

REPUBLICA DE CHILE
MINISTERIO DEL MEDIO AMBIENTE

**BORRADOR DE ANTEPROYECTO DE NORMAS
SECUNDARIAS DE CALIDAD AMBIENTAL PARA LA
PROTECCIÓN DE LAS AGUAS DE LA CUENCA DEL
RÍO VALDIVIA (Propuesta CONSCA 14-09-2010)**

RESOLUCIÓN EXENTA N°

SANTIAGO

VISTOS

El Décimo Programa Priorizado de Dictación de Normas de Calidad Ambiental y de Emisión aprobado por el Consejo Directivo de CONAMA mediante el acuerdo N° 273 del 21 de abril de 2005; la Resolución Exenta N° 3401, del Director Ejecutivo (s) de CONAMA, de fecha 18 de diciembre de 2006, publicada en el Diario Oficial y en el Diario La Nación el día 27 de diciembre de 2006, que dio inicio al proceso de dictación de la presente norma secundaria de calidad ambiental; la Resolución Exenta N° 1198, de fecha 24 de mayo de 2007, que amplía el plazo para la preparación del anteproyecto de norma; la Resolución Exenta N° 947, del Director Ejecutivo de CONAMA, de fecha 14 de septiembre de 2010 que ordena la acumulación del procedimiento de elaboración de las Normas Secundarias de Calidad Ambiental para la protección de las aguas del río Cruces al procedimiento de elaboración de la Normas Secundarias de Calidad Ambiental para la protección de las aguas de la cuenca del río Valdivia y los demás antecedentes que obran en el expediente; lo dispuesto en el artículo 17 del D.S. N° 93 de 1995, del Ministerio Secretaría General de la Presidencia, Reglamento para la Dictación de Normas de Calidad Ambiental y de Emisión; la Resolución N° 520 de 1996, de la Contraloría General de la República; y las facultades que me otorga la Ley 19.300.

RESUELVO

- I. Apruébase el Anteproyecto de las normas secundarias de calidad ambiental para la protección de las aguas de la cuenca río Valdivia, que es del siguiente tenor:

ANTECEDENTES GENERALES DE LA CUENCA Y FUNDAMENTACIÓN

La cuenca del río Valdivia se encuentra ubicada en territorio de la XIV R, Región de Los Ríos. Con una extensión total de 10.275 km² está compuesta principalmente por las subcuencas de los ríos Cruces y Calle Calle. Con un caudal medio anual de 92 m³/s, el río Cruces nace en la parte noreste de la cuenca, en la vertiente occidental de los cerros situados entre los lagos Villarrica y Calafquén, para luego tomar un curso suroriental hasta la confluencia con el río Calle Calle, dando origen al río Valdivia, en la ciudad homónima, a una distancia de 15 km. de la bahía de Corral, el cual tiene un caudal medio mensual de 770 m³/s. Por su parte, la subcuenca del río Calle Calle, la cual corresponde a una hoya trasandina, se origina en el extremo poniente del lago Lacar, en el nacimiento del río

Huahum, en territorio argentino. La parte de esta subcuenca que se ubica en territorio nacional abarca desde el paso internacional Huahum hasta la confluencia del Calle Calle con el río Cruces.

La parte alta de la cuenca del río Valdivia está formada por un sistema fluviolacustre, en la cual existe un número importante de grandes lagos conectados entre sí, entre los cuales destacan los lagos Calafquén, Pihueico, Neltume, Panguipulli y Riñihue. La parte baja de esta cuenca está formada por el río San Pedro, el cual constituye el desahue del lago Riñihue para continuar con el río Calle Calle y posteriormente por un complejo sistema estuarial formado por los ríos Calle Calle, Cruces y Valdivia.

Debido a la importancia, y sensibilidad de los sistemas estuariales y sobre todo a que los estuarios presentan características hidrodinámicas, fisicoquímicas y ecológicas completamente distintas a los sistemas fluviales, las cuales deben ser consideradas al momento de elaborar estrategias de protección, en este proceso normativo se ha decidido normar la porción estuarial de esta cuenca en conjunto con los ríos que dan origen a este estuario.

Los estuarios poseen una función biológica irremplazable en la producción y el desarrollo de numerosas especies, a tal punto que son reconocidos como verdaderas "áreas de crianza" y hábitats promotores para el desarrollo de larvas de distintas especies de peces, debido su alta producción biológica, tanto primaria como secundaria. Es por ello que históricamente los estuarios han sido focos de asentamientos humanos, lo que actualmente representa el difícil desafío de protección de estos ecosistemas altamente complejos y sensibles. Uno de los estuarios más importantes del centro-sur de Chile es el del Río Valdivia, el cual reviste una gran importancia ambiental y económica, registrándose en los últimos años un gran incremento de las actividades productivas asociadas a la cuenca.

El sistema estuarial de la cuenca del río Valdivia corresponde un estuario de tipo neotectónico, positivo, y de mezcla parcial. Con un régimen de mareas semidiurnas (registrando las mayores diferencias de alturas de marea durante la noche) y de tipo micromareal, es decir con rangos mareales que no superan los 2 m. La circulación mareal estuarial es reflejo de la interacción entre mareas y topografía submarina, existiendo en el caso del estuario de los ríos Valdivia y Calle-Calle un canal principal bien desarrollado, y escasas planicies submareales e intermareales. Otra característica importante, es la existencia de canales mareales que comunican estuarios, como el canal Cantera que une los estuarios Valdivia y Tomagaleones y el canal Cau-Cau, que comunica los estuarios Cruces y Valdivia.

En la parte terminal del río Cruces se ubica el Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter que corresponde a un humedal costero estuarial, que se formó como consecuencia del hundimiento del terreno con ocasión del terremoto de 1960, el cual fue declarado un sitio Ramsar por ser un sitio relevante para las especies y comunidades, aves acuáticas, peces y el ecosistema. Además del valor desde la perspectiva de la biodiversidad, el Santuario tiene valor por el potencial uso en recreación, turismo e interés educacional. El Humedal del río Cruces permite el control de la erosión, retención de sedimentos, retención de nutrientes, estabilización del clima, el control de caudales, control de sedimentación, almacenaje de aguas lo que reduce los riesgos de inundación para la población. Este Santuario de la Naturaleza tiene una superficie de 4.877 Ha.

Las principales actividades económicas asociadas a la cuenca y al sistema estuarial corresponden a las actividades silvoagropecuarias, agrícolas, ganaderas, industriales con un

gran número de empresas de este rubro (principalmente empresas forestales e industrias de la madera) y, en menor medida, actividades de acuicultura (cultivos de mitílicos y salmónidos). Además, se realizan sobre esta cuenca actividades de pesca deportiva (se registran 13 clubes) y de captación de agua potable. La población urbana, de la parte baja de la cuenca se concentra mayoritariamente en la ciudad de Valdivia, La cual en su mayoría posee servicios de alcantarillado y de tratamiento de aguas servidas. Todas estas actividades ejercen presión sobre la calidad de las aguas de la cuenca del río Valdivia, de tal manera que se hace necesaria la creación de instrumentos de gestión ambiental que permitan proteger la calidad de sus aguas y de su ecosistema.

Los principales antecedentes técnicos utilizados para el desarrollo de las normas secundarias de calidad fueron: el estudio "Diagnóstico y Clasificación de los cuerpos y cursos de Agua según objetivos de calidad", de la Dirección General de Aguas (DGA), estudios complementarios desarrollados para Conama por Aquambiente, CODEPROVAL, UACH y UCSC, el estudio Aproximación Ecotoxicológica y Evaluación de Riesgo Ecológico Teórico en apoyo al proceso de elaboración de las NSCA de la cuenca del río Valdivia, el estudio Evaluación de Riesgo Ecológico para el Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter en apoyo al proceso de elaboración de las NSCA de la cuenca del río Valdivia y todos los antecedentes obtenidos por el Comité Operativo y que constan en el expediente público de la norma.

TÍTULO I OBJETIVOS Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

Artículo 1°. El presente anteproyecto establece las normas secundarias de calidad ambiental para la protección de las aguas de la cuenca del río Valdivia.

Estas normas de calidad ambiental tienen por objetivo asegurar la conservación del patrimonio ambiental y preservación de los ecosistemas hídricos, de manera que en dichos cursos de agua se salvaguarden sus comunidades acuáticas, los usos y servicios ambientales que estos ecosistemas entregan a la sociedad en su conjunto.

Las normas secundarias de calidad ambiental, permitirán la protección y conservación de la calidad de las aguas e impedirán su deterioro futuro.

Artículo 2° El ámbito territorial de aplicación de la presente norma, corresponde al río San Pedro, el río Calle Calle, el río Cruces y el río Valdivia

TÍTULO II DEFINICIONES

Artículo 3°. Para los efectos de lo dispuesto en este decreto, se entenderá por:

1. **Aguas continentales superficiales:** Son las aguas terrestres que se encuentran naturalmente a la vista del hombre y que escurren por causas naturales.

2. **Áreas de vigilancia:** Es el cuerpo o curso de agua superficial continental, o parte de él, para efectos de asignar y gestionar su calidad. Dichas áreas corresponden a las establecidas en el artículo 4º de este anteproyecto.
3. **Autoridad competente:** Corresponden a los organismos públicos señalados en el artículo 14º.
4. **Comunidades acuáticas:** Conjunto de poblaciones biológicas que tienen en el medio acuático, continental o marino, su medio normal o más frecuente de vida y que dependen directa y/o indirectamente de éste.
5. **Estuario:** Un estuario es un cuerpo de agua costero semicerrado que se extiende hasta el límite efectivo de la influencia de la marea, dentro del cual el agua salada que ingresa por una o más conexiones libres con el mar abierto, o cualquier otro cuerpo de agua salina, es diluida significativamente con agua dulce derivada del drenaje terrestre y puede sustentar organismos eurihalinos, ya sea durante una parte o la totalidad de su ciclo de vida”.
6. **Humedal:** Las extensiones de marismas, pantanos y turberas, o superficies cubiertas de aguas, sean éstas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluidas las extensiones de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros. Podrán comprender sus zonas ribereñas o costeras adyacentes, como las islas o extensiones de agua marina de una profundidad superior a los seis metros en marea baja, cuando se encuentren dentro del humedal.
7. **Percentil:** Corresponde al valor “q” calculado a partir de los valores efectivamente medidos para cada elemento o compuesto en cada estación de monitoreo, aproximados a la unidad de medida correspondiente más próxima. Todos los valores se anotarán en una lista establecida por orden creciente para cada área determinada: $X_1 \leq X_2 \dots \leq X_k \dots \leq X_{n-1} \leq X_n$. El percentil será el valor del elemento de orden “K” para el que “K” se calculará por medio de la siguiente fórmula: $K = q * n$, donde $q = 0,85$ para el percentil 85 y “n” corresponde al número de valores efectivamente medidos. El valor “k” se aproximará al número entero más próximo.
8. **Programa de Vigilancia:** Monitoreo sistemático, destinado a caracterizar, controlar y evaluar la variación de la calidad de las aguas, en las áreas de vigilancia en un periodo determinado.

TÍTULO III NIVELES DE CALIDAD AMBIENTAL POR ÁREAS DE VIGILANCIA

Artículo 4º. Para efectos de la aplicación y fiscalización del cumplimiento de las presentes normas se han establecido para la cuenca del río Valdivia tres áreas de vigilancia. Los lugares y coordenadas (en UTM WGS 84 – Huso 18) de inicio y término de cada una de las áreas de vigilancia se establecen en la tabla siguiente:

Tabla N° 1
Áreas de Vigilancia

ÁREAS DE VIGILANCIA				
Río Cruces	RC I	De: nacimiento río Cruces	5.634.252	733.256
		Hasta: río Cruces Loncoche	5.639.597	705.228
Río Cruces	RC II	De: río Cruces Loncoche	5.639.597	705.228
		Hasta: río Cruces Bocatoma	5.619.574	681.721
Río Cruces	RC III	De: río Cruces Bocatoma	5.619.574	681.721
		Hasta: río Cruces Rucaco	5.620.006	680.443
Río Cruces	RC IV	De: río Cruces Rucaco	5.620.006	680.443
		Hasta: río Cruces Cahuincura	5.620.787	667.634
Río Cruces	RC V	De: río Cruces Cahuincura	5.620.787	667.634
		Hasta: Río Cruces San Luis de Alba	5.614.447	658.822
Río Cruces	SNCA	De: Río Cruces desde la San Luis de Alba	5.614.447	658.822
		Hasta: Confluencia Río Cruces y Río Calle Calle	5.590.372	648.860
Río Valdivia	RV	De: Confluencia Río Cruces y Río Calle Calle	5.590.372	648.860
		Hasta: desembocadura en en la bahía de Corral	5.585.128	637.966
Río Calle Calle	RCC	De: Balsa San Javier (Antihue)	5.592.061	674.754
		Hasta: Confluencia Río Cruces y Río Calle Calle	5.590.372	648.860
Río San Pedro	RSP	De: Desahue Lago Riñihue	5.595.015	716.287
		Hasta: Antihue	5.592.061	674.754

Artículo 5º. Para cada Área de Vigilancia identificada en la Tabla N° 1 del artículo anterior, se ha asignado, en la Tabla N° 2, una calidad ambiental para cada uno de los compuestos o elementos normados, teniendo en cuenta que los valores máximos y mínimos están referidos a concentraciones o unidades totales según corresponda.

Tabla N° 2
Niveles de Calidad Ambiental por Áreas Vigilancia

CUENCA RÍO VALDIVIA			ÁREAS DE VIGILANCIA								
N°	Elemento o compuesto	Unidad	RSP	RCC	RV	RC I	RC II	RC III	RC IV	RC V	SNCA
1	pH	-	6,5-8,0	6,5-8,5	6,5-8,5	6,0-7,5	6,5-8,0	6,5-8,0	6,5-8,0	6,5-8,0	6,5-8,0
2	Oxígeno	mg/L	> 8,3	> 8,9	> 8	> 9,4	> 9	> 8,8	> 9,7	> 8,5	> 8,5
3	Conductividad	µS/cm	71,3	100	-	46,7	41,6	49,6	102	90,4	-
4	Sulfato	mg/l	1	2,0**	-	1	2,0**	2,0**	4,1	6,9	-
5	Sodio	mg/l	4,34	4,6	-	3,4	4,6	3,9	8,7	7,3	-
6	Cloruro	mg/l	4,71	7,1	-	6,26	5,03	4,9	9,3	10	-
7	Calcio	mg/l	6,9	7,7	-	5,09	7,39	4,4	4	-	-
8	Magnesio	mg/l	4,7	1,5	-	1,9	2,36	1,9	1,87	-	-
9	Potasio	mg/l	2,6	1,8	-	0,75	0,84	2,12	2,25	-	-
10	Aluminio	mg/l	0,2	0,4	0,8	0,5	0,3	0,40	0,49	0,06 *	0,22
11	Cobre	mg/L	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,1
12	Cromo	mg/L	-	0,02	0,02	-	-	-	-	-	-
13	Hierro	mg/L	0,13	0,56	0,81	0,5	0,34	0,43	0,39	0,5	0,4
14	Manganeso	mg/L	0,04	0,04	0,08	0,1	0,03	0,03	0,03	0,05	0,8
15	Mercurio	mg/l	-	0,002	0,002	-	-	-	-	-	-
16	Zinc	mg/l	0,08	0,03	0,04	0,05	0,05	0,03	0,02	0,06	0,04
17	Nitrato	mg/L	0,04	0,07	0,14	0,14	0,13	0,15	0,12	0,41	-
18	Fosfato	mg/L	0,01	0,01	0,017	0,04	0,02	0,01	0,03	-	-

* Referido al valor de la fracción disuelta

TÍTULO IV PROGRAMA DE VIGILANCIA

Artículo 6º. El monitoreo de las normas secundarias deberá efectuarse de acuerdo a un Programa de Vigilancia aprobado por resolución por las autoridades competentes y en coordinación con la el Ministerio de Medio Ambiente y la Superintendencia de Medio Ambiente, si corresponde. Dicho programa será de conocimiento público y en él se señalarán, a lo menos, los datos que sean representativos de las áreas de vigilancia, las estaciones de monitoreo de calidad del agua, las frecuencias de monitoreo, las responsabilidades y las metodologías analíticas seleccionadas. Los programas para su aprobación deberán cumplir con lo dispuesto en el presente artículo y con el Título V del presente decreto.

El programa de vigilancia podrá incorporar el monitoreo de compuestos y elementos adicionales a los establecidos en la presente norma, así también como nuevas estaciones de monitoreo de calidad de agua, con la finalidad de generar información para revisiones futuras de la norma. Además, los bioensayos, los bioindicadores y análisis de sedimentos podrán ser utilizados como herramientas complementarias para determinar los impactos producidos sobre las comunidades acuáticas y calidad de agua

Las mediciones obtenidas con anterioridad a la aprobación del programa de vigilancia podrán ser validamente utilizadas para el control de la norma cuando cumplan con los requisitos exigidos en este artículo y en el Título V del presente anteproyecto.

TÍTULO V METODOLOGÍAS DE MUESTREO Y ANÁLISIS

Artículo 7°. El monitoreo se efectuará de acuerdo a los métodos de muestreo y condiciones de preservación de muestras establecidos en las normas chilenas oficiales que se indican a continuación o a sus versiones actualizadas.

Identificación	Título de la norma
NCh411/1.Of96	Calidad del agua – Muestreo – Parte 1: Guía para el diseño de programas de muestreo.
NCh411/2.Of96	Calidad del agua – Muestreo – Parte 2: Guía sobre técnicas de muestreo
NCh411/6.Of96	Calidad del agua – Muestreo – Parte 6: Guía para el muestreo de ríos y cursos de agua.
NCh411/3.Of96	Calidad del agua – Muestreo – Parte 3: Guía sobre la preservación y manejo de las muestras.
Collection and Preservation of Samples	Descritas en el número 1060 del "Standard Methods" for Examination of Water and Wastewater.

Artículo 8°. La determinación de los compuestos o elementos incluidos en estas normas podrán efectuarse de acuerdo a los métodos analíticos que se indican a continuación, o a sus versiones actualizadas, teniendo en cuenta que los resultados deberán referirse a valores totales en los compuestos o elementos que corresponda.

Metodologías descritas en: Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 21th Edition 2005, APHA-AWWA-WPCF; y metodologías analíticas utilizadas por el Laboratorio Nacional de la Dirección General de Aguas.

Parámetros	Metodologías
Aluminio	3500-AI B. Eriochrome Cyanine R Method 3111 D. Direct Nitrous Oxide-Acetylene Flame Method* 3120 B Inductively Coupled Plasma (ICP) Method. 3125 B Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry (ICP/MS) Method
Calcio	3111 B. Direct Air-Acetylene Flame Method*
Cloruro	4500-Cl B. Argentometric Method 4500 Cl C. Mercuric Nitrate Method* 4110 Determination of Anions by Ion Chromatography
Cobre	3500-Cu B. Neocuproine Method 3113 B. Electrothermal Atomic Absorption Spectrometric Method. 3120 B Inductively Coupled Plasma (ICP) Method. 3125 B Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry (ICP/MS) Method 3111 B. Direct Air-Acetylene Flame Method.*

Parámetros	Metodologías
Conductividad Eléctrica	2510 B Laboratory Method*
Cromo	3113 B. Electrothermal Atomic Absorption Spectrometric Method. 3120 B Inductively Coupled Plasma (ICP) Method. 3125 B Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry (ICP/MS) Method 3111 B. Direct Air-Acetylene Flame Method*
Hierro	3111 B. Direct Air-Acetylene Flame Method* 3500 Fe-B Phenanthroline Method 3113 B. Electrothermal Atomic Absorption Spectrometric Method. 3120 B Inductively Coupled Plasma (ICP) Method.
Magnesio	3111 B. Direct Air-Acetylene Flame Method*
Manganeso	3111 B. Direct Air-Acetylene Flame Method* 3113 B. Electrothermal Atomic Absorption Spectrometric Method. 3120 B Inductively Coupled Plasma (ICP) Method. 3125 B Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry (ICP/MS) Method
Mercurio	3112 B. Cold-Vapor Atomic Absorption Spectrometric Method. 3125 B. Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry (ICP/MS) Method
Molibdeno	3113 B. Electrothermal Atomic Absorption Spectrometric Method. 3125 B Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry (ICP/MS) Method
Níquel	3113 B. Electrothermal Atomic Absorption Spectrometric Method. 3125 B Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry (ICP/MS) Method
Oxígeno Disuelto	4500-O G. Membrane Electrode Method ASTM International, 2006, D888-05 standard test methods for dissolved oxygen in water
pH	4500-H+ B. Electrometric Method
Sodio	3111 B. Direct Air-Acetylene Flame Method* 3500-Na B. Flame Emission Photometric Method
Sulfato	4500-SO42- Turbidimetric Method* 4110 Determination of Anions by Ion Chromatography
Zinc	3111B. Direct Air-Acetylene Flame Method* 3120 B. Inductively Coupled Plasma (ICP) Method 3125 B. Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry (ICP/MS) Method
PARÁMETROS DE LA RED DE OBSERVACIÓN	
Fosfato	4500-P B. Sample Preparation 4500-P C. Vanadomolybdophosphoric Acid Colorimetric Method 4500-P D. Stannous Chloride Method 4500-P E. Ascorbic Acid Method

Parámetros	Metodologías
	4110 B. Ion Chromatography with Chemical Suppression of Eluent Conductivity
Nitrato	4110 B. Ion Chromatography with Chemical Suppression of Eluent Conductivity 4500-NO3_ B. Ultraviolet Spectrophotometric Screening Method 4500-NO3_ D. Nitrate Electrode Method
Nitrogeno Kjendahl	4500-Norg B. Macro-Kjeldahl Method 4500-Norg C. Semi-Micro-Kjeldahl Method

* Metodología analítica utilizada por el Laboratorio Nacional de la Dirección General de Aguas.

Otras metodologías descritas en La Agencia de Protección Ambiental de los EEUU. (USEPA):

Parámetros	Metodologías
Calcio	Method 200.7 Determination of metals and trace elements in water and wastes by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Rev. 4.4 1994.
Elementos Traza	Method 1638. Trace Elements in Ambient Waters by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. (ICPMS)
Metales Traza	Method 1669. Sampling Ambient Water for Trace Metals. Trace Metal Cleanroom. EPA 600/R/96/018.

Artículo 9º. Para los casos en que exista más de una metodología para determinar un compuesto o elemento, según lo establecido en el artículo anterior, corresponderá a las autoridades competentes evaluar la metodología a utilizar, teniendo en consideración la concentración regulada y la sensibilidad del método analítico, para posteriormente informar en el programa de vigilancia.

TÍTULO VI CUMPLIMIENTO Y EXCEDENCIAS

Artículo 10º. El cumplimiento de las normas contenidas en el presente anteproyecto deberá verificarse de acuerdo con el Programa de Vigilancia, y en base a los datos por compuesto o elemento obtenidos en cada una de las áreas de vigilancia que se indican en el artículo 4º de este anteproyecto.

Artículo 11º. Se considerarán sobrepasadas las normas secundarias de calidad establecida en el presente decreto, cuando el percentil 85 de las concentraciones de las muestras

analizadas para un compuesto o elemento, según la frecuencia mínima establecida en el Programa de Vigilancia y durante dos años consecutivos, sean mayores a los límites establecidos en las presentes normas.

Se considerarán también sobrepasadas las normas secundarias de calidad establecidas en el presente decreto, si antes de concluir el primera año de control se registrase al menos 2 periodos de monitoreo, según frecuencia mínima establecida en el Programa de Vigilancia, en los cuales algunos de los parámetros normados registre concentraciones mayores a los límites establecidos en las presentes normas

Para el caso del oxígeno disuelto, la concentración deberá ser mayor o igual a los límites establecidos en la presente norma, y para el caso del pH, la concentración debe fluctuar entre el rango determinado en la presente norma, incluyendo los extremos.

Artículo 12º. Cuando la representatividad de las muestras analizadas se vea afectada por fenómenos excepcionales y/o transitorios tales como inundaciones, sequias, catástrofes naturales, los datos podrán no ser incluidos en las mediciones destinadas a verificar el cumplimiento de las normas secundarias.

En el evento que, sobre la base de información objetiva verificada por la autoridad competente, se determine que la superación de las normas secundarias de calidad para algún compuesto, elemento o parámetro se debe a factores naturales, esta superación no dará lugar a la declaración de zona como saturada o latente.

TÍTULO VII FISCALIZACIÓN

Artículo 13º. Corresponderá a la Dirección General de Aguas, DIRECTEMAR y la Superintendencia de Medio Ambiente fiscalizar el cumplimiento de las normas secundarias de calidad ambiental, comprendidas en el presente anteproyecto.

Lo anterior, no obsta a las atribuciones sobre fiscalización que éstos u otros organismos públicos posean conforme a la legislación vigente.

TÍTULO VIII INFORME DE CALIDAD

Artículo 14º. El Ministerio del Medio Ambiente, coordinará a las autoridades competentes en la elaboración de un Informe de Calidad destinado a divulgar el cumplimiento de las normas secundarias de calidad ambiental contenidas en el presente decreto. Dicho informe será de conocimiento público y será publicado anualmente, exceptuando el primero que será publicado una vez que se haya cumplido el plazo establecido en el artículo 11.

Para efecto de lo anterior, dentro de los tres primeros meses de cada año, las autoridades competentes deberán proveer, al Ministerio del Medio Ambiente, toda la información pertinente.

El informe de calidad deberá señalar, fundadamente, al menos el cumplimiento de las normas secundarias de calidad ambiental contenidas en el presente decreto, para cada uno

de los parámetros normados en cada una de las áreas de vigilancia establecidas en el artículo 5.

TÍTULO IX VIGENCIA

Artículo 15º. Las normas secundarias de calidad ambiental para la protección de las aguas de la cuenca del río Valdivia, entrarán en vigencia con la publicación del presente decreto en el diario oficial.

Para tales efectos:

- a) Remítase copia del expediente al Consejo Consultivo del Ministerio del Medio Ambiente, para que emita su opinión sobre el anteproyecto de normas secundarias de calidad. Dicho Consejo dispondrá de 60 días contados desde la recepción de la copia del expediente, para el despacho de su opinión. La opinión que emita el Consejo Consultivo del Ministerio del Medio Ambiente será fundada, y en ella se dejará constancia de los votos disidentes.
- b) Dentro del plazo de 60 días, contados desde la publicación en el Diario Oficial, del extracto de la presente resolución, cualquier persona, natural o jurídica, podrá formular observaciones al contenido del anteproyecto de las normas secundarias de calidad. Dichas observaciones deberán ser presentadas, por escrito, en la SEREMI del Medio Ambiente correspondiente al domicilio del interesado y deberán ser acompañadas de los antecedentes en los que se sustentan, especialmente los de naturaleza técnica, científica, social, económica y jurídica.

Anótese, publíquese en extracto, comuníquese y archívese.

**MARÍA IGNACIA BENITEZ PEREIRA
MINISTRA
MINISTERIO DEL MEDIO AMBIENTE**



UNIVERSIDAD CATOLICA
DE TEMUCO

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS AMBIENTALES
Laboratorio Ecotoxicología y Monitoreo Ambiental
Laboratorio de Limnología y Recursos Hídricos

***Evaluación de riesgo ecológico para el
Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter
como apoyo a la elaboración del anteproyecto
de las normas secundarias de calidad
ambiental para la protección de las aguas de la
cuenca del río Valdivia, Región de Los Ríos.***

5604-1-LE10



EQUIPO DE TRABAJO

Director Proyecto: Dr. Francisco Ramón Encina Montoya

Laboratorios de Ecotoxicología y Monitoreo Ambiental & Limnología y Recursos Hídricos.
Escuela de Ciencias Ambientales, Facultad de recursos Naturales. Universidad Católica de
Temuco, Manuel Montt 56, Casilla 15-D, Temuco, Chile. fencina@uct.cl

Equipo de trabajo

Dr. Francisco Ramón Encina Montoya

Laboratorio Ecotoxicología y Monitoreo Ambiental
Escuela de Ciencias Ambientales
Facultad de Recursos Naturales

Dr. David Figueroa Hernández

Laboratorio de Limnología y Recursos Hídricos
Escuela de Ciencias Ambientales
Facultad de Recursos Naturales

Ing. Acuicultura Carlos Felipe Aguayo Arias

Laboratorio Ecotoxicología y Monitoreo Ambiental
Laboratorio de Limnología y Recursos Hídricos
Escuela de Ciencias Ambientales
Facultad de Recursos Naturales

Lic. en RRNN Carolina Soto Vidal

Laboratorio Ecotoxicología y Monitoreo Ambiental
Escuela de Ciencias Ambientales
Facultad de Recursos Naturales



Lic. RR.NN. Katherine Weisser Scheel.

Laboratorio de Ecotoxicología y Monitoreo Ambiental.

Laboratorio de Limnología y Recursos Hídricos.

Escuela de Ciencias Ambientales.

Facultad de Recursos Naturales.

Lic. en RRNN Amerindia Jaramillo Allendes.

Laboratorio Ecotoxicología y Monitoreo Ambiental

Escuela de Ciencias Ambientales

Facultad de Recursos Naturales

Edith Méndez

Químico Laboratorista

Laboratorio Ecotoxicología y Monitoreo Ambiental

Escuela de Ciencias Ambientales

Facultad de Recursos Naturales



INDICE

i. Portada	1
RESUMEN EJECUTIVO	9
I. INTRODUCCION	20
II. OBJETIVOS	23
III. MATERIALES Y METODOS	24
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
V. CONCLUSIONES	134
VI. RECOMENDACIONES	136
VII. BIBLIOGRAFIA	138
VIII. ANEXOS	143



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Profesionales que integraron el panel de expertos para determinar especies a utilizar en bioensayos de toxicidad.	30
Tabla 2. Rangos para selección de especies.	31
Tabla 3. Taxa empleados en realización de bioensayos de toxicidad Santuario de la Naturaleza.	38
Tabla 4. Concentraciones de metales en bioensayos de <i>Daphnia obtusa</i> .	40
Tabla 5. Resumen de las condiciones en que fueron llevados a cabo los bioensayos con <i>Daphnia obtusa</i> .	41
Tabla 6. Concentraciones evaluadas de microalgas.	44
Tabla 7. Resumen de las condiciones en que se efectuaron los bioensayos con <i>Selenastrum capricornutum</i> .	44
Tabla 8. Resumen de las condiciones en que se efectuaron los bioensayos con Leptophlebiidae.	49
Tabla 9. Alimento para cultivo.	52
Tabla 10. Variables controladas para la manipulación de Chironomidos.	52
Tabla 11. Condiciones de ensayo de sobrevivencia.	53
Tabla 12. Resumen de las condiciones en que se efectuaron los bioensayos con individuos de la familia Galaxiidae.	57
Tabla 13. Concentraciones probadas en bioensayos de peces nativos.	57
Tabla 14. Cálculos previos bioensayos con <i>Oncorhynchus mykiss</i> .	58
Tabla 15. Consideraciones generales para bioensayos con peces según EPA (1998).	59
Tabla 16. Fecundidad de hembras cultivadas en laboratorio y su talla, así como la talla de los huevos que portaban.	98
Tabla 17. Ensayos de sobrevivencia individuos de una familia Chironomidae nativo (Chironominae) usando agua reconstituida (situación control).	101
Tabla 18. Promedio y desviación estándar de parámetros en bandejas de cultivo en laboratorio (n=9)	103
Tabla 19. Taxa empleados en realización de bioensayos de toxicidad Santuario de la Naturaleza.	110
Tabla 20. Resumen Estadístico para Microalgas LC ₅₀ .	112
Tabla 21. Resumen Estadístico para <i>Chlorella sp.</i>	113
Tabla 22. Resumen Estadístico para <i>Daphnia obtusa</i> .	114
Tabla 23. Resumen Estadístico para <i>Daphnia ambigua</i> .	115
Tabla 24. Resumen Estadístico para <i>Meridialaris sp</i> (Leptophlebidos).	116
Tabla 25. Resumen Estadístico para <i>Paratanytarsus grimmii</i> (Chironomidos)	117
Tabla 26. Resumen Estadístico para <i>Oncorhynchus mykiss</i> .	118
Tabla 27. Tabla resumen resultados bioensayos realizados.	119
Tabla 28. Valores de LC ₅₀ promedios de especies nativas y estandarizadas para el Santuario de la Naturaleza, Río Cruces.	123
Tabla 29. Porcentaje de datos bajo el límite de detección para la estimación de exposición de percentiles de exposición para metales	126



Tabla 30. Resumen de los percentiles para las concentración de Al, Cu, Fe, Mn y Zn Informe UCT (2009).	127
Tabla 31. Relación Metales Disueltos y Metales Totales (porcentual).	128
Tabla 32. Resumen relación Metales Disueltos y Metales Totales (porcentual).	129
Tabla 33. Concentraciones de No Efecto (PNEC) y porcentajes (%) de especies protegidas para Aluminio.	130
Tabla 34. Concentraciones de No Efecto (PNEC) y porcentajes (%) de especies protegidas para Cobre.	130
Tabla 35. Concentraciones de No Efecto (PNEC) y porcentajes (%) de especies protegidas para Hierro.	131
Tabla 36. Concentraciones de No Efecto (PNEC) y porcentajes (%) de especies protegidas para Manganeso.	131
Tabla 37. Concentraciones de No Efecto (PNEC) y porcentajes (%) de especies protegidas para Zinc.	132
Tabla 38. Criterios de calidad de Aguas para la protección acuática (National Recommended Water Quality Criteria EPA-822-R-02-047, 2002).	132
Tabla 39. Valores propuestos por UCT (2009) considerando especies estandarizadas y un Factor de seguridad de 100.	133
Tabla 40. Resumen de los límites propuestos para norma del Santuario del Río Cruces basado en un enfoque de evaluación de riesgo probabilístico.	133



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hidrografía cuenca del río Valdivia, región de Los Ríos.	25
Figura 2. Carta localización Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter, Cuenca del río Valdivia, región de Los Ríos.	26
Figura 3. Flujo Metodológico.	29
Figura 4. Disposición de envases bioensayo con microcrustáceo <i>Daphnia obtusa</i> .	41
Figura 5. Disposición de envases Bioensayo con <i>Selenastrum capricornutum</i> .	43
Figura 6. Sistemas de recolección y selección de especies.	46
Figura 7. Sistemas de transporte y envases de traslados de especies	47
Figura 8. Disposición de envases bioensayos con invertebrado bentónicos nativos.	48
Figura 9. Sistema implementado para realizar bioensayos con invertebrado bentónicos nativos.	48
Figura 10. Materiales empleados en terreno captura Chironomidos.	50
Figura 11. Transporte de larvas e instrumentos de medición.	50
Figura 12. Manipulación de larvas.	51
Figura 13. Oviposturas sometidas a estrés térmico durante un máximo de 4 días.	53
Figura 14. Batería de ensayo usada para determinar sobrevivencia de larvas bajo una condición control	54
Figura 15. Acondicionamiento de peces en Laboratorio.	55
Figura 16. Disposición acuarios bioensayos con peces nativos.	56
Figura 17. Bioensayos con <i>Oncorhynchus mykiss</i> .	59
Figura 18. Esquema Enfoques Especies de Relevancia Ecológica.	66
Figura 19. Microfotografía <i>Daphnia obtusa</i> .	88
Figura 20. Microfotografía de <i>Raphidocelis subcapitata</i> (<i>Selenastrum capricornutum</i>).	89
Figura 21. Cultivo de microalgas del santuario de la naturaleza mantenidos a 26 ° T.	91
Figura 22. <i>Asplanchna brightwellii</i>	94
Figura 23. Aislamiento Cladóceros	96
Figura 24. Incubadora de Zooplancton a 18°C.	97
Figura 25. A. - Género <i>Bosminia</i> Hembra incubante con 4 ejemplares preeclusión; B.- <i>Chytorus sp.</i>	97
Figura 26. Variación de temperatura máxima y mínima en sala de cultivo.	99
Figura 27. Ciclo de vida Diptera - Chironominae - obtenido en condiciones controladas.	100
Figura 28. Crecimiento en longitud de larvas de Chironominae.	101
Figura 29. Curva y ecuación de crecimiento de Chironominae estimada bajo condiciones de cultivo intensivo.	102
Figura 30. Grafico temperatura máximas y mínimas, período del 22-06-10 al 11-07-10.	103
Figura 31. Carta de control para los LC ₅₀ -96 h de <i>Selenastrum capricornutum</i> .	113
Figura 32. Carta de control para los LC ₅₀ -96 h de <i>Chlorella sp.</i>	114
Figura 33. Carta de control para los CL ₅₀ -48 h <i>D. obtusa</i> .	115



Figura 34. Carta de control para los LC_{50} - 48 h <i>Daphnia ambigua</i>	116
Figura 35. Carta de control para los LC_{50} - 48 h de Leptophebidos.	117
Figura 36. Carta de control para los LC_{50} - 48 h de <i>Paratanytarsus grimmii</i> .	118
Figura 37. Carta de control para los LC_{50} - 48 h de <i>Oncorhynchus mykiss</i> .	119
Figura 38. Perfil de medias de Conductividad de las estaciones Cuenca río Cruces.	126



RESUMEN EJECUTIVO.

Introducción.

Durante los últimos años, los esfuerzos de protección de recursos hídricos se han centrado en generar procesos de elaboración de Normas Secundarias de Calidad Ambiental para la protección de las aguas de diferentes cuencas hidrográficas a lo largo del país, lo anterior motivado principalmente por la preocupación que ha generado el continuo aumento en la actividad humana que produce alta presión sobre el entorno y en especial sobre los recursos hídricos, generando riesgos para la protección y conservación del medio ambiente, así como también para la preservación de los recursos naturales que se asocian a dicho territorio. La degradación de la calidad del recurso hídrico ha motivado la necesidad de generar iniciativas tendientes a proteger y conservar este recurso natural.

Las Normas Secundarias de Calidad Ambiental para la Protección de las Aguas del río Cruces, fueron incluidas en forma especial en el "Noveno Programa Priorizado de Normas", dada la situación de alteración que afectó específicamente al "Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter". Sin embargo, debido a la escasez de antecedentes técnicos existentes en ese período, el ámbito territorial de aplicación de estas normas se limitó a la fracción limnética del río Cruces, dejando fuera de este proceso normativo la zona estuarial de este río, es decir al "Santuario" en sí. Por tal motivo, a fines del año 2006 se dio inicio a la elaboración de las Normas Secundarias de Calidad Ambiental para la protección de las aguas de la cuenca del río Valdivia, proceso normativo incluido en el "Décimo Programa Priorizado de Normas", el cual resulta una regulación ambiental complementaria a las Normas Secundarias de Calidad Ambiental del río Cruces, ya que dentro del ámbito territorial de aplicación de estas normativas se encontraría la parte estuarial del río Cruces además de la porción estuarial del río Calle Calle y el río Valdivia.

Actualmente se han incorporado antecedentes técnicos al estudio de calidad de aguas de esta cuenca, los cuales han surgido a partir de la elaboración de los dos procesos normativos antes mencionados, y han permitido describir en forma general las características hidrodinámicas y fisicoquímicas de la cuenca del río Valdivia.



Estas normas secundarias de calidad ambiental definen el estado deseado por la sociedad para un recurso ambiental. En el caso de las aguas, las normas de calidad ambiental deberían definir el estado que éstas deben presentar en los cursos y cuerpos de agua y no de acuerdo con los usos finales que se pretende dar a los recursos hídricos tales como riego, agua potable, vida acuática, recreación con contacto, etc.

La cuenca del río Cruces se caracteriza por presentar amplias zonas de inundación estacional y permanente en las riberas, esta cuenca presenta un régimen netamente pluvial, dominada por humedales de tipo ribereño y palustre, con influencia estuarina en la zona inferior. El área fue declarada legalmente como Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter el 3 de junio de 1981, mediante decreto N° 2.734 del Ministerio de Educación; el mismo año ingresa a la nómina de la Convención sobre los Humedales de Importancia Internacional (Convención Ramsar), convirtiéndose en el primer sitio de Chile protegido bajo este esquema de conservación. El Santuario incluye el lecho, islas y zonas de inundación de los ríos Cruces y Chorocamayo, correspondiendo a una reserva acuática de aproximadamente 4.877 ha, ubicada en el sector estuarial del río Cruces.

Esta área presenta un alto valor desde la perspectiva de la biodiversidad, centrado a su vez en el potencial uso de ésta en recreación, turismo e interés educacional para la práctica de la educación e interpretación ambiental. Debido a la alta fragilidad de este ecosistema a las modificaciones ambientales ha sido necesario evaluar acabadamente los potenciales impactos que las actividades productivas aledañas al humedal que pudiesen generar y determinar de manera específica los efectos tóxicos a que se ve expuesto este sistema, todo ello con la finalidad de proteger, mantener y/o recuperar la calidad de las aguas continentales superficiales, de manera de salvaguardar el aprovechamiento del recurso hídrico, las comunidades acuáticas y los ecosistemas, maximizando los beneficios ambientales, sociales y económicos en esta cuenca de uso múltiple.

En términos cualitativos, el agua constituye una parte esencial de los ecosistemas acuáticos de la cuenca de los ríos. Una reducción de la calidad del recurso, genera efectos negativos sobre dichos ecosistemas, por lo que es necesario mantener la calidad de sus aguas para la conservación de la diversidad que sustentan, no sólo por su valor intrínseco, sino también por los servicios ambientales esenciales para el ser humano.



La gestión ambiental del recurso hídrico requiere del empleo de una serie de herramientas que asegure su uso de manera sustentable, protegiendo y manteniendo su calidad, resguardando el desarrollo de los usos prioritarios y asegurando la preservación de comunidades acuáticas y sistemas bióticos asociados. Las normas ambientales son una de las herramientas de gestión ambiental más ampliamente empleadas, las cuales establecen, por acuerdo entre los distintos sectores de la sociedad, cuáles serán los niveles de sustancias contaminantes que serán considerados aceptables y seguros para la salud del ser humano y del medio ambiente (CONAMA 2003).

En relación a las orientaciones técnicas para establecer los niveles de protección de los ecosistemas acuáticos en Chile, éstas se contienen en la "Guía CONAMA para el establecimiento de las normas secundarias de calidad ambiental para aguas continentales superficiales y marinas" (2004), cuyo objetivo principal es "proteger, mantener o recuperar la calidad de las aguas continentales superficiales de manera de salvaguardar el aprovechamiento del recurso, la protección y conservación de las comunidades acuáticas y de los ecosistemas lacustres, maximizando los beneficios sociales, económicos y ambientales".

De acuerdo a CONAMA (1995), los valores límites para estas normas son estimados a partir la data histórica de parámetros físico químicos, seleccionando el percentil 66 o superior, sin embargo y paradójicamente, sólo considera criterios físico-químicos y excluye los criterios biológicos que son el objetivo de las normas secundarias por definición. Además, los valores estimados a partir de los percentiles, pueden ser influenciados por la sensibilidad de los métodos analíticos empleados y la evolución en el uso de la cuenca. En particular muchos de los datos en análisis corresponden a valores bajo los niveles de detección, los cuales presentan un grave problema de interpretación ya que afectan la distribución de los datos induciendo a docimaciones falsas (Keith et al. 1983).

Surge así la necesidad de establecer niveles de protección de los ecosistemas acuáticos y determinar las respuestas de organismos nativos de ambientes acuáticos chilenos frente a diversos xenobióticos, puesto que es probable que los organismos nativos tengan sensibilidades distintas que los organismos estandarizados frente a contaminantes determinados, lo que generaría normas que podrían sobreestimar los niveles de protección. Si bien muchas de las pruebas ecotoxicológicas y las especies a utilizar están



estandarizadas, el objetivo final de la aplicación de criterios biológicos a la evaluación de recursos hídricos es que los resultados permitan proteger los ecosistemas naturales. Sin embargo, dada la complejidad que presentan los ecosistemas acuáticos, no es posible evaluar el efecto de contaminantes sobre la totalidad de los organismos que viven en ellos, debiendo evaluar los efectos individuales de los contaminantes, utilizando para ello especies de prueba representativas de los ecosistemas analizados, las cuales deben ser seleccionados mediante criterios ecológicos, de sensibilidad a contaminantes y factibilidad de cultivo en condiciones de laboratorio.

En este sentido el informe "Evaluaciones del Desempeño Ambiental", elaborado por la Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE) y la Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL) de las Naciones Unidas (2005), recomendó a Chile: i) Aplicar políticas ambientales de forma cabal y eficiente, ii) Profundizar en la integración de las consideraciones ambientales en las decisiones económicas, sociales y sectoriales, iii) Reducir los efectos de las actividades productivas e industriales sobre la calidad y la cantidad del agua, iv) Desarrollar un enfoque integrado de gestión de cuencas para mejorar el manejo de los recursos hídricos y forestales y v) Mayor énfasis en el manejo del agua para la protección de los ecosistemas acuáticos.

A la fecha se han iniciado varios procesos de elaboración de normas secundarias de calidad ambiental para la protección de las aguas continentales superficiales y marinas en nuestro país. La elaboración de estas normas secundarias de calidad, requiere ser asumidas regionalmente, para los efectos de incorporar la realidad ambiental, económica y social del territorio regional, pero a su vez deben constituir procesos homogéneos y estandarizados acordes con los criterios nacionales establecidos (INGAM LTDA 2008).

En cuanto a la gestión y evaluación de recursos hídricos ésta ha sido abordada en los Estados Unidos (EEUU) y en la Comunidad Europea (CE), incorporando en los programas de monitoreos además de los parámetros físico-químicos tradicionales, los criterios biológicos (bioindicadores y otros) bajo un enfoque de cuenca hidrográfica (USEPA, 1992; Directiva 60/EC, 2002). Así, la Directiva Marco del Agua (DMA) 2000/60/EC, ha introducido una nueva perspectiva en la política de aguas, incorporando la Evaluación de Riesgos Ambientales (ERA) de contaminantes industriales y de productos fitosanitarios (insecticidas, herbicidas y fungicidas) sobre sistemas ecológicos y humanos. El desarrollo de ERA se basó en los enfoques de la Evaluación de Riesgos para la Salud Humana en



forma independiente en los EEUU (USEPA, 1998) y posteriormente en la CE (SSC, 2003) para lo cual se realizó una revisión y unificación de la base científica, metodológica y conceptual para la Evaluación del Riesgo Ambiental (ERA) (Van Leeuwen & Hermens, 1995; USEPA 1998; European Comisión, 1996, Directive 91/414/EEC, 2002). En particular, la evaluación de efectos actuales o potenciales sobre sistemas ecológicos se denomina evaluación de riesgos ecológicos (ERE) (USEPA, 1998), proceso que consiste en la caracterización y estimación de la probabilidad de ocurrencia de efectos adversos en sistemas ecológicos, como consecuencia de la actividad antrópica como resultado de la exposición de entidades ecológicas a un determinado contaminante (USEPA 1998; Encina & Díaz, 2001).

La Evaluación de Riesgo Ecológico permite realizar una predicción temprana y económica del riesgo ecológico a un nivel aceptable de certeza, constituyendo una herramienta confiable para la toma de decisiones en cuanto a regulación, control y fiscalización para la protección de los ecosistemas (ASTM, 1988; Vighi, 1989). De acuerdo a Medina & Encina (2004), el proceso de Evaluación de Riesgo Ecológico (ERE) contempla las siguientes etapas: a) Identificación del peligro: en la cual se formula el problema y se identifican las características de la sustancia y sus potenciales efectos, además se identifican los componentes de ecosistema expuesto y aquello que se debe proteger; b) Evaluación del efecto: donde se determina la concentración sin efecto ecológico (PNEC), se establece la relación entre el nivel de exposición y la naturaleza, severidad y duración de los efectos del contaminante; c) Evaluación de la exposición: etapa en la cual se mide o estima la concentración ambiental esperada (PEC). Se propone un modelo del destino del contaminante y su grado de contacto con el sistema ecológico afectado; d) Caracterización del riesgo: etapa en la cual se integran los tres pasos anteriores y se calcula el riesgo implicado. De acuerdo al nivel de información se calcula la probabilidad de que los efectos ocurran por la presencia actual o futura del contaminante.

Así, en términos generales las metodologías de evaluación del riesgo, para la protección de los ecosistemas acuáticos, se conceptualizan como un procedimiento de dos componentes que, por una parte, involucra la "evaluación de la exposición" de los organismos a contaminantes y, por otra, la "evaluación de los efectos" que derivan de esa exposición (Vighi 1989).



El proceso de Evaluación de Riesgo Ecológico permite desarrollar, organizar y presentar información científica para la toma de decisiones relevantes en materia ambiental. Cuando la ERE es ejecutada a nivel de cuencas hidrográficas, ésta puede ser empleada para identificar los recursos valiosos, los recursos vulnerables, priorizar la colecta de información y establecer relaciones entre la actividad humana y los efectos potenciales (EPA 1998), permitiendo identificar los valores ambientales de interés, los riesgos más importantes y detectar la falta de información, apoyando las decisiones respecto a los enfoques de investigación que deben ser desarrollados a futuro en el área en estudio.

En Chile, la protección de los sistemas acuáticos se realiza a priori mediante la evaluación de proyectos en el marco del Sistema de Evaluación de Impacto Ambiental (SEIA) y/o a posteriori, a través de la fiscalización y control que verifica la aplicación de las normativas vigentes en el territorio nacional. La descarga de aguas residuales a las aguas superficiales y subterráneas está regulada por los D.S. 90 (2001) y D.S. 46 (2002) respectivamente, y sólo establecen los límites máximos y mínimos de la concentración o permanencia de sustancias, elementos, energía o combinación de ellos, basándose principalmente en normas extranjeras, y no considera las relaciones causales entre las concentraciones reguladas y los efectos sobre los ecosistemas locales amenazados (Medina & Encina 2002).

De esta forma, el empleo de la Evaluación de Riesgo Ecológico como herramienta de gestión ambiental permitió estimar empíricamente los niveles máximos de tolerancia de las especies locales claves o aquellas que por su importancia funcional son especies de relevancia ecológica en estos ecosistemas, obteniendo, por tanto, información respecto de la probabilidad de que ocurran efectos adversos sobre las especies expuestas a determinados contaminantes (parámetros fisicoquímicos). Todo ello con el objetivo de proteger al ecosistema en su conjunto.

El presente estudio tiene por finalidad determinar información ecotoxicológica clave para la cuenca del río Cruces y en particular del Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter, antecedentes relevantes y prioritarios.



Objetivo General.

Establecer los niveles máximos de tolerancia de las especies locales con mayor relevancia ecológica y sensibilidad en el Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter, a través de Evaluación de Riesgo Ecológico.

Objetivos Específicos.

1. Determinación de los niveles de sensibilidad o tolerancia máxima a determinados contaminantes sobre las especies estandarizadas y especies locales de mayor relevancia ecológica.
2. Determinación de la relación existente entre los niveles de sensibilidad o tolerancia máxima de las especies locales v/s las especies estandarizadas.
3. Propuesta de niveles de calidad ambiental (valor de norma) sobre la base de la evaluación de riesgo ecológico en las especies locales de relevancia ecológica en el Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter.

Materiales y Métodos.

Se realizaron ensayos ecotoxicológico agudos con cinco metales (Al, Cu, Fe, Mn y Zn), utilizando 9 de las 11 especies del río Cruces, como: *Chlorella sp.*, *Scenedesmus quadricauda*, *Daphnia ambigua*, *Simocephalus sp.*, *Acanthocyclops vernalis*, *Simosa sp.*, *Skistodiaptomus diabolicus*, *Meridialaris sp.*, *Paratanytarsus grimmii*, *Galaxias maculatus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Myriophyllum sp.* Se realizaron ensayos ecotoxicológico agudos con los mismos cinco metales, utilizando tres especies estandarizadas: *Selenastrum capricornutum*, *Daphnia obtusa* y *Oncorhynchus mykiss*. Las nueve especies locales, fueron colectadas, aisladas y cultivadas en laboratorio: *Chlorella sp.*, *Scenedesmus quadricauda*, *Daphnia ambigua*, *Simocephalus sp.*, *Acanthocyclops vernalis*, *Simosa sp.*, *Skistodiaptomus diabolicus* y *Paratanytarsus grimmii*. Además se estableció un protocolo de cultivo captura y cultivo estandarizado del Chironomido *Paratanytarsus grimmii*



La determinación de niveles de protección para el área en estudio, se efectuó a partir de una evaluación de riesgo ecológico probabilística de acuerdo a la metodología propuesta por Medina & Encina (2004), además se incorporó en el análisis la variabilidad e incertidumbre para estimar el porcentaje de especies protegidas para un nivel de exposición determinada, para lo cual se utilizó una modificación de la metodología de Van Straalen & Denneman (1989). Las concentraciones de no efecto (PNEC), se calcularon aplicando un factor de evaluación (FS) de 50 y 100 a los LC_{50} , de acuerdo a los recomendado por la OECD (1992). Finalmente basados en los valores de PNEC, se proponen los valores límites para el anteproyecto de Norma Secundaria de Calidad Ambiental para la protección de las aguas del río Valdivia, los cuales protegen al 70% de las poblaciones expuestas.

Resultados y Discusión.

El nivel de protección propuesto para ser utilizado en el anteproyecto de Norma Secundaria de Calidad Ambiental para la protección de la biota de las aguas del río Valdivia, se realizó estimando los concentraciones de no efecto (PNEC) considerando su variabilidad mediante estimación de los percentiles y utilizando factor de evaluación de 100 (OECD, 1992; SETAC, 2010), de tal forma que el valor recomendado corresponde al valor de la PNEC que protege el 70% de las poblaciones expuesta. Los resultados preliminares en bioensayos con *Myriophyllum sp.*, permiten establecer como LOEC para Al de Se estimó en general efectos significativos (LOEC) sobre la actividad fotosintética en relación al control para Al 2 mg/l; Fe de 2 mg/l; Mn 5 mg/l y Zn 5 mg/l.

Los resultados de los LC_{50} para los metales en su estado disuelto mostraron la siguiente distribución probabilística, estos valores se encuentran dentro de los rangos de ocurrencia de las concentraciones en el Santuario. Además las especies locales presentaron en promedio una mayor resistencia que las especies estandarizadas, considerando las bases de datos internacionales.



Variable	Al	Cu	Fe	Mn	Zn
	0.04	0	0.03	0.5	0.03
	0.14	0.03	0.6	0.6	0.12
	0.38	0.08	1.7	1.2	0.13
	1.3	0.19	3.1	2.8	0.8
	2.86	0.2	3.8	3.3	0.98
	3.2	0.21	5.2	4.7	1.6
	5.38	0.26	6.1	5	1.6
	6.8	0.37	6.7	6.2	2.19
	9.7	0.8	8.6	9.4	4.2
	16.82	2.8	10.1	22	7
	25.7	8.4	15.8	127.6	118.1

La norma de calidad secundaria regulará la concentración de metales totales, por otro lado los PNEC se calculan sobre la base de metales disueltos, de tal forma que se estimaron los factores de conversión de metales disueltos a totales en función de los estudios disponibles en el río Cruces y son los siguientes: 0.12 para Al; 0.12 para Cu; 0.159 para Fe; 0.07 para Mn y 0.35 para Zn.

Todos éstos antecedentes permitieron realizar la estimación de niveles de protección que efectivamente resguardan los ecosistemas, siendo base y apoyo fundamental en el desarrollo de la Norma Secundaria de Calidad Ambiental (NSCA) para la Protección de las Aguas. Así, el enfoque basado en la Evaluación de Riesgo Ecológico que consideró este estudio, ha permitido incorporar no sólo criterios físico-químicos en la generación de Normas Secundarias de Calidad Ambiental, sino también, criterios biológicos, buscando estimar los niveles máximos de tolerancia de determinadas especies locales representativas de este ecosistema, ello con el objetivo de proteger a las especies, funciones y propiedades naturales asegurando el resguardo de este ecosistema en su conjunto. Un aspecto importante en esta aproximación metodológica es que la sociedad debe establecer los niveles de protección que quiere lograr con la norma, considerando las prioridades de la cuenca y el valor que le asigna a la biodiversidad.



Los valores de No efecto (PNEC), consideraron las recomendaciones de la OECD y por tanto se utilizaron valores de seguridad de 50 y 100. Los valores estimados de PNEC para factores de seguridad de 50 y 100 que protegen sobre el 70% de las especies expuestas se muestran en la siguiente tabla:

PNEC	Factor de seguridad = 50		Factor de seguridad = 100		Factor de seguridad = 50		Factor de seguridad = 100		Factor de seguridad = 50	
	ES	ES	ES	ES	ES	ES	ES	ES	ES	ES
0.01	0	0.001	0.000	0	0	0.14	0.07	0.002	0.001	
0.02	0.01	0.005	0.002	0.08	0.04	0.16	0.08	0.007	0.003	
0.06	0.03	0.013	0.007	0.22	0.11	0.34	0.17	0.01	0.004	
0.24	0.12	0.048	0.024	0.47	0.24	0.94	0.47	0.056	0.026	
0.53	0.27	0.034	0.017	0.65	0.32	1.34	0.67	0.092	0.046	
0.89	0.45	0.04	0.021	0.76	0.38	1.42	0.71	0.092	0.05	
1.13	0.57	0.06	0.030	0.83	0.42	1.76	0.88	0.125	0.06	
1.61	0.81	0.13	0.065	1.08	0.54	2.67	1.34	0.24	0.12	
2.8	1.4	0.45	0.226	1.27	0.63	6.25	3.13	0.4	0.2	
4.27	2.14	1.35	0.677	1.98	0.99	36.3	18.1	6.754	3.38	

La implementación de la evaluación de riesgo ecológico es un imperativo para cumplir con algunos acuerdos internacionales suscrito por Chile, los cuales establecen la obligatoriedad de evaluar el riesgo frente a determinados xenobióticos (e.g. Convenio de Estocolmo). Por otro lado, esta metodología ha sido establecida como obligatoria en la Comunidad Europea y EEUU en la autorización de nuevos productos, en el proceso de valuación de impactos ambientales, control de efluentes y elaboración de normas de calidad ambiental. En el caso normativo, esta metodología permite la determinación de los valores aceptables para la biota de las normas secundarias, particularmente sensibles hoy al determinar los parámetros significativos del estudio de norma de las cuencas prioritarias, entre ellas la del río Cruces. No obstante el desarrollo a nivel mundial de metodologías estandarizadas de evaluación de riesgo, en Chile su aplicación es incipiente ya que depende de modificaciones legales y la preparación de cuadros técnicos, pero fundamentalmente del desarrollo de un marco científico que permita:



0024470

- a) Desarrollar y mantener los cultivos de especies nativas ya establecidos en diferentes zonas del país.
- b) Realización de ensayos con una alta confiabilidad, la sensibilidad y variabilidad de la respuesta de especies con relevancia ecológica frente a determinados xenobióticos, para lo cual es necesario realizar un mayor número de ensayos para los diferentes sistemas loticos y lenticos del país, realizar ensayos agudos y crónicos que permitan aumentar la confiabilidad de los resultados disminuyendo los factores de seguridad utilizados.
- c) Establecer una base de datos oficiales de valores de LC_{50} y NOEC.
- d) Financiamiento y desarrollo de una base ecológica para interpretar los efectos observado y su relación con los impactos adversos a niveles de organización superior en los sistemas ecológicos de interés
- e) El desarrollo de programas de monitoreo físico-químicos y biológicos permanentes, que permitan contar con información de niveles de abundancia, concentración y variabilidad espacio temporal de los xenobióticos y entidad ecológicas a nivel de cuencas hidrográficas.



I. INTRODUCCION.

Las Normas Secundarias de Calidad Ambiental para la Protección de las Aguas del río Cruces, fueron incluidas en forma especial en el "Noveno Programa Priorizado de Normas". Sin embargo, debido a la escasez de antecedentes técnicos existentes en ese período, el ámbito territorial de aplicación de estas normas se limitó a la fracción limnética del río Cruces, dejando fuera de este proceso normativo la zona estuarial de este río, es decir al "Santuario" en sí. Por tal motivo, a fines del año 2006 se dio inicio a la elaboración de las Normas Secundarias de Calidad Ambiental para la protección de las aguas de la cuenca del río Valdivia, proceso normativo incluido en el "Décimo Programa Priorizado de Normas", el cual resulta una regulación ambiental complementaria a las Normas Secundarias de Calidad Ambiental del río Cruces, ya que dentro del ámbito territorial de aplicación de estas normativas se encontraría la parte estuarial del río Cruces además de la porción estuarial del río Calle Calle y el río Valdivia.

Actualmente se han incorporado antecedentes técnicos al estudio de calidad de aguas de esta cuenca, los cuales han surgido a partir de la elaboración de los dos procesos normativos antes mencionados, y han permitido describir en forma general las características hidrodinámicas y fisicoquímicas de la cuenca del río Valdivia.

Debido a la inexistencia de datos históricos para la fracción estuarial del río Cruces, se torna complejo establecer niveles de calidad ambiental en este tramo del río. De esta forma, con el objeto de generar información específica para la fracción estuarial del río Cruces considerando sus características diferenciales respecto al resto de la cuenca del río Valdivia, se desarrolló durante el año 2009 el estudio "Aproximación Ecotoxicológica y Evaluación de Riesgo Ecológico teórico en apoyo a la elaboración del Anteproyecto de Normas Secundarias de Calidad Ambiental para la protección de las aguas del río Valdivia", estudio que tuvo por finalidad obtener propuestas de niveles de calidad ambiental de tipo teóricos para este tramo del río.



A partir de dicho estudio se caracterizó la estructura comunitaria del Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter y se seleccionó, a través de un Panel de Expertos, las especies de mayor relevancia ecológica, las especies claves y de mayor representatividad en el sistema, estableciéndose un listado de 33 especies. Sobre la base de esa selección se realizó la evaluación de riesgo ecológico de tipo teórico considerando los end-point ecotoxicológicos (LC₅₀ y NOEC en base a datos nacionales e internacionales) de géneros y familias similares a los registrados en el Santuario de la Naturaleza.

La Evaluación de Riesgo Ecológico desarrollada en ese estudio permitió efectuar una predicción temprana y económica del riesgo ecológico a un nivel aceptable de certeza. Esta evaluación incluyó la identificación del peligro, la evaluación del efecto, la evaluación de la exposición, y finalmente la caracterización del riesgo estableciendo el valor potencial del riesgo ecológico para los organismos expuestos.

Así, el enfoque de la Evaluación de Riesgo Ecológico, que consideró el estudio, ha permitido incorporar no sólo criterios físico-químicos en la generación de Normas Secundarias de Calidad Ambiental, sino también, criterios biológicos, buscando estimar los niveles máximos de tolerancia de familias y géneros similares a los registrados en este ecosistema, ello con el objeto último de proteger a las especies, funciones y propiedades naturales del área, asegurando el resguardo de este ecosistema en su conjunto.

En este sentido, se debe hacer de las normas secundarias de calidad ambiental un instrumento de gestión adecuado para los objetivos de protección que persiguen, constituyéndose en una herramienta confiable para la toma de decisiones en cuanto a regulación, control y fiscalización en pos de la protección de estos ecosistemas; haciendo necesario establecer niveles de protección específicos para los ecosistemas naturales y determinar las respuestas de organismos nativos de ambientes acuáticos chilenos frente a diversos xenobióticos, ya que, si bien muchas de las pruebas ecotoxicológicas y las especies a utilizar están estandarizadas, el objetivo final de la aplicación de criterios biológicos a la evaluación de recursos hídricos es que los resultados permitan proteger los ecosistemas naturales. Por lo tanto, es probable que los organismos nativos del Santuario de la Naturaleza, tengan sensibilidades distintas a los organismos estandarizados, a partir de los cuales se realizó la evaluación de riesgo ecológico teórica, lo que generaría normas que podrían sobreestimar o subestimar los niveles de protección.



Por tal motivo, se requiere realizar la Evaluación de Riesgo Ecológico a partir de los resultados de bioensayos desarrollados sobre especies locales de relevancia ecológica colectadas en el Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter o en sus afluentes, estimando los niveles máximos de tolerancia de las especies locales claves o de relevancia ecológica. Obteniendo de esta manera información respecto de la probabilidad de que ocurran efectos adversos sobre las especies expuestas a determinados contaminantes (parámetros fisicoquímicos) en el Santuario, para proteger este ecosistema en su conjunto. Sin embargo, debido a la complejidad que presentan los ecosistemas acuáticos, no es posible evaluar el efecto de contaminantes sobre la totalidad de los organismos, debiéndose determinar los efectos individuales de los contaminantes sobre especies representativas de los ecosistemas analizados, seleccionándolos basado en criterios ecológicos, sensibilidad a contaminantes y factibilidad de cultivo en condiciones de laboratorio.

La información generada en este estudio, será incorporada en el análisis y discusión conducente a la determinación de los objetivos de protección de las Normas Secundarias de Calidad Ambiental que se encuentran actualmente en proceso de elaboración. Dado que la evaluación de riesgo ecológico se desarrolla en el marco de la ecotoxicología, que consiste en el estudio multidisciplinario de los efectos de un agente contaminante sobre los organismos vivos, sobre sus poblaciones y sus comunidades; la evaluación de riesgo ecológico será determinada a partir de la concentración ambiental esperada (calculada en el Santuario de la Naturaleza en forma determinística) y los niveles de exposición, los cuales serán determinados principalmente a través de valores de toxicidad aguda y en casos específicos de toxicidad crónica reportados en especies, familias y géneros similares a los presentes dentro de la estructura comunitaria presente en el "Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter", por lo cual se hace necesario la selección de especies de distintos niveles tróficos para ser empleados en los bioensayos de toxicidad.



II. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Establecer los niveles máximos de tolerancia de las especies locales con mayor relevancia ecológica y sensibilidad en el Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter, a través de Evaluación de Riesgo Ecológico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinación de los niveles de sensibilidad o tolerancia máxima a determinados contaminantes sobre las especies estandarizadas y especies locales de mayor relevancia ecológica.
2. Determinación de la relación existente entre los niveles de sensibilidad o tolerancia máxima de las especies locales v/s las especies estandarizadas.
3. Propuesta de niveles de calidad ambiental (valor de norma) sobre la base de la evaluación de riesgo ecológico en las especies locales de relevancia ecológica en el Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter.



III. MATERIALES Y METODOS

Área de Estudio.

El humedal de río Cruces se caracteriza por presentar amplias zonas de inundación estacional y permanente en las riberas. La cuenca del río Cruces presenta régimen netamente pluvial, dominada por humedales de tipo ribereño y palustre, con influencia estuarina en la zona inferior (Dugan 1992). La profundidad en las partes inundadas no sobrepasa los 2 metros, mientras que el cauce principal puede llegar a los 16 metros (Dürschmidt 1980). El área fue declarada legalmente como Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter el 3 de junio de 1981, mediante decreto N° 2.734 del Ministerio de Educación; el mismo año ingresa a la nómina de la Convención sobre los Humedales de Importancia Internacional (Convención Ramsar), convirtiéndose en el primer sitio de Chile protegido bajo este esquema de conservación. El Santuario incluye el lecho, islas y zonas de inundación de los ríos Cruces y Chorocamayo, en una longitud aproximada de 25 km y de 2 km de ancho como promedio, correspondiendo a una reserva acuática de aproximadamente 4.877 ha, ubicada en el sector estuarial del río Cruces. El origen de estos humedales se remonta a mayo de 1960 cuando el sur de Chile sufrió un devastador terremoto, que provocó el descenso de vastos terrenos asociados a riberas de ríos, lo que permitió el asentamiento de zonas húmedas que han llegado a convertirse en valiosos refugios de fauna silvestre (Kennedy 1977).

El río Cruces se origina en la vertiente occidental de los cerros situados entre los lagos Villarrica y Calafquén. Drena un área de 3.233 km² en la depresión de San José en la parte norte de la provincia de Valdivia. De acuerdo a la estadística histórica, el río Cruces, tiene un caudal medio anual de 192,7 m³/s, con una fuerte variación estacional, en invierno el caudal medio es de 113,6 m³/s, mientras que en verano es de 20 m³/s, marzo es el mes más seco, con 1,1654 m³/s. El río Cruces es un tributario del Valdivia, y sus principales afluentes son los ríos Puralón, Naninhue, San Antonio, Cudico, Pichoy, Cayumapu, Chorocamayo y otros esteros menores. Sus últimos 20 km tienen características de potamón, con aguas tranquilas y profundas y con sustrato de arena y limo. Además, están rodeados por bañados que alojan con mucho sedimento orgánico en el fondo y una abundante vegetación acuática y palustre (Campos 1985). Estos bañados, que tienen mayor extensión que el mismo río, se formaron por inundación de vegas agrícolas y ganaderas, que descendieron casi dos metros (Ramírez et al. 1991) (Figuras 1 y 2).

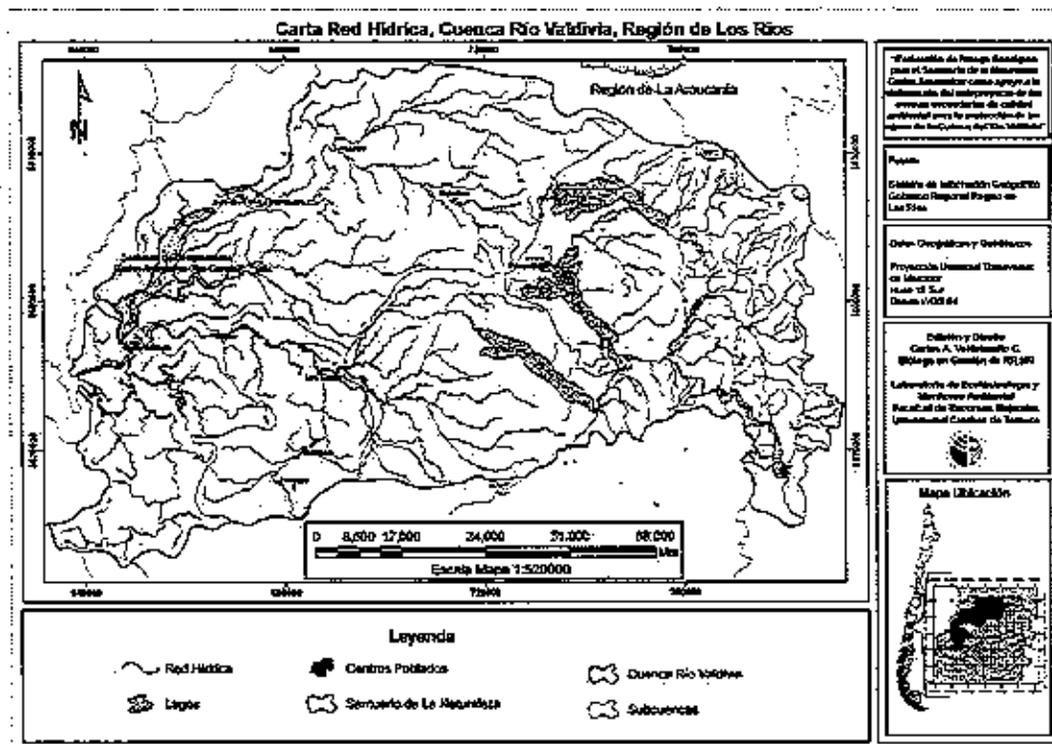


Figura 1. Hidrografía cuenca del río Valdivia, región de Los Ríos.

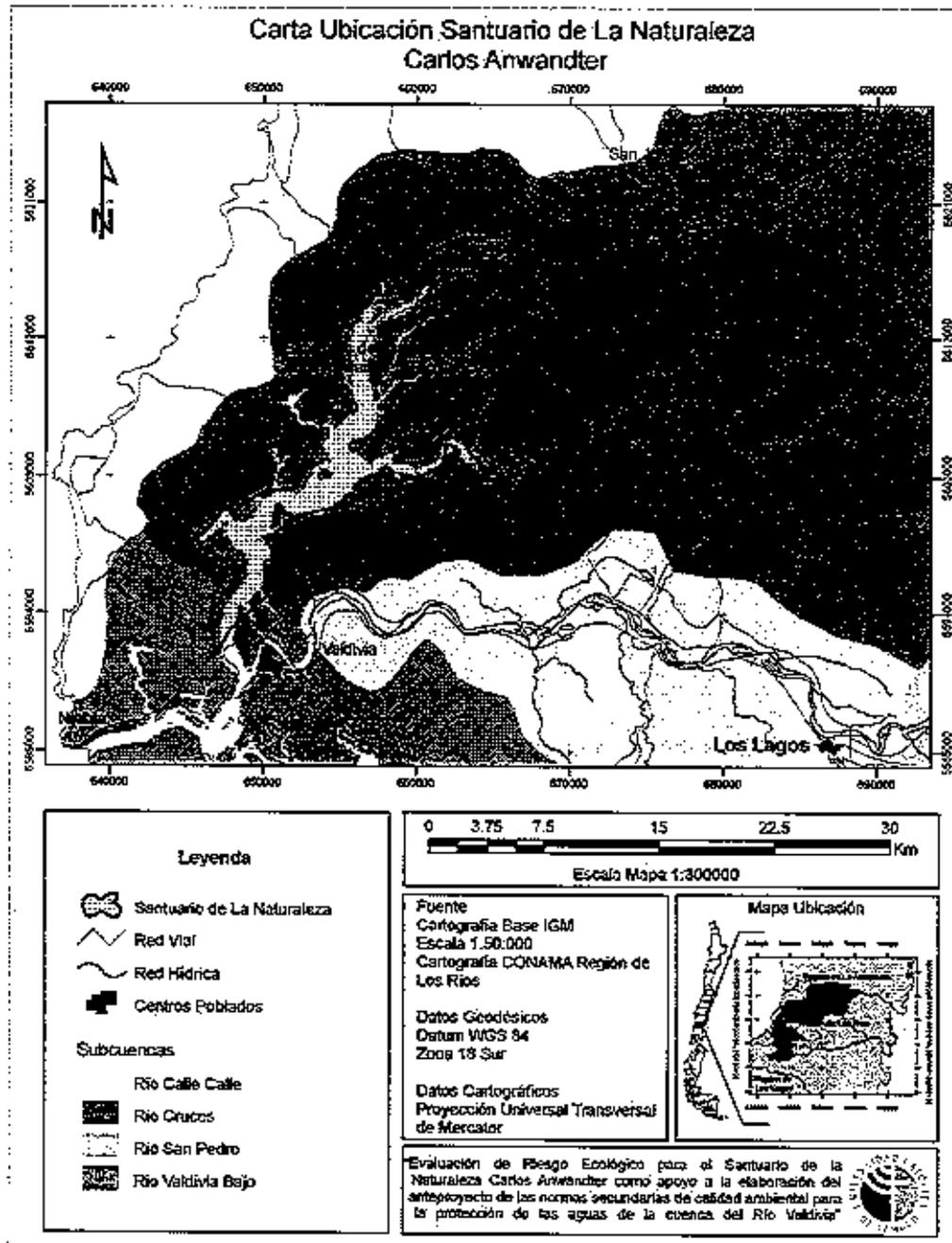


Figura 2. Carta localización Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter, Cuenca del río Valdivia, región de Los Ríos.



Los humedales mantienen una serie de funciones ecosistémica que es importante resguardar, entre éstas por ejemplo, el humedal del río Cruces, permite el control de erosión, retención de sedimentos, retención de nutrientes, estabilización del clima, el control de caudales, control de sedimentación, almacenaje de aguas, lo que reduce los riesgos de inundación para la población (Muñoz & Möller 1992). Además del valor desde la perspectiva de la biodiversidad, el Santuario tiene un valor adicional por el potencial uso en recreación, turismo e interés educacional para la práctica de la educación e interpretación ambiental (Morales 1979). De gran importancia es la alta productividad y diversidad biológica del Santuario del río Cruces (Schlatter, 1976; Schlatter et al. 2002), la flora acuática y palustre del Santuario, proporciona un lugar de vida, refugio y nidificación para una gran cantidad de especies de fauna y es además una importante fuente de alimento para los consumidores primarios (Araya et al. 1995; Kennedy 1977).

De acuerdo al origen fitogeográfico de las especies de flora, el 65% de ellas son plantas nativas, observándose un alto porcentaje de plantas alóctonas (32,5%), que indicaría que en esta zona existiría un alto grado de intervención humana (Ramírez et al. 1991), a pesar de ello este sector es una zona muy rica en diversidad vegetal, conformada por 80 especies de plantas superiores, distribuida en 39 familias y 62 géneros (Ramírez et al. 1991), considerando la abundancia de las especies, los Criptófitos dominan el espectro biológico con un 62,3%, confirmándose así el carácter hidrófilo de la vegetación, es decir, de tipo acuático y palustre, los Hemicriptófitos representan el 35,25% y los Fanerófitos y Caméfitos, en conjunto forman menos del 3% del total.

La avifauna del Santuario está formada por más de 60 especies y ha sido estudiada por Kennedy (1977), destacando por su abundancia la tagua (*Fulica armillata*) y el cisne de cuello negro (*Cygnus melancoryphus*). En los bañados abundan coipos (*Myocastor coypus*) y carpas (*Cyprinus carpius*) que al igual que las aves nombradas, se alimentan de plantas acuáticas y palustres (Campos 1985).



La fauna ictiológica de este río y sus bañados no es muy variada, pero entre las especies existen algunas que cumplen roles ecológicos de gran importancia, ya sea como consumidores primarios o formando parte de la dieta de muchas especies de aves y de algunos mamíferos (Campos 1985), dentro de las especies autóctonas se encuentran: *Brachygalaxias bullocki* (Puye); *Galaxias maculatus* (Puye); *Cheirodon galusdae* (Pocha de los lagos); *Cheirodon pisciculus* (Pocha común); *Cheirodon australis* (Pocha del sur), entre otros.

La alta sensibilidad de este ecosistema a las modificaciones ambientales, se hizo patente producto de la situación ocurrida en el Santuario, durante el año 2004. De esta forma se hizo urgente la necesidad de evaluar acabadamente de los potenciales impactos que las actividades productivas generadas en las cercanías del humedal pudiesen generar y determinar de manera específica los efectos tóxicos y posibles riesgos ecológicos a que se ve expuesto este frágil sistema.



Flujo Metodológico.

El desarrollo de este estudio se basó en el enfoque de la Evaluación de Riesgo Ecológico, en base al siguiente flujo metodológico básico, como se muestra en la Figura 3.

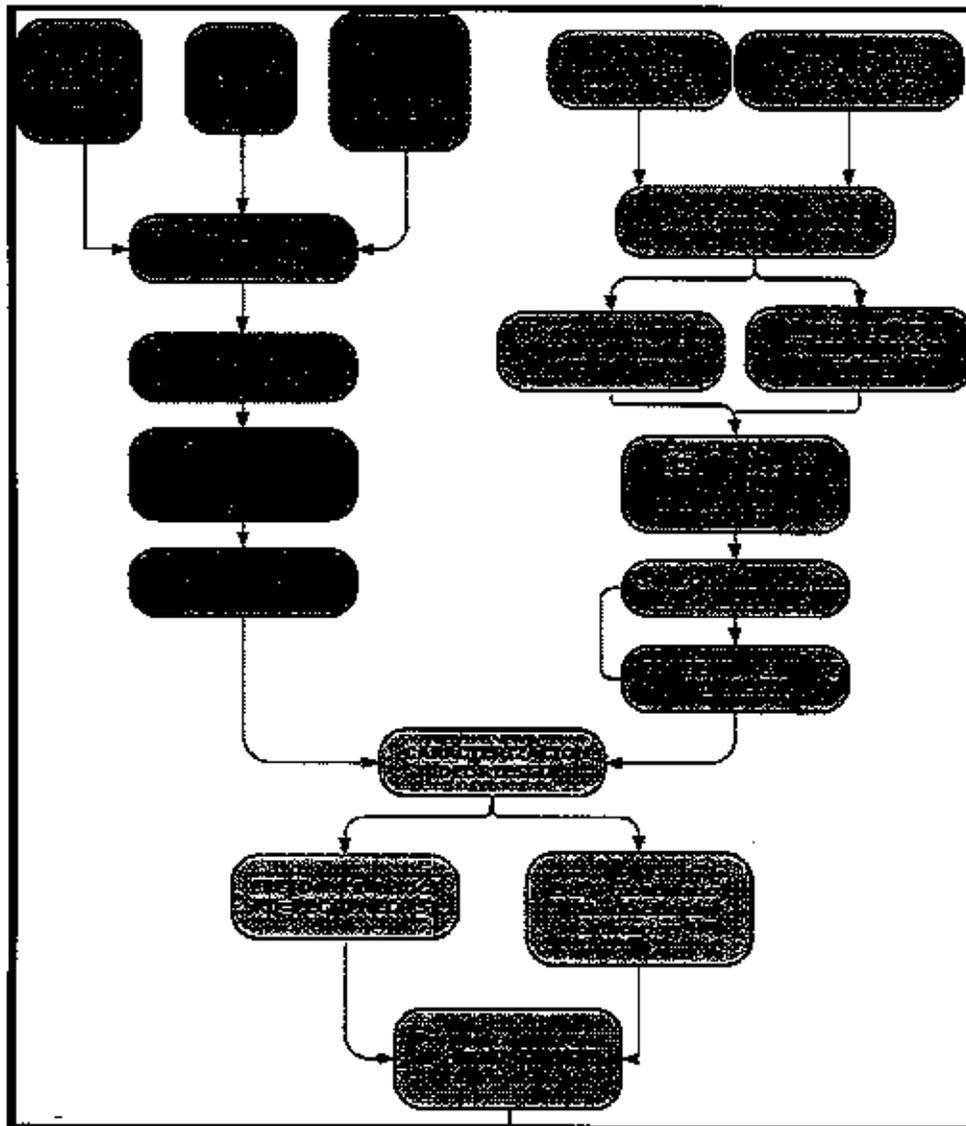


Figura 3. Flujo Metodológico.



3.1 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE SENSIBILIDAD O TOLERANCIA MÁXIMA A DETERMINADOS CONTAMINANTES SOBRE ESPECIES ESTANDARIZADAS Y ESPECIES LOCALES DE MAYOR RELEVANCIA ECOLÓGICA

3.2.1 SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES LOCALES DE RELEVANCIA ECOLÓGICA Y EL ROL ECOLÓGICO DE LAS ESPECIES SELECCIONADAS PARA LOS BIOENSAYOS EN EL "SANTUARIO DE LA NATURALEZA CARLOS ANWANDTER".

A partir de la información bibliográfica recopilada y sistematizada, se generó un listado de las diferentes especies presentes en el Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter. Éste fue analizado por diversos investigadores, de acuerdo a su especialidad y conocimiento del área en estudio, determinando las especies a ser utilizadas en bioensayos. La metodología utilizada fue en base a un Panel de Expertos, cuyos participantes se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Profesionales que integraron el panel de expertos para determinar especies a utilizar en bioensayos de toxicidad.

MACROINVERTEBRADOS	Mg. Maritza Mercado	Consultora Benthos	benthos.maritza@gmail.com
	Dr. David Figueroa	UC. Temuco	dfiguero@uct.cl
FITOPLANCTON	Dra. Fabiola Cruces	U. Concepción	fcrucesi@udec.cl
ZOOPLANCTON	Dr. Stefan Woelf	UACH	swoelf@uach.cl
	Dr. Patricio de Los Ríos	UC. Temuco	prios@uct.cl
MACROFITAS	Mg. Enrique Hauenstein	UC. Temuco	ehauen@uct.cl
	Dr. Carlos Ramírez	UACH	cramirez@uach.cl
PECES	Dra. Evelyn Habit	U. de Concepción	ehabit@udec.cl
	Dr. Iván Valdebenito	UC. Temuco	ivisler@uct.cl

Los criterios considerados para la selección de especies representativas del Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter- Río Cruces fueron los siguientes:

- Criterio 1 (60%): Especies posibles de cultivar o mantener en laboratorio, criterio al cual se le asignó una ponderación del 60%.



- **Criterio 2 (20%):** Especies que dadas sus características son consideradas como indicadores de buena calidad de aguas, asignándole a este criterio una ponderación del 20%.
- **Criterio 3 (20%):** Relevancia ecológica de cada una de las especies en estudio. Este criterio se subdividió por abundancia y por rol trófico asignándole a cada uno una ponderación del 10%.

Por especie, cada experto le asignó un valor de 1 a 3 a cada criterio establecido, obteniéndose la valorización final mediante el promedio el cual se comparó con los rangos establecidos y su correspondiente definición (Tabla 2).

Tabla 2. Rangos para selección de especies.

1- 1,5	Especie no seleccionada, ya que no cumple con los criterios establecidos para ser empleada en bioensayos
1,6- 2,0	Se requiere contar con mayor información para determinar el potencial de esta especie y su empleo en bioensayos
2,1- 3,0	Especie seleccionada dado su potencial para ser empleada en bioensayos, de acuerdo a los criterios establecidos. *Este intervalo corresponde al 70% de exigencia

Selección de los organismos utilizados en bioensayos.

La selección de los organismos a utilizar en los bioensayos de toxicidad se efectuó en base a la preselección establecida mediante el Panel de expertos desarrollado en el estudio antecedente "Aproximación Ecotoxicológica y Evaluación de Riesgo Ecológico teórico en apoyo a la elaboración del Anteproyecto de Normas Secundarias de Calidad Ambiental para la protección de las aguas del río Valdivia", revisión bibliográfica posterior y los criterios establecidos en dicho estudio para ese fin. El listado emanado del panel de expertos debe ser entendido como una forma de reducir el espectro de especies a ser utilizada para el desarrollo de los bioensayos. Ya que al comenzar a trabajar con las especies pre-seleccionadas, se evidenciaron inconvenientes, los cuales sólo se verían solucionados si se contase con un importante nivel de conocimiento sobre los taxa en estudio, sin embargo en la mayoría de los casos esta información no se encuentra disponible.



A continuación se detallan tres razones que explican las diferencias entre el listado de especies propuesto en el estudio anterior y la actual lista de especies utilizadas en los ensayos de toxicidad:

a) Análisis Estacional.

Al momento de realizar los muestreos (fines de otoño/comienzos de invierno) las bajas abundancias de especies propuestas o la ausencia de algunas de ellas, nos lleva a pensar que podemos estar en presencia de factores temporales (estacionales), que no fueron considerados en la selección efectuada por el panel de expertos y que determinarían el éxito de un campaña de terreno (objetivo/esfuerzo de captura). Nos referimos a las variaciones diarias, estacionales e incluso anuales que pueden experimentar las poblaciones de las especies propuestas originalmente y que se relacionarían con procesos sucesionales, aspectos climáticos y perturbaciones (Minshall, 1988).

Las fuentes de modificación de patrones de presencia-ausencia en una escala temporal, pueden verse fuertemente asociadas a perturbaciones de origen muy variado, por ejemplo al modificarse la vegetación ripariana (uso de suelo), se generaría una modificación del régimen de ingreso de material alóctono grueso y fino; como consecuencia se produciría una respuesta (variación) de tipo funcional (rol trófico) en las comunidades bentónicas (Lmly & Hilderbrand, 2000; Scheibler & Debandi, 2008). Otro ejemplo estaría dado por las modificaciones encontradas en la estructura de comunidades de macroinvertebrados por Piscart et al. (2005) a consecuencia de un gradiente de salinidad desde un efluente. Estas fuentes de perturbación también pueden tener importante incidencia en los patrones de deriva (no conocidos en nuestros ríos), y que determinan la presencia de especies y por consiguiente la estructura comunitaria en un lugar determinado dentro del sistema fluvial (Waters, 1972; Reisen & Prins, 1972).

En cada sistema, si bien es posible inferir patrones generales de comunidades y poblaciones que las componen (listado generado a partir del panel de expertos), las múltiples interacciones con el medio las hacen de suyo particular. Éste sería el caso del lugar (aspecto espacial) y época del año (aspecto temporal) en la cual se ejecutaron las actividades del proyecto y que justificarían haber planteado un nuevo listado de especies, que si bien corresponden a especies encontradas en los actuales muestreos efectuados en el área, no todas corresponderían a especies citadas en el listado propuesto anteriormente.



b) Problemas de cultivo (ciclo) con algunas de las especies seleccionadas por el panel de expertos.

Producto de la escasa información biológica de algunas de las especies propuestas por el panel de experto, en términos, de los ciclos biológicos (aspectos de la reproducción, estados larvales, juveniles y adultos, y requerimientos ambientales), se han debido descartar algunas de las especies propuestas dadas las múltiples dificultades para su mantención en laboratorio. Aspectos críticos han tenido relación con la reproducción donde algunas de las especies presentan una baja fecundidad y son muy frágiles en su manipulación. La alimentación también ha sido un factor relevante dado que es necesario estandarizar tipos de dietas que aseguren la mantención de especies de copépodos y dáfidos en sistemas cerrados. Esto ha implicado la mantención de microcultivos de algas que sustentan a estas poblaciones con las respectivas dificultades en su mantención. Además otros factores críticos en laboratorio, se relacionan con el control de temperatura, oxigenación y tamaño de la burbuja de aire en los vasos de precipitado y matraces, lo cual ha dificultado encontrar el balance en algunas de las especies propuestas originalmente.

c) El listado original se basa en el desarrollo del panel de expertos centrado en fundamentos teóricos.

Respecto de este último punto es importante destacar que la selección de especies propuesta, basado en un panel de experto, no consideró los aspectos finos de requerimientos y manipulación en condiciones artificiales o de laboratorio que permita la mantención y cultivo de las especies seleccionadas. Esto último ha llevado al equipo a emplear un segundo filtro en la selección de las especies que actualmente se están utilizando para llevar a cabo los bioensayos, las cuales han respondido de manera más adecuada a las condiciones de laboratorio que se están manejando. Además, durante los muestreos se han encontrado otras especies que también cumplen con los criterios necesarios para selección en bioensayos.

La selección de las especies consideró el empleo en los bioensayos de al menos un taxa de cada uno de los niveles tróficos que conforman la estructura funcional que caracteriza este ecosistema (fitoplancton, zooplancton, macroinvertebrados, peces y macrófitas). De esta forma, se efectuó un análisis del rol trófico de cada una de las especies seleccionadas, en base a fichas técnicas de éstas y análisis de la estructura funcional de este ecosistema.



3.2.2 ESTABLECIMIENTO Y MANTENCIÓN DE CULTIVOS DE LAS ESPECIES LOCALES DE MAYOR RELEVANCIA ECOLÓGICA (FITOPLANCTON, ZOOPLANCTON, ICTIOFAUNA, MACROFAUNA BENTÓNICA Y MACRÓFITAS).

-Cultivos de especies estandarizadas de Fitoplancton, Zooplancton y Peces.

Para el desarrollo de este estudio, se utilizaron cultivos partenogénéticos de *Daphnia obtusa* y *Selenastrum capricornutum*, cultivos que se comenzaron a partir de ejemplares adquiridos en el Laboratorio de Bioensayos de la Universidad de Concepción, para la mantención y desarrollo de las especies se utilizaron los protocolos de la APHA (1995) y NCh2083 (1999) para *D. obtusa*, en el caso de *S. capricornutum* se emplearon los protocolos establecidos en la NCh2706 (2003) y para *O. mykiss* los protocolos de EPA (1998).

Elección de los organismos utilizados.

Los organismos que se utilizaron en el desarrollo de cada uno de los bioensayos corresponden a *Selenastrum capricornutum* una alga verde (clorofita) unicelular con forma de media luna y un volumen aproximado de entre 40 y 60 μm^3 , que puede encontrarse en sistemas acuáticos epicontinentales eutróficos u oligotróficos. Cuando las células son expuestas a muestras que contienen contaminantes tóxicos, su reproducción se afecta, alterando la tasa de crecimiento de la población de las algas.

Un segundo organismo utilizado corresponde a la especie *Daphnia obtusa*, organismos que es posible encontrar en los lagos norpatagónicos del país, resultando, por consiguiente, ser representativos de los ecosistemas nacionales, a diferencia de otras especies que si bien se encuentran estandarizadas no responden a las características de los ecosistemas estudiados y/o evaluados.

Finalmente los peces, organismos representativos de los cuerpos acuáticos y pueden ser utilizados como indicadores de toxicidad como es la especie *Oncorhynchus mykiss*.



Descripción de los cultivos para *Daphnia obtusa*.

Agua de los Cultivos.

Los cultivos fueron mantenidos en agua procedente de lago (para este caso se utilizaron las aguas del lago Calafquén), la cual fue filtrada utilizando un filtro con un ancho de poro de 0,2 μm , con el fin de eliminar impurezas que ésta pudiera contener.

Alimentación y condiciones de los cultivos.

Los cultivos fueron alimentados con una dieta estandarizada basándose en el protocolo del APHA (1995). Este alimento es una mezcla de harina de pescado, alfalfa y levadura. Se agregó 1 mL de este alimento por cada 50 individuos en 1 L de agua cada dos días.

Los cultivos fueron mantenidos en recipientes de vidrio de 2,5 L de volumen con 1 L de agua, que contuvieron una densidad constante de alrededor de 50 individuos. La mantención de alrededor de 10 acuarios de este tipo con la densidad antes mencionada de manera constante e invariable, basta para realizar alrededor de cuatro bioensayos semanalmente.

Recambio del medio.

El recambio del medio de los cultivos se realizó una vez por semana, con el fin de que las condiciones fueran siempre estables y no existiera presencia de exubias o desechos de los mismos organismos. Para ello, se separaron las *Daphnia* utilizando una pipeta Pasteur, éstas se colocaron en una pequeña cantidad del agua del cultivo, los acuarios se lavaron con agua corriente y luego fueron "cebados" con agua de lago, se volvieron a llenar con agua de lago aireada durante 24 h y los organismos se devolvieron al acuario ya limpio. Finalmente se les suministró como alimento aquel protocolizado por la APHA (1995).

Condiciones físico-químicas.

Los cultivos fueron mantenidos a temperatura ambiente fluctuante entre el día y la noche, con fotoperíodo de luz natural en periodo de verano (12 horas de luz - 12 horas de oscuridad) y con sistema de aireación mecánica.



Descripción de los cultivos para microalga *Selenastrum capricornutum*.

El cultivo de fitoplancton se basó en la preparación de cinco soluciones, conteniendo micronutrientes (1ª con macronutrientes), es decir, las 4 soluciones restantes, todas ellas con las concentraciones adecuadas para asegurar un crecimiento óptimo de las algas durante el periodo de incubación. Para la proliferación se procede a la inoculación bajo condiciones de esterilidad en donde el cultivo se puede iniciar a partir de cepas mantenidas en medio sólido tomando las células con un asa y esparciéndolas en el medio nutritivo líquido, o a partir de un cultivo líquido de algas que haya alcanzado la fase estacionaria. El medio inoculado se puso a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ dentro de una cámara con iluminación superior a 2 000 lux, manteniendo aireación permanente.

Descripción de los cultivos para peces *Oncorhynchus mykiss*.

Los organismos fueron expuestos a un periodo de aclimatación de 24 horas con el propósito de eliminar individuos que no poseían condiciones óptimas. Para una buena mantención de los organismos del ensayo se efectuaron recambios diarios de agua con oxigenación constante, los peces fueron alimentados con pellets de harina de pescado.

Cultivos de especies locales de Fito - Zooplancton y Macrofauna Bentónica.

Cultivos de Fito – Zooplancton especies locales.

Para la implementación de cultivos se realizó un muestreo mediante red para fito y zooplancton fina la cual cubrió una longitud de 1000 metros de arrastre superficial en el Santuario de la Naturaleza del río Cruces sector Punucapa, se registraron las variables ambientales, se efectuó una toma de muestras de agua para su caracterización química en laboratorio, las colectas de fito y zooplancton fueron filtradas en terreno y almacenadas en contenedores plásticos con volúmenes acordes con la densidad de organismos colectados, para evitar la falta de oxígeno durante el proceso de traslado a laboratorio. Las especies empleadas fueron *Chlorella sp*, *Scenedesmus quadricauda*, *Daphnia ambigua*, *Simocephalus sp.*, *Simosa sp*, *Skistodiptomus diabolicus* y *Acanthocyclops vernalis*.



Cultivos de Macrofauna Bentónica.

Para la implementación de cultivos de macrofauna bentónica se muestrearon los ejemplares del Río Codihue (coordenadas UTM 759051E - 5676398N), distante a 70 Km de Temuco, afluente del Lago Colico. El río Codihue es un río precordillerano el cual presenta abundante vegetación ribereña y baja actividad antrópica. Los parámetros de referencia de calidad del agua del río Codihue al momento de su captura fueron: Temperatura 11.7°C; Conductividad Eléctrica 93.3 μ S; Sólidos Totales Disueltos 46.8 mg/l y pH 7.44.

Los cultivos se efectuaron con ejemplares del género *Meridialaris sp* y de la familia Chironomidae (*Paratanytarsus grimmii*).

Los Chironómidos presentes en el fondo del río (sustrato) se colectaron con una red tipo D. Las muestras obtenidas fueron colocadas en bandejas de plástico y los individuos presentes fueron tomados con un gotario plástico y depositado en una botella de vidrio. Posteriormente se colocaron en recipientes con aireación para su traslado al laboratorio.



3.2.3 DETERMINACIÓN DE EFECTOS: REALIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE BIOENSAYOS SOBRE LAS ESPECIES DE RELEVANCIA ECOLÓGICA DEL SANTUARIO DE LA NATURALEZA Y EN LAS ESPECIES ESTANDARIZADAS CONSIDERANDO DIFERENTES NIVELES TRÓFICOS.

En la Tabla 3. se muestran los taxa de diferentes niveles tróficos empleados en la realización de los bioensayos de toxicidad.

Tabla 3. Taxa empleados en realización de bioensayos de toxicidad Santuario de la Naturaleza.

GRUPO	Especie	Estandarizado/ Local y/o Nativo
Fitoplancton	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Estandarizado
	<i>Chlorella sp.</i>	Local y/o Nativo
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Local y/o Nativo
Zooplancton	<i>Daphnia obtusa</i>	Estandarizado
	<i>Daphnia ambigua</i>	Local y/o Nativo
	<i>Simocephalus sp.</i>	Local y/o Nativo
	<i>Simosa sp.</i>	Local y/o Nativo
	<i>Skistodiaptomus diabolicus</i>	Local y/o Nativo
	<i>Acanthocyclops vernalis</i>	Local y/o Nativo
Macroinvertebrados	<i>Meridialis sp.</i>	Local y/o Nativo
	<i>Paratanytarsus grimmii</i>	Local y/o Nativo
Peces	<i>Galaxias maculatus</i>	Local y/o Nativo
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Estandarizada
Macrófitas	<i>Myriophyllum sp.</i>	Local y/o Nativo

De esta forma, empleando las especies antes mencionadas se efectuaron bioensayos de toxicidad, los cuales son una herramienta que nos permite cuantificar y obtener el nivel de toxicidad de una muestra, midiendo el efecto de uno o más contaminantes sobre las especies ha evaluar y consiste en la exposición de los organismos a concentraciones crecientes de un agente tóxico determinando sus cambios en un período de tiempo específico. Los organismos seleccionados, es decir, especies o familias de diferentes niveles tróficos del ecosistema en estudio, fueron expuestos a distintas concentraciones de 5 metales previamente establecidos como son: Aluminio (Al), Cobre (Cu), Hierro (Fe),



Manganeso (Mn) y Zinc (Zn). Así, de acuerdo a la metodología empleada se determinó la concentración letal media, o LC₅₀, a un nivel de confiabilidad del 95% para cada uno de los grupos analizados.

a) Validación y Realización de bioensayos con Zooplancton.

- Validación de ensayos. Preparación de la solución madre del tóxico de referencia (K₂Cr₂O₇) para *Daphnia obtusa*.

La preparación de la solución madre se efectuó llevando a peso constante cristales de K₂Cr₂O₇; para ello se colocaron 10 mg de éste en una placa Petri y se calentó por una hora en una estufa con campana a 100° C. Luego de esto, los cristales fueron pesados hasta alcanzar un peso estable, posteriormente se preparó una solución de stock de 1000 mg/l, 100 mg/l y 10 mg/l las que fueron refrigeradas a 4° C, en frasco oscuro y cubierto con papel aluminio. A partir de esta solución madre se prepararon las diferentes concentraciones ensayadas en las pruebas toxicológicas con *D. obtusa*.

Se efectuó un ensayo preliminar para determinar las concentraciones definitivas del tóxico de referencia, estas concentraciones corresponden a: 0,33mg/l-0,80mg/l-1,5 mg/l-3,5mg/l y 5,7mg/l, las cuales fueron establecidas en base a revisión bibliográfica de estudios precedentes. Finalizado este ensayo preliminar, se procedió a determinar las concentraciones definitivas del compuesto las que fueron: 0,1 mg/l-0,2 mg/l-1,5mg/l y 2,5 mg/l de Dicromato de potasio.

En este ensayo de validación se utilizó agua reconstituida, preparada en base a Nch 2083 (1999).

- Realización bioensayos de toxicidad con metales para zooplancton.

En esta etapa se efectuaron bioensayos con diferentes taxa que fueron expuestos a concentraciones de los 5 metales previamente establecidos. Para estas pruebas se utilizó como agua de dilución, agua de lago filtrada, aireada vigorosamente 24 horas antes, previo a su utilización se comprobó que la concentración de oxígeno se encontrara por encima de 6 mg/L (CIID 2004), ya que en el momento de las pruebas toxicológicas no se ocupó sistema de aireación mecánica. No se suministró alimentación a los neonatos en el transcurso de los bioensayos (NCh2083 1999) (Tabla 4).



Tabla 4. Concentraciones de metales en bioensayos de *Daphnia obtusa*.

CONCENTRACIONES	7	12	18	22	28
COBRE	7	12	18	22	28
PLATA	8	12	14	16	18
ZINC	0,5	0,8	1,5	2,5	3,0
COBALTO	2	5	8	10	12
ARGENTINO	26	36	46	56	60

Limpieza de los materiales.

Previo a la realización del bioensayo se lavaron cuidadosamente las cámaras de prueba según lo recomendado por la NCh2083 (1999), para evitar que algún residuo contenido en los envases interfiera en los resultados de los bioensayos. Se dejaron por 24 horas en HNO₃ (al 10%) y posteriormente fueron enjuagadas con agua corriente seis veces. Luego de esto fueron dejadas en remojo por 48 horas en agua destilada haciendo recambio a las 12 horas. Antes de la realización del test fueron enjuagadas con agua de dilución utilizada para la mantención y desarrollo de los cultivos, así se asegura que el material de vidrio no contenga restos de ácido que puedan alterar los resultados de los test. Al término de cada ensayo se repitió el procedimiento de limpieza para eliminar los restos de los tóxicos empleados. Las pipetas y todo material usado en las pruebas recibieron el mismo tratamiento que las cámaras utilizadas.

Tratamiento de las muestras previo bioensayos.

Una vez en el laboratorio fue necesario tratar las muestras antes de la realización de los test, utilizando protocolos. Para las muestras líquidas se utilizó la NCh2083 (1999). Por su parte, como es explicó anteriormente, para el tóxico de referencia, se preparó previamente una solución madre a partir de la cual se hicieron las diferentes diluciones para obtener las concentraciones deseadas para el ensayo.

Realización del Ensayo.

Para cada bioensayo se efectuaron cuatro réplicas, considerando un total de 5 concentraciones más un control por cada metal seleccionado, como medio se utilizó agua filtrada de dilución sin presencia de tóxico. Por lo tanto cada test para cada metal seleccionado implica el uso de 24 frascos de vidrio de 10 mL de volumen con una altura de 4,7 cm, a los cuales se les agrega el agua filtrada, en este caso no se proporcionó un sistema de aireación mecánica durante el tiempo de exposición. Finalmente, tanto en el control como en las diferentes concentraciones utilizadas por cada metal se consideró la



cantidad de 5 neonatos de *D. obtusa*. Estos organismos de hasta 24 horas de nacidos, fueron colectados desde los acuarios de cultivo (Figura 4).

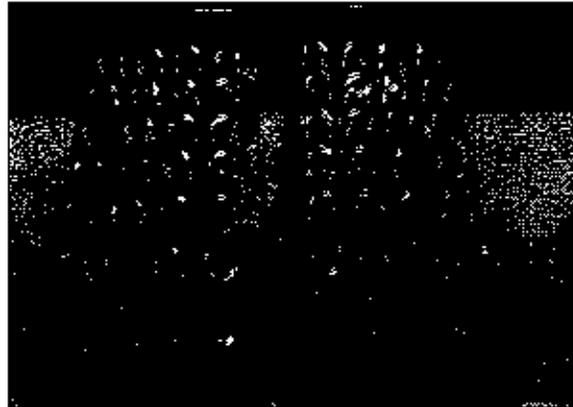


Figura 4. Disposición de envases bioensayo con microcrustáceo *Daphnia obtusa*.

Condiciones físico-químicas.

Los cultivos fueron mantenidos a temperatura ambiente fluctuante entre el día y la noche, con fotoperíodo de luz natural en periodo de verano (12 horas de luz - 12 horas de oscuridad) y sin sistema de aireación mecánica.

Un resumen de las condiciones en las que fueron realizados los bioensayos se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Resumen de las condiciones en que fueron llevados a cabo los bioensayos con *Daphnia obtusa*.

Tiempo de exposición	24 y 48 horas
Temperatura	18±2° C
Calidad de la luz	Fluorescente, blanco-frío
Fotoperíodo	12hrs luz - 12hrs oscuridad
Volumen de las cámaras	10 mL
Edad de los organismos	Neonatos < 24 horas
Número de concentraciones	5
Número de replicas por concentración	4
Número de organismos usados por cámara	5
Alimentación	Ninguna
Aireación	Agua previamente aireada por 24 h.
Tipo de agua del control y de dilución	Agua de lago filtrada
Respuesta	Mortalidad
Criterio de aceptabilidad	Hasta 10% de mortalidad en el control
Expresión de los resultados	LC ₅₀



Registro de los datos.

Al finalizar el tiempo de duración de los bioensayos (48 horas) se procedió a verificar al efecto de las diferentes concentraciones sobre los organismos, teniendo como juicio de signo de muerte, la inmovilidad de los individuos por un tiempo aproximado de 30 segundos, registrando el número de organismos muertos en función de los vivos y de acuerdo a esto se calculó el porcentaje de mortalidad.

Análisis de los datos.

Luego de finalizar las pruebas se procedió a calcular el valor del LC_{50} de 48 horas y los límites de confianza del 95% utilizando el programa PROBIT ingresando los datos de mortalidad registrados para cada uno de los bioensayos en los cuales el control presentara un porcentaje de mortalidad inferior al 10% (US EPA, 1990).

- Validación de ensayos. Preparación de la solución madre del tóxico de referencia ($K_2Cr_2O_7$) para *Daphnia ambigua*.

La preparación de la solución madre se efectuó siguiendo los mismos pasos descritos en el caso de la validación con la especie *Daphnia obtusa*.

Las concentraciones fueron establecidas en base a revisión bibliográfica de estudios precedentes. Se procedió a determinar las concentraciones definitivas del compuesto las que fueron en un ensayo preliminar de 0,1-0,5-2-10-50mg/l las cuales permitió estableció el rango a evaluar de Dicromato de potasio

b) Validación y Realización de bioensayos con Fitoplancton.

- Validación de ensayos. Preparación de la solución madre del tóxico de referencia ($K_2Cr_2O_7$) para *Selenastrum capricornutum*.

La preparación de la solución madre, se efectuó siguiendo el mismo procedimiento empleado en el caso de los ensayos con *Daphnia obtusa*. Así, se realizó un ensayo preliminar que evaluó las concentraciones de 0,3mg/l-0,5 mg/l-1 mg/l 5mg/l y 10 mg/l, las cuales fueron establecidas de acuerdo a literatura consultada. Finalizado el ensayo preliminar, se procedió a determinar las concentraciones definitivas del compuesto las que fueron: 1mg/l-2mg/l-3,5m/l-4,5mg/ y 5,4mg/l de $K_2Cr_2O_7$. En este ensayo de validación se utilizó medio de cultivo preparado en base a la Nch 2706 (2002).



- Preparación de la solución madre del tóxico de referencia ($K_2Cr_2O_7$) para *Chlorella* sp.

Los pasos a seguir consisten en los descritos anteriormente para *S. capricornutum*, evaluando en primera instancia las concentraciones de 0,3-1,3-2,3-3,5-5 mg/l de $K_2Cr_2O_7$. Estableciendo finalmente las concentraciones definitivas.

- Realización bioensayo de toxicidad con metales para fitoplancton.

Para cada bioensayo se utilizaron cuatro réplicas, donde para cada una hubo 5 diferentes concentraciones más un control (agua de dilución sin presencia de tóxico alguno). Por lo tanto, cada test implica el uso de 24 frascos de vidrio (Figura 5). Tanto el control como las diferentes concentraciones ensayadas se realizaron en base a cálculos previos como lo muestra la Tabla 7. El agua de dilución utilizada para las pruebas corresponde al medio de cultivo de las algas, cuyo pH es de 7.5.



Figura 5. Disposición de envases Bioensayo con *Selenastrum capricornutum*.

El stock de microalgas con el que se comienza a trabajar corresponde a 500.000 Cel/ml, donde al agregar 0.2 ml de éstas a cada una de las réplicas ensayadas se obtendrá una concentración inicial para la prueba de 50.000 cel/ml.

Las concentraciones ensayadas para cada metal se resumen en la Tabla 6, las que se definieron en base a ensayos preliminares y literatura respectiva.



Tabla 6. Concentraciones evaluadas de microalgas.

METALES	CONCENTRACIONES EVALUADAS mg/L				
COBRE- concentraciones I	0,42	0,48	0,53	0,58	0,62
COBRE- concentraciones II	0,15	0,22	0,34	0,45	0,54
HIERRO- concentraciones I	0,3	0,5	1,0	5,0	10
HIERRO- concentraciones II	0,5	1,2	2,5	5,5	10
ZINC- Concentraciones I	0,48	0,56	0,76	0,82	0,96
ZINC- Concentraciones II	8,0	12,0	17,0	24,0	28,0
ALUMINIO- Concentraciones I	0,39	0,46	0,52	0,65	0,75
ALUMINIO- Concentraciones II	0,3	0,8	1,3	1,7	2,2
MANGANESO- Concentraciones I	1,2	2,5	3,5	4,5	5,0
MANGANESO- Concentraciones II	0,5	1,2	2,2	3,2	4,2

Un resumen de las condiciones en las que fueron realizados los bioensayos se presenta en la siguiente Tabla 7.

Tabla 7. Resumen de las condiciones en que se efectuaron los bioensayos con *Selenastrum capricornutum*.

Tiempo de exposición	72 -96 horas
Temperatura	20°C -23°C ±2° C
Calidad de la luz	Blanca fría dada por tubos fluorescentes
Fotoperiodo	Iluminación continua
Volumen de las cámaras	30 ml
Número de concentraciones	5 más un control
Número de replicas por concentración	4
Factor de dilución	0,3-0,5
Alimentación	Ninguna
Aireación	No
Duración del ensayo	96 horas
Respuesta	Mortalidad /densidad (conteo)
Criterio de aceptabilidad	Hasta 10% de mortalidad en el control
Expresión de los resultados	LC ₅₀

Registro de los datos.

Al finalizar el tiempo de duración de los bioensayos se procedió a verificar al efecto de las diferentes concentraciones sobre los organismos, obteniendo la densidad de células existente para cada concentración, estableciendo el crecimiento visualizado en relación con el riesgo.



Análisis de los datos.

Luego de finalizadas las pruebas se procedió a calcular el valor del LC_{50} de 96 horas y los límites de confianza del 95% utilizando el programa PROBALG, ingresando los datos de mortalidad registrados para cada uno de los bioensayos en los cuales el control presentara un porcentaje de mortalidad inferior al 10% (US EPA 1990) y la densidad celular del control fuese superior respecto a la concentración máxima, además de no existir una diferencia superior al 20% entre las replicas.

c) Validación y Realización de bioensayos con Macroinvertebrados Bentónicos.

Los organismos que se utilizaron en el desarrollo de cada uno de los bioensayos corresponden a especímenes pertenecientes a la comunidad de invertebrados bentónicos del Orden Ephemeroptera con su Familia Leptophlebiidae y Dípteros de la Familia Chironomidae.

El criterio de selección para ambas taxa fue la alta abundancia de las poblaciones respectivas en el ambiente natural, su condición de especies indicadoras de buena calidad de agua en el caso de *Meridialaris sp.* y su amplia distribución en el territorio en el caso de Chironomidae.

En la realización de los bioensayos, estos organismos fueron expuestos a diferentes concentraciones de los metales seleccionados (aluminio, cobre, hierro, mangneso y zinc) por un tiempo de 96 horas con el objeto de determina la concentración letal media, o LC_{50} , a un nivel de confiabilidad del 95%.

- Validación de bioensayos para macroinvertebrados.

Para la estandarización de los bioensayos se empleó Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$), las diluciones empleadas en los bioensayos con macroinvertebrados fueron preparadas con agua reconstituida en base a Nch 2083 (1999). El procedimiento efectuado es el mismo descrito anteriormente (punto 3.1.1 a y b) en el caso de los ensayos con zoo y fitoplancton, sólo varía la duración del ensayo que en este caso alcanza las 48 horas.



Muestreo y Transporte de Invertebrados Bentónicos Nativos.

Los invertebrados bentónicos empleados en los bioensayos fueron colectados en el Río Codihue, mediante muestreos al azar durante los meses de marzo, abril y mayo empleando una red Surber de 30x30 centímetros. Las muestras de fauna fueron minuciosamente separadas del material orgánico e inorgánico, esta operación se realizó in situ, posteriormente las muestras fueron identificadas hasta el nivel taxonómico de familia mediante claves y descripciones de Peters y Edmunds (1972), McCafferty (1983), Arenas (1993, 1995) y Fernández y Domínguez (2001).

Los individuos empleados en los bioensayos fueron seleccionados utilizando bandejas de 60x30x15 cm donde se dispuso el material colectado, posteriormente fueron recogidos mediante gotarios y dispuestos en el sistema de transporte especialmente diseñado para este tipo de comunidad. Este sistema consiste en la utilización de envases de 10 litros en cuyo interior se dispone un sustrato artificial para que los individuos transportados se adhieran y se distribuyan de forma uniforme en los envases de traslado. Adicionalmente los envases de transporte fueron implementados con un sistema de aireación mecánica en un cooler con icepack de manera de asegurar y conservar la temperatura de recolección (entre 11 y 14°C) (Figuras 6 y 7). Una vez en el laboratorio fueron mantenidas por 24 horas para su aclimatación antes de ser utilizadas en los bioensayos.

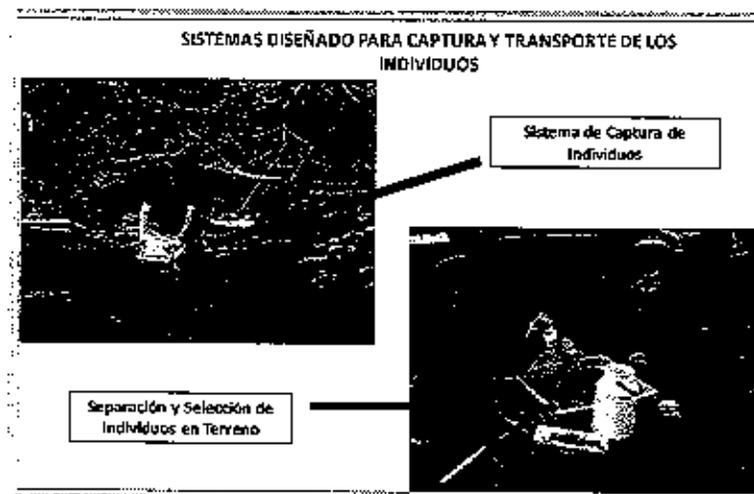


Figura 6. Sistemas de recolección y selección de especies.

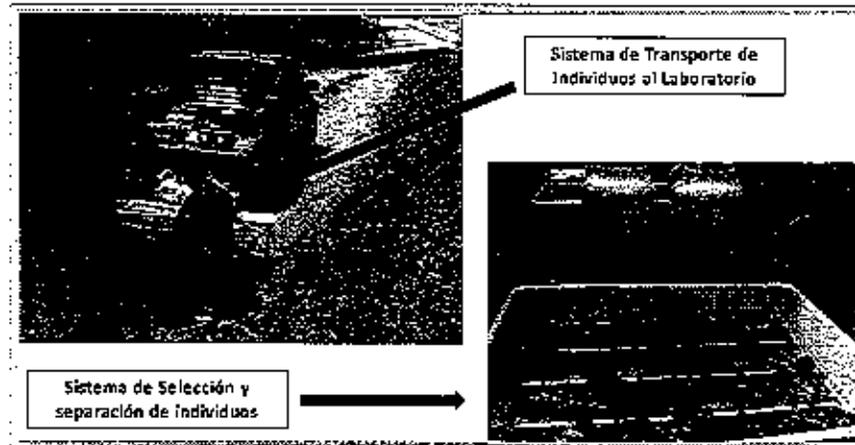


Figura 7. Sistemas de transporte y envases de traslados de especies

- Realización de bioensayos de toxicidad con metales.

Mediante los bioensayos con macroinvertebrados bentónicos efectuados se evaluaron 5 metales previamente definidos (aluminio, cobre, hierro, manganeso y zinc), los organismos empleados corresponden al Orden Ephemeroptera específicamente a la Familia Leptophlebiidae y Dípteros de la familia Chironomidae.

- Diseño de bioensayos con Invertebrados Bentónicos Nativos- familia Leptophlebiidae.

Para cada bioensayo se emplearon cuatro réplicas, considerando un total de 5 concentraciones más un control por cada metal seleccionado, como medio se utilizó agua filtrada de dilución sin presencia de tóxico. Por lo tanto cada test para cada metal seleccionado implica el uso de 24 vasos precipitados de 100 ml a los cuales se les agrega el agua filtrada, adicionalmente se les proporciona un sistema de aireación mecánica durante todo el tiempo de exposición, el que corresponde a 96 horas (Figura 8). Finalmente, tanto el control como las diferentes concentraciones utilizadas por cada metal contienen 5 individuos de la familia seleccionada para este estudio.

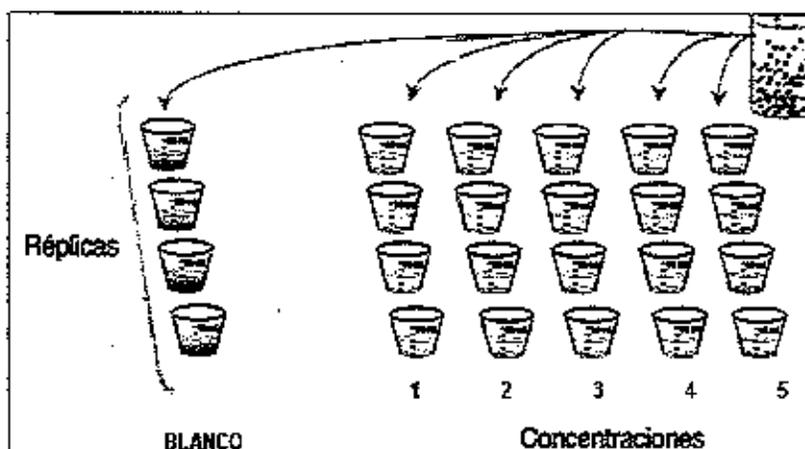


Figura 8. Disposición de envases bioensayos con invertebrado bentónicos nativos.

A su vez, cada vaso precipitado utilizado en los bioensayos contaron con un sustrato artificial consistente en una esfera de plumavit cuyo diámetro fue de 2,5 cm, conjuntamente con su respectiva varilla plástica, para que los individuos se mantuvieran fijados, en cada uno de los vasos (Figura 9), de manera de acondicionar los individuos a las características naturales, considerando que su principal hábitat corresponde a los intersticios del bentos de ríos y lagos, donde se mantienen adheridos.



Figura 9. Sistema implementado para realizar bioensayos con invertebrado bentónicos nativos.

Las condiciones generales en las cuales se desarrollaron los bioensayos se detallan en la siguiente Tabla:



Tabla 8. Resumen de las condiciones en que se efectuaron los bioensayos con Leptophlebiidae.

Tipo de ensayo	Estático
Duración del Test	24-48 hrs. (K ₂ Cr ₂ O ₇) 96 hrs. (5 metales)
Variable respuesta	Mortalidad
Luz	Ambiente laboratorio
Fotoperíodo	8 hrs. Luz y 16 hrs. Oscuridad
Nº de concentraciones	5 + control
Nº de organismos por concentración	5
Nº de replicas	4 (metales) 4 (K ₂ Cr ₂ O ₇)
Temperatura	11°C / 1°C
Alimentación	Ninguna
Talla de los organismos	10 mm
Volumen de solución	50ml
Agua de dilución para K ₂ Cr ₂ O ₇	Reconstituida
Criterios de aceptabilidad	Hasta 10% de mortalidad en el control
Agua de dilución para los 5 metales	Agua de lago
Expresión de los resultados	LC50 24-48 hrs. para K ₂ Cr ₂ O ₇ LC50 96 hrs. Metales

- Cultivo y Diseño de bioensayos con Invertebrados Bentónicos Nativos- familia Chironomidae (*Paratanytarsus grimmii*).

Conocer la respuesta ecotoxicológica de especies nativas frente a distintos xenobióticos puede ayudar a establecer estándares de protección para los ecosistemas acuáticos continentales. Una dificultad que se presenta para ello, es el manejar especies susceptibles de usar bajo en condiciones de laboratorio. Las fases metodológicas a emplear para el cultivo y diseño de bioensayos con individuos de la familia Chironomidae, son las siguientes:

Fase I: Captura de larvas de Chironomidos en ambiente natural y selección de especie.

Fase II: Mantención de larvas en condiciones controladas.

Fase III: Obtención de adultos y huevos.

Fase IV: Cultivo de huevos y obtención de larvas.



a) Muestreo: Los ejemplares utilizados para el cultivo se colectaron del Río Codihue (coordenadas UTM 759051E - 5676398N), distante a 70 Km de Temuco, afluente del Lago Colico. El río Codihue es un río precordillerano el cual presenta abundante vegetación ribereña y baja actividad antrópica. Los parámetros de referencia de calidad del agua del río Codihue al momento de su captura fueron: Temperatura 11.7 °C; Conductividad Eléctrica 93.3 µS; Sólidos Totales Disueltos 46.8 mg/l y pH 7.44.

Los Chironomidos presentes en el fondo del río (sustrato) se colectaron con una red tipo D (Figura 10). Las muestras obtenidas fueron colocadas en bandejas de plástico y los individuos presentes fueron tomados con un gotario plástico y depositado en una botella de vidrio. Posteriormente se colocaron en recipientes con aireación para su traslado al laboratorio (Figura 10).

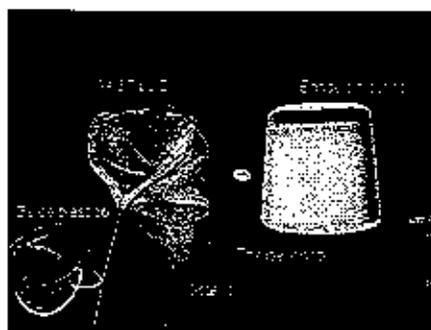


Figura 10. Materiales empleados en terreno captura Chironomidos.

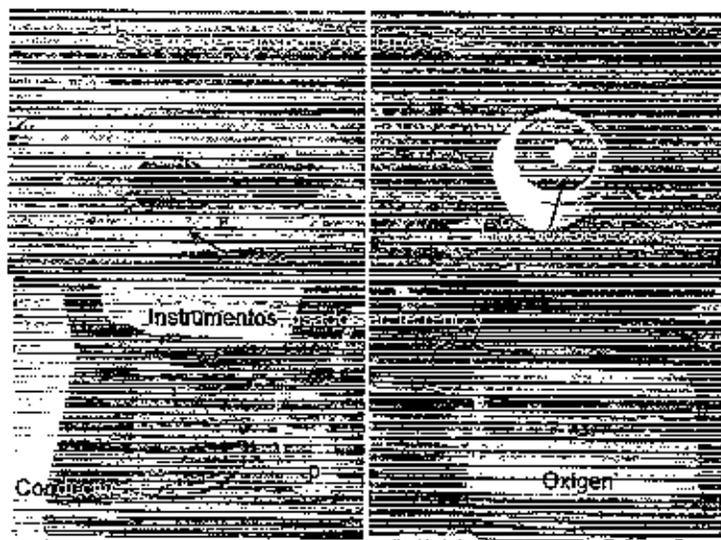


Figura 11. Transporte de larvas e instrumentos de medición.



b) Condiciones de manipulación.

Para los ensayos se utilizaron larvas de Diptera, familia Chironomidae, subfamilia Chironominae. Los individuos fueron puestos en bandejas de plásticos con un sustrato preparado ad-hoc. La manipulación de los individuos se efectuó bajo lupa estereoscópica utilizando pipetas plásticas y cápsulas de petri de 4,5 cm. Tanto cápsulas como bandejas se colocaron en cajas para insectos de 25 cm x 36 cm, revestidas en malla de 2 mm de apertura. A las bandejas se puso un sistema de aireación con mangueras conectadas a bombas (Figura 12).

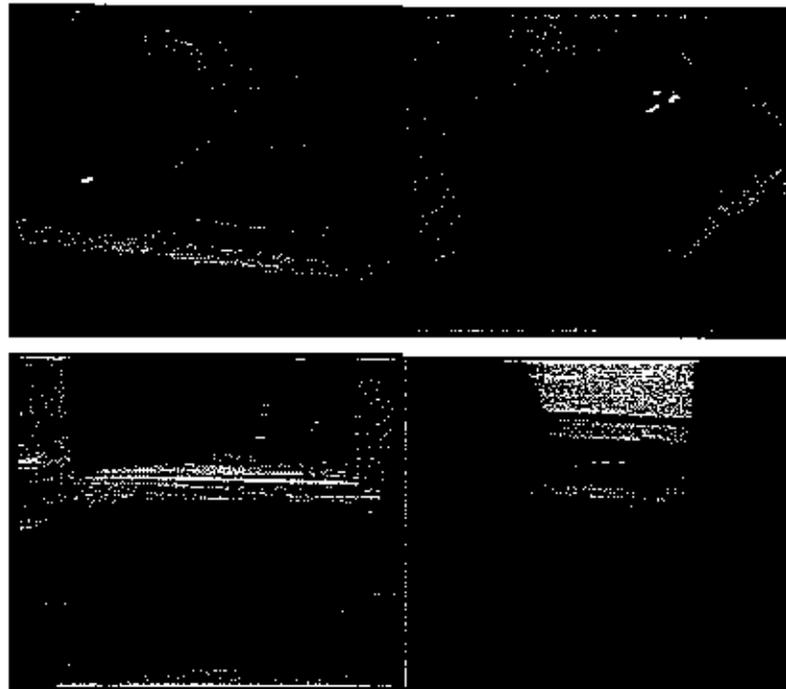


Figura 12. Manipulación de larvas.

A las bandejas se le suministró alimento cada 3 días. La alimentación se efectuó con alimento preparado como se describe en Tabla 9 y 10.



Tabla 9. Alimento para cultivo.

INGREDIENTES	PROCEDIMIENTO
-Sedimento obtenido del río -Alimento para peces -Hojas de ortiga	El sedimento y las hojas de ortiga se secaron en estufa a 40°C durante 24 hrs. Las hojas de ortiga fueron molidas en un mortero y el sedimento colocado nuevamente a estufa a 110°C durante 24 hrs. para terminar de secar. Posteriormente, se procedió macerar en un mortero. La ortiga, alimentos para peces y sedimento macerados se combinaron en una proporción 0,1 - 1 - 10 gramos respectivamente.

Los ensayos se realizaron utilizando condiciones constantes de acuerdo a la Tabla 11.

Tabla 10. Variables controladas para la manipulación de Chironómidos.

ESPECIE	TEMPERATURA	ALIMENTACIÓN	PERÍODO
Reconstituida según NCh 2083 of1999 (Daphnias). Modificado de ISO 1989)	Variación sala: máxima= 21,4°C Promedio mínima=17,4°C	Por bandeja 2ml, cada 3 días	Horas luz: 14 (6 AM-20 PM) Horas oscuridad: 10 (20 PM-6 AM)

Previo a la realización de los bioensayos de toxicidad se debió analizar:

- Sincronización de eclosión de larvas.

Utilizando los cultivo de Chironomidos ya establecidos se obtienen oviposturas en forma aleatoria, por lo que las larvas eclosionan desincronizadamente y como consecuencia, se obtienen larvas de diferentes longitudes al cabo de unos días. Esto dificulta la necesidad de disponer de individuos suficientes (estado II, de 2 a 3 mm) para un bioensayo. Con el objeto de obtener larvas en forma masiva (sincronizado) y de una misma talla de individuos, se utilizó la técnica de estrés térmico. Para ello, se colocaron en un capsula de petri, de 6 cm de diámetro, 6 a 10 oviposturas de 24 hrs. obtenidas durante 4 días consecutivos (según disponibilidad) en un refrigerador a 5 °C (Figura 12). Al cuarto día, las oviposturas fueron retiradas y colocadas bajo condiciones de cultivo previamente establecidas, permitiendo ello continuar con el desarrollo de los huevos.

Con el método descrito anteriormente, se logró sincronizar la eclosión con un desfase entre oviposturas de menos de 24 horas.



Cada ovipostura tiene un número variable de huevos (rango 40 a 130) por lo que la técnica antes mencionada permitió planificar la cantidad de oviposturas a manejar y así obtener el número de larvas requeridas para un determinado bioensayo.

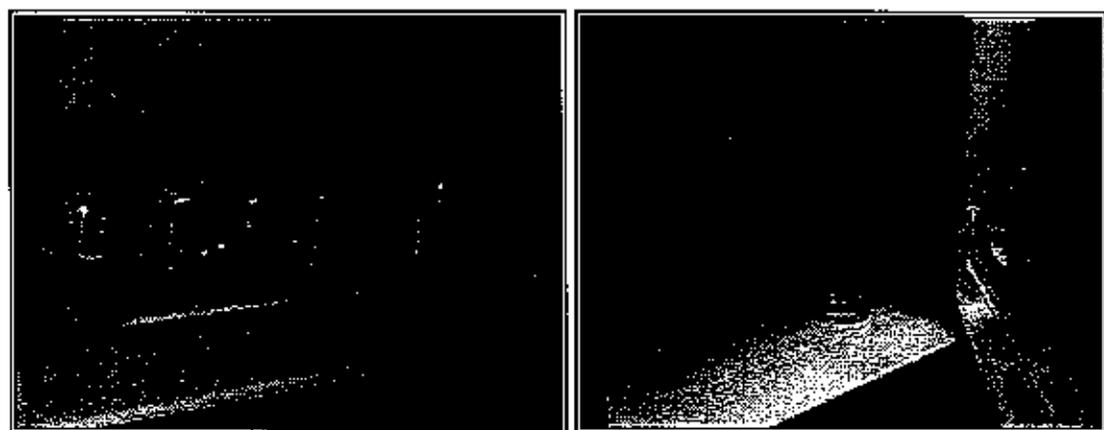


Figura 13. Oviposturas sometidas a estrés térmico durante un máximo de 4 días.

- Test de sobrevivencia.

Con el objetivo de conocer la respuesta en sobrevivencia a la manipulación de las larvas en futuros bioensayos, se procedió a montar un test preliminar para cuantificar la sobrevivencia de individuos bajo una condición control. Las condiciones del ensayo se muestran en Tabla 11.

El ensayo se realizó entre el 19 de junio y el 23 de junio de 2010. En la Figura 14 se muestra la batería de ensayos usada para determinar sobrevivencia, siendo empleado como medio base agua reconstituida según NCh N° 2083 (1999).

Tabla 11. Condiciones de ensayo de sobrevivencia.

Especie	Chironominae
Estadio	II (2 a 3 cm)
Envases	100cc
Medio base	agua reconstituida
Nº ind. por envase	5
Nº réplicas	3
Temperatura (°C) ensayo	22
Fotoperiodo	10 noche/ 14 día
Alimentación	S/A
Aireación	S/A
Horas registro	24-48-72-96-120



Figura 14. Batería de ensayos usada para determinar sobrevivencia de larvas bajo una condición control.

d) Validación y Realización de bioensayos con Peces.

- Validación de bioensayos con peces.

Para la estandarización de los bioensayos se empleó Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$), para las diluciones empleadas en los bioensayos con peces se utilizó agua de lago. El procedimiento efectuado para el caso de los peces es el mismo descrito anteriormente en para bioensayos con zoo y fitoplancton, sólo varía la duración del procedimiento que en este caso es de 48 horas.

Muestreo y Transporte de Peces Nativos.

Los peces nativos (*Galaxias maculatus*) fueron colectadas en el Río Cruces y tributarios de éste en un área aledaña a la comuna de Lanco. Las muestras fueron transportadas en bidones plásticos, mantenidas con aireación mecánica y una vez en el laboratorio fueron mantenidas por 24 horas para su aclimatación antes de ser utilizadas en los bioensayos.



El arte de pesca utilizado para la colecta de peces en el río fue la red de corral, la cual presenta una longitud de relinga de 25 m y una altura de 1,5 m, un tamaño de apertura de malla de 3 mm y un cono con un largo de 1,5m y un diámetro de 1,5 m, ubicado en la mitad de la longitud total de la red. En la parte superior lleva flotadores y en la parte inferior lastre de plomos. El procedimiento fue realizado por tres personas uno de los cuales tomó un extremo de la red y realizó el cerco correspondiente, ayudado por una embarcación a motor en los sectores donde el río presentaba una profundidad superior a lo 1,5 m o simplemente caminando en los sectores más bajos; la otra persona puesta en el extremo opuesto alineó la red, de tal manera que una vez que el cerco fue completado, se comenzó a recoger la red desde la orilla por ambas puntas, evitando la fuga de peces por encima o por debajo de la misma, de esta manera los peces comienzan a agruparse en el centro de la malla donde finalmente ingresan al cono para ser recogidos.

Los especímenes fueron depositados en estanques de 60 litros asegurando una densidad de carga no mayor a los 10 kg/m³, todos los estanques fueron acondicionados con aireación mecánica para mantener los niveles de oxígeno disuelto en forma óptima no menor a los 6 mg/l posteriormente éstos fueron trasladados al Laboratorio para su acondicionamiento de 24 horas previo al bioensayo, lo cual implica el retiro de todos los sólidos sedimentables colectados producto de la captura, ello con la finalidad de mantenerlos en agua limpia por lo menos 24 horas antes de la aplicación del bioensayo, además se deben mantener con aeración controlada de tal forma de no ocasionar un sobre stress de los peces y asegurar al menos un 85% de saturación de oxígeno (Figura 15).



Figura 15. Acondicionamiento de peces en Laboratorio.



- Realización de Bioensayos- Diseño de Bioensayos con Peces Nativos.

Para la realización de bioensayos de toxicidad con peces, se seleccionaron individuos pertenecientes a la Familia Galaxiidae con la especie *Galaxias maculatus*. El criterio de selección para este taxón fue la alta abundancia de las poblaciones respectivas en el ambiente natural, su condición de especies indicadoras de buena calidad de agua y su amplia distribución en el territorio nacional.

Estos organismos fueron expuestos a diferentes concentraciones de los metales seleccionados (aluminio, cobre, Hierro, mangneso y zinc) por un tiempo de 96 horas con el objeto de determina la concentración letal media, o LC_{50} , a un nivel de confiabilidad del 95%.

Los bioensayos en peces se efectuaron con juveniles en estado de pigmentación de 0,5 gr promedio, la densidad utilizada por acuario no superó los 10 kg/m^3 ; debido a que los individuos juveniles y adultos están presentes en toda época del año facilita su recolección. Se consideraron un total de 5 concentraciones más un control por cada metal seleccionado con 5 individuos cada uno, como medio se utilizó agua filtrada de dilución sin presencia de tóxico. Por lo tanto cada test para cada metal seleccionado implica el uso de 30 acuarios de 2000 ml a los cuales se les agrega el agua filtrada, adicionalmente se les proporciona un sistema de aireación mecánica durante todo el tiempo de exposición (Figura 16), para finalmente establecer los valores del LC_{50} .

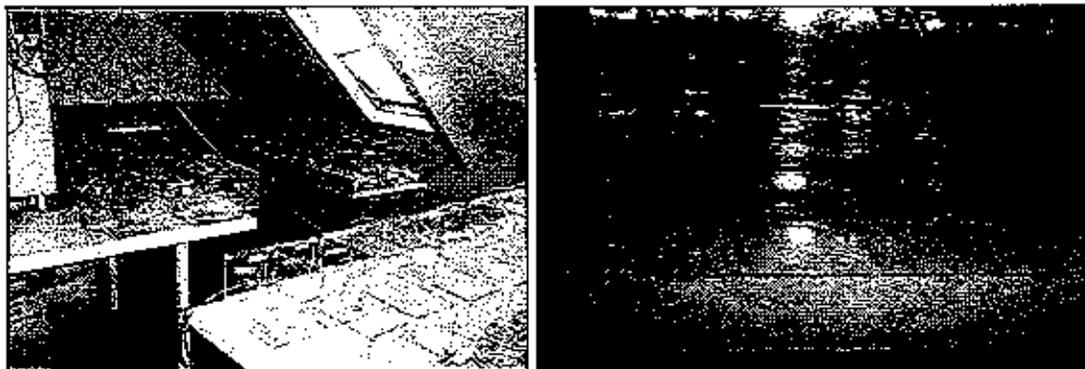


Figura 16. Disposición acuarios bioensayos con peces nativos.

Las condiciones generales en las cuales se desarrollaron los bioensayos se detallan en la Tabla 12:



Tabla 12. Resumen de las condiciones en que se efectuaron los bioensayos con individuos de la familia Galaxiidae.

Tipo de ensayo	Estático
Duración del Test	24-48 hrs. ($K_2Cr_2O_7$) 96 hrs. (5 metales)
Variable respuesta	Mortalidad
Luz	Ambiente Laboratorio
Fotoperíodo	8 hrs. Luz y 16 hrs. Oscuridad
Nº de concentraciones	5 + un control
Nº de organismos por concentración	5
Nº de replicas	5 (metales) 5 ($K_2Cr_2O_7$)
Temperatura	11°C / 1°C
Alimentación	Ninguna
Talla de los organismos	5 - 6 cm
Volumen de solución	800ml
Agua de dilución para $K_2Cr_2O_7$	Agua de Lago
Criterios de aceptabilidad	Hasta 10% de mortalidad en el control
Agua de dilución para los 5 metales	Agua de lago
Expresión de los resultados	LC ₅₀ 24-48 hrs. para $K_2Cr_2O_7$ LC ₅₀ 96 hrs. metales

El establecimiento de las concentraciones a evaluar se preparó considerando antecedentes anteriores de ensayos preliminares. Las concentraciones iniciales se detallan en la Tabla 13.

Tabla 13. Concentraciones probadas en bioensayos de peces nativos.

PECES	CONCENTRACIONES				
ALUMINIO	0,1 mg/l	0,5 mg/L	2 mg/l	4 mg/l	6 mg/l
ARSÉNICO	0,1 mg/l	0,5 mg/L	2 mg/l	4 mg/l	6 mg/l
COBRE	0,1 mg/l	0,5 mg/L	2 mg/l	4mg/l	6mg/L
HIERRO	0,1 mg/l	0,5 mg/L	2 mg/l	4 mg/l	6 mg/l
MANGANESO	0,1 mg/l	0,5 mg/L	2 mg/l	4 mg/l	6 mg/l
ZINC	0,1 mg/l	0,5 mg/L	2 mg/l	4 mg/l	6mg/L



Registro de los datos.

Al finalizar el tiempo de duración de los bioensayos se procedió a verificar al efecto de las diferentes concentraciones sobre los organismos, registrando el número de organismos muertos y de acuerdo a esto se calculó el porcentaje de mortalidad.

Análisis de los datos.

Luego de finalizar las pruebas se procedió a calcular el valor del LC₅₀ de 96 horas y los límites de confianza del 95% utilizando el programa Xlstat 2009 ingresando los datos de mortalidad registrados para cada uno de los bioensayos en los cuales el control presentara un porcentaje de mortalidad inferior al 10% (US EPA, 1990).

- Realización de pruebas con *Oncorhynchus mykiss*.

Los bioensayos en especies estandarizadas para peces consideraron individuos adultos con una densidad de 10 kg/m³; ello puesto que los individuos adultos están presentes en toda época del año condición que facilita su recolección. Basado en protocolos EPA (1998), los bioensayos consistieron en un control más cinco concentraciones y 4 ejemplares por concentración (Nº que está determinado por la densidad recomendada de 10 kg/m³) con cinco réplicas, con una duración de 96 horas para así establecer los LC₅₀.

En la Tabla 14 se muestran los cálculos previos para la realización del bioensayo.

Tabla 14. Cálculos previos bioensayos con *Oncorhynchus mykiss*.

	Control	25%	50%	75%	100%	
Muestra(ml)	---	80	200	400	600	800
Relleno (ml)	800	720	600	400	200	---
Volumen Final (ml)	800	800	800	800	800	800
Nº individuos de 2 a 2,5 gramos	4	4	4	4	4	4

Los peces sometidos a ensayos se colocaron en frascos de vidrio de 1 litro con agua de clorada y filtrada contando con aireación mecánica durante todo el tiempo de exposición, como lo muestra la Figura 17.

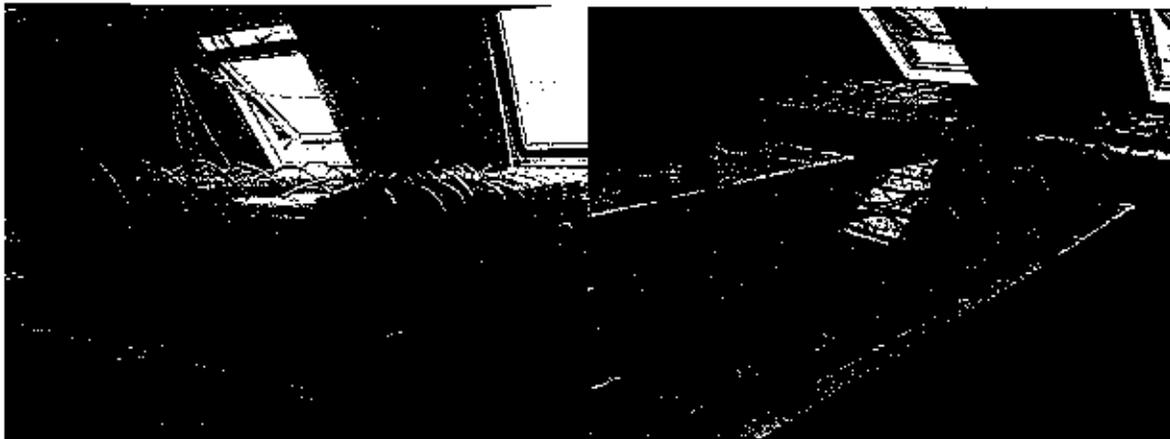


Figura 17. Bioensayos con *Oncorhynchus mykiss*.

Las condiciones generales de los bioensayos se entregan en la Tabla 15.

Tabla 15. Consideraciones generales para bioensayos con peces según EPA (1998).

Agua de dilución	Agua de clorada y filtrada
Temperatura	15°C
pH	7
Fotoperíodo	14 horas de luz
Aireación	Asegurar OD > 5ppm
Duración test	96 hrs
Talla promedio de organismos	5,42 cm
Peso promedio de organismos	2 grs
alimentación	ninguna
Número de individuos por ensayo	5
Número de concentraciones	5 mas un control
Número de replicas	4
Expresión resultados	LC ₅₀
Valides del test	Mortalidad del control > 10%
Variable de respuesta	mortalidad

Registro de los datos.

Al finalizar el tiempo de duración de los bioensayos se procedió a verificar al efecto de las diferentes concentraciones sobre los organismos, teniendo como juicio de signo de muerte, la inmovilidad de los individuos por un tiempo aproximado de 30 segundos registrando el número de organismos muertos en función de los vivos y de acuerdo a esto se calculó el porcentaje de mortalidad.



Análisis de los datos.

Terminado el ensayo se procede a calcular el valor del LC_{50} de 96 horas y los límites de confianza del 95% utilizando el programa Xistat 2009 (EPA, 1993). Se utilizaron los datos de mortalidad registrados para cada uno de los bioensayos en los cuales el control presentara un porcentaje de mortalidad inferior al 10% (US EPA, 1990).

e) Realización de ensayos con Macrófitas.

Para los ensayos de toxicidad crónica con los metales Al, Fe, Cu, Zn y Mn para macrófitas se realizaron bioensayos con la especie *Myriophyllum aquaticum*. El método empleado consistió en la medición del contenido de clorofila de los ejemplares en ensayo.

Medición de contenido de clorofila.

Se determinó el contenido de clorofila para la especie en estudio, de esta forma, se realizó una primera medición antes de cada experimento, y una última medición al término de cada experimento o a medida que las plantas presentasen signos de mortalidad. Para determinar el contenido clorofílico, se pesaron 0,5 gramos aproximadamente del material, utilizando 10 ml de acetona como solvente manteniéndose en frío durante 24 horas. Se calibró el espectrofotómetro a longitud de onda de 647 nm y 664 nm. La medición se realizó contra una solución de acetona al 80% (calibración del instrumento). El cálculo del contenido de ambas clorofilas se realiza aplicando la siguiente relación:

$$Cl [a] \left(\frac{mg}{10ml} \right) = 0,1178 \times E_{664} - 0,0229 \times E_{647}$$

$$Cl [b] \left(\frac{mg}{10ml} \right) = 0,2005 \times E_{647} - 0,0477 \times E_{664}$$

Donde, E = corresponde a la lectura en espectrofotómetro a diferente longitud de onda (Latsague & Leiva 1998).

El valor de concentración de clorofila (a y b) por 10 ml (acetona), que corresponden a "x" gramos de biomasa vegetal humedad.

$$\frac{[y] \text{ mg clorofila}}{10 \text{ ml acetona}} = \frac{[y] \text{ mg clorofila}}{[x] \text{ mg biomasa vegetales}}$$

$$\frac{[y] \text{ mg clorofila} \times 100}{[x] \text{ grs biomasa vegetal}} = \text{Porcentaje de clorofila en biomasa vegetal}$$



3.3 CARACTERIZACIÓN DEL RIESGO MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE VALORES DE RQ SOBRE LA BASE DE LA INFORMACIÓN OBTENIDA DE LOS BIOENSAYOS DE LAS ESPECIES LOCALES, ESTANDARIZADAS Y LA DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES DE SEGURIDAD PARA LA PROTECCIÓN DE ESPECIES LOCALES.

La determinación de niveles de protección para el área en estudio, se efectuó a partir de una evaluación de riesgo ecológico de acuerdo a la metodología propuesta por Medina & Encina (2004), además se incorporó en el análisis la variabilidad e incertidumbre, para ello se utilizó una modificación de la metodología de Van Straalen & Denneman (1989), para estimar el porcentaje de especies protegidas para un nivel de exposición determinada. Las concentraciones de no efecto (PNEC) se calcularon aplicando un factor de evaluación (FS) de 50 y de 100 a los LC_{50} , de acuerdo a los recomendado por la OECD (1992). Finalmente el nivel de protección propuesto en el anteproyecto de Norma Secundaria de Calidad Ambiental para la protección de las aguas del río Valdivia corresponde al valor de PNEC que protege el 70% de las poblaciones expuestas.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE SENSIBILIDAD O TOLERANCIA MÁXIMA A DETERMINADOS CONTAMINANTES SOBRE ESPECIES ESTANDARIZADAS Y ESPECIES LOCALES DE MAYOR RELEVANCIA ECOLÓGICA

4.2.1 SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES LOCALES DE RELEVANCIA ECOLÓGICA Y EL ROL ECOLÓGICO DE LAS ESPECIES SELECCIONADAS PARA LOS BIOENSAYOS EN EL "SANTUARIO DE LA NATURALEZA CARLOS ANWANDTER".

Especies de Relevancia Ecológica.

La conceptualización de especies ecológicamente relevantes en el ecosistema es uno de los aspectos centrales de la ecología como disciplina científica. Es así como se han sucedido diferentes paradigmas que tratan de explicar las importancias de las especies que interactúan con su medio natural (abiótico y biótico) y sus efectos sobre la biodiversidad:

Conceptos tradicionales.

1. Los primeros paradigmas acerca de la importancia de las especies estuvieron centradas en las fuerzas Botton-up como reguladores de las poblaciones en un ecosistema. En términos simples la producción primaria y el transporte de energía y materiales hacia los niveles tróficos superiores corresponderían a las fuerzas organizadoras del ecosistema y por tanto especies ecológicamente relevantes.
2. Posteriormente fueron los procesos de interacción biológica comenzando a prevalecer por el sistema Botton-up, en el cual la competencia fue considerada como el factor organizador más relevante al interior de cada nivel trófico regulando los tamaños poblacionales de las especies.
3. Recientemente las fuerzas Top-down han captado la atención de la comunidad científica considerando a los predadores como entidades ecológicamente relevantes para el ecosistema por sus efectos en la biodiversidad.



El sistema predador-presa, sin duda, ha sido ampliamente analizado, derivando importantes aportes para el entendimiento de la función de estas especies y sus consecuencias sobre el ecosistema (Estes et al 2001). Desde este punto de vista el mayor efecto de los predadores está asociado a la mantención de altos niveles de biodiversidad en una comunidad. Consecuentemente este tipo de especies es considerada como ecológicamente relevantes, surgiendo el concepto de "Especies Claves," las cuales se definen como aquellas especies predadores de alto nivel trófico que mantienen altos niveles de biodiversidad en una comunidad. Los argumentos para categorizar a ciertas especies como claves radican en el efecto predatorio y por tanto regulatorio que existe sobre presas competitivamente dominantes que favorecen la exclusión competitiva entre potenciales competidores reduciendo la biodiversidad. Esta argumentación ecológica ha sido sustentada con numerosos experimentos de campo en el cual destaca el trabajo realizado en el intermareal rocoso con el clásico experimento con las estrellas de mar y su efecto sobre las agrupaciones de choritos (Paine 1960). No obstante los importantes avances derivados de las especies claves actualmente surgen otras formas de determinar especies ecológicamente relevantes que tiene relación con las redes ecológicas en el cual se producen interacciones de interdependencia.

Nuevo enfoque - Redes Tróficas.

Las especies dentro de una comunidad son capaces de tejer redes de interdependencia mutua, estas interacciones de interdependencia han tenido un papel muy importante en la generación de biodiversidad (Bascompte & Jordano 2008). Consecuentemente determinar la estructura de las redes ecológicas en términos de sus múltiples interacciones es un acercamiento que permitirá entender las respuestas de las especies frente a diferentes perturbaciones como pérdida de hábitat, invasiones de especies exóticas o sobreexplotación. Los patrones a determinar en la estructura de una red ecológica corresponden entre otros a las clásicas medidas de longitud de cadenas tróficas, si la distancia que separa a dos especies es superior a tres conexiones una perturbación que afectase a una especie A no influiría en otra especie B. Los datos empíricos demuestran que la mayoría de las especies están separadas tan solo por dos a tres conexiones generándose rápidas propagaciones de una perturbación. Otra propiedad estructural tiene relación con la distribución de conexiones de las especies donde se encuentran distribuciones heterogéneas y asimétricas. Se ha determinado que a mayor número de especies en una red ecológica la distribución es más heterogénea, es decir, muchas especies poco conectadas y un número pequeño altamente conectadas; por el



contrario redes ecológicas con pocas especies presentarían distribuciones más homogéneas. La asimetría tiene relación con que algunas especies con una sola interacción tienden a interactuar con las especies más conectadas en la red ecológica.

Las propiedades estructurales mencionadas previamente tienen profundas implicaciones para entender los efectos de pérdida de biodiversidad y propagación de perturbaciones. Las redes ecológicas son muy sensibles a la extinción de especies altamente conectadas, dado que la pérdida de estas especies provoca la co-extinción de un gran número de otras especies y la fragmentación de la red ecológica. Los datos empíricos de la naturaleza reflejan que las redes ecológicas presentan distribuciones heterogéneas y por tanto son más robustas frente a la extinción de especies de manera azarosa, sin embargo la extinción de las especies altamente conectadas (generalistas) genera efectos devastadores en la estructura de la comunidad biológica. Desde este punto de vista podemos establecer un criterio para seleccionar especies ecológicamente relevantes como todas aquellas altamente conectadas o generalistas (Bascompte & Jordano 2008, Montoya & Yvon-Durocher 2007, Montoya 2006, Pimm 1984).

La selección de estas especies altamente conectadas conlleva conocer y entender todas las características tróficas de las especies, es decir, todas las interacciones de alimentos de la especie en su contexto de la red ecológica y a su vez como estas se conectan con otras especies.

Desafortunadamente este tipo de conocimiento es escaso en nuestros sistemas naturales, particularmente en el Santuario del Río Cruces poseemos la información de la composición biológica desde una perspectiva cualitativa. Sin embargo, las relaciones de alimento y las fuerzas de interacciones entre las especies son desconocidas, por lo tanto es difícil reconocer bajo este marco teórico las especies claves o relevantes del Santuario del Río Cruces por lo que se plantea la necesidad de abrir líneas de investigación tendientes a establecer la estructura trófica del sistema. Por lo tanto, el mecanismo para la selección de especies ecológicamente relevantes se realizó mediante panel de experto.



Nuevo enfoque - Ecotoxicología.

El enfoque ecotoxicológico implica seleccionar especies relevantes del ecosistema en función del grado de sensibilidad a la exposición de un contaminante y no por las interacciones tróficas de las especies. Esto conlleva una argumentación que las especies dentro de un ecosistema tienen respuestas diferenciales a la presencia de los xenobióticos y por lo tanto las especies claves (en el sentido de los enfoques Top Down, bottom up y redes tróficas) no necesariamente son las más sensibles a la exposición (de contaminantes) y por tanto la protección del ecosistema se vería amenazada.

Bajo este enfoque es necesario reconocer especies sensibles a los contaminantes y para ello se recurrió a una metodología de panel de experto dado el escaso conocimiento de nuestros sistemas naturales, particularmente en el Santuario del Río Cruces.

Para la determinación de especies relevantes se consideró aquellas a ser usadas en bioensayos con el objeto de determinar el grado de sensibilidad a los xenobióticos y para ello se utilizaron los siguientes criterios:

- Especies posibles de cultivar o mantener en laboratorio.
- Especies que dadas sus características son consideradas como indicadores de buena calidad de aguas.
- Especies que dadas sus abundancias y por rol trófico juegan un importante rol en el ecosistema.

Las especies seleccionadas en este estudio fue en su sentido funcional como potenciales candidatas a ser utilizadas en bioensayos ecotoxicológicos estandarizados, y estimar para diversos xenobióticos, los valores de LC₅₀ tendientes a proteger el sistema acuático y que sirvan de base para la dictación de los valores críticos en la futura norma secundaria de calidad de ambiental para la protección de las aguas del río Cruces.



A continuación se muestra un esquema de los enfoques antes analizados:

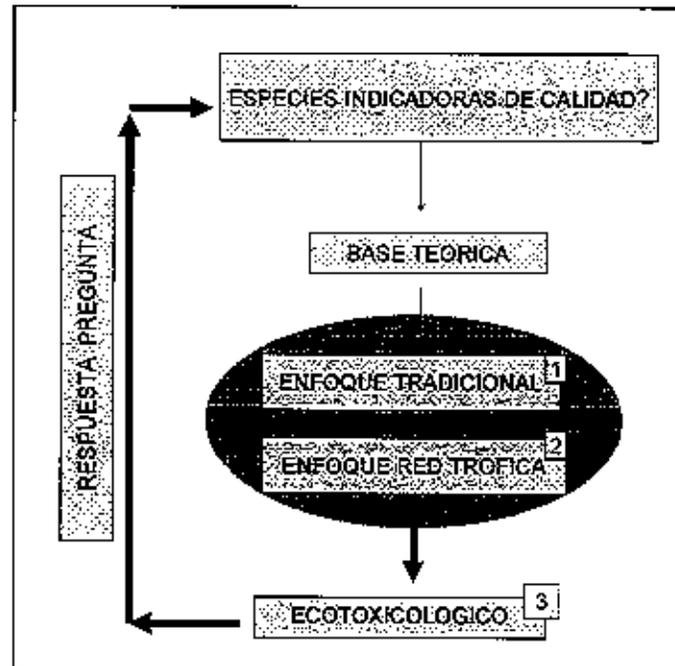


Figura 18. Esquema Enfoques Especies de Relevancia Ecológica.

En base al empleo de un enfoque ecotoxicológico, las especies seleccionadas para ser utilizadas en los bioensayos de toxicidad correspondieron a:

1. Fitoplancton: *Selenastrum capricornutum* (nombre actual: *Raphidocelis subcapitata*), *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella sp.*
2. Zooplancton: *Daphnia obtusa*, *Daphnia ambigua*, *Simocephalus sp.* y *Acanthocyclops vernalis*, *Simosa sp.*, *Skistodiaptomus diabolicus*, *Acanthocyclops vernalis*.
3. Macroinvertebrados bentónicos: *Meridialaris sp* y *Paratanytarsus grimmii*.
4. Peces: *Galaxias maculatus* y *Oncorhynchus mykiss*.
5. Macrófitas: *Myriophyllum sp.*

La selección antes señalada se basó en los criterios mencionados y en la necesidad de emplear en los bioensayos un taxón de cada uno de los niveles tróficos que conforman la estructura funcional de este ecosistema. Todo ello en base a un enfoque de tipo funcional a los bioensayos en términos de su cultivo y mantención en laboratorio y por ser organismos indicadores de buena calidad de agua. Por lo tanto, se asume que estas especies son sensibles a la exposición de contaminantes (indicadoras de buena calidad de agua e intolerantes a la contaminación), consecuentemente la protección de estas



especies permite proteger a otros organismos más tolerantes o resistentes a la contaminación. Lo anterior es independiente del rol trófico que las especies juegan en el sistema ecológico y cómo están posicionadas en la red ecológica del Santuario de la Naturaleza. No es de interés para los fines de este estudio, proteger especies claves en el sentido de Paine (1966) el cual las define como especies de alto nivel trófico que mantienen altos niveles de diversidad biológica, ya que ellas podrían ser resistentes a la contaminación.

En conclusión y bajo este enfoque, el rol ecológico de las especies seleccionadas no es el factor más relevante para propiciar la protección del ecosistema, si no cuán sensible son a la contaminación ya que a través de esta característica es posible proponer valores estimados en la norma secundaria de calidad ambiental para cada parámetro químico, siendo éstos más exigentes para proteger a las especies que conforman el ecosistema.

Las especies seleccionadas en este estudio y que están bajo condiciones artificiales de cultivo juegan numerosos roles ecológicos:

Las especies de dáfidos, copépodos y rotíferos son característicos de sistemas lénticos en los cuales se observan interacciones tróficas con el fitoplancton y con el propio zooplancton (las características zooplanctívoras han generado una mayor dificultad en su cultivo y mantención en laboratorio). La eliminación de este componente específico de especies del zooplancton (por perturbaciones), podría generar efectos indirectos en la red ecológica, particularmente en aquellos individuos zooplanctívoros. De esta forma, se observarían modificaciones en las abundancias de cada población integrante de la red ecológica, es así como, poblaciones herbívoras mostrarían un aumento de sus tamaños poblacionales e indirectamente una disminución del fitoplancton con otras consecuencias negativas sobre la productividad primaria del ecosistema.

Para el caso de los peces nativos (*G. maculatus*) en un contexto de red ecológica se clasifica como una especie intermedia, es decir, existen presas consumidas por éste, como a su vez *Galaxias* es presa de otros organismos superiores en su red ecológica. La eliminación de esta especie nativa podría tener consecuencias importantes en el stock pesquero de otras especies de peces que depredan sobre ella. A partir de análisis efectuados en sistemas lénticos se observó que poblaciones de salmonídeos asilvestrados dependen en un noventa por ciento de la biomasa de *G. maculatus* (Lagos Colico y



Caburgua). Por lo tanto, la eliminación de esta especie en la red ecológica generaría múltiples efectos sobre todas las especies que se conectan a ella con modificaciones en las respectivas abundancias. Por ejemplo, las poblaciones de salmonídeos tenderían a disminuir su tamaño poblacional, las poblaciones de invertebrados tenderían a aumentar sus tamaños poblacionales y finalmente el perifiton o biofilm tendería a disminuir sus abundancias.

Las especies seleccionadas, en este estudio, bajo cualquier situación de perturbación y eliminación de ellas del ecosistema tendrían numerosos e insospechados efectos en la red ecológica del Santuario del Río Cruces. De esta manera, el enfoque ecotoxicológico empleado en este estudio permite evaluar a aquellas especies más exigentes en sus requerimientos ambientales y por consecuencia la protección de ellas permitiría proteger a otras especies menos exigentes en sus parámetros ambientales. Además, dado que este estudio considera varias especies de diferentes niveles tróficos se está recogiendo la variabilidad propia del ecosistema lo que permitirá balancear o equilibrar el análisis final del estudio.

- Determinación del rol ecológico de las especies seleccionadas para los bioensayos y otras especies presentes en el Santuario de la Naturaleza.

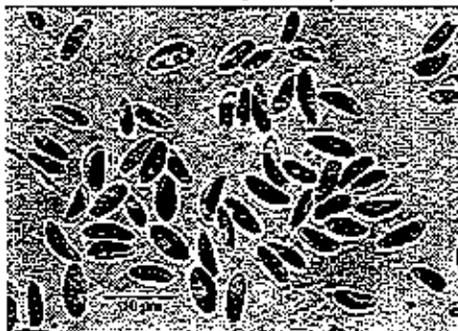
A continuación se describen y caracteriza el rol trófico de organismos de diferentes grupos presentes en el Santuario de la Naturaleza, algunos de los cuales fueron empleados en los bioensayos de toxicidad aguda realizados.



Fitoplancton.

a) *Selenastrum capricornutum* (Nombre actual: *Raphidocelis subcapitata*).

Selenastrum capricornutum (Printz 1914) (nombre actual: *Raphidocelis subcapitata*).



Descripción

Selenastrum capricornutum, pertenece a la Clase Chlorophyceae, Orden Chlorococcales, Familia Scenedesmaceae, Género *Scenedesmus*.

Morfología.

Microalga clorofícea (alga verde) unicelular con forma de media luna y de un volumen aproximado de entre 40 y 60 μm^3 y se caracteriza por corresponder a una de las algas coloniales más sencillas existente. Posee células elipsoidales o fusiformes, de 2,4 a 8, en series lineares para formar una colonia plana. Las células están dispuestas una al lado de otras con sus ejes mayores paralelos. Los cenobios (agrupación de células de origen común) de ocho células están a menudo constituidos por dos hileras alternadas de cuatro células. Con una pared lisa o verrucosa. Los polos de las células a menudo ornamentadas con espinas. Por último cada célula presenta un cloroplasto con un pirenoide que funcionan como depósitos de almidón y yacen dentro de los cloroplastos.

La estructura básica de este tipo de algas es semejante a las plantas superiores por lo que se cree que estas evolucionaron a partir de las primeras. Las clorofíceas poseen pirenoides (Hegewald & Silva 1988).

Hábitat.

Esta especie habita en el fitoplancton de sistemas acuáticos epicontinentales, principalmente en aguas limpias o con bajos niveles de contaminación. Por lo mismo, ha sido ampliamente utilizada en bioensayos de toxicidad dado que la especie es altamente sensible a la presencia de contaminantes y permite detectar modificaciones del estado ecológico del ambiente (Parra et al 1982-1983).

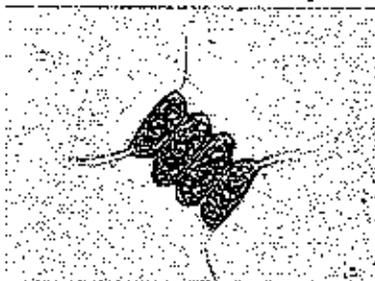
Ecología.

S. capricornutum corresponde a un organismo unicelular autótrofo que, como productores primarios sustentan las tramas tróficas de los sistemas acuáticos donde prolifera. El desarrollo de estos clorófitos en el fitoplancton incide notablemente sobre el flujo de la materia y la energía (Hegewald & Silva 1988).



b) *Scenedesmus sp.*

Scenedesmus sp.



Descripción

Scenedesmus sp., pertenece a la Clase Chlorophyceae, Orden Chlorococcales, Familia Scenedesmaceae, Género *Scenedesmus*.

Morfología.

Microalga verde de agua dulce, constituye una de las algas coloniales más sencillas existentes, género formado por cerca de 100 especies. Puede encontrarse en parejas o formando cenobios. Los individuos coloniales están constituidos por 2, 4, 8 ó 12 células elipsoidales o fusiformes, en series lineales para formar una colonia plana. Las formas más comunes son cenobios de cuatro células, con o sin espinas, en disposición lineal. Sin embargo, el rango de variabilidad morfológica de este género es definitivamente muy amplio. Las células están dispuestas una al lado de otras con sus ejes mayores paralelos. Las células centrales son alargadas y sin apéndices, las terminales, se abomban en el centro y presentan espinas que se proyectan hacia el exterior, formando pequeñas escaleras decrecientes o un pequeño y discreto zigzag, según se van formando, se agregan en una fila formando una especie de tablero.

Los cenobios (agrupación de células de origen común) de ocho células están a menudo constituidos por dos hileras alternadas de cuatro células. Con una pared lisa o verrucosa. Los polos de las células a menudo ornamentadas con espinas. Cada célula presenta un cloroplasto con un pirenóide, la estructura sobre la cual se almacena almidón (Azpiroz 1984).

Hábitat.

Esta especie habita en el fitoplancton de sistemas acuáticos continentales, vive formando parte de plancton, en grupos de cuatro o de ocho células, *Scenedesmus* habita en aguas limpias o con bajos niveles de contaminación, es un género que ha conquistado las aguas de todo el planeta, tanto las dulces como las saladas (Tadashi et al. 2009).

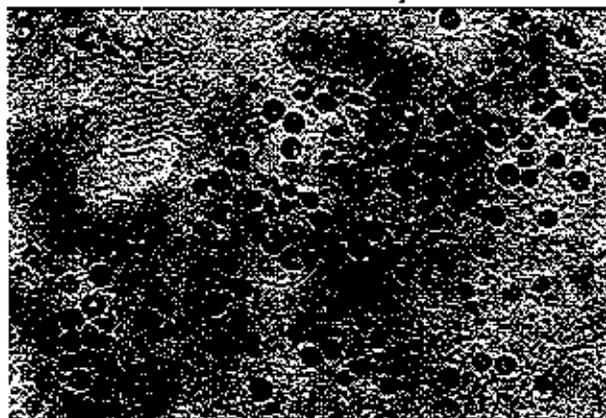
Ecología.

Esta clorofícea corresponde a un productor primario que como organismo autótrofo sustentan las tramas tróficas de los sistemas acuáticos donde prolifera. El desarrollo de estos clorófitos en el fitoplancton incide notablemente sobre el flujo de la materia y la energía (Hegewald & Silva 1988).



c) *Chlorella sp.*

Chlorella sp



Descripción

Chlorella sp., pertenece a la Clase Chlorophyceae, Orden Chlorococcales, Familia Chlorellaceae, Género *Chlorella*.

Morfología.

Es una microalga unicelular inmóvil, sin constricción en la parte media de la célula, de forma esférica, con pared celular lisa y con un cloroplasto en forma de copa (Laing & Ayala 1990). Tiene dimensiones que van desde las 2 a 10 μm de diámetro, no presenta flagelo. *Chlorella* contiene pigmentos verdes fotosintetizadores tanto clorofila a como b en su cloroplasto. Su reproducción es rápida requiriendo sólo dióxido de carbono, agua, luz solar y pequeñas cantidades de minerales (Zelitch 1971).

Las colonias de *Chlorella* a veces están rodeadas de mucílago y la modalidad de la agregación de la célula es característica de estas especies lo que facilita su identificación (Laing & Ayala 1990).

Hábitat.

Aproximadamente el 90% de estas microalgas verdes se caracterizan por formar parte del plancton o bentos de cuerpos de agua continentales (Fogg 1977).

Ecología.

Tal como las algas verdes analizadas anteriormente *Chlorella sp.* es un organismo autótrofo.



Zooplancton.

a) *Daphnia obtusa*.

Daphnia obtusa (Kurz, 1874).



Descripción

Daphnia obtusa, pertenece a la Clase Branchiopoda, Orden Cladocera, Familia Daphniidae, Género *Daphnia*.

Morfología.

Este cladóceros es una de las seis especies de *Daphnia* que se encuentran en Chile, mide entre 200 y 3000 μm de largo y se caracteriza por presentar segmentos corporales variables en número, y a menudo poco claros; el dorso en forma de escudo dorsal cubierto por dos valvas, las cuales dejan descubierta la cabeza; el abdomen termina en una furca. Con 5 apéndices torácicos muy diferentes entre sí, con sus bordes armados de cerdas; apéndices branquiales con articulaciones; los ojos compuestos, a menudo fusionados en una sola unidad, se encuentran alojados en una bolsa. Esta especie muestra anténulas relativamente cortas y truncadas que le dan la movilidad; las papilas olfatorias son siempre apicales, las anténulas son cortas, en general no mayores que el diámetro del ojo, insertas sobre la cara, debajo del rostro y están fusionadas en la cabeza, pero no entre sí ni en el extremo del rostro (Alonso 1996).

Hábitat.

Este crustáceo nativo es propio de aguas continentales, presenta distribución cosmopolita y en Chile se registra de norte a sur y de costa a cordillera, en diferentes cuerpos de agua, específicamente desde Talcahuano a Punta Arenas (Villalobos 2006).

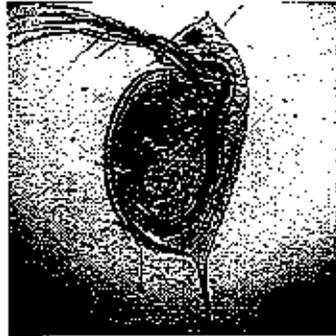
Ecología.

Corresponde a un especie suspensívora (filtradora), que utiliza las sedas de sus apéndices para crear corrientes y recoger las partículas alimentarias. Su alimentación consiste principalmente en microalgas (Colbourne & Hebert, 1996).



b) *Daphnia. ambigua* (Scourfield 1947)

***Daphnia. ambigua* (Scourfield 1947)**



Descripción

Daphnia ambigua, pertenece a la Clase Branchiopoda, Orden Cladocera, Familia Daphniidae, Género *Daphnia*.

Morfología

Las sedas de la antena no alcanzan el borde valvar; el rostro está moderadamente desarrollado. La espina de la caparazón tiene una longitud menor de la mitad que el cuerpo (aunque este es de carácter variable). Post-ádbomen con 7-10 espinas anales, los dientes de los tres peines de la garra son pequeños y de longitud similar.

Hábitat

Esta especie se encuentra a menudo en aguas profundas frescas más debajo de la termoclina lo que sugiere una tolerancia a las temperaturas frías, y a su vez es una de las especies más comunes en regiones subtropicales y tropicales.

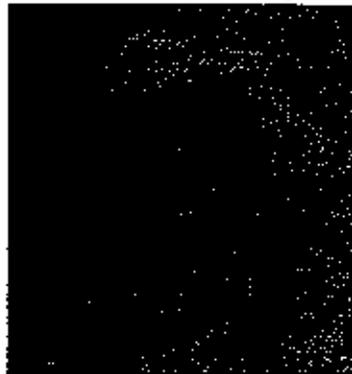
Ecología

Corresponde a una especie filtradora



c) *Simocephalus sp*

Simocephalus sp



Descripción

Simocephalus vetulus, pertenece a la Clase Branchiopoda ,Orden Cladocera, Familia Daphniidae, Género *Daphnia*.

Morfología

Simocephalus sp. Son grandes desde 3-4 mm , son animales que se encuentran cubiertos por un caparazón bivalvar, La cabeza contiene un ojo compuesto no está cubierta por la caparazón, está rodeado por . Pegado a la cabeza se encuentran las anténulas, las cuales contienen setas olfatorias (Balcer et al. 1984).

El adulto posee un tamaño que varía ampliamente, dependiendo de la disponibilidad de alimento, ya que cuando este está presente en abundancia el crecimiento puede continuar a lo largo de su ciclo y así podemos encontrar ejemplares adultos grandes pudiendo llegar a tener caparazones dos veces más grandes que un individuo normal, así durante una estación desde primavera a verano su tamaño puede variar ampliamente en relación a la disponibilidad de alimento, estos tipos morfológicos son llamados cyclomorfos

Alimentación

Simocephalus sp. Son filtradores de sedimento ingiriendo cualquier alga protozoo o detritos orgánico de tamaño adecuado. Las patas torácicas hacen corrientes de alimentación las cuales llevan partículas suspendidas para su alimentación, las setas en estos apéndices remueven partículas no deseadas.

Reproducción

Durante la primavera y hasta el otoño es habitual que las hembras se reproduzcan por partenogénesis, dando ciclo tras ciclo nuevas hembras y de esta forma rápida y fácil, las poblaciones de estos pequeños crustáceos pueden llegar a crecer de forma exponencial. Cada hembra puede albergar en su interior en la zona del costado y por encima del tubo digestivo entre una y dos decenas en *Simocephalus*.



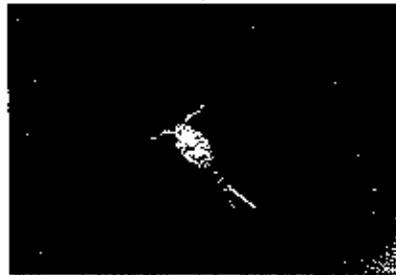
Hábitat

Simocephalus sp. Se encuentra en lagos y lagunas, ellas son frecuentes en zonas de grandes áreas lacustres. Estas especies viven en áreas con abundante vegetación riverañ, por lo que son vulnerables a la destrucción del hábitat por parte de los peces particularmente las carpas. Pueden ser encontrados en cuerpos de agua en fondo como en zonas litorales.

d) Familia Cyclopidae.

(*Acanthocyclops vernalis*; *Skistodiaptomus diabolicus*)

Familia Cyclopidae.



Descripción

Familia Cyclopidae pertenece a la Clase Copepoda, Orden Cyclopoidea.

Morfología.

Estos copépodos son de talla pequeña y cuerpo alargado (inferior a 2 mm), forman parte de la Sección Gnathostoma, ya que son organismos de vida libre. Esta familia alberga un total de 22 especies citadas para las aguas continentales de Chile. Estos organismos no presentan caparazón, tienen seis pares de apéndices cefálicos y no presentan apéndices abdominales. Las anténulas, que están muy desarrolladas poseen funciones sensoriales y de locomoción. Las piezas mandibulares de tipo masticador, antena y maxilípedos no se han transformados en órganos de sujeción o fijación, se caracterizan a su vez por que la cabeza y tórax son más ancho que el abdomen y están claramente separados de éste, la anténula es corta, con un máximo de 17 artejos; en los machos las anténulas están a ambos lados modificadas en órganos prehensores; las antenas presentan sólo una rama o con una rama externa rudimentaria. Poseen un solo ojo dispuesto en posición central (Ruiz & Bahamonde 1989).

Hábitat.

Estos copépodos dulceacuícolas, en general, viven en ambientes con alto grado de inestabilidad. A pesar de ello se consideran un grupo muy exitoso por su amplia diversidad y distribución (Suárez-Morales et al 2000). Probablemente ese éxito se debe en parte, a los mecanismos adaptativos, que en ocasiones están ligados a procesos de dispersión (Ringuelet 1958).

**Ecología.**

Estos copépodos representan un eslabón importante en las cadenas tróficas, ya que se alimentan de fitoplancton, detritus de animales y plantas y son la base de la alimentación de muchos peces. Han sido ampliamente estudiados como reguladores de las poblaciones de fitoplancton al representar un importante constituyente del zooplancton (Bayly 1992).



Macroinvertebrados.

a) Familia Leptophlebiidae.

Familia Leptophlebiidae.	
	
<i>Meridialaris sp.</i>	<i>Penaphlebia sp.</i>
Descripción	
Clase Insecta, Orden Ephemeroptera, Familia Leptophlebiidae.	
<p>Morfología.</p> <p>Las ninfas de esta familia de efemerópteros son bastante variadas en su apariencia, pero todas ellas tienen cuerpos y cabezas achatadas, patas achatadas con amplios fémures. Las pterotecas en el meso y metatorax, las patas están formadas por 5 segmentos, coxa y trocánter cortos, fémur más o menos aplanado, tibia cilíndrica o subtriangular y tarso unisegmentado que termina en una uña tarsal la que puede tener denticúlos. Presentan prominentes traqueobranquias variables a lo largo de su abdomen, compuestas de una lámina ventral y una dorsal. Usualmente estas branquias son pareadas y vagamente con forma de hojas. Las setas de sus cercos se encuentran ordenadas en anillos. Los palpos maxilares y labiales presentan tres filamentos caudales. Clipeo fusionado a la frente, cabeza usualmente prognata. La mayoría de las ninfas son de tamaño menor a 20 mm. (Domínguez et al 2006). Se caracterizan por su corta vida en fase adulta, viven sólo dos o tres días, tiempo suficiente para efectuar el apareamiento y su fase larvaria es desde 3 a 4 semanas hasta 2 años y medio (Faculty of Sciences 2000).</p>	
<p>Hábitat.</p> <p>Es una familia de especies cosmopolitas y alcanzan su máxima diversidad en el hemisferio sur (Faculty of Sciences 2000).</p> <p>Generalmente se encuentran en ríos de aguas rápidas. Puesto que la mayoría de los leptophlébidos son especies características en aguas corrientes y no soportan una alta carga orgánica (Figueroa 2004), han sido considerados sensibles al estrés ambiental y su presencia significa buenas condiciones hídricas (Merrit & Cummins 1978).</p>	



Ecología.

Estos consumidores primarios, corresponden en su mayoría a recolectores de detritus (detritívoros) proveniente de la superficie de rocas y madera, por lo que son considerado dentro del grupo trófico funcional de los raspadores, recolectores o parstoreadores, es decir, organismos que consumen partículas finas de materia orgánica (Décamps & Naiman 1991). Son además el alimento preferido de muchos carnívoros de agua dulce, que incluyen otros insectos y peces

b) Familia Chironomidae.

(*Paratanytarsus grimmii*).

Familia Chironomidae.



Descripción

Clase Insecta, Orden Diptera, Familia Chironomidae.

Morfología.

Los quironómidos son dípteros pequeños (de 2 a 10 mm) emparentados. Esta familia se caracteriza por presentar antenas plumosas y llamativas en los machos adultos y pilosas en las hembras. La cabeza es pequeña, frecuentemente escondida por el tórax y carece de ocelos. Las patas delanteras son alargadas, y la venación de las alas es más marcada anteriormente que posteriormente. Los adultos, al emerger, dejan en la superficie del agua exuvias de las pupas. Las larvas son generalmente acuáticas, de cuerpo alargado y tubular, con 12 segmentos abdominales bien definidos, cabeza bien desarrollada y pequeña, y sin patas. Dos pares de patas falsas o pseudopodos las ayudan en sus movimientos, aunque uno o ambos pares pueden estar ausentes. Las larvas son de color rojo, morado, azul, verde o blanco. Los especímenes larvales pierden su color al ser introducidos en alcohol. Las larvas habitan ríos, arroyos y lagos, aunque se pueden encontrar también en pozos, huecos en las rocas, fitotelmata, heces de animales y prácticamente en cualquier ambiente húmedo (De la Rosa 1997).



Hábitat.

La familia Chironomidae se caracteriza por agrupar a organismos cosmopolitas, habitando desde aguas claras hasta sistemas con elevada carga de materia orgánica, además resisten bajas concentraciones de oxígeno, situación que muy pocos organismos toleran (Coffman & Ferrington 1979). De esta forma, ocupa un amplio rango de hábitats de agua dulce y frecuentemente son los dípteros más abundantes del bentos de ríos y arroyos, principalmente se encuentran alojados en el sedimento de estos sistemas dulceacuícolas (Cranston 1995).

Ecología.

Los Chironomidos y sus larvas son consumidos por diversos organismos como odonatos, coleópteros y peces n alimento importante de los peces y de otros animales acuáticos.

Estos dipteros se caracterizan por su gran plasticidad ecológica, su considerable riqueza específica, su importante desarrollo numérico en determinadas condiciones y su íntima y permanente relación con determinados factores del medio, constituyen uno de los grupos de mayor interés para el completo conocimiento de los sistemas acuáticos. Así, los diferentes grados de tolerancia y la sensibilidad que estos organismos presentan a las distintas condiciones del medio hacen que sean considerados como excelentes indicadores en estudios de vigilancia y esenciales en la tipificación de los hábitats acuáticos (Navarrete et al. 2004).



Peces.

a) *Galaxias maculatus*.

***Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842).**



Descripción

Galaxias maculatus, pertenece a la Clase Actinopterygii, Orden Osmeriformes, Familia Galaxiidae, Género *Galaxias*.

Morfología:

Especie nativa considerada como fuera de peligro de extinción desde la región del Bio-Bio al sur (D.S. 51/2008).

Esta especie nativa de las aguas del sur de Chile presenta un cuerpo alargado, fusiforme, carece de escamas y aleta adiposa, cabeza corta, longitud puede alcanzar 15 cm. pero el promedio es de 7 cm; la coloración en adultos es de tonalidad amarillenta con grandes manchas en los flancos (Campos 1970). La primera madurez sexual de esta especie se produce al año de vida y no se observa dimorfismo sexual, sólo en el momento de plena madurez, donde la pared abdominal de la hembra se torna transparente y se pueden observar los ovocitos. Campos (1970) en Mancilla (2004) encontró ejemplares maduros desde septiembre hasta abril (primavera - otoño), relacionado con el aumento de temperatura. El ciclo de vida presenta: ova, embrión "ojos pigmentados", larva, juvenil y adulto (Mancilla 2004).

Hábitat:

G. maculatus habita zonas de baja profundidad en ríos potamales o hiporitrales, asociado a la desembocadura de éstos y en lagos, corresponde a una especie diadrómica, es decir, puede vivir en aguas salobres, saladas y dulces (Vila et al 1999). En Chile la especie muestra una amplia distribución, primero en forma discontinua al norte de Concepción y a partir de la hoya del Bío-Bío se encuentra ininterrumpidamente hasta Tierra del fuego, en la hoya del río Imperial su distribución se encuentra principalmente en el área estuarina y potamal (Varela 2005).

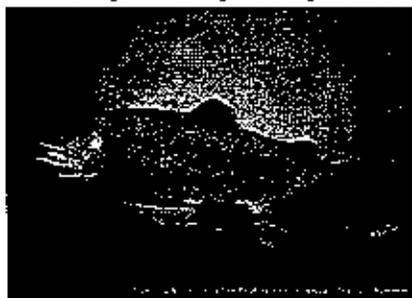


Ecología:

En cuanto la alimentación de este pez, los juveniles (entre 4 y 6 meses) se alimentan principalmente de zooplancton en el mar, ríos o lagos, luego durante su fase adulta se alimenta de larvas de insectos acuáticos, pequeños crustáceos y oligoquetos (Varela 2005).

b) *Oncorhynchus mykiss mykiss*.

***Oncorhynchus mykiss mykiss* (Walbaum, 1792)**



Descripción

Oncorhynchus mykiss pertenece a la Clase Actinopterygii, Orden Salmoniformes, Familia Salmonidae, Género *Oncorhynchus*

Morfología

Cuerpo alargado y un tanto comprimido, la coloración varía con el hábitat, el tamaño y la condición sexual los que habitan corrientes son más oscuros y los residentes de lagos son más ligeros, brillantes y plateados (Froese y Pauly -Fishbase 2007).

Hábitat

Principalmente un pez de quebradas de montaña sin embargo puede vivir en lagos y sistemas lénticos. Prefiere aguas oxigenadas con temperaturas de alrededor de 12 C.

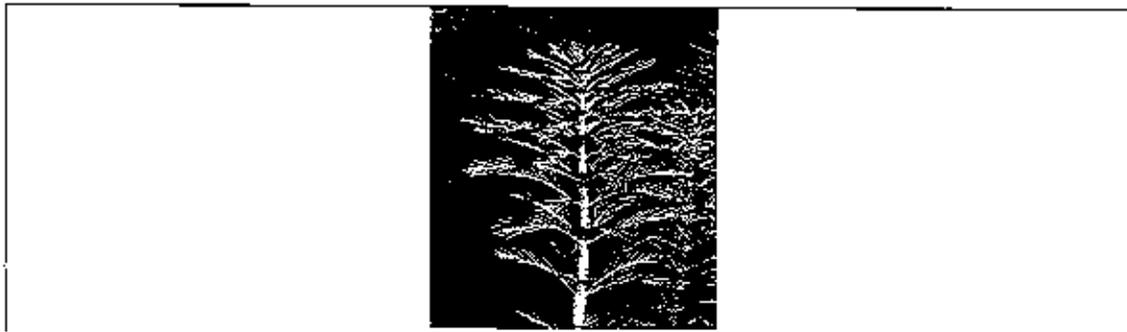
Ecología

Tiene una dieta generalista basada principalmente en invertebrados como larvas de diferentes organismos y peces de otras especies de menor tamaño.(Diavanera 2006)



Macrófitas.

a) *Miriophyllum sp.*



Descripción

Pertenece a la Clase Magnoliopsida, Orden Saxifragales, Familia Halogaceae, Género *Myriophyllum*.

Morfología

Estas plantas acuáticas tienen hojas pinnadas, las hojas sobre el agua están más tiesas que las sumergidas. Las flores son pequeñas con cuatro pétalos y se encuentran en puntos terminales

Ecología

Constituye una fuente considerable de materia orgánica, desempeña un papel importante en el metabolismo del lago, pudiendo regular por sí misma la concentración de sustancias disueltas (Howard-Williams y Allanson, 1978)



DESCRIPCIÓN ROL ECOLÓGICO ESPECIES ENCONTRADAS EN EL SANTUARIO NO UTILIZADAS EN BIOENSAYOS

a) *Pediastrum sp.*

Pediastrum sp.



Descripción

Pediastrum sp., pertenece a la Clase Chlorophyceae, Orden Chlorococcales, Familia Hydrodictyaceae, Género *Pediastrum*.

Morfología.

Cenobio más o menos circular o acampanados, con células unidas en forma compacta. Las células periféricas tienen dos procesos terminales y las internas son de forma poligonales de 5 a 6 lados más o menos rectos. Las superficies de las células son algo escarbadas. Esta cloroficea tiene un diámetro aproximado de 120 μm ; con un diámetro de cada célula de 12 μm ; el largo de los procesos de las células periféricas es de aproximadamente 8 μm (5 ejemplares). Esta alga verde se reproduce asexualmente mediante la producción de autocolonias. El protoplasto de cada célula madre da lugar a unas zoosporas biflageladas para cada celda de la colonia del padre. Las zoosporas se liberan de la célula madre dentro de una vesícula y luego se organizan en una disposición celular particular en círculos concéntricos, en espirales o irregulares ordenadas, unidas por todas sus paredes de contacto o bien parcialmente unidas a través de los apéndices (Cifuentes et al. 1998). Las células luego se amplían hasta que alcanzan su tamaño completo. También es posible la reproducción sexual a través de la fusión de los gametos pequeños, biflagelados que se liberan de la célula madre. Los cigotos germinan en zoosporas, que se convierten en polyeders de paredes gruesas que generan los nuevos cenobios (Hugo 1990).

Hábitat.

Estas microalgas verdes se caracterizan por ser especies comunes en cuerpos de agua continentales, típicas de ambientes ligeramente alcalinos, mesotróficos y eutróficos, pero no en zonas contaminadas (Komarek & Jakovska 2001), sus cenobios de gran tamaño se asocian también a área de un bajo estado trófico (Nasselli-Flores & Barone 2000).

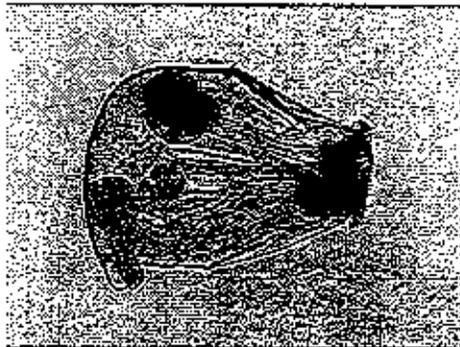


Ecología.

Tal como las algas verdes analizadas anteriormente *Pediastrum sp.* es un organismo autótrofo.

b) *Asplanchna brightwellii*.

***Asplanchna brightwellii* (Gosse, 1850).**



Descripción

Asplanchna brightwellii, pertenece al Phylum Rotifera, la Clase Monogononta, Orden Ploimida, Familia Asplanchnidae, Género *Asplanchna*.

Morfología.

Estos rotíferos son organismos microscópicos, acuáticos, de vida libre, generalmente solitarios. Son organismos que se caracterizan por dos elementos particulares como son la corona de cilios de la cabeza y el *trophi* o estructura masticatoria. Se reproducen por partenogénesis, producen machos por muy breves períodos, en condiciones desfavorables dan lugar a huevos de resistencia. Presentan adaptaciones a la vida pelágica, como reducción lorica, aumento del volumen, proyecciones para suspensión, reducción de órganos de adhesión, reducción de la tasa de hundimiento, presentan ciclos de vida cortos, reproducción asexual en condiciones óptimas y sexual cuando las condiciones del medio son desfavorables (Segers 2002).

Hábitat.

Este rotífero euplancónico es una especie cosmopolita (De Manuel 2000), que prefiere aguas continentales ácidas y eutróficas cálidas (Margalef et al. 1976).

Ecología.

Son organismos predadores, que se alimenta principalmente de seston (12 - 50 μm) como naupilos de crustáceos, ciliados y un amplio espectro de algas. El desarrollo de esta especie está altamente controlado por la cantidad de tocoferol que ingiere a partir de sus presas (Braioni & Gelmini 1983).

Constituyen comparativamente un pequeño filum pero son muy importantes en los

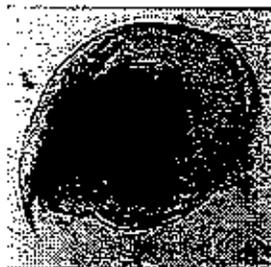


ambientes continentales a causa de su tasa reproductora, su habilidad para ocupar rápidamente los nichos vacantes, constituyendo más del 30% de la biomasa planctónica, son recicladores eficientes de la materia orgánica y responden rápidamente a los cambios ambientales (Nogrady et al 1993).



c) Chydorus sp.

Chydorus sp.



Descripción

Chydorus sp., pertenece al Phylum Arthropoda, la Clase Branchiopoda, Orden Cladocera, Familia Chydoridae, Género *Chydorus*.

Morfología.

Entre las características morfológicas de estos cladóceros destacan sus apéndices aplanados y foliosos, en los que tanto endopodio como exopodio son un único lóbulo con sedas marginales; la coxa de los mismos tiene un episodio también aplanado que hace las veces de branquia. Los apéndices del cuerpo están además adaptados para la alimentación filtradora y para la natación. Las primeras antenas como las maxilas son vestigiales. El último segmento del abdomen tiene dos prolongaciones llamadas cercopodios. Presentan anténulas relativamente cortas y truncadas con tres segmentos en cada rama; las papilas olfatorias son siempre apicales. Las bases de las anténulas son separadas y articuladas con la cabeza. Esta familia presenta rostro fuertemente deprimido en forma terminal aguzada, de longitud en general mayor al diámetro del ojo (Alonso 1996).

Hábitat.

Estos cladóceros son cosmopolitas y propios de ambientes dulceacuícolas (Dominguez & Zúñiga 1976).

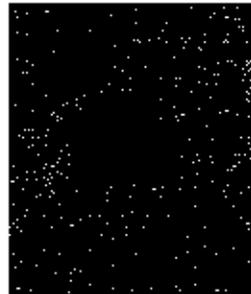
Ecología.

Chydorus sp. tiene un rol importante en las tramas tróficas pelágicas, principalmente para pequeños consumidores secundarios del meroplancton, con quienes coexisten temporal y espacialmente. Se caracterizan por ser organismos son herbívoros, ya que utilizando sus apéndices torácicos producen corrientes de agua entre las valvas, de manera de filtrar las partículas de alimento provenientes del medio (Rosenberg & Palma 2003).



d) *Bosminia sp.*

Bosminia sp



Descripción

Chydorus sp., pertenece al Phylum Arthropoda, la Clase Branchiopoda, Orden Cladocera, Familia Bosminidae, Género *Bosminia*.

Morfología.

Entre las características morfológicas de estos cladóceros destacan sus apéndices aplanados y foliosos, en los que tanto endopodio como exopodio son un único lóbulo con sedas marginales. Los apéndices del cuerpo están además adaptados para la alimentación filtradora y para la natación. Presenta anténulas relativamente largas y aguzadas, con aspectos de "trompa de elefante", papilas olfatorias no apicales. La base de las anténulas fusionadas con el extremo anterior del rostro.

Los machos varían entre 0,4-0,5 mm de longitud y las hembras entre 0,4 y 0,6 mm. Los machos presentan antenulas modificadas, en cambio las hembras tienen antenulas de mayor tamaño y fijas a la cabeza, curvas hacia atrás y paralelas entre sí. Tanto machos como hembras presentan espina terminal puntiaguda (Alonso 1996).

Hábitat.

Estos cladóceros son cosmopolitas y propios de ambientes dulceacuícolas (Dominguez & Zúñiga 1976).

Ecología.

Estos cladóceros son especies filtradoras no selectivas principalmente de microalgas cianofíceas y protozoos. Su desarrollo se caracteriza por la fácil adaptabilidad a rangos amplios de temperatura, aguas con cierto grado de contaminación y concentraciones de oxígeno desde cero hasta la sobresaturación (Romero 2009).



4.2.2 ESTABLECIMIENTO Y MANTENCIÓN DE CULTIVOS DE LAS ESPECIES LOCALES DE MAYOR RELEVANCIA ECOLÓGICA (FITOPLANCTON, ZOOPLANCTON, ICTIOFAUNA, MACROFAUNA BENTÓNICA Y MACRÓFITAS).

Cultivos de especies estandarizadas de Fito y Zooplancton.

Cultivo Microcrustáceos.

Corresponde a la especie *Daphnia obtusa*, organismos que es posible encontrar en los lagos nor Patagónicos del país, resultando, por consiguiente, ser representativos de los ecosistemas nacionales, a diferencia de otras especies que si bien se encuentran estandarizadas no responden a las características de los ecosistemas estudiados y/o evaluados (Figura 19)

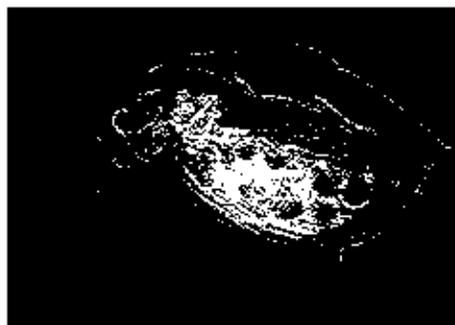


Figura 19. Microfotografía *Daphnia obtusa*.

Agua de dilución.

Los cultivos de *D. obtusa* son mantenidos utilizando agua procedente del lago Calafquen, la cual es filtrada utilizando un filtro con un ancho de poro de 0,2 μm , con el fin de eliminar las impurezas que esta pudiera contener. Los cultivos fueron mantenidos en recipientes de vidrios de 2,5 L de volumen con 1 L de agua, que contuvieron una densidad constante de alrededor de 50 individuos. Mantener alrededor de 10 acuarios de este tipo con la densidad antes mencionada de manera constante e invariable,

Recambio del medio.

El recambio del medio de los cultivos se realiza una vez por semana, con el fin de que las condiciones fueran siempre estables y no existiera presencia de exubias o desechos de los mismos organismos. Para ello, se separaron las daphnias utilizando una pipeta Pasteur, los que se colocaron en una pequeña cantidad del agua del cultivo, los acuarios se



002482
104800

lavaron con agua corriente y luego fueron "cebadadas" con agua de lago, se volvieron a llenar con agua de lago aireada durante 24 horas y los organismos se devolvieron al acuario ya limpio. Finalmente se les suministró como alimento aquel protocolizado por la APHA (1995).

Alimentación.

Los cultivos de *Daphnia obtusa* son alimentados con un preparado estandarizado basándose en un protocolo del APHA (1995). Este alimento es una mezcla de harina de pescado, alfalfa y levadura. Se agregó 1 ml de este alimento por cada 50 individuos en 1L. de agua cada dos días.

Condiciones físico-químicas.

Los cultivos son mantenidos en incubadora con fotoperíodo 16 horas luz - 8 horas oscuridad y a temperatura de $18 \pm 2^\circ \text{C}$. Contando con aireación mecánica.

Cultivo Microalgas.

Corresponde a *Raphidocelis subcapitata* (antes *Selenastrum capricornutum*) una alga verde (clorofita) unicelular con forma de media luna y un volumen aproximado de entre 40 y 60 μm^3 , que puede encontrarse en sistemas acuáticos epicontinentales eutróficos u oligotróficos. Cuando las células son expuestas a muestras que contienen contaminantes tóxicos, su reproducción se afecta, alterando la tasa de crecimiento de la población de las algas (Figura 20).



Figura 20. Microfotografía de *Raphidocelis subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*).



Agua de dilución.

El medio donde se mantiene estas algas corresponde a agua desionizada enriquecida con nutrientes esenciales. El medio de cultivo se basa en la preparación de una serie 7 soluciones concentradas de nutrientes: conteniendo micronutrientes y macronutrientes, de acuerdo a NCH 2706 (1996), todas ellas con las concentraciones adecuadas para asegurar un crecimiento óptimo de las algas durante el periodo de incubación.

Condiciones físico química.

Los cultivos son mantenidos en incubadora con iluminación continua, a temperatura de $18 \pm 2^\circ \text{C}$ y aireación mecánica constante proporcionada por una bomba de oxígeno.

Las condiciones antes mencionadas son posibles de ser utilizadas para la mantención de otros cultivos existentes de microalgas, como por ejemplo *Scenedesmus sp.* y *Pediastrum sp.*

Cultivos de Fito y Zooplancton Especies Locales.

Aislamiento y Masificación Fitoplancton

Muestreo.

Se realizó un muestreo mediante red para fitoplancton el cual cubrió una longitud de 500 metros de arrastre superficial en el Santuario de la Naturaleza del río Cruces sector Punucapa, se registró variables ambientales, así como toma de muestras de agua tendientes a obtener tres aspectos, primero la caracterización química en laboratorio, la segunda fue la captura de microalgas desde el ambiente natural y finalmente muestras para análisis de contenido orgánico.

Resultados Variables ambientales.

Temperatura $9,5^\circ \text{C}$

Salinidad 0‰

pH: 7,40

Dureza: 28,3 mg/L

Amonio: 0,71 mg/L



Procedimiento para aislamiento general de fitoplancton.

La primera muestra de agua (250 y 500 ml) fue primero pasada por filtros previamente pesado y tarados, a fin de determinar la materia orgánica e inorgánica del lugar de muestreo. Los cultivos iniciales destinados a aislamiento de microalgas se desarrollaron con agua de ambiente natural esterilizada por filtración a $0,22 \mu\text{m}$, la cual fue enriquecida con sales y vitaminas, medio f/2 de Gillard, (1974), de uso común en el manejo de las microalgas el medio empleado correspondió en un inicio la, Los enriquecimientos fueron realizados dependiendo de la actividad fisiológica de las algas objeto. Se microfiltro agua de ambiente natural a $0,22 \mu\text{m}$, y se utilizó como primer medio de cultivo.

Las muestras conteniendo todas las microalgas colectadas primero fueron colocadas a dos temperaturas. La primera a temperatura similar a ambiente natural 10°C , para lo cual se empleó una cámara refrigerada con fotoperiodo similar al de ambiente natural.

Paralelamente otra muestra fue cultivada a temperatura de 26°C (Figura 21) con fotoperiodo similar al de ambiente natural, y medio enriquecido. A fin de aislar aquellas especies diatomeas, se nutrió con silicato aquellos matraces que se presentaron con mayor crecimiento de diatomeas.

Aislamiento

La metodología seguida para los aislamientos consideró la aplicación de varias técnicas diferentes, las que fueron desde: a) repiques desde los cultivos con variadas inoculaciones de pequeños volúmenes ($100 \mu\text{l}$) y sus diluciones, b.- aislamiento directo célula a célula mediante el uso de microtools bajo microscopio de contraste de fase. c.- crecimiento en medio agar y finalmente aislamiento por competencia inter poblacional.



Figura 21. Cultivo de microalgas del santuario de la naturaleza mantenidos a 26°T .



Las células que crecieron de mejor forma fueron los cultivos mantenidos a 26°C, debido a la velocidad y la célula que se desarrolló mejor fue del género *Chlorella sp.* Además de una especie perteneciente al género *Selenastrum* y varias diatomeas planctónica de cadena largas y libres, en menor grado fueron las especie de *Scenedesmus sp.* y *Pediastrum sp.* En el cultivo de agua fría se observó un mayor crecimiento de diatomeas. Las densidades alcanzadas de *Chlorella sp.* se encuentran en los $3,5 \times 10^6$ cel/ml.

Los cultivos a baja temperatura han sido claramente diferenciados con una mayor presencia de diatomeas del grupo Bacillariofita mientras que los de temperatura a 26°C microalgas no diatomeas del tipo Clorofitas.

Aislamiento y masificación de zooplancton.

Muestreo.

Se realizó un muestreo mediante red para zooplancton fina la cual cubrió una longitud de 1000 metros de arrastre superficial en el Santuario de la Naturaleza del río Cruces sector Punucapa, se registraron variables ambientales, así como toma de muestras de agua para su caracterización química en laboratorio, las colectas de zooplancton fueron filtradas en terreno y almacenadas en contenedores plásticos con volúmenes acordes con la densidad de organismos colectados, para evitar la falta de oxígeno durante el proceso de traslado a laboratorio.

Resultados Variables ambientales.

Temperatura 9,5 °C

Salinidad 0‰

pH 7,40

Procedimiento para aislamiento general de zooplancton.

Se microfiltró agua de ambiente natural a 0,22 µm, para se utilizada como primer medio de cultivo para el zooplancton. El zooplancton fue separado por filtraciones sucesivas graduadas según objeto de búsqueda desde 2000 µm hasta 50 µm. El zooplancton fue separado por grupo a fin de evitar depredación e iniciar monocultivos. Cada grupo zoológico (rotíferos, cladóceros y copépodos), fueron cultivados en dos sistemas y a dos temperaturas.



Sistema de cultivo A.

En placas de pocillos de cultivo estériles de volúmenes de 3 ml, placas de 12 pocillos y placas de cultivo de 96 pocillos de 500 µl.

Sistema de cultivo B.

Cultivo inicial en matraz estéril de 250 ml.

Para ambos casos los cultivos se desarrollaron tanto en incubadora a 18°C constante, como a 25 °C, variable en 2 °C.

Aislamiento y cultivo de rotíferos.

Aislamiento.

En este grupo fue posible separar dos especies, una de ellas con muy baja abundancia (con un total de 32 ejemplares especie 1 y solo dos ejemplares especie 2). Se aisló y cultivó en agua procedente del santuario microfiltrada a 0,22 µm y suplementada con policultivo de microalgas previamente aisladas de ambiente natural, paralelamente se cuantificó la presencia de hembras con huevos y se registraron características morfológicas para su identificación.

Se encontró una baja abundancia, así como la ausencia de ejemplares portadores de huevos. La observación del cultivo mostró ser poco viable debido a la mortalidad progresiva de los ejemplares, frente a lo cual se procedió a identificar en base a su morfología y conducta, ya que los rotíferos son un grupo zoológico difícil de identificar debido a que algunos grupos específicos presentan polimorfismo.

Al transcurrir dos días de cultivo, se procedió a la evaluación de éste encontrando que no se observaron microalgas en su contenido digestivo, esto sumado a su conducta de búsqueda de alimento, hicieron pensar que se trataba de un rotífero depredador y no fitoplantófago, además no se encontró ningún individuo portador de huevos (poco común en poblaciones de rotíferos) y finalmente la presencia de grandes tallas de un promedio de 720 µm.



Así con estos antecedentes se procedió al registro de características morfológicas como forma de las bolsas digestivas, forma de vitelario, tamaño corporal y conducta, lo cual llevó a identificar a una de las posibles especies como perteneciente al sub-género *Asplanchna* (Figura 22), mientras que la otra especie al parecer corresponde sólo a un tipo morfológico dentro de los estados de desarrollo del *Asplanchna*.

Por cuanto es una especie cuya clasificación sistemática es:

Clase: Monogononta

Orden: Ploima

Familia: Asplanchnidae

Sub-género: *Asplanchna* posible especie *Asplanchna brightwelli*

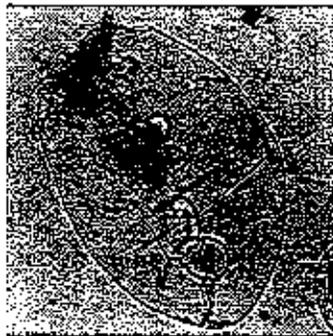


Figura 22. *Asplanchna brightwelli*

El desarrollo de esta especie está altamente controlado por la cantidad de tocoferol que ingiere a partir de sus presas, que están constituidas por ciliados, ya que si la dieta es rica en esta vitamina las hembras generarán de gran tamaño, este crecimiento proporciona a las hembras el mecanismo necesario para protegerlas del canibalismo, debido a que esta especie presenta polimorfismo y por tanto morfotipo de cada generación, lo que nos lleva a concluir que la otra especie encontrada, corresponde a un morfotipo en forma de cruz de esta misma especie.

La complejidad del desarrollo de esta especie nos lleva a pensar que la única posibilidad de conseguir su cultivo es manteniendo en forma paralela un cultivo de ciliados u otros rotíferos para su alimentación y a la vez suplementarlos con tocoferol, a fin de evitar el canibalismo, lo cual hace muy complejo el sistema de producción de estos ejemplares, sin embargo aún así esta especie podría ser un excelente espécimen para pruebas toxicológicas tanto por sus tamaños como por su sensibilidad a químicos.



Aislamiento y cultivo de copépodos.

Aislamiento.

Se pudieron separar dos especies, con una muy baja abundancia, con un total de 3 ejemplares de la especie 1 y 22 ejemplares de la especie 2. Se aísla y cultiva en agua procedente del santuario del río Cruces sector Punucapa la cual es microfiltrada a 0,22 µm y suplementada con policultivo de microalgas previamente aisladas del ambiente natural, paralelamente se cuantifica la presencia de hembras portadoras de bolsas ovíferas y se registran características morfológicas para su identificación.

Se encontró que de los ejemplares aislados ninguno presentaba bolsas ovíferas, por lo cual no se encuentran en fase reproductiva hasta el momento. La especie perteneciente al orden Cyclopoida, a la familia Cyclopoidae y posiblemente al orden Acanthocyclops.

Los copépodos pertenecientes a este orden son depredadores comiendo cladóceros juveniles y neonatos, así como también microalgas, el número de huevos por hembra alcanza los 40 a 70. Los copepoditos emergen de la diapausa en primavera y la reproducción es mayor a finales del verano y el otoño.

El cultivo se continuó hasta encontrar presencia de hembras ovíferas, sin embargo este grupo en general se informa que la relación macho hembra es de 28:1, por lo cual se requiere mayor número de individuos para asegurar su cultivo, de tal forma que se hizo necesario realizar más muestreos de los previstos.

Se colocó fotoperíodo y se alimentaron con policultivos de presas vegetales y animales para su observación.

Aislamiento y Cultivo de Cladóceros.

Resultados Aislamiento.

Las muestras obtenidas en terreno, fueron trasladadas al laboratorio de cultivo, para aislamiento y masificación de ejemplares.



La diversidad encontrada fue de sólo dos especies y la abundancia 10,5 ind/m³. En base a su morfología corporal tales como forma, tipo de ojo y ocelo, forma y medidas de las valvas, y posición de órganos sensoriales, se estableció que se encontraron dos géneros *Bosminia* y *Chydorus*.

Especie A.- Clase: Branchiopoda, Suborden cladóceros, familia Chydoridae.

Se aíslan todos los ejemplares de *Bosminia* y sólo dos individuos de *Chydorus sp.* (Figura 24)

Se procede a cultivar en agua de medio ambiente natural esterilizada mediante filtración a 0,22, las variables en cultivo de mantención fueron las mismas de ambiente natural con modificación a dos temperaturas 18°C (en cámara de incubación) (Figura 23), y a temperatura de 24 °C.

Se midió un total de 36 ejemplares adultos con un promedio 407,9 µm y una desviación de 76,7.



Figura 23. Aislamiento Cladóceros



Figura 24. Incubadora de Zooplancton a 18°C.

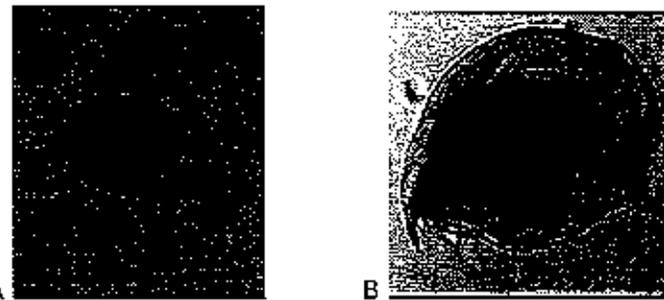


Figura 25. A.- Género *Bosminia* Hembra incubante con 4 ejemplares preeclosión;
B.- *Chytorus* sp.

En la Tabla 16 se muestra la talla de aquellas hembras que desde terreno, venían con embriones así como sus medidas. Al comparar los datos, se observa que las hembras que portan huevos presentan después de una semana de cultivo una talla menor, lo que pudiera indicar una madurez más rápida.



Tabla 16. Fecundidad de hembras cultivadas en laboratorio y su talla, así como la talla de los huevos que portaban.

1	365,5	1	54
2	378	2	57,5
3	311	2	50,5
4	354,5	2	60
5	332	3	57,5
6	393,2	4	55
7	370,6	4	57,8
8	354	2	49,3
9	347,8	3	54,7
10	410	4	57,7
Promedio	361,66	2,7	55,40
Desviación	28,8	1,1	3,4

La baja cantidad de cladóceros encontrados en terreno, así como lo avanzado del invierno, hacen suponer la complejidad de la masificación de esta especie, lo que se evidencia en las mortalidades y en el estado reproductivo que se encuentran puesto que las especies ya se encontraban preparadas para generar huevos de resistencia, por lo que habrá que manejar varias variables para obtener un stock de hembras reproductivas con mejor fecundidad, sobrevivencia y partenogenéticas, que el principio de la masificación en este tipo de organismos.

Este género se caracteriza por tener una alimentación por filtración de microalgas, pero vive normalmente asociado al epilimnion por lo cual se ha citado que prefiere grandes partículas de diatomeas (10 y 15 μm).

Cultivos de Macrofauna Bentónica.

Cultivo de Chironomidos-Variantes de cultivo.

a) La temperatura de la sala de cultivo se controló desde el 6 de mayo al 10 de junio, su seguimiento diario se muestra en Figura 26. El promedio de temperatura de cultivo fue de 19,4°C. con promedios de máximas de 21,4°C y de mínimas de 17,4°C (Figura 26).

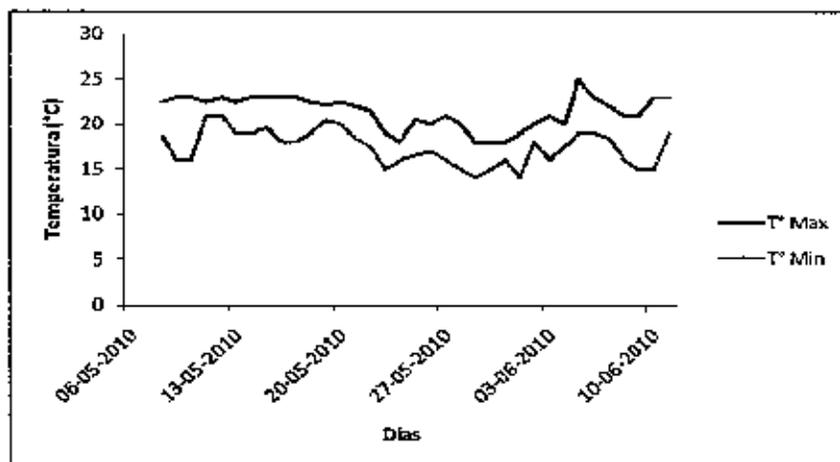


Figura 26. Variación de temperatura máxima y mínima en sala de cultivo.

b) El fotoperiodo establecido (14 hrs luz y 10 hrs oscuridad) durante todo el período del ensayo, permitió obtener y manejar adecuadamente los distintos etapas de desarrollo del Chironómido seleccionado.

c) El alimento utilizado permitió el desarrollo adecuado de los distintos estadios larvales. No se observó presencia de hongos y/o respuestas que evidenciaran efectos negativos sobre las larvas. Las mismas larvas aprovechan el alimento como sustrato y construcción de capullos individuales usados como habitáculos; en ellos se observó un comportamiento vigoroso de las larvas durante todo el período de ensayo.

Desarrollo del Cultivo.

a) Ciclo de vida.

Las larvas obtenidas en terreno se mantuvieron bajo condiciones controladas (según método) lo que permitió desarrollar el ciclo completo del Chironomido seleccionado (huevo, larva, pupa, adulto), primer paso para el establecimiento de un cultivo estandarizado (Figura 27).

Se definieron los tiempos (días) de duración de cada etapa: Larva 20 días; pupa 2 días, adulto 2 días, huevo 3 días. Total de días ciclo de vida Chironominae 27 días.

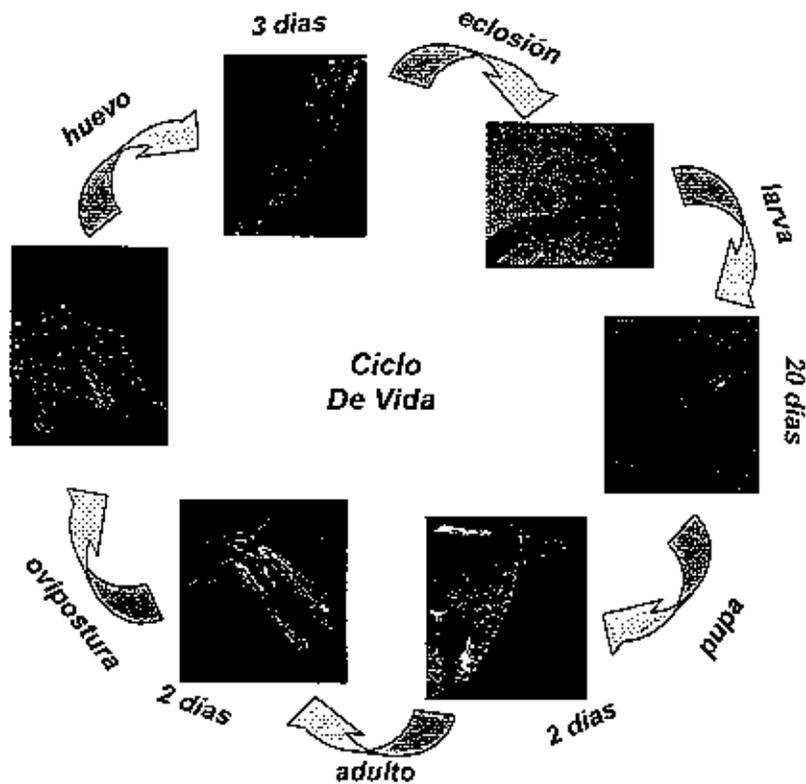


Figura 27. Ciclo de vida Diptera - Chironominae - obtenido en condiciones controladas.

b) Crecimiento de larva.

Posterior a la eclosión, en forma diaria se registró la longitud de las larvas. La curva de crecimiento en longitud tuvo su mejor ajuste a una curva de tipo exponencial ($R^2=0,9721$). La longitud máxima (5,4 mm) se obtuvo a los 20 días, posteriormente comienza su etapa de pupa (Figura 28).

Durante el período de seguimiento se pudo distinguir cuatro estados de desarrollo larval en conformidad a su relación en longitud versus número de días (I, II, III y IV).

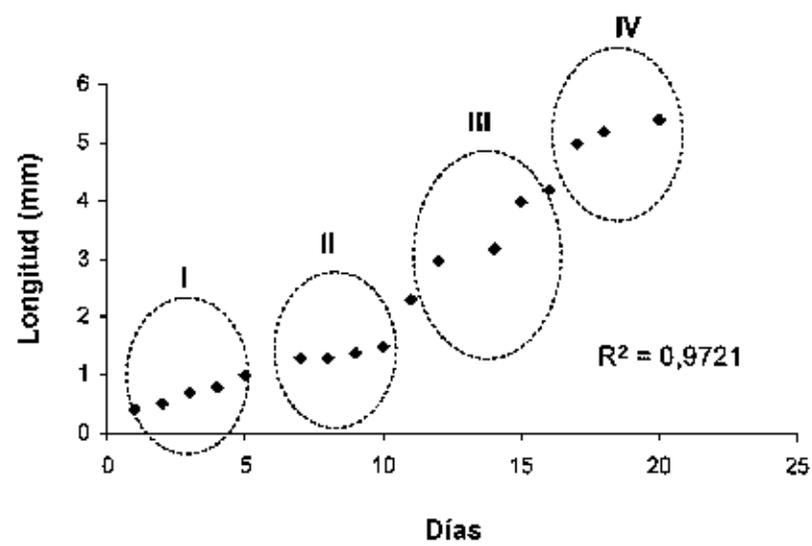


Figura 28. Crecimiento en longitud de larvas de Chironominae.

Cultivos y Bioensayos de Chironomidos.

Los resultados de los cultivo y ensayos con Chironomidos nativos mostraron que a las 48 horas se tiene una sobrevivencia del 100%, a las 72 horas se tiene un 97,3% y a las 120 horas la sobrevivencia es del 93,3 % (Tabla 17). Estos resultados permiten señalar que los individuos de Chironominae poseen una alta sobrevivencia bajo condiciones de manipulación y serían adecuados para su uso en bioensayos.

Tabla 17. Ensayos de sobrevivencia individuos de una familia Chironomidae nativo (Chironominae) usando agua reconstituida (situación control).

Ensayo 24 hrs						Ensayo 96 hrs					
	R1	R2	R3	Total	%		R1	R2	R3	Total	%
V1	5	5	5	15	100	V1	5	5	5	15	100
V2	5	5	5	15	100	V2	5	5	5	15	100
V3	5	5	5	15	100	V3	5	5	5	15	100
V4	5	5	5	15	100	V4	3	5	5	13	86,7
V5	5	5	5	15	100	V5	5	5	4	14	93,3
Sobrevivencia	25	25	25	75	100	Sobrevivencia	23	25	24	72	96,0
% Sobrevivencia	100	100	100			% Sobrevivencia	92	100	98		

Ensayo 48 hrs						Ensayo 120 hrs					
	R1	R2	R3	Total	%		R1	R2	R3	Total	%
V1	5	5	5	15	100	V1	5	5	5	15	100
V2	5	5	5	15	100	V2	5	5	5	15	100
V3	5	5	5	15	100	V3	5	5	5	15	100
V4	5	5	5	15	100	V4	1	5	5	11	73,3
V5	5	5	5	15	100	V5	5	5	4	14	93,3
Sobrevivencia	25	25	25	75	100	Sobrevivencia	21	25	24	70	93,3
% Sobrevivencia	100	100	100			% Sobrevivencia	84	100	98		

Ensayo 72 hrs					
	R1	R2	R3	Total	%
V1	5	5	5	15	100
V2	5	5	5	15	100
V3	5	5	5	15	100
V4	4	5	5	14	93,3
V5	5	5	4	14	93,3
Sobrevivencia	24	25	24	73	97,3
% Sobrevivencia	96	100	98		



Curva de crecimiento y condiciones de laboratorio de Cultivos de Chironomidos.

Con el objeto de determinar la ecuación de crecimiento de las larvas empleadas, se procedió a medir en forma diaria, 24 horas después de la eclosión hasta el estado de pupa, 5 larvas obtenidas de una ovipsotura. Los registros fueron tabulados y se estimó la ecuación con una función polinómica como se muestra en la Figura 29. Se propone el estado II (2 a 3 cm) como la talla apropiada para ser usada en los bioensayos. Las ventajas de ese estadio son: durante 5 días estas larvas registran un buen porcentaje de sobrevivencia al ser sometidas a condiciones de control para bioensayos, son fáciles de manipular, el rango de variación en longitud es estrecho y se reduce el efecto de mortalidad por carnivoría y efectos por metamorfosis (pupa).

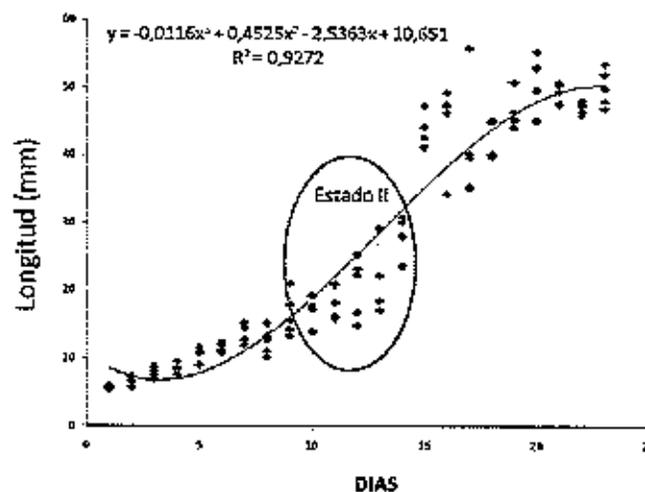


Figura 29. Curva y ecuación de crecimiento de Chironominae estimada bajo condiciones de cultivo intensivo.

Parámetros de cultivo.

Durante el periodo de mantención de lavas, se registraron los parámetros: temperatura, pH y oxígeno del agua en cada bandeja de cultivo de Chironomidos. Mantener estas condiciones lo mas estables posibles, determinará el éxito del cultivo. En la Tabla 18. se entregan los resultados del seguimiento de los parámetros señalados durante el periodo comprendido entre el 22-06-10 al 11-07-10.



Tabla 18. Promedio y desviación estándar de parámetros en bandejas de cultivo en laboratorio (n=9)

	T°C	pH	O ₂
Promedio	18,5	6,9	51,8
DS	0,8	0,5	15,8

Se realizó un seguimiento diario a las temperaturas máximas y mínimas de la sala de cultivo, siendo estos parámetros determinantes en el control de temperatura de las bandejas donde se encuentran las larvas. El registro en el período muestra un descenso de la temperatura promedio de 2,7 grados (de 22,6 °C durante el periodo del 22 de junio al 11 de julio a 18,7 °C durante el periodo del 12 de julio al 26 de julio), ello debido a las condiciones climáticas estacionales las cuales particularmente han sido extremas (onda de frío polar en la zona centro-sur de Chile) teniendo que readecuar los sistemas de calefacción en la sala de cultivo, situación que ya ha sido abordada.

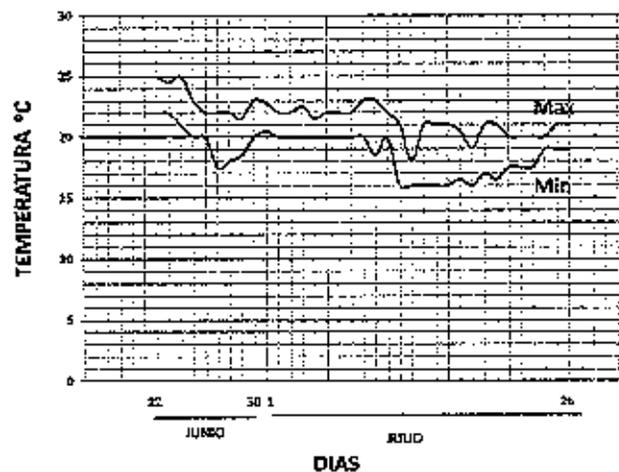


Figura 30. Grafico temperatura máximas y mínimas, período del 22-06-10 al 11-07-10.

De esta forma se determina que: la técnica de estrés término (refrigeración a 5 °C) utilizada para sincronizar la eclosión de individuos es adecuada y permite planificar entregas de larvas de acuerdo a los requerimientos de los bioensayos realizados; en los ensayos de sobrevivencia se obtuvo a las 72 horas un 100% de sobrevivencia; fue posible establecer una curva de crecimiento para la especie en cultivo, la cual permite planificar un manejo de individuos para cubrir las necesidades de los bioensayos realizados,



empleando el estadio II para ello; y finalmente, se determinó que los parámetros críticos de cultivo (temperatura, pH y oxígeno) se logran mantener en rangos apropiados para el cultivo de la especie en cautividad.

Protocolo Cultivo de Chironomido Nativo.

Introducción.

Trabajos tendientes a conocer la biología reproductiva, ciclos biológicos y condiciones de cultivo para su manejo intensivo son fundamentales para definir estándares de aquellas especies que son planteadas para ser usadas en bioensayos de toxicidad. Asimismo el trabajo con especies nativas vienen a fortalecer el uso de esta técnica, a la hora de ser llamadas a entregar respuestas frente a las alteraciones producidas en el medio ambiente debido a la incorporación de determinados cenobíticos, y/o a la hora de establecer condiciones basales para ser planteados como elementos de juicio para el establecimiento de niveles críticos (normativa secundaria).

El presente protocolo entrega los resultados del trabajo efectuado bajo condiciones controladas de laboratorio de una especies de invertebrados nativos (Diptera: Chironomidae) con el objeto de establecer un protocolo para ser usado en bioensayos de toxicidad.

Protocolo cultivo de Chironomido nativo para su uso en bioensayos de toxicidad.

1. Especie Seleccionada

Para la elaboración del protocolo, se establecieron las condiciones de cultivo de la especie *Paratanytarsus grimmii* (Schneider).

Clasificación.

Clase: Insecta

Orden: Diptera

Familia: Chironomidae

Subfamilia: Chironominae

Genero: Paratanytarsus

Especie: *Paratanytarsus grimmii*



Características: posee una distribución mundial, habitando sistemas lóticos, lagunas y estanques. Es partenogenético y se desconoce el macho.

1.2 Materiales para la sala de cultivo (6m²)

- Termómetro de mercurio
- Termómetro de máxima y mínima
- Calefactor
- Cajas de cultivo (base de madera, con malla de alambre en los lados y forradas en el interior con tul) (Puerta: 20cm x 30cm, Lados: 25cm x 36 cm)
- Lámparas de iluminación
- Timer
- PHmetro
- Oxigenómetro
- Sistema de aireación
- Agua reconstituida
- Lupa
- Microscopio
- Placas petri (9 y 5 cm de diámetro)

1.3 Materiales para la colecta de larvas en terreno

- Redes (tipo D, con base de 30cm)
- Bandejas de plástico
- Baldes de plástico
- Gotarios (3ml)
- Pinceles y brochas
- Sistema de aireación (mangueras de 5mm con difusor y bombas de oxígeno)



1.4 Materiales para la elaboración del sustrato (alimentación y refugio de larvas):

- Sedimento colectado en el Río
- Hojas de ortiga
- Alimento para pez
- Estufa
- Mortero
- Agua reconstituida
- Papel aluminio
- Balanza digital

1.5 Materiales para la manipulación de las larvas:

- Placas petri
- Bandejas plásticas
- Estilete
- Pinzas
- Gotarios
- Lupa
- Microscopio
- Agua reconstituida
- Sustrato

1.6 Materiales para la manipulación de adultos:

- Pinzas
- Placas petri
- Agua reconstituida

1.7 Materiales para la manipulación de huevos:

- Placas petri
- Agua reconstituida
- Pinzas
- Gotarios
- Lupa
- Microscopio
- Refrigerador
- Termómetro de máxima y mínima



2. Metodología de cultivo y manipulación de la especie.

2.1 Condiciones de la sala de cultivo.

En la sala de cultivo se instalan las "cajas de cultivo" dentro de las cuales se instalan las bandejas con larvas y placas petri para las posturas de huevos.

Para el sistema de aireación se instalan 2 bombas de oxígeno (según requerimientos), conectadas con mangueras y un difusor con bandeja.

Es necesario controlar la temperatura de la sala de cultivo para lo cual es aconsejable instalar un calefactor eléctrico con termostato, un termómetro de mercurio para registrar la temperatura del momento y un termómetro de máxima y mínima.

La sala de cultivo se mantiene con fotoperiodo controlado utilizando lámparas conectada a un timer (14 horas luz-10 horas oscuridad).

Para la manipulación de las larvas y oviposturas, se usa solo agua reconstituida a temperatura ambiente (20°C). Además se realizan observaciones diarias con lupa y microscopio,

2.2 Colecta de larvas en terreno.

El cultivo de *Paratanytarsus grimmii*, se inicia con la colecta en terreno de larvas. La captura se realiza en distintos puntos a la orilla del río con redes a una profundidad de 20 a 30 cm aproximadamente. El contenido de material biológico obtenido se vierte en bandejas plásticas y con un gotario se separan las larvas, depositándose en frascos y baldes plásticos. Paralelamente se puede utilizar el método de piedras con pinceles y brochas.

Los baldes con larvas de *Paratanytarsus grimmii*, colectados en el terreno se llevan a la sala de cultivo, se cubren con tul instalándose inmediatamente el sistema de aireación. Luego de 20 a 25 días se obtienen los primeros adultos y consecuentemente las oviposturas.

2.3 Elaboración del sustrato.

El sustrato que servirá de alimento y hábitat para las larvas, se prepara en base a sedimento colectado en un río seco, alimento para pez molido y hojas de ortiga secas. El procedimiento consiste en obtener sedimento desde el río se elimina el agua excedente por filtración rustica para luego ser colocados en bandejas de aluminio las que se llevan a una estufa a 110°C durante 24 hrs. Las hojas de ortiga se secan en estufa a 40°C



durante 24 hrs. Luego se muelen al igual que el alimento para pez (pelet) y el sedimento. Con estos materiales se prepara una mezcla que contiene 10g de sedimento, 1g de alimento para pez y 0,1g de hojas de ortiga.

2.4 Manipulación de larvas obtenidas en la sala de cultivo.

Una vez que las larvas salen de la matriz gelatinosa (ovipostura), se colocan en bandejas con sustrato, para ello se toman 2g de la mezcla y se le agregan 10 ml de agua reconstituida.

En cada bandeja se colocan 200 ml de agua reconstituida y se vierte la mezcla de sustrato, con el gotario se trasladan las larvas a las bandejas (1000 a 1500 larvas por bandeja). Posteriormente las bandejas se llevan a las cajas y se conectan las mangueras para la aireación. Suministrándoles 6ml de sustrato dos veces por semana y procurando que la columna de agua se mantenga sobre los 2,5cm.

A las 48 hrs las larvas miden 0,5mm, las larvas que están en las bandejas se observan como pequeños cúmulos, en estos cúmulos las larvas se encuentran aglomeradas y alimentándose del sustrato constantemente, como así también se pueden observar las casa construidas por cada individuo.

2.5 Manipulación de adultos.

Los adultos al salir de las bandejas se ubican en los lados y techo de las cajas, depositando los huevos en las placas petri que contienen 10 ml de agua reconstituida. Los adultos se caracterizan por presentar una tonalidad verde y ser de pequeño tamaño (1,5-2,0 mm).

2.6 Manipulación de huevos.

Las oviposturas, adherentes, poseen forma filamentosa y de 4.0 - 4.5 mm de longitud, compuesta por una masa gelatinosa en cuyo interior se disponen los huevos generalmente pareados y transparentes. Cada filamento contiene 180 huevos promedio

2.7 Sincronización de ovipostura

Si la demanda de individuos para bioensayos es mayor al la colectada en un día, se procede a sincronizar eclosión. A las 24 horas posterior a la ovipostura, los huevos son colectados desde las cápsulas de petri instaladas en las "cajas de cultivo" y trasladadas a



refrigeración a 5°C contante (shock térmico). Cuando se cuenta con la cantidad suficiente de huevos, se sacan de refrigeración, colocándolas en cajas de cultivo. Huevos con y sin refrigerar eclosionan al tercer día.

Una vez que eclosionan todas las larvas, se vierten un par de gotas de sustrato en las placas esperando 2horas a modo de aclimatación, posteriormente trasvasiarlas a bandejas plásticas de cultivo dentro de las "cajas de cultivo" y sometidas bajo las condiciones expuestas en el punto 3.1.



4.2.3 DETERMINACIÓN DE EFECTOS: REALIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE BIOENSAYOS SOBRE LAS ESPECIES DE RELEVANCIA ECOLÓGICA DEL SANTUARIO DE LA NATURALEZA Y EN LAS ESPECIES ESTANDARIZADAS CONSIDERANDO DIFERENTES NIVELES TRÓFICOS.

En la Tabla 19 se muestran los taxa de diferentes niveles tróficos empleados en la realización de los bioensayos de toxicidad.

Tabla 19. Taxa empleados en realización de bioensayos de toxicidad Santuario de la Naturaleza.

GRUPO	Especie	Estandarizado/nativos locales
Fitoplancton	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Estandarizado
	<i>Chlorella sp.</i>	Local
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Local
Zooplancton	<i>Daphnia obtusa</i>	Estandarizado
	<i>Daphnia ambigua</i>	Local
	<i>Simocephalus sp.</i>	Local
	<i>Simosa sp</i>	Local
	<i>Acanthocyclops vernalis</i>	Local
	<i>Skistodiaptomus diabolicus</i>	Local
Macroinvertebrados	<i>Meridialaris sp.</i>	Local
	<i>Paratanytarsus grimmii</i>	Local
Peces	<i>Galaxias maculatus</i>	Local
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Estandarizada
Macrófitas	<i>Myriophyllum sp.</i>	Estandarizada

4.2.3.1 Validación y Realización de Bioensayos.

- Validación Bioensayos.

El control de la calidad de los bioensayos es un aspecto muy importante en el desarrollo de los bioensayos de toxicidad, lo que permite evaluar el nivel de reproducibilidad frente a una sustancia química patrón, en este caso Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$). El número de resultados consecutivos recomendados por USEPA (1990), para una correcta intracalibración corresponde a un mínimo de cinco (5) bioensayos triplicados



consecutivos. De esta forma, el control de calidad se realiza principalmente mediante el cálculo de la precisión y exactitud. El coeficiente de variación (CV) indica el nivel de precisión de la calibración. En este sentido, el Servicio de Protección Ambiental de Canadá (EPS, 1990) y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 1990) fijan un coeficiente de variación menor o igual a 30% ($CV < 30\%$) como la máxima variabilidad permitida entre los índices de toxicidad para el tóxico de referencia correspondientes a las réplicas de un mismo bioensayo entre los índices de toxicidad promedio para los n bioensayos consecutivos realizados con el tóxico de referencia. Una variabilidad intralaboratorio superior al 30% (precisión inferior a la mínima permitida) indica una gran desviación estándar alrededor de la media, lo cual causa que los límites de vigilancia superior (LVS) e inferior (LVI) al 95% en la carta de vigilancia sean excesivamente amplios. En consecuencia, aunque un laboratorio no genere resultados con un nivel adecuado de exactitud, puede demostrar que sus datos están dentro del rango definido por los límites de vigilancia. No sólo es importante monitorear si los valores de $CL_{50-24 h}$ para el tóxico de referencia en un bioensayo determinado caen o no dentro de los límites establecidos en la carta de vigilancia (es decir, si se cumple con la exactitud), sino que también deben ser monitoreadas las tendencias o patrones desarrollados por los datos. La ocurrencia de datos fuera de los límites puede ser prevenida por una temprana detección de una tendencia. La teoría de probabilidad señala que la probabilidad que cualquier dato caiga bajo o sobre la media en la carta de vigilancia (LTC = línea de tendencia central) es de $1/2$ (asumiendo fuentes de variación aleatorias). La probabilidad que 2 puntos se encuentren en el mismo lado de la línea es de $1/4$. Por lo tanto, la probabilidad que "n" puntos estén en el mismo lado de la línea es de $1/(2^n)$. Si el $n = 5$, la probabilidad que esto ocurra sólo por azar es sólo de un 3%. Por lo tanto, si 5 o más puntos consecutivos (valores de $CL_{50-24 h}$ correspondientes a bioensayos consecutivos) están en el mismo lado de la LTC, se deben tomar medidas para detectar fuentes de error y corregirlas (Dux 1986). Cuando el bioensayo se emplee en la evaluación de la calidad toxicológica de muestras ambientales, se debe realizar simultáneamente un bioensayo con el tóxico de referencia, el cual debe mantener la precisión y exactitud histórica establecida en el proceso de calibración. Sólo si se cumple esto se puede asegurar con un alto grado de confianza que los índices de toxicidad para las muestras ambientales son realmente efecto de su toxicidad y no el reflejo de alguna fuente de variabilidad introducida al sistema (variaciones en la edad de los organismos, agua de dilución, procedimientos operativos, etc.).



Sólo si se cumple que la variabilidad (CV) es menor o igual al 30% se puede determinar la exactitud intralaboratorio. Los estadísticos descriptivos utilizados en este estudio permiten determinar si existen valores "anormales" "(outside)" o "muy anormales" "(far outside)" que no deban ser incluidos en ningún análisis estadístico realizado sobre la población o muestra de datos. El rango intercuartil se extiende desde el cuartil inferior hasta el cuartil superior cubriendo la parte central de la población de datos. Un "valor anormal" es definido como aquel que se encuentra ubicado a más de 1,5 veces sobre o bajo el rango intercuartil. En el caso de "Valores muy anormales" corresponden a aquéllos ubicados a más de 3,0 veces sobre o bajo el rango intercuartil. En este caso, ninguno de los datos de CL_{50} considerados están dentro de la categoría de "anormales" o "muy anormales". Por lo tanto, todos los datos serán incluidos en la determinación de la precisión y exactitud intralaboratorio.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la validación de los bioensayos realizados.

Selenastrum capricornutum.

Para *Selenastrum capricornutum*, el valor de la CL_{50-96} h promedio para los (n=6) bioensayos fue de 1.06333 mg/L de $K_2Cr_2O_7$, con una desviación estándar (ds) de 0.23. Los valores mínimo y máximo fueron de 0.7 y 1.33 respectivamente. La precisión de CV = 21.75%. La exactitud en los resultados está señalada por la correcta amplitud entre los límites de vigilancia superior e inferior (LVS = 1.82 mg.L-1; LVI = 0.30). Con respecto al monitoreo de tendencias o patrones anómalos desarrollados por los datos, éstos no son observables distribuyéndose los datos en forma azarosa alrededor de la línea de tendencia central (LTC; Ver carta de vigilancia, Figura 31) y entre las líneas de vigilancia. Los parámetros de control de calidad indican el alto nivel de precisión y exactitud que puede y debe ser alcanzado en la ejecución de los bioensayos (Tabla 20).

Tabla 20. Resumen Estadístico para Microalgas LC_{50} .

Recuento	6
Promedio	1.06333
Desviación estándar	0.231229
Coef. de variación	21.7456%
Mínimo	0.7
Máximo	1.33
Rango	0.63
Curtosis estandarizada	0.0158196

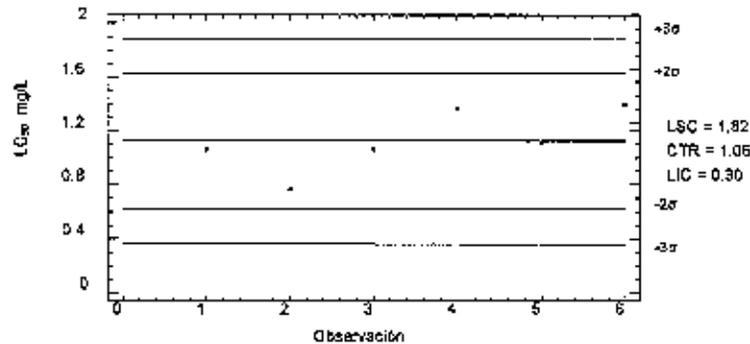


Figura 31. Carta de control para los LC₅₀-96 h de *Selenastrum capricornutum*. Los intervalos están dados por $\mu - 2\sigma$; $\mu - 2\sigma$ que representa al 89% y $\mu - 3\sigma$; $\mu - 3\sigma$ que equivale al 99,7%.

Chlorella sp

Para, *Chlorella sp* el valor de la CL₅₀-48 h promedio para los (n = 4) bioensayos fue de 0,79 mg/l de de K₂Cr₂O₇, con una desviación estándar (ds) de 0.207204. Los valores mínimo y máximo fueron de 0.57 y 1.07 respectivamente. La precisión corresponde a un CV = 26,2283%. La exactitud en los resultados está señalada por la correcta amplitud entre los límites de vigilancia superior e inferior (LVS = 0,16 mg.L-1; LVI = 1,41). Los parámetros de control de calidad indican el alto nivel de precisión y exactitud que puede y debe ser alcanzado en la ejecución del bioensayos (Tabla 21 y Figura 32).

Tabla 21. Resumen Estadístico para *Chlorella sp*

Recuento	4
Promedio	0,79
Desviación Estándar	0,207204
Coefficiente de Variación	26,2283%
Mínimo	0,57
Máximo	1,07
Rango	0,5
Curtosis Estandarizada	0,7579

En la tabla 21. Se observa la sistematización de los valores de toxicidad promedio y desviación estándar para cada uno de los ensayos realizados para *Chlorella sp* expuesta a Dicromato de Potasio.

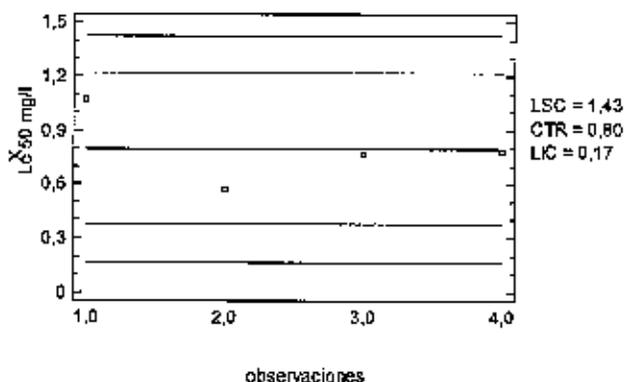


Figura 32. Carta de control para los LC₅₀-96 h de *Chlorella sp.*

Daphnia obtusa.

Para *Daphnia obtusa*, el valor de la CL₅₀-48 h promedio para los (n = 5) bioensayos fue de 0.252 mg/L de K₂Cr₂O₇, con una desviación estándar (ds) de 0.0216795. Los valores mínimo y máximo fueron de 0.23 y 1.28 respectivamente. La precisión corresponde a un CV = 8.60297%. La exactitud en los resultados está señalada por la correcta amplitud entre los límites de vigilancia superior e inferior (LVS = 0.33 mg.L-1; LVI = 0.17). Los parámetros de control de calidad indican el alto nivel de precisión y exactitud que puede y debe ser alcanzado en la ejecución del bioensayos (Tabla 22 y Figura 33).

Tabla 22. Resumen Estadístico para *Daphnia obtusa*.

Recuento	5
Promedio	0.252
Desviación estándar	0.0216795
Coef. de variación	8.60297%
Mínimo	0.23
Máximo	0.28
Rango	0.05
Curtosis estandarizada	-1.08065

En la Tabla 22. Se observa la sistematización de los valores de toxicidad promedio y desviación estándar para cada uno de los ensayos realizados para *D. obtusa* expuestos a Dicromato de Potasio.

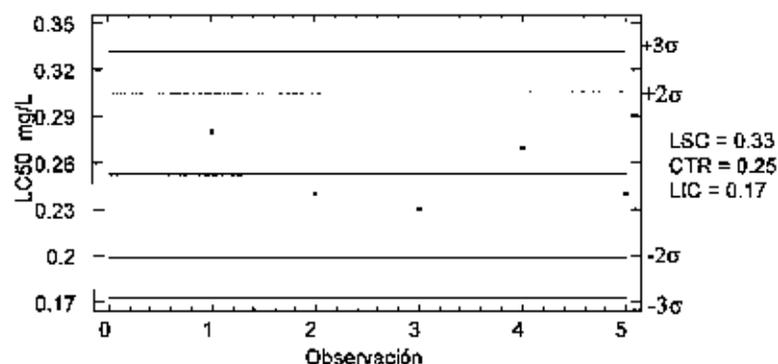


Figura 33. Carta de control para los CL_{50-48} h *D. obtusa*. Los intervalos están dados por $\mu - 2\sigma$; $\mu - 2\sigma$ que representa al 89% y $\mu - 3\sigma$; $\mu - 3\sigma$ que equivale al 99,7%.

Daphnia ambigua

Para *Daphnia ambigua*, el valor de la CL_{50-48} h promedio para los ($n = 4$) bioensayos fue de 1,4775 mg/L de $K_2Cr_2O_7$, con una desviación estándar (ds) de 0,310202. Los valores mínimo y máximo fueron de 1,21 y 1,89 respectivamente. La precisión corresponde a un CV = 20,995%. La exactitud en los resultados está señalada por la correcta amplitud entre los límites de vigilancia superior e inferior (LVS = 2,40; LVI = 0,54). Los parámetros de control de calidad indican el alto nivel de precisión y exactitud que puede y debe ser alcanzado en la ejecución del bioensayos (Tabla 23 y Figura 34).

Tabla 23. Resumen Estadístico para *Daphnia ambigua*.

Recuento	4
Promedio	1,4775
Desviación Estándar	0,310202
Coefficiente de Variación	20,995%
Mínimo	1,21
Máximo	1,89
Rango	0,68
Curtosis Estandarizada	-0,228693

En la Tabla 23. Se observa la sistematización de los valores de toxicidad promedio y desviación estándar para cada uno de los ensayos realizados para *D. ambigua* expuestos a Dicromato de Potasio.

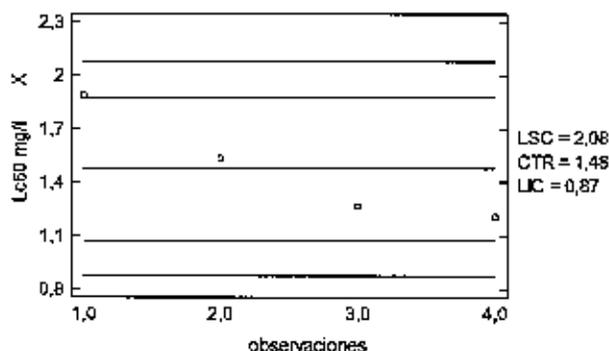


Figura 34. Carta de control para los LC₅₀- 48 h *Daphnia ambigua*

Familia Leptophlebiidae (*Meridialaris sp*)

Para *Meridialaris sp*, el valor de la CL₅₀-48 h promedio para los (n = 5) bioensayos fue de 29.9174 mg/L de K₂Cr₂O₇, con una desviación estándar (ds) de 16.5182. Los valores mínimo y máximo fueron de 8.64 y 51.565 respectivamente. La precisión es de CV = 55.2126%. La exactitud en los resultados está señalada por la correcta amplitud entre los límites de vigilancia superior e inferior (LVS = 58.46 mg/L; LVI = 1.38 mg/L). Con respecto al monitoreo de tendencias o patrones anómalos desarrollados por los datos, se observa una tendencia y hay datos fuera del rango equivalente a 89% de confianza ($\mu - 2\sigma$; $\mu + 2\sigma$). Los parámetros de control de calidad indican el bajo nivel de precisión con valores mayores al 30% y una mediana exactitud, por lo que se aumentará el número de ensayos hasta alcanzar los estándares requeridos (Tabla 24 y Figura 35).

Tabla 24. Resumen Estadístico para *Meridialaris sp* (Leptophlebidos).

Recuento	5
Promedio	29.9174
Desviación estándar	16.5182
Coef. de variación	55.2126%
Mínimo	8.64
Máximo	51.565
Rango	42.925
Curtosis estandarizada	-0.283737

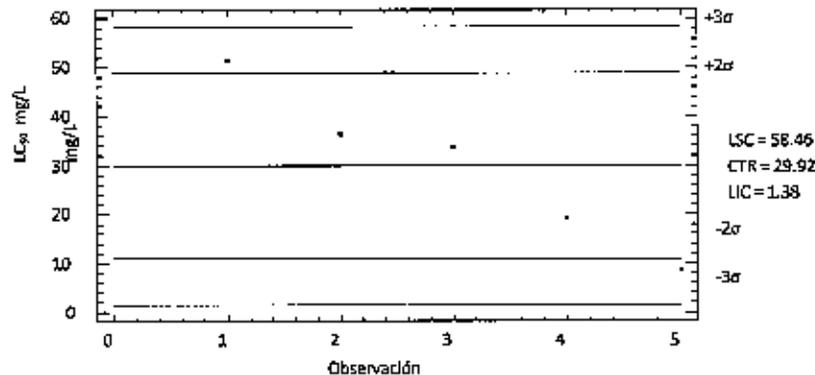


Figura 35. Carta de control para los LC₅₀- 48 h de Leptophebidos. Los intervalos están dados por $\mu - 2\sigma$; $\mu - 2\sigma$ que representa al 89% y $\mu - 3\sigma$; $\mu - 3\sigma$ que equivale al 99,7%.

Chironomidae (*Paratanytarsus grimmii*)

El valor de la lc_{50} promedio para los ($n=5$) bioensayos fue de 53.8 mg/L de $K_2Cr_2O_7$, con una desviación estándar (ds) de 7,32803. Los valores mínimo y máximo fueron de 43.0 y 63.0 respectivamente. La precisión corresponde a un CV = 13,6209%. La exactitud en los resultados está señalada por la correcta amplitud entre los límites de vigilancia superior e inferior (LVS = 75.78 mg/L; LVI = 31.81 mg/L). Con respecto al monitoreo de tendencias o patrones anómalos desarrollados por los datos, se observa una tendencia y hay datos fuera del rango equivalente a 89% de confianza ($\mu - 2\sigma$; $\mu - 2\sigma$). Los parámetros de control de calidad indican el bajo nivel de precisión con valores mayores al 30% y una mediana exactitud, por lo que se aumentará el número de ensayos hasta alcanzar los estándares requeridos (Tabla 25 y Figura 36).

Tabla 26. Resumen Estadístico para *Paratanytarsus grimmii* (Chironomidos)

Criterio	Valores
Recuento	5
Promedio	53,8
Desviación Estándar	7,32803
Coefficiente de Variación	13,6209%
Mínimo	43,0
Máximo	63,0
Rango	20,0
Curtosis Estandarizada	0,480496



En la Tabla 26. Se observa la sistematización de los valores de toxicidad promedio y desviación estándar para cada uno de los ensayos realizados para *Paratanytarsus grimmii* expuestos a Dicromato de Potasio.

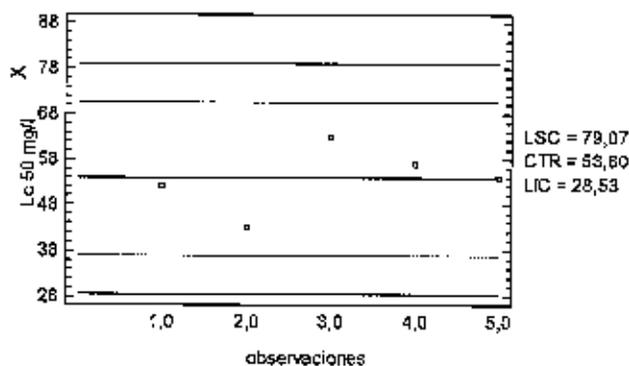


Figura 36. Carta de control para los LC₅₀- 48 h de *Paratanytarsus grimmii* .

Oncorhynchus mykiss.

Para *O. mykiss*, el valor de la CL₅₀-48 h promedio para los (n = 5) bioensayos fue de 55.47 mg/L de K₂Cr₂O₇, con una desviación estándar (ds) de 0,5869. Los valores mínimo y máximo fueron de 54.8 y 56.3 respectivamente. La precisión corresponde a un CV = 1.058%. La exactitud en los resultados está señalada por la correcta amplitud entre los límites de vigilancia superior e inferior (LVS = 57.33 mg/L; LVI = 53.61 mg/L). Con respecto al monitoreo de tendencias o patrones anómalos desarrollados por los datos, éstos no son observables distribuyéndose los datos en forma azarosa alrededor de la línea de tendencia central y entre las líneas de vigilancia. Los parámetros de control de calidad indican el alto nivel de precisión y exactitud que puede y debe ser alcanzado en la ejecución del bioensayo (Tabla 26 y Figura 37).

Tabla 26. Resumen Estadístico para *Oncorhynchus mykiss*.

Recuento	5
Promedio	55.47
Desviación Estándar	0.586941
Coefficiente de Variación	1.05812%
Mínimo	54.8
Máximo	56.3
Rango	1.5
Sesgo Estandarizado	0.506545
Curtosis Estandarizada	-0.289786

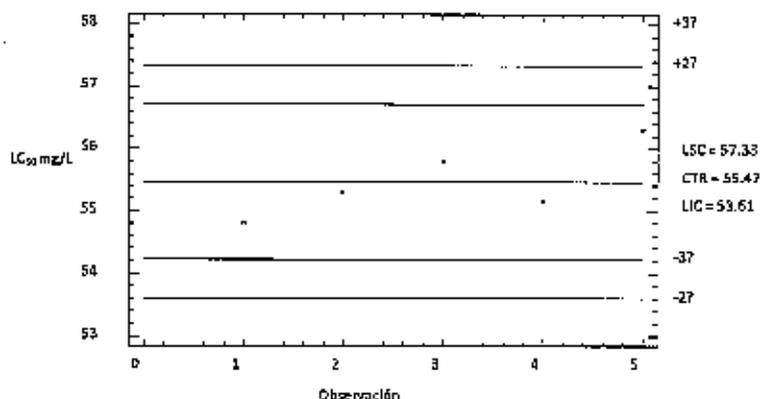


Figura 37. Carta de control para los LC₅₀- 48 h de *Oncorhynchus mykiss*. Los intervalos están dados por $\mu - 2\sigma$; $\mu - 2\sigma$ que representa al 89% y $\mu - 3\sigma$; $\mu - 3\sigma$ que equivale al 99,7%.

- Resultados Bioensayos de Toxicidad con metales seleccionados.

A continuación se muestran los resultados de la realización de bioensayos de toxicidad en las especies de relevancia ecológica del Santuario de la Naturaleza (considerando los diferente niveles tróficos en análisis) y en las especies estandarizadas utilizadas para validar estos ensayos, determinando los efectos de los metales Al, Cu, Fe, Mn y Zn en estas especies.

En la siguiente Tabla se detallan los valores obtenidos a partir de los bioensayos realizados para la LC₅₀.

Tabla 27. Tabla resumen resultados bioensayos realizados.

Especies	Origen	Elemento	Forma	Exposición	LC ₅₀	Unidad
<i>Acanthocyclops vernalis</i>	Local	aluminio	sulfato aluminio Al ₂ (SO ₄) ₃	96hrs	0.691	mg/L
<i>Simocephalus sp.</i>	Local	aluminio	sulfato aluminio Al ₂ (SO ₄) ₃	96hrs	4.8	mg/L
<i>Chlorella sp</i>	Local	aluminio	sulfato aluminio Al ₂ (SO ₄) ₃	96hrs	0.134	mg/L
<i>Skistodiaptomus diabolicus</i>	Local	aluminio	sulfato aluminio Al ₂ (SO ₄) ₃	48hrs	0.037	mg/L



<i>Daphnia obtusa</i>	Estandarizada	aluminio	sulfato aluminio Al ₂ (SO ₄) ₃	48hrs	0.18	mg/L
<i>Daphnia ambigua</i>	Local	aluminio	sulfato aluminio Al ₂ (SO ₄) ₃	48hrs	9.7	mg/L
<i>Galaxias maculatus</i>	Local	aluminio	sulfato aluminio Al ₂ (SO ₄) ₃	96hrs	25.7	mg/L
<i>Meridialaris sp</i>	Local	aluminio	sulfato aluminio Al ₂ (SO ₄) ₃	96hrs	3.2	mg/L
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Estandarizada	aluminio	sulfato aluminio Al ₂ (SO ₄) ₃	48hrs	7.7	mg/L
<i>Paratanytarsus grimmii</i>	Local	aluminio	sulfato aluminio Al ₂ (SO ₄) ₃	96hrs	18.6	mg/L
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Local	aluminio	sulfato aluminio Al ₂ (SO ₄) ₃	48hrs	9.7	mg/L
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Estandarizada	aluminio	sulfato aluminio Al ₂ (SO ₄) ₃	48hrs	1.7	mg/L
<i>Simosa sp</i>	Local	aluminio	sulfato aluminio Al ₂ (SO ₄) ₃	48hrs	3.15	mg/L
<i>Acanthocyclops vernalis</i>	Local	hierro	cloruro de hierro(FeCl ₃)	48hrs	3.2	mg/L
<i>Simocephalus sp.</i>	Local	hierro	cloruro de hierro(FeCl ₃)	48hrs	6.8	mg/L
<i>Chlorella sp</i>	Local	hierro	cloruro de hierro(FeCl ₃)	96hrs	1.2	mg/L
<i>Skistodiaptomus diabolicus</i>	Local	hierro	cloruro de hierro(FeCl ₃)	48hrs	0.03	mg/L
<i>Daphnia obtusa</i>	Estandarizada	hierro	cloruro de hierro(FeCl ₃)	48hrs	10.2	mg/L
<i>Daphnia ambigua</i>	Local	hierro	cloruro de hierro(FeCl ₃)	48hrs	5.7	mg/L
<i>Galaxias maculatus</i>	Local	hierro	cloruro de hierro(FeCl ₃)	96hrs	0.56	mg/L
<i>Meridialaris sp</i>	Local	hierro	cloruro de hierro(FeCl ₃)	96hrs	4.6	mg/L
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Estandarizada	hierro	cloruro de hierro(FeCl ₃)	96hrs	15.8	mg/L



<i>Paratanytarsus grimmii</i>	Local	hierro	cloruro de hierro(FeCl ₃)	48hrs	9.1	mg/L
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Local	hierro	cloruro de hierro(FeCl ₃)	96hrs	6.3	mg/L
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Estandarizada	hierro	cloruro de hierro(FeCl ₃)	96hrs	1.4	mg/L
<i>Simosa sp</i>	Local	hierro	cloruro de hierro(FeCl ₃)	48hrs	3.1	mg/L
<i>Acanthocyclops vernalis</i>	Local	hierro	cloruro de cobre(CuCl ₂)	48hrs	0.029	mg/L
<i>Simocephalus sp.</i>	Local	cobre	cloruro de cobre(CuCl ₂)	48hrs	0.260	mg/L
<i>Chlorella sp</i>	Local	cobre	cloruro de cobre(CuCl ₂)	96hrs	2.6	mg/L
<i>copepodos plantofagos</i>	Local	cobre	cloruro de cobre(CuCl ₂)	48hrs	0.082	mg/L
<i>Daphnia obtusa</i>	Estandarizada	cobre	cloruro de cobre(CuCl ₂)	48hrs	0.194	mg/L
<i>Daphnia ambigua</i>	Local	cobre	cloruro de cobre(CuCl ₂)	48hrs	0.003	mg/L
<i>Galaxias maculatus</i>	Local	cobre	cloruro de cobre(CuCl ₂)	96hrs	0.210	mg/L
<i>Meridialaris sp</i>	Local	cobre	cloruro de cobre(CuCl ₂)	96hrs	0.370	mg/L
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Estandarizada	cobre	cloruro de cobre(CuCl ₂)	96hrs	0.800	mg/L
<i>quironomidos</i>	Local	cobre	cloruro de cobre(CuCl ₂)	48hrs	8.400	mg/L
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Local	cobre	cloruro de cobre(CuCl ₂)	96hrs	2.800	mg/L
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Estandarizada	cobre	cloruro de cobre(CuCl ₂)	96hrs	0.200	mg/L
<i>Acanthocyclops vernalis</i>	Local	manganeso	Cloruro de manganeso (MnCl ₂)	48hrs	0.5	mg/L
<i>Simocephalus sp.</i>	Local	manganeso	Cloruro de manganeso (MnCl ₂)	48hrs	22.0	mg/L
<i>Chlorella sp</i>	Local	manganeso	Cloruro de manganeso (MnCl ₂)	96hrs	1.4	mg/L
<i>Daphnia obtusa</i>	Estandarizada	manganeso	Cloruro de manganeso (MnCl ₂)	48hrs	0.58	mg/L
<i>Daphnia ambigua</i>	Local	manganeso	Cloruro de manganeso	48hrs	3.30	mg/L



			(MnCl ₂)			
<i>Galaxias maculatus</i>	Local	manganeso	Cloruro de manganeso (MnCl ₂)	96hrs	6.18	mg/L
<i>Meridialaris sp</i>	Local	manganeso	Cloruro de manganeso (MnCl ₂)	96hrs	5.0	mg/L
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Estandarizada	manganeso	Cloruro de manganeso (MnCl ₂)	96hrs	4.7	mg/L
<i>Paratanytarsus grimmii</i>	Local	manganeso	Cloruro de manganeso (MnCl ₂)	48hrs	127.6	mg/L
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Local	manganeso	Cloruro de manganeso (MnCl ₂)	96hrs	9.4	mg/L
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Estandarizada	manganeso	Cloruro de manganeso (MnCl ₂)	96hrs	1.2	mg/L
<i>Simosa sp</i>	Local	manganeso	Cloruro de manganeso (MnCl ₂)	48hrs	2.8	mg/L
<i>Acanthocyclops vernalis</i>	Local	zinc	cloruro de zinc (ZnCl ₂)	48hrs	0.032	mg/L
<i>Simocephalus sp.</i>	Local	zinc	cloruro de zinc (ZnCl ₂)	48hrs	4.2	mg/L
<i>Chlorella sp</i>	Local	zinc	cloruro de zinc (ZnCl ₂)	96hrs	0.9	mg/L
<i>Daphnia obtusa</i>	Estandarizada	zinc	cloruro de zinc (ZnCl ₂)	48hrs	0.8	mg/L
<i>Daphnia ambigua</i>	Local	zinc	cloruro de zinc (ZnCl ₂)	48hrs	1.6	mg/L
<i>Galaxias maculatus</i>	Local	zinc	cloruro de zinc (ZnCl ₂)	96hrs	0.12	mg/L
<i>Meridialaris sp</i>	Local	zinc	cloruro de zinc (ZnCl ₂)	96hrs	0.98	mg/L
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Estandarizada	zinc	cloruro de zinc (ZnCl ₂)	96hrs	0.13	mg/L
<i>Paratanytarsus grimmii</i>	Local	zinc	cloruro de zinc (ZnCl ₂)	48hrs	118.1	mg/L
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Local	zinc	cloruro de zinc (ZnCl ₂)	96hrs	1.6	mg/L
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Estandarizada	zinc	cloruro de zinc (ZnCl ₂)	96hrs	7.0	mg/L
<i>Simosa sp</i>	Local	zinc	cloruro de zinc (ZnCl ₂)	48hrs	2.19	mg/L



Si bien se realizó, la recolección, mantención y bioensayos con *Myriophyllum* sp, estos no permitieron estimar los LOEC y NOEC, debido a la baja actividad fotosintética de las plantas capturadas y el tiempo considerado en este estudio. Los resultados preliminares permiten establecer como LOEC para Al de Se estimó en general efectos significativos (LOEC) sobre la actividad fotosintética en relación al control para Al 2 mg/l; Fe de 2 mg/l; Mn 5 mg/l y Zn 5 mg/l. A continuación se detallan los valores promedio de LC₅₀ de especies nativas y estandarizadas para el Santuario de la Naturaleza.

A continuación se detallan los valores promedio de LC₅₀ de especies locales y estandarizadas para el Santuario de la Naturaleza.



Tabla 28. Valores de LC₅₀ promedios de especies nativas y estandarizadas para el Santuario de la Naturaleza, Río Cruces.

		Al	Cu	Fe	Mn	Zn
Especies estandarizadas (EPA)	Promedio Especies estandarizadas (EPA)	0,59	0,17	0,114	0,713	0,08
	Plecóptera (EPA)		12			
	Trichoptera (EPA)		9,15		200	
	Chironomidae (EPA)		0,054	0,22	97,12	0,065
Especies estandarizadas (UCT)	<i>O. mykiss</i> (UCT)		0,8		4,5	0,1
	<i>Selenastrum capricornutum</i>	1,7	0,2	1,4	1,2	7
	<i>Daphnia obtusa</i>	9,4	12,2	10	29,4	0,72
Especies nativas (UCT)	<i>Quironomido sp</i>	24,7	8,4	9,1	136	122
	<i>Meridiaralis sp</i>	3	0,39	4,3	0,5	63,7
	<i>Acanthocyclops vernalis</i>	0,066	0,036	0,0042	0,0012	0,0039
	<i>Daphnia ambigua</i>			5,5	3,3	0,9
	<i>Chlorella sp</i>	7,2	2,6	1,2	1,4	0,9
	<i>Galaxias maculatus</i>					7,9

En la tabla anterior se observa que al contrastar los valores de Lc₅₀ (mg/l) de la literatura con los ensayos desarrollados, en especies estandarizadas se infiere que en su mayoría están dentro de los rangos establecidos, además es posible observar que dentro de los 3 grupos de especies estandarizadas evaluados, la especie *Daphnia obtusa* posee una mayor tolerancia a la toxicidad (Lc₅₀ Al= 9,4 mg/l, Lc₅₀ Cu= 12,2 mg/l, Lc₅₀ Fe= 10 mg/l y Lc₅₀ Mn=29,4 mg/l).

A partir de los ensayos realizados con especies nativas, se observa que *Daphnia ambigua* muestra mayor tolerancia a la toxicidad que la especie de microalga analizada (*Chlorella sp.*), similar a lo observado entre especies estandarizadas (Lc₅₀ *Daphnia obtusa* > Lc₅₀ *Selenastrum capricornutum*).

En cuanto a las especies de microalgas analizadas, se ha determinado que para los metales Al, Cu y Mn la especie nativa (*Chlorella sp.*) muestra mayor tolerancia a la toxicidad que la especie estandarizada en estudio (*Selenastrum capricornutum*).

Al considerar ambas especies del género *Daphnia*, se observa que para Fe y Mn, la especie nativa (*D. ambigua*) muestra mayor sensibilidad que la especie estandarizada (*D. obtusa*).

Además se observa que para las especies *O. mykiss* y *D. obtusa* la mayor toxicidad es aportada por Zn y la mayor resistencia se da a la exposición de Mn. Sin embargo en el caso de la microalga *Selenastrum capricornutum* el menor valor de toxicidad está dado por Zinc.



002500
002500

Respecto a la comparación de los 4 grupos estudiados de especies nativas aquella que presenta una mayor sensibilidad a la toxicidad de los metales evaluados corresponde a la especie *Acanthocyclops vernalis* y la mayor tolerancia está representada por la especie *Quironomido sp.*

En el caso de *Chorella sp.* la mayor toxicidad es registrada con Zinc situación que se repite con la especie *Daphnia ambigua.*

Se destaca que para metales como Zinc y Manganeso, los Quironomidos muestra mayor resistencia en comparación con los restantes metales.

Respecto a la especie *Acanthocyclops vernalis* el metal más nocivo corresponde a Manganeso y metal con menor efecto esta dado por Aluminio.



4.3 CARACTERIZACIÓN DEL RIESGO SOBRE LA BASE DE LA INFORMACIÓN OBTENIDA DE LOS BIOENSAYOS DE LAS ESPECIES LOCALES, ESTANDARIZADAS Y LA DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES DE SEGURIDAD PARA LA PROTECCIÓN DE ESPECIES LOCALES.

La determinación de valores de protección ambiental y aplicación de Evaluación de Riesgo Ecológico se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Medina & Encina (2004) que incluye las siguientes etapas: a) Identificación del peligro: etapa en la cual se formula el problema y se identifican las características de la sustancia y sus potenciales efectos, además se identifican los componentes del ecosistema expuesto y aquello que se debe proteger; b) Evaluación del Efecto donde se determina la concentración sin efecto ecológico (PNEC), para lo cual se utilizaron las bases de datos con valores de toxicidad para especies estandarizadas; c) Evaluación de la exposición, etapa en la cual se mide o estima la concentración ambiental esperada (PEC), para la evaluación de la exposición (PEC) se utilizaron los antecedentes recopilados de bases de datos disponibles; d) Caracterización del riesgo, etapa en la cual se integran los tres pasos anteriores y calcula el riesgo implicado. De acuerdo al nivel de información se calcula la probabilidad de que los efectos ocurran por la presencia actual o futura del contaminante. De esta forma, los valores de protección y factores de seguridad se calcularon mediante dos metodologías, una determinística (la concentración más baja en la cual hay efectos sobre las especies más sensibles) y otra probabilística, incorporando todos los resultados de sensibilidad, mediante una modificación de método de van Straalen y Denneman (1989) calculando la relación entre la concentración ambiental y el % de protección de especies de la comunidad.

4.3.1 DETERMINACIÓN DE CRITERIOS DE CALIDAD PARA LA PROTECCIÓN DE ESPECIES LOCALES.

Exposición.

La primera fase de la evaluación de riesgo incluye la caracterización de la exposición, o sea de las concentraciones a las cuales son expuestas las entidades ecológicas. En este sentido, es necesario establecer que las características de presión de uso sobre la calidad de aguas del río Valdivia (UCT, 2009) son básicamente agrícolas, forestales y en menor grado industriales, lo cual permite establecer que la calidad actual de sus aguas corresponden a la calidad de fondo o background natural. Es necesario establecer que



la mayor parte de los registros de metales corresponden a concentraciones totales con una gran frecuencia de datos bajo el límite de detección Tabla 26, lo que indica una baja sensibilidad en las técnicas analíticas utilizadas.

Tabla 29. Porcentaje de datos bajo el límite de detección para la estimación de exposición de percentiles de exposición para metales Al, Cu, Fe, Mn y Zn.

Elemento	Unidad	Nº de datos	Nº de datos bajo límite de detección	Porcentaje	Nº de datos válidos
Al	mg/L	291	165	56.7	456
Cu	mg/L	334	233	69.8	567
Fe	mg/L	253	4	1.6	257
Fe. Dis	mg/L	121	5	4.1	126
Mn	mg/L	315	125	39.7	440
Zn	mg/L	214	68	31.8	282

De las estaciones en las cuales hay registros de los metales considerados en este estudio, son seis las estaciones que presentan características comparables. En la Figura 38, se muestra el perfil de medias de Conductividad de las estaciones en la Cuenca del río Cruces, en donde se puede observar que desde la estación 11 a la 17 está claramente influenciada por las mareas.

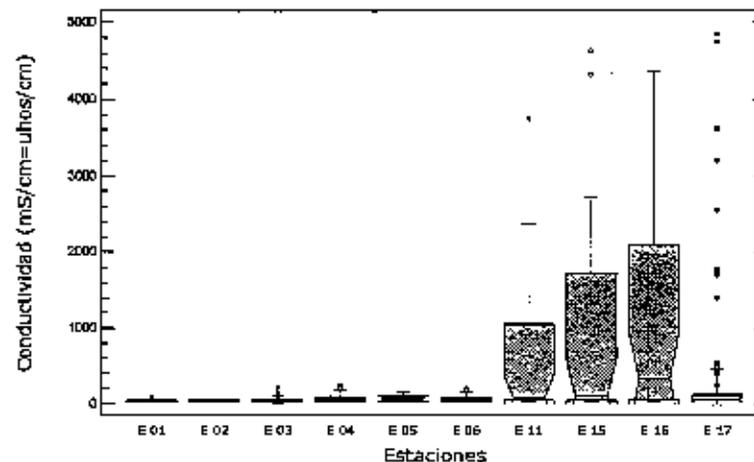


Figura 38. Perfil de medias de Conductividad de las estaciones Cuenca río Cruces.

En la Tabla 27, se muestran los percentiles calculados para las concentraciones de los metales en las estaciones 1 a la 6 en el río Cruces.



Tabla 30. Resumen de los percentiles para las concentración de Al, Cu, Fe, Mn y Zn Informe UCT (2009).

Estación	Elemento	Unidad	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E1 Celco 1	Al	mg/L	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,09	0,21	0,34	0,06
E2 Cruces ante boca toma Celco	Al	mg/L	0,26	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,34	0,46	0,58	0,70	0,30	0,40
E 3 cruces en rucaco	Al	mg/L	0,10	0,10	0,20	0,20	0,30	0,30	0,40	0,59	0,80	1,00	0,40	0,50
E4 Celco 2	Al	mg/L	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,17	0,60	0,06	0,06
E5 Cruces en Cahuincura	Al	mg/L	0,26	0,30	0,30	0,30	0,30	0,42	0,54	0,66	0,74	0,80	0,49	0,60
E6 Celco 3	Al	mg/L	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,12	0,46	0,06	0,06

Estación	Elemento	Unidad	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E1 Celco 1	Cu	mg/L	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,05	0,01	0,01
E2 Cruces ante boca toma Celco	Cu	mg/L	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01
E 3 cruces en rucaco	Cu	mg/L	0,001	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,16	0,01	0,01
E4 Celco 2	Cu	mg/L	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,05	0,01	0,01
E5 Cruces en Cahuincura	Cu	mg/L	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02
E6 Celco 3	Cu	mg/L	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,05	0,01	0,01

Estación	Elemento	Unidad	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E1 Celco 1	Fe	mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E2 Cruces ante boca toma Celco	Fe	mg/L	0,19	0,20	0,22	0,31	0,34	0,34	0,34	0,53	0,73	0,92	0,34	0,42
E 3 cruces en rucaco	Fe	mg/L	0,10	0,16	0,26	0,31	0,36	0,39	0,46	0,58	0,74	1,20	0,43	0,49
E4 Celco 2	Fe	mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E5 Cruces en Cahuincura	Fe	mg/L	0,14	0,17	0,19	0,22	0,28	0,35	0,42	0,57	0,91	1,46	0,39	0,49
E6 Celco 3	Fe	mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Estación	Elemento	Unidad	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E1 Celco 1	Fe. Dis	mg/L	0,04	0,04	0,05	0,06	0,07	0,11	0,14	0,17	0,28	0,40	0,13	0,15
E2 Cruces ante boca toma Celco	Fe. Dis	mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E 3 cruces en rucaco	Fe. Dis	mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E4 Celco 2	Fe. Dis	mg/L	0,05	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,10	0,16	0,23	0,46	0,09	0,12
E5 Cruces en Cahuincura	Fe. Dis	mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E6 Celco 3	Fe. Dis	mg/L	0,05	0,06	0,07	0,09	0,11	0,12	0,14	0,19	0,26	0,53	0,13	0,14



Estación	Elemento	Unidad	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
E1 Celco 1	Mn	mg/L	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02
E2 Cruces ante boca toma Celco	Mn	mg/L	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,04	0,06	0,09	0,03	0,03
E 3 cruces en rucaco	Mn	mg/L	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,03	0,04	0,04	0,06	0,12	0,03	0,04
E4 Celco 2	Mn	mg/L	0,003	0,004	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,04	0,02	0,02
E5 Cruces en Cahuincura	Mn	mg/L	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,04	0,07	0,14	0,03	0,03
E6 Celco 3	Mn	mg/L	0,003	0,004	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,05	0,02	0,02

Estación	Elemento	Unidad	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
E1 Celco 1	Zn	mg/L	0,001	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,01	0,01	0,01	0,05	0,01	0,01
E2 Cruces ante boca toma Celco	Zn	mg/L	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,03	0,04	0,05	0,03	0,03
E 3 cruces en rucaco	Zn	mg/L	0,001	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	0,01	0,01
E4 Celco 2	Zn	mg/L	0,001	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,02	0,05	0,005	0,01
E5 Cruces en Cahuincura	Zn	mg/L	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01
E6 Celco 3	Zn	mg/L	0,001	0,001	0,002	0,002	0,004	0,004	0,01	0,01	0,03	0,06	0,01	0,01

Los valores de LC_{50} estimados a partir de los ensayos de metales sobre las especies locales y/o nativas fueron realizados con la fracción disuelta (biodisponible) a partir de la disolución de sus sales (sulfato aluminio $Al_2(SO_4)_3$, cloruro de cobre ($CuCl_2$), cloruro de fierro ($FeCl_3$), Cloruro de manganeso ($MnCl_2$), cloruro de zinc ($ZnCl_2$)). Para extrapolar estos resultados a la fracción total, se calcularon los factores de corrección (fracción disuelta/fracción total) a partir de las series de muestreos realizados en el río Cruces por UACH (2008) en el estudio "Recopilación y análisis de información en apoyo para la elaboración del anteproyecto de la norma secundaria de calidad ambiental para la protección de las aguas de la cuenca del río Valdivia" (Tabla 28).

Tabla 31. Relación Metales Disueltos y Metales Totales (porcentual).

Elemento	Disueltos	Totales	Relación (%)
Cobre	18.1	4.3	7.7
Cromo	83.3	83.3	83.3
Cadmio	3.1	1.2	15.8
Cobalto	16.5	3.1	3.0
Cinc	41.5	33.3	33.3
Total			12.0
			83.3*
			15.9
			7.0
			35.0

En el caso particular del cobre, la relación estimada está afectada por un alto número de mediciones bajo el límite de detección tanto para los metales disueltos como totales. En base al análisis efectuado por UCT (2009), se estableció que para todas las estaciones de



calidad de agua en estudio, existe una alta correlación entre las concentraciones de Aluminio y Hierro (Valor Coeficiente de Pearson=0,979), por tanto las el factor propuesto para transformar los valores e protección estimados a partir de los LC₅₀ a concentración de metales totales se muestran en la Tabla 29.

Tabla 32. Resumen relación Metales Disueltos y Metales Totales (porcentual).

Elemento	Porcentaje
Aluminio	12.0
Cadmio	12.0*
Cromo	15.9
Cobalto	7.0
Cupero	35.0

EFFECTOS.

La estimación de la concentración de no efecto (PNEC), se realizó utilizando los resultados de los bioensayos de toxicidad aguda mostrados en la Tabla 24, para lo cual se calcularon las ecuaciones que relacionaban los percentiles y LC₅₀. El nivel de protección propuesto para ser utilizado en el anteproyecto de Norma Secundaria de Calidad Ambiental para la protección de la biota de las aguas del río Valdivia, se realizó estimando los concentraciones de no efecto (PNEC) considerando su variabilidad mediante estimación de los percentiles y utilizando un factor de evaluación de 50 y 100 (OECD, 1992; SETAC, 2010), de tal forma que el valor recomendado corresponde al valor de la PNEC que protege el 70% de las poblaciones expuestas. Los valores fueron ajustados de acuerdo a la Tabla 28. Los resultados para cada uno de los metales considerados se muestran en las Tablas siguientes:



Tabla 33. Concentraciones de No Efecto (PNEC) y porcentajes (%) de especies protegidas para Aluminio. Se considera un Factor de seguridad de 50 y de 100 de acuerdo a lo recomendación de OECD.

	0.04	0.01	0.00
	0.14	0.02	0.01
	0.38	0.06	0.03
	2.86	0.48	0.24
	3.20	0.53	0.27
	5.38	0.89	0.45
	6.80	1.13	0.57
	9.70	1.61	0.81
	16.82	2.80	1.40
	25.70	4.27	2.14

Tabla 34. Concentraciones de No Efecto (PNEC) y porcentajes (%) de especies protegidas para Cobre. Se considera un Factor de seguridad de 50 y de 100 de acuerdo a lo recomendación de OECD.

	0.00	0.001	0.000
	0.03	0.005	0.002
	0.08	0.013	0.007
	0.20	0.032	0.016
	0.21	0.034	0.017
	0.26	0.04	0.021
	0.37	0.06	0.030
	0.80	0.13	0.065
	2.80	0.45	0.226
	8.40	1.35	0.677



Tabla 35. Concentraciones de No Efecto (PNEC) y porcentajes (%) de especies protegidas para Hierro. Se considera un Factor de seguridad de 50 y de 100 de acuerdo a lo recomendación de OECD.

Especie	Factor de seguridad		
	50	100	1000
	0.03	0.00	0.00
	0.6	0.08	0.04
	1.7	0.22	0.11
	3.8	0.47	0.24
	5.2	1.65	0.32
	6.1	1.76	0.38
	6.7	1.83	0.42
	8.6	1.08	1.54
	10.1	1.27	0.63
	15.8	1.98	0.99

Tabla 36. Concentraciones de No Efecto (PNEC) y porcentajes (%) de especies protegidas para Manganeso. Se considera un Factor de seguridad de 50 y de 100 de acuerdo a lo recomendación de OECD.

Especie	Factor de seguridad		
	50	100	1000
	0.5	0.14	0.07
	0.6	0.16	0.08
	1.2	0.34	0.17
	3.3	0.94	0.47
	4.7	1.34	0.67
	5.0	1.42	0.71
	6.2	1.76	0.88
	9.4	2.67	1.34
	22.0	6.25	3.13
	127.6	36.3	18.1



Tabla 37. Concentraciones de No Efecto (PNEC) y porcentajes (%) de especies protegidas para Zinc. Se considera un Factor de seguridad de 50 y de 100 de acuerdo a la recomendación de OECD.

Porcentaje	Factor de Seguridad	PNEC (µg/L)	Porcentaje (%)
0.03	50	0.002	0.001
0.12	50	0.007	0.003
0.13	100	0.01	0.004
0.98	50	0.056	0.026
1.60	50	0.092	0.046
1.60	100	0.092	0.05
2.19	50	0.125	0.06
4.20	50	0.240	0.12
7.00	50	0.400	0.20
118.10	50	6.754	3.38

(1) ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (1992) Report of the OECD Workshop on the extrapolation of laboratory aquatic toxicology data to the real environment. OECD Monograph 59. Paris, France.

Estos valores son coherentes con los propuestos en otras normativas (Tabla 35)

Tabla 38. Criterios de calidad de Aguas para la protección acuática (National Recommended Water Quality Criteria EPA-822-R-02-047, 2002).

Elemento	CMC (µg/L)	CCC (µg/L)	Factor de Seguridad	Porcentaje (%)
Cu	0.013	0,75	0,087	0.00149
Fe	0.0019	0,013	0,009	0.00045
Mn	0.0031	0.032	0,0025	1.37
Zn	0.028			0.8
	0.008	0,12	0,12	0.0125

*(CMC) Criteria Maximum Concentration and CCC Criterion Continuous Concentration

Lo valores estimados para Cu, Fe, Mn con bioensayos nativos presentan similares niveles de protección que los propuestos la UCT (2009) (Tabla 36)



Tabla 39. Valores propuestos por UCT (2009) considerando especies estandarizadas y un Factor de seguridad de 100.

ES	ES	ES	ES	ES	Zo
100	0.100	0.002	0.004	0.016	0.011

En resumen en la Tabla 37, se muestra los valores propuestos para ser aplicados en la norma del Santuario del Río Cruces basado en una aproximación de validación de riesgo probabilística considerando la variabilidad en la sensibilidad de especies nativas.

Tabla 40. Resumen de los límites propuestos para norma del Santuario del Río Cruces basado en un enfoque de evaluación de riesgo probabilístico.

Categoría	Límites Propuestos	
	ES	Zo
ES	0.22	0.11
ES	0.031	0.016
ES	0.39	0.20
ES	0.80	0.40
ES	0.046	0.023

El fundamento teórico de la aplicación de un análisis probabilístico para la estimación de valores de protección, se basa en que una comunidad biológica natural cualquiera, los valores de un cierto "end point" toxicológico (LC50, NOEC, etc.) para las diversas especies, son independientes entre ellas y representan una estimación de la sensibilidad. Con varias de estas estimaciones es posible evaluar la variabilidad de la sensibilidad de todas las especies de la comunidad, la que también presenta una distribución simétrica. De este modo, la sensibilidad de las diferentes especies frente a la exposición a un tóxico (variabilidad interespecífica) está distribuida de forma análoga a la sensibilidad de los diversos individuos de una misma especie (variabilidad interespecífica).



V. CONCLUSIONES.

- Se realizaron ensayos ecotoxicológicos agudos con cinco metales (Al, Cu Fe, Mn y Zn) utilizando 11 especies del río Cruces: *Chlorella sp.*, *Scenedesmus quadricauda*, *Daphnia ambigua*, *Simocephalus sp.*, *Acanthocyclops vernalis*, *Simosa sp.*, *Skistodiaptomus diabolicus*, *Meridialaris sp.*, *Paratanytarsus grimmii*, *Galaxias maculatus*, *Oncorhynchus mykiss* y *Myriophyllum sp.*
- Se realizaron ensayos ecotoxicológico agudos con cinco metales (Al, Cu Fe, Mn y Zn) utilizando tres especies estandarizadas: *Selenastrum capricornutum*, *Daphnia obtusa*, *Oncorhynchus mykiss*
- De las 9 de las especies locales fueron colectadas, asiladas y cultivadas en laboratorio: *Chlorella sp.*, *Scenedesmus quadricauda*, *Daphnia ambigua*, *Simocephalus sp.*, *Acanthocyclops vernalis*, *Simosa sp.*, *Skistodiaptomus diabolicus* y *Paratanytarsus grimmii*
- Se estableció un protocolo de cultivo captura y cultivo estandarizado del Chironomido *Paratanytarsus grimmii*
- Los resultados de los LC₅₀ para los metales en su estado disuelto mostraron la siguiente distribución probabilística:

	0.04	0	0.03	0.5	0.03
	0.14	0.03	0.6	0.6	0.12
	0.38	0.08	1.7	1.2	0.13
	1.3	0.19	3.1	2.8	0.8
	2.86	0.2	3.8	3.3	0.98
	3.2	0.21	5.2	4.7	1.6
	5.38	0.26	6.1	5	1.6
	6.8	0.37	6.7	6.2	2.19
	9.7	0.8	8.6	9.4	4.2
	16.82	2.8	10.1	22	7
	25.7	8.4	15.8	127.6	118.1



- Los resultados preliminares permiten establecer como LOEC en general efectos significativos (LOEC) sobre la actividad fotosintética (*Myriophyllum sp.*) en relación al control para Al 2 mg/l; Fe de 2 mg/l; Mn 5 mg/l y Zn 5 mg/l.
- Las especies locales presentaron en promedio una mayor resistencia que las especies estandarizadas, considerando las bases de datos internacionales.
- Dado que la Norma Secundaria (NSCA) regulará metales totales, se estimaron los factores de conversión de metales disueltos a totales en función de los estudios disponibles en el río cruces y son los siguientes: 0.12 para Al; 0.12 para Cu; 0.159 para Fe; 0.07 para Mn y 0.35 para Zn.
- Para estimar los valores de valores de No efecto (PNEC) y de acuerdo a las recomendaciones de la OECD se consideraron valores de seguridad de 50 y 100.
- Los valores estimados de PNEC para factores de seguridad de 50 y 100 que protegen sobre el 70% de las especies expuestas fueron los siguientes:

Metal	PNEC (mg/l)									
	0.01	0	0	0.001	0	0	0.14	0.07	0.002	0.001
	0.02	0.01	0.03	0.005	0.08	0.04	0.16	0.08	0.007	0.003
	0.06	0.03	0.08	0.013	0.22	0.11	0.34	0.17	0.01	0.004
	0.48	0.24	0.2	0.032	0.47	0.24	0.94	0.47	0.056	0.026
	0.53	0.27	0.21	0.034	0.65	0.32	1.34	0.67	0.092	0.046
	0.89	0.45	0.26	0.04	0.76	0.38	1.42	0.71	0.092	0.05
	1.13	0.57	0.37	0.06	0.83	0.42	1.76	0.88	0.125	0.06
	1.61	0.81	0.8	0.13	1.08	0.54	2.67	1.34	0.24	0.12
	2.8	1.4	2.8	0.45	1.27	0.63	6.25	3.13	0.4	0.2
	4.27	2.14	8.4	1.35	1.98	0.99	36.3	18.1	6.754	3.38

- El análisis probabilístico para la estimación de valores de protección, se basa en que una comunidad biológica natural cualquiera, los valores de un cierto "end point" toxicológico (LC50, NOEC, etc.) para las diversas especies, son independientes entre ellas y representan una estimación de la sensibilidad del ecosistema.



VI. RECOMENDACIONES.

La implementación de la evaluación de riesgo ecológico es un imperativo para cumplir con algunos acuerdos internacionales suscrito por Chile, que establecen la obligatoriedad de evaluar el riesgo frente a determinados xenobióticos (e.g. Convenio de Estocolmo). Por otro lado esta metodología ha sido establecida como obligatoria en la Comunidad Europea y EEUU en la autorización de nuevos productos, en el proceso de evaluación de impactos ambientales, control de efluentes y elaboración de normas de calidad ambiental. En el caso normativo, esta metodología permite la determinación de los valores aceptables para la biota de las normas secundarias, particularmente sensibles hoy al determinar los parámetros significativos del estudio de norma de las cuencas prioritarias, entre ellas la del río Cruces. No obstante el desarrollo a nivel mundial de metodologías estandarizadas de evaluación de riesgo, en Chile su aplicación es incipiente ya que depende de modificaciones legales y la preparación de cuadros técnicos, pero fundamentalmente del desarrollo de un marco científico que permita:

- a) Desarrollar y mantener los cultivos de especies nativas ya establecidos en diferentes partes del país.
- b) Realización de ensayos con una alta confiabilidad, la sensibilidad y variabilidad de la respuesta de especies con relevancia ecológica frente a determinados xenobióticos, para lo cual es necesario realizar un mayor número de ensayos para los diferentes sistemas lóticos y lénticos del país, realizar ensayos agudos y crónicos que permitan aumentar la confiabilidad de los resultados disminuyendo los factores de seguridad utilizados.
- c) Establecer una base de datos de valores de LC50 y NOEC.
- d) Financiamiento y desarrollo de una base ecológica para interpretar los efectos observados y su relación con los impactos adversos a niveles de organización superior en los sistemas ecológicos de interés.
- e) En el plan de vigilancia, es necesario medir adicionalmente las concentraciones de metales disueltos, ya que estos están biodisponibles e interaccionan con las entidades biológicas.



- f) Por medio de este estudio se aislaron especies locales y se implementaron cultivos de: *Selenastrum capricornutum*, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus quadricauda*, *Daphnia obtusa*, *Daphnia ambigua*, *Simocephalus sp.*, *Simosa sp.*, *Acanthocyclops vernalis* y *Skistodiaptomus diabolicus*. Lo anterior es un gran avance puesto que a nivel nacional no se cuenta con cultivos de especies locales, la mantención de este material genético y ecotoxicológico y relevante experiencia adquirida permitirá el desarrollo de nuevos estudios y otras normas que contemplen de igual forma las características y respuestas de especies locales, permitiendo la protección de estos ecosistemas en su conjunto. Por tanto, este proyecto configura el primer avance para el desarrollo a futuro de normativas nacionales que contemplen las características propias de los ecosistemas y especies locales, conduciendo a la protección efectiva de los sistemas acuáticos, fin último de las Normas Secundarias de Calidad de Aguas.



VII. BIBLIOGRAFÍA.

- Alexander M, Merritt R & M Berg (1997). New strategies for the control of the parthenogenetic chironomid (*Paratanytarsus grimmii*) (Diptera: Chironomidae) infecting water systems. *Journal of the American Mosquito Association*.13(2):189-192.
- Alonso M (1996). Crustacea, Branchiopoda. En: Fauna Ibérica, vol. 7. Ramos M (Eds). Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. Madrid. 486 pp.
- Azpiroz R (1984). Relación entre la morfología y el contenido protéico de *Scenedesmus quadricauda* como respuesta a la concentración de nitrógeno y fósforo en el medio.
- Bayly I (1992). Fusion of the genera *Boeckella* and *Pseudoboeckella* (Copepoda) and revision of their species from South America *Revista Chilena de Historia Natural, Santiago de Chile* 65:17-63, 25 figs.
- Braioni M & D Gelmini (1983). *Guide il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane. Rotiferi Monogononti*. Consiglio Nazionale delle Ricerche, Italy, 181 pp.
- Campos H (1970). *G. maculatus* (Jenyns 1984) en Chile, con especial referencia a su reproducción. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural. Santiago- Chile* 31:5-20.
- Cifuentes A, Silva J, Bay-Schmith E & A Larraín (1998). "Selección de cepas de microalgas para ser utilizadas en bioensayos de toxicidad" *Gayana Oceanol.* 6(1-2):1-9.
- Colbourne, J & P Hebert (1996). The systematics of North American *Daphnia* (Crustacea: Anomopoda): a molecular phylogenetic approach. *Trans. Roy Soc. Ser. B.* 351:349-360.
- Cranston P (1995). Biogeography. En: Armitage, P., P. S. Cranston & L. C. Pinder (eds.). *The Chironomidae. The biology and ecology of non-biting midges*. Chapman & Hall, London, pp. 62-8.
- De Manuel J (2000). The rotifers of Spanish reservoirs: ecological, systematical and zoogeographical remarks. *Limnetica*, 19: 91-167.
- Décamps H & R Naiman (1991). La ecología de los ríos. *Revista el Mundo Científico* 9: 470-479.
- Domínguez P & L Zúñiga (1976). Análisis fenológico de los cladóceros limnéticos de la Laguna El Plateado (Valparaíso). *An. Mus. Hist. Nat. Valparaíso*, 9: 35-44.
- Domínguez E, Hubbard M & M Pescador (1994). Los Ephemeroptera en Argentina. Serie: Fauna de agua dulce de la república de Argentina. *Insecta:Ephemeroptera*. Vol.33(1): 141 pp.
- Domínguez E, Molineri C, Pescador M, Hubbard M & C Nieto (2006). Aquatic Biodiversity in Latin América: Ephemeroptera of South América. PENSOFIT, Sofia-Moscow, 646 pp.
- Dux J (1986). Handbook of Quality Assurance for the Analytical Chemistry Laboratory. Van Nostrand Reinhold Company, New York.



EPS (1990). Guidance Document on Control of Toxicity Test Precision Using Reference Toxicants. Environment Canada. Report EPS 1/RM/12.

Faculty of Sciences (2000). Volume 8 N° 2, May-August 2000 CIENCIA 8(2), 127-136, Maracaibo, Venezuela.

Figueroa R, Valdovinos C, Araya E & O Parra (2003). Macroinvertebrados bentónicos como indicadores de calidad de agua de ríos del sur de Chile. Revista Chilena de Historia Natural, 76:275-285.

Figueroa R (2004). Calidad ambiental de la cuenca hidrográfica del río Chillán, VIII Región, Chile, Tesis Merritt R & K Cummins (1978). An introduction to the aquatic insects of North America. Kendall/Hunt Publishing Company, Iowa, 320 pp.

Fogg G (1977). ALGAL cultures and phytoplankton ecology. Second Edition. The University of Wisconsin Press. 126 p.

Goldman J (1980). Physiological aspects in algal mass culture. En: Algae Biomass: Production and use. G. Shelefand C., Soeder (eds) 343-360.

Hegewald E & Silva P (1988). Annotated catalogue of *Scenedesmus* and nomenclaturally related genera, including original descriptions and figures. *Bibliotheca Phycologica*, 80, 1-587.

Hegewald E & Silva P (1988). Annotated catalogue of *Scenedesmus* and nomenclaturally related genera, including original descriptions and figures. *Bibliotheca Phycologica*, 80, 1-587.

Komarek J & V Jankovska (2001). Review of the Green Algal Genus *Pediastrum*: Implications for Pollen-analytical Research. *Bibliotheca Phycologica*, 108. 127 pp.

Hugo O (1990). Contribución a la palinología estratigráfica de la formación de Malargüe, Cretácico Superior, sur de la Provincia de Mendoza, Argentina. Parte 1: Especies terrestres y de aguas continentales. AMEGHINIANA (Revista Asociación Paleontológica Argentina) 27 (3-4): 289-303.

Laing I & F Ayala (1990). Introduction to Applied Phycology (Ed. Akatsuka) Volumen 1, SPB Academic Publishing Bv, The Hague. 447-477 p.

Larrain A (1995). Criterios ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: Importancia de los Bioensayos de Toxicidad. Revista Ciencia y Tecnología del Mar. Cona (N° Especial):39-47.

Larrain A, Soto E & E Bay-Schmith (1998). Assessment of sediment toxicity in San Vicente Bay, Central Chile, using the amphipod *Ampelisca araucana*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 61:363-369.

Larrain A, Soto E, Silva J & E Bay-Schmith (1998). Sensitivity of the meiofaunal Copepod *Tisbe longicornis* to $K_2Cr_2O_7$ under varying temperature regimes. . Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 61:391-396.



Larrain A, Riveros A, Silva J & E Bay-Schmith (1999). Toxicity of Metals and Pesticides Using the Sperm Cell Bioassay with the Sea Urchin *Arbacia spatuligera* Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 62:749-757.

Langton P, Cranston P & P Armitage (1998). The parthenogenetic midge of water supply systems, *Paratanytarsus grimmii* (Schneider) (Diptera: Chironomidae). Bul. Ent. Res; 78: 317-328

Lemly, A.D. and Hildebrand, R.H. (2000). Influence of large woody debris on stream insect communities and benthic detritus. *Hydrobiologia*. 421,179-185.

Margalef R, Planas D, Armengol J, Vidal A, Prat N, Guiset A, Toja J & M Estrada (1976). *Limnología de los embalses españoles*. Dirección General de Obras Hidráulicas. Ministerio de Obras Públicas. Madrid. 422 pp.

Mancilla A (2004). Estudios del ciclo de vida y parámetros reproductivos del puye (*Galaxias maculatus*), en condiciones de cultivo experimental. Tesis de Grado presentada a la Facultad de Ingeniería de la Universidad Católica de Temuco para optar al grado de Licenciado en Ciencias de la Acuicultura.

Minshall, G.W. (1988). Stream ecosystem theory: a global perspective. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 7(4):263-288.

Murray D, Hughes S, Furse M & W Murray (2004). New records of Chironomidae (Diptera: Insecta) from the Azores, Macaronesia. *Ann. Limnol. Int. J. Lim.* 40 (1):33-42.

Naselli-Flores L & R Barona (2000). Phytoplankton dynamics and structure: a comparative analysis in natural and man-made water bodies of different trophic state. *Hydrobiologia*, 438: 65-74.

Nogrady T, Wallace R & T Snell (1993). Rotifera. Biology, Ecology and Systematics. 142 p. En Dumont, H. (Ed) *Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World*. SPB. Academic Publishing bv.

OECD (1992). Report of the OECD Workshop on the extrapolation of laboratory aquatic toxicology data to the real environment. OECD Monograph 59. Paris, France.

Parra O, M González, V Dellarossa, P Rivera & M Orellana (1982-1983). Manual Taxonómico del Fitoplancton de Aguas Continentales; con especial referencia al fitoplancton de Chile. Editorial de la Universidad de Concepción Vol. 1, Cyanophyceae, 1982; Vol. 2, Chrysophyceae-Xanthophyceae, 1982; Vol. 3, Cryptophyceae, Dinophyceae y Euglenophyceae, 1982 ; Vol. 4, Bacillariophyceae, 1982; Vol. 5 (partes 1 y 2), Chlorophyceae, 1983.

Pezzato & Monteiro (2004). Photosynthetic Rate of the Aquatic Macrophyte *Egeriadsena Planch.* (Hydrocharitaceae) in Two Rivers from the Itanhaém River Basin in São Paulo State, Brazil. *BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY* Vol.47, n. 1 : pp. 153-162.

Piscart, C., Moreteau, J.C., Beisel, J.N. (2005). Biodiversity and structure of macroinvertebrate communities along a small permanent salinity gradient (Meurthe River, France). *Hydrobiologia*. 551,227-236



- Reisen, W.K., Prins, R. (1972). Some ecological relationship of the invertebrate drift in Praters Creek, Pickens County, South Carolina. *Ecology*. 53(5), 876-884
- Ringuelet R (1958). Los crustáceos Copépodos de las Aguas Continentales en la República Argentina. Sinopsis Sistemática. Contribuciones Científicas, Universidad de Buenos Aires, Serie Zoología, 1(2):1 - 126.
- Romero T (2009). Desarrollo de *Moina* sp. en condiciones de laboratorio alimentada con microalgas cultivadas en residuales pesqueros. *Revista electrónica de veterinaria*. Vol 10(4): 1-13.
- Rosenberg & Palma (2003). Cladóceros de los fiordos y canales patagónicos localizados entre el golfo de Penas y el estrecho de Magallanes *Investig. mar.* v.31 n.1 Valparaíso.
- Ruiz R & N Bahamonde (1989). Cladóceros y copépodos límnicos en Chile y su distribución geográfica. Lista sistemática. Publicación Ocasional Nº 45, Museo Nacional de Historia Natural, Santiago. 48 pp.
- Segers H (2002). The nomenclature of the Rotifera: annotated checklist of valid family and genus group names. *J. Nat. Hist.* 36: 631-640.
- Servicio Agrícola y Ganadero (2001). Manual de métodos para el bioensayo de crecimiento de microalgas, Laboratorio de Ecotoxicología.
- Scheibler, E.E., Debandi, G.O. (2008). Spatial and temporal patterns in the aquatic insect community of a high altitude Andean stream (Mendoza, Argentina), *Aquatic Insect*. 30(2), 145-161
- Silva J, Troncoso L, Bay-Schmith E & A Larrain (2001). Utilization of *Odonthestes regia* (Atherinidae), from the South Eastern Pacific as a test organism for bioassays; study of its sensitivity to six chemicals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 66:570-575.
- Silva J, Torrejón G, Bay-Schmith E & A Larrain (2003). Calibración del bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia obtusa* (Crustacea: Cladocera) usando un tóxico de referencia. *Gayana* 67(1): 87-96.
- Silva J, Fuentealba C, Bay-Schmith E & A Larrain (2007). Estandarización del bioensayos de toxicidad aguda con *Diplodon chilensis* usando un tóxico de referencia. *Gayana* 71(2): 135-141.
- Soto E, Oyarce G, Inzunza B & E Bay-Schmith (2003). Acute toxicity of organic and inorganic compounds on the freshwater cyclopoid copepod *Eucyclops neumani neumani* (Pesta 1927). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70:1017-1021.
- Tadashi M, Mitsufumi M, Yoshiaki M, Hiroshi S, Reiko S & T Tsuyoshi (2009). Characterization of marine microalga, *Scenedesmus* sp. Strain JPCC GA0024 toward biofuel production. *Biotechnol Lett.* DOI 10.1007/s 10529-009-0029.
- Troncoso L, Galleguillos R & A Larrain (2000). Effects of copper on the fitness of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Mollusca: Bivalvia). *Hydrobiologia* 420: 185-189.



US EPA (1990). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organism. Fourth Edition. Report 600/4-90/027F.

Varela R (2005). Determinación del nivel de toxicidad aguda del fungicida Cardendazim y el Herbicida 2,4 D mediante bioensayos con *Galaxias maculatus*. Tesis de Grado presentada a la Facultad de Recursos Naturales de la Universidad Católica de Temuco para optar al grado de Licenciado en Recursos Naturales.

Vila I, Fuentes L & M Contreras (1999). Peces Límnicos de Chile. Boletín del Museo Nacional de Historia Natural, Chile, 48: 61-75.

Villalobos L (2006). Estado de conocimiento de los crustáceos zooplanctónicos dulceacuícolas de Chile. *Gayana* 10(1): 31-39.

Waters T.F. (1972). The drift of stream insects. *Ann. Rev. Entomol.* 17,253-272.

Zárate C (2004). Evaluación de riesgo ecotoxicológico, asociado al uso de plaguicidas y su impacto sobre especies acuáticas. Tesis de Grado presentada para optar al título de Ingeniero Ambiental, Departamento de Ingeniería Geográfica, Facultad de Ingeniería, Universidad de Santiago de Chile.

Zúñiga M, Vallejos P, Larrain A & E Bay-Schmith (2003). Toxicity of copper on four Chilean marine mussels. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 71:1167-1174.



VIII. ANEXOS.

Anexo 1. Base de Datos Recopilación de Información de Toxicidad.

Información disponible en CD adjunto en archivo BASE DE DATOS TOXCICIDAD Santuario de la Naturaleza.xls.

002510



ORD. : N° 14 /



ANT.: Ord. N° 0456 del 31 de agosto de 2010, de la SEREMI del Medio Ambiente, región de Los Ríos.

MAT.: Envía minuta del DCPRH N° 239 que evalúa factibilidad de utilizar datos de estación E3 Celulosa Arauco y Constitución en elaboración NSCA cuenca río Valdivia.

Santiago, 26 de enero de 2011.

DE: SRA. MESENIA ATENAS V.
JEFA DPTO. DE CONSERVACIÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE AGUAS

A: ANDRÉS IROUMÉ ARRAU
SEREMI DEL MEDIO AMBIENTE
REGIÓN DE LOS RÍOS

Por medio de la presente, se hace envío de Minuta N° 239 elaborada por el Departamento de Conservación y Protección de Recursos Hídricos de la Dirección General de Aguas, que responde a solicitud realizada por la Secretaria Regional Ministerial del Medio Ambiente, región de Los Ríos a través de Ord. N° 0456 del 31 de agosto de 2010, en relación a evaluar la factibilidad de incluir dentro de los antecedentes técnicos del proceso de elaboración de las Normas Secundarias de Calidad Ambiental para la Protección de las aguas de la cuencas del río Valdivia, la estación de monitoreo E3 de la base de datos del Programa de Monitoreo Ambiental de Celulosa Arauco y Constitución.

Saluda atentamente a usted,

MESENIA ATENAS VIVANCO
Ingeniero Jefe
Depto. Conservación y P.R.H
DIRECCIÓN GENERAL DE AGUAS

MAV/SMJ

DISTRIBUCIÓN:

- Destinatario.
- Depto. Conservación
- Depto. de Asuntos Hídricos, División de políticas y regulaciones. Subsecretaría de Medio Ambiente.
- Archivo

PROCESO N°4496002



MINISTERIO DE OBRAS PÚBLICAS
 DIRECCIÓN GENERAL DE AGUAS
 DEPTO. CONSERVACIÓN Y PROTECCIÓN DE RECURSOS HÍDRICOS
 PROCESO N° 4495787

MINUTA DCPRH N° 239 /

SANTIAGO,

MAT.: Evaluación de factibilidad de uso de base de datos (Estación 3) del programa de monitoreo ambiental de la Celulosa Arauco y Constitución en el proceso de elaboración de las NSCA de la cuenca del río Valdivia

1. OBJETIVO	2
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. DESCRIPCIÓN DE LA CUENCA DEL RÍO VALDIVIA	5
4. CRITERIOS PARA LA EVALUACIÓN DE LOS DATOS	6
4.1 REVISIÓN INICIAL DE DATOS.....	7
4.2 COMPARACIÓN DE DATOS ESTACIÓN DE CELCO VALDIVIA CON ESTACIÓN DE CALIDAD DE AGUAS DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE AGUAS (DGA).....	8
4.3 VERIFICACIÓN DE TRAZABILIDAD DE LOS DATOS ENTREGADOS POR EULA	13
4.4 VERIFICACIÓN DE LOS DATOS DIGITALES ENTREGADOS POR CELCO VALDIVIA.....	14
4.5 REVISIÓN FINAL DE DATOS.....	14
5. CONCLUSIÓN	15

1. Objetivo

Evaluar la factibilidad, de que los datos obtenidos por Celco Valdivia en el monitoreo de la estación 3 (E3), realizado por el centro EULA-Chile, puedan ser incluidos como antecedentes técnicos al proceso de elaboración de las NSCA de las cuenca del río Valdivia, según lo solicitado formalmente a la Dirección General de Aguas en el oficio N° 04596 del 31/08/2010.

2. Introducción

Celulosa Arauco y Constitución S.A planta Valdivia, es una instalación industrial para la fabricación de celulosa kraft blanqueada de pino radiata o eucalipto, ubicada en la comuna de Mariquina XIV Región de Los Ríos. Según el programa de monitoreo ambiental establecido en la Resolución de Calificación Ambiental (RCA N°279/98, posteriormente modificada), la empresa debe monitorear la calidad del agua del río Cruces (estaciones E1 y E2), como también el humedal (estación E3),

Según la Resolución de Calificación Ambiental, Celulosa Arauco planta Valdivia deberá cumplir durante su etapa de operación con un programa de monitoreo en las estaciones antes mencionadas, el cual abarca diferentes componentes ambientales como meteorología, hidrología, calidad del agua río Cruces y el humedal, calidad del efluente, aguas lluvias, calidad de agua sector depósito de residuos sólidos, calidad del aire, sedimentos, comunidades biológicas y suelos (tabla N°9.2 RCA 279/98¹), como así también considera diversas variables a analizar (parámetros físico-químicos) junto con la frecuencia establecida (tabla N°9.3 RCA 279/98¹).

A continuación en la tabla N°1 se muestra el componente ambiental denominado por Celco Valdivia como "calidad de agua del río Cruces y humedal", junto con las características específicas del monitoreo para la etapa de operación (RCA 279/98 tabla N°9.2).

¹ Resolución exenta N°279/98 Comisión Regional del Medio Ambiente, Décima Región de Los Lagos

COMPONENTE AMBIENTAL	VARIABLE AMBIENTAL	ESTACIONES MONITOREO	FRECUENCIA	ESPECIFICACIONES TECNICAS
Calidad de Agua del Rio Cruces y Humedal	Variables definidas en lista A Monitoreo (Tabla N°3)	- Aguas abajo Loncoche - Aguas abajo Lanco - Aguas arriba de la bocatoma. - 500 m. Aguas abajo del puente Rucaco - Al Ingreso al Humedal.	Trimestral.	Muestreos, tratamiento de muestras y análisis, según Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater
	Variables definidas en lista B Monitoreo (Tabla N°3)	- Aguas abajo Loncoche - Aguas abajo Lanco - Aguas arriba de la bocatoma. - 500 m. Aguas abajo del puente Rucaco - Al Ingreso al Humedal.	Mensual.	

A continuación en la tabla N°2 se muestran los parámetros a analizar en aguas, para la estación E3 Celco Valdivia (RCA 279/98 tabla N°9.3). El análisis de las muestras y muestreo, es realizado por el centro EULA-Chile de la Universidad de Concepción

VARIABLE	MONITOREO TRIMESTRAL Lista A	MONITOREO MENSUAL Lista B
Temperatura	X	X
Penetración de la luz	X	X
Color	X	X
Turbidez	X	
pH	X	X
Conductividad específica	X	X
Sodio	X	
Oxígeno disuelto	X	X
Oxígeno disuelto saturado	X	X
Demanda bioquímica de oxígeno	X	X
Demanda química de oxígeno	X	X

Cloruros	x	
Cloro libre residual	x	x
Cloratos	x	x
Sulfatos	x	
Fósforo soluble	x	x
Fósforo total	x	x
Nitratos	x	
Nitritos	x	
Amoníaco	x	
Nitrógeno orgánico	x	
Nitrógeno total	x	x
Sólidos filtrables org. E inorg.	x	x
Sólidos suspendidos	x	x
Sólidos sedimentables	x	x
Sólidos disueltos totales	x	x
Aluminio	x	x
Arsénico	x	
Bario	x	
Berilio	x	
Boro	x	
Cadmio	x	
Cobalto	x	
Cobre	x	
Cromo total	x	
Fierro	x	
Flúor	x	
Litio	x	
Manganeso	x	
Mercurio	x	
Molibdeno	x	
Níquel	x	
Plomo	x	
Selenio	x	
Vanadio	x	
Zinc	x	
Cianuro	x	
Comp. Org. Hal. Ads. (AOX)	x	x
Ácidos Resínicos	x	x
Ácidos Grasos	x	x
Clorofenoles	x	x
Pentaclorofenoles	x	x
Pesticidas organoclorados totales	x	x
Pesticidas totales	x	
Coliformes fecales	x	

3. Descripción de la cuenca del Río Valdivia

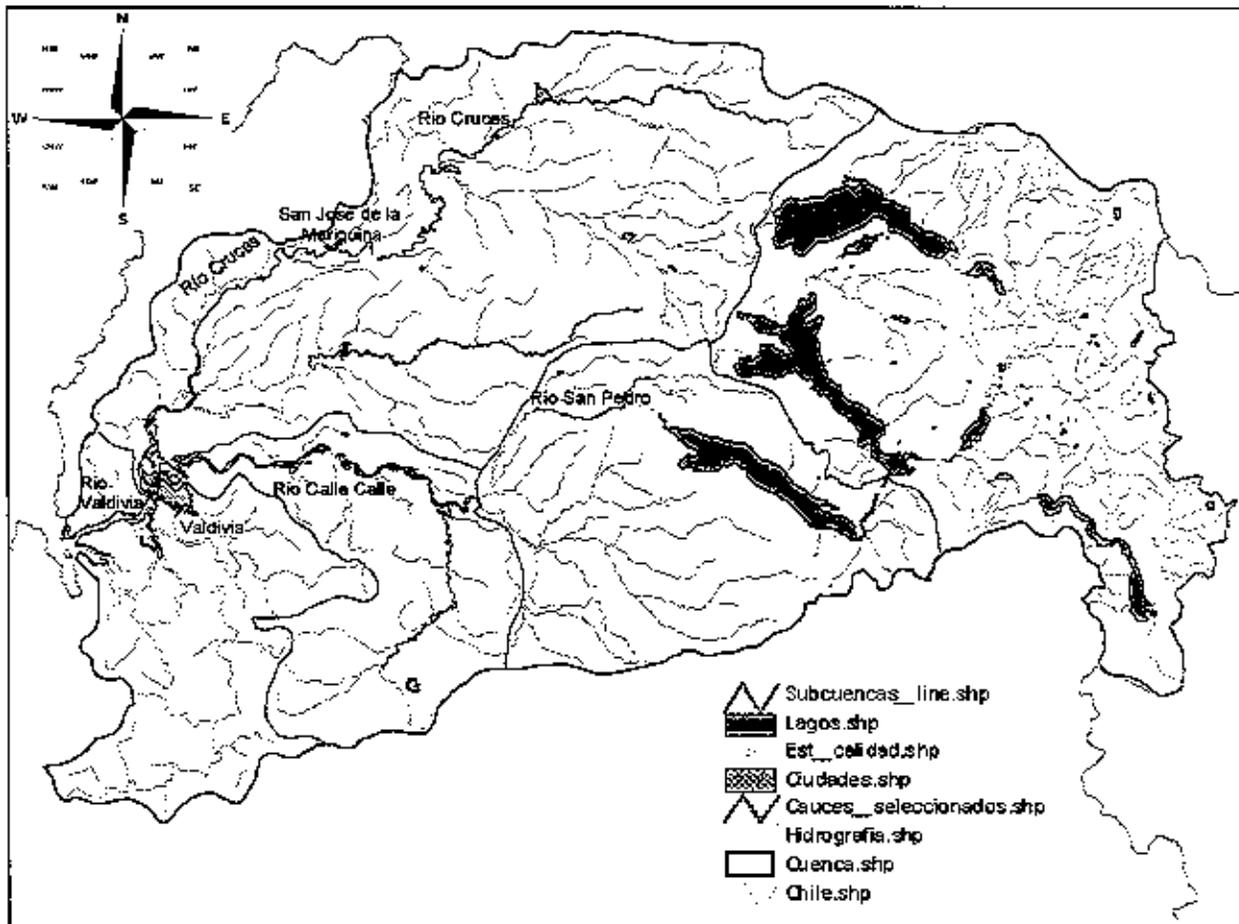
La cuenca del río Valdivia forma parte de la X región de Los Lagos, caracterizada fundamentalmente por contener en su curso alto una cadena de grandes lagos en serie, como lo son el lago Riñihue, lago Pirehueico, lago Lacar, lago Panguipulli, evacuando todos estos cuerpos lacustres en el río San Pedro, con una extensión total de la cuenca de 10.275 km². Dos ríos forman el río Valdivia que son el río Calle Calle y el río Cruces, el río Calle Calle se origina de la junta de los ríos San Pedro y Quinchilca, desembocando en la bahía de Corral, mientras que el río Cruces nace con el nombre de San José Copihuelpi, de la unión de varios esteros recibiendo dos aportes importantes de los ríos Nanihue y Pichoy, antes de juntarse con el Calle Calle en Valdivia.

El clima en la cuenca del río Valdivia presenta dos tipos, uno es el templado cálido lluvioso con influencia mediterránea, caracterizado por presentar precipitaciones a lo largo de todo el año y que en los meses más fríos presenta temperaturas de -3 °C y en los más cálidos temperaturas de 18°C. El otro clima, es el templado frío lluvioso con influencia mediterránea, caracterizado por las bajas temperaturas todo el año y el aumento de las precipitaciones con la altura (3000 mm anuales, sobre los 1200 m.s.n.m.).

Las principales actividades en la cuenca corresponden a silvoagropecuarias, agrícolas y ganaderas, además de las empresas forestales e industrias de la madera. En la ciudad de Valdivia, la economía está basada en actividades industriales, universitarias, eventos artesanales, de artilleros, gastronomía y turismo.

Los usos de suelo en su mayoría, están compuestos por bosque nativo y bosque mixto con un 45% de la superficie total, lo siguen las praderas con un 28%, las plantaciones forestales con un 12,8% y finalmente un 11,8% para matorrales, cuerpos de agua, etc.

A continuación en la **Figura N°1**, se muestra la cuenca del río Valdivia con los cauces principales, límites cuenca y subcuenca, estaciones de monitoreos de calidad de agua (DGA), entre otras características. (ArcView GIS 3.2)



4. Criterios para la evaluación de los datos

Para realizar un completo análisis de la información disponible, se solicitaron antecedentes complementarios al Ministerio de Medio Ambiente y a la Empresa Celco Valdivia, para el caso de los datos de los Informes de resultados originales que recibe la empresa de parte del Laboratorio EULA.

En cuanto a los criterios utilizados para la evaluación de los datos, están enfocados principalmente en la trazabilidad y calidad de estos, abarcando desde la toma de muestra hasta el informe final elaborado y entregado por Celco Valdivia para la estación 3. A continuación se señalan los criterios utilizados para la evaluación de los datos:

- Revisión inicial de datos.
- Comparación de datos E3 Celco Valdivia, con estación de calidad de aguas río Cruces en Rucaco de la Dirección General de Aguas (DGA).
- Verificación de trazabilidad de los datos entregados por EULA.
- Verificación de datos digitales entregados Celco Valdivia.
- Revisión final de datos.

4.1 Revisión inicial de datos

Se realizó una revisión preliminar de carácter general de los datos disponibles de la estación E3 de Celco Valdivia, que corresponden al periodo de Junio de 1995 a Septiembre del 2009, verificando la uniformidad, orden, formato, información entregada y la claridad de los mismos. También se identificaron los parámetros con información junto con los valores entregados para cada uno de estos.

A continuación en la **Tabla N°3**, se muestran los parámetros revisados y medidos para la estación 3.

Parámetros medidos Estación 3			
1	Temperatura (°C)	30	N(NH ₄ ⁺) (mg/L)
2	pH	31	N Org (mg/L)
3	Conductividad (umhos/cm)	32	N Tot (mg/L)
4	Oxígeno Disuelto (mg/L)	33	Fósforo Soluble (µg/L)
5	Oxígeno Disuelto Saturado (%)	34	P Tot (mg/L)
6	Turbiedad (NTU)	35	D.Q.O. (mg/L)
7	Cloro libre residual (mg/L)	36	DBO ₅ (mg/L)
8	Sulfato (SO ₄ ²⁻) (mg/L)	37	Coliformes Fecales (NMP/100 ml)
9	Sodio (Na ⁺)(mg/L)	38	Coliformes Totales (NMP/100 ml)
10	Fluoruro (F)(mg/L)	39	Cloruro (mg/L)
11	Cianuro (CN)(mg/L)	40	Cloratos (mg/L)
12	Aluminio (Al) (mg/L)	41	Sólidos Suspendidos Orgánicos (mg/L)
13	Arsénico (As) (mg/L)	42	Sólidos Suspendidos Inorgánicos (mg/L)
14	Boro (B) (mg/L)	43	Sólidos Suspendidos (mg/L)
15	Cadmio (Cd) (µg/L)	44	Sólidos totales disueltos (mg/L)
16	Cobalto (Co) (mg/L)	45	Sólidos Sedimentables (ml/L * hr)
17	Cromo (Cr) (µg/L)	46	Sólidos Disueltos Orgánicos (mg/L)
18	Cobre (Cu) (µg/L)	47	Sólidos Disueltos Inorgánicos (mg/L)
19	Fierro (Fe) (mg/L)	48	Penetración de la Luz (M)

20	Mercurio (Hg) (mg/L)	49	Color (Pt/Co)
21	Litio (Li) (mg/L)	50	Productividad Primaria (mgC/m3/h)
22	Manganeso (Mn) (mg/L)	51	Bario (mg/L)
23	Molibdeno (Mo) (mg/L)	52	Berilio (mg/L)
24	Niquel (Ni) (mg/L)	53	Vanadio (mg/L)
25	Plomo (Pb) (mg/L)	54	Comp. Orgán. Hal. Ads. (AOX) (µg/L)
26	Selenio (Se) (mg/L)	55	Ácidos Resínicos (µg/L)
27	Zinc (Zn) (mg/L)	56	Ácidos Grasos (µg/L)
28	N(NO ₃ ⁻) (mg/L)	57	Clorofenoles (ng/L)
29	N(NO ₂ ⁻) (mg/L)	58	Pentaclorofenoles (µg/L)

Efectuada la revisión preliminar de los datos se realizan a continuación las siguientes recomendaciones para una mejor claridad en la información y mejor entendimiento de la base de datos entregada en el archivo Excel por Celco Valdivia:

- Eliminar la columna año, y modificar el formato de la celda en la columna que contiene la fecha del monitoreo (dd-mm-yyyy).
- Añadir una columna con la hora del muestreo y el tipo de muestra (si fuese necesario).
- Indicar toda la información referente a la estación 3, nombre, código si lo tuviera, coordenadas, tipo de muestra, etc.
- Incluir un glosario con las siglas o símbolos no numéricos utilizados en la planilla
- Incluir las metodologías utilizadas para los análisis y sus límites de detección (como información adicional).

4.2 Comparación de datos estación de Celco Valdivia con estación de calidad de aguas de la Dirección General de Aguas (DGA).

El análisis se basó en una comparación de los resultados obtenidos por el laboratorio de la DGA para la estación río Cruces en Rucaco (código BNA 10134001-5), versus los resultados obtenidos por Celco a través del laboratorio de química ambiental del Centro EULA-Chile para la estación E3. A continuación en la tabla N°4 se muestra las coordenadas UTM para la estación E3 de Celco Valdivia, ubicada en el río cruces sector San Luis de Alba, junto con las coordenadas de la estación de calidad de la Dirección

General de Aguas (DGA) en el río Cruces en Rucaco, que se utilizará como punto de comparación de datos por constituir la estación mas cercana.

	UTM Norte	UTM Este
Estación E3 - Celulosa Arauco planta Valdivia	5614447	658822
DGA - Estación Río Cruces en Rucaco	5620006	680443

Datum WGS84

Si bien ambas estaciones no tienen el mismo emplazamiento, se encuentran muy cercanas entre si. De igual forma no existen descargas, extracciones de agua o afluentes en el tramo de río que las separa, que pudieran generar una alteración en los datos de calidad del agua. Lo anterior, establece un punto de comparación adecuado entre los parámetros, tendencias y sus resultados obtenidos, para lo cual se comparan en función de los siguientes ítems:

4.2.1 Verificar que los parámetros medidos en ambas estaciones coincidan entre si, en las mediciones realizadas desde el año 1995 hasta el 2009. Periodo que contienen los resultados obtenidos por el centro EULA (Monitoreo Celco Valdivia) para la estación 3.

A continuación en la **Tabla N°5**, se muestran los parámetros en común analizados por el laboratorio EULA y por el laboratorio de la DGA, junto con los años a comparar y la frecuencia en la toma de muestra.

Parámetros	Unidad	Rango de años	Promedio frecuencia anual	
			DGA	EULA
Temperatura	°C	1996-2009	4 Veces	12 Veces
pH		1995-2009	4 Veces	12 Veces
Conductividad	(umhos/cm)	1995-2009	4 Veces	12 Veces
Oxígeno Disuelto	(mg/L)	1996-2009	4 Veces	12 Veces
Sulfato (SO ₄ -2)	(mg/L)	2003-2009	4 Veces	12 Veces
Sodio (Na ⁺)	(mg/L)	2003-2009	4 Veces	12 Veces
Aluminio (Al)	(mg/L)	2002-2009	4 Veces	12 Veces
Arsénico (As)	(mg/L)	1995-2009	4 Veces	12 Veces
Boro	(mg/L)	2003-2009	4 Veces	12 Veces
Cadmio (Cd)	(mg/L)	1995-2009	4 Veces	12 Veces
Cobalto (Co)	(mg/L)	1995-2009	4 Veces	12 Veces
Cobre (Cu)	(mg/L)	1995-2009	4 Veces	12 Veces

Fierro (Fe)	(mg/L)	2002-2009	4 Veces	12 Veces
Mercurio (Hg)	(mg/L)	1995-2009	4 Veces	12 Veces
Manganeso (Mn)	(mg/L)	2002-2009	4 Veces	12 Veces
Molibdeno (Mo)	(mg/L)	2002-2009	4 Veces	12 Veces
Níquel (Ni)	(mg/L)	1995-2009	4 Veces	12 Veces
Plomo (Pb)	(mg/L)	1995-2009	4 Veces	12 Veces
Selenio (Se)	(mg/L)	1995-2009	4 Veces	12 Veces
Zinc (Zn)	(mg/L)	1995-2009	4 Veces	12 Veces
N(NO ₃ ⁻)	(mg/L)	1996-2009	4 Veces	12 Veces
Fosforo total	(mg/L)	2002-2009	4 Veces	12 Veces
Cloruro	(mg/L)	2003-2009	4 Veces	12 Veces

La frecuencia de 12 veces utilizada por Celco Valdivia, comenzó a partir del año 2004 hasta el año 2009, anterior a eso era de 2 a 4 veces por año

4.2.2 Verificar las metodologías de análisis entre los parámetros. Para poder comparar los resultados obtenidos, estos necesariamente deben ser analizados bajo la misma metodología.

A continuación en la **Tabla N°6**, se muestran las metodologías utilizadas por el laboratorio acreditado del Centro EULA y las utilizadas por el laboratorio de la DGA, para cada parámetro señalado anteriormente (Tabla N°5).

Parámetros	Unidad	Metodologías utilizadas		
		Laboratorio DGA	Centro EULA	
Temperatura	°C	4500 H+B Electrometric method	2250 B Standard Methods 21th Edit. Termometría	A
pH		4500 H+B Electrometric method	4500 H B Standard Methods 21th Edit. Potenciometría	A
Conductividad	(umhos/cm)	2510 B Electrometría	2510 B Standard Methods 21th Edit. Electrometría	A
Oxígeno Disuelto (O.D)	(mg/L)	4500 O-G Membrane Electrode Method	4500 O Standard Methods 21th Edit. Volumetría Winkler	A
Sulfato (SO ₄ ²⁻)	(mg/L)	Turbidimetría	Merck Code 14548 (Nova) 60-EAM	N/A
Sodio (Na ⁺)	(mg/L)	Espectroscopia de absorción atómica	3111 B Standard Methods 21th Edit. EAA-Llama	A
Aluminio (Al)	(mg/L)	Espectroscopia de absorción atómica	3111 D Standard Methods 21th Edit. EAA-Llama	A
Arsénico (As)	(mg/L)	Espectroscopia de absorción atómica - Generación de Hidruros	3114 B Standard Methods 21th Edit. EAA-Generación de Hidruros	A
Boro (B)	(mg/L)	Método del Azometino-H	4500-B Standard Methods 21th Edit. EAM	A
Cadmio (Cd)	(mg/L)	Espectroscopia de absorción atómica	3111 B Standard Methods 21th Edit. EAA-Llama	A

Cobalto (Co)	(mg/L)	Espectroscopia de absorción atómica	NCh 2313/25 ICP-MS. Derivado a LRR	A
Cobre (Cu)	(mg/L)	Espectroscopia de absorción atómica	3111 B Standard Methods 21th Edit. EAA-Llama	A
Hierro (Fe)	(mg/L)	Espectroscopia de absorción atómica	3111 B Standard Methods 21th Edit. EAA-Llama	A
Mercurio (Hg)	(mg/L)	Espectroscopia de absorción atómica - Vapor frío	3112 B Standard Methods 21th Edit. EAA-Vapor frío	A
Manganeso (Mn)	(mg/L)	Espectroscopia de absorción atómica	3111 B Standard Methods 21th Edit. EAA-Llama	A
Molibdeno (Mo)	(mg/L)	Espectroscopia de absorción atómica	3111 D Standard Methods 21th Edit. EAA-Llama	A
Níquel (Ni)	(mg/L)	Espectroscopia de absorción atómica	3111 B Standard Methods 21th Edit. EAA-Llama	A
Plomo (Pb)	(mg/L)	Espectroscopia de absorción atómica	3111 B Standard Methods 21th Edit. EAA-Llama	A
Selenio (Se)	(mg/L)	Espectroscopia de absorción atómica - Generación de Hidruros	3114 C Standard Methods 21th Edit. EAM-Generación de Hidruros	A
Zinc (Zn)	(mg/L)	Espectroscopia de absorción atómica	3111 B Standard Methods 21th Edit. EAA-Llama	A
N(NO ₃)	(mg/L)	Espectroscopia de absorción Molecular	4500-NO ₃ E Standard Methods 21th Edit. EAM	A
Fosforo total	(mg/L)	Espectroscopia de absorción Molecular	4500 P Standard Methods 21th Edit. EAM	A
Cloruro	(mg/L)	Volumetría	4500-Cl-B Standard Methods 21 Edit. Volumetría	N/A

En la última columna se indica con una letra "A" parámetro acreditado y con "N/A" parámetro no acreditado.

4.2.3 Utilizar campañas de monitoreo que hayan sido realizadas en periodos similares entre ambas entidades, priorizando el día, mes, año y finalmente estación del año para compararlos entre si.

A continuación en la tabla N°7, se muestran las fechas utilizadas para comparar cada parámetro, haciendo coincidir los monitoreos realizados en función del año, mes y/o estación del año en el cual fue realizado.

°	Parámetros	Fechas en Común	
		EULA	DGA
1	Temperatura	04-04-1995	01-06-1995
2	pH	12-03-1996	01-02-1996
3	Conductividad	15-10-2002	01-09-2002
4	Oxígeno Disuelto (O.D)	15-04-2003	01-03-2003
5	Sulfato (SO ₄ ²⁻)	02-09-2003	01-09-2003
6	Sodio (Na ⁺)	06-04-2004	01-04-2004
7	Aluminio (Al)	29-07-2004	01-07-2004
8	Arsénico (As)	18-11-2004	01-11-2004

9	Boro (B)	05-04-2005	19-04-2005
10	Cadmio (Cd)	26-07-2005	19-07-2005
11	Cobalto (Co)	09-11-2005	24-11-2005
12	Cobre (Cu)	05-04-2006	17-04-2006
13	Fierro (Fe)	26-07-2006	19-07-2006
14	Mercurio (Hg)	21-11-2006	23-11-2006
15	Manganeso (Mn)	17-04-2007	12-04-2007
16	Molibdeno (Mo)	01-08-2007	22-08-2007
17	Níquel (Ni)	27-11-2007	22-11-2007
18	Plomo (Pb)	27-03-2008	17-03-2008
19	Selenio (Se)	07-08-2008	18-08-2008
20	Zinc (Zn)	13-11-2008	17-11-2008
21	N(NO ₃)	06-04-2009	07-04-2009
22	Fosforo total	30-07-2009	23-07-2009
23	Cloruro	23-11-2009	16-09-2009

A continuación se presentan los resultados de la comparación entre la E3 por EULA y la estación Rucaco por la DGA, utilizando los criterios señalados en los puntos 4.2.1, 4.2.2 y 4.2.3.

- Los parámetros in situ como temperatura, conductividad, pH y oxígeno disuelto, tienen valores muy similares, casi idénticos, que se ven confirmados con el promedio e individualmente en las fechas señaladas en la tabla N°7.
- Para el sulfato, sodio y cloruro, se encontraron pocos datos tanto para EULA como para la DGA, lo cual aleja los promedios entre si, pero si los comparamos de manera individual, encontramos mas concordancia entre ellos.
- Si comparamos Aluminio y fosforo total, ambos se caracterizan por tener todos los datos completos de acuerdo a las fechas establecidas de comparación, también ambos se mueven entre los valores de limite de detección para ambas entidades, por lo tanto la única diferencia que se encuentra, esta dada mayoritariamente por los diferentes límites de detección.
- El Arsénico, Boro, Cadmio, Cobalto, Cobre, Fierro, Mercurio, Manganeso, Molibdeno, Níquel, Plomo, Selenio y Zinc se caracterizan por una falta de coincidencia en las fechas que se realizan los muestreos entre los años 2007 y 2008, a pesar de esto, la

tendencia nos muestra que se mueven casi solo en valores de límites de detección, por esto, ya sea individualmente o como promedio los valores para ambas entidades son casi iguales.

- Por último el nitrato, es el parámetro en donde se encuentra la mayor diferencia, los valores entregados por EULA, superan por casi el doble los entregados por DGA. Esta diferencia se puede explicar en las diferentes fechas de muestreo y lo sensible del parámetro.

4.3 Verificación de trazabilidad de los datos entregados por EULA

La trazabilidad de los resultados entregados fueron sometidos al seguimiento teórico de estos, es decir, confirmar y verificar que las diferentes etapas por las que atraviesan los datos hasta el resultado final, coincidan con lo establecido en la norma y en la legislación vigente, además de lo informado por el centro EULA como empresa encargada de la toma de muestra, análisis y de la entrega de resultados. Para esto se recopiló información correspondiente a las metodologías utilizadas para la toma de muestras, preservación, forma y tiempo de transporte, recepción de muestras, almacenamiento, análisis químico, resultados obtenidos y entrega de informes consolidados.

La campaña de muestreo para la estación E3, fue diseñada por Celco Valdivia y llevada a cabo por el centro EULA-Chile, este diseño sigue lo establecido por la NCh 411/1². Mientras que la toma de muestra, el transporte y la preservación realizada por EULA, se rige por NCh 411/2³, 411/3⁴ y 411/6⁵, además EULA fue auditado en enero del 2010 para acreditar la unidad de muestreo. Para el análisis de los parámetros medidos en la estación 3⁶, el laboratorio de química ambiental del centro EULA-Chile, se encuentra acreditado por el Sistema Nacional de Acreditación del Instituto Nacional de

² NCh 411/1: Guía para el diseño de programas de muestreo

³ NCh 411/2: Guía sobre técnicas de muestreo

⁴ NCh 411/3: Guía sobre la preservación y el manejo de muestras

⁵ NCh 411/6: Guía para el muestreo de ríos y cursos de agua

⁶ Tabla N°4: Parámetros medidos por Centro EULA en estación 3

Normalización (INN) como laboratorio de ensayo, de acuerdo a la Norma NCh-ISO 17025, Of 2001, desde el año 2003, para aguas crudas y RIL La trazabilidad de estas mediciones se lleva a cabo mediante el uso de patrones de referencia, material de referencia, calibración externa y/o verificaciones externas e internas (se adjunta documento INN sobre acreditación del Laboratorio EULA como respaldo).

La trazabilidad, según lo descrito anteriormente, esta asegurada en un laboratorio acreditado, porque tiene un procedimiento que asegura este requerimiento de la acreditación, dando garantías de que los instrumentos de medición utilizados producen resultados correctos y son operados de manera tal que aseguren la trazabilidad de las mediciones efectuadas con la exactitud apropiada. Asimismo, todo está avalado por la normativa vigente según lo descrito en el punto 4.3.

4.4 Verificación de los datos digitales entregados por Celco Valdivia

La información entregada en formato digital por Celco Valdivia fue sometida a una verificación, la cual consta de una comparación de la información entregada por el centro EULA-Chile (Informes consolidados), y los valores que se encuentran en el archivo digital entregado por la empresa.

Al revisar los valores correspondientes a los informes entregados por EULA-Chile contra los valores entregados por Celco Valdivia, no se encuentra diferencia alguna entre ambas fuentes de información, solo hay un cambio de unidades realizado por Celco Valdivia, el cual no influye ni cambia de ninguna forma la verificación positiva de los datos entregados por este.

4.5 Revisión final de datos

Con la revisión final general del archivo Excel entregado por Celco Valdivia, en donde se verificaron los cambios propuestos, con el fin de generar una nueva base de datos mejorada, nuevos criterios de información, nueva estructura, para que la información existente entregada sea lo más clara posible en beneficio de aquellos que la utilizarán como fuente de información.

5. Conclusión

Con la información recopilada y analizada de los datos proporcionados por Celco Valdivia, correspondientes a la estación 3, ubicada en el humedal del río Cruces, podemos asegurar que bajo las condiciones descritas en el presente informe, los resultados analíticos informados por Celco, pueden ser utilizados como antecedentes técnicos o base de datos para el proceso normativo de la cuenca (Elaboración de Normas Secundarias de Calidad Ambiental).

Así, si se requiere continuar utilizando la información proveniente de la base de datos que genera Celco Valdivia para efectos del desarrollo normativo, se debe tener en consideración que se cumplan los siguientes requisitos:

- Mantener el análisis de muestras con un laboratorio acreditado por el INN,
- Los valores que se definan para los límites de detección, deben ser acordes con las concentraciones encontradas.
- El punto de monitoreo (E3) debe continuar en el mismo emplazamiento.
- La toma de muestra y análisis debe realizarse con el mismo procedimiento que se ha realizado hasta ahora.
- La frecuencia de monitoreo estará sujeta a lo que se estime como necesario para las variables de calidad de agua que se quieren controlar.

Por último, la información entregada debe incorporar las condiciones meteorológicas, de muestreo, fechas, horas y épocas del año, información fundamental ligada a los valores y/o resultados obtenidos.

Heriberto A. Moya G.

Químico Analista / Diplomado en Análisis y Gestión del Ambiente



INSTITUTO NACIONAL
DE NORMALIZACION

CERTIFICADO

Eduardo Ceballos O.
Eduardo Ceballos O., Jefe de División Acreditación del Instituto Nacional de Normalización, INN, certifica que el Centro EULA de la Universidad de Concepción, domiciliado en Barrio Universitario s/n Concepción, está acreditado en el Sistema Nacional de Acreditación del INN, como Laboratorio de ensayo el área Físico-química para aguas, con los Certificados LE 239 y LE 240.

Actualmente se encuentra en la última etapa del proceso de renovación de su acreditación.

Este certificado se emite a solicitud de Centro EULA de la Universidad de Concepción para los fines que estime conveniente.

Santiago, 15 de Diciembre de 2010

2010-12-15
PGB/em

OFICINAS GENERALES
MATIAS COUSIÑO 64 - PISO 8
SANTIAGO - CHILE
TEL. (56-2) 446 8800
FAX (56-2) 441 0427
www.inn.cl

INSTITUTO NACIONAL
DE NORMALIZACION

El Instituto Nacional de Normalización, INN, certifica que:

CENTRO EULA-CHILE

DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

ubicado en Barrio Universitario s/n, Concepción

ha renovado su acreditación en el Sistema Nacional de Acreditación del INN, como

Laboratorio de Ensayo

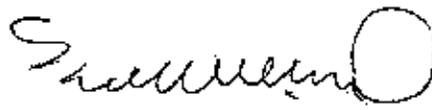
según NCh-ISO 17025.Of2005

en el área Microbiología para aguas, con el alcance indicado en anexo.

Primera acreditación: Desde el 6 de Junio de 2005

Vigencia de la Acreditación : hasta el 26 de Junio de 2012

Santiago de Chile, 12 de Enero de 2010



Eduardo Ceballos Osorio
Jefe de División Acreditación



Sergio Toro Galleguillos
Director Ejecutivo



ACREDITACION LE 325

ALCANCE DE LA ACREDITACION DEL LABORATORIO DE ENSAYO CENTRO EULA-CHILE DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCION, CONCEPCION, COMO LABORATORIO DE ENSAYO

AREA : MICROBIOLOGIA PARA AGUAS

SUBAREA : MICROBIOLOGIA PARA AGUAS RESIDUALES, SEGUN CONVENIO INN-SISS

Ensayo	Norma/Especificación	Producto a que se aplica
Determinación de Coliformes fecales	NCh2313/22.Of95	Aguas residuales
Determinación de Coliformes fecales	NCh2313/23.Of95	Aguas residuales

SUBAREA : MICROBIOLOGIA PARA AGUAS CRUDAS Y AGUAS RESIDUALES.

Ensayo	Norma/Especificación	Producto a que se aplica
Determinación de Coliformes Totales	Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Ed 21, Cap. 9221 B.	Aguas crudas y aguas residuales
Determinación de Coliformes totales	Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Ed 21, cap. 9222 B.	Aguas crudas
Determinación de Coliformes fecales	Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Ed 21, Cap. 9221 E.	Aguas crudas
Determinación de Coliformes fecales	Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Ed 21, Cap. 9222 D.	Aguas crudas



Eduardo Ceballos Osorio
Jefe de División Acreditación



Sergio Toro Gallardo
Director Ejecutivo

INSTITUTO NACIONAL
DE NORMALIZACION

El Instituto Nacional de Normalización, INN, certifica que:

CENTRO EULA-CHILE
DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

ubicado en Barrio Universitario s/n, Concepción

ha renovado su acreditación en el Sistema Nacional de Acreditación del INN, como

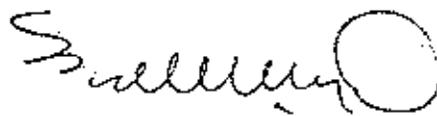
Laboratorio de Ensayo
según NCh-ISO 17025.Of2005

en el área Físico-química para aguas, con el alcance indicado en anexo.

Primera acreditación: Desde el 25 de Septiembre de 2003

Vigencia de la Acreditación : hasta el 30 de Junio de 2010

Santiago de Chile, 31 de Diciembre de 2009



Eduardo Ceballos Osorio
Jefe de División Acreditación



Sergio Toro Galleguillos
Director Ejecutivo

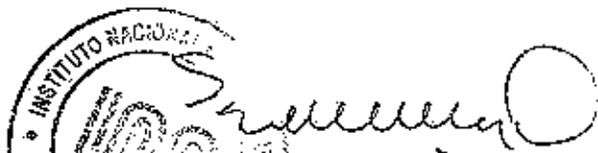


ACREDITACION LE 239

ALCANCE DE LA ACREDITACION DEL LABORATORIO DE ENSAYO DEL CENTRO EULA-CHILE DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCION, SEDE CONCEPCION, COMO LABORATORIO DE ENSAYO

AREA : FISICO-QUIMICA PARA AGUAS
SUBAREA : FISICO-QUIMICA AGUAS RESIDUALES, CONVENIO INN-SISS

Ensayo	Norma/especificación	Producto a que se aplica
pH	NCh2313/1.0f95	Aguas residuales
Temperatura	NCh2313/2.0f95	Aguas residuales
Arsénico	NCh2313/9.0f96	Aguas residuales
Selenio	NCh2313/30.0f98	Aguas residuales
Hierro	NCh2313/10.0f96	Aguas residuales
Manganeso	NCh2313/10.0f96	Aguas residuales
Cobre	NCh2313/10.0f96	Aguas residuales
Cadmio	NCh2313/10.0f96	Aguas residuales
Cromo	NCh2313/10.0f96	Aguas residuales
Zinc	NCh2313/10.0f96	Aguas residuales
Niquel	NCh2313/10.0f96	Aguas residuales
Plomo	NCh2313/10.0f96	Aguas residuales
Cloruro	NCh2313/32.0f99	Aguas residuales
Demanda bioquímica de oxígeno	NCh2313/5.0f96	Aguas residuales
Demanda química de oxígeno	NCh2313/24.0f97	Aguas residuales
Fósforo total	NCh2313/15.0f97	Aguas residuales
Índice de fenol	NCh2313/19.0f98	Aguas residuales
Mercurio	NCh2313/12.0f96	Aguas residuales
Sólidos sedimentables	NCh2313/4.0f95	Aguas residuales
Cromo hexavalente	NCh2313/11.0f96	Aguas residuales
Hidrocarburos totales	NCh 2313/7.0f97	Aguas residuales
Sólidos suspendidos totales	NCh2313/3.0f95	Aguas residuales
Amonio	NCh2313/16.0f97	Aguas residuales
Cianuro	NCh2313/14.0f97	Aguas residuales
Nitrogeno Kjeldahl	NCh2313/28.0f98	Aguas residuales


Edgardo Ceballos Osorio
Jefe de División Acreditación


Sergio Toro Galleguillos
Director Ejecutivo

INSTITUTO NACIONAL
DE NORMALIZACION

El Instituto Nacional de Normalización, INN, certifica que:

CENTRO EULA-CHILE

DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

ubicado en Barrio Universitario s/n, Concepción

ha renovado su acreditación en el Sistema Nacional de Acreditación del INN, como

Laboratorio de Ensayo

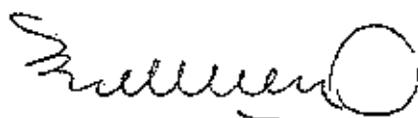
según NCh-ISO 17025.012005

en el área Físico-química para aguas, con el alcance indicado en anexo

Primera acreditación: Desde el 25 de Septiembre de 2003

Vigencia de la Acreditación : hasta el 30 de Junio de 2010

Santiago de Chile, 31 de Diciembre de 2009



Eduardo Ceballos Osorio
Jefe de División Acreditación.



Sergio Toro Galleguillos
Director Ejecutivo



ACREDITACION LE 240