniluvio como medida de higiene de modo que tampoco fue considerado finalmente para una evaluaci3n experimental en este estudio.

En el caso del di3xido de cloro, la normativa (Res. 1882/08, Anexo 5) establece una concentraci3n referencial de 100 mg/L con un tiempo de retenci3n de 5 minutos siempre que la concentraci3n de s3lidos suspendidos sea menor a 200 m/L para aplicar a los residuos l3quidos y s3lidos de plantas de proceso. As3 tambi3n, la literatura se3ala una dosis de 60 mg/L para inhibir la germinaci3n de quistes de dinoflagelados del g3nero *Alexandrium* (Pati & Belmonte 2007).



Sin embargo, di3xido de cloro no fue posible evaluarlo experimentalmente en las condiciones de laboratorio utilizadas para este estudio pues el di3xido de cloro no se vende como un producto listo para su uso y es inestable. Requiere de un proceso de generaci3n *in situ*, a trav3s de generadores especiales y su producci3n y manejo involucran complejidad y riesgos. (<http://www.bvsde.paho.org/bvsacg/fulltext/desinfeccion/capitulo7.pdf>).

Si bien en las naves wellboats utilizan un desinfectante, luego de un lavado previo con detergente, a base de un di3xido de cloro estabilizado al 5% ("Clorodos", Anexo 6), detergente que en este caso es utilizado en las naves en una concentraci3n m3nima de 200 ppm o mg/L por 25 minutos, igual que el cloro puesto que es el compuesto activo y por el cual se controla la concentraci3n en el agua.

As3, tras la revisi3n bibliogr3fica y evaluar la factibilidad de llevar a cabo los experimentos para el desarrollo del estudio, finalmente fueron 7 los elementos seleccionados para ser evaluados experimentalmente.

Aplicaci3n de elementos sobre cultivos de c3lulas vegetativas de *A. catenella*

El dise1o experimental para poner a prueba los diferentes elementos seleccionados en la eliminaci3n de c3lulas vegetativas de *A. catenella*, consisti3 en exponer vol3menes de cultivos de cepas en fase exponencial para asegurar las condiciones 3ptimas de las c3lulas, a diferentes dosis de los elementos mencionados. Una mezcla de cepas de *A. catenella* es la mejor aproximaci3n de emular las poblaciones de esta microalga en el medio ambiente, adem3s de asegurar la formaci3n de quistes viables (*e.g.* Figueroa et al. 2005, H3garet et al 2008). Para los elementos temperatura, salinidad, ozono y ultrasonido, se utiliz3 entre 40-60 ml de cultivo. El cultivo fue establecido a partir de tres cepas iniciales, una de Ays3n (ACA50) de Isla Tronador y dos de Magallanes (ACM35₄, ACM43₃) provenientes del Estrecho de Magallanes y Canal Beagle, respectivamente. Para los otros elementos o repetic3n de experimentos (caso de ultrasonido), las cepas se indican respectivamente en cada secci3n. Todas las cepas fueron mantenidas en el laboratorio de Punta Arenas. Los gradientes, dosis y/o tiempo de exposici3n de cada elemento fueron establecidos a partir de las indicadas en la literatura y/o normativa vigente para el tratamiento de aguas de transporte de organismos acu3ticos vivos o limpieza y desinfecci3n en nuestro pa3s (*i.e.* Res. 776 del 2008, Res. EX. 2327/10, SERNAPESCA, Anexo 7).

Como antecedente, la densidad de *A. catenella* en nuestros cultivos de mezcla en fase estacionaria, fue mayor a las 10.000 c3lulas / mL como m3nimo, dependiendo de las cepas, valores concordantes con los reportados en la literatura para cepas chilenas (*e.g.* Navarro et al. 2006), de modo que al momento de utilizar los cultivos para la evaluaci3n de los elementos, la concentraci3n de c3lulas fue siempre menor a la se1alada para la fase estacionaria.

La evaluaci3n de las t3cnicas, tras un tiempo de aplicado cada tratamiento, son cuantificadas mediante la observaci3n de *A. catenella* y/o quistes bajo microscopio con epifluorescencia *in vivo* (excitaci3n radiaci3n UV-azul, emisi3n luz roja para visualizaci3n de la clorofila-a) (H3garet et al. 2008) y



otros pigmentos en el caso de la aplicación de elementos de rápida acción (e.g. cloración). El efecto de mayor plazo de otros elementos (e.g. temperatura, salinidad, UV, ozono,) se realizó fundamentalmente mediante el control postratamiento periódico de la viabilidad de las células vegetativas tratadas, pues reflejó su capacidad para remontar el crecimiento inicial mediante división vegetativa.

Para el control postratamiento, tanto las microalgas tratadas como no tratadas (T0 o controles) fueron mantenidas en condiciones estándares u óptimas de crecimiento en las que se mantiene la colección de cultivos de *A. catenella* (temperatura 16 °C, fotoperiodo 12:12 horas luz:oscuridad, luz 50 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en una cámara de incubación.

1) Temperatura

Se estableció un gradiente de cuatro niveles de temperatura en base al criterio de > 50 °C de normativas vigente en Chile (Resolución N°776, 2008, SERNAPESCA) y efectividad experimental reportada por la literatura (i.e. Hallegraef *et al.* 1997): 25, 35, 45 y 60 °C. Este gradiente fue obtenido mediante un set de placas calefactoras (AM4, VELP SCIENTIFICA) y un baño digital termo-regulado (ISO -TEMP 220, 15 litros). Para los diferentes gradientes de temperatura se empleó un matraz de 100 mL con 40 mL de cultivo. Una alícuota de 1 mL en triplicado fue puesto en tubos eppendorf antes de iniciar el tratamiento (control T0, i.e. sin tratamiento de alza de temperatura previo), mientras el resto de las submuestras fueron recolectadas tras un tiempo variable de permanencia (hasta 50 minutos) en cada una de las temperaturas previamente establecidas. El efecto térmico fue controlado tras una semana de permanencia de los tubos eppendorf en condiciones estándares de cultivo (16 °C, 12:12 L:O) y comparados con el control T0 (sin tratamiento térmico). Se realizaron tres experimentos: El primero incluyó la temperatura de 25 °C para la búsqueda del umbral de efecto, el segundo incluyó la temperatura máxima para confirmar efecto, mientras que el tercero incluyó las temperaturas de 35 y 45 °C tras evaluar los resultados del primer y segundo experimento. Los resultados se muestran en tablas (indicando significancia estadística) y gráficos de columnas son el promedio de tres réplicas. La desviación estándar es indicada en cada tabla así como sobre cada columna de la figura.

2) Salinidad

El gradiente de salinidad fue generado mediante la dilución, de agua de mar filtrada por 0.2 μm , con agua MQ y posteriormente enriquecida con medio L1 para eliminar el efecto de la dilución de nutrientes incluyendo el control. Se experimentó con un gradiente de siete concentraciones generados en base al criterio de < 20 ppm o psu recomendado por el protocolo de traslados del REPLA (D.S. MINECON N°345/2005): 2, 6, 9.1, 10, 15, 20, y 31 psu. Los gradientes fueron medidos con un conductímetro portátil (YSI 30) en unidades de μS o ppt y traspasadas a unidades conocidas de psu confirmando las conversiones con una escala de conversión de libre acceso (http://www.sensordev.com/PSU_vs_Conductivity.xls) de acuerdo a la temperatura. En búsqueda de la concentración umbral se experimentó inicialmente con las cuatro últimas concentraciones (experimento Sal 1) cuyos resultados fueron negativos. De aquí que se experimentó con concentraciones menores (experimento Sal 2) considerando siempre la concentración de 31 PSU como control en cada experimento. Los resultados se muestran en tablas (indicando significancia



estadística) y gráficos de columnas son el promedio de tres réplicas. La desviación estándar es indicada en cada tabla así como sobre cada columna de la figura.

Para cada gradiente de salinidad se empleó un matraz de 100 mL con 40 mL de cultivo en triplicado y se mantuvieron en condiciones estándares de cultivo (16 °C, 12:12 L:O). El efecto de cada nivel de salinidad fue evaluado mediante el conteo de células vivas y muertas observadas en una alícuota de 50 μ L en triplicado bajo microscopio óptico. Los resultados fueron comparados con el control de 31 PSU en el que se mantienen las cepas en cultivo en nuestro laboratorio.

3) Ozono

El gradiente de dosis de ozono aplicado al cultivo de *A. catenella*, fueron obtenidas mediante el generador de ozono portátil OZX-300AT, con especificaciones de producción mínima de 10 mg/ hr. Según la normativa vigente para tratamientos de residuos líquidos aplicables a plantas de proceso (Res. 1882/08, Anexo 5), las concentraciones de ozono debieran ser mayores a 0.3 mg/L por un periodo de retención de 3 minutos mientras que el Programa Sanitario General de Limpieza y Desinfección aplicable a la Producción de Peces (PSGL) (Res. EX.2327/10, Anexo 7) establece una dosis mínima de desinfección, i.e. CT de ozono de 1.6 mg/L (donde C es concentración en mg/L y T tiempo en minutos) para el tratamiento de aguas empleadas por las embarcaciones en operaciones de transporte de peces vivos cuya finalidad es evitar la introducción de enfermedades de alto riesgo para las especies hidrobiológicas. Los resultados se muestran en tablas (indicando significancia estadística) y gráficos de columnas son el promedio de tres réplicas. La desviación estándar es indicada en cada tabla así como sobre cada columna de la figura.

En base a estos datos se experimentó inicialmente con cuatro tiempos de exposición: 1, 2, 3, 4, minutos (experimento 1) en busca de la dosis umbral pero no hubo resultados negativos, razón por la cual se experimentó con otros cinco tiempos para lograr dosis mayores: 5, 10, 25, 35, 55 minutos (experimentos 2 y 3). Las concentraciones fueron determinadas mediante calibración a 1 minuto de exposición directamente en 1L de agua luego del tiempo de aplicación mediante un kit colorimétrico (CHEKIT Comparator-kit Lovibond Water Testing, Germany, rango 0-1 mg/L) de tal modo que a 1 minuto de exposición se obtuvo un promedio de mediciones (n=5) de 0.30 ± 0.08 mg/L (CT).

Por razones de bioseguridad, los experimentos se llevaron a cabo siempre bajo campana extractora de aire. De acuerdo a los límites de ozono seguros para la salud de la IOA (International Ozone Association), el nivel umbral ante sobre el cual comienzan a aparecer irritación nasal y bronquial es alrededor de los 0.3 ppm o mg/L (<http://www.understandingozone.com/limits.asp>).

El tratamiento consistió en exponer 1 L de la mezcla de cepas en cultivo en plena fase exponencial de crecimiento a los diferentes tiempos establecidos, tomando tras cada tiempo una alícuota de 10 mL en tubos plásticos de centrífuga de 15 mL y puestos en condiciones estándares de cultivo (16 °C, 12:12 L:O). El efecto del ozono se evaluó mediante el conteo de células vivas y muertas cada 1-2 días en una alícuota de 50 μ L tomados de los tubos de centrífuga. Los resultados se compararon con los conteos realizados en los tubos control (sin tratamiento de ozono, tomados justo antes de iniciar el tratamiento). Los resultados se muestran en tablas (indicando significancia estadística) y gráficos de columnas son el



promedio de tres réplicas. La desviación estándar es indicada en cada tabla así como sobre cada columna de la figura.

4) Radiación UV

Para el experimento de UV, se utilizaron tres tipos de tubos fluorescentes importados, los que emiten UV-A (320-400 nm) (R-UVA Philips TLK 40W/10R, Holland y UVA-340 Q Panel Co, USA), UV-B (280-320 nm) (UVB-313 Q Panel Co, USA) y UV-C (< 280 nm) (UV-C Philips TUV 15W/G15T8, Holland) respectivamente. Estas lámparas son de emisión fija, de modo que solo es posible disminuir la radiación pero no aumentarla. Por tanto el incremento de la radiación se realiza prolongando el tiempo de exposición a dicha radiación y la dosis es calculada con los términos intensidad y tiempo. Para obtener radiaciones variables con tiempos constantes se requeriría el uso de reactores de UV, adquisición que no es posible solventar con un proyecto como el actual, dado el elevado costo además de la restricción que estos presentan para la compra de equipos. Así, cada rango de UV fue aplicado en diferentes dosis, por separado, en muestras de cultivo de células vegetativas de *A. catenella* con cruce de cepas de las tres regiones del sur-austral: Experimento 1 de UV (UV 1) con cruce de cepas ACM44₁₃ x ACL22N2 x ACM35₂; experimento 2 con cruce de cepas ACL24N1 x ACM43₈ x A50. Las diferentes dosis fueron obtenidas mediante la aplicación de la radiación a diferentes tiempos (minutos). La intensidad de cada tubo fue medido con un quantum Photo/Radiometer HD 9021 con dos sensores, uno para radiación UVA y el otro para UVB. La radiación UVC fue medida con un radiómetro digital modelo UVX UVP con sensor. Los tres tipos de radiación fueron medidos para cada tipo de lámpara a la misma distancia de la fuente y en los puntos en que fueron situadas las cepas. A partir de estos datos y basados en la dosis mínima de 90 mJ/cm² para la radiación UV establecida por el Programa Sanitario General de Limpieza y Desinfección aplicable a la Producción de Peces (Res. EX.2327/10, Anexo 7), se generaron tres gradientes para dar inicio a los experimentos. Las intensidades emitidas por cada lámpara se muestran en la Tabla 12. Cabe hacer notar que cada lámpara emite los tres tipos de radiación UV, siendo la de mayor intensidad aquella nominal para cada lámpara.

En búsqueda de la dosis umbral se generaron cinco niveles de tiempo de aplicación de UV (experimento 1): 2, 4, 6, 10 y 15 minutos más el control (To, sin UV). Las intensidades de cada tipo de UVA, B y C aplicadas correspondieron a 0.331, 0.091 y 0,0265 mWatt cm⁻², respectivamente.

En base a los resultados obtenidos del experimento 1, se precisó la dosis de UVC empleada inicialmente en el experimento 2 por ser la más efectiva de los tres tipos radiación experimental, incluyendo un nivel de 8 minutos de tiempo de aplicación entre los 6 y 10 minutos para precisar la dosis y reproducibilidad del experimento.

Los tratamientos se aplican a 5 mL de cultivos dispuestos en placas petri pequeñas (5 cm diámetro) en triplicado y descubiertas para cada tiempo de exposición establecido previamente. Se emplean estos envases pues presentan una mayor superficie de exposición al UV. Tras el tiempo de exposición, el contenido de las placas fue puestos en tubos de centrifuga de 15 mL y mantenidas en condiciones estándares de cultivo. En experimentos previos se demostró que estos envases eran óptimos para el crecimiento de células vegetativas. El efecto de las dosis de radiación UV fue evaluado mediante el conteo de las células vivas y muertas en una submuestra de 50 µL, cada 2-3 días la primera semana y luego semanalmente. Los resultados se muestran en tablas y gráficos de



columnas y son el promedio de tres réplicas. La desviación estándar es indicada en cada tabla así como sobre cada columna de la figura.

Por razones de bioseguridad, los experimentos fueron realizados en compartimentos oscuros, restringidos al personal mientras los manipuladores del experimento fueron protegidos con gafas anti UV, guantes opacos y cubriendo con ropa oscura las partes del cuerpo expuestas.

5) Ultrasonido

Un sonicador Ultrasonik modelo 28x con frecuencia de 46 ± 2 kHz fue utilizado para evaluar la efectividad del ultrasonido en la desnaturalización de la fase vegetativa de *A. catenella*. El equipo es un baño de ultrasonido disponible en cualquier laboratorio incluido el nuestro en P. Arenas.

Básicamente el ultrasonido actúa rompiendo las membranas de las células y también por las colisiones que se producen con otros organismos y material particulado por efecto del proceso de cavitación (Buchholz *et al.* 1998), *i.e.* la rápida formación de burbujas de aire microscópicas que colapsan a medida que las moléculas de agua absorben la energía ultrasónica, efecto que disminuye a medida que el agua se aleja de la fuente emisora. Esta condición supone contar con una especie de emisor similar al reactor de UV, de diámetro tal que asegure que el agua a medida que fluye por el cilindro esté en estrecho contacto con el emisor o área afectada con la energía ultrasonido. Un ejemplo de este equipo es el reportado por Collings *et al.* (2008) quienes utilizaron un emisor de vástago, no disponible en nuestros laboratorios y de alto costo cuya adquisición no es posible solventar con este proyecto por el elevado costo y la restricción a la compra de equipos, menos con el solo con el objetivo de evaluar su efectividad. Un equipo similar al descrito no se encuentra implementado en Chile y mucho menos es posible adquirirlo por el proyecto para su evaluación. Por estas razones, para la experiencia se utilizó equipos disponibles, de frecuencia fija y de menor costo y de uso común en los laboratorios, que en todo caso tampoco habían sido evaluados previamente para fines como los que se desarrollan en este proyecto

En un primer experimento, la frecuencia fue aplicada a tiempos de 1, 2, 5 y 10 minutos. Para cada tiempo de exposición al ultrasonido, se empleó un matraz de 100 mL con 40 mL de mezcla de cepas cultivo en triplicado. Un segundo experimento, realizado con una mezcla de cepas constituidas por ACM35₂ x ACM44₃ x ACL24N1, los tratamientos aplicados fue a tiempos mayores: 30, 60 y 90 minutos. En ambos casos, tras cada tiempo de exposición los matraces fueron mantenidos en las condiciones estándares de cultivo inicial (16 °C, 12:12 L:O). El efecto fue evaluado mediante el conteo de células vivas y muertas observadas en una alícuota de 50 µL en triplicado bajo microscopio óptico cada 2-5 días por una semana. El efecto fue evaluado en base a un control en triplicado (T₀, sin ultrasonido.) Los resultados se presentan en tablas (indicando significancia estadística) y gráficos de columnas. La desviación estándar es indicada en cada tabla así como sobre cada columna de la figura.

Por razones de bioseguridad, los experimentos fueron realizados en un compartimento cerrado y aislado, dado que la frecuencia utilizada encuentra en los límites recomendados para prevenir la pérdida de la audición



[\(http://www2.warwick.ac.uk/services/healthsafetywellbeing/guidance/noise_vibration/ultrasound/\)](http://www2.warwick.ac.uk/services/healthsafetywellbeing/guidance/noise_vibration/ultrasound/).

6) Filtros

Para el caso de los filtros, al contrario de los otros elementos seleccionados existe una abundante información empírica disponible para la recolecta de esta microalga utilizando mallas de 25 μm de trama, no fue necesario evaluarla. El tamaño de las células utilizadas en este estudio sobrepasa los 35 μm de longitud y 40 μm de diámetro y en consecuencia son atrapados por la malla de 25 μm de trama. Por lo demás, las dimensiones de células con las que se trabajó están dentro de los rangos citados en la literatura (Doblinand & Dobbs 2006) —38–56 μm de longitud y 23–32 μm de ancho— en la que se recomienda la filtración como metodología de eliminación.

7) Cloración (Hipoclorito de sodio)

Los rangos de concentración en experimentación con células vegetativas están basados en las medidas de residuos líquidos y sólidos de plantas de proceso (Res. 1882/08, Anexo 5). Esta establece una concentración tal que la concentración mínima o residual después de 25 minutos sea de 5 mg/L.

En la búsqueda de concentraciones umbrales se aplicó 2.5, 5, 10, 20, 50, 100 y 200 mg/L por 10, 25 y 35 minutos en base a la concentración mínima más utilizada en tratamientos de aguas de plantas y wellboats (*i.e.* Anexo 6) que es de 200 ppm o mg/L por 25 minutos. El cloro utilizado en la preparación de los diferentes tratamientos fueron soluciones comerciales concentradas de uso doméstico cuya concentración aparece en la etiqueta del envase.

Para cada dosis y tiempo, se empleó una mezcla de tres cepas: ACA12₂ x ACA12₃ x AC Cinco mL de esta mezcla fueron filtradas por una red de 25 μm en fija en un cilindro plástico (volumen app. 15 mL). Las células retenidas en el tubo con el filtro fueron sumergidas en la solución de cloro por el tiempo establecido. Cada tratamiento fue realizado en triplicado. En seguida fueron lavadas al menos tres veces en agua de mar ultrafiltrada esterilizada para quitar el cloro. Entonces las células fueron devueltas a tubos de vidrio de cultivo de 15 mL mediante lavados reiterados con medio L1 hasta completar 5 mL. Cada tubo de cultivo en triplicado fue puesto en la cámara de cultivo bajo condiciones estándares. El efecto fue evaluado contra un control (sin tratamiento), mediante el conteo de células vivas y muertas observadas en una alícuota de 50 μL en triplicado bajo un microscopio óptico. Los resultados, promedios y desviación estándar, son presentados en tablas (indicando significancia estadística).

Obtención de quistes *in vitro*

Los quiste utilizados para ser sometidos a la exposición de los diferentes elementos aplicados en las células vegetativas, fueron inducidos mediante el cruce de diferentes cepas de *A. catenella* en cultivo.

Un total de 12 cepas fueron utilizadas para los cruces. En un primer experimento se utilizaron las cepas: ACM17₅, ACM17₁₅, ACM44₁₄, ACM44₁₅, ACM44₁₇ y ACL24N1, procedentes de la región de Los Lagos y Magallanes. En un segundo cruce experimental se utilizaron las cepas: ACM43₄,



ACM45₂, ACM17₃, ACM44₉, ACM35₁ y ACL22N2 procedentes de Magallanes y Los Lagos. Los cruces fueron realizados entre pares de cepas.

Al momento de iniciar los cruces, los cultivos fueron seleccionados por estar en óptimas condiciones de crecimiento exponencial. Se contó el número de células en alícuotas de 1 ml de cada en una cámara de Sedgewick-Rafter para realizar los cálculos de concentración en partes de iguales de cada cepa a cruzar. Una concentración de al menos un total de 800 células/mL por pocillo Se estimó adecuada para realizar los cruces (e.g. Figueroa *et al.* 2005), vale decir 400 células/mL de una cepa fueron cruzadas con otras 400 células/mL de la otra.

Para los dos experimentos realizados, un total de 21 cruces fueron obtenidos y monitoreados cada 5-7 días por lo menos por 50 días hasta que la totalidad de las células estuviesen enquistadas. Cada experimento se realizó en cuatro condiciones de medio de cultivo L1. Estos fueron: L1 diluido 20 veces, L1 solo con Nitratos (N) diluido 20 veces, L1 con fosfatos (P) diluido 20 veces y L1 con N y P diluido 20 veces. Todos los cultivos permanecieron en condiciones estándares mientras se monitorearon.

Una vez que la mayor parte de la población de *A. catenella* estuviese enquistada, las placas fueron puesta en total oscuridad en las mismas condiciones de temperatura hasta que la totalidad de la población enquistó.

Selección de elementos para tratar quistes de *A. catenella*

Para el caso de los quistes, se seleccionaron los mismos elementos experimentados para eliminar las células vegetativas de *A. catenella*: **1) Temperatura; 2) salinidad; 3) ozono; 4) radiación UV (A, B, C); 5) ultrasonido; 6) filtros y 7) hipoclorito de sodio.** Estos son los elementos de mayor uso tanto en plantas como en wellboats para tratar riles y mantenimiento de bodegas (Anexos 8 y 6).

Aplicación de elementos sobre quistes de *A. catenella*

Los quistes fueron seleccionados y aislados uno a uno según aspecto y pigmentación por micromanipulación bajo un microscopio invertido. En el caso de los tratamientos de salinidad, temperatura y radiación UVC, los quistes fueron puestos uno por uno en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 (15 mm diámetro c/pocillo) que contenía 2 mL de medio de cultivo L1. Uno a dos quistes fueron puestos en cada pocillo. Las placas controles o T0 (no tratadas) fueron la referencia contra las que se compararon los resultados del placas tratadas. Una vez finalizada las experiencias de tratamiento, tanto las placas tratadas como no tratadas fueron incubadas bajo condiciones estándares de cultivo (temperatura 16 °C, fotoperiodo 12:12 horas luz:oscuridad, luz 50 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

1) Temperatura

Las temperaturas para aplicar a los quistes fueron seleccionadas en base a la información reportada en la literatura —ejemplo: 38 °C por 4.5 horas (Hallegraeff *et al.* 1997)— y también en los resultados



obtenidos en los tratamientos térmicos aplicados en células vegetativas durante este estudio. Así se establecieron dos temperaturas experimentales: 25 y 45 °C por 1, 3 y 5 horas, mientras que a los T0 no se les aplicó temperatura alzada.

Para cada temperatura y tiempo, los quistes (cruces ACM45₂ x ACM44₉ y ACM43₄ x ACM35₁) fueron aislados por micromanipulación y puestos individualmente en un pocillo de 2 mL de medio de cultivo en una placa de 24. Las placas fueron selladas e incubadas sumergidas a las diferentes temperaturas en un baño termostático en los tiempos previamente establecidos excepto los T0. Transcurrido el tiempo de tratamiento las placas fueron incubadas bajo condiciones estándares de cultivo. El efecto de los tratamientos fue monitoreado cada 1–2 semanas en base al número de quistes germinados contra la placa control o T0 (sin tratamiento de temperatura alzada). Los resultados, promedios y desviación estándar, son presentados en tablas.

2) Salinidad

La selección de las concentraciones de salinidad seleccionadas fue en base a su efecto en las células vegetativas. Así tres concentraciones de salinidad fueron evaluadas: 10, 6.2 y 2.2 psu, utilizando la concentración de 31 psu como control de la germinación de quistes pues es la utilizada para mantener los cultivos rutinarios de las cepas de *A. catenella*. El gradiente de salinidad fue generado mediante la dilución de agua de mar filtrada por 0.2 µm con agua MQ como se explicó en el tratamiento de células vegetativas.

Para cada dosis y tiempo, los quistes (cruces ACM45₂ x ACM44₉ y ACM43₄ x ACM35₁) fueron aislados por micromanipulación y puestos individualmente en un pocillo de 2 mL de medio de cultivo L1 en cada concentración de salinidad establecida previamente, en una placa de 24. Todas las placas incluida la placa control (31 psu), fueron incubadas a condiciones estándares de crecimiento. El efecto de los tratamientos fue monitoreado semanalmente en base al número de quistes germinados que se compraron contra una placa control (31 psu). Los resultados, promedios y desviación estándar, son presentados en tablas.

3) Radiación UV

La selección del tipo de radiación UV a aplicar fue en base a su efecto en las células vegetativas. Así solo la radiación UVC fue aplicada a los quistes. Las dosis experimentales fueron tres: 30, 66 y 94 mJ/cm² considerando aquellas indicadas por normativa aunque ninguna indica el tipo de RUV: 90 mJ/cm² (Res. EX.2327/10, Anexo 7) y 105-200 mJ/cm²/seg con una transmitancia del 60% y 25 mg/L de sólidos suspendidos totales (Res. 1882/08, Anexo 5). También fue considerada aquella dosis de UVC recomendada por Troncoso (2010): 70 mJ/cm² como mínimo para inhibir la germinación de quistes naturales.

Para cada dosis y tiempo, los quistes (cruces ACM43₄ x ACM45₂ y ACM43₄ x ACM44₉) fueron aislados por micromanipulación y puestos individualmente en cada pocillo de una placa de 24 con 2 mL de medio de cultivo L1 en la concentración de salinidad establecida previamente. Las placas tratadas como no tratadas con UV (T0) fueron incubadas a condiciones estándares de crecimiento. El efecto de los tratamientos fue monitoreado semanalmente en base al número de quistes



germinados contra la placa control (T0 o sin UVC). Los resultados, promedios y desviación estándar, son presentados en tablas.

4) Ozono

La generación y concentración de ozono fue la misma descrita para su aplicación en las células vegetativas. Se buscó la dosis umbral en base a los resultados obtenidos con la fase vegetativa de la microalga y el señalado por la literatura, 10 mg/L para inhibir la mayor parte de los quistes (Laughton *et al.* 2001). Así, la concentración establecida experimentalmente por minuto: 0.30 ± 0.08 mg/L (CT) para los tratamientos de las células vegetativas fue aplicada a: 30 y 60 minutos (dosis de 9 y 18 mg/L, respectivamente). Por razones de bioseguridad, los experimentos se realizaron siempre bajo campana extractora de aire.

Para cada dosis y tiempo, los quistes (cruces ACM45₂ x ACM35₁) fueron aislados por micromanipulación y puestos individualmente en vasos precipitados de 10 mL con 5 mL de medio de cultivo L1, en triplicado. El tratamiento consistió en exponer los vasos con quistes a la emisión de ozono en los tiempos establecidos previamente, mientras los T0 se dejaron sin tratar con ozono. Para evitar la salpicadura de agua y con ella los quistes por efecto del burbujeo de ozono, se interpuso un trozo de red de 25 μ m (sumergida) a modo de barrera entre los quistes y el emisor de ozono. Al término del tiempo de exposición, la red fue lavada antes de ser retirada del vaso procurando dejar el mismo volumen de medio en cada vaso. Entonces los vasos fueron cubiertos con parafilm y puestos en condiciones estándares de cultivo junto al T0. El efecto del ozono se evaluó cada cinco días mediante el conteo de quistes germinados en cada vaso, y con los conteos realizados se compararon con los de los vasos control (T0 sin tratamiento de ozono). Los resultados, promedios y desviación estándar, son presentados en tablas.

5) Ultrasonido

El mismo sonicador Ultrasonik modelo 28x con frecuencia de 46 ± 2 kHz utilizado para evaluar la efectividad del ultrasonido en la desnaturalización de la fase vegetativa de *A. catenella* fue el aplicado para el tratamiento de los quistes. El equipo es un baño de ultrasonido disponible en cualquier laboratorio. Las dosis seleccionadas se basaron en esencialmente en los resultados obtenidos en el segundo experimento aplicado a las células vegetativas, vale decir aplicación de la frecuencia media durante 30, 60 y 90 minutos.

Para cada dosis y tiempo, los quistes (cruces ACM43₄ x ACM17₃) fueron aislados por micromanipulación y puestos individualmente en vasos precipitados de 10 mL con 5 mL de medio de cultivo L1. El tratamiento consistió en exponer los vasos con quistes a la frecuencia media: 46 ± 2 KHz por 30, 60 y 90 minutos mientras que los vasos seleccionados como controles no fueron sometidos a ultrasonido. Para evitar el calentamiento de las muestras tratadas durante el tratamiento, la temperatura se mantuvo entre 13 y 14 °C mediante la adición de hielo en el contenedor de agua del baño del sonicador. Al término del tiempo de tratamiento, los vasos fueron cubiertos con parafilm y puestos en condiciones estándares de cultivo junto a los vasos controles (sin ultrasonido). El efecto de la dosis de ultrasonido aplicado se evaluó cada cinco días mediante el conteo de quistes germinados en cada vaso, y los conteos realizados se compararon con los



realizados en los controles (sin tratamiento de ozono). Los resultados, promedios y desviación estándar, son presentados en tablas.

6) Filtros

Los filtros fueron seleccionados para eliminar quistes de *A. catenella*, sin embargo al igual que para las células vegetativas, la poca información empírica disponible para la recolección y aislamiento rutinario de análisis y estudio de éstos incorpora mallas de 25 μm como mínimo de trama. Por tal razón fue innecesario ser evaluadas directamente. El tamaño de los quistes utilizados en este estudio sobrepasó los 40 μm de longitud y 27 μm de diámetro, valores que estuvieron dentro de 58 μm de longitud y 28 μm de ancho reportados en la literatura (Hallegraeff *et al.* 1997). En consecuencia, las dimensiones de los quistes con los que se trabajó se encuentran dentro de los rangos para los que se recomienda el uso de la filtración como metodología de eliminación (*i.e* Cangelosi *et al.* 1999).

7) Cloración (hipoclorito de sodio)

Los rangos de concentración en experimentación con quistes se basaron esencialmente en los resultados obtenidos en el tratamiento de las células vegetativas de este estudio.

En la búsqueda de concentraciones umbrales se aplicó 20, 50, 100 y 200 mg/L por 25 minutos, pues fueron las concentraciones y tiempos con mayor efectividad en la eliminación de las células. Para cada dosis y tiempo, los quistes (37– 69) fueron seleccionados uno a uno bajo microscopio mediante micromanipulación, seleccionando aquellos en buenas condiciones fisiológicas y color, y puestos en vasos de 10 mL con 5 mL de agua de mar ultrafiltrada y esterilizada, en duplicado. Entonces los vasos fueron vaciados a un cilindro plástico (volumen app. 50 mL) en cuyo extremo se fijó una red de 25 μm . Los quistes retenidos en el tubo con el filtro fueron entonces sumergidos en la solución de cloro por el tiempo establecido. En seguida fueron lavados sumergiendo el tubo al menos por un minuto, tres veces en agua de mar ultrafiltrada esterilizada para quitar el exceso de cloro. Entonces la red con los quistes fue sumergida en vasos pp de 50 mL con 20 mL de L1. El mismo procedimiento de trasvasije fue realizado con los vasos controles pero sin someter los quistes a cloración. Una vez realizado el tratamiento, los vasos con quistes tratados y no tratados con cloro (controles) fueron incubados bajo condiciones estándares de cultivo. De esta manera se evitó la pérdida de quistes durante el proceso de traspaso desde la red al medio de cultivo. Los vasos fueron controlados cada 2 a 4 días. El efecto fue evaluado en base al número de quistes germinados contra un control (sin tratamiento de cloro). Los resultados, promedios y desviación estándar, son presentados en tablas.

Consulta a expertos

Esta actividad contempló la consulta a expertos internacionales que trabajan en el tema. En este último caso, las investigadoras internacionales, Isabel Bravo del Instituto Español Oceanográfico (IEO) de Vigo, y Rosa Figueroa del Depto. de Ecología de la Universidad de Lund en Suecia, participaron en este proyecto como expertos en la tarea de actualización de nuestra información existente en el tema además de discutir diseños y técnicas experimentales vía correo electrónico. La primera investigadora es experta en aspectos ecológicos de quistes y toxinas de microalgas nocivas



como las especies de *Alexandrium*. La segunda investigadora es especialista en ciclos de vida de especies de *Alexandrium* y otras afines y en aspectos genéticos de las mismas.

Como resultado del bajo número de quistes encontrados en los sedimentos como para realizar experimentos de eliminación estadísticamente válidos y habiendo alcanzado la época estival sin una floración intensa de *A. catenella*, se comenzó a trabajar en la obtención experimental de quistes por inducción. Este es uno de los aspectos con menor información en Chile y por tanto requirió un tiempo de dedicación mayor al contemplado originalmente en la propuesta. Así, durante el mes de enero de 2011, se programó la estadía de la Dra. Isabel Bravo para trabajar en la inducción de quistes a partir de cruces seriados de cepas de *A. catenella* que forman parte de la colección que posee el laboratorio de IFOP en Punta Arenas. Los resultados se entregan en la sección respectiva. Previamente, esta experta también visitó las dependencias de IFOP en Puerto Montt donde se discutieron aspectos relativos a los resultados de quistes encontrados en el presente proyecto. Posteriormente ha participado en la discusión de los resultados obtenidos hasta ahora vía internet.

La interacción con la segunda investigadora en aspectos de cruces de cepas parentales, periodos y condiciones de germinación de los mismos y discusión de los resultados obtenidos en este proyecto fue realizada a través de comunicaciones vía Internet y proporción de literatura actualizada.

Resultados y discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos en la sección anterior, el potencial riesgo de propagación de *A. catenella* por los vectores y fómites aun cuando estén expuestos a bajas intensidades de floración, ha confirmado la necesidad de evaluar los diversos elementos existentes y reportados en la literatura para la eliminación o desnaturalización de esta microalga ya sea adherida y/o incluida en los moluscos o adherida en los fómites.

A continuación se presentan los resultados para cada uno de los elementos evaluados: 1) **Temperatura >20 °C**; 2) **salinidad <25 ppm**; 3) **ozono**; 4) **radiación UV (A, B, C)**; 5) **ultrasonido**. 6) **filtros**; 7) **Cloración (hipoclorito de sodio)**.

Efectos de los elementos sobre cultivos de células vegetativas de *A. catenella*.

1) Temperatura

La figura 8 (Tabla 13) muestra los resultados obtenidos tras someter *A. catenella* a 25, 35, 45 y 60°C. Las tres temperaturas mayores tuvieron un efecto significativo (Kruskal-Wallis, $p < 0.01$) en la sobrevivencia de *A. catenella* al inhibir su crecimiento pero a diferentes tiempos de exposición mientras que la temperatura de 25 °C no tuvo un efecto significativo en la eliminación de *A. catenella* (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$). El efecto de la temperatura de 45 °C en la sobrevivencia de *A. catenella* fue a partir de un tiempo de exposición mínimo de 5 minutos. La temperatura de 35 °C fue



significativamente efectiva después de los 10 minutos de exposición y la temperatura de 60 °C tuvo un efecto en menos de 5 minutos de exposición.

De los dos métodos utilizados para conseguir el gradiente de temperatura, el baño termoregulado fue lejos mejor que la placa calefactora. Los cultivos expuesto a alzas de temperatura, alcanzaron rápidamente la temperatura efectiva de exposición (< de 5 minutos), en tanto el tiempo que tomaron los cultivos en alcanzar la temperaturas establecidas fue > 5 minutos y más, dependiendo de la temperatura requerida. En algunos tratamientos fue posible observar la presencia de quistes. A pesar de ser en número muy bajo, una evaluación de su viabilidad fue realizada dejando las muestras al menos dos meses en condiciones de cultivo durante el cual no hubo germinación.

2) Salinidad

La figura 9 (Tabla 14) muestra la sobrevivencia de *A. catenella* tras ser sometida a 2, 6, 9.1, 10, 15, 20, 23 y 31 psu de salinidad siendo este último el control contra el cual se comparan el resto de las salinidades. Los resultados indican que a partir de salinidades menores a 6 psu comienzan a observarse efectos en la sobrevivencia de *A. catenella*, siendo significativamente efectiva (Kruskal-Wallis, $p < 0.001$) la concentración de 2 psu. Salinidades > 6 psu no tuvieron un efecto significativamente (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$) negativo en el crecimiento de *A. catenella* respecto del control.

En este experimento, el tiempo de exposición a las diferentes salinidades es desde el inicio hasta el final de la experiencia con controles de sobrevivencia en las fechas indicadas en las figuras. De acuerdo a los resultados obtenidos, la salinidad de 6 psu es la salinidad umbral, pues si bien persisten células vivas, están a un nivel mínimo en número y no logran re-establecer el cultivo. Las células muertas se evidencian por los restos de tecas vacías que quedan y persisten mayormente en el medio debido a una menor tasa de descomposición que su contenido. Incluso parecieran aumentar tras la adición lenta de células vivas producto de la división de las células sobrevivientes en el control previo. En otras palabras, el nivel de salinidad pareciera mantener una especie de “cultivo latente” que jamás logra re-establecerlo a las condiciones previas al tratamiento. Es probable que si las condiciones de salinidad fuesen revertidas por sobre los 10 psu, el cultivo remontará. Así lo sugieren los cultivos mantenidos a salinidades > 6 psu.

3) Radiación UV

La figura 10 (Tabla 15) muestra las diferentes dosis de radiación UVA, UVB y UVC aplicadas a los cultivos de *A. catenella*. De los tres tipos de radiación evaluados, la radiación UVC, con proporciones similares de las otras (UVA y UVB) fue significativamente efectiva (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$), respecto del control (sin tratamiento de UV), en inhibir el crecimiento de *A. catenella* a partir de ciertas dosis aplicadas. De las dosis aplicadas de UVA y UVB, ninguna fue inhibitoria del crecimiento de la microalga (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$).

De acuerdo a la literatura, la Radiación UVC mayormente efectiva no es la monocromática sino que si se aplica en proporciones similares con los otros dos tipos de UV (A y B) (Asahina, 2007). Los resultados aquí obtenidos concuerdan con los reportados por este autor.



La dosis efectiva de radiación UVC fue de 13 mJ/cm² obtenida a los 8 minutos de exposición. Si bien tras una semana de control (9/2/11) del experimento con UVC, la figura 9 muestra ausencia de células de *A. catenella* a los 4 min de exposición (tercera columna), en los controles siguientes, 2 y 7 días después (11 y 17/2/10), respectivamente, se confirmó la presencia de células vivas que pudieron pasar desapercibidas en el control del 9/2/10 o, lo que es más probable, fueran el producto de la germinación de los quistes observados durante el primer control experimental (4/2/11) tras dos días del tratamiento con UVC experimental y en todos los tiempos de exposición. Sin embargo, los quistes no fueron viables a tiempos de exposición de UVC mayores a 4 min. Por esta razón se consideró que el umbral de UVC para células vivas se encontraba entre los 6 y 10 min de exposición. Con este antecedente se buscó la dosis precisa, que se obtuvo a los 8 min (13 mJ/cm²).

4) Ozono

La figura 11 (Tabla 16) muestra la sobrevivencia de *A. catenella* tras ser sometida a dosis entre 0.30 y 16.5 mg/L de ozono. Las diferentes concentraciones fueron logradas exponiendo los cultivos de la microalga a diferentes tiempos (entre 1 a 55 minutos, respectivamente). La dosis significativamente efectivas (Kruskal-Wallis, $p < 0.01$) fueron obtenidas a tiempos mayores de 25 minutos, es decir sobre los 7.5 mg/L de ozono (*i.e.* exps. inicio 6/12/10 y 24/02/11). Cabe hacer notar que a dosis < 4 minutos, 1.2 mg/L, la tendencia fue a mantener o incluso aumentar el crecimiento del cultivo respecto del control (*i.e.* exp. Inicio 26/10/10, promedios T0: 43 ± 20 vs tratamientos: 63 ± 18 células/50 μ L). Por tanto estas dosis no fueron inhibitorias del crecimiento de *A. catenella* (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$).

5) Ultrasonido

La figura 12 (Tabla 17) muestra que de las dosis aplicadas: frecuencia media de 46 ± 2 kHz durante 1, 3, 5, 10 y 30, 60, 90 minutos, ninguna resultó ser efectiva para inhibir el crecimiento de las células vegetativas de *A. catenella* respecto del control (T0) (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$).

6) Filtros

El tamaño de las células utilizadas en este estudio sobrepasa los 35 μ m de longitud y 40 μ m de diámetro y en consecuencia son atrapados por la malla de 25 μ m de trama. Por lo demás, las dimensiones de células con las que se trabajó están dentro de los rangos citados en la literatura (Doblinand & Dobbs 2006) —38–56 μ m de longitud y 23–32 μ m de ancho— en la que se recomienda la filtración como metodología de eliminación.

De acuerdo a los antecedentes y a nuestra experiencia empírica tras año de uso de estas mallas en los diferentes estudios que incorporan al fitoplancton en general y en el proceso de limpieza y aislamiento de quistes desde los sedimentos para su identificación y/o cultivo (con o sin presencia de *A. catenella*), los filtros han resultado ser muy efectivos en la recolecta no solo de *A. catenella*, sino de diferentes taxones nocivos utilizándolos en forma simple y temporalmente discreta. Sin embargo, para que sean efectivos en plantas de proceso o trayecto de transporte en wellboats, éstos debieran ser utilizados en serie —250, 100, 50 y 25 μ m— y en tándem de dos o tres juegos, adosados a dispositivos de limpieza (*e.g.* aspersores) mecánicos o automáticos de modo de automatizar las



reiteradas limpiezas que deben realizarse durante procesos continuos de desarenado, tratamiento de aguas riles o aguas de transporte, antes de ser devueltas al ambiente.

7) Cloraci3n (hipoclorito de sodio)

La Tabla 18 muestra que de las dosis aplicadas: 20, 50, 100 y 200 mg/L por 10 y 25 minutos, las concentraciones con mayor efectividad en la eliminaci3n de las c3lulas fue de 200 mg/L aplicada por 10 minutos y de 100 aplicada por 25 minutos. Las concentraciones restantes ninguna fue efectiva en los tiempos aplicados. La repetici3n de los experimentos asegura las efectividad de las dosis aplicadas por cuanto resultados positivos y negativos como los observados bajo el tratamiento de 50 m/L concentraci3n ayudaron a eliminar fuentes de error: vulnerabilidad de las c3lulas o cepas, concentraci3n err3nea de etiqueta de envases o diluciones err3neas durante la ejecuci3n de la experiencia.

Evaluaci3n experimental de los elementos utilizados en la eliminaci3n y/o desnaturalizaci3n de c3lulas de *A. catenella* y recomendaciones de uso

De los 7 elementos evaluados experimentalmente, la mayor3a resultaron ser efectivos en la eliminaci3n de las c3lulas vegetativas de *A. catenella* a excepci3n del ba3o de ultrasonido. Este elemento por si solo no elimin3 las c3lulas en ninguno de los tiempos de exposici3n.

De acuerdo a los resultados, la a efectividad de los elementos utilizados en la eliminaci3n y/o desnaturalizaci3n de c3lulas de *A. catenella* puede resumirse como sigue:

- **Temperatura:** > 45 °C x 5 min (con temperaturas < 45 °C, la exposici3n debe ser > 10 min)
- **Salinidades:** < 2 psu (partes por mil)
- **Radiaci3n:** UVC > 13 mJ/cm²
- **Ozono:** > 7.5 mg/L (< 1,5 mg/L estimulan el crecimiento)
- **Ultrasonido:** No efectivo en ba3o de ultrasonido a frecuencia media de 46 ± 2 KHz por 90 minutos.
- **Filtros:** trama < 25 µm
- **Cloraci3n:** concentraci3n m3nima de 100 ppm por 25 minutos

Si bien la ozonificaci3n es efectiva, la concentraci3n requerida es muy alta de acuerdo a la experiencia de las embarcaciones de traslados de salmones por cuanto oxidan piezas y difusores de ox3geno instalado en el interior de las bodegas. Por ello es aconsejable utilizar este tipo de



elementos en contenedores plásticos o fibra de vidrio, inertes al efecto oxidativo del ozono. En consecuencia el elemento es útil si se tienen en consideración su poder de oxigenación, en plantas de proceso y embarcaciones de traslado de salmones en general.

De los elementos evaluados empíricamente y por referencia bibliográfica, los filtros resultan ser muy efectivos para la eliminación de microalgas de *A. catenella* y en general el fitoplancton, siempre que usen en serie —250, 100, 50 y 25 μm — y en **tándem** de dos o tres juegos y adosados a dispositivos de limpieza (e.g. aspersores) mecánicos o automáticos de modo de automatizar las reiteradas limpiezas que deben realizarse durante un trayecto de transporte o en plantas de proceso.

Además de los filtros en serie, las alzas de la temperatura a 35 y 45 °C y disminución de la salinidad (< 2 psu o en su defecto uso de agua dulce) son elementos de mayor factibilidad de uso en plantas de proceso. En el caso de las embarcaciones de transporte, las bajas salinidades serían mayormente factibles de utilizar en contraste al alza de temperatura que requiere de un gasto de energía adicional dependiente del tonelaje de la embarcación y que incidirá en el costo operativo.

Igualmente en el caso de fómites, se recomienda, por su efectividad y fácil aplicación, que luego de ser utilizados, éstos sean lavados para retirar cualquier resto orgánico. Posteriormente debieran ser sumergirlas en agua dulce al menos 24 horas. Este tiempo puede ser acortado a 20 minutos si el agua está a 35°C o, a 10 minutos si la temperatura del agua es de igual o mayor a 40°C. También está la factibilidad de usar hipoclorito de sodio disuelto en agua en concentración mínima de 100 ppm, solución en la que debieran permanecer sumergidos por más de 25 minutos.

En el caso de los transvectores, previo al proceso de desarenado, se recomienda el lavado de las valvas para eliminar el material orgánico sobre éstas y el retiro del biso en el caso de los mitílidos. Si el lavado es con agua dulce, aumenta la efectividad de la limpieza preliminar antes del proceso. El agua circulante residual de desarenado debiera ser tratada con los siguientes elementos que son mayormente factibles de utilizar: Filtrar por sistemas de filtros descritos más arriba, o ser sometidas a temperaturas de 45 °C por al menos 10 minutos, o tratarlas con hipoclorito de sodio por sobre los 100 ppm por 30 minutos, antes de ser devueltas al medio ambiente.

Obtención de quistes de *A. catenella*

De los cruces de cepas realizados, la mayor proporción de quistes con aspecto saludable (pigmentados e internamente homogéneos) resultó con los cruces entre las cepas ACM43₄, ACM45₂, ACM17₃, ACM44₉ y ACM35₁, con medio de cultivo L1-20, comenzando a enquistar luego de los 15 días. Al cabo de un mes gran parte de la población estaba enquistada. En este momento se dispusieron en oscuridad pero a las mismas condiciones de temperatura de cultivo hasta que en 15 días se observó la totalidad de la población enquistada. El enquistamiento duró entre 40-45 días de iniciado los cruces. Los medios de cultivo L1-20, L1-N20 y L-NP-20 produjeron quistes cuyo contenido celular fue descolorido y/o no homogéneo, razón por la cual no fueron considerados para la experimentación.



Efecto de los elementos sobre quistes de *A. catenella*

1) Temperatura

La Tabla 19 muestra los resultados obtenidos tras someter quistes de *A. catenella* a 25 y 45 °C por 2, 3 y 5 horas. La mayor efectividad de la temperatura fue de 45 °C, pues inhibió la germinación de todos los quistes tratados en cualquiera de los tiempos aplicados. No obstante la temperatura de 25°C también fue efectiva pero a tiempos de exposición al menos de 5 horas.

Si bien se observó un bajo porcentaje de germinación de los quistes en los controles (2-5 %) comparado con otros porcentajes de germinación en otros experimentos, los quistes con aplicación de alza de temperatura definitivamente no germinaron ni siquiera en esta fracción porcentual, lo que valida los tratamientos aplicados. No obstante, los escasos antecedentes que existen en nuestro país referentes a estudios de quistes y ciclos de vida de microalgas en general como *A. catenella*, hacen difícil explicar el bajo porcentaje de germinación de los quistes controles.

En este contexto, los resultados obtenidos son útiles como antecedentes para establecer otros estudios con preguntas más específicas que ayuden a mejorar el conocimiento de esta fase del ciclo de vida de *A. catenella*. Las interrogantes que surgen de este estudio se refieren fundamentalmente a: Cuáles serían las condiciones óptimas de germinación de quistes de *A. catenella*, sean estos inducidos o aislados naturalmente desde los sedimentos. Cuanto varía el tiempo de latencia de quistes inducidos y/o naturales bajo diferentes condiciones de conservación como temperatura, oscuridad, oxigenación, salinidad, nutrientes disueltos (solo se utilizó oscuridad durante el desarrollo de este proyecto de acuerdo a antecedentes bibliográficos). Cuáles son las condiciones óptimas de conservación para asegurar un porcentaje de germinación por sobre el 25% de germinación (porcentaje máximo de germinación obtenido para quistes inducidos durante la ejecución de este proyecto). Cuán dependiente es esta tasa de germinación de las cepas utilizadas durante el desarrollo del proyecto. Todas interrogantes no posibles de responder durante la ejecución de este tipo de proyectos, por cuanto no están especificados en los objetivos, bases técnicas, plazos ni financiamiento. Sin embargo, una vez dilucidadas estas interrogantes, se estaría en mejor condición de argumentar objetivamente los resultados de la baja germinación de quistes obtenidos en las unidades de tratamiento no tratadas.

2) Salinidad

La Tabla 20 muestra el efecto de la salinidad en los quistes. Ninguno de los quistes sometidos a salinidades < 31 psu aplicadas ha germinado respecto al control luego de 33 días de monitoreo. De acuerdo al control, se hubiese esperado que al menos el 20% de los quistes sometidos a las diferentes salinidades hubiesen germinado dentro de los diez días de iniciado el experimento. Los resultados del control y tiempo de monitoreo de los diferentes tratamientos, 87-1119 días, sugieren un efecto de las salinidades < 10 psu para inhibir la germinación de los quistes.

Comparado con los porcentajes de germinación obtenidos en la totalidad de los experimentos realizados en este estudio, el porcentaje de germinación obtenido en este caso es relativamente alto. No obstante, sin antecedentes como los planteados en 1) no es posible sustentar objetivamente si



este porcentaje de germinaci3n es alto o bajo. Cabe adem3s se1alar que las condiciones de crecimiento de las c3lulas germinadas se mantuvieron en los mismos pocillos con 2 ml de medio cultivo L1 hasta el final del periodo de incubaci3n, condici3n que es probable que haya provocado el un crecimiento "estacionario" de las c3lulas como el observado en la placa control de 31 psu (exp. inicio 27/07/11) a partir del d3a 33.

3) Radiaci3n UV

La Tabla 21 muestra el efecto de la radiaci3n UVC con las dosis experimentales aplicadas: 2, 11, 21, 30, 66 y 94 mJ/ cm². Ninguno de los quistes sometidos a las dosis se1aladas germin3 despu3s de los 119 a 133 d3as de monitoreo en comparaci3n a la germinaci3n del control cuyo porcentaje fue entre el 2 y 25% a los dos y diez d3as de incubaci3n en condiciones 3ptimas. Los quistes destinados a la determinaci3n del tiempo de latencia registraron un 14 % de germinaci3n reci3n a los 43 d3as de monitoreo. Los resultados de los controles (tiempo de latencia y control sin tratamiento de UVC) en los dos experimentos realizados sugieren que las dosis aplicadas son efectivas para inhibir la germinaci3n de quistes.

Cabe hacer notar, que el tiempo de latencia es el lapso que un quiste de resistencia requiere para germinar. Es una caracter3stica espec3fica y por tanto variable que debe determinarse para cada camada de quistes de modo de eliminar su efecto covariante de los elementos con los que se experimenta. El tiempo de latencia se evalu3 con un n3mero superior de quistes que el control de tratamiento de UVC. El control tampoco ha sido tratado con UVC y la diferencia con el "tiempo de latencia" es el n3mero menor de quistes empleados. El control contempla un n3mero de quistes similar al n3mero de los quistes tratados. El "Tiempo de latencia" ayud3 a decidir la continuidad de los controles de los quistes tratados con UVC y el de otros elementos experimentales en el tiempo y se consider3 como complemento del control dado la falta de antecedentes en este t3pico. Se hace notar tambi3n que durante el segundo experimento la germinaci3n de los quistes fue en dos d3as y es normal que as3 ocurriera por cuanto el tiempo de latencia de estos quistes ya hab3a sido cumplido. La antig3edad de los quistes (seis meses) desde que se indujeron as3 lo indica y es probable que por lo mismo tambi3n haya disminuido la tasa de germinaci3n respecto del primer experimento aunque m3s importante parece ser el cruce de cepas de las cuales proceden los quistes utilizados en el segundo experimento. No obstante lo expuesto, la germinaci3n positiva de quistes en el control del segundo experimento indica el efecto de las dosis de UVC aplicadas. Por 3ltimo recalcar que la informaci3n obtenida es de inter3s para ser considerada en futuros estudios dirigidos en este t3pico, antecedentes que no se dispon3an para las cepas de *A. catenella* existentes en el pa3s.

4) Ozono

La Tabla 22 muestra la germinaci3n de quistes de *A. catenella* tras ser sometidos a dosis de 9 y 18 mg/L de ozono. Las diferentes concentraciones fueron logradas exponiendo los quistes durante 30 y 60 minutos a ozonificaci3n. Ninguna de las dosis aplicadas fue efectiva para evitar la germinaci3n de los quistes tratados respecto del control. Por el contrario y al igual que lo acontecido para las c3lulas vegetativas existen dosis que resultan m3s bien estimulantes del crecimiento. En el caso de los



quistes, la concentración de 0.3 mg/L aplicada durante 30 minutos, dosis de 9 mg/L, estimuló la germinación de los quistes respecto del control.

5) Ultrasonido

La Tabla 22 a 23 muestra que de las dosis aplicadas a los quistes: frecuencia media de 46 ± 2 kHz durante 30, 60 y 90 minutos, solo los tiempos de exposición de 30 y 60 minutos resultaron ser efectivos para evitar la germinación de los quistes, no así al tiempo mayor de exposición de 90 minutos. Los resultados obtenidos sugieren que o existe un umbral de tiempo sobre el cual se estimuló la germinación de los quistes en vez de inhibirla, o que debido a la antigüedad de los quistes utilizados (seis meses), la materia orgánica acumulada alrededor de sus membranas los protegió del efecto de cavitación provocada por el ultrasonido aplicado o fue producto de la interacción de ambas alternativas. Se recomienda que en futuros estudios se consideren estos resultados para dilucidar el real efecto del ultrasonido de baño en la germinación de quistes de *A. catenella*.

6) Filtros: trama < 25 μ m

El tamaño de los quistes utilizados en este estudio sobrepasó los 40 μ m de longitud y 27 μ m de diámetro, valores que estuvieron dentro de 58 μ m de longitud y 28 μ m de ancho reportados en la literatura (Hallegraeff *et al.* 1997). En consecuencia, las dimensiones de los quistes con los que se trabajó se encuentran dentro de los rangos para los que se recomienda el uso de la filtración como metodología de eliminación (*i.e* Cangelosi *et al.* 1999).

7) Cloración

La Tabla 24 muestra que las dosis aplicadas: 20, 50, 100 y 200 mg/L por 25 minutos, todas fueron efectivas en inhibir la germinación de los quistes. Concentraciones de 20 mg/L aplicadas por 25 minutos serían suficientes para eliminar los quistes de *A. catenella*.

Evaluación experimental de los elementos utilizados en la eliminación y/o desnaturalización de células de *A. catenella* y recomendaciones de uso

De los 7 elementos evaluados experimentalmente, la mayoría resultaron ser efectivos en la eliminación de las células vegetativas de *A. catenella* a excepción del baño de ultrasonido.

De acuerdo a los resultados, la efectividad de los elementos utilizados en la eliminación y/o desnaturalización de quistes de *A. catenella* puede resumirse como sigue:

- **Temperatura:** 45 °C x 1 hora, 25 °C x 5 horas

- **Salinidades:** < 10 psu (partes por mil)

- **Radiación:** UVC > 2 mJ/cm²



- **Ozono: sin efecto a dosis < 18 mg/L (dosis de 9 mg/L estimulan la germinación)**
- **Ultrasonido: No efectivo en baño de ultrasonido a frecuencia media de 46 ± 2 KHz aplicada > 60 minutos. Aplicaciones entre 30 y 60 minutos son efectivas para la inhibición de quistes.**
- **Filtros: trama < 25 μ m**
- **Cloración: concentración mínima de 20 ppm por 25 minutos**

El ozono no fue efectivo en la eliminación de quistes a dosis menores de 18 mg/L, concentraciones altas en todo caso considerando el poder oxidativo para su uso en plantas de proceso como embarcaciones de traslados .si se encontraran concentraciones efectivamente mayores.

De los elementos evaluados empíricamente y por referencia bibliográfica, al igual que en las células, los filtros resultan ser muy efectivos para la eliminación de quistes, siempre que usen en serie —**250, 100, 50 y 25 μ m**— y **en tándem** de dos o tres juegos y adosados a dispositivos de limpieza (e.g. aspersores) mecánicos o automáticos de modo de automatizar las reiteradas limpiezas que deben realizarse durante un trayecto de transporte o en plantas de proceso. Así el sistema de filtros elimina tanto la fase vegetativa de *A. catenella* como su fase de quiste.

Igualmente que en el caso de las células, las alzas de la temperatura a 25 y 45 °C y/o disminución de la salinidad (< 10 psu o en su defecto uso de agua dulce) serían los elementos de mayor factibilidad de uso en plantas de proceso y embarcaciones de transporte para la eliminación de quistes de *A. catenella*, considerando para cada caso, factores de tonelaje y energía mínima necesaria requerida en su aplicación.



3.4. Objetivo específico 2.4. *Evaluar distintos mecanismos de eliminación o de destrucción de A. catenella (quistes y forma vegetativa) para aplicar a las potenciales fuentes dispersoras de plagas de acuerdo al DSN°345/2005.*

Metodología

La mayoría de las técnicas de tratamiento de aguas marinas descritas en la literatura han sido propuestas para el tratamiento de las aguas de lastres. De hecho, las técnicas y elementos descritos para el tratamiento de fómites en el punto 3.3, como ya se mencionó en el mismo punto, están basadas en la literatura para el tratamiento de aguas lastre y son totalmente aplicables para el tratamiento de otro tipo de aguas o efluentes de desecho.

En Chile, las potenciales fuentes dispersoras de plagas están circunscritas básicamente a sus aguas efluentes de: Plantas lavadoras de redes, plantas procesadoras, plantas desarenadoras y purificadoras, de transporte de organismos vivos en wellboats, barcos cisternas y lastre. Si bien las aguas lastres son un problema antiguo en todas partes del mundo, el aumento de las actividades generadas por la industria de la acuicultura en Chile también han aumentado los riesgos potenciales de propagación de plagas a través del uso de los servicios que prestan las fuentes potenciales mencionadas. Aunque para muchos es evidente, no está demás mencionar que la mayoría de estas plantas está concentrada en la región de Los Lagos.

Hasta ahora, las medidas de higiene y salubridad de los productos de consumo público son las más utilizadas al interior de las plantas procesadoras y de desarenado, sin embargo parte de los elementos utilizados (e.g. cloro, hipoclorito) en el tratamiento de sus aguas de desecho que van directo al medio ambiente, son conocidamente efectivos eliminadores de *A. catenella*. De hecho, la eliminación de cultivos viejos de microalgas mantenidos en los ceparios estipula como procedimiento la cloración (con cloro, también conocido como hipoclorito de sodio, lejía o lavandina) de las muestras previamente a su eliminación por el fregadero. De este modo se cautela la propagación de *A. catenella* en el sistema marino inmediato en el que desembocan los desechos.

Habiéndose realizado una revisión de las metodologías disponibles para la evaluación experimental, se seleccionaron los métodos con mayor efectividad y mayor probabilidad de uso, o en su defecto con mayor factibilidad de implementarlas en caso de no ser utilizadas, por los wellboats, las plantas de desarenado, purificación y proceso de recursos marinos para el tratamiento de sus efluentes y riles como medios de dispersión de *A. catenella* en el medio ambiente.



Diseño de validación de muestreo y tratamiento de elementos de eliminación de *A. catenella* implementados en plantas de desarenado o desinfección: Para ejecutar en plantas o experimentalmente.

No fue posible contar con una planta desarenadora en la región de Los Lagos para cumplir con la solicitud de la Subsecretaría de Pesca, pues se adujo a que en el proceso de desarenado no se tratan ejemplares que provengan de áreas con presencia de marea roja, y en la región de Magallanes no existen plantas de esta naturaleza debido a que no se destinan mariscos frescos a los mercados internacionales. Por tales motivos se debió proponer un diseño experimental para ser ejecutado en dependencias de IFOP en Punta Arenas.

La figura 13 muestra el sistema a escala piloto de desarenado utilizado para realizar la experiencia. Este consistió en tres bims con capacidad de 600 L cada uno dispuestos en forma descendente des una altura de 3.5 m. Los moluscos se dispusieron en el segundo bim a una altura de 2 m mientras que el tercero que fue el receptor del agua (o "ril") se dispuso a nivel del suelo. El agua fue evacuada en forma descendente por efecto de gravedad a un flujo de 2.5 L/min, sobre los moluscos recolectados en las cercanías de Punta Arenas durante baja marea (Punta Carrera, distante a 20 km de la ciudad). Estos se dispusieron en sobre una red suspendida en el interior del bim pero sumergidos en agua de mar, de modo de recepcionar la arena y fecas excretadas por los moluscos y dejar sedimentar por decantación en el fondo del mismo receptor.

El agua acumulada en el tercer bim (nivel del suelo) fue bombeada hacia el bim de mayor altura, de manera que se mantuvo un flujo constante de agua al menos por 8 horas consecutivas durante el día dejando en reposo durante la noche para continuar con el flujo al día siguiente.

Al momento de recolectar las muestras de moluscos (choritos, entre 100-200 individuos tamaño comercial), se recolectó agua del lugar con manguera y red, o bien mediante bombeo de agua. Esta última alternativa hubo de ser utilizada por las malas condiciones climáticas.

El agua de mar circulante fue recolectada en las cercanías del lugar mediante bombeo en tambores de 200 L. El agua fue prefiltrada mediante tamices de red de 250, 100, y 25 μm para evitar contaminación con microalgas ajenas a las que pudiesen eliminar los moluscos tratados. Esta agua fue vaciada en el bim dispuesto en el suelo desde el cual el agua fue bombeada al bim de mayor altura.

Previo a iniciar el tratamiento (T0), se recolectó entre 6-8 individuos para examen de sus valvas, biso e interior (hepatopáncreas y tejido restante) además de agua. Solo el hepatopáncreas y tejido fueron sonicados por 1 minuto a una amplitud del 40 % para pesquisar quistes eventualmente adheridos a estos órganos. En el resto de los elementos no se sonicó para no romper las eventuales microalgas presentes. El agua proveniente del bim con choritos fue filtrado por el set de tamices de 250, 100, y 25 μm durante el periodo de circulación de agua en que se mantuvieron los moluscos. Luego de las 8 horas de circulación de agua, se recolectó nuevamente seis moluscos (para el análisis de cuerpo, hepatopáncreas, valvas, biso), agua concentrada en el tamiz de 25 μm y sedimentos del fondo del bim contenedor de moluscos (2 L) (T1). Un muestreo similar fue realizado



al término del segundo periodo de recirculación (T2). La temperatura se mantuvo entre 7.8 y 8.9 °C durante los dos experimentos realizados.

Resultados y discusión

Diseño de validación de muestreo y tratamiento de elementos de eliminación de *A. catenella* implementados en plantas de desarenado o desinfección: Para ejecutado experimentalmente.

Durante el periodo solicitado por SUBPESCA, se logró realizar dos experimentos de desarenado, el 15 y 20 de febrero con moluscos choritos en ambas ocasiones.

Las Tablas 25a,b muestran la composición específica observada durante los dos experimentos realizados, para los distintos elementos muestreados: valvas, visos, hepatopáncreas, cuerpo, agua y sedimento además del agua *in situ* de donde procedieron los moluscos. Un resumen de los resultados se presenta en la Tabla 25c para facilitar la interpretación de los mismos.

Aunque el agua circulante ayudó a mantener la temperatura bajo los 9 °C y a los moluscos en buenas condiciones fisiológicas (no se presentaron individuos muertos), los elementos analizados más bien mantuvieron la concentración de microalgas e incluso la aumentaron hacia el final del experimento como aconteció con las valvas y bisos. En el caso del agua circulante, la concentración total de microalgas disminuyó en T2 y T3 durante el segundo experimento, no así en el primero, que paradójicamente a lo esperado aumentó ostensiblemente la concentración de microalgas en T3. La diferencia observada en las concentraciones del agua circulante en T0 en el primer experimento parece haber producido las diferencias observadas entre ambos experimentos. El aumento de microalgas en el sedimento sugiere mayor contenido de microalgas en la materia orgánica, principalmente excretada por los propios moluscos. Si bien el consumo de microalgas no se reflejó en el hepatopáncreas ni tejido corporal por cuanto las muestras fueron homogenizadas por ultrasonido para lograr una mayor probabilidad de encontrar quistes adheridos, el proceso también conduce al rompimiento de las células. Sin embargo, el aumento notorio de la concentración de microalgas en el sedimento del experimento 1 en T3 luego que las microalgas no fueran detectadas en el sedimento en T2, sugiere fuertemente un consumo por parte de los moluscos. Así también lo evidencia la escasa concentración de microalgas en el agua circulante tanto en T2 como en T3, y no solo en el experimento 1 sino también en el experimento 2.

También es destacable hacer notar que tanto las valvas como el biso actúan como atrapadores efectivos de las microalgas en suspensión.

Por último, hacer notar que a pesar de no existir una floración intensa de *A. catenella* (nivel 1-2 diez días antes del muestreo, programa marea roja) y detectarse un nivel de toxicidad positivo de VPM pero no sobre el límite en las cercanías de la zona de recolecta de las muestras de moluscos recolectados, tanto en el experimento 1 como en el 2 se detectó su presencia: en el agua apozada (T1) del primer experimento (100 células/L), y en la forma de quiste de resistencia en el hepatopáncreas (3 quistes de resistencia/g) en T2 del segundo experimento. Para verificar el



contenido de VPM en las mismas muestras recolectadas, se realizó un análisis de VPM por HPLC el que fue positivo, indicando un contenido de 2-32 μg eq. STX.2HCl/100 g carne en los moluscos del primer experimento y 2-7 μg eq. STX.2HCl/100 g carne en los moluscos del segundo experimento.

La presencia de otros quistes así como tecas de microalgas tóxicas como *Dinophysis* o *Prorocentrum lima*, sugieren la necesidad siempre de tratar las aguas de postratamiento de depuración o desarenado, mediante técnicas de filtración, cloración, ozono, calor o disminuir las salinidad a $< 2\text{psu}$, de acuerdo a la evaluación realizada en este estudio.

Es interesante hacer notar que un apozamiento, previo a la circulación de agua, provoca un aumento de las microalgas en los sedimentos mientras que la circulación de agua estimula su consumo por los moluscos. En el caso de este estudio, tras un apozamiento de 18 horas se pesquisó la forma vegetativa de *A. catenella* en el agua.

De acuerdo a estos resultados se recomienda para plantas de desarenado o proceso, dejar los transvectores siempre con un flujo de agua aunque sea mínimo, pero en ningún caso en aguas estancadas. Los transvectores debieran permanecer en condición de flujo de agua al menos durante 41 horas. El biso y valvas una vez eliminados, no debieran ser devueltos al ambiente acuático como tampoco los sedimentos resultantes del proceso por cuanto actúan como efectivas trampas de microalgas.

Aunque en el caso de este experimento piloto los sedimentos se dejaron acumular para lograr definir si la circulación y periodo de horas en tratamiento eran efectivos en la eliminación de microalgas, lo recomendable es que una vez apozados, los moluscos sean trasladados a contenedores con circulación de agua filtrada por 25 μm o en su defecto, succionar el sedimento acumulado en el fondo antes de hacer recircular el agua filtrada para evitar la re-suspensión de las microalgas.

Otras consideraciones

De la lista de técnicas y metodologías que pueden ser aplicadas para la limpieza y desinfección de bodegas y otros en relación a virus y plagas para aguas lastre (e.g. Cairns 2001; WRCB 2002; Doblinand & Dobbs 2006; Gavand *et al.* 2007) pero, que también pueden ser eventualmente aplicables a las aguas de transporte de peces vivos en las naves son: Sistemas de filtración; agua dulce; alzas de temperatura del agua; radiación ultravioleta (UV); ozono; dióxido de cloro; hipoclorito de sodio.

SERNAPESCA mediante la Resolución N°1882/ 2008 (Anexo 5), exige el uso de hipoclorito de sodio, dióxido de cloro, UV y/u ozono como medidas para el manejo de residuos sólidos y líquidos aplicables en centros de matanza en tierra y plantas de proceso que reciben salmónidos de centros de cultivo de áreas en cuarentena por virus ISA. La mayoría de las plantas dedicadas al proceso de peces, aunque la mayoría de ellas procesan también moluscos, utilizan cloración y/u ozono de manera que implementar medidas cautelares de tratamiento de aguas y riles debieran ser rápidas y



de bajo costo (Anexo 8). Estas medidas también son utilizadas para tratar las aguas de transporte de los wellboats Patagón (Anexo 6).

Por último cabe mencionar que no solo las medidas cautelares debieran ser aplicadas en plantas de proceso y plantas derivadas además de las aguas de transporte en wellboats, sino además en el resto del país donde hay antecedentes de especies nocivas o potencialmente tóxicas, que si bien no han sido declaradas plaga, pueden provocar problemas de toxicidad o muerte de peces en cultivos. Estudios de estas especies en cuanto a su capacidad de producción de toxinas y ciclos de vida es necesario también para argumentar la aplicación de estas medidas cautelares al resto del país.

Casos como las aguas lastre, otra fuente de dispersión en el mundo (*i.e.* Carlton 1985; Hallegraeff & Bolch 1991; Hallegraeff 1998) y potencialmente que ocurra en Chile dada su gran extensión costera, es un problema potencial que aún no ha sido abordado técnica ni científicamente. Tal situación amerita considerar seriamente el despliegue de las medidas cautelares como las propuestas de modo de prevenir la propagación de especies sobre todo tóxicas al resto del país a través de las aguas de lastre.



3.5. Objetivo específico 2.5. *Aplicar y validar aquellos métodos de destrucción más adecuados en sistemas de traslado de peces (barcos cisterna o wellboats) y otras "fuentes potenciales dispersoras de plagas". Evaluar los costos de implementación de las medidas técnicas que se propongan.*

Metodología

Potenciales fuentes dispersoras en Chile: Wellboats y plantas de proceso

Entre las potenciales fuentes dispersoras de *A. catenella* existentes en Chile están los wellboats.

El sistema de transporte de organismos vivos mediante wellboats se ha masificado en Chile sólo durante los últimos años en la industria de la acuicultura debido a la alta demanda por el servicio de transportes de organismos vivos mediante wellboats, particularmente con el gran desarrollo de la salmonicultura. Por lo tanto no existía información técnica precisa de las distintas flotas que operan o han operado en faenas de transporte de recursos hidrobiológicos en el sur del país en relación a las áreas que presentan eventos de *A. catenella* y que forman parte de sus rutas.

Por esta razón, previo al desarrollo de una floración, se hizo necesario realizar un primer crucero para evaluar los métodos de muestreo diseñados para este tipo de embarcaciones. La finalidad, pesquisar las formas vegetativas de *A. catenella* y eventuales quistes en el agua de los estanques de transporte de peces de los wellboats. Este crucero fue realizado el 17 y 18 de febrero de 2010 a bordo del Patagón IV. De esta manera se conocieron aspectos importantes en la operatividad de estas naves como las tasas de recambio de agua durante el trayecto, tiempos de retención en bodegas, las características físicas, los medios disponibles para la sanitización rutinaria de las mismas y momento de aplicación de éstas, información que es útil al momento de proponer diseños experimentales y evaluación de técnicas y elementos utilizados en la sanitización, que pudiesen ser aplicables también en la eliminación y/o desnaturalización de *A. catenella* y de sus quistes. La información permite además, sondear los costos de implementación involucrados y establecer los parámetros de calidad del recurso que deben mantenerse.

Nave utilizada para evaluar el diseño de muestreo de fitoplancton en aguas de bodegas de wellboats

La nave utilizada para realizar las pruebas metodológicas de recolección de muestras de fitoplancton, fue la m/n Patagón IV, perteneciente a la empresa Patagonia Travelling S. y operada por Patagonia Wellboat. Esta es una de las seis naves que pertenecen a la flota de esta empresa que realiza el servicio de transportes de recursos hidrobiológicos de cosecha y/o siembra de smolts en la región de Los Lagos y Aysén.



La misma nave y otra similar, el Patagón V, servirán de modelo en este proyecto para evaluar las técnicas en uso o alternativas para eliminar y/o desnaturalizar las formas de vida de la microalga tóxica *A. catenella* así como su aplicabilidad en el resto de las naves de la flota, gracias a la información técnica de las mismas que ha sido facilitada por la empresa.

Características de la nave Patagón IV

Esta nave (Fig. 14) presenta las siguientes características físicas:

- Eslora: 45.8 m
- Manga: 10 m
- Calado máximo aprox.: 4,80 m
- Volumen total de sus 2 bodegas: 690 m³
- Capacidad de Carga Viva: 90 t de biomasa
- Sistema carga - descarga: Vacío-presión de sus bodegas presurizadas.
- Velocidad crucero: 12.5 nudos.

Mecanismos de llenado de agua de las bodegas

Naves Patagón I-V

- Las naves poseen escotillas tanto a proa de la nave como a popa. Cada bodega tiene ducto de entrada y salida del agua, independientes entre sí.
- Todas poseen dos bodegas rectangulares y en paralelo, disposición babor - estribor en cada nave.
- Al abrir en forma neumática las escotillas de cualquier nave se produce la inundación inmediata, operación que solo toma un par de minutos. El agua entra a las bodegas tanto por las escotillas de proa como popa. Con la fuerza que ejerce el peso bruto de la nave, el agua entra a presión por los ductos ubicados en la parte baja del casco
- Una vez producida la inundación al 100 % de las bodegas y estando la nave detenida, ya no hay intercambio neto de agua con el medio exterior, pese a que hay comunicación con el medio el intercambio solo es pasivo y poco significativo
- Cuando la nave comienza a navegar, se produce nuevamente una cuña de empuje de agua que ingresa a las bodegas por los ductos de proa. El caudal de ingreso de agua es proporcional a la sección de compuerta que se abre y a la velocidad de avance de la nave. Paralelamente se mantienen abiertas las compuertas de popa que será la vía de evacuación del ingreso neto por proa.
- Todas las naves están adicionalmente equipadas con sistemas de bombeo que pueden reemplazar al 100 % la función de las escotillas. En este caso, las naves pueden permanecer con sus escotillas de proa o popa cerradas y mediante bombeo se succiona agua desde las bodegas al medio. Como consecuencia se genera un flujo de entrada de agua por las escotillas



que se han dejado abiertas proporcional al caudal bombeado. Esta opción se utiliza cuando la nave esta detenida y se requiere recambio de agua en las bodegas.

Nave Patagón VI

- Esta es la única nave que solo opera con bombeo de agua, es decir siempre se requiere bombeo para producir la circulación y ello se debe a que esta nave opera con llenado de bodegas por sobre el nivel del mar, es decir, hay presión negativa dentro de las bodegas. Esta nave también tiene escotillas pero el llenado inicial por apertura de las mismas solo lo hace al 80% y el último 20% debe llenarse con bombeo por lo explicado anteriormente.

Mecanismos de descarga de agua de las bodegas

Las descargas de agua son diferentes según las naves. Los Patagones I y II lo hacen por bombeo mientras que Los Patagones III, IV, V y VI lo hacen por empuje con presión positiva en las bodegas. El procedimiento básicamente consiste en:

Patagones I-II

- Cerrar las bodegas
- Bombear agua (y peces) desde las bodegas al exterior
- Cuando queda aprox. un 20 % del volumen de agua y peces, se permite ingreso de agua a las bodegas mediante apertura parcial de compuertas, esto para evitar que la concentración final de peces sea excesivamente alta; una vez bajada la densidad de peces se continúa el vaciado y se repite el ingreso parcial de agua las veces que sea necesario. Finalmente se bombea todo el saldo de agua y peces en las bodegas - quedando en seco todos los ductos.

Patagones III-VI

- Cerrar las bodegas
- Dejar una pequeña cámara de aire al interior de las bodegas
- Inyectar aire a presión a las bodegas generando una presión positiva
- Abrir las válvulas que conducen el agua y los peces por las mangueras de descarga
- Presión se mantiene siempre positiva y hacia el final de la descarga, igualmente hay inyección de agua para mantener densidad de peces que se resisten a salir; finalmente toda el agua y los peces son eyectados por la presión positiva en las bodegas



Condiciones internas de las bodegas Patagón IV

Un plano de la nave se muestra en la figura 15. Físicamente, las bodegas de babor y estribor se muestran en la figura 16. Cada bodega de esta nave tiene al menos 5 difusores de oxígeno en ambos costados a lo largo de la bodega (Fig. 17). Además posee una rejilla cuya trama de orificio es de 1cm de diámetro aproximadamente y cubre gran parte de la superficie vertical de proa en la que se posiciona la compuerta de entrada de agua a la bodega, continuando por la superficie vertical de estribor de la bodega. Esta rejilla, tiene la función de actuar como retenedor de elementos (organismos, partes de organismos, algas, crustáceos entre otros) y como difusor del caudal de agua de entrada a la bodega. Un esquema de la posición de la bocatoma de agua, compuerta de salida y posición de la rejilla se muestra en la figura 18.

La velocidad promedio de navegación fue de 11 nudos para el trayecto Acantilada-Huicha dependiendo de las condiciones de viento en la zona lo que hace variar su velocidad crucero.

Durante el trayecto de transporte de los peces vivos, las bodegas fueron alimentadas con agua de mar exterior en forma continua a través de una bocatoma de 65 cm de diámetro situada en la proa de las bodegas y a una altura de 50 cm del piso de las mismas. A medida que entra el agua por proa, el contenido de agua sale a través de una compuerta situada en la popa de la bodega.

Las escotillas de acceso al interior de las bodegas para el personal de la nave, situadas en la superficie externa de cada bodega, permanecen cerradas mediante sellos numerados durante todo el trayecto de transporte de la carga (Fig. 19). Estos sellos son colocados al salir del centro en Acantilada –Aysén, y sólo son extraídos una vez llegada la carga a su destino, el centro de acopio.

Los sellos en estas escotillas de acceso son puestos por la propia empresa dueña de los peces, en este caso Salmones Antártica cuyo centro de cultivo en se encuentra ubicado en Acantilada y su centro de acopio en Huicha – Chiloé. La información de los sellos se comunica a la empresa de transporte mediante una guía de despacho. La medida es aplicada en resguardo a hurtos o incidentes de cualquier tipo que ocurran durante la ruta de transporte.

Ruta de transporte del wellboat Patagón IV

La ruta efectuada por el Patagón IV en el traslado de truchas arcoiris (*Oncorhynchus mikis*) de 3 k aproximadamente fue entre Acantilada y Huicha.

Caudal de agua en las bodegas durante el transporte de carga

El recambio de agua en las bodegas durante el traslado de estos peces vivos es continuo y se produce siempre que la nave esté navegando. En la nave Patagón IV esta renovación de agua comienza por la entrada de agua a través de una bocatoma localizada en la proa de cada bodega.



En el caso de esta nave la bocatoma generalmente se mantiene abierta solo en un 50% para no estresar a los peces que nadan contra la corriente.

No hay medidor de caudales en las bodegas, por lo que su estimación es indirecta vía % de la superficie de apertura de las compuertas o bocatoma de las bodegas. Así, el cálculo del caudal de agua promedio estimado durante el trayecto fue el siguiente:

Caudal de agua ($\text{m}^3 \text{h}^{-1}$) = área compuerta * velocidad nave

Diámetro compuerta = $65\text{cm}/100 = 0.65 \text{ m}$

Radio compuerta = 0.325 m

$$\begin{aligned}\text{Área} &= \pi * R^2 \\ &= 3.1416 * (0.325 \text{ m})^2 \\ &= 0.3317 \text{ m}^2\end{aligned}$$

$$1 \text{ nudo} = 1852 \text{ m h}^{-1}$$

$$11 \text{ nudos} = 20372 \text{ m h}^{-1}$$

$$\text{Caudal de entrada agua al 50\%} = 0.3317 \text{ m}^2 * 20372 \text{ m h}^{-1} * 0.5 = 3380 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$$

Tiempo de retención del volumen de agua en cada bodega: Volumen/caudal = $345 \text{ m}^3 / 3380 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1} = 0.102 \text{ horas} = \boxed{6.12 \text{ min}}$

El caudal también depende de las características físicas y velocidad de navegación de las distintas naves que conforman la flota. Así por ejemplo, en la nave Patagón III, cuya navegación es más lenta, las bodegas permanecen abiertas en un 100% y por lo tanto el caudal debe ser calculado para esta nave. En el caso de la nave Patagón VI, la de mayor envergadura de las naves de la flota, el agua es inyectada a las bodegas por medio de bombas las que son utilizadas al 100% y funcionan a 1000 rpm lo que se traduce en un caudal aproximado de $3000 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$.

Teóricamente para cada bodega del Patagón IV, el recambio completo de agua cuyo volumen es de 345 m^3 , es de 6 minutos aproximadamente. Sin embargo, esta puede variar algo durante el trayecto en función de la demanda de oxígeno que se registra en línea, la velocidad del agua dentro de las bodegas, y el grado de estrés (observados a través de un sistema cerrado de televisión con cámaras instaladas en las bodegas) de los peces que nadan contra la corriente. Todos estos controles y regulación de estos factores se realizan automatizadamente desde el puente, al igual que durante el llenado de las bodegas en los centros de cultivo como el vaciado de la carga en los centros de acopio. La concentración de oxígeno en el agua para asegurar condiciones óptimas de traslado de los peces es de 8 mg/L . Ante un déficit de O_2 , se aplica 0.5 mg/L de oxígeno mediante los difusores instalados en el piso de cada bodega.



Demanda de oxígeno de los peces

Fisiológicamente los peces soportan hasta una concentración de 3 mg/L de oxígeno en el agua, sin embargo estas operaciones representan mayor exigencia por estar los peces en una condición de stress. Por lo anterior se considera normal, niveles sobre 6.5 e idealmente operar sobre 7 mg/L.

En las operaciones es posible verificar que hacia el término del proceso de carga se registra la condición más crítica pues se ingresan grandes volúmenes de agua habitualmente muy pobre en O₂ desde las jaulas y el metabolismo de los peces está muy alto generando una gran demanda de O₂ en las bodegas del wellboat. Aún con aportes muy altos de O₂ el agua se saturará (O₂ + CO₂) y generará una caída del nivel de oxígeno que se acepta como normal de trabajo hasta 5 mg/L. Si se llega a ese nivel y aún no está terminada la carga, la nave debe suspender el ingreso de peces a las bodegas y debe renovar el agua dentro de las bodegas, ya sea por bombeo o por la acción de navegar en el sector hasta recuperar los niveles de O₂ por sobre los 8 mg/L. Logrado lo anterior, la nave volverá a la jaula de carga y continuará el proceso hasta completar su carga.

Durante el viaje resulta más fácil mantener niveles de O₂ sobre 7 mg/L y en caso de navegar por aguas muy pobres en O₂, los sistemas de generación de la nave pueden suplir el 100 % del requerimiento de los peces. En la descarga se repite tema de la baja de O₂ hacia el final de la descarga, pero es menos agudo que durante la carga.

Metodología de muestreo de agua de las bodegas y en el exterior durante el crucero en Patagon IV (aplicada)

El objetivo de este embarque fue esencialmente evaluar el sistema de recolección de muestras de agua tanto en bodega de la nave como en el ambiente marino (exterior) para realizar recomendaciones de control en las pesqueras de microalgas tóxicas sobre todo en las bodegas durante eventuales floraciones que se produzcan en las rutas de transporte.

Para realizar el muestreo en la nave durante el trayecto de transporte de salmones (17-19 de febrero de 2010) en presencia de *A. catenella* en el ambiente, se consideró la abundancia relativa de esta microalga obtenidas del monitoreo de la marea roja y del monitoreo REPLA de SERNAPESCA (www.sernapesca.cl) (Tabla 2a, b, Fig. 20) en las diferentes áreas que coincidían con la ruta de transporte de Patagón IV.

La figura 21 muestra los tramos de la ruta realizada en el fiordo Aysén y en la boca de éste, en los que se recolectó muestras de agua tanto de la bodega de estribor como en la columna de agua en el exterior de la nave (5.5 m de profundidad de la columna de agua) el día 18 de febrero de 2010. La distancia promedio recorrida durante los tramos de recolecta de agua fue de 3,2 km aproximadamente para un tiempo de 10 min.

La recolecta de agua en la bodega se realizó mediante una electrobomba de drenaje (220 v), sumergible y de acero inoxidable (ESPA, modelo Drain 100) con capacidad aproximada de acuerdo



a cálculos realizados durante su operación en el embarque, de 69 L min⁻¹. Esta bomba fue suspendida —con ayuda de un cabo sujeto en la cubierta más un peso (~10kg) que mantuviera la verticalidad de la bomba— en el interior de la bodega de estribor a 5 m de profundidad durante 10-15 min. El agua impulsada a la superficie fue a través de una manguera reforzada de 2 cm de diámetro (Fig. 22). El agua fue recogida en un recipiente de plástico de 100 L con aberturas superiores en los costados para el escape de agua y cuya boca estaba cubierta por un set de tres tamices de diferente tamaño de trama (Fig. 23).

Cada tamiz fue confeccionado con una red de plancton de 20, 100 y 250 µm, respectivamente, sujetas individualmente con un marco de madera que cubría prácticamente la totalidad de la superficie de la boca del recipiente.

En la confección de estos tamices se utilizó suficiente paño de red de modo que al llenarse el recipiente con agua, las redes quedasen bajo el nivel de las aberturas de escape de agua del recipiente y asegurar que permanecieran sumergidas mientras se trabajaba.

Para la recolección de agua, los tamices fueron dispuestos por tamaño descendente. Después de 10-15 min, se cortó el flujo de agua y se retiraron los dos tamices superiores. Una alícuota de 120 ml fue tomada del agua filtrada que quedó sobre la red de 20 µm y fijados con lugol para posterior análisis microscópico en el laboratorio. Otra alícuota de 3-5 ml fue puesta en un tubo con medio de cultivo, traslada en oscuridad y frío hasta el laboratorio e incubada en cámara de cultivo bajo condiciones de luz y temperatura estándar. De esta manera se pesquisa el estado de vida y fisiológico de *A. catenella* que pudiesen eventualmente transferida al interior de la bodega durante una floración en alguna de las áreas geográficas por la que atraviesa la ruta de navegación.

Una réplica del sistema de recolecta de agua descrito arriba, fue utilizado para recolectar agua de mar desde la columna de agua en el fiordo Aysén (exterior de la nave). Sin embargo, la electrobomba portátil de cubierta para extraer agua desde una profundidad sub-superficial del fiordo no funcionó. La velocidad de navegación de la nave (> 9 nudos) impidió sumergir la manguera de succión de agua a una profundidad adecuada aún cuando se utilizaron diversos pesos, como para evitar la succión de aire por la turbulencia provocada en la superficie del mar por el propio barco en navegación. No obstante que la bomba es capaz de succionar agua con la nave detenida, fue imposible hacerlo durante la navegación.

Por esta razón se optó por recolectar agua del fiordo a través de la red de succión de agua para incendios que posee el barco. El agua proviene de una profundidad de 5.5 m y es de similar profundidad al flujo de agua que alimenta la bocatoma de las bodegas. El flujo de agua fue entonces regulado a un promedio de 70 L min⁻¹ aproximadamente. El agua fue recogida en el sistema de tamices y recipiente a través de una manguera de lona (para incendios) (Fig. 24). Del mismo modo que antes, una alícuota de 120 mL recogidos por la malla de 20 µm fueron fijados en lugol y 3-5 ml fueron puestos en tubos con medio de cultivo.

Crucero en la nave Patagón V



Entre el 22 y 23 de marzo de 2010, se realizó un segundo crucero en un wellboat, el Patagón V de características similares a la nave Patagón IV. El crucero se programó luego de conocer un aumento de las abundancias relativas de *A. catenella* (entre 3 y 5) registradas por el programa marea roja y REPLA del SERNAPESCA (Tabla 2a, b).

Características de la nave Patagón V

- Eslora: 49.2 m
- Manga: 10 m
- Calado máximo aprox.: 4,80 m
- Volumen total de sus 2 bodegas: 785 m³
- Capacidad de Carga Viva: 105 t de biomasa
- Sistema carga - descarga: Vacío-presión de sus bodegas presurizadas.
- Velocidad crucero: 10.5 nudos

Condiciones internas de las bodegas Patagón V

Las condiciones internas de las bodegas son similares a la de la nave Patagón IV (plano similar de la nave), pero de un volumen algo mayor. Cada bodega es de 400 m³.

Ruta de transporte del wellboat Patagón V

La ruta efectuada por el Patagón V en el traslado de truchas arcoiris (*Oncorhynchus mikis*), vivas de 3 kilos, fue entre Islote Bonito (fiordo Aysén) y Huicha (Fig. 25). La densidad de carga en el traslado fue de 100 kg/m³.

Caudal de agua en las bodegas durante el transporte de carga

En el caso de esta nave, el diámetro de la bocatoma es de 70 cm y en este viaje se mantuvo con una superficie de apertura del 65%. La velocidad promedio durante el trayecto fue de 10.3 nudos.

Caudal de agua (m³ h⁻¹) = área compuerta * velocidad nave

Diámetro compuerta = 70 cm/100 = 0.70 m

Radio compuerta = 0.35 m

Área = 0.385 m²

Caudal de entrada agua al 65% = 0.385 m²*19077 m h⁻¹ * 0.65 = 4772 m³ h⁻¹



Tiempo de retención del volumen de agua en cada bodega: Volumen/caudal = $400 \text{ m}^3 / 4772 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1} = 0.082 \text{ horas} = \boxed{4.93 \text{ min}}$

Metodología de muestreo de agua de las bodegas y en el exterior durante el crucero en Patagón IV (aplicada)

La metodología de muestreo de agua tanto en el interior de las bodegas como del exterior (columna de agua a 5.5 m de profundidad) fue la misma utilizada en el Patagón IV descrita anteriormente.

Otras fuentes de dispersión: Plantas de proceso, de desarenado y purificación y evaluación de técnicas de destrucción de quistes de *A. catenella in vitro*

Entre otras fuentes potenciales de dispersión están las plantas de proceso de moluscos. Éstas están distribuidas a lo largo de Chile pero su mayor porcentaje se encuentra en la región de Los Lagos. Con el auge de la industria de la acuicultura en los últimos años, han surgido además servicios ya sea anexos a las mismas plantas o independiente como las plantas desarenadoras y/o depuradoras especialmente para el procesamiento de los moluscos destinados a mercados externos. Otra industria reciente es el del servicio de lavado de redes utilizados en las mismas actividades.

Por ello se visitó al menos dos plantas de proceso para observar en terreno los procedimientos de limpieza y control utilizados tanto al interior de la planta como en sus efluentes y riles. Una de ellas está ubicada en la ciudad de Punta Arenas y la otra en la ciudad de Puerto Montt. También se buscó información en la red de buscadores de libre acceso.

Diseño para la validación de muestreo y tratamiento de UV con y sin filtro durante cruceros en wellboats

La figura 26a muestra un modelo de validación de muestreo de aguas pre y post tratamiento con filtros y UV para ser aplicado en wellboats. El muestreo de agua consistía en la recolecta de volúmenes suficientes y representativos (no menos de 5 L) del utilizado en este tipo de embarcaciones.

El agua debía ser recolectada antes de ser filtrada y también después del filtro o pre-reactor UV (Fig 26a), ambas antes de ser tratada en el reactor de UV. Cuando no se dispusiera del filtro (Fig. 26b), la muestra de agua siempre debía ser recolectada inmediatamente antes de ser tratada en el reactor de UV. El efluente proveniente del reactor de UV debía ser recolectado antes de ser vaciado a la bodega —en caso de transportar smolts— o en su defecto antes de ser evacuado al medio ambiente.



De acuerdo a este diseño, el muestreo consistió en la recolecta de agua antes de ser filtrada por filtros Bernoulli, vale decir, desde el exterior de la nave o desde una de las bodegas cerradas en las que se transportan las truchas. La recolecta de agua se realizó mediante una bomba de succión durante 2 a 5 minutos (flujo de 69 L/min) y filtradas por tamices de redes de distinto trama, metodología similar a la utilizada para el muestreo de agua en las bodegas y exterior de los wellboats anteriormente descrita por cuanto se recolecta un volumen de agua representativo del contenido de la bodega.

A través del conducto de agua, en la sección post filtro o pre-reactor UV (Fig. 26a), sección post reactor y finalmente en el compartimento de relave —esta última sin ser tratada para evaluar el efecto del UV— la recolecta de agua fue de 8 L agua en cada sección. Un muestreo de agua de los conductos sin el filtro (Fig.26b) no fue posible realizar debido a que el filtro en estas naves, se encuentra intercalado y fijo en el sistema de red de agua que conduce al reactor de UV.

El muestreo se realizó al menos una vez durante cada crucero, puesto que la renovación del agua durante el trayecto es total de acuerdo a la operatividad de estas naves y como ha sido informado en los respectivos avances entregados en relación a cómo funcionan estas Naves.

El registro de las dosis de UV así como de la transparencia del agua es automático pues está integrado al software de operatividad del reactor UV instalado en las naves Patagón. De manera que a petición del mandante, se solicitó a la empresa, una copia de este registro para el trayecto en el cual se realizaron los muestreos.

El agua recolectada (8 L) en un bidón de plástico de 10 L en las distintas secciones fue filtrada por el set de tamices de 250, 100, y 25 μm . Una alícuota de la muestra de cada fracción de tamaño fue fijada con lugol para su posterior análisis bajo microscopio.

Los resultados se expresan por células / L y corregidos por el volumen filtrado para fines comparativos.

Resultados y discusión

De los wellboats y plantas de proceso incluyendo, los primeros más las depuradoras y desarenadoras son los más desconocidos. Como las plantas desarenadoras-depuradoras son de uso reciente en nuestro país la implementación de medidas de destrucción son afines con las empleadas en las plantas de proceso.

Plantas de proceso

Los procedimientos utilizados rutinariamente en una planta de proceso para el tratamiento de desechos y riles involucran principalmente procesos físicos-químicos. Un modelo de operatividad y



elementos utilizados es el que se describe a continuación (gentileza de planta de proceso Caicaen de Marine Harvest de Puerto Montt).

La planta de proceso opera como matanza de peces y posee desinfección físico-química. Las etapas son las siguientes (Fig. 27):

1. Proceso físico de separación de sólidos y grasas. Se tratan 30 m³/h

- Proceso decantación y separación de sólidos.
- Separación de grasas por diferencia de densidad.

2. Proceso químico

Opera a 25m³/h. Requiere 4 a 5 hrs por proceso.

- Adición de Cloruro férrico (proceso de coagulación y floculación de materia orgánica)
- Ajuste de pH con soda
- Adición de polímero (floculante formador de agregados de materia orgánica)
- Separación de flóculos por flotación y lodos mediante la adición de aire
- Adición de cal a lodos para deshidratar
- Compactación de lodos por presión (tortas de lodo)
- Retiro de tortas de lodo

3. Proceso de desinfección

- Agua antes tratada pasa a proceso de desinfección
- Uso de ozono. En caso de contingencia se utiliza hipoclorito de sodio.
- Uso de estanques de 50 m³ con 100 mg/L residencia por 10 min para caso del hipoclorito. Hipoclorito se neutraliza con metadisulfito.
- Caso de ozono: se emplean 0.3 mg/L ozono como concentración mínima con 5 minutos de residencia. Efluente debe salir con menor de 0.2 mg/L de ozono.

Los riles provenientes de los wellboats no ingresan a la planta. Existen tanques de 500 m³ a orilla de playa dentro del recinto de la plata para el tratamiento de las aguas. El tratamiento se inicia con el proceso físico y luego ingresa al proceso de desinfección arriba descrito.

Para las fuentes potenciales dispersoras de plagas tales como aguas efluentes de plantas desarenadoras la siguiente descripción es un ejemplo de los requisitos exigidos por las autoridades fiscalizadoras que debe cumplir una planta desarenadora en funcionamiento en la zona central de Chile, con tres piscinas de desarenado y un volumen total de 151 m³ (<http://seia.sea.gob.cl/documentos/documento.php?idDocumento=199752>):

“El proceso del desarenado cumplirá las siguientes exigencias emanadas de SERNAPESCA y contenidas en la Norma Técnica N °3:

1. El fondo de las paredes de las piscinas tendrá la superficie lisa, dura e impermeable y fácil de lavar.



2. Antes de su depuración los moluscos bivalvos vivos serán lavados con agua de mar limpia a presión o con agua potable a fin de quitarles el barro. Este lavado como es realizado en las mismas piscinas de desarenado debe dejar abiertos los desagües durante el lavado inicial y, siempre que se deje, entre las dos operaciones el tiempo suficiente para que las piscinas estén limpias en el momento de iniciar el proceso de depuración.
3. Las piscinas de desarenado recibirán la cantidad de **50 m³/h**.
4. La toma del agua de mar se realizará con ayuda de punteras de agua salada instaladas frente a la planta de procesos.
5. El funcionamiento de las piscinas de desarenado permitirá que los moluscos vivos vuelvan rápidamente a alimentarse por filtración, eliminen la arena y se mantengan con vida en condiciones adecuadas tras la depuración previa a ser procesados.
6. La cantidad de moluscos a rotar en las piscinas nunca será mayor que la capacidad de procesamiento de la planta, **10 toneladas por día**. Para asegurarse de esto, el control de las piscinas será estricto y se registrarán todas las compras y salidas de los moluscos programadas.
7. En el caso que una piscina de desarenado contenga varios lotes de moluscos, estos serán de la misma especie. **El tratamiento se prolongará hasta que los moluscos del último lote ingresado a la piscina cumplan las 48 horas**.
8. El sobre el piso de las piscinas existirá una malla de plástico que sostendrá a los moluscos y permitirá la descamación de la arena y su posterior retiro.
9. Una vez terminado el desarenado se deberá lavar minuciosamente las conchas de los moluscos vivos con abundante agua limpia salada en las mismas piscinas.
10. Una vez al mes se realizará un estudio microbiológico de las aguas del desarenado.
11. Las bombas necesarias para impulsar este caudal se seleccionarán entre las que cumplan las restricciones de ruido indicadas en el D.S. N° 146 del Ministerio Secretaría General de la Presidencia de la República.
12. El agua utilizada en los desarenadores será devuelta al mar, a través de un emisario superficial que tiene un punto de descarga a 260 metros de la orilla, dentro de la Zona de Protección del Litoral, frente al terreno de la planta. Previamente se le retirará la arena en un decantador y al mismo tiempo se le hará pasar por **una lámpara UV** para eliminar la posible contaminación biológica. **La arena retirada** se estima en 150 kilos por día y será utilizada para relleno en la misma empresa. En caso que no se utilice como relleno se solicitará la resolución sanitaria para disponer fuera de la planta este residuo”.

Wellboats

En relación a los wellboats, a continuación se entregan los resultados del muestreo de agua en las bodegas de transporte de salmones realizados en dos oportunidades, metodologías de muestreo para evaluar las medidas implementadas a bordo para el tratamiento del agua de transporte.



3.5.1. Composición del fitoplancton en el agua recolectada en naves de transporte

Patagón IV

La composición del fitoplancton cuantitativo tanto en las muestras de agua de la bodega como del exterior del Patagón IV recolectadas el 18 de febrero de 2010 se muestra en la Tabla 26.

No obstante que al momento de realizar el embarque no habían indicios de la ocurrencia de floraciones de *A. catenella* en las diferentes áreas incluidas en la ruta de transporte del Patagón IV, los análisis de 40 ml de muestras de agua sedimentadas, recogidas tanto en las bodegas como en el exterior, mostraron la presencia de *A. catenella* (Fig. 28) en el exterior y/o bodega en los tramos N° 2-5 (Fig. 21). Sin embargo, su presencia fue muy escasa (< %1 del fitoplancton total) considerando que la muestra analizada fue el concentrado de al menos 600 L de agua que cubrieron un promedio de 3.2 km de trayecto y que provino de una profundidad óptima (5.5 m) en referencia a que es la profundidad en la que es común encontrar la mayor concentración de esta especie cuando está presente en el ambiente (e.g. Guzmán *et al.* 2002).

La leve tendencia observada en esta ocasión hacia un mayor número de células de *A. catenella* en la bodega, puede ser un artefacto debido a que el agua recolectada desde la red de incendios es bombeada con gran fuerza, debiendo controlar el flujo en forma manual a través de la llave de paso al momento de ser filtrada.

En las muestras del crucero Patagón IV, también fue posible observar cualitativamente, pues fue tan escasa que no se logró cuantificar por el método Uthermol, la presencia de otra especie de *Alexandrium*, *A. ostenfeldii* (Fig. 29) cuya distribución ha sido indicada para la zona sur austral de Chile (Guzmán *et al.* 2007). En otras partes del mundo ha sido señalada como productora de espirólidos (efecto neurotóxico) y/o VPM (Deeds *et al.* 2008). **Durante este estudio fue posible establecer cultivos de dos cepas de *A. ostenfeldii* aisladas desde las trampas de sedimentos. Así, ha sido posible verificar la producción de GTX3, GTX2 y STX (Fig. 30). La ausencia de espirólidos en estas dos cepas fue confirmada mediante LC-MS en el extranjero.**

Aunque no se observó quistes de *A. catenella*, al menos temporales, lo más probable es que no haya habido debido a la escasez de la microalga en el agua. Por otro lado, encontrar quistes sedimentados en el fondo de la bodega es difícil debido al rápido recambio de agua y el desagüe se produce por el piso de popa de la bodega. Por lo que lo más probable es que estén suspendidos en el agua al igual que las células vegetativas o en posibles puntos “muertos” de la bodega, adheridos a materia orgánica que habría que establecer. Estas posibilidades no son descartables. Aunque no son de *A. catenella*, la figura 29 (con epifluorescencia muestra claramente dos quistes, altamente similares a los de *Protoperdinium avellanum* y *P. denticulatum*, quistes encontrados también en sedimentos del sector (Anexo 3).

En cualquier caso, este resultado demuestra que **el sistema de muestreo de agua utilizado fue eficaz para ser aplicado en la pesquisa de formas de vida de *A. catenella*** tanto en las bodegas



de este tipo de naves así como en el ambiente natural especialmente cuando son escasas o no existe una floración intensa.

Patagón IV y V

La ruta del Patagón IV y V es mostrada en la Tabla 27. La composición específica en las muestras obtenidas durante el trayecto de la nave Patagón V realizado el 22-23 de marzo de 2010 se muestra en la Tabla 28. Al igual que durante el cruce Patagón IV, la presencia de *A. catenella* en las muestras concentradas en los tramos N° 2- 4 (Fig. 17) fue < %1 del fitoplancton total.

La Tabla 8 compara los resultados de *A. catenella* obtenidos en ambos cruceros desde las muestras concentradas así como estandarizados a un mismo volumen de agua (real) de acuerdo al flujo existente durante la recolecta de las muestras desde el exterior mediante la red de incendio cuyo flujo era regulado manualmente. El de la bodega fue un flujo de agua mayormente estable por cuanto se utilizó una bomba cuyo rango de flujo fue 50-78 L/min. La cantidad de *A. catenella* fue no significativamente diferente (Mann-Whitney, $p=0.37$) entre bodega y el exterior en ninguno de los dos cruceros.

3.5.2. Características físicas de la flota de wellboats Patagonia

En el Anexo 9 se muestran las características físicas de la flota de wellboats a las que pertenece la nave Patagón II, IV y V y que forman parte de una flota de seis en total. Cualquiera de estas naves es capaz de realizar la ruta indicada en las figuras 31-32. De las seis naves, solo Patagón VI aún no cuenta con reactor UV.

3.5.3. Metodologías de sanitización

El Anexo 10 muestra el programa de aseguramiento de calidad en el que se entregan los procedimientos operacionales de saneamiento general. De acuerdo a este programa, cada entidad pesquera debe implementar un manual de procedimientos operacionales de saneamiento (POS) que contempla las prácticas de higiene y sanitización considerando las exigencias contempladas en las normas técnicas emitidas por SERNAPESCA (documento HPB/PT1).

Para el caso de las bodegas de transporte de peces vivos, dentro de la flota Patagonia, las naves que poseen instalados generadores de ozono a partir del oxígeno del aire y otras que no. De ello depende el esquema propio de cada nave. Sin embargo, el dióxido de cloro es una sustancia común a todas las naves. El Anexo 6 muestra los protocolos de limpieza y desinfección aplicados.

La nave Patagón IV puede utilizar ozono que aplica en concentraciones de 0.5 mg L^{-1} como mínimo, mediante difusores instalados en el piso de cada bodega, sin embargo su uso está restringido solo



cuando el transporte se realiza a través de **zonas de cuarentena** debido a los daños oxidativos que provoca en las superficies de la nave en las que se aplica.

Rutinariamente una limpieza a fondo de las bodegas de transporte es previa a la desinfección propiamente tal. La limpieza comienza con un lavado de las bodegas con agua de mar aplicada con chorro a presión proveniente de la red de incendio.

Luego del lavado, se realiza la desinfección utilizando concentraciones de 200 ppm de dióxido de cloro en agua y se aplica manualmente mediante chorro a presión. La mezcla de agua con este compuesto es realizada por una hidrolavadora (ver Anexo 6) instalada en la misma nave. La concentración en la solución resultante es evaluada mediante kits indicadores de cloro.

En el caso de la nave Patagón II, además de aplicar esta metodología de lavado y desinfección una vez finalizada la descarga de peces en los centros de acopio, tiene instalados filtros y un sistema de UV para desinfectar el agua de las bodegas, los cuales pueden ser aplicados durante la carga y descarga de peces y durante el trayecto.

Esta nave se encuentra equipada con un sistema de desinfección del agua de ingreso sus bodegas. El sistema instalado consiste en equipos reactores UV (Atlantium) con un diseño de proyecto que busca aplicar dosis máximas de 125 mJ cm^{-2} a los caudales proyectados. Estas dosis se logran siempre que se opere con aguas cuya transmitancia sea igual o mayor al 93 % por lo que cada equipo opera con un set de filtros automáticos de limpieza (sistema Benoulli) pre-reactor de $50 \mu\text{m}$ (Fig. 33). La longitud del reactor es de 1.20 m aproximadamente y opera con un flujo de $198 \text{ m}^3/\text{h}$.

El filtro Bernoulli está basado en que un incremento de la velocidad del caudal de un líquido lleva como consecuencia un descenso de la presión. Un pistón especialmente diseñado, es introducido en la cesta del filtro, creando un incremento en la velocidad del caudal entre el pistón y la pared del filtro. La resultante caída de la presión, "vacía" hacia afuera las partículas adheridas en el interior de la cesta. Las impurezas son expulsadas a través de la válvula de salida de lodos y se evitan los problemas debidos a la colmatación de la superficie del colador (<http://www.filtrosbmarten.com/filtros-bernoulli.html>).

Los equipos han sido recientemente instalados y aún no se cuenta con una información histórica suficiente de evaluación respecto a su eficacia durante el traslado de peces vivos en sus bodegas. Hasta el momento solo se han realizado navegaciones de prueba con los reactores operando sin peces.

Por lo tanto era de interés para la empresa conocer la eficiencia de esta técnica respecto de las células y quistes de *A. catenella* además de su efecto de desinfección puesto que son aplicadas durante el transporte de peces vivos, no así técnicas como las antes mencionadas (dióxido de cloro, ozono) y otras como alza de temperatura, ultrasonido, desoxigenación o adición de peróxido de hidrógeno a las aguas.



Diseño de validación de muestreo y tratamiento de UV con y sin filtro durante cruceros en wellboats con filtro Bernoulli y reactor UV

Las Tabla 29a,b muestra los resultados, corregidos por volumen filtrado, de la composición específica en muestras recolectadas durante dos cruceros, en las naves Patagón V y II (Anexo 11) realizados en los meses de diciembre de 2011 y enero de 2012 (28 de diciembre y 19 de enero, respectivamente) en condiciones de floración o no, con el fin de evaluar el efecto de las metodologías en la composición del fitoplancton en la aguas de transporte de las naves dotadas con sistemas de filtros y reactores de UV. Los cruceros se realizaron en rutas de transporte de peces existentes en el interior de la región de Los Lagos dado que la empresa estaba con una alta frecuencia de operaciones en esta región, no así en la región de Aysén. Por lo mismo el acceso a los embarques fue mucho más rápido como para cumplir con la actividad y objetivo dentro del tiempo solicitado por SUBPESCA y a la vez cumplir con los resultados para la entrega del informe final.

Los resultados indican una baja efectividad del filtro cuando las concentraciones de microalgas en el ambiente son bajas (Tabla 29c). Así se observa al comparar los resultados de la segunda toma de muestra del primer crucero con los muestreos realizados durante la primera toma durante el mismo crucero y con el muestreo del segundo crucero. De hecho este resultado era esperable considerando que se están utilizando filtros de trama 250-300 μm para lograr la máxima transmitancia para asegurar el efecto de radiación UV como tratamiento para el virus ISA.

Los resultados sugieren que la alta concentración de células en el agua colmató los filtros, reduciendo la trama original hasta lograr filtrar un 60% de las células entre 25 y 100 μm (fracción de tamaño dentro de la cual se encuentran las células de *A. catenella*), un 66 % de las células entre 100 y 250 μm y un 80% de la fracción de tamaño > 250 μm .

Sin embargo, en el caso del muestreo 1 durante el primer crucero, y el muestreo del segundo crucero, se observa un alza ostensible de la concentración de células postfiltro en relación a densidad del fitoplancton en situación de prefiltro. Aunque los mecanismos no están claros, aparentemente existe un efecto físico y o químico que tiende a concentrar el fitoplancton, por sedimentación (efectos de torbellinos y succión) o coagulación y floculación (debido al aumento de la materia orgánica en la bodega), que se produce al pasar de un gran volumen como el de la bodega (o ambiental) a uno de menores dimensiones como el conducto en los que se intercala el sistema de filtros y reactor UVC. Las mayores diferencias encontradas entre las muestras de agua prefiltro y las postfiltro-postUVC, en comparación con las diferencias de encontradas entre muestras de agua postfiltro y postUVC así lo sugieren

Cabe considerar además que los filtros no fueron efectivos en eliminar *A. catenella*, pues se observó la microalga en la sección post reactor UV durante el primer crucero (Tabla 29a), sin embargo es altamente probable que las células fueran inviables debido a la intensidad de radiación UV aplicada (122 mJ / cm^2) por los reactores de estas naves, nueve veces superior a la dosis efectiva (13 mJ/cm^2) obtenida durante este estudio para la inviabilidad de las células de *A. catenella*.



Los resultados indican que el uso de filtros con trama de 25 μm para la eliminación de *A. catenella*, es el efectivo en caso de utilizar solo esta metodología para la eliminación de la microalga. Sin embargo como recomendación, debe estar posicionado al final de una serie de filtros de mayor a menor trama para aminorar el problema común de colmatación. El problema debiera eliminarse si estas series de filtros y en serie de dos o más unidades están adosados a aspersores mecánicos o automatizados para limpieza alternada. El número de redes (filtros) recomendable es de al menos tres y es el utilizado en este estudio y se basa en la experiencia empírica: 250-100-25 μm , o en variaciones de esta serie como 300- 100- 25 μm , pero siempre presente el filtro de 25 μm . El número de redes en la serie puede aumentar, pero en ningún caso es recomendable disminuirlo a menos de tres en la serie por los problemas de colmatación descritos.

El muestreo de fitoplancton en situación de prefiltro debe ser en el conducto y con dimensiones de sección transversal similar a las secciones donde se muestrea el fitoplancton en situación de postfiltro y post reactor UVC. De esta manera se evita el alza aparente de la concentración de microalgas al pasar de un volumen de contenedor mayor (bodega) a uno de menores dimensiones (conducto) de muestreo. En consecuencia, se recomienda intercalar una válvula para el muestreo de agua justo antes de la posición de los filtros y reactor.

3.5.4. Rutas de las naves Patagón

En el caso de la flota Patagonia, lo habitual es que las naves Patagón I; Patagón II y Patagón III operen solo en la región de Los Lagos mientras las naves Patagón IV, V y VI lo hacen entre las regiones de Los Lagos y Aysén.

En el caso de la nave Patagón II, hace transporte de peces y de smolt y hasta el momento se ha dado que los destinos de esas siembras han sido solo dentro de la región de Los Lagos. Sin embargo esta nave también está en condiciones de realizar la ruta hasta la región de Aysén cuando ese sea el destino de los smolts.

En la región de Aysén la flota navega prácticamente por todas las rutas navegables para llegar a cada centro de cultivo.

La ruta principal es el Canal Moraleda y la ruta alternativa ha sido siempre el Canal Pérez Sur - Pérez Norte - Melinka y Golfo del Corcovado (Fig. 31).

En algún momento en el año 2009 se le indicó a la flota seguir la ruta de salida desde la región de Aysén a la región de Los Lagos por el Canal Tuamapu (por el Sur de Melinka), tomando altura hacia la Isla Boca del Guafo y luego navegar hacia San Pedro en la Isla de Chiloé. Sin embargo, esta ruta fue muy inapropiada y las naves frecuentemente debieron abortar la navegación por las fuertes corrientes del Guafo en la boca del Golfo del Corcovado.



La empresa dueña de la flota señala que la navegación oceánica (por fuera de las islas en la región del Aysén), no es una opción razonable para los wellboats pues estas naves operan con un francobordo mínimo (altura máxima de carga) y resulta peligrosa para la navegación “abierta” cuando vienen con carga total de sus bodegas.

Por último, el arribo de las naves a la región a Quellón en la región de Los Lagos se realiza habitualmente por la Isla Laitec y alternativamente por el paso Chiguao (con restricciones según mareas y fuerza de corrientes) (Fig. 32). Para destinos más al norte, la flota pasa a la cuadra de Quellón, navegando en las cercanías de la Isla de Chiloé o bien por la costa cordillera de ser requerido.



3.6 Objetivo específico 2.6. *Proponer medidas de detección y certificación así como medidas administrativas tendientes a asegurar la inocuidad en los traslados.*

Metodología

Se proponen medidas en base a las normativas vigentes para el tratamiento de aguas efluentes de plantas de proceso, desarenadoras, depuradoras y de traslado de organismos vivos.

En este contexto, las técnicas propuestas en el punto 3.5, son factibles de implementar por entidades de certificación y/o aplicar los criterios establecidos a partir del trabajo experimental, de laboratorio y pilotos, por la autoridad pesquera en actividades de fiscalización. Se proponen medidas de tratamiento de aguas para aplicar en las propias fuentes considerando las medidas que las propias fuentes poseen como rutina.

Además se entregan orientaciones acerca de la operación y tratamiento para la fiscalización de modo que pueda aplicarse a las distintas “fuentes potenciales dispersoras de plagas” de acuerdo a la escala de volumen de las aguas de desecho. Estas orientaciones están basadas en los flujos de proceso que involucran el uso de las aguas y de vectores potenciales propagadores de *A. catenella* así como en las medidas rutinarias que se aplican para la limpieza y sanitización implementadas en las propias “fuentes”.

Resultados

3.6.1. Medidas generales recomendadas para aplicar en paralelo a las metodologías actualmente utilizadas para evitar el transporte de *A. catenella* por los wellboats

- Disposición de un set de filtros que involucre una malla de trama de 20 μm además de 50 μm , incluso una de 10 μm para prolongar la eficacia de la filtración, en los filtros utilizados por los wellboats. Este sistema de filtros es totalmente aplicable a todo tipo de procesos que involucren el tratamiento de aguas o riles de plantas de proceso, desarenadoras, purificadoras y agua de traslado de organismos vivos, antes de ser devueltas al medio acuático. Las tecnologías de limpieza automática que impiden la colmatación rápida de los filtros y la limpieza manual hoy en día están disponibles en el comercio, es una alternativa de las más eficaces por su inocuidad para el usuario como para el medio ambiente.
- Muestreo automatizado para recolecta de agua que facilite el muestreo de grandes volúmenes de agua en las bodegas en zonas del trayecto con alta probabilidad de ocurrencia de floraciones de *A. catenella* de modo de evitar el rompimiento de sellos que deben permanecer cerradas durante el trayecto hasta la llegada al centro de acopio. Este sistema facilitaría el control tanto de la empresa como del organismo fiscalizador. Lo mismo se recomienda para las plantas de proceso y derivadas.



- Disminuir o suspender la tasa de recambio de agua en las bodegas en zonas del trayecto con presencia de *A. catenella* de acuerdo a la información disponible entregada por el monitoreo regular de mareas rojas en las regiones sur-austral. (La eventual disminución de oxígeno de las aguas que contienen los peces en las bodegas puede ser suplida por los equipos de oxigenación instalados en los barcos y que se encuentran operativos para cuando se requiera durante el trayecto).
- Que la información de las abundancias relativas de *A. catenella* para las estaciones de monitoreo cercanas a las rutas regulares y alternativas de los wellboats en la región de Los Lagos y Aysén, esté disponible para el capitán de la nave y los técnicos de peces al iniciar el trayecto de transporte de peces vivos. Un sistema de zonificación similar al aplicado para el virus ISA podría ser de utilidad para la microalga *A. catenella*. Recientemente (2009) SERNAPESCA también ha implementado un programa de monitoreo de vigilancia cualitativa de *A. catenella* en siete estaciones situadas entre el Golfo del Corcovado y el Canal Moraleda dentro del marco del programa REPLA, (Anexo 12) (<http://www.sernapesca.cl>) aunque no hay información disponible de la entidad que recolecta las muestras ni de la metodología de muestreo aplicada.
- Considerar otras fuentes de dispersión de microalgas nocivas en el medio marino como son las aguas lastre. Sin estudios técnicos ni científicos en esta materia para aplicar medidas cautelares de propagación menoscaban fuertemente todo esfuerzo para evitar su propagación por otros medios derivados de la industria pesquera y de acuicultura.

3.6.2 Medidas de detección, certificación y administrativas

Es importante considerar que en vista de los grandes volúmenes que manejan tanto las plantas de proceso y derivadas así como los wellboats y otros servicios derivados de la industria pesquera y acuicultura (lavado de redes, transporte de moluscos y organismos vivos en general), también el muestreo debe estar a la escala de volúmenes utilizadas.

Las técnicas de muestreo propuestas **en el punto 3.5**, son factibles de implementar por entidades de certificación y/o aplicar los criterios establecidos a partir del trabajo experimental, de laboratorio y pilotos, por la autoridad pesquera en actividades de fiscalización. Los criterios considerados para que estos métodos sean factibles de utilizar están basados en el reporte de SWRCB (2002) y son: Seguridad (en la embarcación y para la tripulación encargada de los tratamientos). Efectividad biológica (capacidad de que el tratamiento destruya o elimine los organismos). Aceptabilidad ambiental (sea capaz de eliminar los residuos de los tratamientos aplicados de una manera segura para el medioambiente). Estatus tecnológico (el estado actual del desarrollo de la tecnología de tratamiento, los resultados de las pruebas de rendimiento y la práctica de una futura aplicación).

También debe considerarse que la microalga asunto de este estudio solo es posible observarla a través de microscopio y requisito para la aplicación de medidas de detección y certificación es preciso contar con uno y con un especialista capacitado en su reconocimiento.



Medidas de detección

De acuerdo a los resultados, un volumen de agua, pre y tratada, mayor a 5 L, pre filtrada por una serie consecutiva de redes de trama 250-100-25 μm es lo recomendable para detectar *A. catenella* en su forma vegetativa o quiste bajo un microscopio. Es una medida rápida para la detección de la microalga en aguas de riles o de transporte, como es el caso de plantas de proceso y wellboats. Es importante que las naves y plantas agreguen conductos de desagüe para facilitar el muestreo de pre y post tratamiento para evitar las contaminaciones cruzadas.

Otra medida de detección en el caso de las plantas de proceso, es el muestreo de sedimentos y agua de baño en caso que se dejen apozar entre las etapas de desarenado y/depuración antes de iniciar su procesamiento.

También es recomendable el muestreo del agua de lavado de valvas, así como el muestreo de al menos 5-10 ejemplares para análisis de contenido de microalgas y quistes en los hepatopáncreas, valvas y bisos.

Medidas de certificación

Las medidas de certificación que se proponen están basadas en la efectividad de los elementos evaluados durante este estudio para la eliminación tanto de quistes como de la fase vegetativa de *A. catenella*.

Medidas mínimas que debieran considerarse para una certificación son verificar la aplicación de los siguientes elementos en los tratamientos de aguas circulante y riles para eliminación de ambas fases de *A. catenella*.

Utilización de elementos:

- Temperatura: > 45 °C x 5 min caso de células, 45 °C x 1 hora caso de quistes
- Salinidades: < 2 psu (partes por mil)
- Radiación: UVC > 13 mJ/cm²
- Ozono: > 7.5 mg/L (< 1,5 mg/L estimulan el crecimiento) en caso de las células, pero sin efectividad para inhibir la germinación de quistes.
- Filtros: trama < 25 μm dispuesto al final de una serie mínima de dos tamaños de trama superior: 100 y 250 μm adosado a mecanismos de aspersion o limpieza.
- Cloración: concentración mínima de 100 ppm por 25 minutos



- Ausencia de las fases de *A. catenella* en el agua de apozamiento y sedimentos de moluscos así como en el agua de lavado de los moluscos.
- Ausencia de las fases de *A. catenella* en las valvas, bisco y hepatopáncreas de moluscos.
- Limpieza y lavado de aparejos de pesca utilizadas en cultivos y actividades de pesca artesanal.

Medidas administrativas

- Reforzar las medidas de detección en periodos de floración incluso con niveles de abundancia relativa de 1 y 2.
- Reforzar las medidas de fiscalización de actividades de pesca artesanal que involucren traslado y/o apozamiento (aunque esta última actividad está prohibida) de moluscos y aparejos de pesca.
- Establecer una red de comunicación pública actualizada de las condiciones de nivel de abundancia relativa de *A. catenella* para las zonas extractivas y rutas de navegación dirigida a plantas de proceso y embarcaciones de transporte.
- Establecer y divulgar normativas con medidas específicas de uso para la eliminación de la microalga en agua derivada de plantas de desarenado y de transporte de peces.

3.6.3. Otros antecedentes técnicos a considerar al aplicar las medidas de detección y certificación recomendadas

Lista de naves wellboats actualmente operativas o que estuvieron en funcionamiento en las regiones de Los Lagos y Aysén

El Anexo 13 muestra dos listas de naves wellboats y algunas de sus características físicas que han estado operando en la zona desde el año 1998.

De las 32 naves pertenecientes a 12 empresas que estuvieron operando en la zona (ver lista de empresa Patagonia, Anexo 13), solo 18 pertenecientes a 4 empresas se encontraban operando en el último año (ver lista de SERNAPESCA, Anexo 13). La disminución del número de naves derivó fundamentalmente de la crisis del salmón ocurrida a partir del año 2008. No obstante con el repunte de la salmonicultura en los años venideros, la demanda por estos servicios de transporte aumentará y en consecuencia, también lo hará el número de empresas y naves que prestan este tipo de servicios a la industria de la acuicultura en general.



Metodologías generales de eliminación y/o desnaturalización de *A. catenella* en bodegas de naves wellboats

Embarcaciones de transporte abiertas

De todos estos, los más aplicables para el caso de eliminación y/o desnaturalización de *A. catenella* y sus quistes mientras las embarcaciones transportan peces vivos con recambios de agua entre diferentes áreas geográficas, son el tratamiento UV y/o filtros.

El resto de las metodologías no podrían ser utilizadas al agua en su condición de afluente mientras transportan peces vivos a las bodegas, sino solo como efluente (salida de la bodega) y justo antes de ser expulsada de regreso al ambiente de modo de evitar el estrés, toxicidad y/o daño a los peces.

En naves con recambio continuo de agua durante el transporte de peces vivos, la alternativa es que posean una bodega o compartimiento de tratamiento para el agua, independiente de las bodegas, antes de ser expulsada al medio, o en su defecto, un sistema de esterilización del agua al entrar y salir de la bodega, similar al sistema que posee la nave Patagón II (aún en evaluación). Los elementos ideales en este uso ya que su acción no dañan los peces ni dejan residuos en el agua que podrían afectar el ecosistema, son la radiación UV implementado con sistemas de filtros o el uso de pulsos de plasma (e.g. <http://www.taringa.net/posts/noticias/4678260/manos-limpias,-sin-todo-el-fregado.html>). En el último caso aún existen insuficientes estudios y una tecnología aún en desarrollo como para ser aplicados en este tipo de naves en el futuro cercano. No obstante, un sistema de filtros y/o sistema de UV, ultrasonido, ozono, cloro u otro químico efectivo no dañino al medio ambiente, soluciona el problema.

Aunque algunas naves poseen generadores de ozono, un elemento de una alta capacidad sanitizante (e.g. <http://www.megaozono.com/ozonoagua.htm>) su uso está restringido para ser utilizado directamente en la bodegas del barco debido al daño de las partes metálicas de la nave por efecto de la oxidación. Sin embargo, el revestimiento de las bodegas con fibra de vidrio, o en su defecto, la bodega auxiliar destinada al tratamiento de aguas, podría solucionar este problema en la nave, no obstante persistiría el problema con los elementos auxiliares como son los difusores de oxígeno instalados en las bodegas de transporte.

La implementación de este tipo de elementos de revestimiento de compartimentos como las bodegas, una solución parcial por el momento, mientras que un compartimiento independiente de la bodega para el tratamiento de aguas de solución total, permitiría la recirculación de las aguas en las naves sobre todo cuando transportan carga en zonas de alto riesgo. No obstante, aún requieren ser evaluadas técnica y económicamente antes de decidir llevarlas a la práctica.

En el caso del UV, este elemento tampoco es suficientemente eficaz por sí solo debido a la condición de una alta transparencia del agua. Lo más indicado es aplicarlo en combinación con otros elementos para aumentar su eficacia en la eliminación o desnaturalización de los microorganismos de interés. Tal es el caso de los sistemas de UV con sistemas de filtros y/o separación ciclónica de partículas (Sutherland *et al.* 2001). En este caso, el sistema de filtros tiene la función de eliminar el



mayor porcentaje de material particulado en el agua de modo de obtener una transmitancia adecuada para lograr la eficacia de las dosis de UV aplicada.

A su vez, los filtros de un tamaño de trama adecuado (10-50 μm), pueden retener prácticamente el total de microalgas y quistes de *A. catenella* presente en el agua. El sistema ciclónico, si bien aumenta la eficacia de la separación de partículas, presenta la desventaja que el aumento en volumen de la materia orgánica aglomerada por la turbulencia ciclónica, aumenta la “captura” de partículas (por una mayor probabilidad de encuentro entre partículas) entre las que se encuentran las células y quistes de interés, actuando como “paraguas” contra las dosis de UV aplicadas. Por esta razón, los filtros que retienen este material orgánico aglomerado debieran ser tratados independientemente con otros elementos sanitizantes como el cloro, ozono, ultrasonido o ser sometidos a altas presiones con posterior lavado normal. Este último tiene la ventaja de romper tanto la materia orgánica aglomerada como las partículas retenidas sin correr riesgos de contaminar el medio ambiente. Otra alternativa es dejar en agua dulce los filtros que son recambiados por limpios durante el trayecto para ser tratados una vez finalizado el transporte.

Embarcaciones de transporte cerradas

Para el caso de las embarcaciones cerradas, vale decir que operan sin una alimentación de agua externa y expulsión de la misma durante todo el trayecto de transporte, se podrían utilizar también otras técnicas de eliminación y desnaturalización además del UV y filtros como en las embarcaciones abiertas. Esto debido a que el agua solo es expulsada al final del trayecto. Cuáles son las técnicas más apropiadas en este caso, dependerá de los resultados obtenidos para lograr el objetivo 2.2.

De cualquier manera, cualquiera que sea la metodología aplicada en embarcaciones cerradas, requiere separar el agua de los peces y luego mantener el agua en contenedores cerrados para someterla a un adecuado tratamiento antes de ser expulsada al medio ambiente.

En el caso de los centros de acopio, esta alternativa no es práctica en la actualidad dado que éstos son abiertos. Tampoco existen antecedentes suficientes del efecto de los compuestos utilizados en la limpieza del agua (e.g. peróxido de hidrógeno) al ser eliminados al ecosistema.

La descarga de peces transportados por los wellboats directamente en una planta faenadora, en la actualidad tampoco soluciona el problema del agua como agente dispersor debido a la falta de tratamiento del agua de desecho.

Un centro de acopio de agua cerrado a medida que los peces son apartados para faenamiento podría resolver el problema. Este permitiría someter el agua a un tratamiento efectivo en la eliminación de quistes y células de *A. catenella* previo a ser expulsada al medio ambiente, sobre todo aquellas aguas procedentes de lugares con alta probabilidad de ocurrencia de floraciones de esta especie de microalga. Un alerta de la calidad del agua de transporte en la planta o



centro de acopio, activaría un plan destinado a tratar las aguas previo a su eliminación al medio natural.

Embarcaciones abiertas que también pueden operar cerradas

Todos los wellboat Patagones son abiertos pero todos pueden cerrar al 100 % y operar como cerrados. La empresa expresa que de hecho, **todos los wellboats del mundo pueden operar cerrados**, el punto es ¿cuánto tiempo? y ese tiempo dependerá de cuáles son los sistemas y equipamiento que posee la nave para mantener los peces sin renovación de agua, en buenas condiciones. Cuando se cierra la nave se deben considerar las siguientes variables:

- T° del agua
- Especie transportada, siendo en orden de exigencia, de mayor a menor: smolt - juveniles - Trucha cosecha - Coho cosecha - Salar cosecha
- Densidad de traslado
- Ayuno de los peces

La nave podrá maximizar los tiempos de operación cerrados cuando pueda hacerse cargo del exceso de CO₂ que se generará por la respiración de los peces y para ello deberá tener un sistema de eliminación de CO₂. Este sistema generará espuma y consecuentemente hay que eliminar la espuma mediante un skimmer que permita retirar de las bodegas parte de la materia orgánica que generan los peces producto de sus excreciones y secreciones. Logrado todo lo anterior, el siguiente punto es eliminar la acumulación de amonio. Para ello será importante bajar el metabolismo de los peces y ello implica enfriar el agua de las bodegas. Todo lo anterior (desgasificador - skimmer y enfriadores) permiten alargar el tiempo de autonomía cerrado de una nave, pero finalmente deberá hacer un recambio parcial de agua pues no hay forma de detener el aumento de concentración de amonio en las bodegas. Así, después de un tiempo deberá necesariamente hacer un recambio parcial de agua para mantener en equilibrio el amonio total y el pH.

No es posible dar un tiempo máximo de cierre pues dependerá de las variables arriba descritas. Pero la empresa Patagonia-wellboats señala que en Noruega se habla de máximos de 8 - 10 horas 100 % cerrado.

Costos de implementación

Si se considera la disponibilidad de los distintos elementos evaluados experimentalmente en este estudio, el alza de temperatura, disminución de la salinidad y uso de cloro parecen ser los menos costosos. Sin embargo, los costos exactos de implementación dependerán del volumen o tonelaje de agua a tratar y además son confidenciales.

De acuerdo a la literatura (e.g. SWRCB 2002), el costo de un elevador o calentador de agua bordea los \$20.000.000 sin instalación incorporada.



Costos de filtros tipo Bernoulli se estiman cercanos a los \$4.000.000 aunque el costo de implementación en nave o planta puede alzar el costo a \$5.000.000. Sin embargo, sistemas de filtros más simples con limpieza automática para plantas de desarenado debieran por debajo de este precio.

El costo de los reactores UV más instalación bordea los \$70.000.000 para tonelajes de agua > 600 m³ por ejemplo. De los elementos recomendables es el más caro.

El costo de uso de bajas concentraciones de salinidad o en su defecto, agua dulce, parece ser el más simple para plantas de proceso. Existen plantas que utilizan agua dulce de la red pública, sin embargo dependerá del tonelaje de agua a ser utilizado o de la disponibilidad de fuentes naturales propias.

Por último está el cloro, el más barato de los elementos y de libre acceso, ampliamente utilizado en procesos de limpieza y desinfección. Lo único es que hay que asegurar las concentraciones mínimas recomendadas especialmente para aguas ricas en materia orgánica.



3.7 Objetivo específico 2.7. Realizar un taller de difusión y validación de las medidas propuestas.

Metodología

Este taller de difusión en Puerto Montt, Región de Los Lagos, será realizado el 6 de septiembre de 2006, actividad con la que se completa el logro de los objetivos planteados. Con los resultados obtenidos se confeccionará material de divulgación para ser entregado a los participantes del taller. Se invitará a investigadores, operadores de barcos cisterna, encargados de plantas de procesos, y centros de cultivo (peces y moluscos) y profesionales de la Subsecretaría de Pesca y el Servicio Nacional de Pesca.

Resultados y discusión

Comentarios y discusión del taller de difusión de resultados

Durante la reunión de difusión efectuada el 6 de septiembre de 2011 (Anexo 14), surgieron los siguientes comentarios:

- La existencia de otras fuentes dispersoras de microalgas nocivas comprobada científicamente en otras partes del mundo como son las aguas lastres. Sin embargo, en Chile aún no existe información técnica ni científica como para tomar las medidas cautelares que minimicen la propagación de plagas microalgales frente al esfuerzo que realizan las empresas de naves de servicio de transporte relacionadas con la acuicultura para minimizar la propagación de microalgas nocivas además del virus ISA. Aún cuando es conocido que el tema es asunto de la Directemar cuyo discurso siempre que se ajustan al reglamento internacional, persiste la duda por cuanto no existe una fiscalización que así lo compruebe, especialmente en naves extranjeras de gran tonelaje que navegan en el interior de fiordos y canales del sur-austral del país.
- Falta de transversabilidad de las medidas aplicadas derivadas por normativas de sanitización, REPLA y RAMA que refleja la falta de coordinación y criterios de acuerdo al momento de poner en práctica los reglamentos y normativas por parte de autoridades y servicios de fiscalización. La falta de transversalidad en la aplicación de las medidas adoptadas por cada reglamento tiende a generar gastos excesivos que al final resultan en exigencias inaplicables por los usuarios.
- Se requiere mayor financiamiento para estudios básicos de otros organismos productores de toxinas hasta ahora no considerados como interferentes en las medidas aplicadas a otras especies nocivas, cuyo conocimiento es escaso en relación a ciclos de vida y condiciones óptimas de crecimiento (caso *A. ostentfeldi*, productor de veneno paralizante de los mariscos establecido durante este proyecto) y otras especies de dinoflagelados del género *Dinophysis* productores de veneno diarreico de los mariscos, cuyos perfiles toxicológicos y variabilidad espacio temporal aún son desconocidos en la mayor parte de Chile .



- Existencia de escasos estudios experimentales que avalen su eficacia para aplicar medidas de detecci3n y certificaci3n en Chile aun cuando son aplicadas en otras partes del mundo. Su aplicaci3n en nuestro pa3s debiera considerar previamente una evaluaci3n de las mismas medidas internacionales para adecuarla a nuestra realidad por cuanto los criterios (l3mites y umbrales) no suelen ser los mismos para nuestras aguas.
- Inaplicabilidad del ozono para la eliminaci3n de c3lulas de *A. catenella* en las bodegas de los wellboats debido a las altas concentraciones efectivas encontradas.



4. CONCLUSIONES

- 1. De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio los vectores y fómites son agentes propagadores potenciales de la microalga plaga *A. catenella* y por lo tanto procesos como el desarenado y depuradoras deben tomar medidas cautelares de propagación de las microalgas principalmente en su fase de quiste como vegetativa, así como también las actividades de pesca artesanal que involucren traslado y “apozamiento” de moluscos filtradores.
- 2. Las naves de transporte de peces constituyen agentes dispersores potenciales de *A. catenella* sobre todo en su fase vegetativa. Las medidas cautelares de propagación de esta microalga en base a las técnicas utilizadas para evitar el virus ISA son útiles en la medida que se ajusten a los criterios experimentales que inhiben el crecimiento de la microalga.
- 3. El transporte de peces así como el proceso de moluscos en plantas son mecanismos de propagación de la microalga. Por ello es necesario tratar aguas de transporte y riles antes de ser eliminados al medio ambiente.
- 4. Se ha establecido la tasa de generación de quistes para un periodo de abundancia relativa <3, nivel con mayor frecuencia de ocurrencia en el sur-austral. El porcentaje de enquistamiento/célula día, es bajo. Menor al 1%.
- 5. Se identificó y confirmó a vectores (choritos, choro zapato, almeja) y fómites (redes y mallas paperas) como elementos de propagación de quistes. También de células por parte de mitílidos en valvas, biso y hepatopáncreas tanto en condiciones *in vitro* como naturales aún con bajos niveles ambientales de abundancia relativa de *A. catenella*.
- 6. Los elementos de mayor efectividad en la eliminación de células y quistes de *A. catenella* son: temperaturas > de 45 °C, salinidades < 2 psu, cloración a concentraciones de 100 ppm, filtros de 25 µm dispuesto en series de filtros con trama mayor, radiación UVC > 13 mJ/cm².
- 7. Cualquiera de los elementos arriba mencionados, aplicados en los niveles correspondientes y disposición recomendada de acuerdo a la evaluación efectuada durante la ejecución de este proyecto, son útiles para tratar aguas provenientes de transporte de peces así como de plantas de proceso de modo de minimizar los riesgos de propagación de la microalga.
- 8. El ultrasonido, generado por un baño ultrasónico, ni el ozono fueron efectivos en la eliminación de quistes en las dosis ensayadas, mientras que el ultrasonido tampoco fue efectivo en la eliminación de células de *A. catenella*.
- 9. Los costos de implementación de técnicas y metodologías dependerá esencialmente del volumen y tonelaje involucrados en los procesos de transporte y procesamiento de transvectores de la microalga.



5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asahina A.Y. 2007. Assessing the effectiveness of monochromatic (254 nm) versus polychromatic (200–600 nm) UV lamps in the inactivation of bacteria and viruses in water. PhD these, University of Hawai'i at Manoa. Publication number 3244703. <http://gradworks.umi.com/32/44/3244703.html>
- Bolch, C.J., Hallegraef, G.M. 1993. Chemical and physical treatment options to kill toxic dinoflagellate cysts in ships' ballast water Journal of Marine Environmental Engineering 1:23-29.
- Bravo, I., Figueroa, R. I., Massanet, A., Ramilo, I. & Rial, P. 2009. Factors that promote resting cyst formation in cultures of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) and their relationship to environmental conditions. Hydrobiologia (in press).
- Bravo, I., Figueroa, R. I., Garcés, E., Fraga, S. & Massanet, A.. 2010. The intricacies of dinoflagellate pellicle cysts: The example of *Alexandrium minutum* cysts from a bloom-recurrent area (Bay of Baiona, NW Spain). Deep-Sea Research II 57: 166–174.
- Bricelj, V. M., L. B. Connell, B., Konoki, K. MacQuarrie, .P, Scheuer, T., Catterall, W.A. & Trainer, V.L. 2005. Sodium channel mutation responsible for saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP. Nature 434: 763–767,
- Bricelj, V. M., MacQuarrie, S. P. E., Doane, J. A. & Connell. L. B. 2010. Evidence of selection for resistance to paralytic shellfish toxins during the early life history of soft-shell clam (*Mya arenaria*) populations. Limnol. Oceanogr. 55(6): 2463–2475.
- Buchholz, K., H. Tanis, S. Macomber, E. Farris. 1998. Ballast water secondary treatment technology review. Battelle Duxbury Operations for Northeast Midwest Institute, Washington D.C.
- Cairns, W.L. 2001. Comparison of UV disinfection technologies using low intensity monochromatic and high intensity polychromatic UV lamps. <http://www.trajamuv.com/papers/comp-meno-hi-htm>. Trojan Technologies, Ontario, Canada.
- Cangelosi, A., I.T.Knight, M. Balcen, X. Gao, A. Hug, J.A. McGreeny, B. McGregon, D. Reid, R. Sturtevant, and J.T. Carlton. 1999. The biological effects of filtration as an onboard ballast treatment technology. Proceedings of the North Annual International Aquatic Nuisance Species and Zebra Mussel, Duluth, M. N., <http://www.vemw.org/abstracts.htm>
- Carlton, J.T., 1985. Transoceanic and interoceanic dispersal of coastal marine organisms: the biology of ballast water. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 23, 313–371



- Collings, A.F., Gwan, P.B., Binet, M.T. & Stauber, J.L. 2008. Treatment of ballast water by high power ultrasonics (isponible en Internet).
- Compagnon, D., G. Lembeye, N. Marcos, N. Ruiz-Tagle & N. Lagos, 1998. Bioaccumulation of PSP toxins in bivalve *Aulacomya ater* and two carnivorous gastropods *Concholepas concholepas* and *Argobuccinum ranelliformes* during *Alexandrium catenella* bloom in southern Chile. *J. Shellfish Res.* 17: 67-74.
- D.S. MINECON N°345/2005. Decreto Supremo del Ministerio de Economía que promulga el Reglamento sobre Plagas hidrobiológicas (REPLA).
- Deeds, J.D., Landsberg, J.H., Etheridge, S.M., Pitcher, G.P. & Watt Longan, S. 2008. Non-Traditional Vectors for Paralytic Shellfish Poisoning. *Mar. Drugs* 6: 308-348. www.mdpi.org/marinedrugs
- Dijkema, R. 1992. Large-scale recirculations systems for storage of imported bivalves as a means to counteract introduction of cysts of toxic dinoflagellates in the coastal waters of the Netherlands. <http://www.ifremer.fr/docelec/default-en.jsp>
- Doblinand M.A. & F.C. Dobbs. 2006. Setting a size-exclusion limit to remove toxic dinoflagellate cysts from ships' ballast water. *Marine Pollution Bulletin* 52: 259–263.
- FAO. 2005. Biotoxinas Marinas. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. 278 pp.
- Figueroa, R. I., Bravo, I. & Garcés, E. 2005. Effects of nutritional factors and different parental crosses on the encystment and excystment of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in culture. *Phycologia*, 44(6): 658-670. 2005.
- Garcés, E., Bravo, I., Vila, M., Figueroa, R. I., Masó, M. & Sampedro, N. 2004. Relationship between vegetative cells and cyst production during *Alexandrium minutum* bloom in Arenys de Mar harbour (NW Mediterranean). *J. Plankton Res.*, 26: 637–645.
- Gavand M.R., J.B. McClintock, Ch.D. Amsler, R.W. Peters & R.A. Angus. 2007. Effects of sonication and advanced chemical oxidants on the unicellular green alga *Dunaliella tertiolecta* and cysts, larvae and adults of the brine shrimp *Artemia salina*: A prospective treatment to eradicate invasive organisms from ballast water. *Marine Pollution Bulletin* 54:1777-1788.
- Guéguen M., Lassus, P. Laabir, M., Bardouil, M., Baron, R., Séchet, V., Truquet, P., Amzil, Z. & Barillé, L. 2008. Gut passage times in two bivalve molluscs fed toxic microalgae: *Alexandrium minutum*, *A. catenella* and *Pseudo-nitzschia calliantha*. *Aquat. Living Resour.* 21: 21–29.



- Guo, X., A. Uchara, A. Rabidran, S.H. Bryant, S. may & E. Moczydlowski. 1987. Kinetic basis for insensitivity to tetrodoxin and saxitoxin in sodium channels of canine heart and denervated rat skeletal muscle. *Biochemistry* 26: 7546-7556.
- Guzmán, L., H. Pacheco, G. Pizarro & C. Alarcón. 2002. *Alexandrium catenella* y Veneno Paralizante de los Mariscos en Chile. En. Sar. E.A., M.E. Ferrario y B. Reguera. (Eds). *Floraciones Algales en el Cono Sur Americano*. Instituto Español de Oceanografía. pp. 237-256.
- Guzmán, L., G. Vidal, X. Vivanco, M. Palma, C. Espinoza, P. Mejías, R. Ulloa, L. Iriarte, V. Arenas, S. Mercado, E. Fernández-Niño, J. Monsalve, C. Alarcón, P. Salgado, N. Butorovic, P. Hinojosa & C. Zamora. 2007. Manejo y Monitoreo de las mareas rojas en las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes. Año 2006-2007. Informe Final. 141 p. + Figuras + Tablas + Anexos. Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción- Subsecretaría de Pesca.
- Guzmán, L., G. Vidal, X. Vivanco, V. Arenas, L. Iriarte, S. Mercado, C. Alarcón, H. Pacheco, M. Palma, C. Espinoza, P. Mejías, E. Fernández-Niño, J. Monsalve, G. Pizarro, P. Hinojosa, C. Zamora, P. Zamora & N. Pesse. 2009. Manejo y Monitoreo de las mareas rojas en las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes. Año 2007-2008. Informe Final. 146 p. + Figuras + Tablas + Anexos. Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción-Subsecretaría de Pesca.
- Hallegraeff, G.M. & C.J. Rolch. 1991. Transport of Toxic Dinoflagellate Cysts via Ships' Ballast Water. *Marine Pollution Bulletin* 22(1)2:7-30.
- Hallegraeff, G.M., Valentine, J.P., Marshall, J-A., Bolch, C.J. 1997. Temperature tolerances of toxic dinoflagellate cysts: application to the treatment of ships' ballast water *Aquatic Ecology* 31:47-52.
- Hallegraeff, G.M., 1998. Transport of toxic dinoflagellates via ships' ballast water: bioeconomic risk assessment and efficacy of possible ballast water management strategies. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 168, 297-309.
- Harper, F. M., E.A. Hatfield & R.J. Thompson. 2002. Recirculation of dinoflagellate cysts by the mussel, *Mytilus edulis* L., at an aquaculture site contaminated by *Alexandrium fundyense* (Lebour) Balech. *Journal of Shellfish Research* 21 (2): 471-477.
- Hégaret H., S.E. Shumway, G.H. Wikfors, S. Pate & J.M. Burkholder. 2008. Potential transport of harmful algae via relocation of bivalve molluscs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 361: 169-179.
- Krock, B., Seguel, C.G. & Cembella, D.A. 2007. Toxin profile of *Alexandrium catenella* from the Chilean coast as determined by liquid chromatography with fluorescence detection and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Harmful Algae* 6 (5): 734-744.



- Laughton, R., T. Moran, G. Brown. 2001. A review and evaluation of ballast water management and treatment options to reduce the potential for the introduction of non native species to the Great Lakes. <http://www.pollutech.com/papers/p22.htm>
- Lewis, J. 2002. Data on encystment and excystment rates in dinoflagellates. In Garce's, E., Zingone, A., Montresor, M., Reguera, B. and Dale, B. (eds), LIFEHAB. Life History of Microalgal Species Causing Harmful Blooms. Office for the Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 189 pp.
- Montani, S., Mekusumpun, S., Ichimi, K. 1995. Chemical and physical treatments for destruction of phytoflagellate cysts *Journal of Marine Biotechnology* 2(4):179-181.
- Montecino, V. & G. Pizarro. 1995. Phytoplankton acclimation and spectral penetration of UV irradiance off the central Chilean coast. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 121: 261-269.
- Montresor, M. and Marino, D. .1996. Modulating effect of cold dark storage on excystment in *Alexandrium pseudogonyaulax* (Dinophyceae). *Mar. Biol.* 127, 55-60.
- Montresor, M., Zingone, A. and Sarno, D. 1998. Dinoflagellate cyst production at a coastal Mediterranean site. *J. Plankton Res.*, 20, 2291-2312.
- Navarro J., Muñoz M.G. & Contreras A.M. 2006. Temperature as a factor regulating growth and toxin content in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Harmful Algae* 5: 762-769.
- Pati, A. & Belmonte, G. 2007 . Effect of aquaculture disinfectants on the germination of a dinophyta cystt. *Thalassia* 30:129-142
- Pizarro, G., C. Alarcón, H. Pacheco, E. Fernández-Miño, Susana Mercado, L. Iriarte, M. Seguel, G. Vidal & L. Guzmán. 2009. Muestreo prospectivo de *Alexandrium catenella* en algunos sectores nunca monitoreados y de quistes en sedimentos. Informe Final Suplementario. 39 p. + Figuras + Tablas + Anexos. Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción-Subsecretaría de Pesca, Agosto 2009.
- Resolución N°776/ 2008. Resolución del Servicio Nacional de Pesca que dispone medidas de control de la Anemia Infecciosa del Salmón (ISA).
- Resolución N° 1882/ 2008. Resolución del Servicio Nacional de Pesca que dispone medidas para el manejo de residuos sólidos y líquidos aplicables en centros de matanza en tierra y plantas de proceso que reciben salmónidos de centros de cultivo de áreas cuarentenadas por virus ISA.



- Resolución EX. 2327/ 2010. Resolución del Servicio Nacional de Pesca que establece requisitos para la aprobación de los sistemas de tratamiento de las aguas empleadas por embarcaciones en la operación de transporte de peces vivos.
- Troncoso, V.A. 2010. Inactivación de quistes de resistencia (hipnoquistes) de *Alexandrium catenella*. Informe final proyecto SERNAPESCA, 17 pp.
- Suárez-Isla, B. & Guzmán L.1999. Mareas rojas y toxinas marinas. Serie Orientaciones en Ciencias, Tecnología y Cultura”, Editorial Universitaria, Santiago, Chile, 77 pp.
- Sutherland, T.F., C. D. Levings, C.C. Elliott & W. W. Hesse. 2001. Effect of a ballast water treatment system on survivorship of natural populations of marine plankton. Mar Ecol Prog Ser 210: 139-148.
- SWRCB, State Water Resources Control Board. 2002. Evaluation of Ballast Water Treatment Technology for Control of Nonindigenous Aquatic Organisms. California Environmental Protection Agency. Report prepared in compliance with section 71210 of the California Public Resources Code, in consultation with the Department of Fish and Game, the State Lands Commission, the United States Coast Guard, the regulated industry, and other stakeholders. December 2002. 70 pp.

FIGURAS

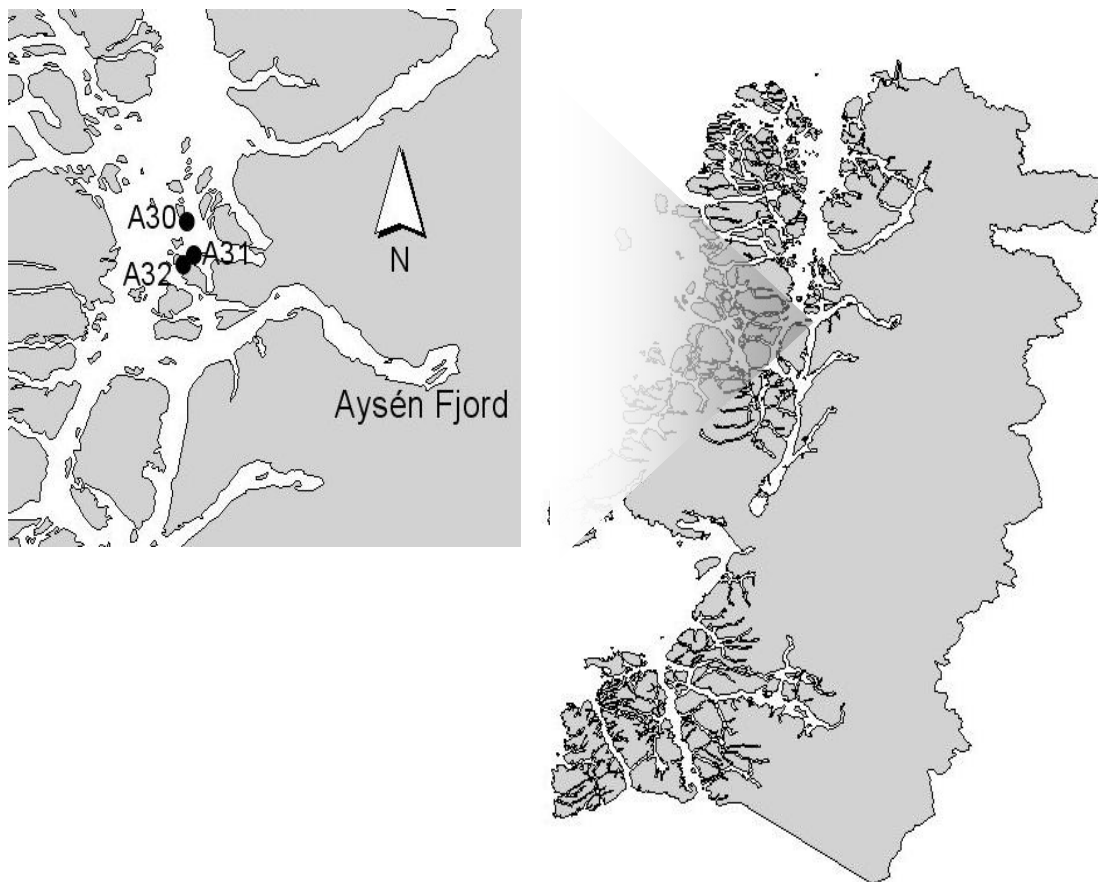


Figura 1. Mapa de las estaciones de muestreo y experimento *in situ* en la región de Aysén (recuadro Rojo). A30 (Isla Julián), A31 (Is. Huichas) y A32 (I. Vergara). (Autor: Christian Espinoza).

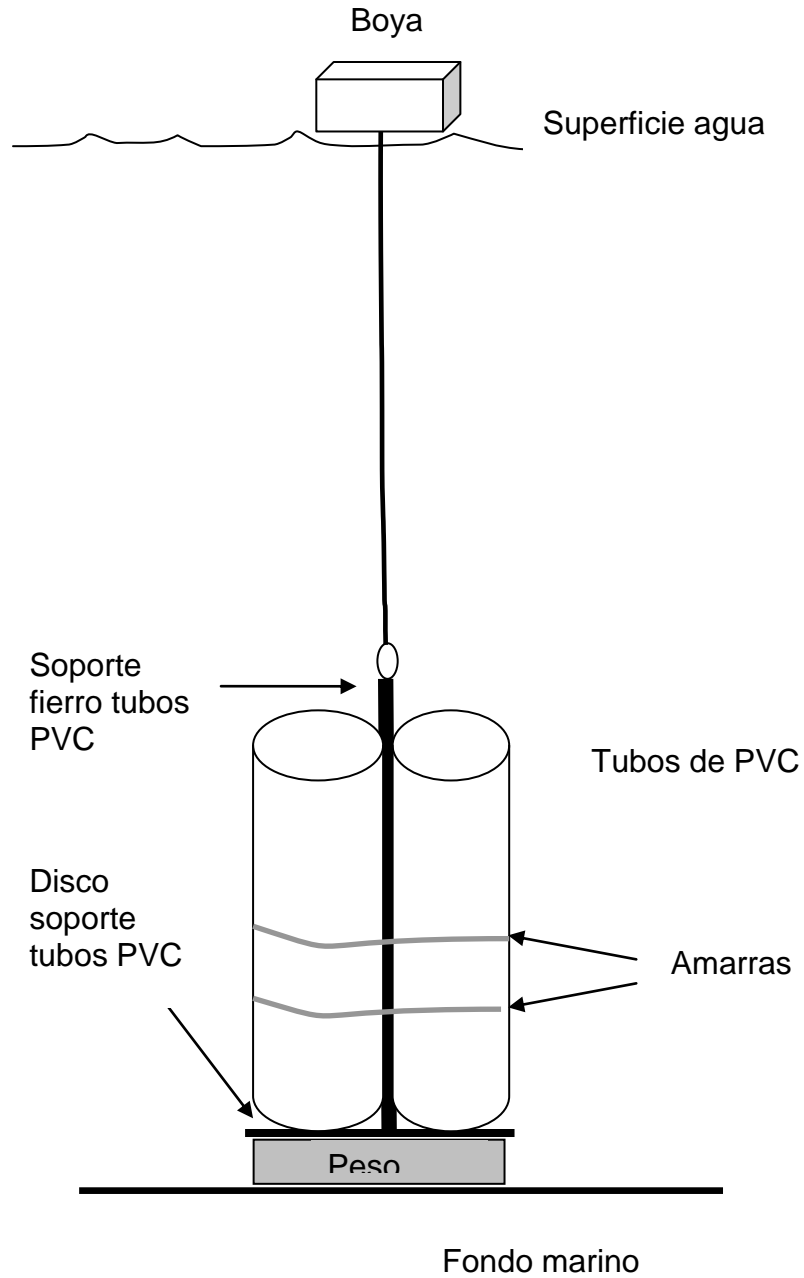


Figura 2. Esquema de trampas de sedimento dispuestas cerca del fondo a 16 m de profundidad. (Diseño: G. Pizarro).

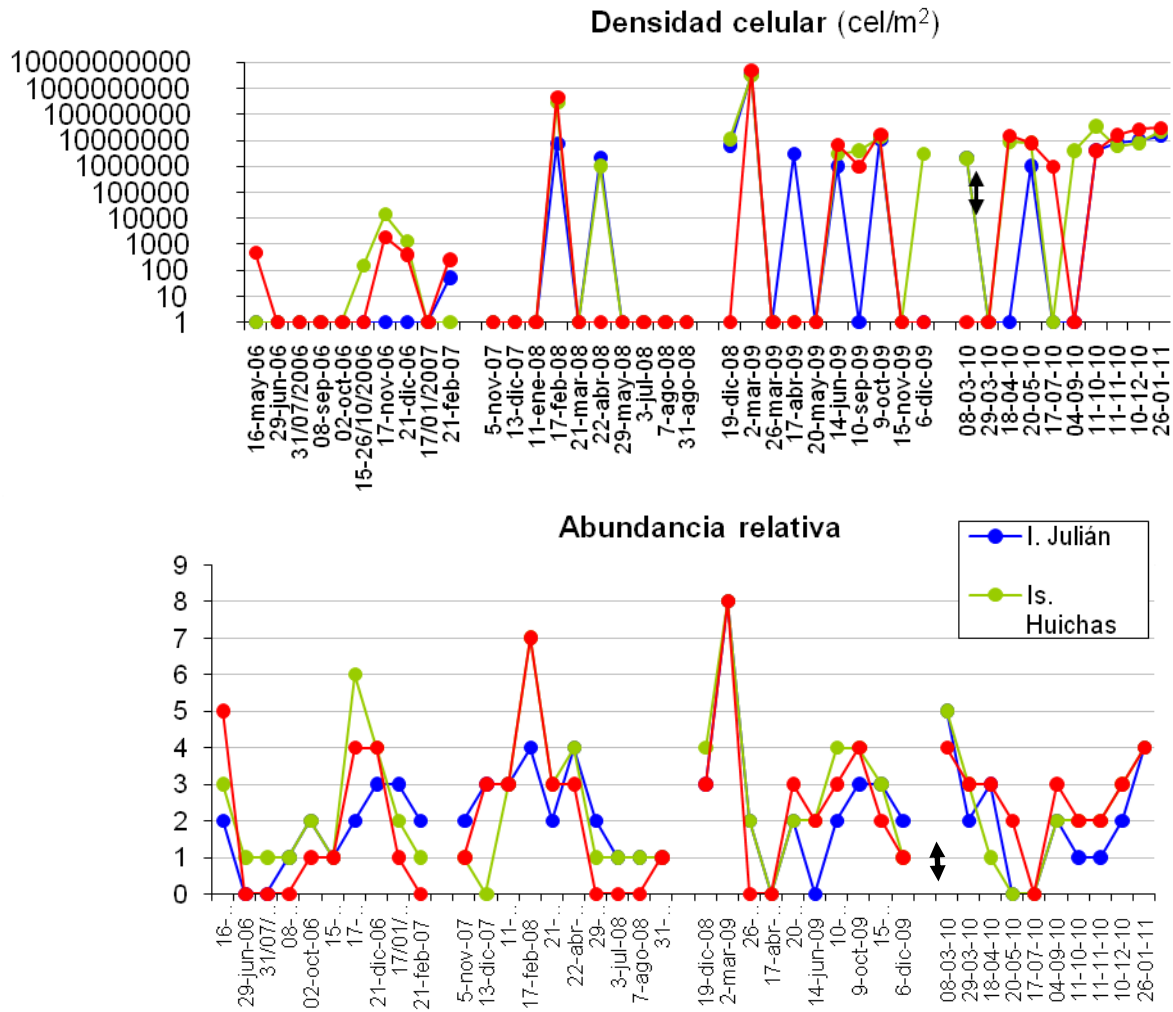


Figura 3. Densidad (superior) y abundancia relativa (inferior) de *A. catenella* registrada en años anteriores en el área de estudio. Las flechas indican los valores registrados durante la experiencia *in situ* de este estudio: I. Julián (azul), Is. Huichas (línea verde), I Vergara (línea roja).

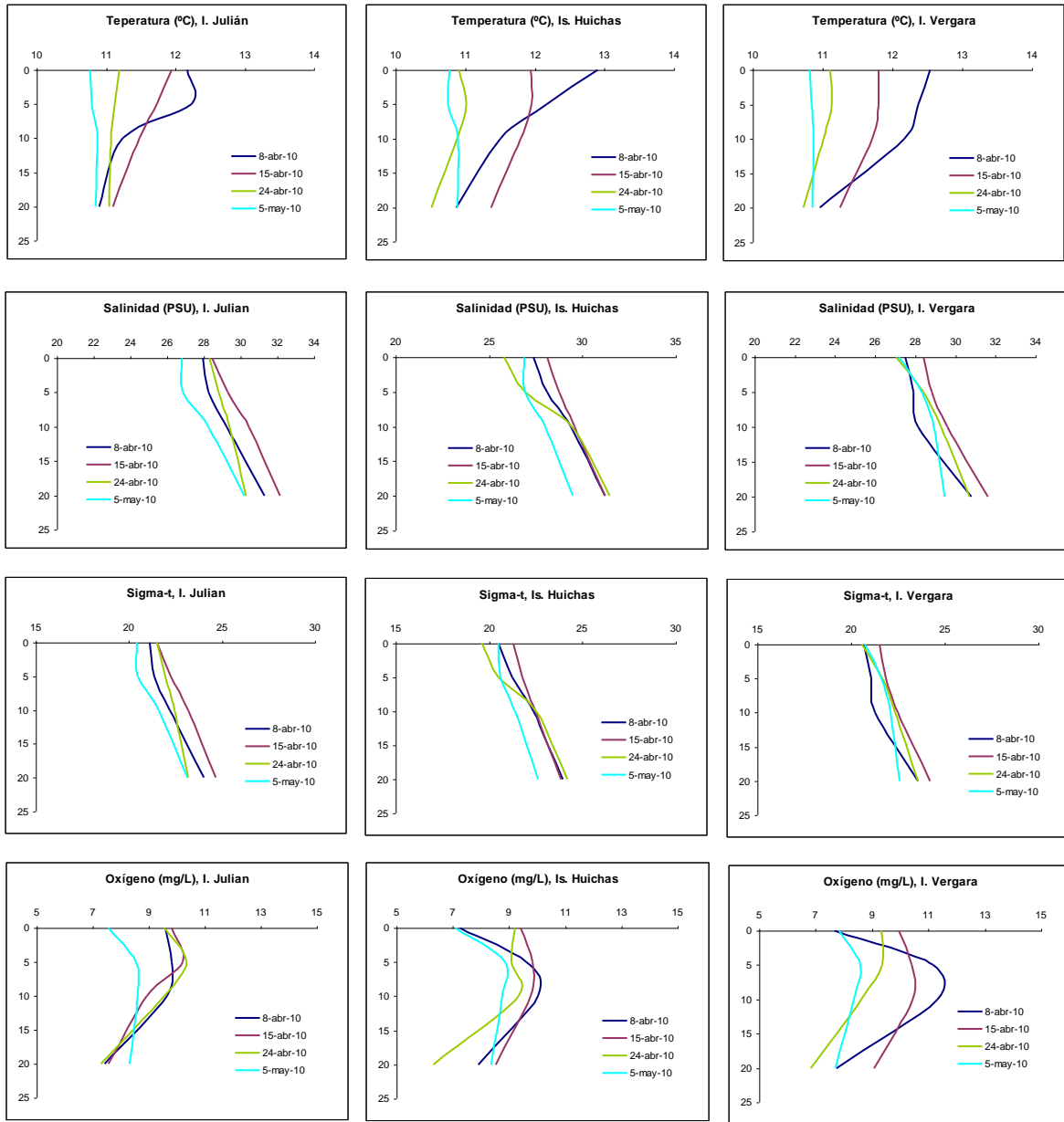


Figura 4. Perfiles de variables oceanográficas registrados en el área de estudio durante la realizaci3n de los experimentos *in situ*.

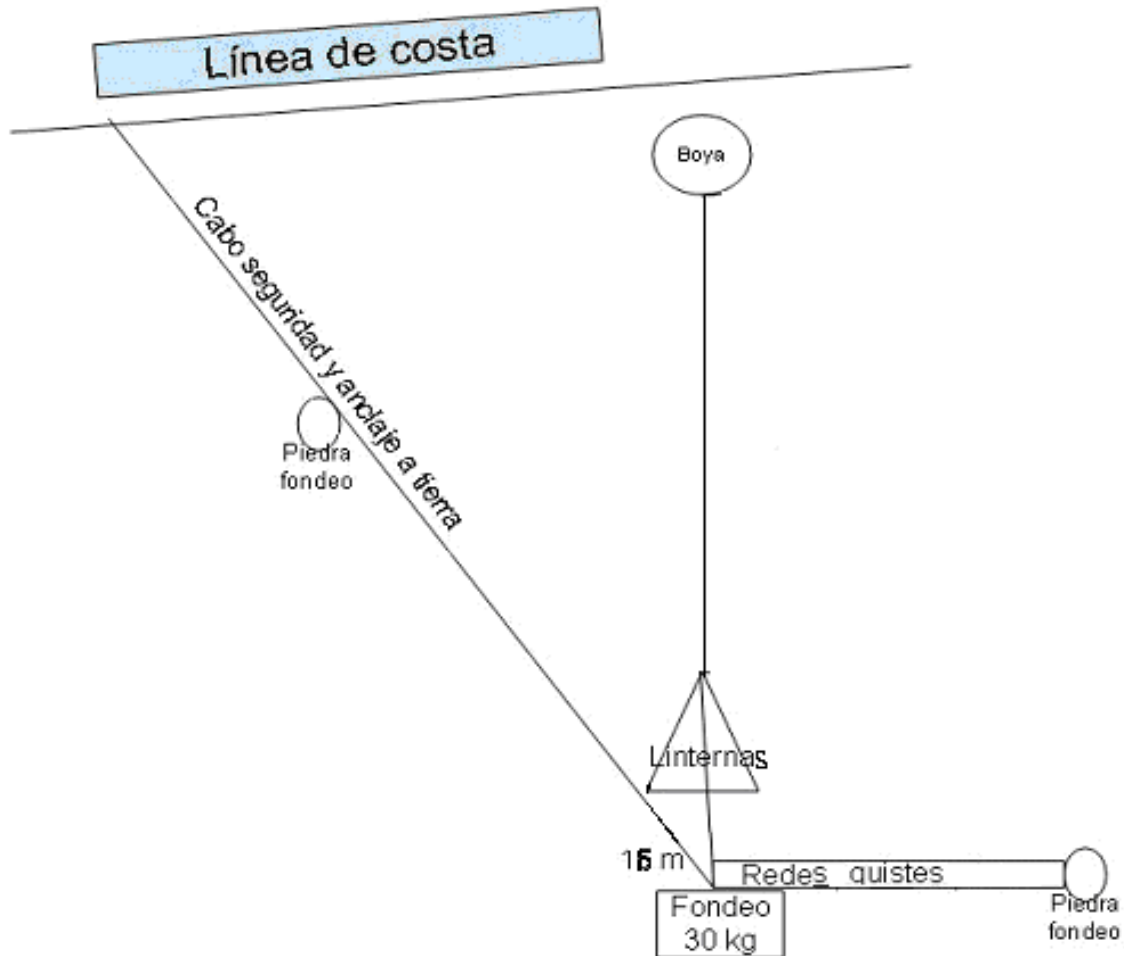


Figura 5. Representación esquemática del sistema de fondeo con una línea suspendida desde los 5 m de profundidad en la columna de agua sosteniendo tres linternas y tres redes posicionadas en las cercanías del fondo marino (16 m de profundidad aproximadamente). Un sistema de fondeo similar fue fondeado en cada una de las estaciones experimentales seleccionadas de Aysén (Diseño: Elías Fernández-Niño).



Figura 6. Sistema de incubación de choritos *in vitro* en diferentes concentraciones de *A. catenella*. (Foto: G. Pizarro).

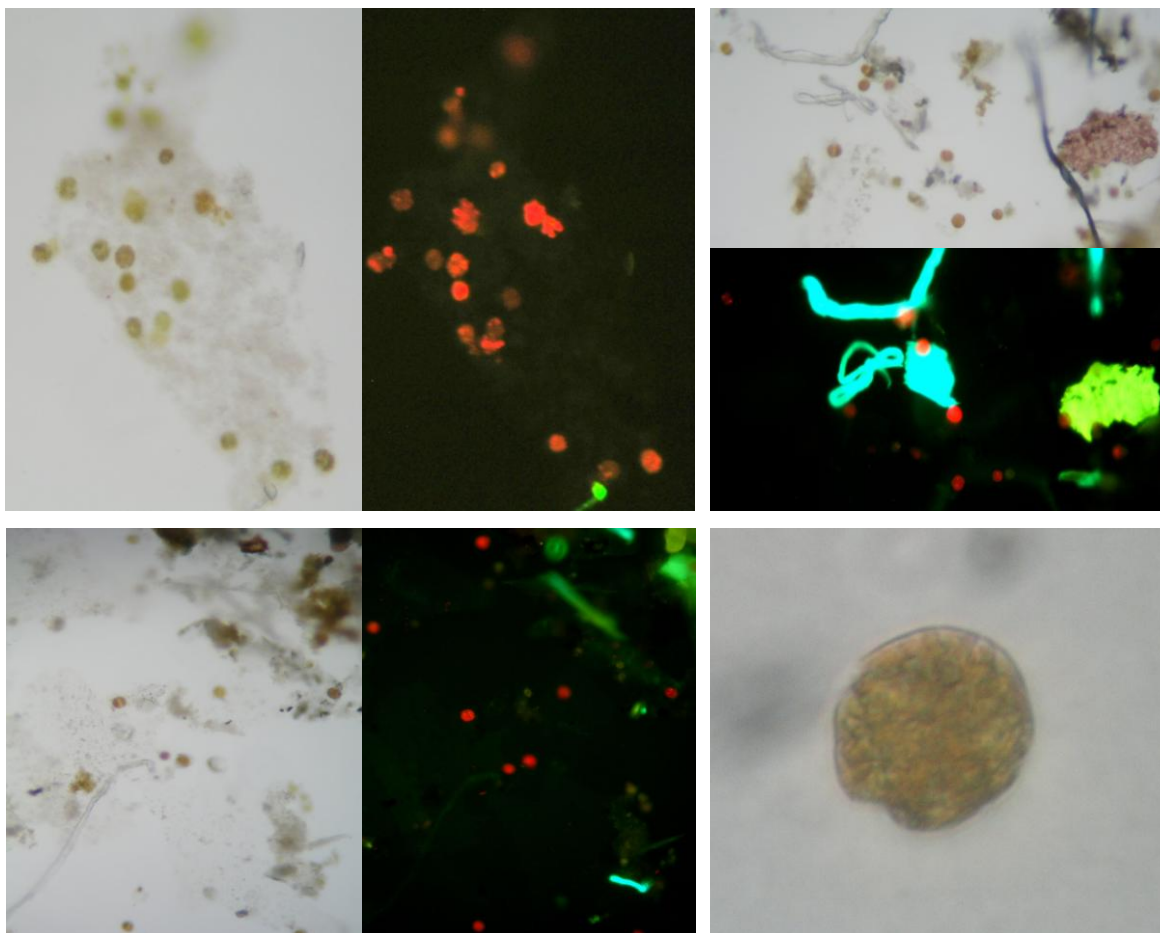


Figura 7a. Fotomicrografías superiores por microscopía óptica normal y con epifluorescencia de quistes temporales embebidos en materia orgánica en agua de incubación con 1575 cél/mL (izq.) y quistes sueltos en el agua de incubación con 2510 cél/mL (der.). Fotomicrografías inferiores por microscopía óptica normal y con epifluorescencia de quistes temporales sueltos (izq.) y célula móvil (der.) presentes en el agua de lavado de valvas de vectores incubados con 1575 y 2510 cél/mL, respectivamente (Fotos: G. Pizarro).

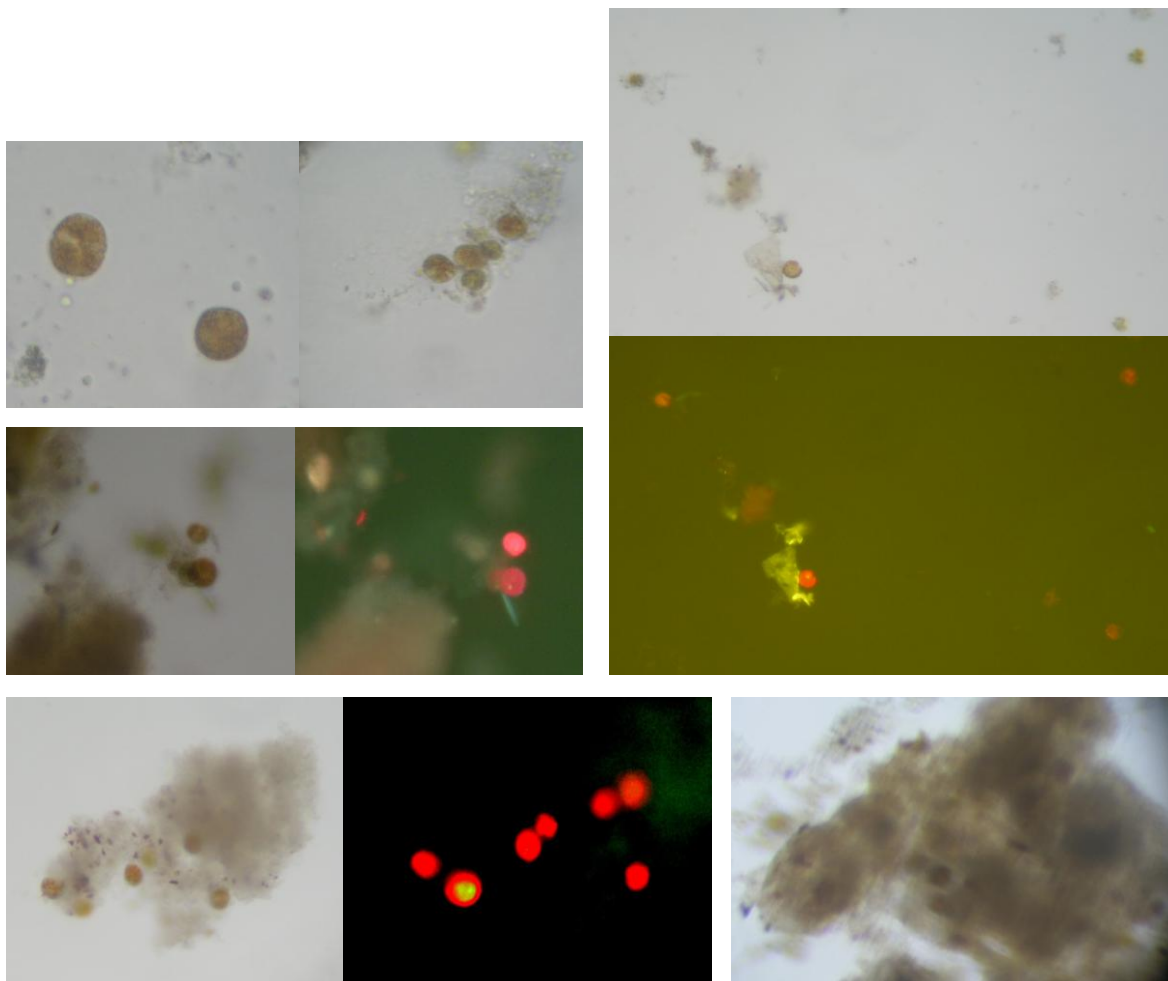


Figura 7b. Fotomicrografías superiores por microscopía óptica normal y con epifluorescencia de quistes temporales sueltos y embebidos en materia orgánica presentes en el agua de lavado del biso de vectores incubados con 1575 cél/mL (izq.) y en 2510 cél/mL (der.). Fotomicrografías inferiores por microscopía óptica normal y con epifluorescencia de quistes temporales embebidos en materia orgánica en el biosustrato y pseudofecas de vectores incubados con 1575 cél/mL (izq.) y en 90 cél/mL (der.) (Fotos: G. Pizarro).

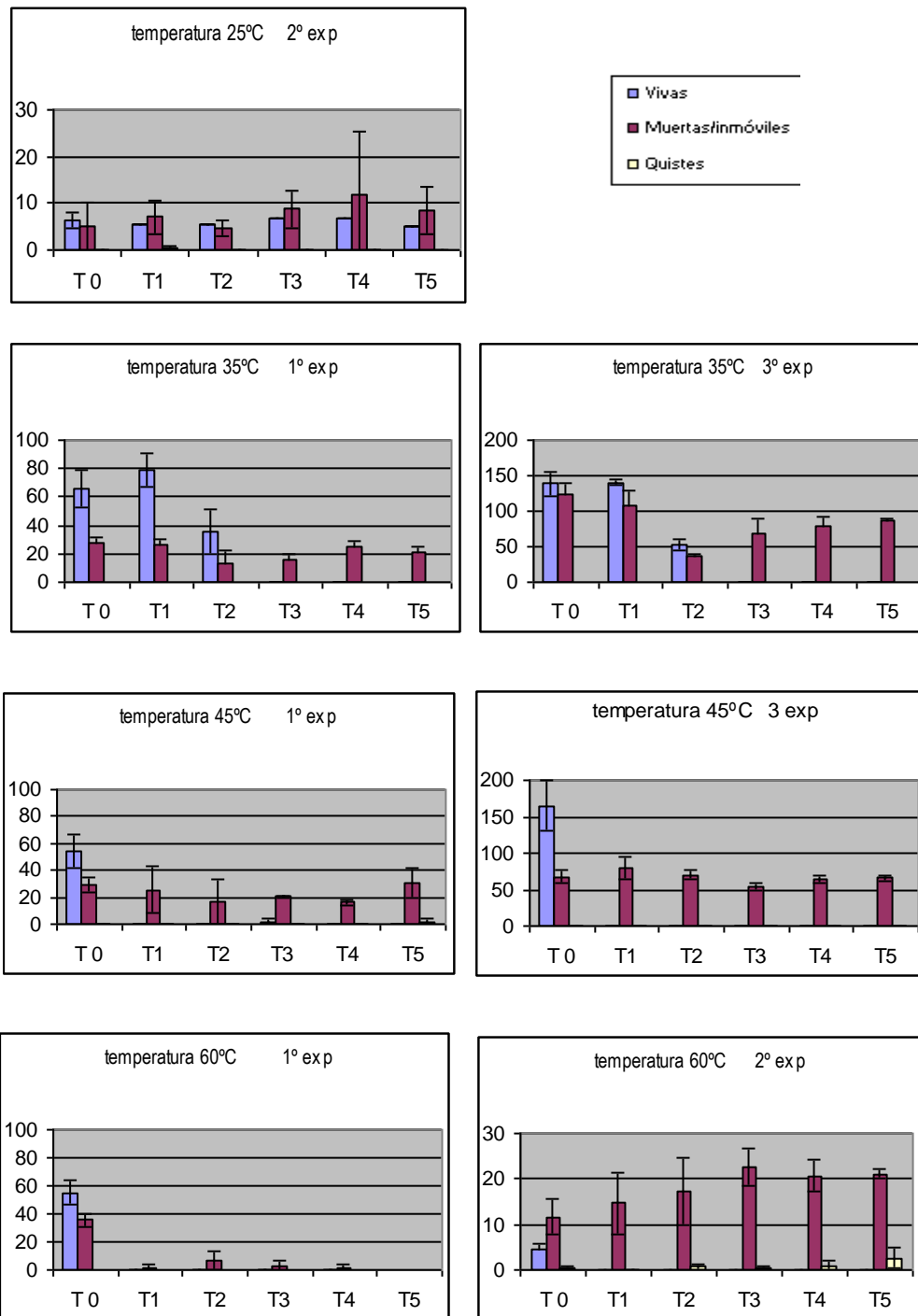


Figura 8. Efecto de la temperatura en los cultivos de células vegetativas de *A. catenella*. T0 : control (sin tratamiento previo a alza temperatura); T1: 5 min; T2: 10 min; T3: 15 min; T4: 20 min; T5: 50 min de exposición a las diferentes temperaturas.

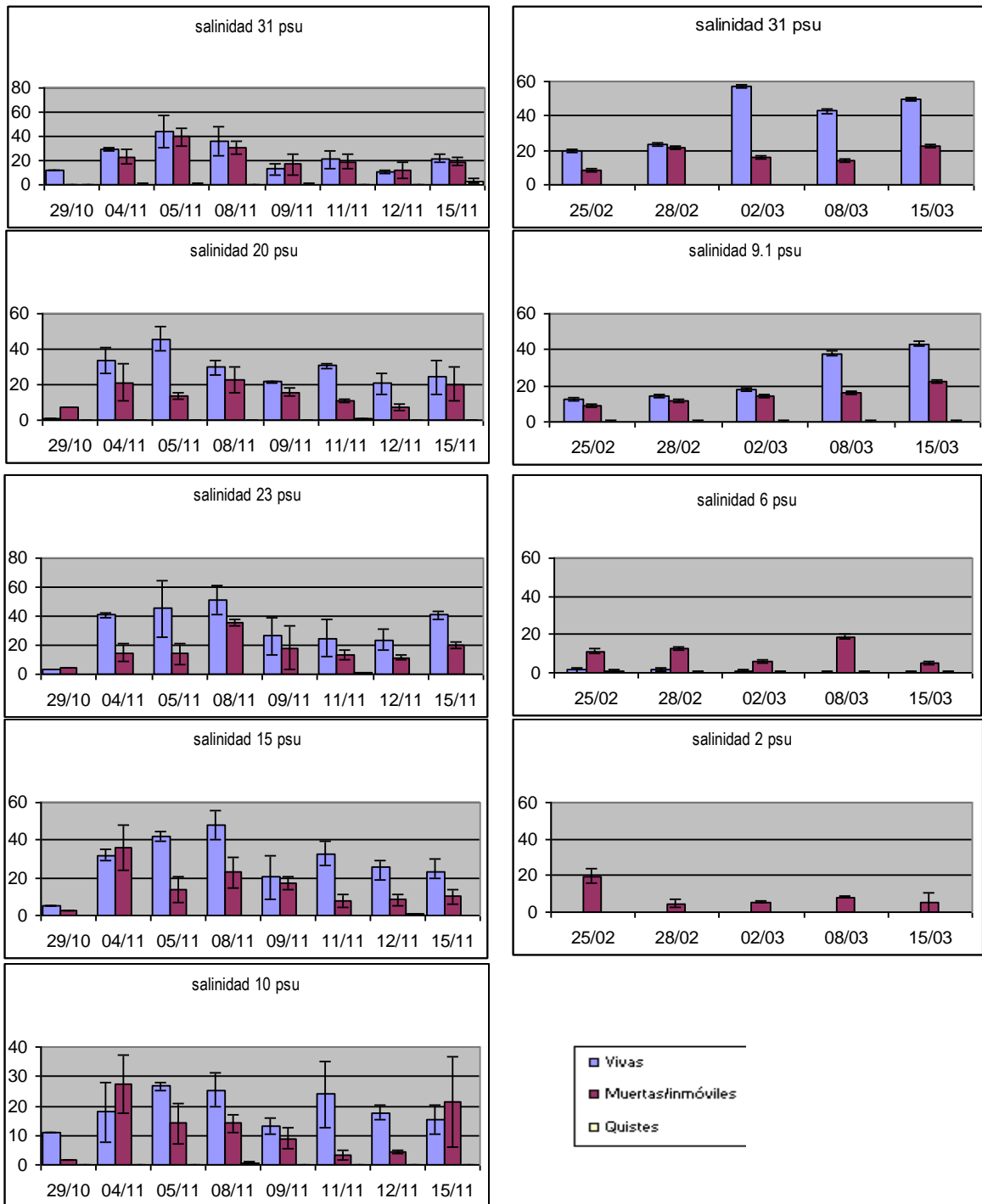


Figura 9. Efecto de diferentes concentraciones de la salinidad del agua en los cultivos de c3lulas vegetativas de *A. catenella*. Inicio experimento 29/10 =T0.

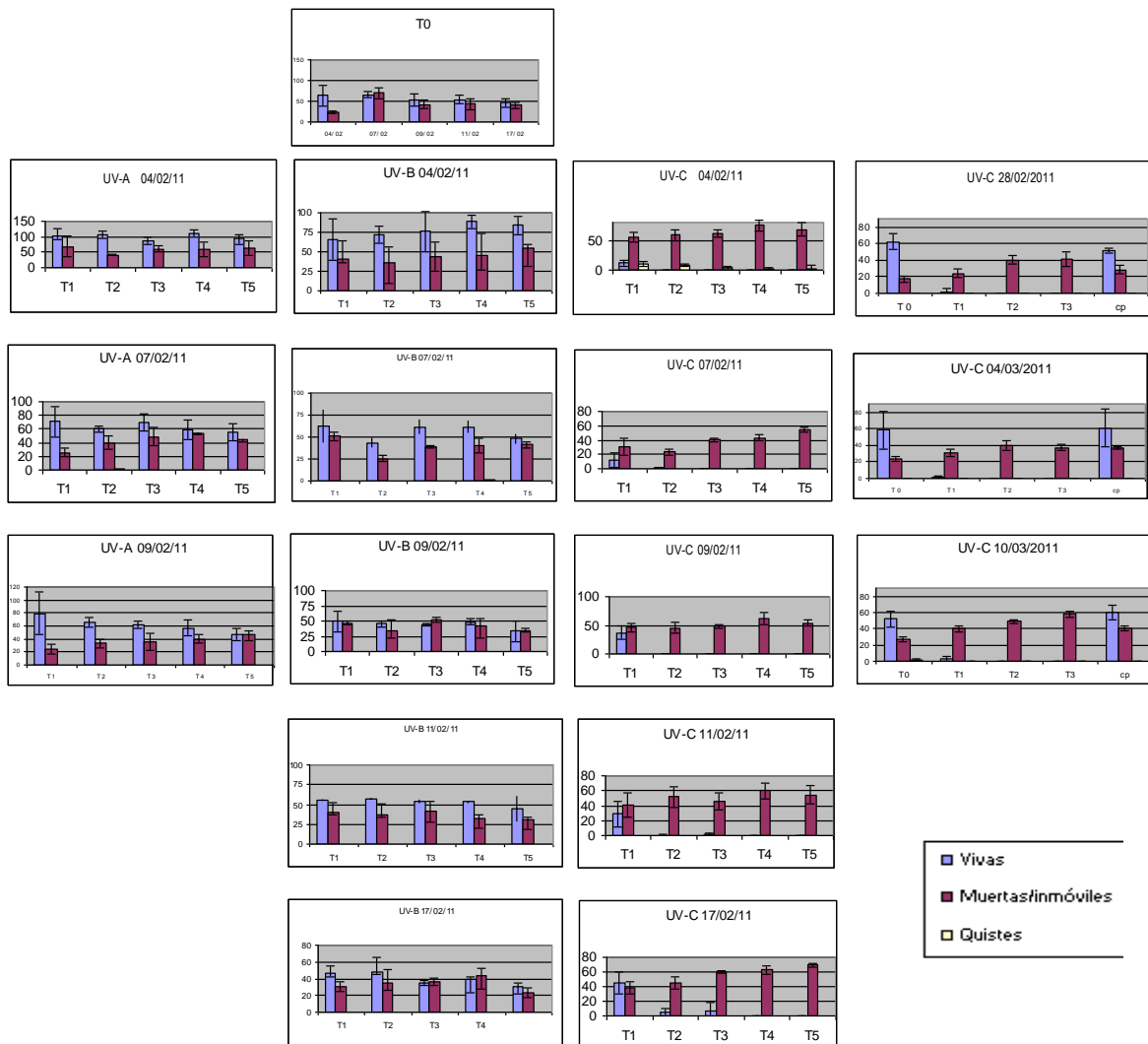


Figura 10. Efecto de diferentes dosis de radiaci3n UV en cultivos de c3lulas vegetativas de *A. catenella*. Primera y segunda columna de gr3ficos: T0: control; T1: 1 min; T2: 2 min; T3: 4 min; T4: 4 min; T5: 5 min de exposici3n a radiaci3n UVA y UVB. Tercera columna de gr3ficos: T1: 2 min; T2: 4 min; T3: 6 min; T4: 10 min; T5: 15 min de exposici3n a radiaci3n UVC. Cuarta Columna de gr3ficos: T1: 6 min; T2: 8 min; T3: 10 min de exposici3n a radiaci3n UVC; cp: sin radiaci3n, control de recipiente de tratamiento (placa petri). Intensidades de radiaci3n: UVA: 0.331 mWatt cm⁻²; UVB: 0.091 mWatt cm⁻² y UVC: 0,0265 mWatt cm⁻²

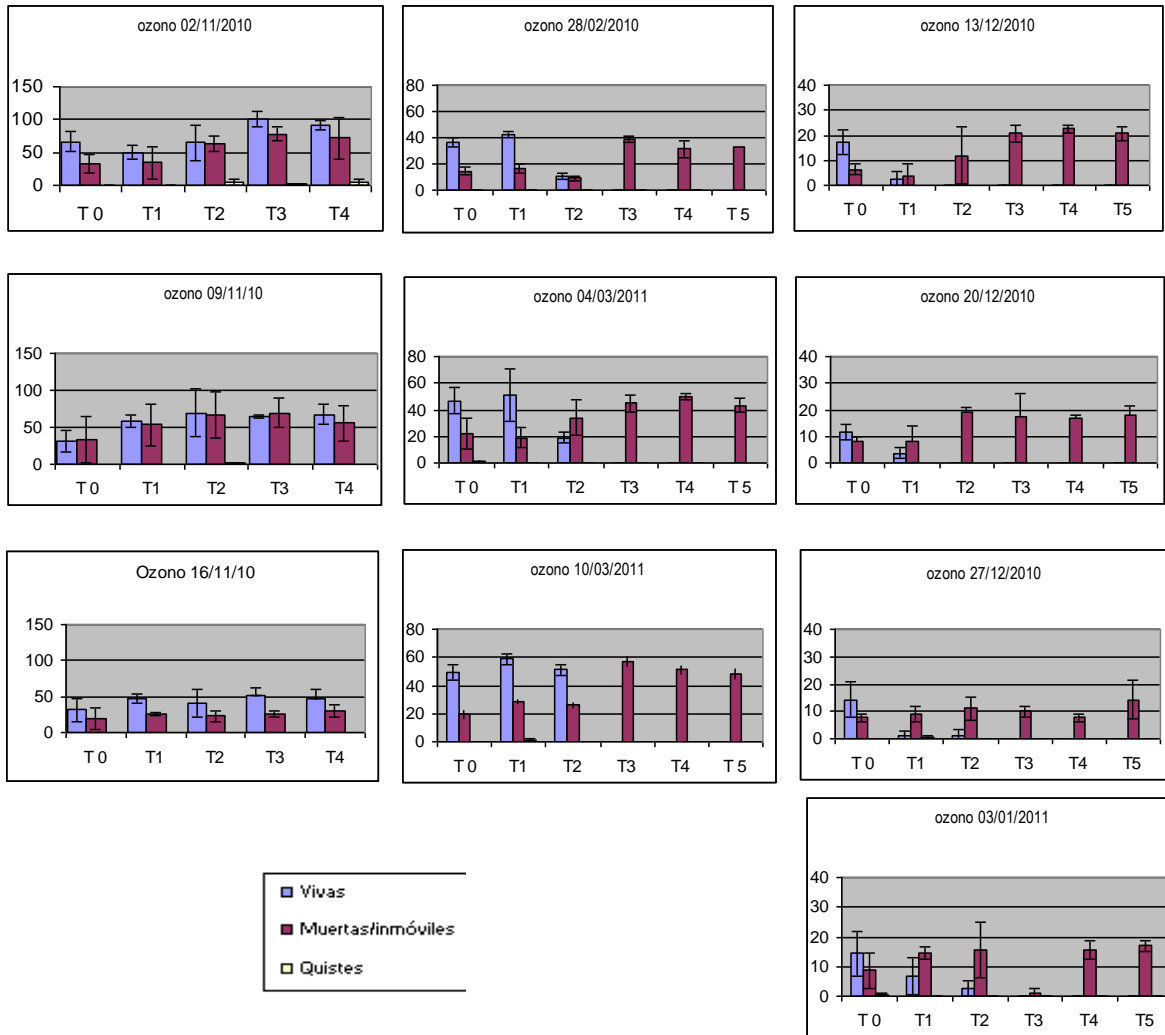


Figura 11. Efecto de diferentes dosis de ozono en los cultivos de c3lulas vegetativas de *A. catenella*. Primera columna de gr3ficos: T0: control; T1: 1 min; T2: 2 min; T3: 4 min de exposici3n a una concentraci3n 0.3 mg/L de ozono. Segunda y tercera columna de gr3ficos: T1: 5 min; T2: 10 min; T3: 25 min; T4: 35 min; T5: 55 min de exposici3n a concentraci3n 0.3 mg/L de ozono.

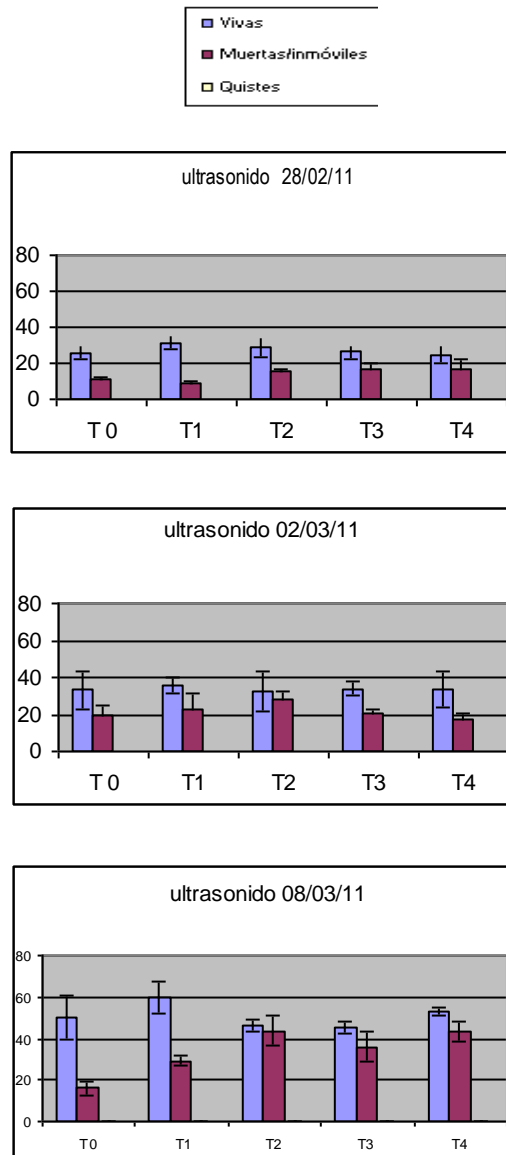


Figura 12. Efecto de diferentes dosis de ultrasonido en cultivos de c3lulas vegetativas de *A. catenella*. T0 : control ; T1: 1 min; T2: 3 min; T3: 5 min; T4: 10 min de exposici3n a una frecuencia media de 46 ± 2 KHz.



Figura 13. Sistema a escala piloto de desarenado utilizado para realizar la experiencia de validaci3n de muestreo y tratamiento para la eliminaci3n de *A. catenella* implementados en plantas de desarenado o desinfecci3n.



Figura 14. Nave wellboat Patag3n IV utilizada para poner a prueba la metodolog3a de muestreo de agua en bodegas de transporte de peces como de la columna de agua en el exterior de la nave (Foto: Nicole Pesse).

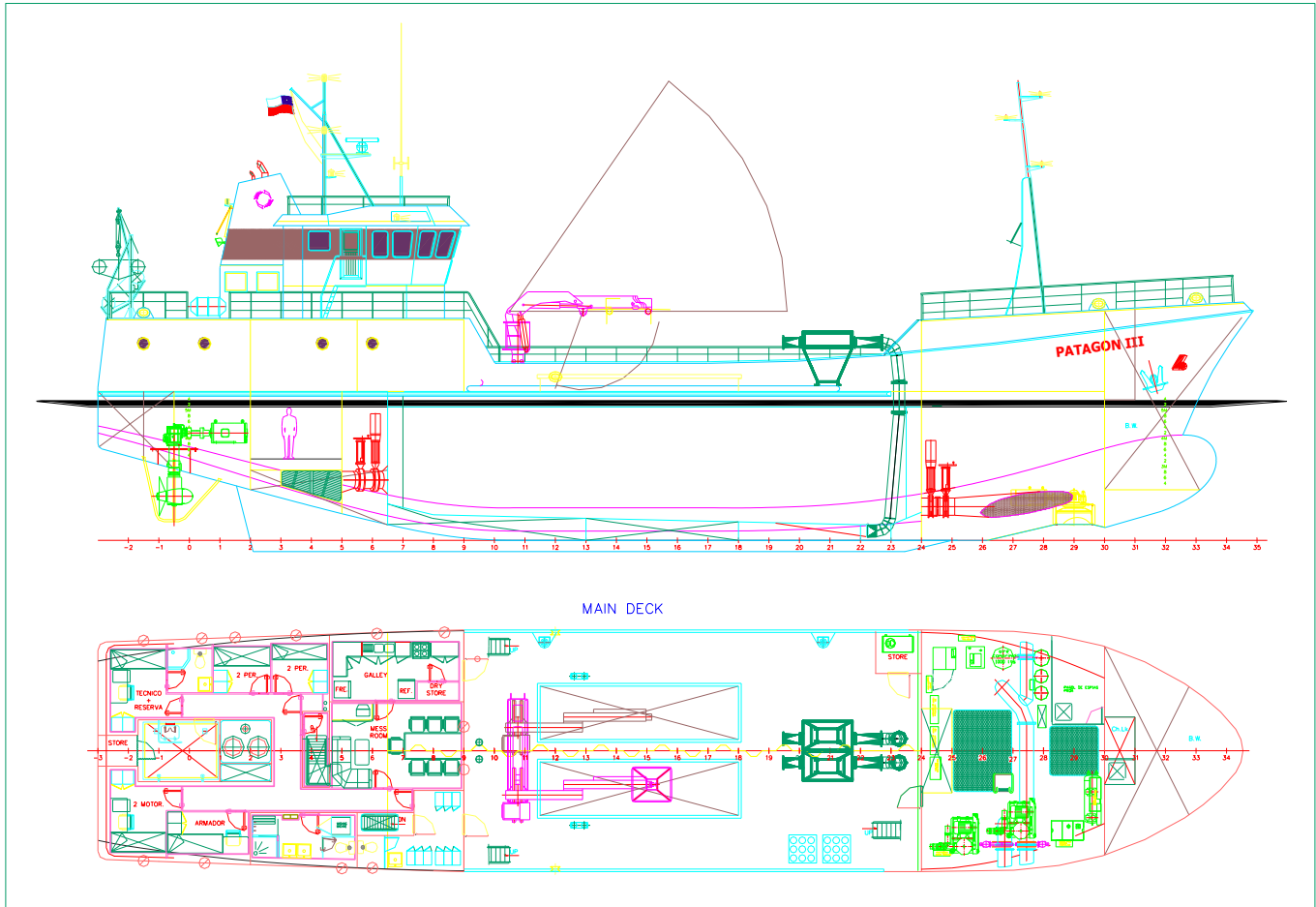


Figura 15. Plano de la nave wellboat Patag3n IV en la que se observan las bombas y ductos de proa y popa, la profundidad de las bodegas (plano superior) y disposici3n de 3stas en la nave (plano inferior).



Figura 16. Bodegas de babor y estribor de la nave Patag3n IV utilizadas para el transporte de peces vivos (Foto: Nicole Pesse).



Figura 17. Fotografía del interior de la bodega de estribor de la nave wellboat Patag3n IV en la que se observan la posici3n de los difusores de oxígeno en el piso de la bodega. En primer plano se observa la escalera de acceso de entrada a la bodega a través de la escotilla (Foto: Nicole Pesse).

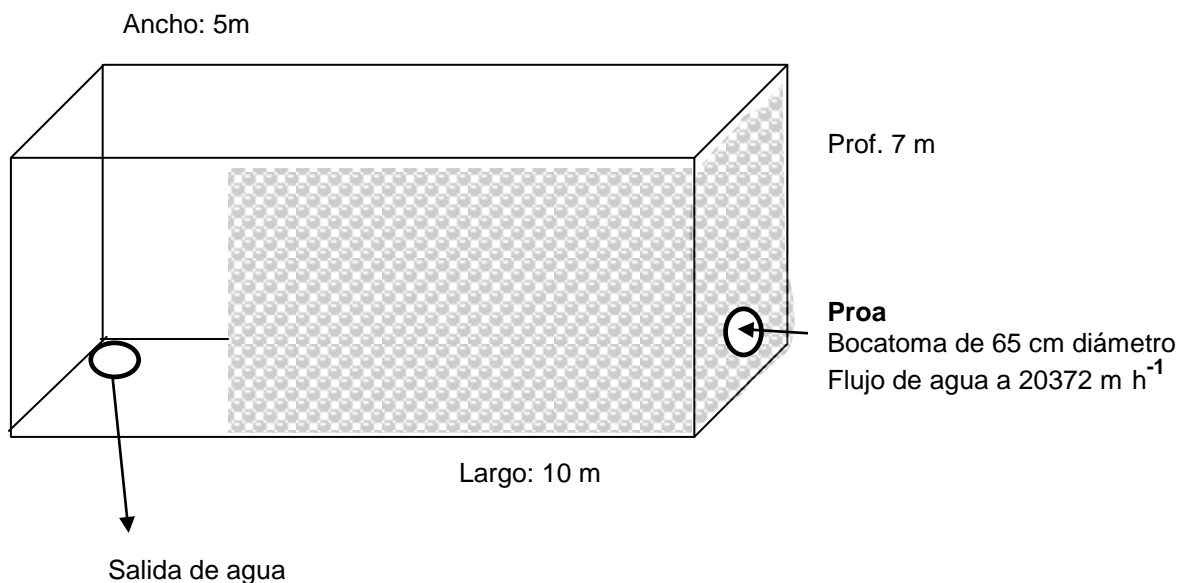


Figura 18. Esquema de una de las bodegas de la nave wellboat Patag3n IV en la que se observan las rejillas dispuestas en la superficie vertical de proa y gran parte de la superficie vertical de estribor. Se indican las posiciones de las compuertas de entrada y de salida de agua as3 como las dimensiones aproximadas de la bodega.



Figura 19. Escotillas de acceso al interior de las bodegas de babor y estribor para el personal de la nave (Foto: Nicole Pesse).

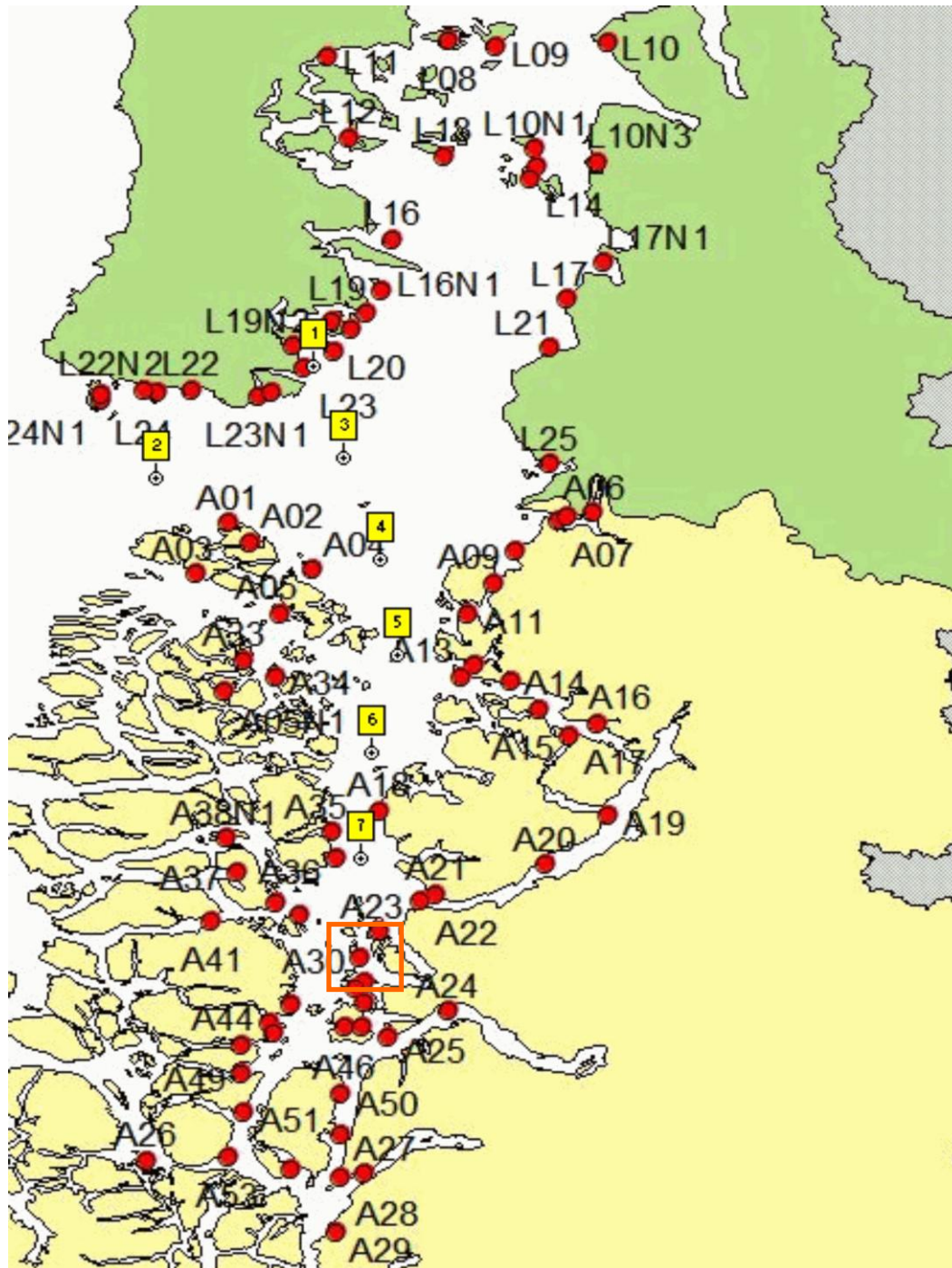


Figura 20. Mapa con las estaciones de monitoreo del programa sur-austral de SUBPESCA (círculos rojos) y estaciones de monitoreo del REPLA de SERNAPESCA (cuadrados amarillos). El rectángulo anaranjado destaca la posición de las estaciones experimentales A30 (I. Julián), A31 (Is. Huichas) y A32 (I. Vergara).

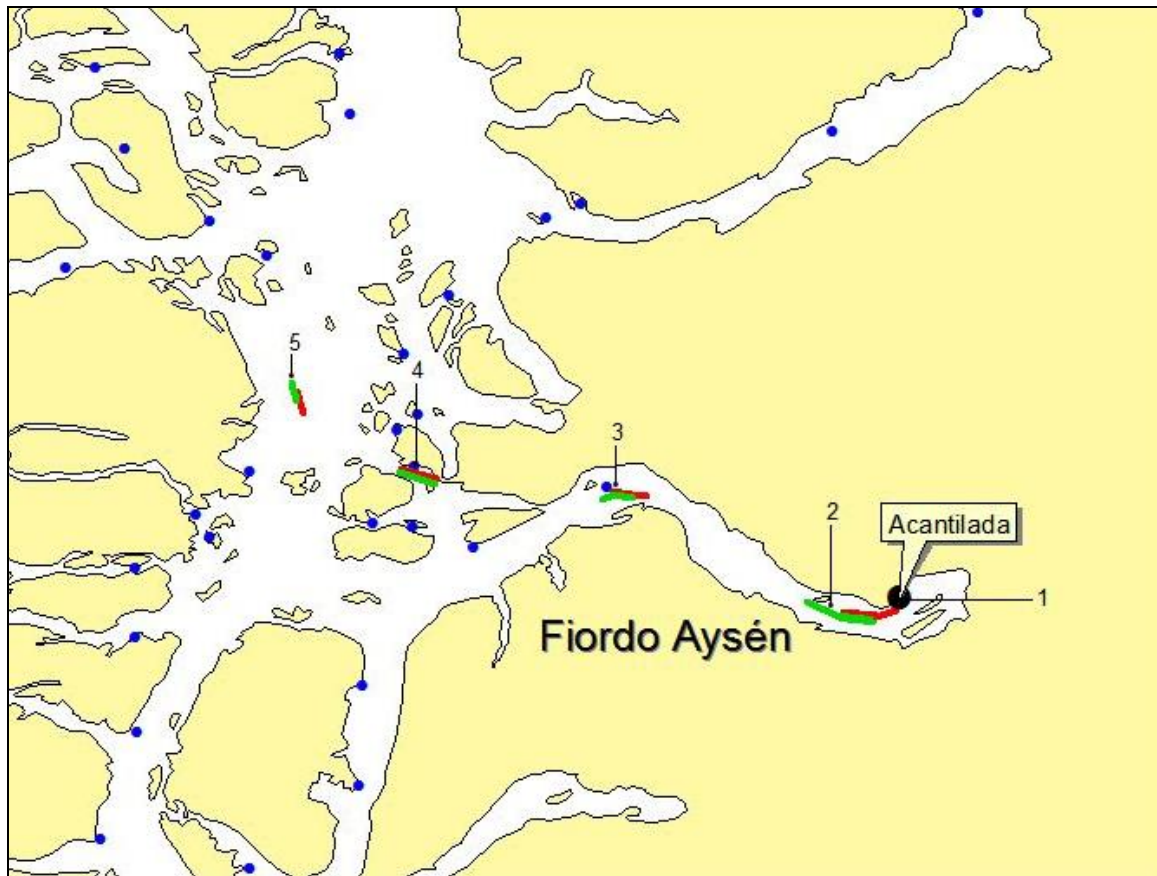


Figura 21. Tramos de la ruta (1-5) realizada por la nave Patagón IV en las que se recolectó muestras de agua tanto de bodegas (línea roja) como del exterior de la nave (fierro Aysén, línea verde). La estación 1 es una muestra recolectada en el exterior de la nave detenida mientras se cargaban sus bodegas. En azul se muestran las estaciones de monitoreo de marea roja.



Figura 22. Compuerta de acceso al interior de la bodega de estribor. Se muestra la manguera de succi3n de agua y cabo que sostiene la bomba sumergible a 5.5 m de profundidad de la bodega cargada con peces vivos (Fotos: Nicole Pesse).



Figura 23. Sistema de tamices (superior 250, centro 100 y abajo 20 μm , respectivamente) utilizados para filtrar el agua proveniente de la bodega cargada con peces vivos (Foto: Nicole Pesse).



Figura 24. La foto superior muestra el sistema de filtraci3n de agua del exterior. La foto inferior muestra un detalle del set de tamices dispuestos de mayor a menor trama de la malla y sumergimiento de las mismas, utilizados para la recolecta de muestras de agua (Fotos: Nicole Pesse).

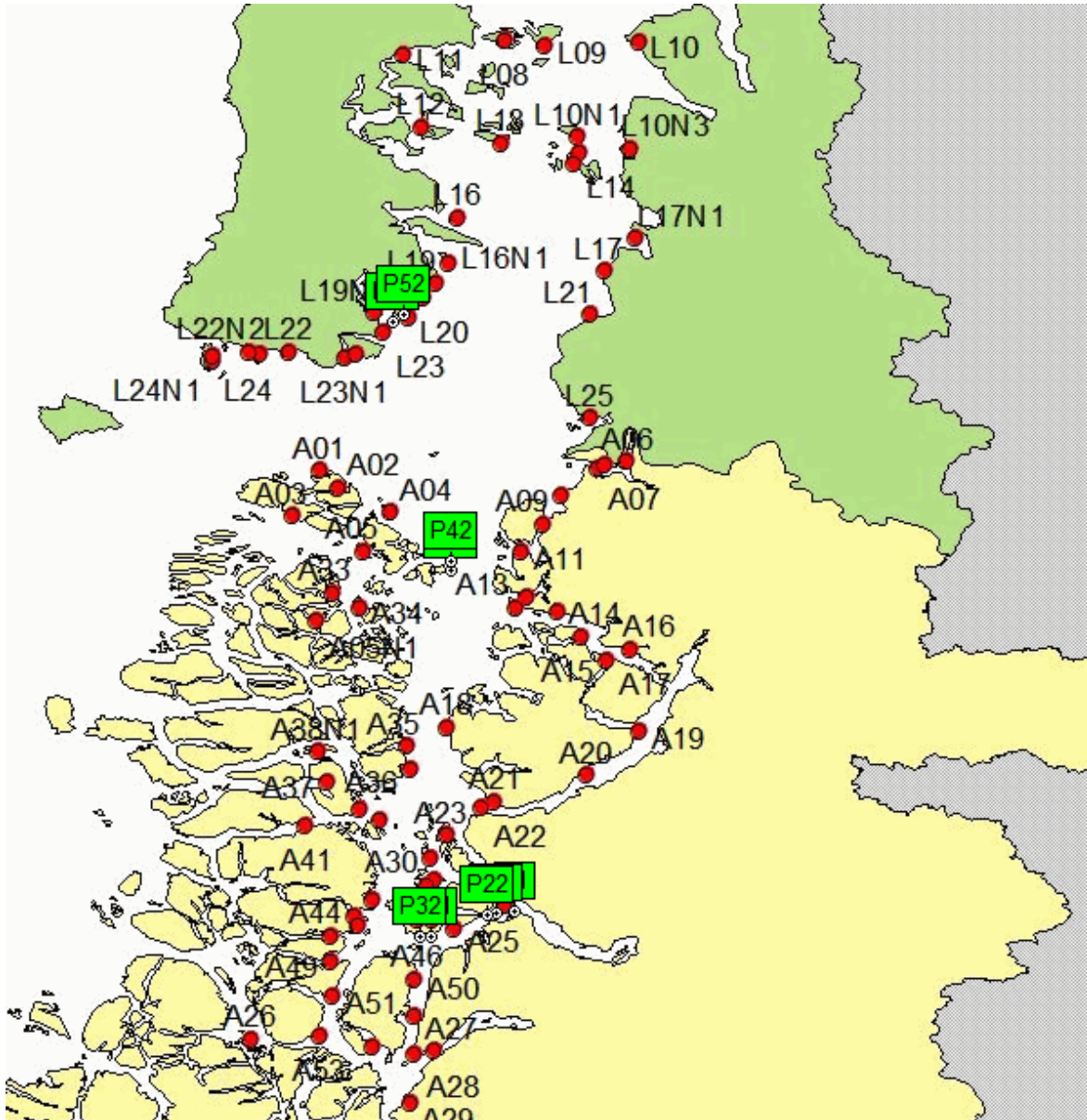
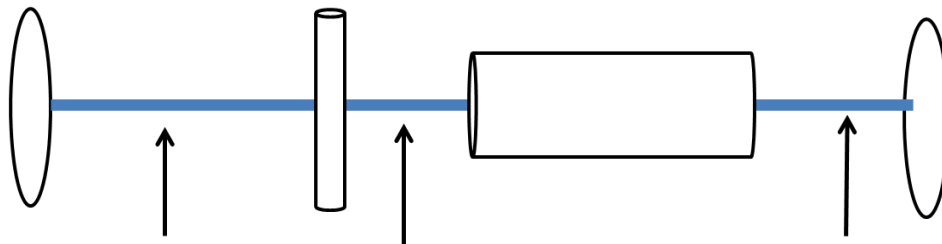


Figura 25. Mapa que muestra los cinco puntos de muestreo de agua de bodega y exterior (rectángulos verdes) durante el trayecto de la nave Patag3n V. Tambi3n se muestran las estaciones de monitoreo del programa sur-austral de SUBPESCA (círculos rojos).



a. Situaci3n con filtro

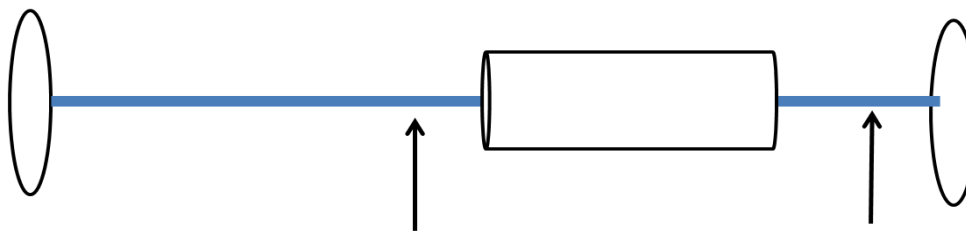
Compuerta de proa Filtro Reactor UV Compuerta de popa



Toma de muestra prefiltro Toma de muestra pre reactor Toma de muestra postreactor

Volumen agua	69 L/min	8 L	8 L
--------------	----------	-----	-----

b. Situaci3n sin filtro



Volumen agua	69 L/min	8 L
--------------	----------	-----

Figura 26. Dise1o de validaci3n de muestreo y tratamiento de UV con y sin filtro durante cruceros en wellboats. a. con filtro. b. sin filtro.



Figura 27. Fotos superiores: Proceso de separación de sólidos y grasa; fotos intermedias: floculación de materia orgánica y separación de líquidos y lodos; fotos inferiores: agua tratada y lodos compactados.

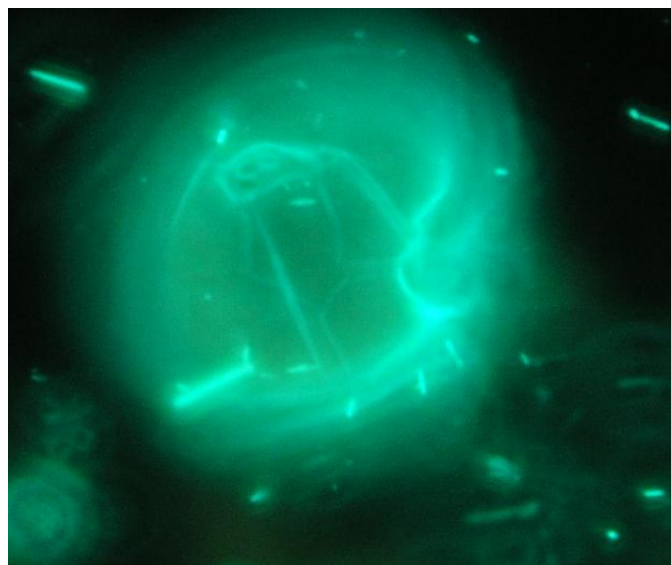


Figura 28. Fotomicrografía de *A. catenella* encontrado en muestras de agua recolectadas en el transecto 5 (Bodega) de la ruta Patagón IV. La fluorescencia fue conseguida añadiendo calcofluor a la muestra para mostrar detalle de la placa 1' (sin poro). (Foto: G. Pizarro)

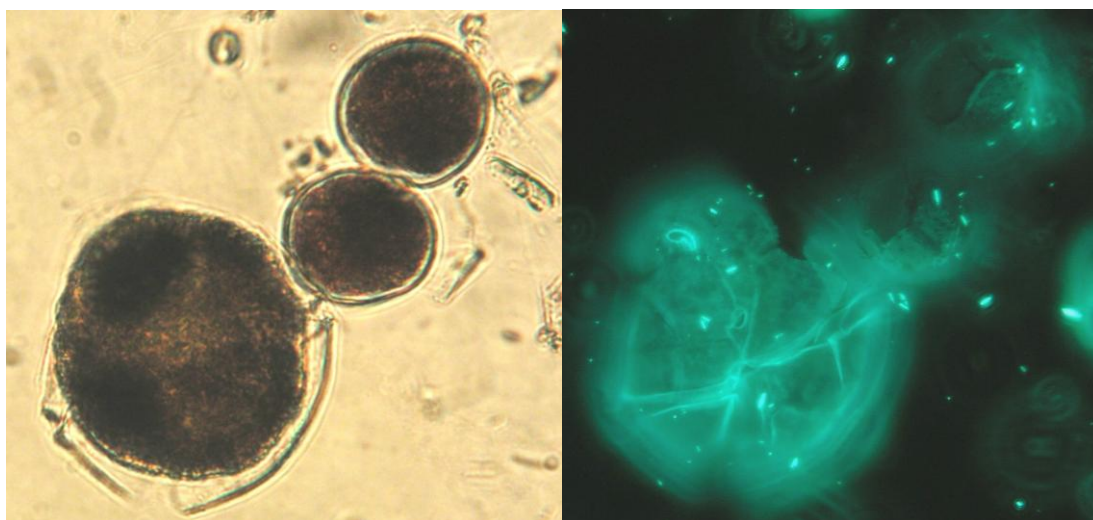


Figura 29. Fotomicrografía de *A. ostenfeldii* encontrado en muestras de agua recolectadas en el transecto 4 (Bodega) de la ruta Patagón IV. Izquierda forma vegetativa acompañada de dos probables quistes de *Protoperidinium avellanum* y *P. denticulatum* A la derecha la misma muestra fluorescente con calcofluor para mostrar detalle del poro de la placa 1' de *A. ostenfeldii* y arqueopilo de los quistes (Foto: G.Pizarro).

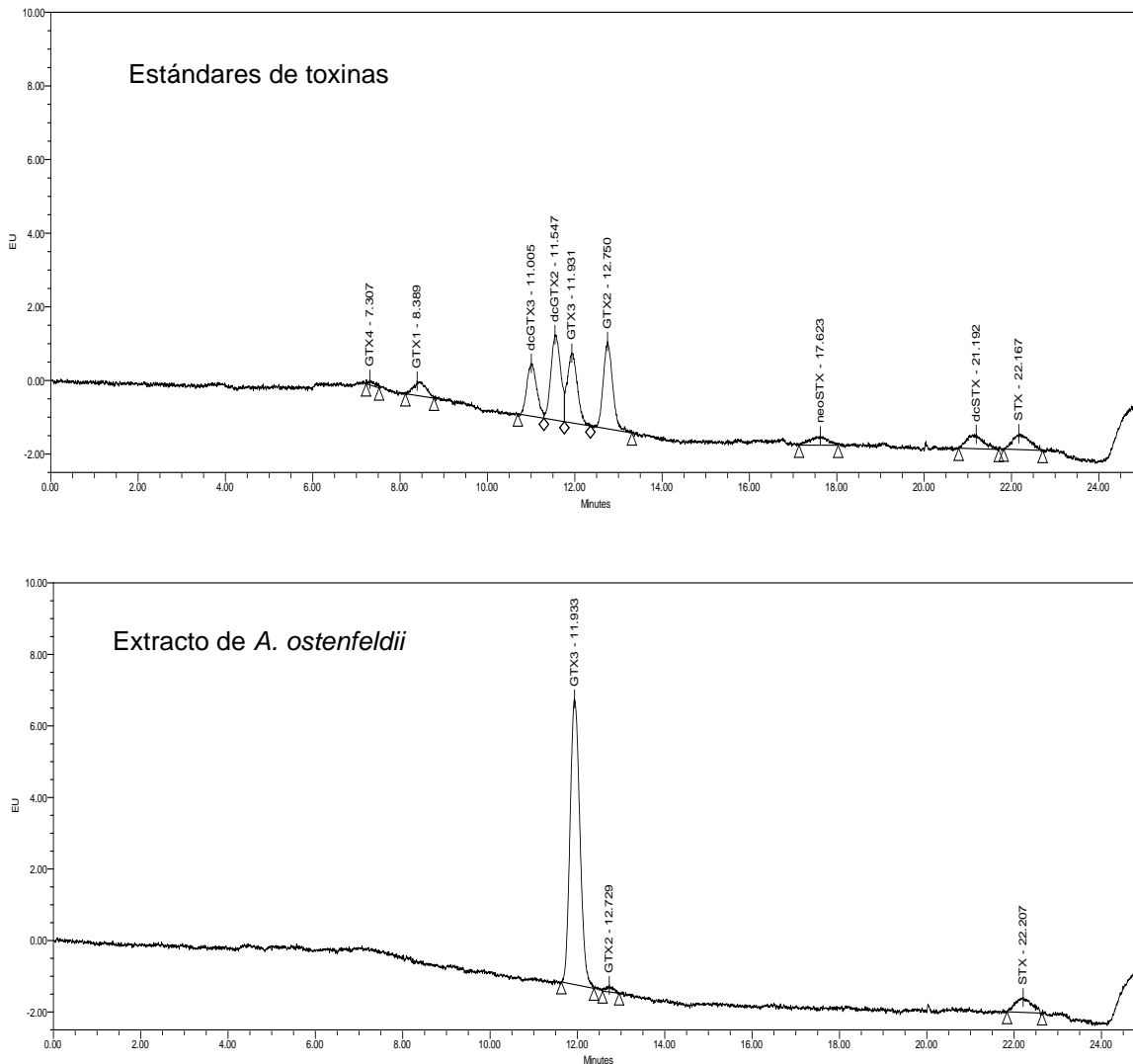


Figura 30. Cromatogramas de las toxinas paralizantes detectadas en cultivos de *A. ostentfeldii* procedente de I. Vergara (confirmaci3n gentileza de Jos3 Franco e Isabel Bravo, investigadores del Instituto de Ciencias Marinas y Espa3ol de Oceanograf3a de Vigo).

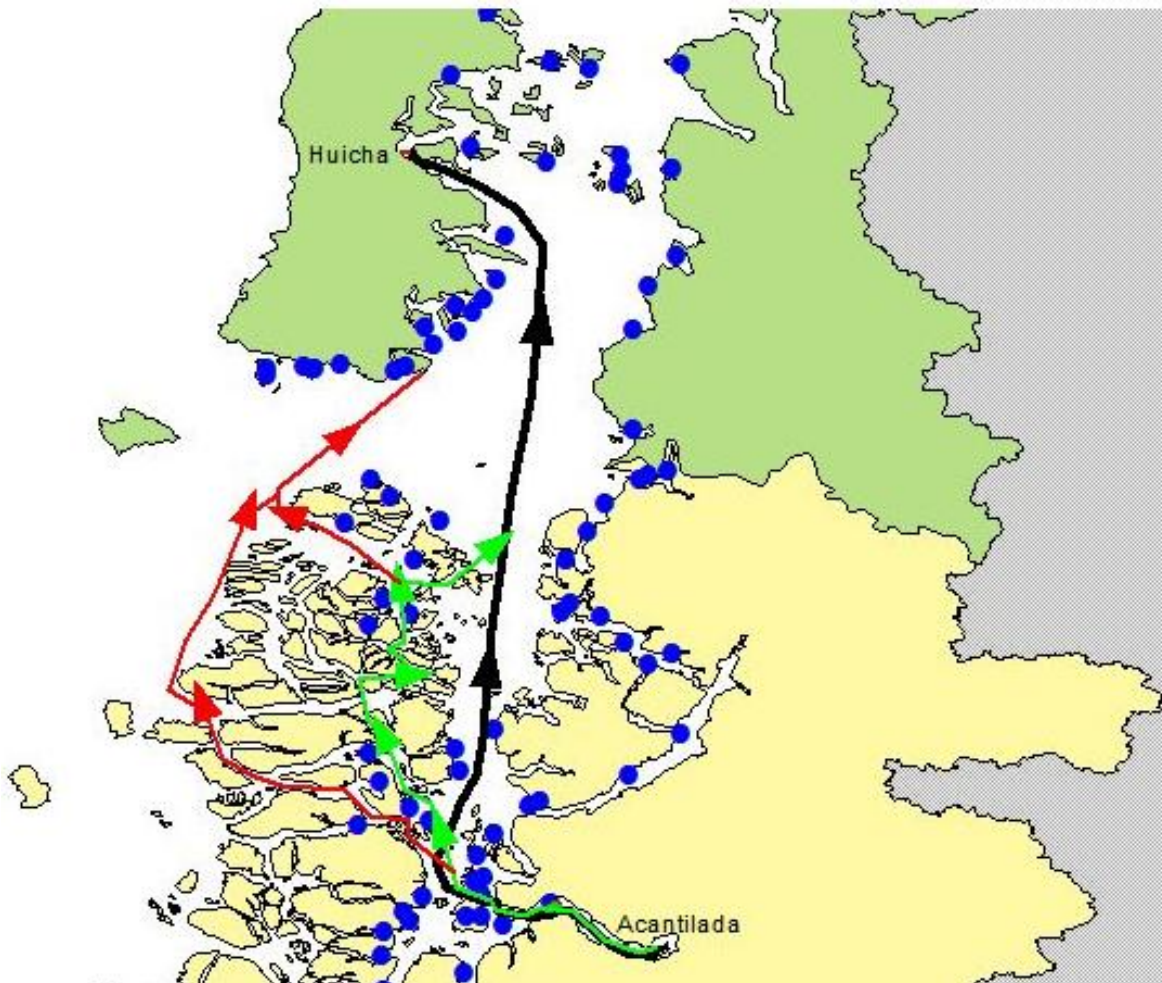


Figura 31. Rutas para la navegaci3n de la flota de wellboats Patagonia en la regi3n de Ays3n (en este caso con acceso al fiordo Ays3n) y salida hacia la regi3n de Los Lagos. Ruta principal de navegaci3n (lnea negra), ruta alternativa viable (lnea verde) y rutas alternativas peligrosas (lneas rojas) para la tripulaci3n y carga de las naves. En azul se indican las estaciones de monitoreo del programa de marea roja que se lleva a cabo desde el a3o 2006.

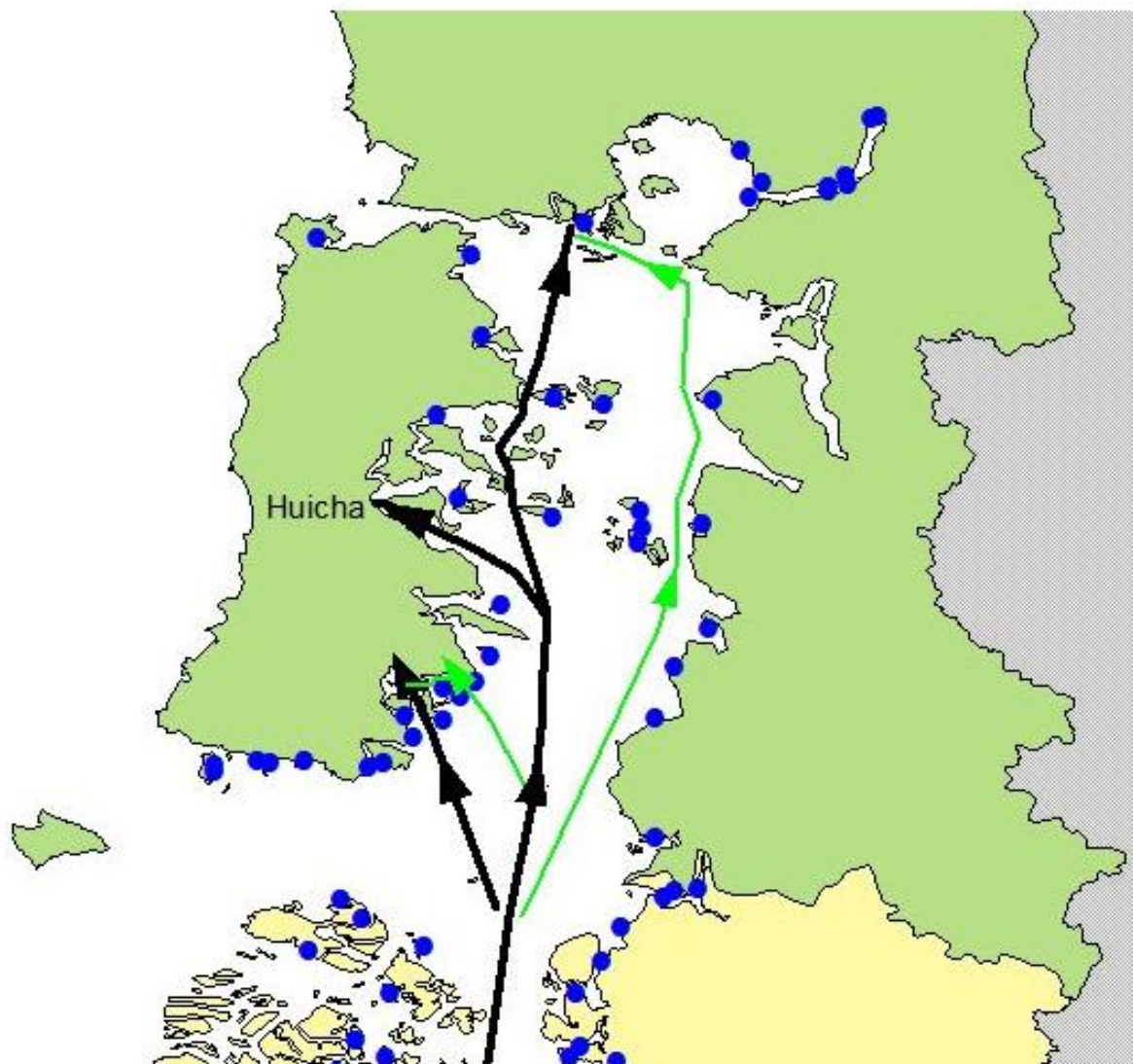


Figura 32. Rutas de navegaci3n de la flota de wellboats Patagonia en la regi3n de Los Lagos. Ruta principal (lnea negra) y rutas alternativas viables tanto para acceder a Quell3n como para acceder a destinos m3s al norte de Huicha como Puerto Montt. En azul se indican las estaciones de monitoreo del programa de marea roja que se lleva a cabo desde el a3o 2006.

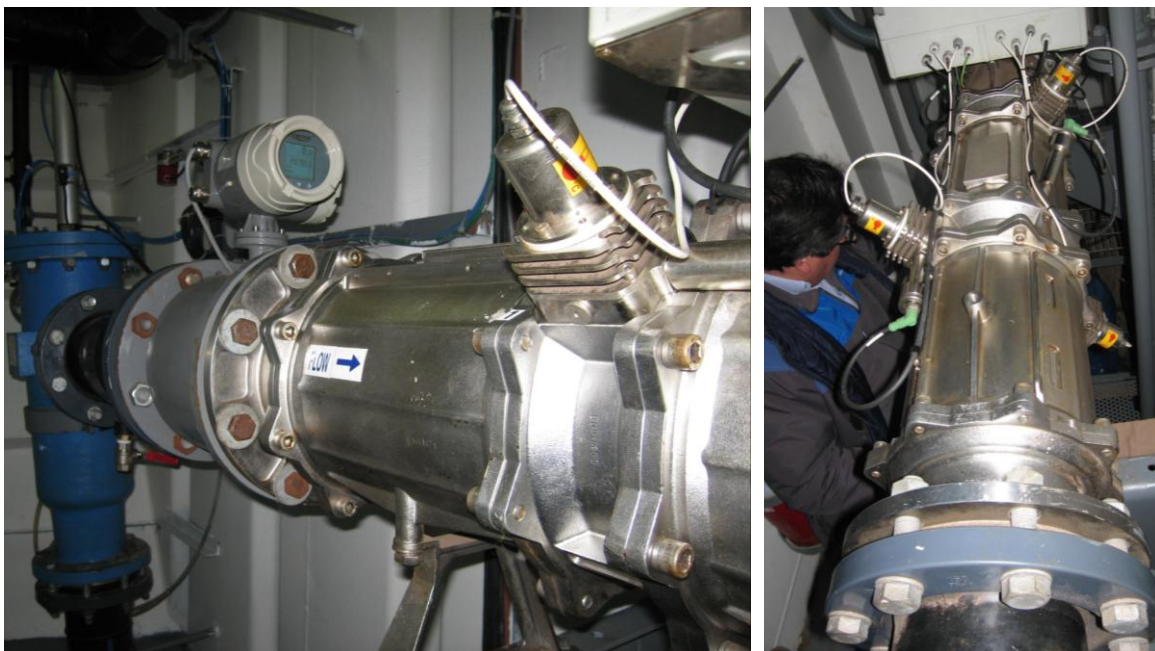


Figura 33. Reactor de radiaci3n UV (cilindro transversal de acero inoxidable) y sistema de filtros pre-reactor (pist3n azul) con operaci3n automatizada desde una estaci3n de programaci3n situada en las cercanías del reactor (Fotos: Nicole Pesse).

T A B L A S



Tabla 1.
Escala de abundancia relativa para *Alexandrium catenella*,
número de células promedio bajo un cubreobjeto de 18x18mm en 3 alícuotas de 0.1 mL cada una.

	Nº células en 0.1 mL	Nivel abundancia relativa A. <i>catenella</i>
AUSENTE	0	0
RARO	1	1 - 2
ESCASO	2	3 - 10
REGULAR	3	11 - 42
ABUNDANTE	4	43 - 170
MUY ABUNDANTE	5	171 - 682
EXTREMADAMENTE ABUNDANTE	6	683 - 2.730
HIPER ABUNDANTE	7	2.730 - 10.922
ULTRA ABUNDANTE	8	10.923 - 43.690
MEGA ABUNDANTE	9	43.691 - 174.762



Tabla 2a.
Abundancia relativa en las tres estaciones experimentales de Ays3n del programa de monitoreo sur-austral.

Programa marea roja 2010-2011			Cruceros rutinarios IV etapa											Cruceros rutinarios V etapa			
Estaci3n	Localidad	Coordenadas	X	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	I	II	III	IV
			6-7/12/09	08-03-10	10	18-04-10	20-05-10	9-	4-5/09/10	11-10-10	11-11-10	10-12-10	26-01-11	3-9/03/2011	8-9/04/11	4-5/05/11	20-06-11
A30	I. Juli3n	45°06'18" 73°30'13"	2	5	2	3	0	0	2	1	1	2	4	0	0	0	0
A31	Is. Huichas	45°10'49" 73°29'10"	1	5	2	1	0	0	2	2	2	3	4	0	0	0	0
A32	I. Vergara	45°11'57" 73°30'44"	1	4	3	3	2	0	3	2	2	3	4	0	0	0	0

Experimento sedimentos y vectores-fomites

↕

Crucero 1 wellboats IV
18-02-2010

↕

Crucero 2 wellboats V
22-23/03/10



INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO / DIVISI3N INVESTIGACI3N EN ACUICULTURA

Tabla 2b.
Abundancia relativa del programa vigilancia REPLA de SERNAPESCA.

REPLA SERNAPESCA 2010

Est.	Coordenadas	22-23/02/10	14-15/03/10	21-03-10	28-29/03/10	9-10/04/10	13-14/04/10	10-05-10	23-05-10	28-29/05/2010	15-16/07/10	10-11/07/10	12-13/08/10	12-09-10	25-10-10	8-9/11/10	14-15/11/10	23-24/11/11	29-30/11/10	15-16/12/10	20-12-10	27-28/12/10	
1	43°18.59' - 73°36.04.1"	0	0	0	0	-	0	0		0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	43°38'55.4" - 73°20'26.7"	0	0	0	0	0	0	0		0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	No se realiz3	0	3	0	0	0	0	0		0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	43°54'17.6" - 73°25'41.7"	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	44°11'32.1" - 73°23'54.4"	0	4	3	0	0	0	1	0	0		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
6	44°29'21.3" - 73°28'11.2"	0	5	3	0	0	0	2	2	0		0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0
7	44°49'41.7" - 73°30'54.1"	0	4	4	2	2	0	0	4	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	3	0	0	0



REPLA SERNAPESCA 2011

Est.	Coordenadas	5-7/01/11	12-01-11	21-01-11	28-01-11	15-02-11	22-01-11	25-02-11	06-03-11	15-16/03/11	2-3/04/11	11-04-11	19-20/04/11	7-8/04/11	14-15/05/11	02-06-11
1	43°18.59' - 73°36.04.1"	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	43°38'55.4" - 73°20'26.7"	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	No se realiz3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	43°54'17.6" - 73°25'41.7"	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	44°11'32.1" - 73°23'54.4"	0	2	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	44°29'21.3" - 73°28'11.2"	2	2	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	44°49'41.7" - 73°30'54.1"	1	2	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Tabla 3a.

Porcentaje de enquistamiento de *A. catenella in situ* durante los cruceros de alta frecuencia y flujo de quistes estimados durante los muestreos de alta y baja frecuencia.

Cruceros de alta frecuencia

Experimentos *in situ*

I. Julián

	29/03/10	08/04/10	15/04/10	24/04/10	05/05/10	20/05/10
Nº días entre muestreo		Instalación	8	9	11	15
Ab. Relativa	2	2	1	1	0	0
nº quistes vivos /trampa			130	67	69	44
Nº quistes/m ²			8442	4318	4448	2825
Nº quistes/m ² día (Flujo quistes <i>in situ</i>)			1055	480	404	188
Nº Células/m ² (columna de agua de 15 m)	0	500.000	0	500.000	0	750.000
% encistamiento /cél día			0,838	0,383	0,323	0,100
Abundancia relativa	2	2	1	1	0	0

Is. Huichas

	29/03/10	07/04/10	16/04/10	25/04/10	05/05/10	20/05/10
Nº días entre muestreo	Instalación	8	9	9	10	15
Ab. Relativa	3	0	1	2	0	0
nº quistes vivos /trampa		83	317	60	80	7
Nº quistes/m ²		5357	20552	3896	5195	455
Nº quistes/m ² día (Flujo quistes <i>in situ</i>)		670	2284	433	519	30
Nº Células/m ² (columna de agua de 15 m)	0	0	1.000.000	3.000.000	0	6.000.000
% encistamiento /cél día		100	0,906	0,043	0,069	0,002
Abundancia relativa	2	0	1	2	0	0

I. Vergara

	29/03/10	08/04/10	16/04/10	25/04/10	05/05/10	20/05/10
Nº días entre muestreo	Instalación	9	8	9	10	15
Ab. Relativa	3	0	1	0	0	2
nº quistes vivos /trampa		27	179	27	17	64
Nº quistes/m ²		1721	11591	1721	1071	4123
Nº quistes/m ² día (Flujo quistes <i>in situ</i>)		191	1449	191	107	275
Nº Células/m ² (columna de agua de 15 m)	0	0	1.500.000	0	0	6.000.000
% encistamiento /cél día		100	0,385	0,051	100	0,018
Abundancia relativa	3	0	1	0	0	2

Area trampa (diam. 14 cm) 0,015394 m²



Tabla 3b.

Densidad de *A. catenella* registrada durante los muestreos experimentales de alta frecuencia en los sitios estudiados y memoria de cálculo densidad integrada en la columna de agua.

Localidad	Fecha	Estrato de profundidad	<i>A. catenella</i> N°/L	<i>A. catenella</i> N°/m3	<i>A. catenella</i> N°/m2 estrato integrado ((N°/m3)*m= N°/m2)	<i>A. catenella</i> N°/m2 columna agua integrada sumatoria 0-15 m
Isla Julián	8-abr-10	0-5m	0	0	0	500 000
		5-10m	0	0	0	
		10-15m	100	100 000	500 000	
		15-20m	0			
Isla Julián	15-abr-10	0-5m	0	0	0	0
		5-10m	0	0	0	
		10-15m	0	0	0	
		15-20m	100			
Isla Julián	24-abr-10	0-5m	100	100 000	500 000	500 000
		5-10m	0	0	0	
		10-15m	0	0	0	
		15-20m	0			
Isla Julián	5-may-10	0-5m	0	0	0	0
		5-10m	0	0	0	
		10-15m	0	0	0	
		15-20m	0			
Isla Julián	5-may-10	0-10m	100	100 000	1 000 000	750 000
		10-20m	0	0	0	
Islas Huichas	7-abr-10	0-5m	0	0	0	0
		5-10m	0	0	0	
		10-15m	0	0	0	
		15-20m	0			
Islas Huichas	16-abr-10	0-5m	0	0	0	1 000 000
		5-10m	200	200 000	1 000 000	
		10-15m	0	0	0	
		15-20m	0			
Islas Huichas	25-abr-10	0-5m	600	600 000	3 000 000	3 000 000
		5-10m	0	0	0	
		10-15m	0	0	0	
		15-20m	0			
Islas Huichas	5-may-10	0-5m	0	0	0	0
		5-10m	0	0	0	
		10-15m	0	0	0	
		15-20m	0			
Islas Huichas	5-may-10	0-10m	700	700 000	7 000 000	6 000 000
		10-20m	100	100 000	1 000 000	



Continuación Tabla 3b.

Isla Vergara	8-abr-10	0-5m	0	0	0	0
		5-10m	0	0	0	0
		10-15m	0	0	0	0
		15-20m	0	0	0	0
Isla Vergara	16-abr-10	0-5m	0	0	0	1 500 000
		5-10m	0	0	0	0
		10-15m	300	300 000	1 500 000	0
		15-20m	0	0	0	0
Isla Vergara	25-abr-10	0-5m	0	0	0	0
		5-10m	0	0	0	0
		10-15m	0	0	0	0
		15-20m	0	0	0	0
Isla Vergara	5-may-10	0-5m	0	0	0	0
		5-10m	0	0	0	0
		10-15m	0	0	0	0
		15-20m	0	0	0	0
Isla Vergara	5-may-10	0-10m	400	400 000	4 000 000	6 000 000
		10-20m	400	400 000	4 000 000	0



Tabla 4.
Porcentaje de enquistamiento y flujo de quistes de *A. Alexandrium minutum* en el NW del mediterr3neo
(tomado de Garc3s *et al.* 2004).

Fecha	Nº d3as transcurrido	Nº c3l/ m ² (columna agua)	Flujo quistes cel x 10 ⁴ /m ² d3a	% enquistamiento	Flujo quistes acumulado cel x 10 ⁴ /m ²
17/01/2002		10.898			
21/01/2002	4	18.574	0		0
24/01/2002	3	26.785	0		0
27/01/2002	3	69.046	0		0
31/01/2002	4	13.097	813	1.2	3.252
04/02/2002	4	221.070	1.497	1.3	9.240
11/02/2002	7	103.207	1.884	3.5	22.428
13/02/2002	2	208.353	6.096	5.5	34.620
15/02/2002	2	2.725.176	6.952	1.0	48.524
17/02/2002	2	528.150	5.989	2.2	60.502
19/02/2002	2	3.054.409	2.246	0.1	64.994
21/02/2002	2	329.713	2.995	1.8	70.984
24/02/2002	3	35	3.066	99.4	80.182
27/02/2002	3	35	856	98.0	82.750
04/03/2002	5	33	599	97.3	85.745
09/03/2002	5	19	941	99.0	90.450
Total	51				



Tabla 5.
Abundancia relativa de *Alexandrium catenella* en el sector experimental durante el periodo de muestreo de alta frecuencia.

Estación	Localidad	Fecha	<i>A. catenella</i>
A30	I. Julián	08/04/10	2
A30	I. Julián	15/04/10	1
A30	I. Julián	24/04/10	1
A30	I. Julián	05/05/10	0
A31	Is. Huichas	07/04/10	0
A31	Is. Huichas	16/04/10	1
A31	Is. Huichas	25/04/10	2
A31	Is. Huichas	05/05/10	0
A32	I. Vergara	08/04/10	0
A32	I. Vergara	16/04/10	1
A32	I. Vergara	25/04/10	0
A32	I. Vergara	05/05/10	0



Tabla 6.

Número de quistes viables observados en los hepatopáncreas homogenizados de 5 ejemplares de cada vector natural recolectados en los tres sitios de estudio.

I. Julián (A-30)				Almeja			Culengue		
	Cholga	n° quistes /g hep.			n° quistes /g hep.			n° quistes /g hep.	
Fecha	15/04/10	24/04/10	05/05/10	15/04/10	24/04/10	05/05/10	15/04/10	24/04/10	05/05/10
n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>Alexandrium catenella</i>	25								1
<i>Ab. Relativa A. catenella</i>	1	1	0	1	1	0	1	1	0

Localidad	I. Julián (A-30)			Is. Huichas (A-31)			I. Vergara (A-32)		
	Chorito	n° quistes /g hep.		Chorito	n° quistes /g hep.		Chorito	n° quistes /g hep.	
Fecha	15/04/10	24/04/10	05/05/10	15/04/10	24/04/10	05/05/10	16/04/10	24/04/10	05/05/10
n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>Alexandrium catenella</i>									1
<i>Ab. Relativa A. catenella</i>	1	1	0	1	2	0	1	0	0



Tabla 7.

Número de quistes viables en hepatopáncreas de vectores procedentes de un área libre de *A. catenella* e incubados *in situ* en los tres sitios de estudio durante la floración ocurrida.

Choro zapato	I. Julián (A-30)			Is. Huichas (A-31)			I. Vergara (A-32)		
	nº quistes /g hep.			nº quistes /g hep.			nº quistes /g hep.		
n	15/04/10	24/04/10	05/05/10	16/04/10	25/04/10	05/05/10	16/04/10	25/04/10	05/05/10
Nº de días entre muestreo	3	2	2	3	4	2	3	14	18
<i>Alexandrium catenella</i>	7	9	11	8	9	10	8	9	11
	-	33	-	20	7	-	7	5	22

Chorito	nº quistes /g hep.			nº quistes /g hep.			nº quistes /g hep.		
<i>Alexandrium catenella</i>	-	-	-	-	-	1	-	3	3

Almeja	nº quistes /g			nº quistes /g			nº quistes /g		
<i>Alexandrium catenella</i>	-	-	-	-	3	-	-	-	-



Tabla 8.

Número de células de *A. catenella* encontrados en muestras de agua de bodega y el exterior, realizados durante el crucero 1 (Patagón IV) y el crucero 2 (Patagón V).

Muestras Patagón IV

18-feb-10

A. catenella N° células / L vol. Filtrado

E1 Acantilada	0
E2	2 000
B2	0
E3	1 500
B3	2 500
E4	4 000
B4	21 000
E5	
B5	6 500

E: Exterior; B: Bodega

Flujo red incendio (E): 50-60 L/min

Flujo bomba (B) : 60-78 L/min

Tiempo de filtrado: 10 min

A. catenella N° células / L vol. corregido x flujo

E1 Acantilada	0
E2	4
B2	0
E3	3
B3	4
E4	8
B4	27
E5	
B5	9

E vs B: NS (Mann-Whitney, p=0.37)

Muestras Patagón V

22-23 mar-10

A. catenella N° células / L vol. Filtrado

E0 Islote Bonito	0
E1 Islote Bonito	0
E2	1 500
B2	1 500
E3	5 000
B3	1 500
E4	2 500
B4	1 000
E5	0
B5	0

E: Exterior; B: Bodega

51-110 L/min

60-78 L/min

10 min

A. catenella N° células / L vol. corregido x flujo

E0 Islote Bonito	1
E1 Islote Bonito	2
E2	8
B2	2
E3	5
B3	1
E4	0
B4	0
E5	0
B5	0

E vs B: NS (Mann-Whitney, p=0.37)



Tabla 9.

Contenido de *A. catenella* en partes externas e internas de chorito luego de ser incubado en tres condiciones simuladas de una floración intensa de la microalga.

Concentración N° células/mL mL de cultivo	1575 350	2510 400	90 400
Agua de incubación	Muchas células vivas nadando Muchos quistes temporales embebidos en materia orgánica	Muchas células vivas nadando Muchos quistes temporales embebidos en materia orgánica	Algunas células vivas Pocos quistes temporales suelos y embebidos en materia orgánica
Valvas	Muchos quistes temporales suelos	Muchos quistes temporales suelos y embebidos en sustrato orgánico Alguna célula viva	No se observan
Biso	Se contabilizan hasta 300 quistes temporales/biso Quistes temporales suelos y sobe sustrato orgánico	Algunos quistes temporales (biso pequeño)	No se observan
Biosustratos y seudofecas Después 24 h en agua limpia	Se contabilizan 7467 quistes temporales/chorito y 800 células vivas /chorito Muchos quistes temporales suelos y embebidos en sustrato orgánico	Se contabilizan 2267 quistes temporales/chorito Muchos quistes temporales suelos y embebidos en sustrato orgánico	No se observan
Después 72 h en agua limpia	Se contabilizan 60 quistes temporales/chorito	Se contabilizan 140 quistes temporales/chorito	Se contabilizan 30 quistes temporales/chorito
Branquias	No se observan	No se observan	No se observan
Manto	No se observan	No se observan	No se observan
Hepatopáncreas	No se observan	No se observan	No se observan



Tabla 10.

Número de quistes de resistencia viables de *A. catenella* encontrados en las redes incubadas *in situ* durante el experimento de muestreo de alta frecuencia.

Área de red (m ²) Instalación el 8 abril 2011	I. Julián (A-30) n° quistes / m ²			Is. Huichas (A-31) n° quistes / m ²			I.Vergara (A-32) n° quistes / m ²		
	0.021	0.18	0.195	0.170	0.081	0.089	0.208	0.047	0.145
N° de días entre muestreo	15-abr-10	24-abr-10	5-may-10	16-abr-10	25-abr-10	5-may-10	16-abr-10	25-abr-10	5-may-10
n	7	9	11	8	9	10	8	9	10
<i>Alexandrium catenella</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		167	308						182

Tabla 11.

Número de quistes de resistencia viables de *A. catenella* encontrados en las linternas incubadas *in situ* durante 27 días, durante el muestreo de alta frecuencia.

Área total linterna = 0.464 m ² Instalación el 8 abril 2011	I. Julián	Is. Huichas	I.Vergara
	n° quistes / m ²	n° quistes / m ²	n° quistes / m ²
N° de días entre muestreo	05-may-10	05-may-10	05-may-10
n	3	3	6
<i>Alexandrium catenella</i>	62	106	261



Tabla 12.
Porcentajes del radiación ultravioleta (UV) emitida por cada lámpara de utilizada en los experimentos de exposición *in vitro*.

Emisión de lámparas utilizadas			
	UVA	UVB	UVC
%UVA	82	24	40
%UVB	12	25	32
%UVC	6	50	29

Tabla 13.
Células de *A. catenella* sometidas a diferentes temperaturas.

Mezcla Cepas: ACM43₃xCM35₄xACA50

			cél/ml						
Inicio: 8/11/10			V		M/I		Q R/T		
Fecha control	Temperatura	min	prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	
14/11/2010	-	T 0	0	6	2	5	5	0	0
	25 °C	T1	5	5	4	7	4	0	1
	25 °C	T2	10	6	3	5	2	0	0
	25 °C	T3	15	7	5	9	4	0	0
	25 °C	T4	20	7	7	12	14	0	0
	25 °C	T 5	50	5	1	8	5	0	0

K-W NS (p=0.45)

			cél/ml						
Fecha inicio: 27/10/10			V		M/I		Q R/T		
Fecha control	Temperatura	min	prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	
04/11/2010	-	T 0	0	65	13	28	3	0	0
	35 °C	T1	5	79	11	26	5	0	0
	35 °C	T2	10	36	16	13	9	0	0
	35 °C	T3	15	0	0	16	4	0	0
	35 °C	T4	20	0	0	25	4	0	0
	35 °C	T 5	50	0	0	21	4	0	0

K-W ** (p=0.003)

V Vivas
M/I Muertas/Inmóviles
Q R/T Quistes Resistencia/Temporales
K-W: Kruskal-Wallis



Continuación Tabla 13.

Fecha inicio: 27/10/10			cél/ml							
Fecha control	Temperatura	min	V		M/I		Q R/T			
			prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E		
04/11/2010	-	T 0	0	54	13	30	6	0	0	
	45 °C	T1	5	0	0	26	17	0	0	
	45 °C	T2	10	0	0	16	17	0	0	
	45 °C	T3	15	2	2	20	1	0	0	
	45 °C	T4	20	0	0	16	2	0	0	
	45 °C	T 5	50	0	0	30	11	2	3	

K-W * (p=0.0147)

Fecha inicio: 27/10/10			cél/ml							
Fecha control	Temperatura	min	V		M/I		Q R/T			
			prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E		
04/11/2010	-	T 0	0	55	9	36	5	0	0	
	60 °C	T1	5	0	0	2	3	0	0	
	60 °C	T2	10	0	0	7	7	0	0	
	60 °C	T3	15	0	0	3	5	0	0	
	60 °C	T4	20	0	0	2	2	0	0	
	60 °C	T 5	50	-	-	-	-	-	-	

K-W ** (p=0.0047)

V Vivas
M/I Muertas/Inmóviles
Q R/T Quistes Resistencia/Temporales
K-W: Kruskal-Wallis



Continuación Tabla 13.

Fecha inicio: 24/02/11			cél/ml						
Fecha control	Temperatura	min	V		M/I		Q R/T		
			prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	
04/03/2011	-	T 0	0	139	18	125	16	0	0
	35 °C	T1	5	141	4	108	22	0	0
	35 °C	T2	10	53	9	36	4	0	0
	35 °C	T3	15	0	0	69	20	0	0
	35 °C	T4	20	0	0	80	11	0	0
	35 °C	T 5	50	0	0	87	4	0	0

K-W ** (p=0.003)

Fecha inicio: 24/02/11			cél/ml						
Fecha control	Temperatura	min	V		M/I		Q R/T		
			prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	
04/03/2011	blanco	T 0	0	165	34	68	8	0	0
	45 °C	T1	5	0	0	79	17	0	0
	45 °C	T2	10	0	0	70	7	0	0
	45 °C	T3	15	0	0	55	5	0	0
	45 °C	T4	20	0	0	64	5	0	0
	45 °C	T 5	50	0	0	66	4	0	0

K-W ** (p=0.003)

Fecha inicio: 8/011/10			cél/ml						
Fecha control	Temperatura	min	V		M/I		Q R/T		
			prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	
15/11/2010	-	T 0	0	4	2	12	4	0	1
	60 °C	T1	5	0	0	15	7	0	0
	60 °C	T2	10	0	0	17	8	1	1
	60 °C	T3	15	0	0	23	4	0	1
	60 °C	T4	20	0	0	21	4	1	1
	60 °C	T 5	50	0	0	21	1	3	2

K-W ** (p=0.003)

V Vivas
M/I Muertas/Inmóviles
Q R/T Quistes Resistencia/Temporales
K-W: Kruskal-Wallis



Tabla 14.

Células de *A. catenella* sometidas a diferentes concentraciones de salinidad

Mezcla cepas: ACM43₃x ACM35₄xACA50

Inicio: 28/10/10

cél/50 uL

Salinidad PSU	Fecha control	V		M/I		Q R/T	
		prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E
31	29/10	12	0	0	0	0	0
31	04/11	30	2	23	6	0	1
31	05/11	44	14	40	8	0	1
31	08/11	36	12	31	5	0	0
31	09/11	13	4	17	9	1	1
31	11/11	21	7	19	7	0	0
31	12/11	10	1	12	7	0	0
31	15/11	22	3	19	3	3	2

cél/50 uL

Salinidad PSU	Fecha control	V		M/I		Q R/T	
		prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E
23	29/10	3	0	5	0	0	0
23	04/11	41	2	15	6	0	1
23	05/11	45	20	14	8	0	1
23	08/11	51	10	36	2	0	0
23	09/11	26	13	18	15	0	0
23	11/11	25	13	14	3	1	1
23	12/11	24	7	12	1	0	0
23	15/11	41	3	20	2	0	0

cél/50 uL

Salinidad PSU	Fecha control	V		M/I		Q R/T	
		prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E
20	29/10	1	0	7	0	0	0
20	04/11	34	8	21	11	0	0
20	05/11	46	7	14	2	0	0
20	08/11	30	4	23	7	0	0
20	09/11	22	1	16	2	0	0
20	11/11	31	2	11	1	1	1
20	12/11	21	6	7	2	0	0
20	15/11	24	9	20	10	0	0



Continuación Tabla 14.

cél/50 uL

Salinidad PSU	Fecha control	V		M/I		Q R/T	
		prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E
15	29/10	5	0	3	0	0	0
15	04/11	32	3	36	12	0	0
15	05/11	42	3	14	7	0	0
15	08/11	48	8	23	8	0	0
15	09/11	20	12	17	3	0	0
15	11/11	33	7	8	3	0	0
15	12/11	26	6	8	3	1	1
15	15/11	23	3	10	4	0	0

cél/50 uL

Salinidad PSU	Fecha control	V		M/I		Q R/T	
		prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E
10	29/10	11	0	2	0	0	0
10	04/11	18	10	27	10	0	0
10	05/11	27	2	14	7	0	0
10	08/11	25	6	14	3	1	1
10	09/11	13	3	9	3	0	0
10	11/11	24	11	3	2	0	0
10	12/11	18	3	4	1	0	0
10	15/11	15	5	21	16	0	0

K-W NS (p=0.2873)

V Vivas
M/I Muertas/Inmóviles
Q R/T Quistes Resistencia/Temporales
K-W: Kruskal-Wallis



Continuación Tabla 14.

Inicio: 24/02/11 cél/50 uL

Salinidad PSU	Fecha control	V		M/I		Q R/T	
		prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E
31	25/02	19	6	8	2	0	0
31	28/02	23	8	22	3	0	0
31	02/03	57	7	16	6	0	0
31	08/03	43	8	14	2	0	0
31	15/03	50	5	22	5	0	0

cél/50 uL

Salinidad PSU	Fecha control	V		M/I		Q R/T	
		prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E
9.1	25/02	13	3	9	4	0	0
9.1	28/02	14	7	12	1	0	0
9.1	02/03	18	9	14	4	0	0
9.1	08/03	38	11	16	6	0	0
9.1	15/03	43	22	23	6	0	0

cél/50 uL

Salinidad PSU	Fecha control	V		M/I		Q R/T	
		prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E
6	25/02	1	2	11	3	1	2
6	28/02	2	3	13	4	0	0
6	02/03	1	1	6	2	0	0
6	08/03	0	0	19	4	0	0
6	15/03	0	0	5	3	0	0

cél/50 uL

Salinidad PSU	Fecha control	V		M/I		Q R/T	
		prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E
2	25/02	0	0	20	4	0	0
2	28/02	0	0	5	2	0	0
2	02/03	0	0	6	1	0	0
2	08/03	0	0	8	1	0	0
2	15/03	0	0	5	6	0	0

K-W *** (p=0.0002)



Tabla 15.
Células de *A. catenella* sometidas a diferentes dosis de radiación UV.

Mezcla cepas: ACM43₃xACM35₄xACA50

Inicio: 31/01/11

Fecha control	UV	min	Dosis	mJ/cm ²		cél/50 uL		Q R/T		
						V	M/I	prom	D.E	
04/02/2011	-	T 0	0	0	63	26	23	4	0	0
	A	T1	1	20	103	22	69	32	0	1
	A	T2	2	40	107	13	41	3	0	0
	A	T3	3	60	88	11	61	11	1	1
	A	T4	4	79	111	13	59	22	0	0
	A	T5	5	99	97	11	64	23	0	1

Fecha control	UV	min	Dosis	mJ/cm ²		cél/50 uL		Q R/T		
						V	M/I	prom	D.E	
07/02/2011	-	T 0	0	0	65	7	69	14	0	0
	A	T1	1	20	71	23	25	6	0	1
	A	T2	2	40	60	5	40	9	2	3
	A	T3	3	60	69	13	49	13	1	1
	A	T4	4	79	59	15	53	1	1	1
	A	T5	5	99	55	12	45	5	0	0

Fecha control	UV	min	Dosis	mJ/cm ²		cél/50 uL		Q R/T		
						V	M/I	prom	D.E	
09/02/2011	-	T 0	0	0	52	14	42	10	0	0
	A	T1	1	20	79	32	24	8	0	1
	A	T2	2	40	66	8	34	6	0	0
	A	T3	3	60	62	6	35	14	0	1
	A	T4	4	79	57	12	40	8	0	0
	A	T5	5	99	46	10	46	7	0	0



Continuación Tabla 15.

Fecha control	UV	min	Dosis	cél/50 uL							
				mJ/cm ²		V		M/I		Q R/T	
				prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E		
11/02/2011	-	T 0	0	0	54	10	43	13	0	0	
	A	T 1	1	20	25	12	41	7	0	0	
	A	T 2	2	40	46	8	24	0	0	0	
	A	T 3	3	60	50	6	32	16	0	0	
	A	T 4	4	79	54	3	50	12	0	0	
	A	T 5	5	99	46	16	32	1	0	0	

Fecha control	UV	min	Dosis	cél/50 uL							
				mJ/cm ²		V		M/I		Q R/T	
				prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E		
17/02/2011	-	T 0	0	0	46	10	40	8	0	0	
	A	T 1	1	20	48	16	28	6	0	0	
	A	T 2	2	40	38	7	28	4	0	0	
	A	T 3	3	60	52	9	28	3	0	0	
	A	T 4	4	79	52	11	46	8	0	0	
	A	T 5	5	99	42	1	32	5	0	0	

K-W NS (p=0.8495)

- V Vivas
- M/I Muertas/Inmóviles
- Q R/T Quistes Resistencia/Temporales
- K-W: Kruskal-Wallis



Continuación Tabla 15.

		cél/50 uL			mJ/cm ²		V		M/I		Q R/T	
Fecha control	UV	min	Dosis		prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E
04/02/2011	-	T0	0	0	63	26	23	4	0	0	0	0
	B	T1	1	5	66	27	40	23	0	0	0	0
	B	T2	2	11	72	11	36	20	0	1	0	1
	B	T3	3	16	76	26	44	19	0	0	0	0
	B	T4	4	22	88	9	45	28	0	0	0	0
	B	T5	5	27	84	11	55	5	0	1	0	1

		cél/50 uL			mJ/cm ²		V		M/I		Q R/T	
Fecha control	UV	min	Dosis		prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E
07/02/2011	-	T0	0	0	65	7	69	14	0	0	0	0
	B	T1	1	5	62	19	51	4	1	1	1	1
	B	T2	2	11	44	6	26	8	0	0	0	0
	B	T3	3	16	62	9	39	2	0	1	0	1
	B	T4	4	22	62	8	40	3	1	2	1	2
	B	T5	5	27	48	6	41	5	1	1	1	1

		cél/50 uL			mJ/cm ²		V		M/I		Q R/T	
Fecha control	UV	min	Dosis		prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E
09/02/2011	-	T0	0	0	52	14	42	10	0	0	0	0
	B	T1	1	5	49	17	47	3	0	0	0	0
	B	T2	2	11	46	5	33	20	0	0	0	0
	B	T3	3	16	44	3	52	4	0	0	0	0
	B	T4	4	22	48	7	42	11	0	0	0	0
	B	T5	5	27	33	17	35	3	0	0	0	0



Continuación Tabla 15.

Fecha control	UV	mJ/cm ²		cél/50 uL						
				V		M/I		Q R/T		
				min	Dosis	prom	D.E	prom	D.E	prom
11/02/2011	-	T0	0	0	54	10	43	13	0	0
	B	T1	1	5	56	2	40	13	0	0
	B	T2	2	11	57	1	37	13	0	0
	B	T3	3	16	54	3	41	13	0	0
	B	T4	4	22	53	2	33	4	0	0
	B	T5	5	27	45	17	31	3	0	0

Fecha control	UV	mJ/cm ²		cél/50 uL						
				V		M/I		Q R/T		
				min	Dosis	prom	D.E	prom	D.E	prom
17/02/2011	-	T0	0	0	46	10	40	8	0	0
	B	T1	1	5	46	9	31	6	0	0
	B	T2	2	11	48	17	35	16	0	0
	B	T3	3	16	35	3	36	5	0	0
	B	T4	4	22	40	3	44	8	0	0
	B	T5	5	27	31	4	23	6	0	0

K-W NS (p=0.7290)

V Vivas
M/I Muertas/Inmóviles
Q R/T Quistes Resistencia/Temporales
K-W: Kruskal-Wallis



Continuación Tabla 15.

Fecha control	UV	min	Dosis	cél/50 uL							
				mJ/cm ²		V		M/I		Q R/T	
				prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E		
04/02/2011	-	T0	0	0	63	26	23	4	0	0	
	C	T1	2	3	11	5	55	8	9	4	
	C	T2	4	6	0	0	59	9	8	3	
	C	T3	6	10	0	0	62	6	4	2	
	C	T4	10	16	0	0	75	9	2	3	
	C	T5	15	24	0	0	69	12	3	5	

Fecha control	UV	min	Dosis	cél/50 uL							
				mJ/cm ²		V		M/I		Q R/T	
				prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E		
07/02/2011	-	T0	0	0	65	7	69	14	0	0	
	C	T1	2	3	12	10	30	12	0	0	
	C	T2	4	6	1	1	23	4	0	0	
	C	T3	6	10	0	0	40	3	0	0	
	C	T4	10	16	0	0	43	4	0	0	
	C	T5	15	24	0	0	54	4	0	0	

Fecha control	UV	min	Dosis	cél/50 uL							
				mJ/cm ²		V		M/I		Q R/T	
				prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E		
09/02/2011	-	T0	0	0	52	14	42	10	0	0	
	C	T1	2	3	37	12	46	8	0	0	
	C	T2	4	6	0	0	45	10	0	0	
	C	T3	6	10	0	0	48	3	0	0	
	C	T4	10	16	0	0	62	11	0	0	
	C	T5	15	24	0	0	54	5	0	0	



Continuaci3n Tabla 15.

Fecha control	UV	mJ/cm ²			cél/50 uL					
					V		M/I		Q R/T	
					prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E
11/02/2011	-	T0	0	0	54	10	43	13	0	0
	C	T1	2	3	29	17	41	17	0	0
	C	T2	4	6	0	1	52	14	0	0
	C	T3	6	10	1	1	46	12	0	0
	C	T4	10	16	0	0	60	11	0	0
	C	T5	15	24	0	0	54	12	0	0

Fecha control	UV	mJ/cm ²			cél/50 uL					
					V		M/I		Q R/T	
					prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E
17/02/2011	-	T0	0	0	46	10	40	8	0	0
	C	T1	2	3	45	15	38	9	0	0
	C	T2	4	6	5	5	45	9	0	0
	C	T3	6	10	7	12	60	2	0	0
	C	T4	10	16	0	0	63	6	0	0
	C	T5	15	24	0	0	69	2	0	0

K-W * (p=0.0114)

- V Vivas
- M/I Muertas/Inm3viles
- Q R/T Quistes Resistencia/Temporales
- K-W: Kruskal-Wallis



Continuación Tabla 15.

Inicio: 25/02/11		mJ/cm ²		cél/50 uL						
Fecha control	UV	min	Dosis	V		M/I		Q R/T		
				prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	
28/02/2011	-	T 0	0	0	62	9	17	4	0	0
	-	T0(placa)	0	0	52	3	29	5	0	0
	C	T1	6	10	2	3	24	6	0	0
	C	T2	8	13	0	0	40	5	0	0
	C	T3	10	16	0	0	41	9	0	0

		mJ/cm ²		cél/50 uL						
Fecha control	UV	min	Dosis	V		M/I		Q R/T		
				prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	
04/03/2011	-	T 0	0	0	58	23	24	3	0	0
	-	T0(placa)	0	0	61	23	37	2	0	0
	C	T1	6	10	1	2	30	5	0	0
	C	T2	8	13	0	0	40	6	0	0
	C	T3	10	16	0	0	37	4	0	0

		mJ/cm ²		cél/50 uL						
Fecha control	UV	min	Dosis	V		M/I		Q R/T		
				prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	
10/03/2011	-	T 0	0	0	52	10	27	4	2	1
	-	T0(placa)	0	0	59	9	41	4	0	0
	C	T1	6	10	3	4	40	4	0	0
	C	T2	8	13	0	0	49	3	0	0
	C	T3	10	16	0	0	58	4	0	0

K-W * (p=0.015)

V Vivas
M/I Muertas/Inmóviles
Q R/T Quistes Resistencia/Temporales
K-W: Kruskal-Wallis



Tabla 16.
Células de *A. catenella* sometidas a diferentes dosis de ozono.

Mezcla cepas: ACM433x ACM354xACA50

cél/50 uL

Inicio: 26/10/10

Fecha control	min	dosis	V		M/I		Q R/T		
			prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	
02/11/2010	T 0	0	0	66	15	33	14	0	0
	T1	1	0.3	50	11	34	24	0	1
	T2	2	0.6	65	27	63	13	4	5
	T3	3	0.9	101	12	78	11	2	0
	T4	4	1.2	91	7	72	31	5	4

cél/50 uL

Fecha control	min	dosis	V		M/I		Q R/T		
			prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	
09/11/2010	T 0	0	0	31	14	34	31	1	1
	T1	1	0.3	58	8	53	27	0	0
	T2	2	0.6	69	32	66	32	3	2
	T3	3	0.9	65	1	70	20	0	0
	T4	4	1.2	68	14	55	23	0	1

cél/50 uL

Fecha control	min	dosis	V		M/I		Q R/T		
			prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	
16/11/2010	T 0	0	0	31	16	20	15	1	1
	T1	1	0.3	47	7	26	2	1	1
	T2	2	0.6	41	20	23	8	1	1
	T3	3	0.9	51	12	26	4	1	1
	T4	4	1.2	47	12	30	9	0	1

K-W NS (p=0.4238)

V Vivas
M/I Muertas/Inmóviles
Q R/T Quistes Resistencia/Temporales
K-W: Kruskal-allis



Continuación Tabla 16.

Cél/50 uL

Inicio: 06/12/10

Fecha control	min	dosis	V		M/I		Q R/T		
			prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	
13/12/2010	T 0	0	0	17	5	6	2	0	0
	T1	5	1.5	3	3	4	5	0	0
	T2	10	3	0	0	12	11	0	0
	T3	25	7.5	0	0	21	3	0	0
	T4	35	10.5	0	0	23	2	0	0
	T 5	55	16.5	0	0	21	3	0	0

cél/50 uL

Fecha control	min	dosis	V		M/I		Q R/T		
			prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	
20/12/2010	T 0	0	0	11	3	8	2	0	0
	T1	5	1.5	4	2	8	6	0	0
	T2	10	3	0	0	19	2	0	0
	T3	25	7.5	0	0	18	9	0	0
	T4	35	10.5	0	0	17	2	0	0
	T 5	55	16.5	0	0	18	4	0	0

cél/50 uL

Fecha control	min	dosis	V		M/I		Q R/T		
			prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	
27/12/2010	T 0	0	0	14	7	8	2	0	0
	T1	5	1.5	1	2	9	3	1	1
	T2	10	3	1	2	11	4	0	0
	T3	25	7.5	0	0	10	2	0	0
	T4	35	10.5	0	0	8	2	0	0
	T 5	55	16.5	0	0	14	7	0	0

cél/50 uL

Fecha control	min	dosis	V		M/I		Q R/T		
			prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	
03/01/2011	T 0	0	0	14	7	9	6	1	1
	T1	5	1.5	7	6	15	2	0	0
	T2	10	3	3	3	16	9	0	0
	T3	25	7.5	0	0	1	2	0	0
	T4	35	10.5	0	0	16	3	0	0
	T 5	55	16.5	0	0	17	2	0	0

K-W ** (p=0.0013)



Continuación Tabla 16.

Inicio: 24/02/11				cél/50 uL					
Fecha control	min	dosis	V		M/I		Q R/T		
			prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	
28/02/11	T 0	0	0	36	4	15	3	0	0
	T1	5	1.5	43	2	17	3	0	0
	T2	10	3	10	3	9	2	0	0
	T3	25	7.5	0	0	39	2	0	0
	T4	35	10.5	0	0	31	7	0	0
	T 5	55	16.5	0	0	33	3	0	0

				cél/50 uL					
Fecha control	min	dosis	V		M/I		Q R/T		
			prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	
04/03/11	T 0	0	0	47	10	22	12	1	1
	T1	5	1.5	51	20	19	8	0	0
	T2	10	3	19	4	34	13	0	0
	T3	25	7.5	0	0	45	7	0	0
	T4	35	10.5	0	0	50	3	0	0
	T 5	55	16.5	0	0	43	5	0	0

				cél/50 uL					
Fecha control	min	dosis	V		M/I		Q R/T		
			prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	
10/03/2011	T 0	0	0	49	6	20	4	0	0
	T1	5	1.5	59	4	29	2	1	1
	T2	10	3	51	4	26	3	0	0
	T3	25	7.5	0	0	57	4	0	0
	T4	35	10.5	0	0	51	4	0	0
	T 5	55	16.5	0	0	48	5	0	0

K-W ** (p=0.003)

V Vivas
M/I Muertas/Inmóviles
Q R/T Quistes Resistencia/Temporales
K-W: Kruskal-Wallis



Tabla 17.
Células de *A. catenella* sometidas a diferentes dosis de ultrasonido de baño con frecuencia media 46 ± 2 KHz.

Mezcla cepas ACA50 x ACM354 x ACM433

Inicio: 25/02/11			cél/50 uL					
Fecha control	min	V		M/I		Q R/T		
		prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	
28/02/2011	T 0	0	26	4	11	1	0	0
	T1	1	31	4	9	1	0	0
	T2	3	29	5	16	1	0	0
	T3	5	26	4	17	4	0	0
	T4	10	25	5	17	5	0	0

Fecha control	min	V		M/I		Q R/T		
		prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	
02/03/2011	T 0	0	33	10	20	6	0	0
	T1	1	36	5	23	8	0	0
	T2	3	32	11	28	4	0	0
	T3	5	34	4	21	3	0	0
	T4	10	34	10	17	3	0	0

Fecha control	min	V		M/I		Q R/T		
		prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E	
08/03/2011	T 0	0	50	11	16	3	0	0
	T1	1	60	8	29	2	0	0
	T2	3	46	3	44	7	0	0
	T3	5	45	3	36	7	0	0
	T4	10	53	2	44	5	0	0

K-W NS (p=0.9429)

V Vivas
M/I Muertas/Inmóviles
Q R/T Quistes Resistencia/Temporales
K-W: Kruskal-Wallis



Continuación Tabla 17.

Inicio: 13/01/12			cél/50 uL							
Fecha control	min		V		M/I		Q R/T			
			prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E		
18/01/12	T 0	0	25	5	21	6	0	0		
	T 1	30	34	4	23	2	0	0		
	T 2	60	33	2	15	3	0	0		
	T 3	90	25	4	16	6	0	0		

Fecha control	min		V		M/I		Q R/T			
			prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E		
31/01/12	T 0	0	24	7	21	6	0	0		
	T 1	30	25	1	15	2	0	0		
	T 2	60	29	4	18	3	0	0		
	T 3	90	26	7	25	3	0	0		

Fecha control	min		V		M/I		Q R/T			
			prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E		
07/02/12	T 0	0	31	5	12	4	0	0		
	T 1	30	25	2	15	3	0	0		
	T 2	60	30	2	15	4	0	0		
	T 3	90	24	3	14	1	0	0		

Fecha control	min		V		M/I		Q R/T			
			prom	D.E	prom	D.E	prom	D.E		
16/02/12	T 0	0	26	4	16	4	0	0		
	T 1	30	27	4	15	1	0	0		
	T 2	60	25	7	11	4	0	0		
	T 3	90	26	3	13	3	0	0		

K-W NS (p=0.5656)

- V Vivas
- M/I Muertas/Inmóviles
- Q R/T Quistes Resistencia/Temporales
- K-W: Kruskal-Wallis



Tabla 18.

Células de *A. catenella* sometidas a diferentes concentraciones de cloro.

Mezcla cepas: ACA122 x ACA123

cél/50 uL

Inicio: 09/09/2011

Fecha control	Concentración		min	V		M/I	
				prom	D.E	prom	D.E
11/09/2011	-	T0	0	12	6	6	3
	10 ppm	T1	10	5	1	7	1
		T2	25	9	7	7	1
		T3	35	7	2	11	7
	5 ppm	T1	10	2	2	3	1
		T2	25	7	2	5	1
		T3	35	3	3	7	5
	2,5 ppm	T1	10	2	1	3	2

Fecha control	Concentración		min	V		M/I	
				prom	D.E	prom	D.E
26/09/2011	-	T0	0	30	14	33	6
	10 ppm	T1	10	24	13	14	3
		T2	25	24	21	21	5
		T3	35	15	20	15	8
	5 ppm	T1	10	4	4	20	6
		T2	25	27	24	23	8
		T3	35	10	17	8	9
	2,5 ppm	T1	10	20	19	16	7

K-W NS (p=0.3126)

- V Vivas
- M/I Muertas/Inmóviles
- Q R/T Quistes Resistencia/Temporales
- K-W: Kruskal-Wallis



Continuaci3n Tabla 18.

c3l/50 uL

Inicio: 20/09/2011			V		M/I		
Fecha control	Concentraci3n		min	prom	D.E	prom	D.E
28/09/2011	-	T0	0	38	9	22	3
	200 ppm	T1	10	0	0	4	1
		T2	25	0	0	1	1
	100 ppm	T1	10	0	0	2	2
		T2	25	0	0	2	2
	50 ppm	T1	10	0	0	1	1
		T2	25	0	0	3	3

			V		M/I		
Fecha control	Concentraci3n		min	prom	D.E	prom	D.E
07/10/2011	-	T0	0	43	6	30	7
	200 ppm	T1	10	0	0	2	0
		T2	25	0	0	2	2
	100 ppm	T1	10	0	0	2	3
		T2	25	0	0	1	2
	50 ppm	T1	10	0	0	1	1
		T2	25	0	0	1	1

			V		M/I		
Fecha control	Concentraci3n		min	prom	D.E	prom	D.E
13/10/2011	-	T0	0	40	16	20	5
	200 ppm	T1	10	0	0	3	0
		T2	25	0	0	1	2
	100 ppm	T1	10	0	0	1	2
		T2	25	0	0	2	2
	50 ppm	T1	10	0	0	0	0
		T2	25	0	0	3	2

K-W ** (p=0.0011)

- V Vivas
- M/I Muertas/Inm3viles
- Q R/T Quistes Resistencia/Temporales
- K-W: Kruskal-Wallis



Continuaci3n Tabla 18.

Inicio: 27/01/2012

Fecha control	Concentraci3n		min	V		M/I	
				prom	D.E	prom	D.E
30/01/2012	-	T0	0	39	3	31	8
	200 ppm	T1	10	0	0	65	6
		T2	25	0	0	63	5
	100 ppm	T1	10	1	1	12	6
		T2	25	0	0	63	4
	50 ppm	T1	10	0	0	35	9
		T2	25	0	0	32	5
	20 ppm	T1	10	1	1	43	7
		T2	25	2	2	40	4

Fecha control	Concentraci3n		min	V		M/I	
				prom	D.E	prom	D.E
07/02/2012	-	T0	0	56	11	38	4
	200 ppm	T1	10	0	0	30	24
		T2	25	0	0	61	15
	100 ppm	T1	10	0	0	17	4
		T2	25	0	0	56	11
	50 ppm	T1	10	2	1	29	8
		T2	25	14	2	31	4
	20 ppm	T1	10	14	21	36	6
		T2	25	2	2	33	4

Fecha control	Concentraci3n		min	V		M/I	
				prom	D.E	prom	D.E
09/02/2012	-	T0	0	46	5	25	7
	200 ppm	T1	10	0	0	26	5
		T2	25	0	0	53	6
	100 ppm	T1	10	3	3	12	6
		T2	25	0	0	53	2
	50 ppm	T1	10	6	4	28	9
		T2	25	17	5	24	2
	20 ppm	T1	10	18	16	47	7
		T2	25	12	3	21	11



Continuación Tabla 18.

Fecha control	Concentración		min	V		M/I	
				prom	D.E	prom	D.E
14/02/12	-	T0	0	67	14	42	18
	200 ppm	T1	10	0	0	33	3
		T2	25	0	0	48	2
	100 ppm	T1	10	0	0	21	8
		T2	25	0	0	25	3
	50 ppm	T1	10	11	8	32	8
		T2	25	22	7	24	4
	20 ppm	T1	10	27	8	36	6
		T2	25	9	2	22	6

K-W *** (p=0.0000)

- V Vivas
- M/I Muertas/Inmóviles
- Q R/T Quistes Resistencia/Temporales
- K-W: Kruskal-Wallis



Tabla 19.
Quistes de *A. catenella* sometidos a diferentes temperatura.

Experimento 1. Cruce: ACM45₂ x ACM44₉

Inicio: 26/11/11

Control: Sin temperatura		28/11/2011	01/12/2011	06/12/2011	08/12/2011	14/12/2011	20/12/2012
Nº días transcurridos acumulados		2	5	10	12	18	24
Número de quistes iniciales	38						
Nº quistes germinados		0	0	0	1	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	0	0	1	1	1
Nº cél vivas		0	0	0	2	0	0
%Promedio de germinación		0	0	0	3	3	3

45 °C x 1 hora		28/11/2011	01/12/2011	06/12/2011	08/12/2011	14/12/2011	20/12/2012
Nº días transcurridos acumulados		2	5	10	12	18	24
Número de quistes iniciales	31						
Nº quistes germinados		0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	0	0	0	0	0
Nº cél vivas		0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinación		0	0	0	0	0	0

45 °C x 5 horas		28/11/2011	01/12/2011	06/12/2011	08/12/2011	14/12/2011	20/12/2012
Nº días transcurridos acumulados		2	5	10	12	18	24
Número de quistes iniciales	37						
Nº quistes germinados		0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	0	0	0	0	0
Nº cél vivas		0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinación		0	0	0	0	0	0



Experimento 2. Cruce: ACM43₄ x ACM35₁

Inicio: 21/12/11

Control: Sin temperatura		23/12/2011	30/12/2011	02/01/2012	17/01/2012	30/01/2012	06/02/2012	17/02/2012
Nº días transcurridos acumulados		2	9	12	27	40	47	58
Número de quistes iniciales	59							
Nº quistes germinados		1	0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	1	1	1	1	1	1
Nº cél vivas		1	0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinación		2	2	2	2	2	2	2

45 °C x 1 hora		23/12/2011	30/12/2011	02/01/2012	17/01/2012	30/01/2012	06/02/2012	17/02/2012
Nº días transcurridos acumulados		2	9	12	27	40	47	58
Número de quistes iniciales	41							
Nº quistes germinados		0	0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	0	0	0	0	0	0
Nº cél vivas		0	0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinación		0	0	0	0	0	0	0

45 °C x 3 horas		23/12/2011	30/12/2011	02/01/2012	17/01/2012	30/01/2012	06/02/2012	17/02/2012
Nº días transcurridos acumulados		2	9	12	27	40	47	58
Número de quistes iniciales	43							
Nº quistes germinados		0	0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	0	0	0	0	0	0
Nº cél vivas		0	0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinación		0	0	0	0	0	0	0

45 °C x 5 horas		23/12/2011	30/12/2011	02/01/2012	17/01/2012	30/01/2012	06/02/2012	17/02/2012
Nº días transcurridos acumulados		2	9	12	27	40	47	58
Número de quistes iniciales	22							
Nº quistes germinados		0	0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	0	0	0	0	0	0
Nº cél vivas		0	0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinación		0	0	0	0	0	0	0



Experimento 3. Cruce: ACM43₄ x ACM35₁

Inicio: 10/01/12

Control: Sin temperatura		16/01/2012	20/01/2012	30/01/2012	06/02/2012	17/02/2012
Nº días transcurridos acumulados		6	10	20	27	38
Número de quistes iniciales	56					
Nº quistes germinados		0	3	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	3	3	3	3
Nº cél vivas		0	6	0	0	0
%Promedio de germinación		0	5	5	5	5

25 °C x 1 hora		16/01/2012	20/01/2012	30/01/2012	06/02/2012	17/02/2012
Nº días transcurridos acumulados		6	10	20	27	38
Número de quistes iniciales	62					
Nº quistes germinados		1	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	1	1	1	1
Nº cél vivas		2	2	0	0	0
%Promedio de germinación		2	2	2	2	2

25 °C x 3 horas		16/01/2012	20/01/2012	30/01/2012	06/02/2012	17/02/2012
Nº días transcurridos acumulados		6	10	20	27	38
Número de quistes iniciales	34					
Nº quistes germinados		0	1	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	1	1	1	1
Nº cél vivas		0	2	0	0	0
%Promedio de germinación		0	3	3	3	3

25 °C x 5 horas		16/01/2012	20/01/2012	30/01/2012	06/02/2012	17/02/2012
Nº días transcurridos acumulados		6	10	20	27	38
Número de quistes iniciales	30					
Nº quistes germinados		0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	0	0	0	0
Nº cél vivas		0	0	0	0	0
%Promedio de germinación		0	0	0	0	0



Tabla 20.
Quistes de *A. catenella* sometidos a diferentes concentraciones de salinidad.

Experimento 1. Cruce: ACM43₄xACMM35₁

Inicio: 26/7/11

Control: Salinidad 31 ppt

		29-ago	1-ago	5-ago	8-ago	28-ago	6-sep	14-sep	27-sep	6-oct	13-oct	20-oct	7-nov	17-nov
Nº días transcurridos acumulados		3	6	10	13	33	42	50	63	72	79	92	109	119
Número de quistes iniciales	43													
Nº quistes germinados		0	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	6	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Nº cél vivas		0	12	5	2	26	26	26	26	26	26	26	26	26
%Promedio de germinación		0	14	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19

Salinidad 10 ppt

		29-ago	1-ago	5-ago	8-ago	28-ago	6-sep	14-sep	27-sep	6-oct	13-oct	20-oct	7-nov	17-nov
Nº días transcurridos		3	6	10	13	33	42	50	63	72	79	92	109	119
Número de quistes iniciales	43													
Nº quistes germinados		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nº cél vivas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinación		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Salinidad 6,3 ppt

		29-ago	1-ago	5-ago	8-ago	28-ago	6-sep	14-sep	27-sep	6-oct	13-oct	20-oct	7-nov	17-nov
Nº días transcurridos		3	6	10	13	33	42	50	63	72	79	92	109	119
Número de quistes iniciales	47													
Nº quistes germinados		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nº cél vivas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinación		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Salinidad 2,2 ppt

		29-ago	1-ago	5-ago	8-ago	28-ago	6-sep	14-sep	27-sep	6-oct	13-oct	20-oct	7-nov	17-nov
Nº días transcurridos		3	6	10	13	33	42	50	63	72	79	92	109	119
Número de quistes iniciales	34													
Nº quistes germinados		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nº cél vivas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinación		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Experimento 2. Cruce: ACM45₂xACM44₉

Inicio: 22/11/11

Control: Salinidad 31 ppt

	24-nov	28-nov	5-dic	14-dic	20-dic	23-dic	30-dic	4-ene	16-ene	30-ene	6-feb	16-feb
Nº dÍas transcurridos acumulados	2	6	14	23	29	32	39	44	56	70	77	87
Número de quistes iniciales	35											
Nº quistes germinados	0	0	3	1	0	0	0	1	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados	0	0	3	4	4	4	4	5	5	5	5	5
Nº cél vivas	0	0	4	2	2	0	0	1	0	0	0	0
%Promedio de germinaci3n	0	0	9	11	11	11	11	14	14	14	14	14

Salinidad 10 ppt

	24-nov	28-nov	5-dic	14-dic	20-dic	23-dic	30-dic	4-ene	16-ene	30-ene	6-feb	16-feb
Nº dÍas transcurridos acumulados	2	6	14	23	29	32	39	44	56	70	77	87
Número de quistes iniciales	35											
Nº quistes germinados	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nº cél vivas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinaci3n	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Salinidad 6 ppt

	24-nov	28-nov	5-dic	14-dic	20-dic	23-dic	30-dic	4-ene	16-ene	30-ene	6-feb	16-feb
Nº dÍas transcurridos acumulados	2	6	14	23	29	32	39	44	56	70	77	87
Número de quistes iniciales	33											
Nº quistes germinados	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nº cél vivas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinaci3n	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Salinidad 2 ppt

	24-nov	28-nov	5-dic	14-dic	20-dic	23-dic	30-dic	4-ene	16-ene	30-ene	6-feb	16-feb
Nº dÍas transcurridos acumulados	2	6	14	23	29	32	39	44	56	70	77	87
Número de quistes iniciales	36											
Nº quistes germinados	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nº cél vivas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinaci3n	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Tabla 21.
Quistes de *A. catenella* a diferentes dosis de radiación UVC.

Experimento 1. Cruce: ACM43₄xACM45₂

Inicio: 28/6/11

Control: Sin UVC		1-jul	4-jul	6-jul	8-jul	12-jul	18-jul	26-jul	3-ago	10-ago	31-ago	1-sep	7-sep	14-sep	27-sep	14-oct	21-oct	8-nov
Nº días transcurridos acumulados		3	6	8	10	14	20	28	36	43	64	65	71	78	91	108	115	133
Número de quistes iniciales	28																	
Número de quistes germinados		5	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados			5	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Nº cél vivas		10	12	14	19	65	239	234	312	725	0	0	0	3	0	0	0	0
%Promedio de germinación		18	18	21	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25

Tiempo latencia (sin UVC)		1-jul	4-jul	6-jul	8-jul	12-jul	18-jul	26-jul	3-ago	10-ago	31-ago	1-sep	7-sep	14-sep	27-sep	14-oct	21-oct	8-nov
Nº días transcurridos acumulados		3	6	8	10	14	20	28	36	43	64	65	71	78	91	108	115	133
Número de quistes iniciales	44																	
Número de quistes germinados		1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados			2	3	3	4	4	4	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Nº cél vivas		2	1	5	0	1	2	0	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinación		2	5	7	7	9	9	9	11	14	14	14	14	14	14	14	14	14

Dosis UVC 30 mJ/ cm² (15 min)		1-jul	4-jul	6-jul	8-jul	12-jul	18-jul	26-jul	3-ago	10-ago	31-ago	1-sep	7-sep	14-sep	27-sep	14-oct	21-oct	8-nov
Nº días transcurridos acumulados		3	6	8	10	14	20	28	36	43	64	65	71	78	91	108	115	133
Número de quistes iniciales	25																	
Número de quistes germinados		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nº cél vivas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinación		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Dosis UVC 66 mJ/ cm² (25 min)		1-jul	4-jul	6-jul	8-jul	12-jul	18-jul	26-jul	3-ago	10-ago	31-ago	1-sep	7-sep	14-sep	27-sep	14-oct	21-oct	8-nov
Nº días transcurridos acumulados		3	6	8	10	14	20	28	36	43	64	65	71	78	91	108	115	133
Número de quistes iniciales	26																	
Número de quistes germinados		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nº cél vivas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinaci3n		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Dosis UVC 94 mJ/ cm² (45 min)		1-jul	4-jul	6-jul	8-jul	12-jul	18-jul	26-jul	3-ago	10-ago	31-ago	1-sep	7-sep	14-sep	27-sep	14-oct	21-oct	8-nov
Nº días transcurridos acumulados		3	6	8	10	14	20	28	36	43	64	65	71	78	91	108	115	133
Número de quistes iniciales	25																	
Número de quistes germinados		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nº cél vivas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinaci3n		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Experimento 2. Cruce: ACM43₄xACM45₂

Inicio: 18/7/11

Control: Sin UVC		20-jul	25-jul	29-jul	2-ago	9-ago	6-sep	13-sep	27-sep	6-oct	14-oct	21-oct	7-nov	17-nov
Nº días transcurridos acumulados		2	7	9	13	20	49	56	70	79	87	94	111	121
Número de quistes iniciales	53													
Número de quistes germinados		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados			0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Nº cél vivas		0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinaci3n		0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2



Dosis UVC 2 mJ/ cm²		20-jul	25-jul	29-jul	2-ago	9-ago	6-sep	13-sep	27-sep	6-oct	14-oct	21-oct	7-nov	17-nov
Nº días transcurridos acumulados		2	7	9	13	20	49	56	70	79	87	94	111	121
Número de quistes iniciales	39													
Número de quistes germinados		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nº cél vivas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinación		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Dosis UVC 11 mJ/ cm²		20-jul	25-jul	29-jul	2-ago	9-ago	6-sep	13-sep	27-sep	6-oct	14-oct	21-oct	7-nov	17-nov
Nº días transcurridos acumulados		2	7	9	13	20	49	56	70	79	87	94	111	121
Número de quistes iniciales	50													
Número de quistes germinados		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nº cél vivas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinación		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Dosis UVC 21 mJ/ cm²		20-jul	25-jul	29-jul	2-ago	9-ago	6-sep	13-sep	27-sep	6-oct	14-oct	21-oct	7-nov	17-nov
Nº días transcurridos acumulados		2	7	9	13	20	49	56	70	79	87	94	111	121
Número de quistes iniciales	51													
Número de quistes germinados		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nº cél vivas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinación		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Tabla 22.
Quistes de *A. catenella* a diferentes dosis de ozono.

Cruce: ACM452 xACM35₁
Inicio: 4/10/11

Control: Sin ozono		07/10/2011	13/10/2011	20/10/2011	04/11/2011	10/11/2011	17/11/2011
Nº días transcurridos acumulados		3	6	13	28	34	41
Número de quistes iniciales	47						
Nº quistes germinados		0	2	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	2	2	2	2	2
Nº cél vivas		0	4	0	0	0	0
%Promedio de germinación		0	4	4	4	4	4

Dosis 9 mg/L (30 min)		07/10/2011	13/10/2011	20/10/2011	04/11/2011	10/11/2011	17/11/2011
Nº días transcurridos acumulados		3	6	13	28	34	41
Número de quistes iniciales	49						
Nº quistes germinados		0	7	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	7	7	7	7	7
Nº cél vivas		0	13	0	0	0	0
%Promedio de germinación		0	14	14	14	14	14

Dosis 18 mg/L (60 min)		07/10/2011	13/10/2011	20/10/2011	04/11/2011	10/11/2011	17/11/2011
Nº días transcurridos acumulados		3	6	13	28	34	41
Número de quistes iniciales	52						
Nº quistes germinados		0	1	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	1	1	1	1	1
Nº cél vivas		0	2	0	0	0	0
%Promedio de germinación		0	2	2	2	2	2



Tabla 23.

Quistes de *A. catenella* sometidas a diferentes dosis de ultrasonido de baño con frecuencia media 46 ± 2 KHz.

Cruce: ACM43₄ x ACM17₃

Inicio: 13/01/12

Control: Sin ultrasonido		16/01/12	18/01/12	20/01/12	30/01/12
Nº días transcurridos acumulados		3	5	7	17
Número de quistes iniciales	28				
Nº quistes germinados		0	0	2	0
Número de quistes germinados acumulados		0	0	2	2
Nº cél vivas		0	0	4	0
%Promedio de germinación		0	0	7	7

30 min de ultrasonido		16/01/12	18/01/12	20/01/12	30/01/12
Nº días transcurridos acumulados		3	5	7	17
Número de quistes iniciales	30				
Nº quistes germinados		0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	0	0	0
Nº cél vivas		0	0	0	0
%Promedio de germinación		0	0	0	0

60 min de ultrasonido		16/01/12	18/01/12	20/01/12	30/01/12
Nº días transcurridos acumulados		3	5	7	17
Número de quistes iniciales	25				
Nº quistes germinados		0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	0	0	0
Nº cél vivas		0	0	0	0
%Promedio de germinación		0	0	0	0

90 min de ultrasonido		16/01/12	18/01/12	20/01/12	30/01/12
Nº días transcurridos acumulados		3	5	7	17
Número de quistes iniciales	107				
Nº quistes germinados		0	0	3	0
Número de quistes germinados acumulados		0	0	3	3
Nº cél vivas		0	0	4	0
%Promedio de germinación		0	0	3	3



Tabla 24.
Quistes de *A. catenella* sometidas a diferentes concentraciones de cloro.

Experimento: Cruce: ACM45₂xACM35₁

Inicio : 03/02/2012

Control: Sin Cloro		07/02/2012	09/02/2012	13/02/2012	16/02/2012	17/02/2012	23/02/2012
Nº días transcurridos acumulados		4	6	10	13	14	20
Número de quistes iniciales	69						
Nº quistes germinados		0	0	2	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	0	2	2	2	2
Nº cél vivas		0	0	3	0	0	0
%Promedio de germinación		0	0	3	3	3	3

Cloro 200 ppm x 25 min		07/02/2012	09/02/2012	13/02/2012	16/02/2012	17/02/2012	23/02/2012
Nº días transcurridos acumulados		4	6	10	13	14	20
Número de quistes iniciales	37						
Nº quistes germinados		0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	0	0	0	0	0
Nº cél vivas		0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinación		0	0	0	0	0	0

Cloro 100 ppm x 25 min		07/02/2012	09/02/2012	13/02/2012	16/02/2012	17/02/2012	23/02/2012
Nº días transcurridos acumulados		4	6	10	13	14	20
Número de quistes iniciales	34						
Nº quistes germinados		0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	0	0	0	0	0
Nº cél vivas		0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinación		0	0	0	0	0	0

Cloro 50 ppm x 25 min		07/02/2012	09/02/2012	13/02/2012	16/02/2012	17/02/2012	23/02/2012
Nº días transcurridos acumulados		4	6	10	13	14	20
Número de quistes iniciales	34						
Nº quistes germinados		0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	0	0	0	0	0
Nº cél vivas		0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinación		0	0	0	0	0	0

Cloro 20 ppm x 25 min		07/02/2012	09/02/2012	13/02/2012	16/02/2012	17/02/2012	23/02/2012
Nº días transcurridos acumulados		4	6	10	13	14	20
Número de quistes iniciales	35						
Nº quistes germinados		0	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		0	0	0	0	0	0
Nº cél vivas		0	0	0	0	0	0
%Promedio de germinación		0	0	0	0	0	0



Tabla 25a.
Composición fitoplanctónica cuantitativa de muestras de experimentos de desarenado en planta piloto. Experimento 1.

Recolecta de muestras (choritos): 15/2/12, 12.00 horas

Lugar: Punta Carrera

Inicio desarenado: 15/2/12 15.00 h

Nº individuos: 200 choritos

	Horas tratamiento transcurridas	Tipo de muestra	Nº células x g, L o indiv.	Nº Individuos	Peso total (g)	Peso individuo g/ind. o hep.	
T0	15.00 hrs 15/02/2012 apozamiento	Cuerpo (Nº cél/g)					
		Teca <i>Prorocentrum lima</i>	1	4	45	11	
		Hepatopáncrea (Nº cél/g)					
		Teca <i>Dinophysis rotundata</i>	6	4	6	1	
		total	7			13	
		Valvas (Nº cél/ (indiv.) total	0	6			
		Biso (Nº cél/ (indiv.)		6			
		<i>Bellerochea malleus</i>	167				
		<i>Pleurosigma spp.</i>	333				
		<i>Surirella spp.</i>	333				
		<i>Thalassionema nitzschioides</i>	167				
		total	1000				
		Agua circulante conc x 25 µm (Nº cél/L)					
		<i>Detonula pumila</i>	2000				
		<i>Licmophora abbreviata</i>	1000				
		<i>Pleurosigma spp.</i>	3000				
		<i>Thalassionema nitzschioides</i>	2000				
		<i>Thalassiosira cf. delicatula</i>	7000				
		total	15000				
		Fito. Cuanti. in situ (Nº cél/L)					
Euglenofíceas indeterminadas	2000						
Fito cuali. in situ (frecuencia)							
<i>Guinardia delicatula</i>	1						
<i>Thalassiosira cf. minuscula</i>	1						
<i>Ceratium lineatum</i>	1						
<i>Dinophysis acuminata</i>	1						
<i>Protoperidinium pellucidum</i>	1						



T1	8.30 hrs 16/02/2012 inicio flujo de agua 2.6 L/min	17.5 toma de muestras	Cuerpo (N° cél/g)				
			Quiste <i>Protooperidinium americanum</i>	0	4	36	9
			Hepatopáncrea (N° cél/g)				
					4	5	1
			total	0			10
			Sedimento (N° cél/L)				
			<i>Fragillaria spp.</i>	28000			
			<i>Navicula spp.</i>	1500			
			<i>Pleurosigma spp.</i>	1500			
			Total	31000			
			Valvas (N° cél/ indiv.)		6		
			<i>Fragillaria spp.</i>	333			
			<i>Licmophora abbreviata</i>	167			
			<i>Navicula spp.</i>	500			
			<i>Pleurosigma spp.</i>	167			
			<i>P. cf. pseudodelicatissima</i>	333			
			<i>Thalassiosira spp.</i>	333			
			Total	1833			
			Biso (N° cél/ indiv.)		6		
			<i>Cylindrotheca closterium</i>	333			
<i>Fragillaria spp.</i>	1000						
<i>Pleurosigma spp.</i>	167						
<i>Thalassiosira cf. delicatula</i>	833						
Total	2333						
Agua apozamiento choritos conc x 25 µm (N° cél/L)							
(al término de apozamiento)							
<i>Thalassiosira cf. delicatula</i>	1000						
<i>Alexandrium catenella</i>	1000						
Euglenofíceas indet.	3000						
Total	5000						



T2	17.00 hrs 16/02/2012 corte de flujo agua	26 toma de muestras	Cuerpo (N° cél/g)	0	3	27	9
			Hepatopáncrea (N° cél/g)	0	3	3	1
			total	0			1
			Sedimento (N° cél/L)				
			Teca <i>Dinophysis rotundata</i>	0			
			Quiste <i>Protooperidinium</i> spp.	0			
			Dinoflagelado indeterminado	0			
			total	0			
			Valvas (N° cél/ (indiv.)		6		
			<i>Fragillaria</i> spp.	2667			
			<i>Licmophora abbreviata</i>	667			
			<i>Navicula</i> spp.	667			
			<i>Pleurosigma directum</i>	167			
			<i>Thalassiosira</i> spp.	333			
			<i>Protooperidinium</i> spp.	167			
			Total	4667			
			Biso (N° cél/ (indiv.)		6		
			<i>Fragillaria</i> spp.	1833			
			<i>Navicula</i> spp.	333			
			Total	2167			
			Agua circulante conc x 25 µm (N° cél/L)				
			(concentrado x 8 horas)				
			<i>Chaetoceros compressus</i>	9			
			<i>Chaetoceros debilis</i>	10			
			<i>Chaetoceros teres</i>	2			
			<i>Chaetoceros</i> spp.	5			
<i>Cylindrotheca closterium</i>	1						
<i>Licmophora abbreviata</i>	2						
<i>Pleurosigma normanii</i>	1						
<i>Pleurosigma</i> spp.	9						
<i>Thalassiosira cf. delicatula</i>	5						
Total	45						



T3	8.30 - 16.00 hrs 16/02/2012 con flujo de agua	41 toma de muestras	Cuerpo (N° cél/g)				
			Dinoflagelado indeterminado	1	3	23	8
			Hepatopáncrea (N° cél/g)				
			Dinoflagelado indeterminado	3	3	2	1
			total	4			9
			Sedimento (N° cél/L)				
			Quiete <i>Preperidinium meunieri</i>	45			
			<i>Fragillaria</i> spp.	9500			
			<i>Navicula</i> spp.	500			
			<i>Pleurosigma normanii</i>	1000			
			<i>Pleurosigma</i> spp.	3500			
			<i>Thalassionema nitzschioides</i>	500			
			Total	15023			
			Valvas (N° cél/ (indiv.))		6		
			<i>Fragillaria</i> spp.	1000			
			<i>Navicula</i> spp.	500			
			<i>Nitzschia</i> spp.	167			
			<i>Pleurosigma</i> spp.	667			
			total	2333			
			Biso (N° cél/ (indiv.))		6		
			<i>Fragillaria</i> spp.	500			
			<i>Leptocylindrus danicus</i>	333			
			<i>Nitzschia</i> spp.	1333			
<i>Paralia sulcata</i>	2667						
<i>Pleurosigma</i> spp.	500						
total	5333						
Agua circulante conc x 25 µm (N° cél/L)							
(concentrado x 8 horas)							
<i>Chaetoceros socialis</i>	4						
<i>Cylindrotheca closterium</i>	8						
<i>Detonula pumila</i>	2						
<i>Fragillaria</i> spp.	19						
<i>Nitzschia longissima</i>	1						
<i>Pleurosigma directum</i>	12						
<i>Pseudo-nitzschia cf. australis</i>	3						
<i>Synedropsis</i> spp.	2						
<i>Thalassiosira</i> spp.	10						
<i>Ceratium lineatum</i>	2						
Total	61						



Tabla 25b.
Composición fitoplanctónica cuantitativa de muestras de experimentos de desarenado en planta piloto. Experimento 2.

Recolecta de muestras (choritos): 20/2/12, 19.00 horas

Lugar: Punta Carrera

Inicio desarenado: 20/2/12, 20.00 h

Nº individuos: 100 choritos

	Horas tratamiento transcurridas	Tipo de muestra	Nº células x g, L o indiv.	Nº Individuos analizados	Peso total (g)	Peso individuo (g/ind. o hep.)
T0	20.00 hrs 20/02/2012 apozamiento	Cuerpo (Nº cél/g) <i>Teca Prorocentrum lima</i> <i>Teca Dinophysis rotundata</i> <i>Teca Dinophysis truncata</i> Hepatopáncrea (Nº cél/g) <i>Teca Prorocentrum lima</i> <i>Teca Dinophysis rotundata</i> <i>Teca Dinophysis truncata</i> total	1 2 1 3 7 3 16	5 5 5	45 5	9 1 10
		Valvas (Nº cél/ indiv.) <i>Licmophora spp.</i> <i>Navicula spp.</i> total	125 375 500	8		
		Biso (Nº cél (indiv.) <i>Fragillaria spp.</i> <i>Licmophora abbreviata</i> <i>Navicula spp.</i> <i>Pleurosigma spp.</i> total	14.000 250 500 375 15125	8		
		Agua circulante (Nº cél/L) (concentrada x 25 µm) <i>Pleurosigma spp.</i> <i>Thalassiosira cf. minuscula</i> <i>Thalassiosira spp.</i> total	3.000 2.000 1.000 6000			
		Agua in situ (Nº cél/L) (bombeo por 5 minutos) <i>Fragillaria spp.</i> <i>Licmophora spp.</i> <i>Navicula spp.</i> <i>Pleurosigma spp.</i> total	32 3 6 3 43			



T1	8.30 hrs 21/02/2012 inicio flujo de agua 2.4 L/min	12.5 No se toma muestra					
----	--	-------------------------------	--	--	--	--	--

T2	17.15 hrs 21/02/2012 corte de flujo agua	21.25 toma de muestras	Cuerpo (N° cél/g)				
			Quiste <i>Protoperidinium americanum</i>	1	5	22	4
			Hepatopáncrea (N° cél/g)				
			Quiste <i>Alexandrium catenella</i>	3	5	4	1
			Dinoflagelado indeterminado	53			
			total	57			5
			Sedimento (N° cél/L)				
			Teca <i>Dinophysis rotundata</i>	38			
			Quiste <i>Protoperidinium</i> spp.	8			
			Quiste <i>Protoperidinium americanum</i>	2			
			Dinoflagelado indeterminado	4			
			total	51			
			Valvas (N° cél/ (indiv.))		6		
			<i>Bellerochea malleus</i>	333			
			<i>Navicula</i> spp.	333			
total	667						
Biso (N° cél/ indiv.)		6					
<i>Bellerochea malleus</i>	333						
<i>Navicula</i> spp.	500						
<i>Pleurosigma</i> spp.	333						
total	1167						
Agua circulante conc x 25 µm (N° cél/L)							
(8 horas circulando)							
<i>Cylindrotheca closterium</i>	1						
<i>Navicula</i> spp.	1						
<i>Pleurosigma</i> spp.	2						
<i>Thalassiosira</i> spp.	1						
total	4						



T3	8.30 - 17.15 hrs 22/02/2012 con flujo de agua	33.25 toma de muestras	Cuerpo (N° cél/g)	-	6	50	8
			Hepatopáncrea (N° cél/g)				
			Teca <i>Dinophysis rotundata</i>	8			
			Teca <i>Prorocentrum lima</i>	3	6	9	2
			Dinoflagelado indeterminado	5			
			total	15			10
			Sedimento (N° cél/L)				
			Teca <i>Dinophysis rotundata</i>	17			
			Quiste <i>Protoperdinium</i> spp.	8			
			Dinoflagelado indeterminado	3			
			total	28			
			Valvas (N° cél/ (indiv.))			6	
			<i>Cylindrotheca closterium</i>	167			
			<i>Navicula</i> spp.	167			
			total	333			
Biso (N° cél/ (indiv.))			6				
total	0						
Agua circulante conc x 25 µm (N° cél/L)							
(8 horas circulando)							
<i>Pseudo-nitzschia cf. australis</i>	2						
<i>Thalassiosira cf. delicatula</i>	2						
<i>Gonyaulax</i> spp.	1						
total	4						



Tabla 26.

Composición fitoplanctónica cuantitativa de las muestras recolectadas en la bodega (B) y en el exterior (E) de la nave Patagón IV durante el trayecto de transporte de peces entre el fiordo Aysén y Chiló (N° células/L) (18 febrero 2010).

Estación	E1	E2	B2	E3	B3	E4	B4	B5
Diatomeas								
<i>Asterionella kariana</i>	10.752						9.000	
<i>Cerataulina pelagica</i>	4.032	3.600				68.544	33.000	
<i>Coscinodiscus centralis</i>			200	400			18.000	1.800
<i>Coscinodiscus radiatus</i>						6.720		
<i>Coscinodiscus spp.</i>					2.000			
<i>Cylindrotheca closterium</i>	1.344					20.160	4.000	200
<i>Cerataulina pelagica</i>	4.032	3.600				68.544	33.000	
<i>Chaetoceros constrictus</i>							2.000	
<i>Chaetoceros debilis</i>						9.408	22.000	
<i>Chaetoceros lorenzianus</i>						17.472		
<i>Chaetoceros spp.</i>	1.344		2.600					
<i>Dityllium brightwellii</i>	1.344				200	18.816	176.000	200
<i>Detonula pumila</i>							4.000	
<i>Eucampia cornuta</i>						49.728	2.000	
<i>Eucampia zodiacus</i>						14.784	95.000	
<i>Fragilaria sp.</i>			800			9.408		200
<i>Guinardia delicatula</i>						6.720	22.000	
<i>Pleurosigma directum</i>						5.376	4.000	
<i>Grammatophora marina</i>	166.656	2.600	7.200	6.800				
<i>Licmophora sp</i>	5.376	200	400					
<i>Melossira moniliformis</i>	29.568				800			
<i>Navicula spp.</i>	5.376							
<i>Paralia sulcata</i>				1.400				
<i>Pseudonitzschia australis</i>	2.688							
<i>Pleurosigma normanii</i>						1.344		
<i>Pleurosigma sp.</i>					1.400			
<i>Pleurosigma sp.</i>					200			
<i>Rhizosolenia pungens</i>		600				6.720	4.000	
<i>Rhizosolenia setigera</i>	4.032						2.000	
<i>Skeletonema costatum</i>		5.200				26.880	7.000	
<i>Stephanopyxis turris</i>						2.688		
<i>Striatella unipunctata</i>	8.064					5.376		
<i>Synedropsis spp.</i>	1.344		200					
<i>Thalassiosira delicatula</i>						41.664		
<i>Thalassiosira cf. rotula</i>						20.160	87.000	
<i>Thalassiosira cf. delicatula</i>							23.000	
<i>Thalasionema. nitzschoides</i>	2.279.396	15.200	39.400	3.200	14.000	143.808	81.000	14.000
<i>Thalassiosira spp.</i>	21.504					3.966.508		
<i>Thalasiotrix sp.</i>	213.696	3.607.548	179.800	4.504.948	7.017.668	13.440	93.000	4.953.648
<i>Tropidoneis sp.</i>						4.032		200
Dinoflagelados								
A. catenella		2.000	0	1.500	2.500	4.000	21.000	6.500
<i>Ceratium fusus</i>			200			12.096		
<i>Ceratium lineatum</i>				1.000		158.592	497.000	2.600
<i>Ceratium pentagonum</i>				1.000		2.688		200
<i>Ceratium tripos</i>	28.224	600				8.064		600
<i>Dinophysis acuminata</i>		2.600		1.200	600	4.032	37.000	7.600
<i>Dinophysis acuta</i>				1.200		4.032	4.000	
<i>Dinophysis rotundata</i>	41.664	34.400		4.000	600	2.688	1.000	7.600
<i>Distephanus espiculum</i>					200		1.000	
<i>Diplopsalis sp.</i>					1.200			
<i>Gymnodinium sp.</i>				5.600	200			800



Continuación Tabla 26.

<i>Gyrodinium sp.</i>				600					
<i>Heterocapasa triquetra</i>							6.000		
<i>Karenia spp.</i>				1.200					
<i>Protoperidinium cf. leonis</i>						5.376			
<i>Protoperidinium claudicans</i>							5.000		
<i>Protoperidinium conicoides</i>						4.032			
<i>Protoperidinium conicum</i>		1.200					2.000		
<i>Protoperidinium divaricatum</i>				800	400	6.720			
<i>Protoperidinium excentricum</i>						4.032			
<i>Preperidinium meunieri</i>						1.344			
<i>Protoperidinium oblongum</i>						5.376			
<i>Protoperidinium obtusum</i>						4.032	4.000		
<i>Protoperidinium. oceanicum</i>						4.032	1.000		
<i>Protoperidinium pyriforme</i>	4.032								
<i>Protoperidinium spp.</i>	36.288	2.000			8.000	26.880	23.000		5.200
<i>Scropsiella trochoidea</i>	1.344								
Otros									
<i>Mirionecta rubra</i>					1.600				600

Total fitoplancton	2.868.068	8.202.140	230.800	4.534.848	7.051.568	4.717.772	1.290.000		5.001.948
% <i>A. catenella</i>		0,02		0,03	0,04	0,08	1,63		0,13



Tabla 27.
Ruta realizada durante el crucero 1, nave Patagón IV.

Localidad	Estación	Fecha	Hora	Latitud S	Longitud W	T °C	Velocidad (nudos)	Flujo exterior-bodega (L/min)
Acantilada	E1	18/ 2/10	13:30	45°24'41,5"	72°52'57,4"		Detenido	55
Acantilada Oeste	E2	18/ 2/10	16:10	45°16'57"	73°12'01"		11,7	55
	B2	18/ 2/10	16:25	45°16'52"	73°13'03"			69
Cinco Hermana	E3	18/ 2/10	17:35	45°16'37"	73°14'21"		12,1	55
	B3	18/ 2/10	17:40	45°17'12"	73°15'23"			69
Canal Pilcomayo	E4	18/ 2/10	18:40	45°14'03"	73°32'38"		11,7	50
	B4	18/ 2/10	18:40	45°10'33"	73°38'01"			78
Canal Moraleda	B5		19:22	45°09'51"	73°38'17"		9	69

Ruta realizada durante el crucero 2, nave Patagón V.

Localidad	Estación	Fecha	Hora	Latitud S	Longitud W	T °C	Velocidad (nudos)	exterior-bodega (L/min)
E. Bonito	E1	22/03/2010	12:00	45° 17,717'	73° 12,644'	11,6	0	94
Cinco Hermanas	E2	22/03/2010	21:07	-45° 18,2'	73° 16,0'	11,7	10,5	110
	B2	22/03/2010	21:14	45° 18,7'	73° 17,8'			
Paso del Medio	E3	22/03/2010	22:10	-45° 23,0'	73° 29,0'	11,6	10,5	60
	B3	22/03/2010	22:20	45° 23,0'	73° 31,2'			
Canal Moraleda	E4	23/03/2010	06:05	44° 07,89'	73° 25,02'	11,6	11,0	51
	B4	23/03/2010	06:15	44° 06,12'	73° 24,95'			
San Pedro	E5	23/03/2010	12:00	43° 17,0'	73° 36,39'	11,6	9,2	58
	B5	23/03/2010	12:10	43° 15,45'	73° 22,4'			



Tabla 28.

Composición fitoplanctónica cuantitativa de las muestras recolectadas en la bodega (B) y en el exterior (E) de la nave Patagón V durante el trayecto de transporte de peces entre el fiordo Aysén y Chiloé (N° células/L) (22-23 marzo 2010).

Estación	E0	E1	E2	B2	E3	B3	E4	B4	E5	B5
Diatomeas										
<i>Asterionella glacialis</i>		14000		6000	11500	9000	225000	72000	200	
<i>Asterionella kariana</i>						12000				
<i>Cerataulina pelagica</i>						1000	1000	1000		
<i>Coscinodiscus centralis</i>			500	5000		1000		2000		
<i>Coscinodiscus radiatus</i>		1500								
<i>Coscinodiscus spp.</i>										
<i>Cylindrotheca closterium</i>	100	3500	500	5000		4000	6000	1000	200	4200
<i>Cerataulina pelagica</i>		3500	7500	12000	8000		62000	45000		600
<i>Chaetoceros affinis</i>										2600
<i>Chaetoceros cinctus</i>					6500	7000				
<i>Chaetoceros compressus</i>		3500			1500	8000	7000			
<i>Chaetoceros constrictus</i>										
<i>Chaetoceros debilis</i>		329000	9332960	140000	723600	255000	293920	57000	1600	
<i>Chaetoceros decipiens</i>		3500	2500					8000		1000
<i>Chaetoceros diadema</i>		9500								
<i>Chaetoceros didymus</i>		3000					2000			
<i>Chaetoceros lorenzianus</i>		6500		3000	6000	2000			500	
<i>Chaetoceros radicans</i>		21000	840000	38000	34500	82000	32000	30000		
<i>Chaetoceros similis</i>		2000	2000				6000			
<i>Chaetoceros socialis</i>						32000	26000			
<i>Chaetoceros teres</i>			1000							
<i>Chaetoceros cf. convolutus</i>						2500				1600
<i>Chaetoceros spp.</i>			1000		5000	1000		1000	300	1000
<i>Corethron pennatum</i>									700	5200
<i>Ditylimum brightwelli</i>		2143680	1189440	50000	1041600	138000	1152400	95000	100	3800
<i>Detonula pumila</i>		1500	1000				4000			
<i>Eucampia cornuta</i>				18000	70500			66000		
<i>Eucampia zodiacus</i>		833000	27909140	8326080	67484480	1239000	2505800	21986300	2800	17400
<i>Fragilaria sp.</i>	43800									
<i>Guinardia delicatula</i>			1000	9000		41000	20000	12000		
<i>Grammatophora marina</i>										
<i>Licmophora sp.</i>										
<i>Melosira moniliformis</i>	500									
<i>Navicula spp.</i>	700									
<i>Paralia sulcata</i>							6000		1700	6000
<i>Pseudonitzschia australis</i>		267500	3084480	87000	37500	69000	1500800	103000		
<i>Pseudonitzschia pseudodelicatissima</i>		500		59000	38000			68000	200	2000
<i>Pseudonitzschia pungens</i>			11000							2000
<i>Pleurosigma directum</i>		1000			5500	1000	5000	2000	400	600
<i>Pleurosigma normanii</i>		500							100	1200
<i>Pleurosigma sp.</i>										
<i>Pleurosigma sp.</i>										
<i>Proboscia alata</i>				1000				3000		
<i>Rhizosolenia imbricata</i>										100
<i>Rhizosolenia pungens</i>			2000	9000	6000		1000	2000	200	
<i>Rhizosolenia setigera</i>			1500			1000	1000	2000		
<i>Skeletonema costatum</i>					87500		25000	24000		
<i>Stephanopyxis turris</i>		1000		2000			5000			
<i>Striatella unipunctata</i>	300									
<i>Surirella sp.</i>		500			500					
<i>Synedropsis spp.</i>										



Continuación Tabla 28.

<i>Thalassiosira delicatula</i>		1000						2000		8800
<i>Thalassiosira cf. rotula</i>				28000		5500		2000	10000	1400
<i>Thalassiosira cf. delicatula</i>										400
<i>Thalasionema. nitzschioides</i>		477000	819840	35000	1102080	201000	77000	25000		1000 6400
<i>Thalassiosira spp.</i>			18000	5000		6000				
<i>Thalasiotrix sp.</i>										
<i>Tropidoneis sp.</i>										
<i>Diatome penada indet..</i>										400
Dinoflagelados										
A.catenella										
<i>Amylax triacantha</i>			3500		4000	2000	2000	4000		
<i>Ceratium fusus</i>			500		2500	1000		1000		
<i>Ceratium lineatum</i>			1000		9500	8000	1000			
<i>Ceratium pentagonum</i>		3000	1500							
<i>Ceratium tripos</i>		2000	500	1000		4000	2000			100
<i>Corythodinium sp</i>							1000	2000		
<i>Dinophysis acuminata</i>			1500		1500	4000	3000			
<i>Dinophysis acuta</i>						2000				
<i>Dinophysis mucronata</i>			2000	1000		3000				
<i>Dinophysis rotundata</i>		2000	5000				1000	1000		
<i>Dinophysis sp</i>						1000				
<i>Diplopsalis sp.</i>										
<i>Gymnodinium sp.</i>								1000		
<i>Gyrodinium sp.</i>		500								
<i>Heterocapasa triquetra</i>										
<i>Karenia spp.</i>		500								
<i>Polykrikos schwartzy</i>					500	1000	1000			
<i>Protoceratium reticulatum</i>						1500				
<i>Protoperidinium cf. leonis</i>					500					
<i>Protoperidinium claudicans</i>			500			1000				200
<i>Protoperidinium conicoides</i>										
<i>Protoperidinium conicum</i>										
<i>Protoperidinium divaricatum</i>										
<i>Protoperidinium excentricum</i>										
<i>Preperidinium meunieri</i>							5000	1000		
<i>Protoperidinium oblongum</i>							2000			
<i>Protoperidinium obtusum</i>		1000	500			1000				
<i>Protoperidinium oceanicum</i>										
<i>Protoperidinium pellucidum</i>		2500				1000	4000	1000		
<i>Protoperidinium pentagonum</i>		1000			2500	500	1000	1000		
<i>Protoperidinium punctulatum</i>				2000	4000	2000				
<i>Protoperidinium pyriforme</i>										
<i>Protoperidinium thulesence</i>			1000							
<i>Protoperidinium cf.granii</i>		1500					1000			
<i>Protoperidinium cf.ovatum</i>					500					
<i>Protoperidinium spp.</i>		4500					2000	4000		
<i>Scropsiella trochoidea</i>					2000					
Otros										
<i>Mirionecta rubra</i>		500		1000			1000	1000		
<i>Dichtyoca fibula</i>		500	500							
<i>Dichtyoca speculum</i>		500	4000	1000	4000	500	1000			
Total fitoplancton	45.500	4.145.680	43.247.360	8.844.080	70.704.260	2.137.500	5.993.920	22.633.300	1.500	66.500
% A. catenella			0,01		0,01	0,09	0,03	0,02		

Tabla 29a.



Composición fitoplanctónica cuantitativa de las muestras recolectadas en diferentes secciones del proceso de de pre y postratamiento de filtración y aplicación de dosis UV en las naves wellboats . Crucero1 Patagón V.

Muestreo 1 cel/L	1 E I			1 E II			1 E III			1 E IV		
	25 µm	100 µm	250 µm	25 µm	100 µm	250 µm	25 µm	100 µm	250 µm	25 µm	100 µm	250 µm
Diatomeas												
<i>Chaetoceros affinis</i>	0	0	0	0	0	0	0	375	0	0	0	0
<i>Chaetoceros compressus</i>	0	0	0	0	338	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros convolutus</i>	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros curvisetus</i>	0	0	0	0	0	125	0	400	0	0	0	0
<i>Chaetoceros debilis</i>	0	0	0	0	163	0	0	113	0	0	213	0
<i>Chaetoceros diadema</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros decipiens</i>	30	0	0	0	500	0	0	1013	0	0	0	0
<i>Chaetoceros didymus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros lacinosus</i>	0	0	0	0	0	0	0	425	0	0	0	0
<i>Chaetoceros lorenzianus</i>	0	0	0	0	0	0	0	250	0	0	0	0
<i>Chaetoceros spp.</i>	103	0	26	125	1050	50	167	1650	38	0	163	0
<i>Coscinodiscus spp.</i>	9	0	0	0	238	0	0	0	13	167	113	0
<i>Cylindrotheca closterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	38	0	0	0
<i>Dactyliosolen fragilissimus</i>	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Detonula pumila</i>	96	109	3	167	0	175	1500	0	513	0	0	50
<i>Ditylum brightwellii</i>	16	0	5	0	63	0	0	113	0	0	0	0
<i>Eucampia sp</i>	0	0	0	0	0	150	0	0	0	1750	438	650
<i>Fragillaria spp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Grammatophora spp.</i>	0	0	0	0	0	0	250	0	0	0	0	0
<i>Gyrosigma spp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lauderia annulata</i>	0	0	0	0	0	88	0	0	0	0	1125	588
<i>Leptocylindrus danicus</i>	22	14	0	458	0	100	0	0	0	0	0	0
<i>Leptocylindrus minimus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Licmophora abbreviata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25
<i>Melosira spp.</i>	0	0	0	0	475	0	0	775	0	0	0	0
<i>Navicula spp.</i>	0	0	0	0	0	0	75	0	0	0	0	0
<i>Odontella sp</i>	84	101	27	167	775	0	75	488	0	0	875	0
<i>Pleurosigma spp.</i>	0	0	0	167	0	0	0	38	25	208	25	13
<i>Pseudo-nitzschia cf. australis</i>	143	51	26	917	8938	388	1450	4913	638	417	15675	3638
<i>P. cf. pseudodelicatissima</i>	0	0	0	0	75	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudo-nitzschia spp.</i>	0	0	0	0	0	188	0	313	0	0	0	0
<i>Rhizosolenia imbricata</i>	0	0	0	0	0	0	0	75	0	0	0	0



Continuación Tabla 29a.

<i>Rhizosolenia pungens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	738
<i>Rhizosolenia setigera</i>	0	0	0	0	0	25	0	0	25	0	0	0
<i>Rhizosolenia striata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0	50	38
<i>Rhizosolenia cf. pungens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhizosolenia spp.</i>	14	0	0	167	38	0	38	88	0	2333	413	50
<i>Skeletonema costatum</i>	0	0	6	792	8213	0	0	8763	1438	0	1325	1338
<i>Stephanopyxis turris</i>	0	0	0	0	238	0	0	125	0	0	238	0
<i>Thalassiosira rotula</i>	71	0	17	125	275	0	0	0	38	0	0	0
<i>Thalassiosira spp.</i>	197	943	243	28325	0	275	42413	988	350	6292	388	438
<i>Diatomeas pennadas indet.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	67833	0	0
Dinoflagelados	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Alexandrium catenella</i>	0	0	0	0	0	0	75	0	0	0	0	0
<i>Alexandrium cf. ostenfeldii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ceratium fusus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ceratium hirundinella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gyrodinium spp.</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Protoperidinium claudicans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0
<i>Protoperidinium punctulatum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Protoperidinium cf. steinii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Protoperidinium spp.</i>	3	14	0	75	38	13	75	0	13	167	0	13
<i>Scrippsiella spp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Dinoflagelados indet.</i>	0	0	2	75	0	0	0	0	0	83	0	0
Zoomastigóforos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ebria tripartita</i>	0	0	0	0	63	0	0	0	0	0	0	0
Ciliados	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Myrionecta rubra</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total fitoplancton	788	1233	362	31558	21525	1575	46117	20900	3150	79250	21088	7575

E I	prefiltro
E II	Postfiltro o prerreactor
E III	Postreactor UV
E IV	relave filtro



Muestreo 2	2 E I			2 E II			2 E III			2 E IV		
	25 µm	100 µm	250 µm	25 µm	100 µm	250 µm	25 µm	100 µm	250 µm	25 µm	100 µm	250 µm
Diatomeas												
<i>Chaetoceros affinis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros compressus</i>	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros convolutus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros curvisetus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros debilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros diadema</i>	0	0	0	0	350	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros decipiens</i>	0	0	0	0	75	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros didymus</i>	0	0	0	0	0	0	0	1113	0	0	0	0
<i>Chaetoceros lacinosus</i>	0	0	0	0	0	325	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros lorenzianus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros spp.</i>	0	36	0	0	775	388	0	863	313	0	0	0
<i>Coscinodiscus spp.</i>	0	7	94	333	0	0	0	50	0	0	125	0
<i>Cylindrotheca closterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Dactyliosolen fragilissimus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Detonula pumila</i>	159	77	7	667	88	125	833	0	0	0	0	513
<i>Ditylum brightwellii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Eucampia sp</i>	587	133	89	5833	1200	1450	250	675	238	4375	163	788
<i>Fragillaria spp.</i>	0	0	0	0	450	0	0	0	0	0	138	0
<i>Grammatophora spp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gyrosigma spp.</i>	0	29	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lauderia annulata</i>	0	0	0	0	438	163	0	0	0	0	0	0
<i>Leptocylindrus danicus</i>	0	19	12	0	50	250	0	0	0	2875	0	425
<i>Leptocylindrus minimus</i>	0	0	0	0	0	0	250	0	0	0	0	0
<i>Licmophora abbreviata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Melosira spp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Navicula spp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Odontella sp</i>	0	0	0	0	25	0	0	38	0	0	113	0
<i>Pleurosigma spp.</i>	0	53	5	125	0	0	0	38	0	1375	163	0
<i>Pseudo-nitzschia cf. australis</i>	80	56	0	0	8150	5213	0	7613	6613	0	175	4388
<i>P. cf. pseudodelicatissima</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudo-nitzschia spp.</i>	0	0	0	792	0	0	0	0	0	0	0	375
<i>Rhizosolenia imbricata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	38	0	0	0
<i>Rhizosolenia pungens</i>	0	0	0	0	0	0	0	88	0	0	0	0
<i>Rhizosolenia setigera</i>	0	0	0	0	113	0	0	113	0	0	0	50
<i>Rhizosolenia striata</i>	0	0	0	0	50	25	0	0	0	0	0	0
<i>Rhizosolenia cf. pungens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhizosolenia spp.</i>	101	60	0	1667	413	113	1000	225	50	2875	563	0



Continuación Tabla 29a.

<i>Skeletonema costatum</i>	0	0	159	0	1025	0	0	1088	538	0	0	675
<i>Stephanopyxis turris</i>	0	0	0	0	38	0	0	0	0	0	0	0
<i>Thalassiosira rotula</i>	94	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	138
<i>Thalassiosira spp.</i>	341	82	75	4000	75	0	2083	713	263	8625	188	275
<i>Diatomeas pennadas indet.</i>	9681	1937	2174	53833	0	0	44500	0	0	125500	5213	0
Dinoflagelados	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Alexandrium catenella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Alexandrium cf. ostenfeldii</i>	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ceratium fusus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0
<i>Ceratium hirundinella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gyrodinium spp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Protoperidinium claudicans</i>	0	5	2	0	25	0	0	0	0	0	38	0
<i>Protoperidinium punctulatum</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Protoperidinium cf. steinii</i>	116	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Protoperidinium spp.</i>	101	53	12	250	0	25	792	13	0	625	0	0
<i>Scrippsiella spp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Dinoflagelados indet.</i>	22	0	2	208	25	0	83	0	0	0	0	0
Zoomastigóforos	0	0	39	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ebria tripartita</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ciliados	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Myrionecta rubra</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total fitoplancton	11290	2565	2676	67708	13463	8075	49791	12625	8050	146250	6900	7625



Tabla 29b.

Composición fitoplanctónica cuantitativa de las muestras recolectadas en diferentes secciones del proceso de de pre y postratamiento de filtración y aplicación de dosis UV en las naves wellboats . Crucero 2 Patagón II.

cel/L	1 E I			1 E II			1 E III			1 E IV		
	25 µm	100 µm	250 µm	25 µm	100 µm	250 µm	25 µm	100 µm	250 µm	25 µm	100 µm	250 µm
Diatomeas												
<i>Chaetoceros affinis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros compressus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros convolutus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros curvisetus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros debilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros diadema</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros decipiens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros didymus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros laciniosus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros lorenzianus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros spp.</i>	0	0	0	38	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Coscinodiscus spp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cylindrotheca closterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Dactyliosolen fragilissimus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Detonula pumila</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ditylum brightwellii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Eucampia sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fragillaria spp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Grammatophora spp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gyrosigma spp.</i>	0	0	0	0	0	13	0	0	0	25	0	0
<i>Lauderia annulata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leptocylindrus danicus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leptocylindrus minimus</i>	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Licmophora abbreviata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Melosira spp.</i>	21	17	90	500	700	663	900	2063	2175	688	1350	8188
<i>Navicula spp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Odontella sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pleurosigma spp.</i>	0	0	2	25	25	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudo-nitzschia cf. australis</i>	0	0	0	75	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. cf. pseudodelicatissima</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudo-nitzschia spp.</i>	0	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhizosolenia imbricata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhizosolenia pungens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhizosolenia setigera</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Continuación Tabla 29b.

Rhizosolenia striata	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rhizosolenia cf. pungens	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rhizosolenia spp.	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0
Skeletonema costatum	0	0	0	0	75	0	0	0	0	0	0	0
Stephanopyxis turris	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0
Thalassiosira rotula	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thalassiosira spp.	0	0	0	0	25	0	0	0	38	63	0	288
Diatomeas pennadas indet.	0	1	0	88	0	0	88	0	88	38	75	2188
Dinoflagelados	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alexandrium catenella	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alexandrium cf. ostenfeldii	0	0	0	0	0	213	0	0	0	0	0	0
Ceratium fusus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ceratium hirundinella	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gyrodinium spp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Protoperidinium claudicans	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Protoperidinium punctulatum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Protoperidinium cf. steinii	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Protoperidinium spp.	0	3	0	0	0	25	0	0	25	63	0	0
Scrippsiella spp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dinoflagelados indet.	11	1	0	0	25	0	50	63	63	138	63	0
Zoomastigóforos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ebria tripartita	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ciliados	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Myrionecta rubra	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25
Total fitoplancton	33	25.2	110.72	750	875	912.5	1038	2125	2388	1013	1488	10688

E I	prefiltro
E II	Postfiltro o prereactor
E III	Postreactor UV
E IV	relave filtro



Tabla 29c.

Resumen composición fitoplanctónica cuantitativa de las muestras recolectadas en diferentes secciones del proceso de de pre y postratamiento de filtración y aplicación de dosis UV en las naves wellboats Patagón V y II.

Patagon V

crucero 1 28/12/2011

Queilen	Muestreo 1 42° 54.4', 73° 30.5'	hora	T °C	UV/%T	Total Fitoplancton		
				mJ / cm ²	25 um	100 um	250 um
1 E I	Prefiltro (bodega x 2')	11.00			788	1233	362
1 E II	Postfiltro (volumen muestra 8L)	11.35	15	122 / 91	31558	21525	1575
1 E III	PostreactorUV (volumen muestra 8L)	11.35			46117	20900	3150
1 E IV	Relave filtro (8L, 45' funcionando)	12.45		114 / 98.7	79250	21088	7575
	Muestreo 2						
Islote Yal	42° 39.3', 73° 39.2'						
2 E I	prefiltro (bodega X 2')	13.00	16	116 / 98.4	173111	39333	40444
2 E II	Postfiltro (volumen muestra 8L)	13.28			67708	13463	8075
2 E III	PostreactorUV (volumen muestra 8L)	13.28			49791	12625	8050
2 E IV	Relave filtro (8l, 30' funcionando)	13.15			146250	6900	7625

% del prefiltro

39	34	20
29	32	20

Patagon II

crucero 2 19/01/2012

Punta Iglesia	41° 41.9', 72° 23.8'	hora	T °C	UV/%T	Total Fitoplancton		
				mJ / cm ²	25 um	100 um	250 um
1 E I	prefiltro (x borda con bomba X 5')	17.42		/ 98	33	25	111
1 E II	Postfiltro (volumen muestra 8L)	17.50			750	875	913
1 E III	PostreactorUV (volumen muestra 8L)	17.50			1038	2125	2388
1 E IV	relave filtro (8l, 30' funcionando)	18.05			1013	1488	10688
1 E II	Postfiltro (réplica)	17.45			750	988	650

A N E X O S

A N E X O 1

Memoria de cálculo del porcentaje de encistamiento.



	Fecha	N° de días entre muestreos	Quistes viables		N° quistes/m ² día (Flujo quistes <i>in situ</i>)	N° Células/m ² (columna de agua integrada) (Cálculo en Tabla 4b)	% encistamiento /cél día (aplicar algoritmo)	Términos algoritmo		
			A. <i>catenella</i> / trampa	N° quistes/m ²				Cy*2	Ce prom	Ce+2Cy
I. Julián										
Instalación	8.4.10					500.000				
	15.4.10	8	130	8442	1055	0	0,837	2110	250000	252110
	24.4.10	9	67	4318	480	500.000	0,382	960	250000	250960
	5.5.10	11	69	4448	404	0	0,322	809	250000	250809
	20.5.10	15	44	2825	188	750.000	0,100	377	375000	375377
Is. Huichas										
Instalación	29.3.10					0				
	7.4.10	8	83	5357	670	0	100	1339	0	1339
	16.4.10	9	317	20552	2284	1.000.000	0,91	4567	500000	504567
	25.4.10	9	60	3896	433	3.000.000	0,043	866	2000000	2000866
	5.5.10	10	80	5195	519	0	0,069	1039	1500000	1501039
	20.5.10	15	7	455	30	6.000.000	0,002	61	3000000	3000061
I. Vergara										
Instalación	29.3.10					0				
	8.4.10	9	27	1721	191	0	100	382	0	382
	16.4.10	8	179	11591	1449	1.500.000	0,38	2898	750000	752898
	25.4.10	9	27	1721	191	0	0,051	382	750000	750382
	5.5.10	10	17	1071	107	0	100	214	0	214
	20.5.10	15	64	4123	275	6.000.000	0,018	550	3000000	3000550

Area trampa (diam. 14 cm)

0,015394 m²

Cy*2 quistes de resistencia multiplicado x 2 debido a que cada quiste de resistencia es producto de dos células vegetativas

Ce prom N° de células vegetativas integradas en la columna de agua

Ce+2Cy N° total de células involucradas en el enquistamiento

A N E X O 2

Presencia de *A. catenella* registrada durante los muestreos experimentales de alta frecuencia en los sitios estudiados.



	I. Julián A-30	I. Julián A-30	I. Julián A-30	I. Julián A-31	Is. Huichas A-31	Is. Huichas A-31	Is. Huichas A-31	Is. Huichas A-32	I. Vergara A-32	I. Vergara A-32	I. Vergara A-32	I. Vergara A-33
Fecha muestreo	8-abr-10	15-abr-10	24-abr-10	5-may-10	7-abr-10	16-abr-10	25-abr-10	5-may-10	8-abr-10	16-abr-10	25-abr-10	5-may-10
<i>Presencia de A. catenella</i>	1	1	1			1	1			1		

A N E X O 3

Ensamble de quistes de resistencia registrados en los sedimentos provenientes de los tres sitios de estudio durante los muestreos de baja frecuencia.



Sedimentos

I. Julian (A-30)
nº quistes /cm³

Especie	IV etapa			
	05-09-10	11-10-10	11-11-10	10-12-10
	VI C	VII C	VIII C	IX C
<i>Alexandrium catenella</i> lleno	181	360	10	30
<i>Alexandrium catenella</i> vacío	46			
<i>Protoceratium reticulatum</i> lleno	55	16	10	23
<i>Protoceratium reticulatum</i> vacío	321	357	373	112
<i>Protoperidinium conicum</i> lleno	31	36		16
<i>Protoperidinium conicum</i> vacío	94	62	42	17
<i>Protoperidinium claudicans</i>				
<i>Protoperidinium avellanaum</i>				3
<i>Protoperidinium oblongum</i>	24	10		7
<i>Protoperidinium americanum</i>	2			
<i>Protoperidinium minutum</i>	61	26	13	
<i>Protoperidinium excentricum</i>	33	16		10
<i>Protoperidinium leonis</i>				
<i>Protoperidinium cf. leonis</i>		13		
<i>Protoperidinium denticulatum</i>				
<i>Protoperidinium cf. denticulatum</i>				
<i>Protoperidinium subinermis</i>				
<i>Protoperidinium cf. punctulatum</i>				
<i>Protoperidinium spp.</i>	52	30	7	16
<i>Lingulodinium polyedrum</i>	7			3
<i>Preperidinium meunieri</i>	24	20		10
<i>Polykrikos schwartzii</i>	22	13	7	7
<i>Polykrikos kofoidii</i>				
<i>Pentapharsodinium daleii</i>	4	3		
<i>Scrippsiella sp.</i>				
<i>Scrippsiella patagonica</i>			7	
<i>Alexandrium ostenfeldii</i>				
<i>Protoperidinium conicoide</i>				3
<i>cf. Oblea acanthocysta</i>			10	
<i>Protoperidinium pentagonum</i>				3
Quiste no identificado A				
<i>Protoperidinium sp. 5</i>				
<i>Gonyaulax sp.</i>				

I. Huichas (A-31)
nº quistes /cm³

Especie	IV etapa			
	05-09-10	11-10-10	11-11-10	10-12-10
	VI C	VII C	VIII C	IX C
	188	79	7	16
	7	3		
	4	3477		
	2602	203	440	758
	7			7
	100		13	23
		10		13
		16		
		3		
		30		
	28	39		
				10
	11		10	10
	9	17	3	10
		23	3	
		7		
	2			

I. Vergara (A-32)
nº quistes /cm³

Especie	IV etapa			
	05-09-10	11-10-10	11-11-10	10-12-10
	VI C	VII C	VIII C	IX C
	13	33		7
	11			
	263	269	69	173
	7	13		7
	35	52		49
		7		
		7		7
	4	13		
		7		
	13	29		10
	9	23		
		3		
	9		13	10
	4			10
	7	13		10
	4			
				20
				3

A N E X O 4

Variables oceanográficas y meteorológicas registradas
durante los muestreos de alta frecuencia.



I. Juli3n A30

Temperatura °C				
Cruceros	8-abr-10	15-abr-10	24-abr-10	5-may-10
Prof (m)				
0	12,2	12,0	11,2	10,8
5	12,2	11,7	11,1	10,8
10	11,2	11,5	11,1	10,9
20	10,9	11,1	11,1	10,9

Salinidad (psu)				
Cruceros	8-abr-10	15-abr-10	24-abr-10	5-may-10
Prof (m)				
0	28,0	28,4	28,3	26,8
5	28,3	29,3	28,8	26,9
10	29,3	30,5	29,4	28,3
20	31,3	32,2	30,3	30,2

Sigma-t (kg·m ⁻³)				
Cruceros	8-abr-10	15-abr-10	24-abr-10	5-may-10
Prof (m)				
0	21,1	21,5	21,5	20,4
5	21,4	22,3	22,0	20,5
10	22,2	23,2	22,5	21,6
20	24,0	24,7	23,2	23,2

Oxígeno (mg/l)				
Cruceros	8-abr-10	15-abr-10	24-abr-10	5-may-10
Prof (m)				
0	9,6	9,8	9,6	7,6
5	9,8	10,2	10,4	8,5
10	9,7	8,9	9,6	8,6
20	7,4	7,6	7,3	8,3

Is. Huichas A31

Temperatura °C				
Cruceros	7-abr-10	16-abr-10	25-abr-10	5-may-10
Prof (m)				
0	12,9	11,9	10,9	10,8
5	12,2	12,0	11,0	10,8
10	11,5	11,8	10,9	10,9
20	10,9	11,4	10,5	10,9

Salinidad (psu)				
Cruceros	7-abr-10	16-abr-10	25-abr-10	5-may-10
Prof (m)				
0	27,4	28,1	25,8	26,9
5	28,1	28,8	26,9	27,0
10	29,4	29,6	29,5	28,0
20	31,2	31,2	31,5	29,5

Sigma-t (kg·m ⁻³)				
Cruceros	7-abr-10	16-abr-10	25-abr-10	5-may-10
Prof (m)				
0	20,5	21,3	19,6	20,5
5	21,2	21,8	20,5	20,6
10	22,4	22,5	22,5	21,4
20	23,9	23,9	24,2	22,6

Oxígeno (mg/l)				
Cruceros	7-abr-10	16-abr-10	25-abr-10	5-may-10
Prof (m)				
0	7,3	9,4	9,2	7,1
5	9,6	9,9	9,1	8,9
10	10,0	9,8	9,4	8,8
20	7,9	8,5	6,3	8,4

I. Vergara A32

Temperatura °C				
Cruceros	8-abr-10	16-abr-10	25-abr-10	5-may-10
Prof (m)				
0	12,5	11,8	11,1	10,8
5	12,4	11,8	11,1	10,8
10	12,2	11,7	11,0	10,9
20	11,0	11,3	10,7	10,9

Salinidad (psu)				
Cruceros	8-abr-10	16-abr-10	25-abr-10	5-may-10
Prof (m)				
0	27,5	28,4	27,1	27,2
5	27,9	28,9	28,4	28,3
10	28,1	29,6	29,3	28,9
20	30,8	31,6	30,7	29,5

Sigma-t (kg·m ⁻³)				
Cruceros	8-abr-10	16-abr-10	25-abr-10	5-may-10
Prof (m)				
0	20,7	21,5	20,6	20,7
5	21,1	21,9	21,7	21,6
10	21,3	22,5	22,4	22,1
20	23,6	24,2	23,6	22,6

Oxígeno (mg/l)				
Cruceros	8-abr-10	16-abr-10	25-abr-10	5-may-10
Prof (m)				
0	7,7	9,9	9,3	7,8
5	11,2	10,4	9,4	8,6
10	11,3	10,5	8,6	8,3
20	7,8	9,1	6,8	7,7

A N E X O 5

Resolución 1882/08: Medidas para el manejo de residuos sólidos y líquidos aplicables en centros de matanza en tierra y plantas de proceso que reciben salmónidos de centros de cultivo de áreas cuarentenadas por virus ISA.



DO

Servicio Nacional de Pesca

ESTABLECE MEDIDAS DE MANEJO DE RESIDUOS SÓLIDOS Y LÍQUIDOS APLICABLES EN CENTROS DE MATANZA EN TIERRA Y PLANTAS DE PROCESO QUE RECIBEN SALMÓNIDOS DE CENTROS DE CULTIVO COMPRENDIDOS EN ÁREAS CUARENTENADAS POR VIRUS ISA. (Resolución)

Núm. 1.882.- Valparaíso, 18 de julio de 2008.- Visto: Lo dispuesto en el D.F.L. N°5, de 1983 y sus modificaciones; el D.S. N°430 de 1991, que fija el texto refundido, coordinado y sistematizado de la Ley N°18.892 y sus modificaciones, Ley General de Pesca y Acuicultura; el D.S. N°319 de 2001, del Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, que aprueba el Reglamento de Medidas de Protección, Control y Erradicación de Enfermedades de Alto Riesgo para las Especies Hidrobiológicas, todos del Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción; la Resolución N°776, de 2008, del Servicio Nacional de Pesca, que dispone medidas de control de la Anemia Infecciosa del Salmón (ISA); lo informado por la Comisión Nacional del Medio Ambiente mediante OF. ORD. D.E. N°81585, de 16 de mayo de 2008; y lo dispuesto en la Resolución N°520 de 1996, de la Contraloría General de la República.

Considerando:

Que ante la presencia del virus de la Anemia Infecciosa del Salmón (ISA), se han dispuesto medidas de control a objeto de evitar la diseminación de la enfermedad hacia otras zonas.

Que los residuos sólidos y residuos líquidos provenientes de la matanza o proceso de transformación desarrollado en plantas que maten o procesen peces originados en centros ubicados en áreas afectadas por el virus ISA, pueden ser un serio factor de riesgo en la diseminación de la enfermedad, el que debe ser abordado con urgencia.

Que dentro de las medidas a adoptar se encuentra el establecimiento de medidas de bioseguridad para el tratamiento y disposición de los señalados residuos que aseguren la eliminación de los agentes infecciosos.

Que los procedimientos urgentes que se establecen en la presente resolución deben ser complementados con otros procedimientos de bioseguridad al interior de las plantas de proceso tendientes a impedir la contaminación cruzada y diseminación del virus ISA.

Resuelvo:

Artículo Primero: Apruébase la siguiente norma técnica para plantas de matanza y proceso de especies salmónidas que reciban peces o materia prima originada en centros de cultivo ubicados en áreas cuarentenadas o infectadas por el virus ISA

1. TRATAMIENTO DE RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS

Los residuos sólidos orgánicos generados por las plantas de matanza o de proceso de salmónidos provenientes de zonas de cuarentena del virus ISA deben seguir los siguientes procedimientos, según el destino de los mismos:

1.1. Residuos Sólidos Orgánicos destinados a plantas reductoras para elaboración de Harina o Aceite de Pescado.

Los residuos sólidos orgánicos que se destinen a una planta reductora para ser transformados en harina o aceite de pescado, deben ser objeto de las siguientes medidas:

1.1.1. Deben acopiarse en compartimentos cerrados o estancos, de forma que no exista escurrimientos de líquidos y/o sólidos al exterior.

1.1.2. Aquellos contenedores que cumplan la doble función de acopio y depósito para el transporte de los residuos sólidos hacia la planta reductora, como es el caso de los bins, deberán operarse de la siguiente forma:

a.- Ser protegidos internamente con una bolsa plástica, con fuelle del tamaño del contenedor con un grosor mínimo de 90 micrones,

b.- Deben ser llenados como máximo hasta el 70% de su capacidad,

c.- Una vez cerrados y previo a su despacho, deben ser sometidos a una desinfección por aspersión.

1.1.3. Las tolvas utilizadas para el acopio de residuos orgánicos deben ser lavadas y desinfectadas, al menos, una vez a la semana.

1.1.4. Los camiones cisternas o tolvas que trasladen residuos deberán ser estancos o cerrados, de tal forma que impidan el escurrimiento de líquidos y/o sólidos hacia el exterior.

1.1.5. Las ruedas de los camiones que transporten los residuos sólidos a una planta reductora, deberán ser desinfectadas por aspersión, previo a su salida desde la planta de proceso o de matanza.

1.1.6. Se debe llevar un registro del manejo de los residuos sólidos orgánicos, para seguir su trazabilidad y éste debe estar disponible para las inspecciones de las autoridades competentes, el cual deberá contener, al menos, lugar de destino de los residuos, la cantidad de residuos trasladados, fecha de salida y patente del camión.

1.1.7. Todo camión o contenedor que ingrese a las plantas de proceso o de matanza para el transporte o acopio de residuos orgánicos sólidos, deberá acreditar mediante un certificado de desinfección, que ha



sido previamente lavado y desinfectado. Éstos deben consignar, al menos, la patente del camión, la fecha y hora de desinfección, los productos usados en ese proceso y su responsable y deben estar disponibles para la verificación del Sernapesca.

1.2. Residuos Sólidos Orgánicos destinados a Instalaciones para su Disposición Final

En el manejo de los residuos sólidos orgánicos que se entreguen o destinen a una instalación para la disposición final de residuos, sin perjuicio de otras medidas o autorizaciones que corresponda, deben cumplirse las siguientes medidas:

1.2.1. Ensilar los residuos orgánicos sólidos en contenedores cerrados y estancos, para lo cual deberá agregarse ácido fórmico o ácido acético a los residuos sólidos, hasta que éstos adquieran un pH homogéneo menor a 4.

1.2.2. Los residuos sólidos obtenidos del proceso de deshidratación de lodos deben ser estabilizados con cal antes de su entrega a instalaciones para su disposición final.

1.2.3. Los contenedores destinados al depósito de residuos sólidos se deben llenar, como máximo, a un 70% de su capacidad.

1.2.4. Debe llevarse una bitácora del llenado de los contenedores destinados al depósito de residuos orgánicos sólidos, en la que se registre el período de llenado de cada contenedor.

1.2.5. Una vez cerrado el contenedor, éste debe ser desinfectado externamente.

1.2.6. Las ruedas de todo medio de transporte que salga de la planta o ingrese a ella deberán ser desinfectadas.

1.2.7. Todo camión o contenedor que ingrese a las plantas de proceso o de matanza para el transporte o acopio de residuos orgánicos sólidos, deberá acreditar que ha sido previamente lavado y desinfectado, mediante certificados que deben consignar, al menos, la patente del camión, la fecha y hora de desinfección, los productos usados en ese proceso y su responsable y deben estar disponibles para la verificación del Sernapesca.

1.2.8. Se debe llevar un registro del manejo de los residuos sólidos orgánicos, para seguir su trazabilidad y éste debe estar disponible para las inspecciones de las autoridades competentes.

1.3. Recintos para Lavado y Desinfección

Los procedimientos de lavado y desinfección establecidos en los puntos 1.1 y 1.2 precedentes deben realizarse en un recinto específico para tal efecto y los residuos sólidos y líquidos que de éstos se generen, deben ser manejados y canalizados adecuadamente y cumplir la normativa vigente.

1.4. Procedimientos de limpieza y desinfección

Los procesos de lavado y desinfección previstos en las disposiciones precedentes deberán efectuarse cumpliendo los procedimientos y condiciones establecidos por el Servicio en el Programa Sanitario General de Limpieza y Desinfección o aquellos a que se refiera en el Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de la Anemia Infecciosa del Salmón.

2. DESINFECCIÓN DE LOS RESIDUOS LÍQUIDOS

2.1. Métodos de desinfección

Las plantas de matanza o proceso que faenen salmónidos provenientes de áreas cuarentenadas por el virus ISA, deberán, previo a la descarga de sus residuos líquidos tratados, someterlos a alguna de las alternativas de desinfección que se establecen a continuación:

2.1.1. Dióxido de Cloro:

2.1.1.1. Este método de desinfección sólo podrá ser aplicado a los residuos líquidos tratados que evidencien una concentración de Sólidos Suspendedos Totales inferior a 200 mg/L. No obstante, si se trata de residuos para los cuales el D.S. N° 90/2000 (MINSEGPRES), establezca una concentración máxima de Sólidos Suspendedos Totales inferior a la antes señalada, deberá cumplirse la establecida en el aludido decreto.

Este parámetro debe ser medido mensualmente

2.1.1.2. Para desinfectar los residuos líquidos tratados, éstos deben recibir una concentración referencial de Dióxido de Cloro de 100 mg/L con un tiempo de retención de 5 minutos.

2.1.1.3. Con todo, el dióxido de cloro residual deberá ser de, al menos, 0,8 mg/L, medidos después del tiempo de exposición previsto en el numeral 2.1.1.2. precedente.

2.1.2. Cloración:

2.1.2.1. La adición de Cloro debe ser de una dosis tal que, luego de un período de retención de 25 minutos, sea posible evidenciar una concentración de cloro residual de 5 mg/L. Esta condición deberá ser monitoreada y registrada, al menos, 2 veces al día.

2.1.2.2. El tratamiento con Cloro, requerirá, necesariamente, la decloración o neutralización con Tiosulfato de Sodio u otros neutralizadores, hasta lograr eliminar el cloro libre en la descarga de residuos líquidos, cuyo máximo permitido será de 2 mg/L.

2.1.2.3. Los residuos líquidos desinfectados deberán ser monitoreados mensualmente para tetracloroetano y triclorometano cuyos máximos permisibles serán 0,4 mg/L y 0,5 mg/L, respectivamente.

2.1.2.4. Con todo, dentro del plazo al que se refiere el artículo tercero de la presente resolución, toda planta de proceso o matanza que utilice cloro como desinfectante, deberá efectuar análisis de la Demanda de Cloro en los residuos líquidos tratados previo a la desinfección, un día a la semana, durante 3 semanas, con una muestra compuesta obtenida durante los horarios de operación de la planta.

Asimismo, durante el mismo período deberá realizarse un análisis semanal de Sólidos Suspendedos Totales y Demanda Química de Oxígeno (DQO).

2.1.3. Ozono:



La utilización de este método requiere una incorporación de ozono en una dosis tal, que luego de un período de retención de 3 minutos, el ozono residual en los residuos líquidos en plantas que utilizan agua dulce o bien el oxidante residual total (TRO) en los residuos líquidos de plantas con altos contenidos de agua marina sea de, al menos, **0.3 mg/L**. Este nivel residual debe ser monitoreado, al menos, 2 veces al día.

2.1.4. Tratamiento con luz U.V.:

2.1.4.1. Para optar por este método de desinfección se requiere una transmitancia, en los residuos líquidos tratados, de 60% o superior y un contenido máximo de Sólidos Suspendidos Totales de 25 mg/L, parámetros que deberán ser monitoreados diariamente.

2.1.4.2. La dosis a aplicar debe ser entre **125 a 200 mJ/cm2/seg.**

2.1.4.3. Respecto del uso de este tipo desinfección, deberá considerarse como horas de vida útil de las lámparas UV, el 90% del tiempo máximo indicado por el fabricante. Después de ese tiempo estas lámparas deben ser cambiadas.

2.1.4.4. Se debe llevar un registro de horometría de las lámparas U.V.

2.2 Métodos de Determinación

2.2.1. Para la determinaciones de Sólidos Suspendidos Totales y Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO5), tetracloroetano y triclorometano deberán emplearse los métodos establecidos en el D.S. N°90 de 2000, del Ministerio Secretaría General de la Presidencia.

2.2.2. El monitoreo del cloro residual deberá realizarse con el método tritrimétrico DPD ferroso, según Standards Methods, edición 21, Sección 4500-CI F.

2.2.3. El monitoreo de Demanda de Cloro deberá efectuarse según lo descrito en Standards Methods, edición 21 de 2005, sección 2350-B, con DPD /FAS.

2.2.4. Monitoreo de DQO deberá efectuarse según el método calorimétrico de digestión cerrada descrito en Standards Methods, edición 21 de 2005, sección 5220-D.

2.2.5. El monitoreo del dióxido de cloro residual deberá realizarse con el método DPD, según Standards Methods, ediciones 19 o 20, Sección 4500-CIO2 D.

2.2.6. El Monitoreo del oxidante residual total (TRO) en residuos líquidos desinfectados de agua marina ozonizada debe realizarse con el método DPD colorimétrico, según Standards Methods, edición 21, Sección 4500-CI G.

2.2.7. El Monitoreo del ozono residual en residuos líquidos desinfectados de agua dulce ozonizada debe realizarse con el método Indigo colorimétrico, según Standards Methods, edición 21, Sección 4500-O3 B.

2.3. Otras consideraciones respecto de la desinfección de efluentes, su aprobación y control

2.3.1. Para la aprobación del sistema de desinfección de sus residuos líquidos tratados, las plantas de proceso o de matanza deberán presentar los documentos que acrediten lo siguiente:

a.- Identificación de la planta e instalaciones, con nombre de la empresa, dirección, tipo de procesos que realiza y responsables.

b.- Sistemas de acopio y retiro de residuos orgánicos sólidos.

c.- El tratamiento que aplica a sus residuos sólidos y líquidos con descripción detallada de sus etapas.

d.- Volumen promedio y máximo de descarga de los residuos líquidos.

e.- El mecanismo de desinfección que aplicará, de acuerdo a lo dispuesto en el punto 2.1 de esta resolución.

f.- Croquis con las etapas del tratamiento que se aplica al ril y su desinfección.

g.- Los considerandos químicos y físicos en los cuales se fundamenta la viabilidad de la desinfección a aplicar en los residuos líquidos tratados.

h.- Informes de laboratorio de los últimos 6 meses que caractericen los residuos líquidos tratados.

i.- Informes de laboratorio de caracterización completa de sus residuos líquidos tratados, de acuerdo a su clasificación, en un período de pleno funcionamiento, no mayor a 30 días, el cual deberá considerar, independientemente del cuerpo de agua de descarga, DBO5 y SST.

2.3.2 El Servicio sólo aprobará aquellos establecimientos que, previa evaluación de los antecedentes presentados conforme al numeral anterior y su verificación en terreno, hayan acreditado el cumplimiento de lo dispuesto en la presente resolución.

2.3.3 Las plantas de proceso y de matanza deben realizar autocontroles a sus residuos líquidos de proceso de acuerdo al caudal de éstos y a la frecuencia de monitoreo indicada en el D.S. N°609/1998 (MOP) o el D.S. N° 90/2000 (MINSEGPRES), según corresponda, los cuales, respecto de los parámetros de interés para esta norma, deben estar disponibles para las inspecciones rutinarias de Sernapesca.

Artículo Segundo: Las plantas de proceso o de matanza deberán llevar un registro del proceso de desinfección de los residuos líquidos tratados, con medición de dosis y niveles residuales, conforme al método de desinfección aplicado y éste debe estar disponible para las inspecciones rutinarias de Sernapesca.

Artículo Tercero: La aplicación de cloro como método de desinfección conforme a la presente resolución, regirá por el plazo de tres meses contado desde su publicación, al término del cual deberá ser objeto de reevaluación en cuanto a su eficacia y efectos. Lo anterior, sin perjuicio de la eventual revisión de los demás métodos de tratamiento que se autorizan.

Artículo Cuarto: Lo dispuesto en la presente resolución se aplicará sin perjuicio de los requerimientos establecidos por otras autoridades competentes.

Artículo Quinto: El incumplimiento de las medidas establecidas en la presente resolución, será sancionado con arreglo a lo dispuesto en los Títulos IX y X de la Ley General de Pesca y Acuicultura, en



relación al artículo 77 del D.S. N°319 de 2001 del Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción.
Anótese, comuníquese y publíquese.- Félix Inostroza Cortés, Director Nacional de Pesca.

[Volver Tamaño de Fuente](#)

A N E X O 6

Protocolo de limpieza y desinfección
de Patagonia Wellboats.



MANUAL
DE
LIMPIEZA Y DESINFECCION
PATAGONIA WELLBOAT

VERSION 01
Marzo 2008



I.-INTRODUCCION

La creación del Manual de limpieza y desinfección para naves de la compañía, da cumplimiento a la(s) normativa(s) dada(s) a conocer por el Servicio Nacional de Pesca.

En el presente documento se dan a conocer las pautas a seguir para la realización de inspección, lavado y desinfección del Wellboat, según las normas preestablecida en PW. Siendo el Técnico de traslados y el Capitán de la nave responsables de la correcta aplicación de estos procedimientos.

II.-OBJETIVOS

Dar cumplimientos a los requisitos sanitarios aplicables al transporte marítimo tendiente a prevenir la diseminación de agentes patógenos.

III.-ALCANCE

Las medidas de limpieza y desinfección que se establecen en el presente manual se aplicará a todas las naves de Patagonia Wellboat, materiales, implementos, equipos, vestuario y personal que aborde las naves de la compañía.

IV.-DEFINICIONES

El Manual de Limpieza y Desinfección tiene como objetivo prevenir la transmisión y diseminación de agentes patógenos a través de vectores o fomites, ya sea al interior del centro, desde hacia otros centros de cultivo, o al medio ambiente.

1. **Acciones correctivas:** El o los procedimientos a seguir cuando existe una disconformidad entre el resultado esperado de una actividad y/o desinfección y lo efectivamente constatado.
2. **Contaminación cruzada:** Transmisión de elementos contaminantes de una superficie a otra.
3. **Circulación de Agua:** Acción de ingresar agua desde una fuente natural (río, lago, mar) a los estanques que contienen los peces vivos y cuyo rebalse regresa nuevamente a la fuente natural. Se definirá como Circulación, cuando la tasa de recambio sea igual o superior a dos cambios/hora y se realice en forma continua durante el transporte
4. **Declaración de Garantía:** Documento que se debe emitir el centro de cultivo por cada lote de pescados que ingresa a planta de proceso, y a través del cual se acredita que la materia prima destinada a proceso no



contiene residuos de Productos Farmacéuticos que superen los límites Máximos Residuales exigidos por los mercados de destino y no contiene contaminantes (ver programa de Control de Fármacos del Sernapesca, Manual de Procedimientos, Sección 1 Programa de Control de Residuos FAR/mp1)

5. **Desinfección:** Designa la aplicación, después de una limpieza completa, de procedimientos destinados a eliminar, destruir, inactivar o disminuir los agentes infecciosos o parasitarios responsables de enfermedades de los animales acuáticos.
6. **Desinfectantes:** Designa las sustancias químicas o procedimientos físicos capaces de destruir los microorganismos patógenos o evitar su desarrollo o crecimiento en diversas estructuras, superficies y organismos vivos.
7. **Centro de Cultivo:** Lugar e infraestructura donde se efectúan actividades de cultivo.
8. **Detergente:** Sustancia que limpia un objeto sin corroerlo. Ayuda a la remoción de partículas reduciendo el tiempo de limpieza y consumo de agua.
9. **Fomites:** Transmisores inanimados de una infección.
10. **Infraestructura:** Bienes muebles e inmuebles que componen un centro de cultivo, tales como, estanques, salas, balsas-jaulas, casetas flotantes, muelles, embarcaciones, redes, entre otras.
11. **Implementos:** Todo elemento utilizado en el cultivo de especies hidrobiológicas, tales como quechas, paletas de alimentación, coladores, elementos de aseo, entre otros.
12. **Limpieza y lavado:** Remoción mecánica de todo resto de material orgánico particulado, materia grasa y en general, de cualquier material adherido a una superficie de equipos, implementos e infraestructura, para lo cual se usa agua y detergentes.
13. **Lote:** Grupo de peces que provienen del mismo centro de cultivo, pertenecen a la misma especie y a la misma generación.
14. **Maniluvios:** Recipientes utilizados para contener compuestos químicos destinados a desinfectar manos.
15. **Monitoreo:** Realización de pruebas programadas u observaciones, que son registradas por el centro y que tienen por objeto constatar el cumplimiento de los procedimientos de limpieza y desinfección preestablecidos y los resultados esperados.
16. **Pediluvio:** Depósito que contiene una solución desinfectante que permite sanitizar el calzado de las personas. También puede cumplir esta función un material esponjoso embebido en suficiente desinfectante.
17. **Recirculación de agua:** Acción de hacer ingresar y salir el agua en los estanques, sin incorporar agua desde el medio natural y sin eliminar agua al medio.
18. **Renovación de agua:** Acción de ingresar agua desde una fuente natural (río, lago, laguna, vertiente, mar) a los estanques que contienen los peces vivos y cuyo rebalse regresa nuevamente a la fuente natural. Se



definirá como Renovación ,cuando la tasa de recambio sea inferior a dos cambios/hora y esta se realice en forma intermitente durante el transporte

19. **Redes:** Malla utilizada para contener y/o proteger a las especies en cautiverio.
20. **Sistema Siva:** Sistema de Visación documental de la acuicultura, que permite acreditar el origen de recursos hidrobiológicos provenientes de centro de acuicultura y productos derivados de ellos.
21. **Vector:** Organismo vivo que pone en comunicación a un agente infeccioso con un animal susceptible.
22. **Vestuario:** Conjunto de indumentaria utilizada por el personal que labora en un centro de cultivo (barco) y por las visitas, que incluye, entre otros, buzo, ropa de agua, guantes, chalecos salvavidas, y gorros.
23. **Visación:** Procedimiento mediante el cual se valida el contenido de un documento que acredita la procedencia de los recurso hidrobiológicos o productos derivados de estos.
24. **Zonificación:** Delimitación de zonas geográficas o hidrobiológicas en función de la presencia o ausencia de enfermedades de alto riesgo y/o de su agente causal.

V.-RESPONSABLES

- **CAPITAN:** Será responsable de controlar el cumplimiento de este procedimiento y gestionar los medios necesarios para su cumplimiento.
- **TRIPULANTES:** Serán responsables de cumplir este procedimiento, son los trabajadores que realizan el procedimiento de Limpieza y desinfección y la manipulación de los productos químicos implicados.
- **TECNICO DE PECES:** Será responsable de difundir a la tripulación los procedimientos aplicables y controlar el cumplimiento de este por los tripulantes que realicen el procedimiento de Limpieza y desinfección.

VI.-REFERENCIAS

- Resolución 64 PSG Transporte
- Resolución 72 PSG Limpieza y Desinfección



VII.-PROCEDIMIENTO

1. Preparaci3n del Personal

El personal debe estar debidamente capacitado para realizar un trabajo tan delicado y de tanta importancia, para lo cual se realizan charlas a bordo para la capacitaci3n de las labores de desinfecci3n. Para realizar este trabajo deben contar con traje de agua impermeable, protecci3n respiratoria (seg3n corresponda), botas de goma y guantes de P.V.C.



Imagen 01. Personal encargado de la faena de lavado y desinfecci3n

2. Inspecci3n de Bodegas

Una vez terminada la faena de descarga se procede a la abertura de escotillas de ingreso a bodegas, con la finalidad de realizar una inspecci3n visual y extracci3n de posibles residuos de materia org3nica (algas, restos de peces (sardinas, pejerrey, etc.). Estos residuos deben ser retirados de forma manual antes de proceder con el lavado.



3. Lavado y Limpieza profunda

El lavado se realiza con agua a presi3n (manguera de incendio) y se continua mediante el uso de la hidrolavadora (permite la regulaci3n de temperatura del agua y de porcentaje de mezcla de qu3micos), tendiente a la remoci3n de suciedad y material particulado.

El procedimiento de limpieza y desinfecci3n comienza en el exterior al puente de gobierno, cubierta principal, escaleras, barandas, equipos de selecci3n y apoyo (quechas, pesos, mangueras de carga-descarga, contadores. Luego se realiza al interior de bodegas, aplica a las paredes, interior de mamparos y elementos que est3n ubicados en su interior (difusores, c3maras, rejillas, sensores, etc.), por un periodo que bordea los 25-35 minutos por bodega.



Imagen 02. Hidrolavadora (ejemplo)

4. Aplicaci3n de Detergente

La aplicaci3n de detergente cuyo objetivo es la eliminaci3n de grasas y aceites, su caracter3stica principal es: clorado, no formador de espuma, biodegradable.

Detergente usado: TONALIM; Dosificaci3n: diluci3n 1/100 . Asegurando m3nimo de 200 ppm de cloro.



5. Lavado

Se realiza lavado de todas las superficies con agua dulce / salada a presi3n mediante hidrolavadora o pist3n (red de incendio).

6. Aplicaci3n de Desinfectante

a) Una vez terminado el lavado se procede a la realizaci3n de la Desinfecci3n, en la cual se utiliza Di3xido de cloro estabilizado (CLORODOS), siendo ocupado en los mismos lugares del punto anterior. La duraci3n de 3sta aplicaci3n es de alrededor de 15 minutos por bodega, dejando una capa de l3quido actuar durante un per3odo de 25 minutos. Dosificaci3n 1:100, **asegurando un m3nimo 200 ppm de cloro.** Tambi3n se puede utilizar para la desinfecci3n DUPLALIM, agente biodegradable vir3cida, fung3cida y bacter3cida. Dosificaci3n: diluci3n 1/200. Envase debidamente rotulado.



Imagen 03. Lavado interno de bodegas.

b) Desinfecci3n por Ozonificaci3n (Patagones III,IV,V,y VI)

En la eventualidad de realizar traslados de peces para cosecha desde centros ubicados en **Zonas de Cuarentena**, se realizar3 desinfecci3n por ozono luego de la descarga en el centro de acopio.

Realizado el procedimiento de limpieza y desinfecci3n por medios mec3nicos mencionados anteriormente, se procede a la inundaci3n de bodegas hasta su rebalse, desalojando posible material particulado que pudiese quedar en las tuber3as y mangueras de carga-descarga. Luego



se deben dejar en funcionamiento las bombas principales, de modo que se realice circulaci3n interna ("sentido proa a popa"), iniciando la inyecci3n de **OZONO (O₃)** hasta lograr una **concentraci3n m3nima residual de 0,5 mg/lit** 3 alrededor de 700 milivolts (ORP), llegando a esta cifra se da un tiempo de permanencia de al menos de 5 minutos, tiempo en el cual se procede a circular agua por todo el circuito o . Luego, se inunda nuevamente con la finalidad de que el Ozono disuelto en bodegas sea desalojado por las mangueras, logrando la desinfecci3n de 3stas.



Imagen 05. Puesta en servicio Planta Ozonificadora

7.-Lavado Final

Acabado el paso anterior se procede a la abertura de v3lvulas y compuertas, en navegaci3n, realizando circulaci3n abierta eliminando posibles residuos en el agua al interior de bodegas.



Imagen 04. Lavado de cubierta principal de la nave.



8.-Monitoreo de la Actividad

Durante cada desinfección se realizará la medición de cloro libre residual, para lo cual se utilizara un kit de determinación de cloro para el caso del detergente Tonalim y otro kit para la verificar la presencia de Dióxido de Cloro.

El registro incluirá:

- Fecha
- Hora
- Ppm cloro detergente
- Ppm Dióxido de cloro desinfectante
- Observaciones/No cumplimientos
- Acción correctiva.

9.-Registro de la Actividad

Terminado el proceso de Inspección, Lavado y Desinfección se procede al llenado de certificados necesarios para el cumplimiento de las normas establecidas. En PW se completan los siguientes informes y carpetas de registro:

- **Carpeta de Registro de Desinfección:** En ella se deben registrar los siguientes datos:
 - Fecha
 - Cliente
 - Hora de inicio y término
 - Folio del certificado de desinfección
 - Etapas de la realización de desinfección
 - Uso de químicos(CLORODOS, DUPLALIM, OZONO)
 - Técnico responsable de la actividad con su respectiva firma.
 - Observaciones y no conformidades que se pudiesen presentar.
 - Acción correctiva realizada.
- **Registro de Recambio de Pediluvio-Maniluvio:** En ella se debe registrar la frecuencia (mínimo 2 veces al día) registrando los siguientes datos:
 - Fecha
 - Hora
 - Etapa del Proceso del recambio (Carga – Descarga)
 - Concentración utilizada
 - Químicos usados (Yodigen, DUPLALIM, otros)
 - Firma del personal que hizo el recambio
 - Firma del Capitán de la Nave.



Imagen 07. Carpeta de Registro de Desinfección.

- **Carpeta de Inspección, Lavado y Desinfección:** En esta carpeta se anota la fecha, hora y personal responsable de la inspección, lavado y desinfección de cada bodega (en este caso; Tripulación General de Cubierta), así como también su firma y posibles observaciones.



Imagen 08. Carpeta de Inspección, Lavado y Desinfección.

- PC: En el computador de la Motonave queda registrado junto a la producción mensual, la fecha, la hora de inicio y término y el folio del Certificado de Desinfección después de cada faena de Inspección, Lavado y Desinfección. Conjuntamente existe un control de



movimiento de químicos en la nave; su ingreso, consumo y el pedimento de los mismos, con la finalidad de contar con stock de tales productos.

The image shows a computer screen displaying a spreadsheet with multiple columns and rows of data. The data appears to be organized by date and includes numerical values, likely representing production and disinfection metrics. The spreadsheet is viewed through a window with a standard operating system interface.

Imagen 09. Registro de Producción Mensual y de Desinfección.

- **Bitácora de Puente:** En Bitácora de Puente de la Motonave queda el registro de fecha e inicio y término de Inspección, Lavado y Desinfección de bodegas, equipos, elementos y lugares expuestos.

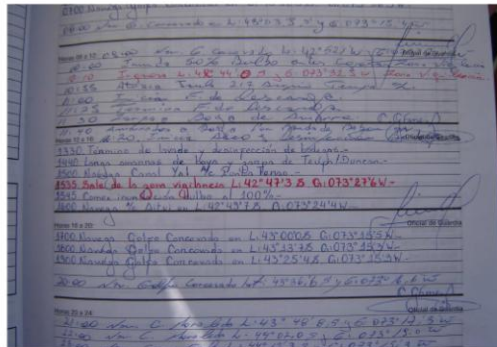


Imagen 10. Registros de Bitácora de Puente.

- **Certificado de Desinfección:** Informe en el cual se acredita la ejecución de un completo lavado y desinfección en bodegas, equipos y elementos que se encuentran expuestos. También se detallan las acciones que se realizan en el proceso, añadiendo fecha y horas de inicio y término. Firmado por el Técnico de Peces responsable y del Capitán a cargo de la Motonave.

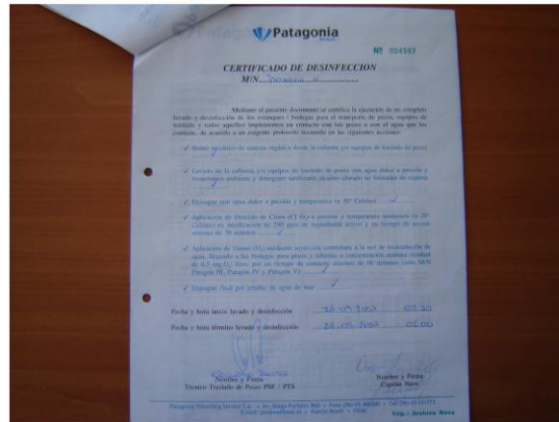


Imagen 06. Certificado de Desinfección.

PRODUCTOS QUIMICOS

En el proceso de lavado y desinfección se utilizan productos químicos aprobados por Programa Sanitario General de Procedimientos de Transportes (PSGT) y por el Programa Sanitario General de Limpieza y Desinfección (PSGL) y reglamentados por el Servicio Nacional de Pesca. En las Motonaves los productos utilizados son los que a continuación se enumeran:

- 1.- **TONALIM líquido**, detergente alcalino clorado sin espuma, alto poder de remoción, limpiador de grasas y de residuos proteicos. Este líquido se utiliza para el lavado de bodegas, por medio de la utilización de hidrolavadora, con una dilución de 1/100, requerimiento mínimo 200 ppm.
- 2.- **CLORODOS** Desinfectante en solución estabilizada, 100% biodegradable sin residuos, efectivo agente contra bacterias, hongos y virus. Aplicación por medio de hidrolavadora con una dilución de 1/100. Requerimiento 200 ppm.
- 3.- **DUPLALIM**, compuesto líquido a base de Aldehído Glutárico y Amonios Cuaternarios, desinfectante de alta acción viricida, fungicida y bactericida, producto biodegradable. Utilizado mediante hidrolavadora para la desinfección de bodegas con una dilución de 1/200.



- 4.- **YODIGEN (30 Y-PLUS)**, yodo molecular activo (3%), desinfectante químico no corrosivo y biodegradable. Se utiliza en pediluvio con una dilución en agua fría de 1/200.



Imagen 11. Productos químicos utilizados.

Todos los líquidos químicos que se encuentran a bordo de las Motonaves se encuentran rotulados y ubicados en zonas específicas, con sus respectivas señalética (Productos químicos, Uso de mascarilla, Uso de guantes, etc.). Además se especifica mediante un cuadro de químicos la aplicación, requerimiento y dilución de cada líquido.



Imagen 12. Señalética de uso de productos químicos.



Desinfección			
Químicos	Aplicación	Requerimiento Mínimo	Dilución
Clorodos	Desinfección bodegas	200 ppm	1:100
Tonalim	Lavado bodegas	100 ppm	1:100
Yodigen	Pediluvios	150 ppm	1:200

Cuadro de aplicación de productos químicos.

OTROS REQUERIMIENTOS BASICOS

- **PEDILUVIO:** El pediluvio es un elemento necesario para evitar posibles contagios que fuesen traídos desde el exterior a la motonave, haciéndose imprescindible que sea puesto en un lugar preestablecido en la cubierta de la motonave. Este debe contener YODIGEN 30 Y-Plus, el cual será renovado cada vez que sea ubicado en su posición de uso.
- **ELEMENTOS DE TRABAJO:** Trajes de agua, botas de goma, mascarillas y guantes deben ser guardados en lugares designados, previa desinfección de ellos una vez terminada la faena de lavado y desinfección.
- **PRODUCTOS QUIMICOS:** Estos deben ser rotulados a su llegada y ubicados en los lugares acondicionados para tal efecto, donde existe señalética que especifique que elementos de trabajo se debe usar para su manejo.
- **OTROS ELEMENTOS A FINES:** Embudo, vaso graduado y otros elementos que sean utilizados para los efectos de uso de químicos, deben ser ubicados en lugares determinados, señalando debidamente cual es su uso.



Imagen 14. Pediluvio.

11.-BITÁCORA DE MODIFICACIONES

Nº Versi3n	Modificaci3n	Fecha	Responsable
01	8.0 Monitoreo de la actividad,punto 4 debe decir Di3xido de cloro		
01	Se agrega datos del registro de recambio de Pediluvio-Maniluvio		
01	Pediluvio se agrega texto:" el cual ser3 renovado cada vez que sea ubicado en su posici3n de uso"		
01	Se agrega tabla registro de Recambio de Pediluvio-Maniluvio		



REGISTRO PRESENCIA DE CLORO
DESINFECCION WELLBOAT

Fecha	Hora	ppm Cloro Detergente	Cumple / No Cumple	ppm Dioxido de Cloro Desinfectante	Cumple / No Cumple	Accion Correctiva

DETERGENTE 200 ppm	DESINFECTANTE 200 ppm
------------------------------	---------------------------------

Tecnico Wellboat

A N E X O 7

Resolución 2327/10: Norma técnica que establece los requisitos de aprobación de los sistemas de tratamiento de las aguas destinados a eliminar patógenos, con que deben contar las embarcaciones que transporten peces vivos.



ESTABLECE REQUISITOS PARA LA APROBACION DE LOS SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE LAS AGUAS EMPLEADAS POR EMBARCACIONES EN LA OPERACION DE TRANSPORTE DE PECES VIVOS.

VALPARAISO, 31 DIC. 2010

RES. EX. **2327**

VISTOS: Lo dispuesto en el D.F.L. N° 5, de 1983 y sus modificaciones; el D.S. N° 430, de 1991, que fija el texto refundido, coordinado y sistematizado de la Ley N° 18.892 y sus modificaciones, Ley General de Pesca y Acuicultura; el D.S. N°319, de 2001, que aprueba el Reglamento de Medidas de Protecci3n, Control y Erradicaci3n de Enfermedades de Alto Riesgo para las Especies Hidrobiol3gicas, todos del Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucci3n, hoy Ministerio de Economía, Fomento y Turismo; la Resoluci3n Exenta N° 72, de 2003, del Servicio Nacional de Pesca, que aprueba el Programa Sanitario General de Limpieza y Desinfecci3n aplicable a la Producci3n de Peces (PSGL), y la Resoluci3n N° 1600 de 2008, de la Contraloría General de la Repúbrica.

CONSIDERANDO:

Que el artículo 86 de la Ley General de Pesca y Acuicultura establece que mediante decreto supremo deberán reglamentarse las medidas de protecci3n y control para evitar la introducci3n de enfermedades de alto riesgo, aislar su presencia en caso de que éstas ocurran, evitar su propagaci3n y propender a su erradicaci3n.

Que, el D.S. 319 citado en Vistos, establece tales medidas, siendo aplicables sus disposiciones, entre otras actividades, al transporte de especies hidrobiol3gicas que se realicen en el territorio de la Repúbrica.

Que, el artículo 48 literal i) del texto reglamentario antes mencionado, dispone que en el caso que se utilicen embarcaciones deberán contar con un sistema de tratamiento de las aguas destinado a eliminar pat3genos, aprobado por el Servicio.

Que, de acuerdo a la disposici3n antes citada, procede que este Servicio establezca los requisitos para la aprobaci3n de tales sistemas.



RESUELVO:

ARTÍCULO PRIMERO: Apruébase la siguiente norma técnica que establece los requisitos de aprobación de los sistemas de tratamiento de las aguas destinados a eliminar patógenos, con que deben contar las embarcaciones que transporten peces vivos, sean éstos destinados a la siembra de un centro de cultivo, reproductores o cosecha viva para su posterior sacrificio y proceso:

1. DEFINICIONES

- 1.1. **CT o Producto CT:** corresponde a un valor que relaciona la concentración de ozono, expresada en mg/L o gr/m³, por el tiempo de exposición, expresado en minutos.
- 1.2. **Dosis UV:** es la cantidad de luz UV (ultravioleta) a la que se exponen los microorganismos y que se deberá expresar en mJ /cm².
- 1.3. **PSGL:** Programa Sanitario General de Limpieza y Desinfección aplicable a la Producción de Peces, contenido en la Resolución Exenta N° 72, de 2003, del Servicio Nacional de Pesca, o la que la reemplace.
- 1.4. **RAM:** Recuento de microorganismos aerobios mesófilos.
- 1.5. **Servicio:** Servicio Nacional de Pesca.
- 1.6. **SST:** Sólidos suspendidos totales.

2. REQUISITOS GENERALES

- 2.1. Las embarcaciones destinadas a faenas de cosecha de centros de cultivo no podrán destinarse en forma inmediata al traslado de reproductores y peces que sean sembrados en otro centro de cultivo, a menos que se efectúe su limpieza y desinfección conforme al Manual de Higiene y Desinfección previsto en el PSGL, y se autorice, cuando proceda, su cambio de uso por el Servicio.
- 2.2. Todas las embarcaciones que efectúen transporte marítimo de peces vivos, deberán tener una autonomía tal, que, ante requerimiento específico del Servicio, puedan navegar completamente cerradas, sin recambiar o eliminar agua de las bodegas de transporte de peces, durante al menos, 3 horas continuas.
- 2.3. Todas las embarcaciones que efectúen transporte de cosecha viva con intercambio de agua, deberán implementar sistemas de desinfección de las aguas que descarguen desde sus bodegas o estanques de traslado de peces.
- 2.4. Todas las embarcaciones que efectúen transporte marítimo de smolts y/o reproductores deberán considerar el llenado inicial de sus bodegas o estanques de transporte de peces con agua desinfectada, o usar agua de pozos profundos. Adicionalmente, toda agua que ingrese a la nave durante el transporte de este tipo de peces, deberá cumplir idénticas exigencias antes de ser puesta en contacto con los peces trasladados. Asimismo, el agua, previo a su descarga, deberá ser desinfectada.
- 2.5. La desinfección podrá efectuarse mediante las tecnologías de gas Ozono o luz Ultravioleta (UV). Para tal efecto, las dosis mínimas de desinfección aceptables serán las siguientes:

a. Luz UV : 90 mJ/cm²

b. Ozono : CT de 1,6 mg/L (donde C es concentración en mg/lit y T tiempo en minutos)



No obstante lo anterior, el Servicio podrá autorizar otras metodologías de desinfección de aguas, que cuenten con evidencia científica comprobable de efectividad y que sean auditables.

- 2.5. Las embarcaciones deberán contar con registros automatizados de las dosis de UV administradas, o bien, de un indicador indirecto de ello, que permita estimar con certeza dicha dosis. Tal información deberá registrarse y almacenarse con una frecuencia mínima de 30 minutos. En el caso de los barcos que desinfecten con ozono, también deberán contar con registros automatizados cada 30 minutos, en base a un equipo de medición de concentración de ozono capaz de indicar la concentración CT aplicada y la concentración residual de ozono en el punto final de la zona de mezcla, debiendo almacenarse toda la información en sistemas de memoria no volátil y quedar disponible para el caso que el Servicio lo requiera.
- 2.6. Las embarcaciones deberán contar con un plan de contingencia, escrito y conocido por el personal que labora en ella y por la empresa contratante del servicio de transporte, para ser aplicado en los casos en que no se logre la dosis mínima desinfectante prevista en el numeral 2.4. precedente.
- 2.7. Las embarcaciones deberán contar con un manual de limpieza y desinfección de bodegas o estanques, mamparos, ductos de agua y estructuras empleadas en el traslado de peces en general, según lo requerido por el PSGL. El referido manual deberá estar disponible para el personal así como para los inspectores del Servicio.

3. REQUISITOS ESPECÍFICOS PARA LA OBTENCIÓN DE LA APROBACIÓN

Para solicitar la aprobación de los sistemas de tratamiento de aguas que habiliten la operación de las naves para realizar actividades de transporte, los armadores deberán presentar a la Unidad de Acuicultura del Servicio, en su Dirección Nacional en Valparaíso, en papel y en una versión digitalizada, los siguientes antecedentes:

- 3.1. Una monografía con las características técnicas de la embarcación, la que deberá incluir, al menos:
 - 3.1.1. Capacidad de bodegas o estanques destinados al transporte de peces, expresada en m³;
 - 3.1.2. Descripción y croquis de la forma de ingreso y salida de las aguas, incluyendo caudales y ubicación de los puntos de monitoreo o muestreo, captación y descarga de agua.
- 3.2. Plan de contingencia, establecido por el armador, ante emergencias que imposibiliten o inhabiliten el uso de los sistemas de desinfección.
- 3.3. Número máximo de renovaciones de agua por hora de las bodegas o estanques que transportan los peces.
- 3.4. Sistemas de registro de la activación de la apertura de compuertas para carga o descarga de agua de bodegas, y forma en que este proceso se efectúa. Este registro podrá ser digital o escrito, en cuyo caso deberá ser firmado por el Capitán de la Nave en la Bitácora de Puente, estar disponible y actualizado.
- 3.5. Características de los sistemas de filtrado u otros sistemas aplicados para la remoción de partículas suspendidas previo a la desinfección;
- 3.6. En el evento que el sistema de desinfección que se aplique sea luz UV-C, se deberá indicar:
 - 3.6.1. Especificaciones técnicas del equipo:
 - Marca, modelo y empresa proveedora del sistema,
 - Característica de las lámparas y demás componentes del sistema UV-C,
 - Número de lámparas,



- Vida operativa estimada de las lámparas según el fabricante,
- Registro de recambio y limpieza de las lámparas, como también mantención de los filtros.

3.6.2. Especificaciones operacionales del equipo:

- Caudal de agua a desinfectar,
- Registro de aplicación UV y Transmitancia durante todo el transporte,

3.6.3. Sistema de registro de uso de las lámparas (horometría).

3.7. En caso que el sistema de desinfección aplicado sea Ozono, se deberá indicar lo siguiente:

3.7.1. Especificaciones de:

- Volumen de agua a desinfectar,
- Especificaciones técnicas del equipo generador de ozono,
- Estanque o sistema de contacto.

3.7.2. Croquis con las características de la embarcación, incluidos, filtros de agua, sistema de generación, aplicación y contacto de ozono.

3.7.3. Protocolos, frecuencias y puntos de monitoreo, limpieza, cambio y mantenimiento general del sistema, además de los registros que se llevará de ellos.

3.7.4. Sistema para el registro de la dosis mínima de ozono aportada, con indicación de concentración y tiempo, y su conversión en valores de CT, fotos del lector que se empleará y las unidades en que esta lectura se expresa.

3.8. Luego de presentada al Servicio la información señalada en los numerales anteriores, y cualquiera sea el sistema de desinfección aplicado, el solicitante deberá coordinar con el Servicio la realización de una prueba de campo. En ésta se deberá realizar análisis de RAM a 22°C, SST y Transmitancia en muestras obtenidas del afluyente o efluente de cada bodega de la embarcación.

Deberán tomarse cuatro muestras, una en la carga, dos durante el transporte y una durante la descarga. Las muestras de transmitancia y SST podrán obtenerse del agua entre la salida del sistema de filtración y la entrada al equipo o sistema de desinfección de UV u ozono, o bien inmediatamente a la salida de éste. Los análisis de RAM a 22°C deben efectuarse a partir de muestras de agua ya desinfectada. La frecuencia y lugar de muestreo podrá ser ajustada, a requerimiento del Servicio, conforme a las características de la embarcación.

El Servicio evaluará la documentación presentada, los resultados de los viajes de prueba y podrá efectuar revisiones en terreno a fin de verificar el funcionamiento de equipos y sistemas.

Si el sistema de tratamiento de las aguas para la operación de embarcaciones que transportan peces vivos es aprobado, se dirigirá un oficio al armador, el cual será incorporado en un listado disponible al efecto en la página web del Servicio.

La aprobación del sistema de tratamiento permanecerá vigente mientras se mantengan las condiciones previstas en la presente resolución, que se tuvieron en consideración por el Servicio para otorgar su aprobación. Para tal efecto, el Servicio podrá realizar, cuando lo estime procedente, inspecciones a las embarcaciones.

ARTÍCULO SEGUNDO: Lo dispuesto en la presente resolución se aplicará sin perjuicio de los requerimientos establecidos por otras autoridades competentes.



ARTÍCULO TERCERO: El incumplimiento de las medidas establecidas en la presente resoluci3n, ser3 sancionado con arreglo a lo dispuesto en los Títulos IX y X de la Ley General de Pesca y Acuicultura, en relaci3n al artÍculo 77 del D.S. N° 319 de 2001, del Ministerio de EconomÍa, Fomento y Reconstrucci3n

ANÓTESE, COMUNÍQUESE Y PUBLÍQUESE

**FELIX INOSTROZA CORTES
DIRECTOR NACIONAL
SERVICIO NACIONAL DE PESCA**

DISTRIBUCI3N

- Direcci3n Nacional de Pesca
- Direcciones Regionales de Pesca
- Unidad de Acuicultura
- Depto. JurÍdico
- Oficina de partes

A N E X O 8

Listado de plantas autorizadas para recibir
peces desde centros cuarentenados
por Virus ISA.



Listado de Plantas Autorizadas para Recibir Peces desde Centros Cuarentenados por Virus ISA

03/03/2011

Planta	Zona	Empresas de Cultivo	Matanza	Tipo	Tipo Desinfección	Lugar de Descarga	Observación
AcuinoVA Chile SA	Pto. Chacabuco	AcuinoVA Chile SA	SI	Primaria-Secundaria	Cloración y Decoloración	ZPL	
Agroindustrial Santa Cruz	Puerto Montt	Agroindustrial Santa Cruz	SI	Primaria-Secundaria	Cloración y Decoloración	Mar Fuera ZPL	Descarga directa a planta, cloración y decoloración.
Aguas Claras	Calbuco	Aguas Claras	SI	Primaria-Secundaria-Terciaria	Cloración y Decoloración	Mar Fuera ZPL	Descarga desde acopio a sala de matanza.
Alimentos Bahía Chincui	Puerto Montt	Productos del Mar Ventisqueros SA	No	Primaria-Secundaria	Dióxido de Cloro	Mar Fuera ZPL	Descarga desde acopio a Planta.
Alimentos Frescos y Congelados Ltda.	Puerto Montt		No	Primaria-Secundaria	Dióxido de Cloro	ESSAL	
Aize	Puerto Montt		No	Secundaria	Cloración y Decoloración	Infiltración	cerrada
Antarfood	Chonchi	Aguas Claras	SI	Primaria-Secundaria	Cloración y Decoloración	Mar Fuera ZPL	
AquaChile	Puerto Montt	AquaChile	No	Secundaria	Cloración y Decoloración	ESSAL	
Caicaen	Calbuco	Marine Harvest Chile	SI	Primaria	Ozono / Cloración y Decoloración	Mar Fuera ZPL	Descarga directa a planta, Ozono.
Salmones Camanchaca SA	Tomé	Camanchaca	No	Secundaria	Cloración y Decoloración / Ozono	ESSBIO	
Carriel Norte	Talcahuano	Frigorífico Carriel Norte	No	Secundaria	Cloración y Decoloración	ESSBIO	Descarga desde camión
Chamiza	Puerto Montt	Marine Harvest Chile	No	Secundaria	Cloración y Decoloración	Río Chamiza	
Chinquihue	Puerto Montt	Marine Harvest Chile	No	Secundaria	Cloración y Decoloración	Mar Fuera ZPL	
Comercial y Servicios Austral Ltda. (Comsur)	Puerto Montt	Trusal	No	Primaria-Secundaria	Cloración y Decoloración	ESSAL	
Congelados Pacifico	Talcahuano	Congelados Pacifico	No	Secundaria	Cloración y Decoloración	ESSBIO	
CSLinao	Puerto Montt	Marine Harvest Chile	No	Secundaria	Cloración y Decoloración	Pta. Propia	
Cultivos Marinos Chiloé	Ancud	Cultivos Marinos Chiloé	No	Secundaria	Cloración y Decoloración	Mar Fuera ZPL	
Cultivos Marinos Chiloé	Dalcahue	Cultivos Marinos Chiloé	SI	Primaria-Secundaria	Cloración y Decoloración	Mar Fuera ZPL	Descarga directa a planta, cloración y decoloración
El Golfo	Talcahuano	Pesquera El Golfo SA	No	Secundaria	Dióxido de Cloro	ESSBIO	
Foodcorp	Coronel	Foodcorp Chile SA	No	Secundaria	Cloración y Decoloración	Mar Fuera ZPL	Descarga desde PAM
Friosur	Pto. Chacabuco	Pesquera Friosur	No	Secundaria	Dióxido de Cloro/Ozono	Mar Fuera ZPL	
Invertec	Castro	Invertec	No	Secundaria	Ozono	Río La Chacra	
Los Fiordos	Quellón	Pesquera Los Fiordos	SI	Primaria-Secundaria	UV. Asoc a ESSAL	ESSAL- Quellón	Descarga directa a planta y acopio en tierra, cloración y decoloración
Ludrimar Sociedad Jimenez y Gutierrez	Puerto Montt	Pesquera Ludrimar Ltda	No	Primaria-Secundaria	Ozono	Fosa de Decantación	
Nova Austral SA	Porvenir	Nova Austral	No	Primaria-Secundaria	Cloración y Decoloración	Aguas Magallanes SA	
Pacific Star	Quellón	Pesquera Pacific Star	No	Primaria-Secundaria	Cloración y Decoloración	Mar Fuera ZPL	
Patagonia Salmon Farming	Ilque	PSF	SI	Primaria-Secundaria	Cloración y Decoloración	Mar Fuera ZPL	Cerrada



Listado de Plantas Autorizadas para Recibir Peces desde Centros Cuarentenados por Virus ISA

03/03/2011

Planta	Zona	Empresas de Cultivo	Matanza	Tipo	Tipo Desinfección	Lugar de Descarga	Observación
Pesquera Bahía Coronel	Coronel		No	Secundaria-Terciaria	Cloración y Decoloración	Mar Fuera ZPL	
Pesquera Bio Bio	Talcahuano	Pesquera Bio Bio	No	Secundaria	Cloración y Decoloración	ESSBIO	
Pesquera del Mar Antártico	Puerto Montt		No	Secundaria	Cloración y Decoloración	ESSAL	
Pesquera Edén Ltda.	Puerto Natales		No	Primaria- Secundaria	Cloración y Decoloración	Mar Fuera ZPL	
Pesquera Friosur	Pto. Chacabuco	Pesquera Friosur	No	Secundaria	Dióxido de Cloro/Ozono	Mar Fuera ZPL	
Pesquera Itata	San Vicente -		No	Secundaria	Cloración y Decoloración	ESSBIO	
Orizon SA	Coronel	Pesquera San José	No	Secundaria-Terciaria	Cloración y Decoloración Secundaria; Dióxido de Cloro Terciaria	Mar Fuera ZPL	Descarga desde PAM
Planta Fitz Roy	Calbuco	Mainstream Chile	No	Primaria- Secundaria	Cloración y Decoloración	Mar Fuera ZPL	
Planta Proceso Salmones Granja Marina Tornagaleones	Quellón	Granja Marina Tornagaleones SA	No	Secundaria	UV. Asoc a ESSAL	ESSAL- Quellón	
Procesadora Hueñocoihue	Dalcahue		No	Secundaria	Cloración y Decoloración	Mar Fuera ZPL	
Prociñt	Puerto Montt		No	Secundaria	Cloración y Decoloración	ESSAL	
Río Dulce	Quellón	Río Dulce	Si	Primaria	Dióxido de Cloro	Mar Fuera ZPL	Descarga directa a planta, UV.
Salmones Andes	Quemchi	Mainstream Chile	Si	Primaria- Secundaria	Cloración y Decoloración	Mar Fuera ZPL	Descarga directa a planta, Ozono
Salmones Antártica	Chonchi	Salmones Antártica	Si	Primaria- Secundaria	Cloración y Decoloración	Mar Fuera ZPL	
Salmones Cailin SA	Quellón	AquaChile	Si	Primaria- Secundaria	Cloración y Decoloración	Mar Fuera ZPL	Descarga directa a planta, cloración y decoloración
Salmones Maulin	Puerto Montt	Salmones Maulin	No	Primaria- Secundaria	Cloración y Decoloración	ESSAL	
Salmones Multiexport	Puerto Montt	Salmones Multiexport	No	Primaria- Secundaria	Cloración y Decoloración	ESSAL	
San José	Calbuco	Camanchaca	Si	Primaria	Cloración y Decoloración u Ozono	Mar Fuera ZPL	Descarga directa a planta, cloración y decoloración
Sociedad Comercial Dasan Ltda.	Puerto Montt		No	Primaria- Secundaria	Cloración y Decoloración	ESSAL	
Surprocesos SA	Quellón		Si	Primaria	Cloración y Decoloración / Ozono	Mar Fuera ZPL	Descarga directa a planta, cloración y decoloración / ozono
Teupa	Chonchi	Marine Harvest Chile	Si	Primaria	Cloración y Decoloración	Mar Fuera ZPL	Cerrada
Yadrán Quellón	Quellón	Yadrán	No	Secundaria	Cloración y Decoloración	Mar Fuera ZPL	No autorizado para descarga directa a planta

A N E X O 9

Flota de naves transportadoras de peces vivos
de Patagonia Wellboats.



Patagonia Wellboats cuenta con una flota de 5 naves, todas equipadas con sistema de última generaci3n en sus bodegas (presi3n de vacío incorporado), así como modernos sistemas para conteo de peces, control de parámetros ambientales del agua en bodegas, y cámaras de TV en sistema de circuito cerrado al interior de las bodegas, cuyos monitores estén instalados en el puente de control y mando de la nave para observaci3n visual de los peces.

Las naves de Patagonia Wellboats cuentan con un completo equipamiento de monitoreo y control de parámetros del agua durante el viaje, lo que permite un traslado seguro y en las mejores condiciones ambientales para los peces. Para el retiro y entrega de los peces, las naves cuentan con sistema de presi3n vacío incorporado en bodegas, para hacer la tarea de cosecha en forma suave y eficiente. Sus naves cuentan con el más moderno equipamiento para navegar en zonas climáticas adversas y para realizar traslados a grandes distancias que requieren de muchas horas de viaje.

Caso de traslados desde y hacia la XI Regi3n, en donde se realizan viajes de hasta 18-20 horas entre puntos de retiro y entrega de los peces. Requerimientos que pueden ser cubiertos por varias de las naves de la flota.

Catálogo de Naves



- Eslora total: 59,00 m
- Manga: 14,00 m
- Calado máximo aprox.: 5,30 m
- Volumen total de sus 2 bodegas: 1.400 m³
- Capacidad de Carga Viva: 180 tons de biomasa.
- Sistema carga - descarga: Por Proa y por Banda.



Patagon V



- Eslora total: 49,20 m
- Manga: 10,00 m
- Calado máximo aprox.: 4,80 m
- Volumen total de sus 2 bodegas: 800 m³
- Capacidad de Carga Viva: 105 tons de biomasa.
- Sistema carga - descarga: Vacío-presión de sus bodegas presurizadas.

Patagon IV



- Eslora total: 45,80 m
- Manga: 10,00 m
- Calado máximo aprox.: 4,80 m
- Volumen total de sus 2 bodegas: 690 m³
- Capacidad de Carga Viva: 90 tons de biomasa
- Sistema carga - descarga: Vacío-presión de sus bodegas presurizadas.

Patagon III



- Eslora total : 41,64 m
- Manga: 8,60 m
- Calado máximo aprox.: 4,95 m
- Volumen total de sus 2 bodegas: 580 m³
- Capacidad de Carga Viva: 75 tons de biomasa.
- Sistema carga - descarga: Vacío-presión de sus bodegas presurizadas.



- Eslora total: 39,05m
- Manga: 8,00 m
- Calado máximo aprox.: 4,30 m
- Volumen total de sus 2 bodegas: 480 m³
- Capacidad de Carga Viva: 52 tons de biomasa.
- Sistema carga - descarga: Sistema doble de bombas de vacío para peces.



- Eslora total : 34,95 m
- Manga : 8,00 m
- Calado máximo aprox.: 4,00 m
- Volumen total de sus 2 bodegas :360 m³
- Capacidad de carga Viva : 40 tons de biomasa
- Sistema de selección y conteo de peces en sitios de engorda.

A N E X O 10

Procedimientos generales
de saneamiento de SERNAPESCA.



PAC/NT4/Marzo 2010



GOBIERNO DE CHILE
SERVICIO NACIONAL DE PESCA

**PROGRAMA DE ASEGURAMIENTO
DE CALIDAD**

**NORMA T3CNICA
SECCI3N 4**

Procedimientos Operacionales de Saneamiento

**DEPARTAMENTO DE SANIDAD PESQUERA
CHILE**



PAC/NT4/Marzo 2010

INDICE:

I.- Antecedentes generales	2
II.- Antecedentes específicos	3
1.- Control y seguridad de agua y hielo	3
2.- Condición y aseo de las superficies de contacto con los alimentos	10
3.- Prevención de contaminación cruzada	12
4.- Mantenimiento de las instalaciones de lavado y desinfección de manos, y de los servicios sanitarios	14
5.- Protección de los alimentos	15
6.- Rotulación, almacenamiento y manejo de químicos	15
7.- Control de la condición de la salud de los manipuladores	17
8.- Sistema y periodicidad del control de plagas	18
III.- Registros	19
IV.- Glosario de términos	20
V.- Bibliografía	22
Anexo N°1	23



I.- ANTECEDENTES GENERALES

Para elaborar, implementar y mantener adecuadamente un Programa de Aseguramiento de Calidad debe existir una base sólida que permita asegurar la inocuidad de los alimentos, ésta la constituyen los Programas prerequisites de plantas pesqueras y barcos factoría para implementar Programas de Aseguramiento de Calidad (Documento PAC/NT3) y los Procedimientos Operacionales de Saneamiento (POS). La presente Norma describe de manera detallada los aspectos que deben considerar los Procedimientos Operacionales de Saneamiento de un establecimiento pesquero.

Cada planta o barco factoría debe tener en forma escrita e implementado un Manual de Procedimientos Operacionales de Saneamiento (POS), que consiste en una descripción detallada de los procedimientos y prácticas de higiene y sanitización del establecimiento.

Para desarrollar este Manual y luego implementarlo, es necesario considerar las exigencias contempladas en la Norma Técnica del Programa de Habilitación de Plantas y Buques Factoría de Sernapesca (HPB/NT1) y respetar los aspectos contemplados en esta Norma.

El manual del POS debe ser específico para cada establecimiento pesquero, controlando durante el proceso las actividades y prácticas con la frecuencia suficiente para mantener las condiciones sanitarias que soporten la elaboración de un producto inocuo para el consumidor.

Es importante considerar que muchos peligros identificados en el PAC pueden ser controlados a través de los Procedimientos Operacionales de Saneamiento, con lo cual adquiere especial importancia. Dentro de estos peligros se encuentran los asociados con el ambiente de procesamiento, el personal o los insumos.

A continuación se esquematiza las diferencias entre los controles del PAC y los procedimientos del POS:

Peligro	Medida de Control	Programa de control
Producto con altos niveles de Histamina por abuso de tiempo y temperatura	Control de tiempo y temperatura de las especies susceptibles	PAC
Producto contaminado por sobrevivencia de agentes patógenos por cocción insuficiente	Control de tiempo y temperatura de cocción	PAC



Peligro	Medida de Control	Programa de control
Producto contaminado con agentes patógenos por manipulación	Control de los hábitos de los manipuladores	POS
Producto contaminado con agentes patógenos por renovación insuficiente de agua de enfriado	Control de la frecuencia de renovación de agua	POS
Producto contaminado con agentes patógenos por suciedad de superficies	Control de los procedimientos de limpieza de las superficies de contacto	POS

II.- ANTECEDENTES ESPECÍFICOS:

Este manual deberá incluir como mínimo los siguientes aspectos:

- 1.- Control y seguridad de agua y hielo
- 2.- Condición y aseo de las superficies de contacto con los alimentos
- 3.- Prevención de la contaminación cruzada
- 4.- Mantenimiento de las instalaciones de lavado y desinfección de manos, y de los servicios sanitarios
- 5.- Protección de los alimentos
- 6.- Rotulación, almacenamiento y manejo de químicos
- 7.- Control de la condición de la salud de los manipuladores
- 8.- Sistema y periodicidad del control de plagas

1.- CONTROL Y SEGURIDAD DE AGUA Y HIELO

En este capítulo del manual debe indicarse qué tipo de agua utiliza el establecimiento pesquero, fundamentalmente en lo referente al agua que toma contacto con los alimentos y las superficies en contacto con ellos. Cabe señalar que también se considera para estos efectos las aguas utilizadas para mantener recursos vivos al interior de los establecimientos.

Al indicar el tipo de agua se debe especificar claramente el abastecimiento (red pública, pozos, agua de mar, abastecimiento de origen superficial o profundo, etc.), tratamiento de potabilización (si corresponde), almacenamiento (si existiese) y distribución dentro del establecimiento pesquero.



PAC/NT4/Marzo 2010

En el caso del hielo debe sealarse al menos: origen, condiciones de almacenamiento, manipulaci3n y distribuci3n.

Monitoreo:

Para vigilar que se mantienen bajo control las condiciones que permiten un adecuado almacenamiento y distribuci3n del agua, se debe considerar al menos los siguientes monitoreos:

- Concentraci3n de cloro libre en diferentes puntos de la planta, los que se deben ir alternado peri3dicamente. La frecuencia de este procedimiento debe ser al menos diaria. Adem3s se debe incluir en este monitoreo el control diario de la concentraci3n de cloro residual del agua que alimenta la(s) m3quina(s) utilizada(s) para fabricar hielo. El l3mite establecido para el agua que est3 en contacto con el producto es de 0.2 a 2 ppm. En el caso de utilizar di3xido de cloro, el l3mite permitido es entre 1 y 3 ppm.
- Manejo de mangueras dentro del establecimiento, con una frecuencia diaria.
- Revisi3n de la inexistencia de conexiones cruzadas dentro del establecimiento. El establecimiento debe demostrar, por ejemplo mediante un plano de distribuci3n de los diferentes tipo de agua, incluyendo las aguas residuales, la inexistencia de conexiones cruzadas. Este procedimiento debe realizarse al menos mensualmente, o cada vez que existan cambios en el sistema de distribuci3n.
- Condiciones estructurales y de manejo de estanques de almacenamiento de agua (si existen). La frecuencia de monitoreo debe ser al menos diaria.
- Punto de descarga de aguas residuales y abastecimiento de agua de mar en barcos factor3a.
- Condiciones estructurales y de manejo del silo de hielo (si existe). La frecuencia de monitoreo debe ser al menos diaria.

Cuando el hielo no sea producido por la planta se deber3 monitorear:

- Calidad microbiol3gica, avalada por los informes de an3lisis entregados por el proveedor, los que deben considerar al menos los requisitos de agua establecidos en esta Norma y deben ser realizados en un laboratorio autorizado por Sernapesca.
- Condiciones higi3nicas durante el transporte, manipulaci3n y almacenamiento

P3gina 5 de 23



PAC/NT4/Marzo 2010

Para todos los monitoreos se debe indicar:

- Frecuencia del procedimiento
- C3mo se realiza el procedimiento
- Personal responsable de la ejecuci3n
- Acci3n correctiva
- Registros

Control de aguas detenidas

Aguas detenidas son aquellas utilizadas en el proceso, en contacto directo con el producto (envasado o no), que se mantienen dentro de recipientes (aguas de enfriado, glaseo, saborizado, etc.).

Se debe considerar dentro de esta definici3n las aguas con renovaci3n continua (ingreso y egreso de agua en forma permanente), donde el procedimiento de recambio no de las garantas de la renovaci3n total, permitiendo la existencia de espacios donde el agua no sea renovada (espacios muertos) dentro del recipiente, como por ejemplo el rebalse.

La frecuencia de recambio de este tipo de aguas debe estar avalada por estudios microbiol3gicos, con la finalidad de asegurar que 3stas no ser3n una fuente de contaminaci3n para el producto final.

Los estudios deben contener como m3nimo:

- Resultados microbiol3gicos, considerando al menos coliformes fecales, adicionalmente la empresa podr3 incluir otro microorganismo asociado al tipo de producto o recurso que elabora. Debe incluirse adem3s los l3mites cr3ticos considerados por la empresa.
- Procedimiento de la toma de muestras, indicando los tiempos de extracci3n de las muestras, volumen del recipiente y tipo de agua, cantidad y tipo de producto elaborado en el per3odo de tiempo
- Conclusiones
- Responsable del estudio

Este estudio y los an3lisis microbiol3gicos pueden ser efectuados por personal de la empresa o entidades externas.

P3gina 6 de 23



PAC/NT4/Marzo 2010

El estudio será válido mientras se mantengan las condiciones en que fue realizado.

El estudio de recambio de aguas no es requisito para las plantas pesqueras que elaboran conservas. Para el caso de las plantas que elaboran productos cocidos congelados, no es necesario efectuar un estudio de aguas detenidas en pasos operacionales que preceden a la cocción, sin embargo es obligatorio cuando esta situación se presenta en pasos posteriores a la cocción.

El registro de recambio de las aguas detenidas es opcional, pues está asociado a las buenas prácticas de la empresa.

Verificación:

Las verificaciones de agua y hielo se deberán realizar de acuerdo a lo siguiente:

A.- Agua potable y/o potabilizada

Se considerara como agua potabilizada a toda el agua utilizada en la industria pesquera, sin considerar agua de mar ni agua proveniente del abastecedor de agua local. Este tipo de agua debe ser tratada de tal manera de cumplir los límites establecidos en esta norma.

- Las plantas que se abastecen directamente de la red de agua potable, que almacenen o no en estanque, o bien la obtengan de pozo, puntera u otra fuente, deberán realizar en el agua una vez al año, al ingreso de la planta y por origen, los siguientes análisis de parámetros indicadores.

Parámetro	Expresión de los resultados	Concentración máxima admisible
Aluminio	µg/l	200
Antimonio	µg/l	5
Benzopirenos	mg/l	0.00001
Boro	mg/l	1
Bromato	mg/l	0.01
Clostridium perfringens (incluidas esporas) (nota 2)	número/100ml	0
Conductividad (nota 1)	µS/cm a 20°C	2500

Página 7 de 23



PAC/NT4/Marzo 2010

Parámetro	Expresión de los resultados	Concentración máxima admisible
Hidrocarburos policíclicos aromáticos (nota 4)	mg/l	0.0001
Niquel	mg/l	0.02
Oxidabilidad	mg/l O ₂	5
Sodio	mg/l	200
Coliformes totales	Número /100 ml	0
Tetracloroeteno y tricloroeteno	mg/l	0.01
1,2 Dicloroetano	mg/l	0.003
Turbidez	NTU (Unidades nefelométricas de turbidez)	2 (nota 3)

Nota 1: El agua no podrá contener materias corrosivas.

Nota 2: Este parámetro se debe medir en todas las aguas, con excepción de las que se acredite que su abastecimiento (público o privado) es subterráneo.

Nota 3: La Turbiedad media de las muestras debe ser menor o igual a 2 NTU.

Nota 4: Suma de concentraciones de benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(ghi)perileno, indeno(1,2,3-cd)pireno.

El análisis anual de estos parámetros, será complementario a los parámetros señalados en la Nch 409/1 of 2005.

- Las plantas además deberán realizar los siguientes análisis de rutina, una vez al mes (mientras exista proceso) por cada fuente de agua, en las diferentes llaves de la planta, alternándolas de modo que todas sean muestreadas a lo menos una vez al año.
- En el caso del hielo, sólo será necesario realizar los análisis microbiológicos que se señalan en la tabla siguiente, con una frecuencia mensual, y por cada silo de hielo que tenga el establecimiento.

Parámetro	Expresión de los resultados	Concentración máxima admisible
Clostridium perfringens (incluidas esporas) (nota 1)	número/100ml	0
Color	Pt/Co	20
Conductividad	µS/cm a 20°C	2500

Página 8 de 23



Parámetro	Expresi3n de los resultados	Concentraci3n máxima admisible
Concentraci3n de iones hidr3geno	Unidades pH	≥ 6.5 y ≤ 8.5
Sabor		Aceptable para los consumidores y sin cambios an3malos
Olor		Inodoro o Aceptable para los consumidores
Escherichia coli	Número/100 ml	0
Enterococos	Número/100 ml	0
Coliformes totales	Número /100 ml	0
Turbidez (nota 2)	NTU (Unidades nefelométricas de turbidez)	2 (nota 2)

Nota 1: S3lo si el agua procede total o parcialmente de agua superficial.

Nota 2: La Turbiedad media de las muestras debe ser menor o igual a 2 NTU.

B.- Agua de mar y/o salobre

- Para el caso del agua de mar, las plantas deberán realizar los siguientes análisis de rutina, una vez al mes (mientras exista proceso) por cada fuente de agua, en las diferentes llaves de la planta, alternándolas de modo que todas sean muestreadas a lo menos una vez al año.

Parámetro	Concentraci3n máxima admisible (número/100 ml)
Escherichia coli	0
Enterococos	0
Coliformes totales	0
Clostridium perfringens (incluidas esporas)	0

Tanto para el agua potable como para el agua de mar se deberán tomar las siguientes consideraciones:

- Se deberá presentar un plano esquemático de la planta con la ubicaci3n de los terminales de agua numerados a considerar en los monitoreos de la concentraci3n de cloro libre y para las verificaciones mensuales.



PAC/NT4/Marzo 2010

- Para la rotación en el monitoreo de la concentración de cloro libre se deben considerar al menos todas las salidas de agua del establecimiento que tengan contacto con el producto.
- Por otra parte si la planta posee salidas de agua principales que derivan en varios terminales (por ejemplo, sobre mesas de fileteo), para las verificaciones mensuales se podrán agrupar como máximo un pool de 5 salidas de agua provenientes de las líneas principales.
- Los procedimientos de toma de muestras de agua deben realizarse según lo establecido en la Norma LAB/NT1, punto 4.
- Para todas las determinaciones se debe indicar el laboratorio autorizado por Sernapesca responsable de dichos análisis.
- Se sugiere utilizar modelo del Anexo N°1 de esta norma para registrar el día del mes en que se realiza el muestreo de agua y hielo.

Cuando la planta se abastece directamente de la red de agua potable, sin almacenamiento intermedio, podrá solicitar al prestador del servicio, copia de los análisis químicos realizados por la empresa durante el último año. Si estos análisis están incompletos de acuerdo a los parámetros exigidos por la normativa, el establecimiento deberá solicitar a un laboratorio autorizado completar las determinaciones no incluidas en el informe del prestador del servicio.

Deben quedar claramente expreso los procedimientos que seguirá la empresa en el caso que los resultados de las verificaciones sean desfavorables. Adicional a esto, al siguiente muestreo siempre debe contemplarse la verificación de la misma llave cuyo resultado fue desfavorable, considerando que al término del período de un año se deben tener todos los terminales principales analizados.

La empresa debe realizar seguimiento del producto posiblemente afectado por este resultado desfavorable, y debe mantener informado al Servicio. Entre las actividades a realizar se debe contemplar la revisión y análisis de los registros relacionados con el problema, la revisión de las medidas de control preventivas y actividades de monitoreo.

Página 10 de 23



PAC/NT4/Marzo 2010

2.- CONDICIÓN Y ASEO DE LAS SUPERFICIES DE CONTACTO CON LOS ALIMENTOS

En este capítulo se debe considerar el diseño, construcción, mantención y los procedimientos de limpieza y sanitización de todas las superficies de contacto con los alimentos y aquellas de las cuales escurre algún drenaje sobre el alimento o sobre las superficies que están en contacto con los alimentos, que podrían conducir, directa o indirectamente a la contaminación de estos durante el procesamiento.

En estas superficies se debe considerar utensilios, cuchillos, mesones, tablas de cortado, equipos de procesamiento, bandejas, cintas transportadoras, guantes, delantales, etc.

Se debe realizar una completa descripción de los procedimientos de limpieza y sanitización indicando al menos:

- Frecuencia del procedimiento y su responsable
- Etapas o tipo de limpieza y sanitización
- Detergentes a aplicar (principio activo, concentración y tiempo de acción)
- Sanitizantes a aplicar (principio activo, concentración y tiempo de acción)

Monitoreo:

Para vigilar que se encuentran bajo control las condiciones de mantención, limpieza y sanitización de las superficies de contacto, se debe considerar al menos los siguientes monitoreos:

- Inspección visual del estado de las superficies
- Inspección visual de la limpieza de las superficies
- Pruebas químicas de concentración de sanitizantes
- Guantes y vestimentas exteriores que puedan estar en contacto con los alimentos, deben estar limpios y en buen estado.

Para todos los monitoreos se debe indicar:

- Frecuencia del procedimiento
- Cómo se realiza el procedimiento
- Personal responsable de la ejecución
- Acción correctiva
- Registros

Página 11 de 23



PAC/NT4/Marzo 2010

En el caso de los sanitizantes utilizados por los establecimientos, es importante que se cuente con los elementos necesarios para medir adecuadamente la concentración del producto utilizado en la limpieza. Al momento de adquirir los sanitizantes se debe considerar el kit respectivo que permita la medición de la concentración efectiva del sanitizante.

Verificaciones:

Para el caso de las superficies de trabajo se debe contemplar verificaciones microbiológicas indicando:

- Determinaciones a realizar
- Niveles máximos aceptados por la empresa, indicando la unidad de expresión
- Lugares a muestrear
- Técnicas utilizadas para las determinaciones
- Planes de muestreo estadísticamente confiables

Para todas las determinaciones microbiológicas, que deben realizarse cada 15 días de producción, se debe indicar el laboratorio autorizado por Sernapesca responsable de dichos análisis.

Se sugiere utilizar modelo del Anexo N°1 de esta norma para registrar los días productivos de cada línea (si corresponde) y los días del mes en que se realiza el muestreo de superficies.

Las plantas que tengan como mercado de destino a Europa y que produzcan alimentos listos para el consumo y productos crudos en que no existe certeza de que sean consumidos cocidos, deberán tomar siempre muestras de las zonas y el equipo de producción, como parte de su plan de muestreo, con el fin de detectar la posible presencia de *Listeria monocytogenes*.

Para el caso de los buques factoría, las verificaciones de superficies deben realizarse todas las mareas, al momento de la recalada de éste, en lo posible, previo a la realización de trabajos de mantención que se realizan habitualmente en puerto.

Las verificaciones se realizan para comprobar la eficiencia de los procedimientos de limpieza, por lo cual deben efectuarse sobre superficies limpias.

En el programa deben quedar claramente expreso los procedimientos que seguirá la empresa en el caso que los resultados de las verificaciones sean desfavorables. Adicional a esto a la

Página 12 de 23



PAC/NT4/Marzo 2010

quincena o recalada siguiente, siempre debe contemplarse la verificación de la misma superficie cuyo resultado fue desfavorable.

La empresa debe realizar seguimiento del producto posiblemente afectado por este resultado desfavorable, y debe mantener informado al Servicio. Entre las actividades a realizar se debe contemplar la revisión y análisis de los registros relacionados con el problema, la revisión de las medidas de control preventivas y actividades de monitoreo.

3.- PREVENCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN CRUZADA:

En este capítulo se debe hacer mención a las prácticas de los operarios tendientes a prevenir la contaminación de los productos (lavado de manos, tránsito, manipulación del producto, manejo de desechos, etc); cómo se realiza la separación física del producto crudo del cocido (cuando corresponda); y señalar además de qué manera el diseño del establecimiento previene la contaminación cruzada.

Para vigilar que se previene la contaminación cruzada en el establecimiento, se debe considerar al menos los siguientes monitoreos:

- Controlar la manipulación y almacenamiento de los productos que se encuentran en diferentes etapas del proceso
- Controlar la separación y manipulación de los productos crudos y su posible relación con los productos cocidos (al inicio de la jornada o turnos y durante el proceso)
- Comportamiento de los operarios que se mueven entre las diferentes áreas del establecimiento, que van al baño, que toman utensilios (lavado y desinfección de manos)
- Manipulación de equipos y utensilios entre áreas de productos crudos y cocidos, o áreas sucias y limpias
- Almacenamiento de productos cocidos
- Manejo de desechos sólidos y líquidos
- Almacenamiento de ingredientes y materiales de empaque

Para todos los monitoreos se debe indicar:

- Frecuencia del procedimiento
- Cómo se realiza el procedimiento
- Personal responsable de la ejecución

Página 13 de 23



PAC/NT4/Marzo 2010

- Acción correctiva
- Registros

Verificaciones:

Para el caso de los manipuladores se debe contemplar verificaciones microbiológicas, cada 15 días de proceso o al término de cada marea en el caso de los tripulantes de los barcos factoría, indicando:

- Determinaciones a realizar
- Niveles máximos aceptados por la empresa, indicando la unidad de expresión
- Plan de muestreo estadísticamente confiable
- Técnicas utilizadas para las determinaciones

Tal como se señala en el capítulo anterior respecto del objetivo de la verificación, ésta se debe realizar cuando el operario se encuentre con las manos limpias, por ejemplo luego del ingreso a la planta o bien a la salida de los servicios higiénicos. La verificación de manos de tripulantes de barcos factoría, debe realizarse durante su permanencia en el puerto, una vez que setos hayan pasado por el filtro sanitario, como lo hacen normalmente durante la marea.

En el programa deben quedar claramente expreso los procedimientos que seguirá la empresa en el caso que los resultados de las verificaciones sean desfavorables. Con la finalidad de corroborar la solución del problema, siempre se debe controlar a la quincena siguiente el operario que resultó sobre los límites máximos permitidos. Para los tripulantes de barcos factoría se debe considerar la recalada siguiente. Además se debe comunicar, por la vía más rápida posible al responsable del PAC a bordo, cuando los resultados sean desfavorables y el buque ha zarpado, con el objeto de que se tomen las medidas que corresponda, respecto del tripulante afectado.

La empresa debe realizar seguimiento del producto posiblemente afectado por este resultado desfavorable, y debe mantener informado al Servicio. Entre las actividades a realizar se debe contemplar la revisión y análisis de los registros relacionados con el problema, la revisión de las medidas de control preventivas y actividades de monitoreo.

Para todas las verificaciones se debe identificar el laboratorio autorizado por Sernapesca responsable de los análisis.

Página 14 de 23



PAC/NT4/Marzo 2010

Se sugiere utilizar modelo del Anexo N°1 de esta norma para registrar los dÍas productivos de cada lÍnea (si corresponde) y los dÍas del mes en que se realiza el muestreo de manipuladores.

4.- MANTENCI3N DE LAS INSTALACIONES DE LAVADO Y DESINFECCI3N DE MANOS, Y DE LOS SERVICIOS SANITARIOS

En este capÍtulo se debe considerar la condici3n y mantenci3n de las instalaciones para el lavado y desinfecci3n de manos y servicios higi3nicos. Este tema estÁ estrechamente relacionado con las prÁcticas adecuadas de lavado y desinfecci3n de manos para prevenir la contaminaci3n cruzada.

Para vigilar que se mantienen las instalaciones de lavado y desinfecci3n de manos y de los servicios sanitarios, se debe considerar al menos los siguientes monitoreos:

- Condiciones de las instalaciones de lavado de manos en baÑos y las estaciones de lavado de manos en las Áreas de manipulaci3n y procesamiento de alimentos. De acuerdo a la Norma T3cnica HPB/NT1, se debe vigilar que exista un nÚmero adecuado de instalaciones, que los grifos no se accionen con la mano, y que se mantengan en adecuada condici3n y limpieza. AdemÁs se deben mantener instrucciones claras que promuevan el lavado de manos
- Condiciones de las instalaciones para la desinfecci3n de manos, disponibilidad de agua y jab3n, desinfectante, toallas de un solo uso o secadores de aire caliente y recipientes para desechos (activados con un sistema no manual).
- Condiciones de los servicios sanitarios, vigilando su adecuado funcionamiento, limpieza y disponibilidad de papel higi3nico
- Concentraciones de los desinfectantes en las estaciones de limpieza ubicadas, tanto en los servicios higi3nicos, como en las Áreas de proceso.

Para todos los monitoreos se debe indicar:

- Frecuencia del procedimiento
- C3mo se realiza el procedimiento
- Personal responsable de la ejecuci3n
- Acci3n correctiva
- Registros

PÁgina 15 de 23



PAC/NT4/Marzo 2010

5.- PROTECCIÓN DE LOS ALIMENTOS.

Este capítulo tiene como objetivo asegurar que los alimentos, las superficies de contacto y los materiales de empaque, estén protegidos de diversos contaminantes microbiológicos, químicos y físicos, tales como:

- Lubricantes
- Combustibles
- Plaguicidas
- Compuestos de limpieza
- Agentes desinfectantes
- Condensados y salpicaduras provenientes del piso

Monitoreo:

Se debe vigilar la presencia de cualquier contaminante del alimento, las superficies de contacto y el material de empaque, incluyendo:

- Condensados que contaminan las superficies en contacto con los alimentos.
- Presencia de apozamientos en el piso.
- Compuestos tóxicos potenciales

Para todos los monitoreos se debe indicar:

- Frecuencia del procedimiento
- Cómo se realiza el procedimiento
- Personal responsable de la ejecución
- Acción correctiva
- Registros

6.- ROTULACIÓN, ALMACENAMIENTO Y MANEJO DE QUÍMICOS

Contempla la rotulación, almacenamiento y uso de los compuestos químicos, de manera que no constituyan un peligro de contaminación de los productos pesqueros.

Los productos químicos usados en la mayoría de las plantas procesadoras incluyen compuestos de limpieza, desinfectantes, sanitizantes, plaguicidas, lubricantes de máquinas y aditivos alimentarios.

Monitoreo:

Página 16 de 23



PAC/NT4/Marzo 2010

Se deben vigilar los siguientes aspectos relacionados con el manejo de químicos:

1.- Rotulación:

Los contenedores originales deben indicar:

- Nombre del compuesto
- Nombre del fabricante.
- Instrucciones de uso claras.
- Aprobación de la autoridad sanitaria pertinente (para sanitizantes y desinfectantes)
- Medidas de seguridad en caso de accidente y prevención

Los envases de trabajo deben indicar:

- Nombre del compuesto.
- Instrucciones para su uso adecuado (área de aplicación, concentración)

2.- Almacenamiento

- Revisar que su almacenamiento sea el adecuado, con acceso restringido y lejos de las áreas de procesamiento, tal como se señala en la Norma Técnica HPB/NT1.
- Almacenamiento separado de productos de limpieza de los plaguicidas.
- Almacenamiento segregado de productos químicos de grado alimentario.
- Revisar que los envases de trabajo usados para dosificar productos químicos a granel, sean fáciles de limpiar e higiénicos y estén debidamente rotulados.
- Rotulación
- Recipientes dosificadores de uso exclusivo

3.- Uso:

- Según las instrucciones del fabricante.
- Uso adecuado, no dando lugar a contaminaciones cruzadas, adulteraciones y enfermedades.

Para todos los monitoreos se debe indicar:

- Frecuencia del procedimiento

Página 17 de 23



PAC/NT4/Marzo 2010

- Cómo se realiza el procedimiento
- Personal responsable de la ejecución
- Acción correctiva
- Registros

Cabe señalar que la frecuencia del monitoreo del uso y manejo adecuado de productos químicos dentro de la planta, debe realizarse diariamente.

7.- CONTROL DE LAS CONDICIONES DE SALUD DE LOS MANIPULADORES

Este capítulo considera el procedimiento a seguir por la empresa con los manipuladores, a los cuales se les diagnostica o tienen síntomas de enfermedad, heridas u otras condiciones que pueden constituirse en una fuente de contaminación bacteriana.

Se debe hacer mención a los controles que realiza la empresa para asegurar que los manipuladores no transmitan enfermedades o contaminen los alimentos a través de la manipulación. (vacunaciones, controles médicos, control de manos, capacitación, etc.)

Para vigilar que se controlan las condiciones de salud de los empleados en la planta, se debe considerar al menos los siguientes monitoreos:

- Observación de los síntomas de enfermedad y heridas de los manipuladores.
- Condiciones generales de manipuladores al ingreso de la planta y durante el proceso
- Control de manos del personal al ingreso de la planta
- Control de los operarios que se reintegran al proceso productivo, luego de ser afectados por una condición o enfermedad que les impidan manipular alimentos.

Para todos los monitoreos se debe indicar:

- Frecuencia del procedimiento
- Cómo se realiza el procedimiento
- Personal responsable de la ejecución
- Plan de muestreo estadísticamente confiable
- Acción correctiva
- Registros

Página 18 de 23



8.- SISTEMA Y PERIODICIDAD DEL CONTROL DE PLAGAS

Este capítulo considera la exclusión de plagas, como roedores, insectos, animales domésticos y aves en establecimientos pesqueros.

Para vigilar que se controla adecuadamente la presencia de plagas en el establecimiento, se debe considerar al menos los siguientes monitoreos:

- Presencia de plagas (insectos, roedores, aves y animales domésticos)
- Evidencia reciente de la presencia de plagas, como excrementos, marcas de roeduras y materiales para hacer nidos.
- Vigilancia de otras condiciones relacionadas, que si no son controladas, podrían conducir a problemas de plagas, tales como la adecuada mantención de la planta y disposición de instalaciones apropiadas contra animales indeseables, según lo señalado en la Norma Técnica HPB/NT1.
- Vigilancia de las condiciones de almacenamiento y eliminación de desechos, verificando que no constituyan un foco de contaminación para la planta ni de molestias para su entorno, según se señala en la Norma Técnica HPB/NT1
- Supervisar la adecuada eliminación de desechos desde el interior de la sala de procesamiento.
- Condiciones de los recipientes en que se depositan los desechos (fáciles de limpiar y desinfectar y estén provisto de tapa).
- Limpieza adecuada y, sanitización de los recipientes para el almacenamiento de los desechos.
- Existencia de un dispositivo de evacuación del agua residual, que reúna condiciones higiénicas adecuadas.
- Vigilancia de las características del piso de las áreas de procesamiento, de forma que facilite el drenaje de agua o se disponga de un dispositivo que permita evacuar el agua residual.

Para todos los monitoreos se debe indicar:

- Frecuencia del procedimiento
- Cómo se realiza el procedimiento
- Personal responsable de la ejecución
- Acción correctiva
- Registros



PAC/NT4/Marzo 2010

Cabe señalar que la frecuencia del monitoreo de la evidencia directa de plagas en la planta, debe realizarse diariamente. En el caso de los barcos factoría debe realizarse previo al zarpe.

Verificaciones

De acuerdo a lo señalado en la Norma Técnica HPB/NT1, se debe exterminar sistemáticamente y en forma preventiva las plagas.

Se debe mantener los registros de las labores de desratización y desinsectación realizadas. Dicho certificado deberá considerar los plaguicidas utilizados, la fecha de aplicación y de vencimiento, así como el grado de infestación y consumo de cebos al momento de la visita.

Se debe disponer de un plano de cebos, proporcionado por la empresa de control de plagas, el cual debe ser verificado por el personal a cargo del saneamiento de la planta, con una frecuencia al menos quincenal. Para el caso de los barcos factoría, esta verificación debe realizarse en el puerto, al finalizar cada marea.

III.- REGISTROS:

Todos los registros del POS deben considerar al menos:

- Título del formulario
- Nombre y dirección de la planta
- Fecha y hora del monitoreo
- Nombre del procedimiento que está siendo monitoreado
- Mediciones u observaciones reales
- Frecuencia de monitoreo
- Firma o iniciales del monitor
- Firma o iniciales de la persona que verifica la documentación
- Hora de inicio y término del proceso
- Fecha de la verificación

Página 20 de 23



IV.- GLOSARIO DE TÉRMINOS:

Para efectos de esta Norma se entenderá por:

Buque factoría: El buque a bordo del cual los productos pesqueros son sometidos a una o varias de las siguientes operaciones seguidas del embalaje: fileteado, corte en rodajas, pelado, picado, congelación, transformación. No se considerarán buques factoría los buques de pesca que únicamente practiquen a bordo la cocción de crustáceos y de moluscos y los que sólo procedan a la congelación a bordo.

Desinfección: procedimiento utilizado en las manos con el objetivo de reducir el número de microorganismos a un nivel que no dé lugar a contaminación nociva del alimento, sin menoscabo de la calidad de él, mediante agentes químicos.

Desinfectante: producto químico autorizado por el Ministerio de Salud, destinado a eliminar o reducir las bacterias potencialmente perjudiciales en las manos.

Condensación: humedad acumulada en techos, paredes, instalaciones aéreas, tuberías o unidades de refrigeración en cámaras.

Contaminación cruzada: transferencia de contaminantes biológicos o químicos a los productos alimenticios provenientes de alimentos crudos, manipuladores de alimentos o el ambiente al interior de la sala de proceso.

Contaminación: presencia de microorganismos, virus y/o parásitos, sustancias extrañas o deletéreas de origen mineral, orgánico o biológico, sustancias radioactivas y/o sustancias tóxicas en cantidades superiores a la permitidas internacionalmente, o que se presuman nocivas para la salud, la presencia de cualquier tipo de suciedad, restos o excrementos, aditivos no autorizados o en cantidades superiores a los permitidos.

Establecimiento pesquero: se refiere indistintamente a una planta pesquera o barco factoría.

Limpieza: eliminación de tierra, residuos de alimentos, polvo, grasa u otra materia objetable.

Microorganismo: Hongos, bacterias y virus. Incluye microorganismos patógenos (que causan enfermedades) o alteradores (que causan descomposición de los alimentos) e indicadores del grado de contaminación bacteriano.



PAC/NT4/Marzo 2010

Plaga: Insectos, roedores, aves y otras especies menores capaces de contaminar directa o indirectamente los alimentos.

Planta pesquera: Cualquier local en el que se preparen, transformen, refrigieren, congelen, embalen o depositen productos pesqueros. No se considera planta pesquera aquel local que sólo almacena productos pesqueros.

Productos pesqueros: Todos los animales o partes de animales marinos o de agua dulce, incluidos sus huevos. Se excluyen los mamíferos acuáticos.

Productos químicos: incluyen los productos utilizados para los tratamientos de limpieza y desinfección, sanitizantes, lubricantes, plaguicidas y rodenticidas u otros químicos utilizados en la empresa que constituyan un **peligro** potencial de contaminación de los productos pesqueros.

Registro de Saneamiento: documentación de las actividades de control de saneamiento en una planta de proceso, conteniendo la información mínima del monitoreo y acciones correctivas. Existen registros de saneamiento diario y periódicos, con una frecuencia acorde a la actividad monitoreada.

Retroflujo: diferencias de presión en el sistema de distribución del agua, que fuerzan los contaminantes a la red de agua potable utilizada durante el proceso.

Rotulación: identificación del producto químico que incluye al menos el nombre del producto y del fabricante, las instrucciones para su uso y la autorización del Instituto de Salud Pública, cuando corresponda.

Sanitización: procedimiento utilizado en las superficies en contacto con los alimentos con el objetivo de reducir el número de microorganismos a un nivel que no dé lugar a contaminación nociva del alimento, sin menoscabo de la calidad de él, mediante agentes químicos.

Sanitizante: producto químico autorizado por el Ministerio de Salud, destinado a eliminar o reducir las bacterias potencialmente perjudiciales en las superficies en contacto con los alimentos.

Página 22 de 23



PAC/NT4/Marzo 2010

Superficies en contacto con los alimentos: Corresponde a las superficies que toman contacto con los alimentos y aquellas de las cuales escurre algún drenaje sobre el alimento o sobre las superficies que están en contacto con los alimentos. En estas superficies se debe considerar utensilios, cuchillos, mesones, tablas de cortado, equipos de procesamiento, bandejas, cintas transportadoras, guantes, delantales, etc.

Tiempo de contacto de un detergente: período requerido por un detergente para penetrar el residuo y liberarlo de la superficie en contacto con los alimentos.

V.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Curso sobre Procedimientos de Control Sanitario para el Procesamiento de Pescados y Mariscos. Alianza HACCP de Pescados y Mariscos, 2001.
- 2.- Norma Técnica HPB/NT1, Requisitos de Infraestructura y Manejo Sanitario de Plantas Pesqueras y Buques Factoría
- 3.- Reglamento 853/2004/CEE del 29 de abril de 2004, que establece las normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.
- 4.- Directiva 80/778/CEE del 15 de julio de 1980, relativa a la calidad del agua destinada a consumo humano.
- 5.- Título 21 parte 123 del Código de Regulaciones Federales de Estados Unidos del 18 de noviembre de 1995, donde se fijan los procedimientos para el proceso e importación segura de productos pesqueros.
- 6.- Fish and Fishery Products Hazards and Control Guide. FDA,, junio 2001.



PAC/NT4/Marzo 2010

Anexo N°1

Modelo de registro de días productivos - POS

Folio: N° 000000

PROGRAMA DE ASEGURAMIENTO DE CALIDAD

Planilla de Días Productivos - POS

Planta Pesquera: Pes:

DIA	ESPECIE	LÍNEA DE ELABORACIÓN	SUPERFICIES - MANIPULADOR (c/15 días productivos)		AGUA - HIELO (1 vez al mes)
			N° día productivo	Fecha de muestreo	Fecha de muestreo
01					
02					
03					
04					
05					
06					
07					
08					
09					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					
31					

A N E X O 11

Ejemplo del registro automático del reactor con las dosis de radiación UV aplicados durante el trayecto del Patagón V para evaluación de tratamientos aplicados en aguas de transporte.



INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO / DIVISIÓN INVESTIGACIÓN EN ACUICULTURA

index	reactorNum	dateStamp	UVT	power	Flow	UV mJcm2			remote	Enable	rowIndex	lamp		eff	UV	age	iCtr	status1	enable	lsm	wtm	current	voltage	kw	% transmitancia	
						Dose	onOff	status				Number	onOff1												UVT1	power1
893	0	28-12-2011 11:17	98	100	992	110	1	4	0	0	893	0	1	100,0556	4199,975	48641	18	4	1	14,54	14,47	9,6111	387	3,720723	98,16639	100
893	0	28-12-2011 11:17	98	100	992	110	1	4	0	0	893	1	1	100,0367	4199,975	48342	20	4	1	13,51	0	9,393899	401,4	3,785243	0	100
893	0	28-12-2011 11:17	98	100	992	110	1	4	0	0	893	2	1	69,91735	4199,975	19786	8	4	1	15,57	16,38	12,9234	283,8	3,345445	98,85679	100
894	0	28-12-2011 11:32	98	100	990	110	1	4	0	0	894	0	1	100,0831	4199,975	49555	18	4	1	14,63	14,63	9,5568	392,4	3,750089	98,20458	100
894	0	28-12-2011 11:32	98	100	990	110	1	4	0	0	894	1	1	100,0384	4199,975	49256	20	4	1	14,29	0	9,574901	405,6	3,88358	0	100
894	0	28-12-2011 11:32	98	100	990	110	1	4	0	0	894	2	1	100,0303	4199,975	20700	8	4	1	11,31	17,07	9,231	399,6	3,688708	98,23838	100
895	0	28-12-2011 11:47	98	88	993	112	1	4	0	0	895	0	1	100,0638	3695,977	50407	18	4	1	13,74	14,94	8,887101	388,8	3,455305	98,58759	88
895	0	28-12-2011 11:47	98	88	993	112	1	4	0	0	895	1	1	100,0407	3695,977	50108	20	4	1	13,29	0	9,502501	403,8	3,83711	0	88
895	0	28-12-2011 11:47	98	88	993	112	1	4	0	0	895	2	1	100,0055	3695,977	21552	8	4	1	14,4	17,57	8,760402	397,8	3,484888	98,50329	88
896	0	28-12-2011 12:02	98	88	1011	115	1	4	0	0	896	0	1	100,0548	3695,977	51321	18	4	1	13,7	15,49	8,869	388,8	3,453589	98,86062	88
896	0	28-12-2011 12:02	98	88	1011	115	1	4	0	0	896	1	1	99,99523	3695,977	51022	20	4	1	13,25	0	9,538699	403,8	3,870504	0	88
896	0	28-12-2011 12:02	98	88	1011	115	1	4	0	0	896	2	1	100,0398	3695,977	22466	8	4	1	14,51	18,2	8,742301	399,6	3,495401	98,74387	88
897	0	28-12-2011 12:17	98	88	963	119	1	4	0	0	897	0	1	100,0462	3695,977	52234	18	4	1	13,74	15,37	8,887101	389,4	3,460637	98,77296	88
897	0	28-12-2011 12:17	98	88	963	119	1	4	0	0	897	1	1	99,99824	3695,977	51935	20	4	1	13,26	0	9,448201	403,2	3,809515	0	88
897	0	28-12-2011 12:17	98	88	963	119	1	4	0	0	897	2	1	100,0945	3695,977	23379	8	4	1	14,69	18,06	8,778499	398,4	3,497354	98,67594	88
898	0	28-12-2011 12:32	98	88	1000	112	1	4	0	0	898	0	1	100,0408	3695,977	53148	18	4	1	13,7	15,01	8,869	389,4	3,453589	98,61941	88
898	0	28-12-2011 12:32	98	88	1000	112	1	4	0	0	898	1	1	99,97395	3695,977	52849	20	4	1	13,3	0	9,484401	403,2	3,824111	0	88
898	0	28-12-2011 12:32	98	88	1000	112	1	4	0	0	898	2	1	100,0959	3695,977	24293	8	4	1	14,83	17,61	8,778499	399	3,502621	98,51218	88
899	0	28-12-2011 12:47	98	92	991	119	1	4	0	0	899	0	1	100,0513	3863,976	54000	18	4	1	14,48	14,89	9,502501	393,6	3,740185	98,51287	92
899	0	28-12-2011 12:47	98	92	991	119	1	4	0	0	899	1	1	99,97288	3863,976	53701	20	4	1	13,75	0	9,5568	405,6	3,876239	0	92
899	0	28-12-2011 12:47	98	92	991	119	1	4	0	0	899	2	1	100,1546	3863,976	25145	8	4	1	15,46	17,35	9,212901	400,2	3,687003	98,40948	92
900	0	28-12-2011 13:02	98	92	999	116	1	4	0	0	900	0	1	100,079	3863,976	54914	18	4	1	14,45	14,76	9,502501	392,4	3,721679	98,46735	92
900	0	28-12-2011 13:02	98	92	999	116	1	4	0	0	900	1	1	99,93861	3863,976	54615	20	4	1	13,62	0	9,574901	406,2	3,889325	0	92
900	0	28-12-2011 13:02	98	92	999	116	1	4	0	0	900	2	1	100,1554	3863,976	26059	8	4	1	15,49	17,24	9,212901	400,2	3,694247	98,35709	92
901	0	28-12-2011 13:17	98	92	997	121	1	4	0	0	901	0	1	100,082	3863,976	55828	18	4	1	14,44	15,29	9,5206	393	3,741596	98,69155	92
901	0	28-12-2011 13:17	98	92	997	121	1	4	0	0	901	1	1	99,93668	3863,976	55529	20	4	1	13,65	0	9,574901	405,6	3,88358	0	92
901	0	28-12-2011 13:17	98	92	997	121	1	4	0	0	901	2	1	100,215	3863,976	26973	8	4	1	15,53	17,79	9,231	400,2	3,694247	98,55666	92

A N E X O 12

Programa de monitoreo cualitativo de *A. catenella*
de SERNAPESCA en el marco del reglamento
de plagas, REPLA.



A+ | A- | Normal

Programa Vigilancia REPLA

- Programa Vigilancia REPLA
- Informes acumulados REPLA

FORMULARIO DE INGRESO

Usuario

clave

Recordarme

[¿Recuperar clave?](#)
[¿Quiere registrarse?](#)
[Regístrese aquí](#)

Usted está en: [Portada](#) > [Descargas y Publicaciones](#) > [Programa Vigilancia REPLA](#)

Programa de Vigilancia para *Alexandrium catenella* en el marco del Reglamento de Plagas

Informes REPLA:

[Ver Informes de resultados REPLA \(al mes Febrero de 2010\)](#)
[Informes de resultados REPLA acumulado](#)

Formularios REPLA:

[Solicitud de muestreo de fitoplancton en origen](#)
[Solicitud de muestreo de fitoplancton en wellboat](#)

El 19 de Diciembre de 2005 se aprueba Reglamento sobre Plagas Hidrobiológicas mediante Decreto Supremo N° 345. Dicho reglamento tiene por objeto establecer las medidas de protección y control para evitar la introducción de especies que constituyan plagas hidrobiológicas, aislar su presencia, evitar su propagación y propender a su erradicación.

Dado lo anterior, por Res. Ex N° 177 del 15 de Enero de 2009, se declara área de florecimiento algal nocivo (FAN) de *Alexandrium catenella* al sector comprendido desde el Golfo de Corcovado a Bahía Anna Pink y el sector desde Canal Baker a Canal Beagle. En la misma Resolución se decreta que el Servicio Nacional de Pesca debe establecer los Programas de Vigilancia, detección, control y/o erradicación de plagas de conformidad con el artículo 9° del Reglamento sobre Plagas Hidrobiológicas.

Por lo anterior, Sernapesca ha implementado un monitoreo cualitativo para *Alexandrium catenella* en Canal Moraleda y Golfo de Corcovado. Este monitoreo consta de 7 estaciones y proporcionará la información necesaria del estado de la zona de transporte de peces desde y hacia la Región de los Lagos.

Escala de Abundancia Relativa.

Definición de nivel de abundancia	ESCALA	<i>Alexandrium catenella</i> (cel/L)
Ausente	0	0
Raro	1	1-2
Escaso	2	3-10
Regular	3	11-42
Abundante	4	43-170
Muy abundante	5	171-682
Extremadamente abundante	6	683-2730
Hiper abundante	7	2731-10922

A continuación se detalla la posición referencial de las estaciones:

Estación	Latitud	Longitud
1	43°18'53"	73°36'39"
2	43°39'15"	74°02'49"
3	43°35'34"	73°31'43"

INFORMACION

[Ante la Emergencia](#)
Instrucciones para Compras Públicas

[FONDO DE FOMENTO PARA LA PESCA Artesanal](#)

[Proceso de Selección de Personal](#)

[Programa de Vigilancia *A. catenella* \(REPLA\)](#)

[Biblioteca del Congreso Nacional](#)

[Concesiones Acuicultura Regiones X, XI, XII](#)



INTERNATIONAL MCS NETWORK

RSS 0.91
RSS 1.0
RSS 2.0

4	43°54'20"	73°25'44"
5	44°11'43"	73°23'00"
6	44°29'21"	73°27'18"
7	44°49'02"	73°29'01"

En el caso de la estaci3n 2 dado que se encuentra fuera de la ruta de navegaci3n habitual, 3sta s3lo se monitorear3 cuando exista la posibilidad de hacerlo, de lo contrario, el muestreo se realizar3 en un punto desplazado latitudinalmente hacia el 3rea continental.



Ver informes:

[Informes de resultados REPLA acumulado](#)

Modificado el (mi3rcoles, 10 de marzo de 2010)

[\[Volver\]](#)



A N E X O 13

Lista de wellboats que operan o han operado en Chile.



SITUACIÓN A ABRIL 2009 (Fuene: Wellboat Patagonia)						
N° Naves	Armador	Wellboat	Capacidad		Sistema	Año
			m3	(ton)	Carga	Inicio
1	Naviera Brekstad	Ivar Senior	426	60	Bomba	2004
2		Midnor Viking	650	85	Vacio - Presión	2009
3		Rune Viking	630	80	Vacio - Presión	2007
4	Solvstrans	Ronia	650	78	Bomba Twin	2005
5		Ronia Fisk	360	50	Vacio - Presión	2006
6	Detroit Chile S.A.	Oddegutt	500	60	Bomba Twin	2004
7		Frigg	700	84	Vacio - Presión	2005
8		Saga	700	84	Vacio - Presión	2005
9		Loki	850	102	Vacio - Presión	2007
10		Forseti	850	102	Vacio - Presión	2008
11		Cacique	900	108	Vacio - Presión	2004
12	La Peninsula	Alcantara	700	84	Vacio - Presión	2003
13		Seiko	500	60	Vacio - Presión	2005
14		Paniahua	990	120	Vacio - Presión	2007
15		Bucalemu	965	118	Vacio - Presión	2007
16		Queilen	1000	120	Vacio - Presión	2008
17	Río Dulce	Río Dulce	500	70	Vacio - Presión	2003
18	Marine Harvest	Jonn Finnsson	300	70	Bomba Twin	2002
19	CPT	Seivag	750	90	Vacio - Presión	2003
20		Seifjord	850	102	Vacio - Presión	2005
21		Seikapp	1200	144	Vacio - Presión	2009
22	Pesq. Nacional	Magdalena	650	65	Bomba Twin	2001
23	Naviera Orca	Orca Yagan	480	70	Vacio - Presión	2005
24		Orca Ona	650	95	Vacio - Presión	2007
25	Camanchaca	Ana Cristina	380	42	Bomba Twin	2002
26	Patagonia Wellboat	Patagón	360	40	Bomba Twin	1998
27		Patagón II	480	53	Bomba Twin	1999
28		Patagón III	580	75	Vacio - Presión	2001
29		Patagón IV	690	90	Vacio - Presión	2003
30		Patagón V	800	104	Vacio - Presión	2004
31		Patagón VI	1400	180	Vacio - Presión	2007
32	Pesca Chile	Antonio C	600	78	Vacio - Presión	2003
TOTALES			22.041	2.762		



Registro de Wellboats

Empresa	Nombre de la Embarcación	Identificación del		Forma de operación	Tiempo de autonomía para	Posicionad or satelital	Ubicación de base de abastecimiento	Capacidad de carga viva	Capacidad Estanques	Eslora total (m)	Manga (m)	Calado max (m)	Mecanismo de
		N° Matricula	CB										
CPT Empr	Seivag	3103	8197	Abierto	1-1,5	Si	Quellón	90	750	46,45	9,40	6,20	hica / Químico/ Ozonificación
CPT Empr	Seifjord	3129	8777	Abierto	1-1,5	Si	Quellón	102	850	48,29	10,20	7,20	hica / Químico/ Ozonificación
Detroit Chi	Frigg	3126	8572	Abierto	1-1,5	No	Puerto Montt/ Quellón	90	690	51,80	12,00	3,42	hica / Químico/ Ozonificación
Detroit Chi	Saga	3136	8841	Abierto	1-1,5	Si	Puerto Montt/ Quellón	90	690	51,80	12,00	3,40	hica / Químico/ Ozonificación
Detroit Chi	Loki	3183	9953	Abierto	1-1,5	No	Puerto Montt/ Quellón	110	850	57,30	12,00	3,47	hica / Químico/ Ozonificación
Detroit Chi	Oddegut	3115	OD	Abierto	1-1,5	No	Puerto Montt/ Quellón	65	500	35,10	9,00	4,26	hica / Químico/ Ozonificación
Detroit Chi	Julieta S	3029	7147	Abierto	1-1,5	Si	Puerto Montt/ Quellón	50	400	58,50	13,50	2,25	hica / Químico/ Ozonificación
La Peninsu	Bucalemu	3176	9877	Abierto	1-1,5	Si	uerto Montt/Calbuco / Quellón	120	910	50,00	10,00	7,00	hica / Químico/ Ozonificación
La Peninsu	Paniahue	2816	5273	Abierto	1-1,5	Si	uerto Montt/Calbuco / Quellón	120	990	53,00	10,20	7,00	hica / Químico/ Ozonificación
La Peninsu	Cacique I	2938	5402	Abierto	1-1,5	Si	uerto Montt/Calbuco / Quellón	108	900	51,00	10,40	6,80	hica / Químico/ Ozonificación
La Peninsu	Alcántara	2578	3834	Abierto	1-1,5	Si	uerto Montt/Calbuco / Quellón	84	700	48,50	8,50	6,10	hica / Químico/ Ozonificación
La Peninsu	Seiko	2602	4104	Abierto	1-1,5	Si	uerto Montt/Calbuco / Quellón	60	500	42,00	8,23	5,70	hica / Químico/ Ozonificación
Patagonia	M/N Patagón	2972	2867	Abierto	1-1,5	Si	Puerto Montt / Quellón	40	360	34,00	8,00	4,30	hica / Químico/ Ozonificación
Patagonia	M/N Patagón II	2996	6540	Abierto	1-1,5	Si	Puerto Montt / Quellón	52	480	35,33	8,00	4,30	hica / Químico/ Ozonificación
Patagonia	M/N Patagón III	3027	6924	Abierto	1-1,5	Si	Puerto Montt / Quellón	75	580	37,94	8,60	5,60	hica / Químico/ Ozonificación
Patagonia	M/N Patagón IV	3079	7846	Abierto	1-1,5	Si	Puerto Montt / Quellón	90	690	46,00	10,00	5,50	hica / Químico/ Ozonificación
Patagonia	M/N Patagón V	3098	8076	Abierto	1-1,5	Si	Puerto Montt / Quellón	105	800	49,20	10,00	5,50	hica / Químico/ Ozonificación
Patagonia	M/N Patagón VI	3172	9672	Abierto	1-1,5	Si	Puerto Montt / Quellón	180	1400	58,88	13,60	5,88	hica / Químico/ Ozonificación

(1) Valores sujetos a condición ambiental de transporte (principalmente temperatura del agua) y estado sanitario de los peces.

(2) Capacidad de carga, según densidad estándar de transpoorte, para peces especie Salar, tamaño cosecha y en condiciones de normales de oxígeno, temperatura y salud.

A N E X O 14

Presentación, lista de invitados y lista de asistentes
al Taller de difusión de resultados
(6 septiembre 2011, Puerto Montt).



INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

"DETERMINACI3N DE LA CAPACIDAD DE ADHERENCIA, MECANISMOS DE PROPAGACI3N Y M3TODOS DE DESTRUCCI3N DE *Alexandrium catenella* (C3LULA VEGETATIVA Y QUISTE)"

Dra. GEMITA PIZARRO N.

Instituto de Fomento Pesquero
Divisi3n Investigaci3n en Acuicultura
Dpto. Medio Ambiente

Puerto Montt, 6 septiembre de 2011

DIVISI3N INVESTIGACI3N EN ACUICULTURA

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

OBJETIVOS

- **General**

Identificar los distintos agentes (vectores y f3mites) probables causantes de propagaci3n de *Alexandrium catenella* y proponer metodologías de eliminaci3n o destrucci3n de *A. catenella* que se puedan aplicar en las actividades de acuicultura, de traslados y de proceso de recursos hidrobiol3gicos.

DIVISI3N INVESTIGACI3N EN ACUICULTURA

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

OBJETIVOS

Específicos

1. Determinar la tasa de generaci3n de quistes de *A. catenella in situ*.
2. Identificar los agentes (vectores y f3mites), describir los mecanismos de propagaci3n de *A. catenella* (c3lula vegetativa y quistes) y evaluar los riesgos de dispersi3n de *A. catenella* a trav3s de agentes de propagaci3n.
3. Evaluar los distintos mecanismos de eliminaci3n o de destrucci3n de *A. catenella* (quistes y forma vegetativa) adheridos y/o incluidos en transvectores y en estructuras (f3mites).

DIVISI3N INVESTIGACI3N EN ACUICULTURA

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

OBJETIVOS

Específicos

4. Evaluar distintos mecanismos de eliminaci3n o de destrucci3n de *A. catenella* (quistes y forma vegetativa) para aplicar a las potenciales fuentes dispersoras de plagas de acuerdo al DSN°345/2005.
5. Aplicar y validar aquellos m3todos de destrucci3n m3s adecuados en sistemas de traslado de peces (barcos cisterna o *wellboats*) y otras "fuentes potenciales dispersoras de plagas". Evaluar los costos de implementaci3n de las medidas t3cnicas que se propongan.
6. Proponer medidas de detecci3n y certificaci3n as3 como medidas administrativas tendientes a asegurar la inocuidad en los traslados.
7. Realizar un taller de difusi3n y validaci3n de las medidas propuestas.

DIVISI3N INVESTIGACI3N EN ACUICULTURA

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

Ciclo vida dinoflagelado

(ref. Figueroa 2005)

DIVISI3N INVESTIGACI3N EN ACUICULTURA

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

METODOLOGÍA

Objetivo

1. Determinar la tasa de generaci3n de quistes de *A. catenella in situ*.

Trampas de sedimentos [Trampas.pdf](#)

Estaciones de muestreo fijas [Est.muestreo.pdf](#)

Fitoplancton columna de agua : Manguera y red, temperatura y otros

Verano-otoño : Abundancia relativa [Abundancia.pdf](#)

DIVISI3N INVESTIGACI3N EN ACUICULTURA



INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

METODOLOGÍA

Objetivo

1. Determinar la tasa de generación de quistes de *A. catenella in situ*.

Trampas de sedimentos Trampas.pdf

Estaciones de muestreo fijas Est.muestreo.pdf

Fitoplancton columna de agua : Manguera y red, temperatura y otros

Verano-otoño : Abundancia relativa Abundancia.pdf

DIVISIÓN INVESTIGACIÓN EN ACUICULTURA

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

METODOLOGÍA

Objetivo

2. Identificar los agentes (vectores y fómites), describir los mecanismos de propagación de *A. catenella* (célula vegetativa y quistes) y evaluar los riesgos de dispersión de *A. catenella* a través de agentes de propagación.

Moluscos, redes y internas *in situ* Est.in.situ.pdf

Moluscos naturales

Incubación de moluscos en condiciones simuladas floraciones intensas de *A. catenella* (valvas, biso, pseudofecas, hepat) Mol.incubados.pdf

DIVISIÓN INVESTIGACIÓN EN ACUICULTURA

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

METODOLOGÍA

Objetivo

3. Evaluar los distintos mecanismos de eliminación o de destrucción de *A. catenella* (quistes y forma vegetativa) adheridos y/o incluidos en transvectores y en estructuras (fómites).

Actividades

Información bibliográfica y normativas:

- Eliminación en moluscos
- Eliminación en fómites: redes y otros

Consulta a expertos

DIVISIÓN INVESTIGACIÓN EN ACUICULTURA

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

METODOLOGÍA

Objetivo

4. Evaluar distintos mecanismos de eliminación o de destrucción de *A. catenella* (quistes y forma vegetativa) para aplicar a las potenciales fuentes dispersoras de plagas de acuerdo al DSN°345/2005.

Actividades

Información bibliográfica y normativas:

Efluentes de plantas procesadoras, desarenado, depuración, mantención de especies vivas, transporte

bibliografia1.pdf

DIVISIÓN INVESTIGACIÓN EN ACUICULTURA

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

METODOLOGÍA

Objetivo

5. Aplicar y validar aquellos métodos de destrucción más adecuados en sistemas de traslado de peces (barcos cisterna o *wellboats*) y otras "fuentes potenciales dispersoras de plagas". Evaluar los costos de implementación de las medidas técnicas que se propongan.

Agua transporte: *wellboats*, moluscos, semillas

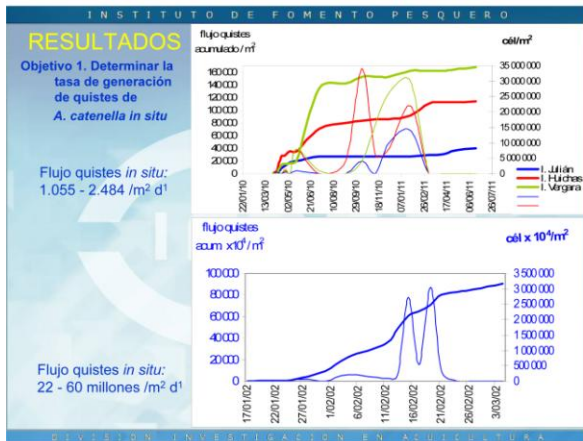
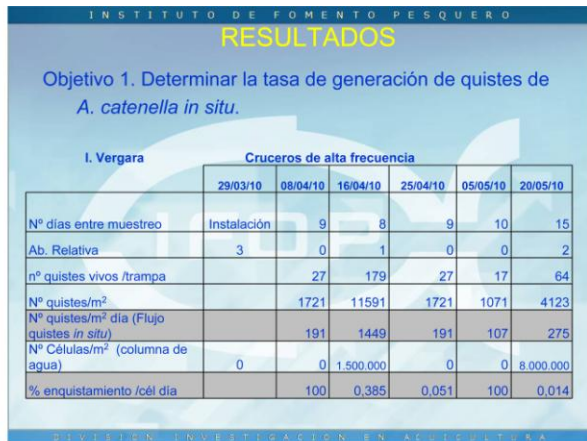
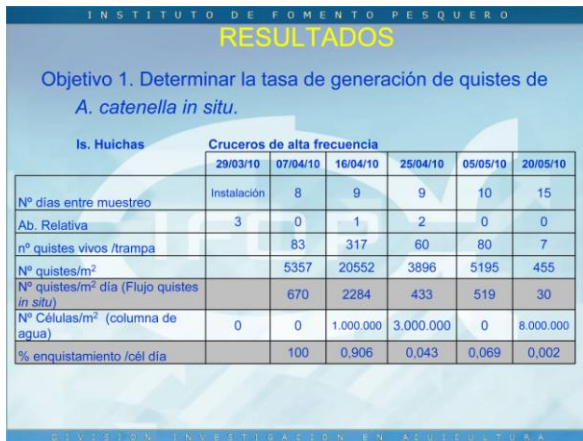
Agua efluentes de plantas: desarenadoras, depuradoras, proceso, lavadoras de artes de pesca

DIVISIÓN INVESTIGACIÓN EN ACUICULTURA

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

RESULTADOS

DIVISIÓN INVESTIGACIÓN EN ACUICULTURA



RESULTADOS

Objetivo 2. Identificar los agentes (vectores y fómites), describir los mecanismos de propagación de *A. catenella* (célula vegetativa y quistes) y evaluar los riesgos de dispersión a través de agentes de propagación.

	Nº quistes/individuo	Nº cél móviles/individuo		Nº quistes/fómite
chorito	7		redes	60
cholga	107		linternas	121
choro zapato	33		biso (chorito <i>in vitro</i>)	300
almeja	3		valvas (chorito <i>in vitro</i>)	quistes temporales, células vivas
culengue	4			
pseudofecas (choritos <i>in vitro</i>)	7467	800		

RESULTADOS

Objetivo 3. Evaluar los distintos mecanismos de eliminación o de destrucción de *A. catenella* (quistes y forma vegetativa) adheridos y/o incluidos en transvectores y en estructuras (fómites).

Objetivo 4. Evaluar distintos mecanismos de eliminación o de destrucción de *A. catenella* (quistes y forma vegetativa) para aplicar a las potenciales fuentes dispersoras de plagas de acuerdo al DSN°345/2005.

bibliografía.pdf

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

RESULTADOS

Objetivo 5. Aplicar y validar aquellos métodos de destrucción más adecuados en sistemas de traslado de peces (barcos cisterna o *wellboats*) y otras "fuentes potenciales dispersoras de plagas". Evaluar los costos de implementación de las medidas técnicas que se propongan.

SEMOPESCA.PD

DIVISIÓN INVESTIGACIÓN EN ACUICULTURA

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

RESULTADOS

Objetivo 5. Barcos cisterna o *wellboats*

DIVISIÓN INVESTIGACIÓN EN ACUICULTURA

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

RESULTADOS

Muestras Patagon IV 18-Feb-19		Muestras Patagon V 22-23 mar-19	
A. catenella N° células / L		A. catenella N° células / L	
E1 Acañillada	0	E0 Istote Bonito	0
B2	2 000	B2	1 500
B3	1 500	B3	1 500
B4	2 500	B4	1 500
B5	4 000	B5	2 500
B6	21 000	B6	1 000
B7	6 500	B7	0

E: Exterior
B: Bodega
Flujo: 70-90 L/min 35-64 L/min
Tiempo de filtrado: 10 min 10 min

DIVISIÓN INVESTIGACIÓN EN ACUICULTURA

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

RESULTADOS

Objetivo 5. Barcos cisterna o *wellboats*

Pistón azul: filtro Bernoulli

Longitud: 1.20 m
Flujo: 198 m³/h

(Gentileza: Patagonia Welboats)

DIVISIÓN INVESTIGACIÓN EN ACUICULTURA

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

RESULTADOS

Objetivo 5. y otras "fuentes potenciales dispersoras"

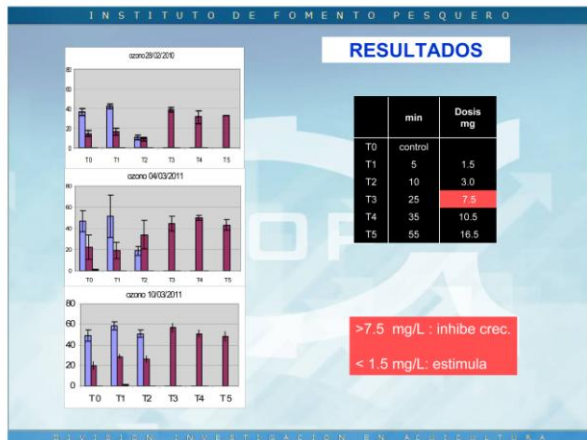
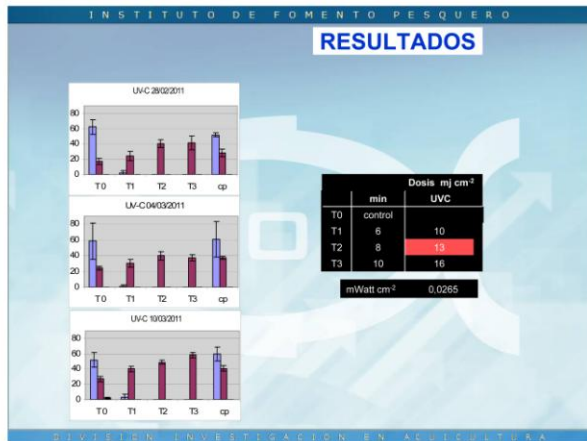
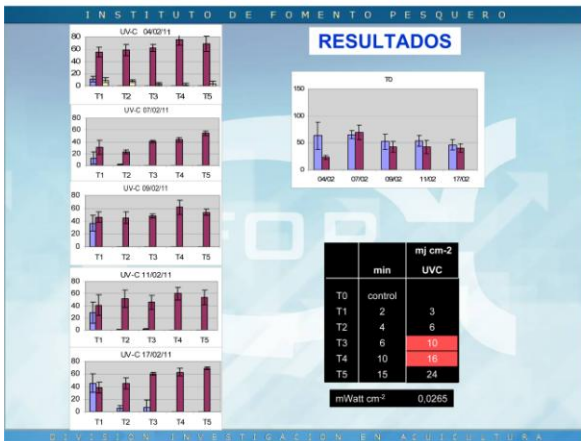
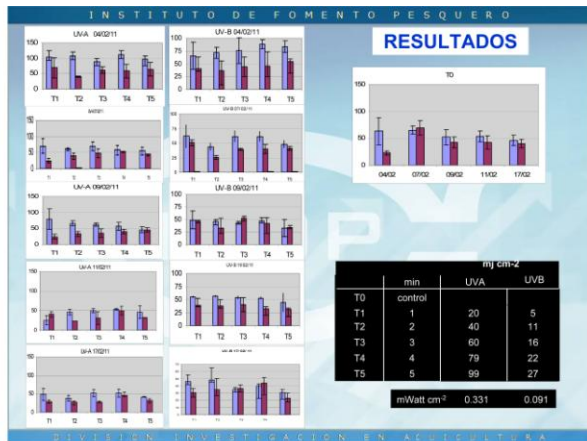
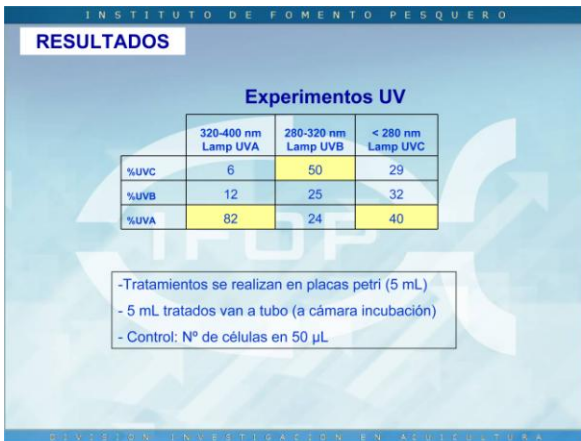
(Gentileza: Marine Harvest)

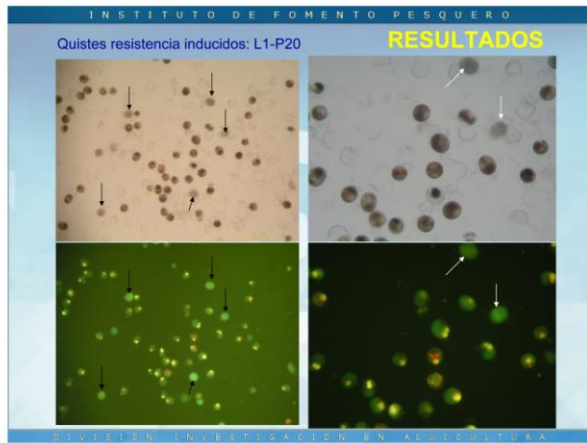
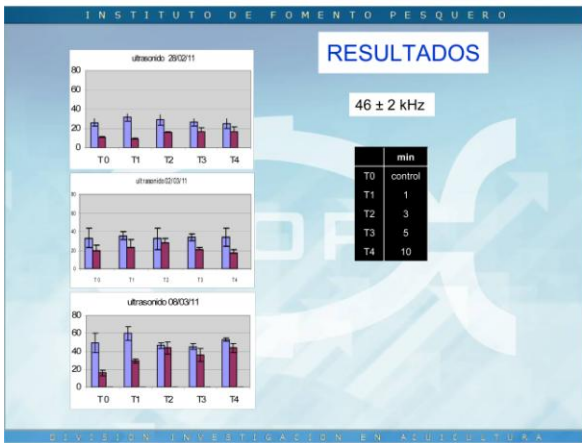
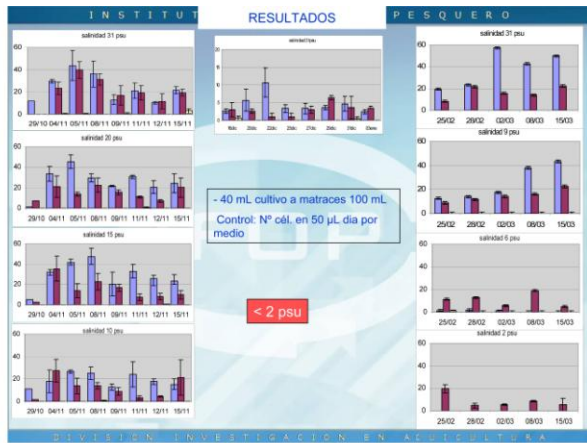
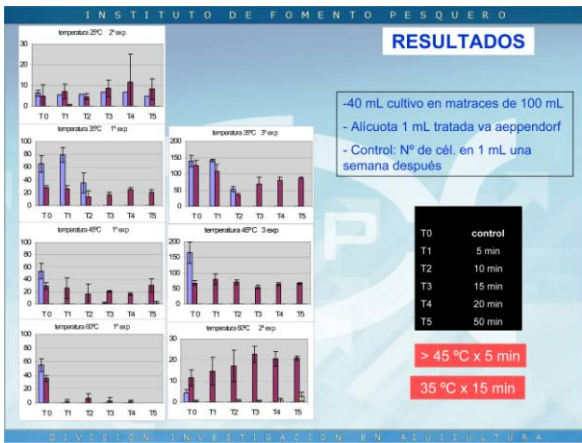
DIVISIÓN INVESTIGACIÓN EN ACUICULTURA

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

EVALUACIÓN EXPERIMENTAL ELEMENTOS

DIVISIÓN INVESTIGACIÓN EN ACUICULTURA





RESULTADOS

Quistes: Control: Salinidad 31 psu

N° días transcurridos acumulados	3	6	10	13	33	36
Número de quistes iniciales	43					
N° quistes germinados	0	6	2	0	0	2
Número de quistes germinados acumulados		6	8	8	8	10
N° cél vivas	0	12	5	2	26	3
% Promedio de germinación	0	14	19	19	19	23

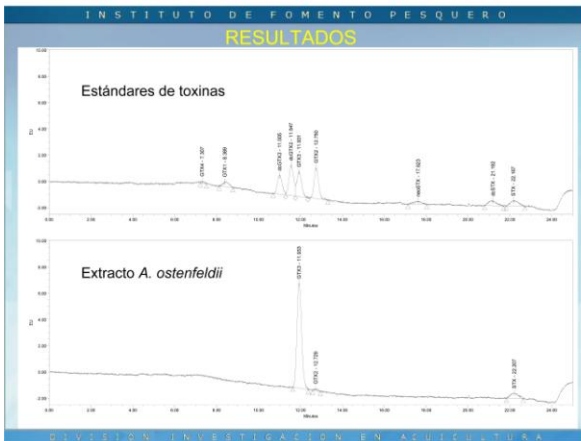
Salinidad 10 psu 34-47 quistes
Salinidad 6.3 psu
Salinidad 2.2 psu

RESULTADOS

Quistes: Control (sin UVC)

N° días transcurridos acumulados	3	6	8	10	14	20	26	36	43
Número de quistes iniciales	28								
Número de quistes germinados	5	0	1	1	0	0	0	0	0
Número de quistes germinados acumulados		5	6	7	7	7	7	7	7
N° cél vivas	10	12	14	19	65	239	234	312	725
% Promedio de quistes germinados	18	18	21	25	25	25	25	25	25

Dosis: 30 MJ cm² 25-26 quistes
Dosis: 66 MJ cm²
Dosis: 94 MJ cm²





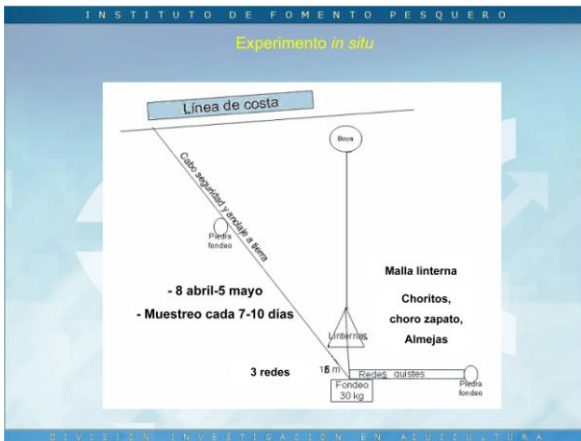
INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

Abundancia relativa *A. catenella*

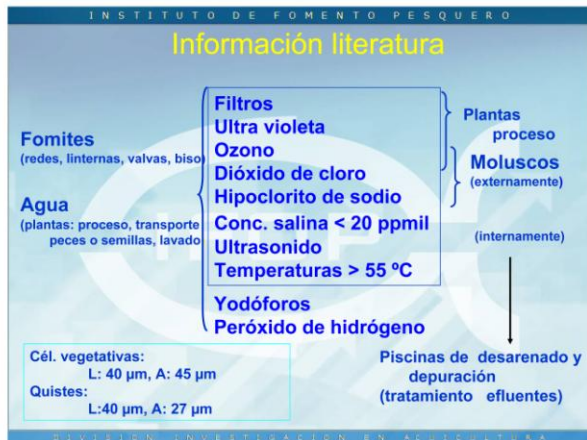
Estación	Localidad	crucero rutinario 10	crucero rutinario 1	Crucero rutinario 2	crucero rutinario 3
Fecha		6-7 -dic -09	8-mar-10	29-30-mar-10	18-abr-10
A30	I. Julián	2	5	2	3
A31	Is. Huichas	1	5	2	1
A32	I. Vergara	1	4	3	3

30 mar-5 mayo experimento trampas y vectores-fómites

DIVISIÓN INVESTIGACIÓN EN ACUICULTURA



- INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO
- Información literaria
- Filtros
 - Ultra violeta
 - Ozono
 - Dióxido de cloro
 - Hipoclorito de sodio
 - Conc. salina < 20 ppmil
 - Ultrasonido
 - Temperaturas > 55 °C
 - Yodóforos
 - Peróxido de hidrógeno
- DIVISIÓN INVESTIGACIÓN EN ACUICULTURA





Lista de invitados al Taller (esta página) y lista de asistentes (pág. Siguiente)

Nombre	Empresa /Institución	Cargo	telefono	mail
1 Mauricio Labra	Patagonia Wellboats	Gerente	(065) 384406	mlabra@wellboat.cl
2 Jaime Parra	Patagonia Wellboats	Operaciones	92561450	jparra@wellboat.cl
3 Hans Kossmann	Patagonia Wellboats	Tecnico Peces	84190347	hans_kossmann@hotmail.com
4 Cristian Olivares	Alimar Wellboats	¿Gerente? Creo		colivares@lapsa.cl
5 Carolina Almonacid	Alimar Wellboats	Asistente de C Olivares		
6 Jorge Isler	Naviera Transmarko	Gerente Area Salmones		jisler@transmarko.cl
7 Rodrigo Cid	Marine Harvest	Encargado de Planta	97999878 / 065-221307	rodrigo.cid@marineharvest.com
8 Georgina Lembeye	SUBPESCA			g lembeye@subpesca.cl
9 Daniela Guajardo	SUBPESCA			dguajardo@subpesca.cl
10 Cecilia Solis	SERNAPESCA			csolis@sernapesca.cl
11 Claudia Rosas	SERNAPESCA			crozas@sernapesca.cl
12 Gemita Pizarro	IFOP	Investigador -Jefe de Proyecto		gpizarro@ifop.cl
13 Leonardo Guzman	IFOP	Jefe División		lguzman@ifop.cl
14 Gastón Vidal	IFOP	Jefe Departamento Medio Ambiente		gvidal@ifop.cl
15 Nicole Pesse	IFOP	Investigador		nicole.pesse@ifop.cl
16 Pedro Brunetti	SUBPESCA	Director Zonal		pbrunetti@subpesca.cl
17 Patricio Steffen	SUBPESCA	PUERTO MONTT		patriciosteffen@gmail.com / smolina@subpesca.cl
18 Francisco Fernández	SERNAPESCA	Director Regional	secretaria*	mmunzenmayer@sernapesca.cl
19 Brani Montecinos	SERNAPESCA	Acuicultura PUERTO MONTT		bmontecinos@sernapesca.cl
20 Cristian Schultz	DIRECTEMAR	Encargado de medio ambiente		cschultzm@directemar.cl



	Nombre	Empresa /Institución	Mail	Teléfono	Firma
1	Mauricio Labra	Patagonia Wellboats	m.labra@wellboats.cl	3841400	[Firma]
2	Jaime Parra	Patagonia Wellboats	j.parra@wellboats.cl	8261450	[Firma]
3	Hans Kossmann	Patagonia Wellboats	hans.kossmann@hotma... 3841400		[Firma]
4	Cristian Olivares	Lapsa	Colivares@Lapsa.cl	8779492	[Firma]
5	Jorge Isler	Naviera Transmarko	woffisler@gmail.com	9423774	[Firma]
X 6	Rodrigo Cid	Marine Harvest			[Firma]
7	Eugenio Zamorano	SUBPESCA	ezamorano@subpesca.cl	052-2502858	[Firma]
X 8	Martina Delgado	SUBPESCA			[Firma]
9	Luis Daza	SUBPESCA	LDAZA@SODPESCA.cl	87929314	[Firma]
10	Bernardita Ahumada	SERNAPESCA	bahumada@sernapesca.cl	681261	[Firma]
11	Patricio González	SERNAPESCA	pgonzalez@sernapesca.cl	254152	[Firma]
12	Carolina Agullo	SERNAPESCA	Carullo@sernapesca.cl	254152	[Firma]
X 13	Braní Montecinos	SERNAPESCA			[Firma]
X 14	Carolina Hernández	SERNAPESCA			[Firma]
X 15	María Jose Cuevas	Península			[Firma]
16	Pablo Elveber	Armasur	aromasur-technics@aromasur.cl	313117	[Firma]
17	Ximena Vivanco	IFOP	ximena.vivanco@ifop.cl		[Firma]
18	Victoria Arenas	IFOP	victoria.arenas@ifop.cl		[Firma]
19	Gemita Pizarro	IFOP	gemita.pizarro@ifop.cl	61-614743	[Firma]
20	Leonardo Guzman	IFOP	leonardo.guzman@ifop.cl		[Firma]
21	Gastón Vidal	IFOP	Gaston B. Vidal S.		[Firma]
22	Nicole Pesse	IFOP	Nicole.Pesse@ifop.cl		[Firma]
23	Sergio Contreras	IFOP	Sergio.contreras@ifop.cl	61-342299	[Firma]

24 Caroline Ahumada rellmat
 25 Rosa Alejandra Vargas contact
 26 Daniela Goajardo J.
 27 Pablo Elveber

Península
 contact@gmail.com 9711769
 dgoajardo@subpesca.cl



INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

Sección Ediciones y Producción
Almte. Manuel Blanco Encalada 839
Fono 56-32-2151500
Valparaíso, Chile
www.ifop.cl



www.ifop.cl