



INFORME DE INVESTIGACION
I.I.P. 13

PREPARADO POR

CONTROL TOXICOLOGICO DE MOLUSCOS BIVALVOS EN LAS
PROVINCIAS DE MAGALLANES Y DE ULTIMA ESPERANZA, 1982
(Primera Etapa)

Este informe deberá ser citado de la siguiente forma:
REQUIRENTE: Secretaría Regional Ministerial de Planificación
y Coordinación, XIIa. Región.
Secretario Regional: Sr. Jaime Fuenzalida A.
EJECUTOR : Instituto de la Patagonia
Rector: Sr. Mateo Martinić B.

Punta Arenas, Julio de 1982

-0-0-0-0-0-0-0

1. INTRODUCCION 1

2. MATERIALES Y METODOS 3

PREPARADO POR *Sección de materiales y metodología aplicada* 3

2.1.1. Georgina Lembeye V. 3

2.1.2. Sección Biología Marina 3

2.1.3. Departamento de Hidrobiología 10

2.2. Programación de los muestreos 13

2.2.1. Colecta de muestra de mariscos 13

2.2.2. Muestra de fitoplancton 17

3. FUNCIONAMIENTO DEL EXPERIMENTO 19

3.1. Capacidad de producción de ratones 19

Este informe deberá ser citado de la siguiente forma:

Control toxicológico de mariscos 22

Lembeye, G., 1982. Control Toxicológico de Moluscos Bivalvos en las Provincias de Magallanes y de Ultima Esperanza, 1982 (Primera Etapa). I.I.P. 13, 40 p.

4.1. Control toxicológico del método 23

4.1.1. Muestras colectadas en junio 23

4.1.2. Muestras colectadas en febrero 26

4.1.3. Muestras colectadas en febrero de 1981 26

4.2. Composición del fitoplancton

I N D I C E

	Pág.
1. INTRODUCCION	1
2. MATERIALES Y METODOS	3
2.1. Descripción de materiales y metodología aplicada	3
2.1.1. Laboratorio	3
2.1.2. Bioterio	7
2.1.3. Bioensayo	10
2.2. Programación del muestreo	13
2.2.1. Colecta de muestra de mariscos	13
2.2.2. Muestra de fitoplancton	17
3. FUNCIONAMIENTO DEL BIOTERIO	19
3.1. Capacidad de producción de ratones	19
3.2. Requerimientos de ratones según muestreo de mariscos diseñado	22
4. RESULTADO	23
4.1. Control toxicológico	23
4.1.1. Estandarización del método	23
4.1.2. Muestras colectadas en junio	25
4.1.3. Muestras colectadas en febrero de 1981	26
4.2. Composición del fitoplancton	

4.2.1.	Composición del fitoplancton en el contenido digestivo de los moluscos.	28
4.2.2.	Composición del fitoplancton de red.	30
5.	DISCUSION	31
5.1.	Programación del muestreo	31
5.2.	Funcionamiento del sistema	33
5.3.	Técnica del bioensayo	34
5.4.	Reclutas	35
6.	LITERATURA CITADA	36
7.	APENDICES	38
7.1.	Tabla de Sommer	38
7.2.	Instrucciones para la colecta de muestras de mariscos	39
7.3.	Registro de muestras de mariscos recibidas entre 1 de junio al 15 de julio.	40

1. INTRODUCCION

Desde 1972, año en que se registró el primer caso comprobado de intoxicaciones en seres humanos, ocasionados por el Veneno Paralítico de los Mariscos (VPM) en Magallanes (Guzmán y Campodonico, 1975), se ha sugerido y planteado, tanto a través de publicaciones científicas como también de conferencias e informes, la necesidad de poner en práctica un programa de control toxicológico permanente de los mariscos filtradores, como única medida preventiva frente a futuras apariciones del VPM. La importancia de desarrollar un Programa de este tipo cobró vigencia cuando en febrero de 1981, se registraron inesperadamente nuevas intoxicaciones masivas -con 3 casos fatales- provocadas por el consumo de cholgas (Lembeye, 1981 a).

Debido a este último caso de envenenamiento masivo se puso en marcha, aunque precariamente, un Plan de Emergencia (Lembeye, 1981 b) el que consideró entre otros aspectos, el control toxicológico de los mariscos (a cargo del Servicio de Salud Regional). Sin embargo, las deficiencias en el equipamiento básico (e.g. carencia de saxitoxina estandar, dificultades en la adquisición de ratones) imposibilitaron la correcta aplicación del bioensayo, obteniéndose sólo una estimación cualitativa de la presencia de VPM.

De hecho, el bioensayo en ratones no sólo permite detectar oportunamente la aparición de VPM en los mariscos, sino también determinar los niveles de la toxina, posibilitando de esta manera la aplicación de medidas de control justas y pre

cisas que vayan en resguardo de la salud pública y que no ocasionen restricciones desmedidas en la actividad económica-pesquera.

El Gobierno Regional a través de la Secretaria Regional de Planificación y Coordinación (SERPLAC) XII Región, en su interés por resguardar la salud pública, ha encomendado al Instituto de la Patagonia, un estudio de Control toxicológico, el cual estará restringido a las provincias de Magallanes y de Ultima Esperanza; su aplicación estará limitada entre los meses de mayo y diciembre de 1982. El estudio será complementado con el análisis de muestras de fitoplancton colectadas en estaciones fijas de Seno Unión y Bahía Bell.

Considerando que un estudio de este tipo requiere de la existencia de un laboratorio adecuado para esta actividad y de un aporte constante de ratones; su primera etapa (mayo-junio) estuvo orientada a la construcción e implementación de un laboratorio y de un bioterio.

En el presente informe se señalan los materiales; se describen la metodología aplicada y el muestreo planificado. Se presentan además dos diseños de funcionamiento del bioterio; se efectúa una estimación de las necesidades de ratones para distintos períodos del año y se discuten las medidas alternativas que deberán aplicarse a fin de mantener un abastecimiento adecuado de ratones.

En forma complementaria y a manera de poner en práctica el método del bioensayo y de proporcionar información compara-

tiva se entregan los resultados del bioensayo aplicado a muestras tóxicas colectadas en febrero de 1981 en Seno Unión.

Por último, se entregan los resultados del análisis microscópico de los tractos digestivos de muestras de mariscos (cholgas y choritos) y de la composición del fitoplancton de red colectado en bahía Bell.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Descripción de materiales y metodología aplicada.

2.1.1. Laboratorio.

Sala.

Consiste en un espacio físico de 4,10 x 2,30 m (9,43 m²). En la figura 1 se presenta un esquema con la ubicación de los implementos básicos que a continuación se detallan:

Fuente de energía: calor y luz.

La estufa, de marca Mademsa (Fig. 1 A) consta de dos quemadores. Se ha preferido este sistema en reemplazo de los tradicionales mecheros de laboratorio principalmente por las facilidades en su adquisición. La estufa se ha adosado a una mesa de 0,80 x 0,50 m, permitiendo con ello disponer de un espacio suficiente para depositar material mientras se trabaja.

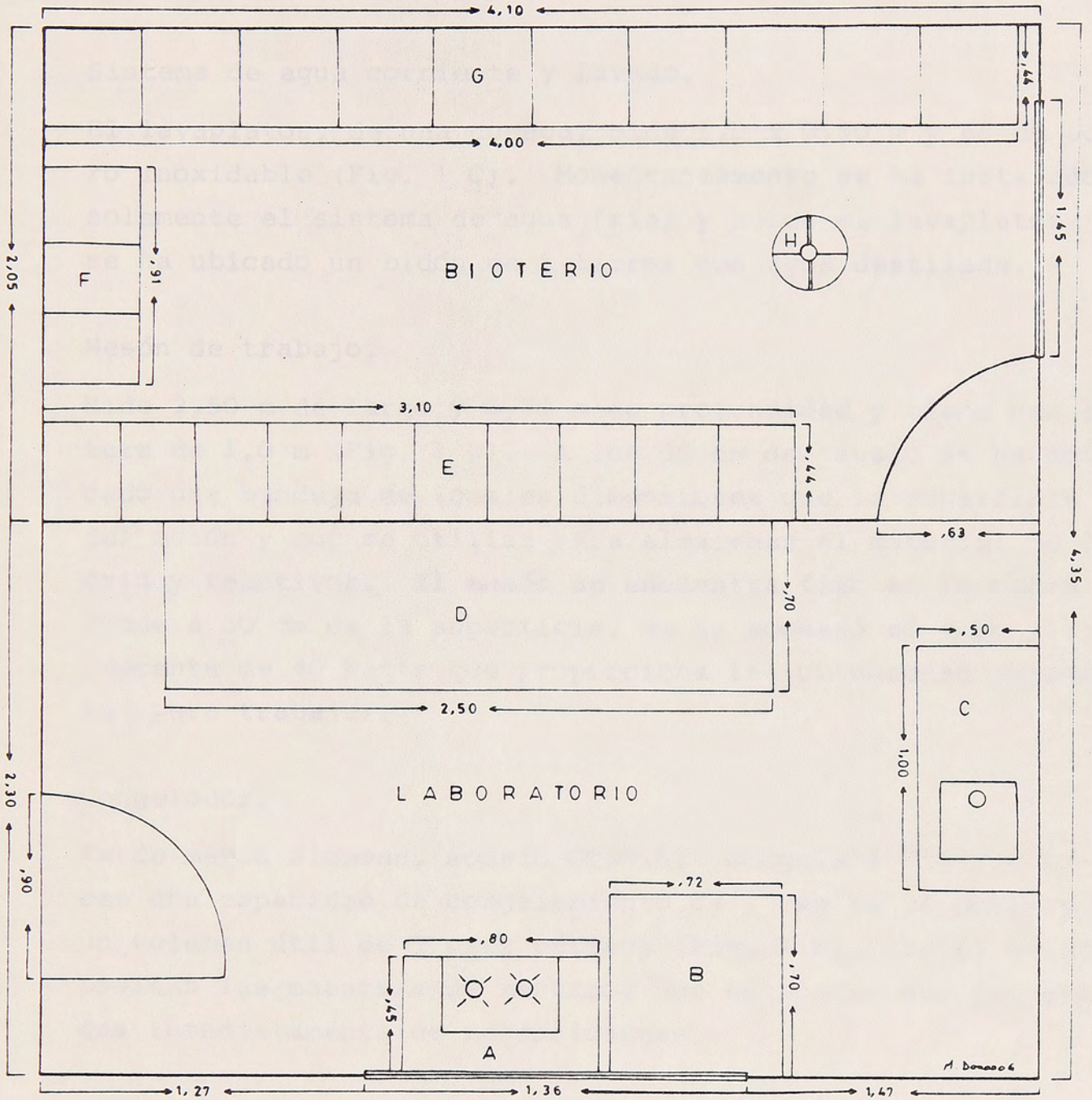


Fig. 1.- Plano del laboratorio y del bioterio.

La luz artificial es suministrada por tubos fluorescentes que se han instalado uno al centro del laboratorio y otro adjunto al mesón de trabajo.

Sistema de agua corriente y lavado.

El lavaplatos, de una cuenca, mide 1,0 x 0,50 m y es de acero inoxidable (Fig. 1 C). Momentaneamente se ha instalado solamente el sistema de agua fría; y sobre el lavaplatos se ha ubicado un bidón de 5 litros con agua destilada.

Mesón de trabajo.

Mide 2,50 m de largo y 0,70 m de profundidad y tiene una altura de 1,0 m (Fig. 1 D). A los 30 cm del suelo se ha colocado una bandeja de iguales dimensiones que la superficie del mesón y que se utiliza para almacenar el material de vidrio y reactivos. El mesón se encuentra fijo en la pared donde a 30 cm de la superficie, se ha adosado el tubo fluorescente de 40 Watts que proporciona la luminosidad suficiente para trabajar.

Congelador.

Es de marca Siemens, modelo GT2018. Congela a -18°C y posee una capacidad de congelamiento de 12 Kg en 24 horas y un volumen útil de 7 pies cúbicos (Fig. 1 B). En él se depositan las muestras de mariscos que no pueden ser procesadas inmediatamente de recepcionadas.

La calefacción de la sala la proporciona un calentador marca Perfection de 11.400 BTU.

Materiales:

Los materiales y reactivos que se señalan a continuación se han clasificado de acuerdo a los requerimientos de cada una de las 2 etapas en que, por conveniencia en la metodología del trabajo, se ha dividido el proceso del bioensayo:

a) Materiales utilizados en la obtención de extractos:

-Material de vidrio: probeta de 200ml, vasos de precipitado de 400 ml, matraces de 100 y de 1000 ml, pipetas de 1, 10, 20, 25 y 30 ml y tubos de cultivo con tapas de 15 ml.

-Reactivos:

Solución de HCl 0,1N (100ml/ muestra)

Solución de HCl 5N (utilizada para regular pH de la muestra)

Solución NaOH 0,1N (para regular pH de la muestra)

Solución de NaOCl 0,3% (utilizada para el lavado del material que ha estado en contacto con la solución estandar de Saxitoxina).

- Papel pH (o pHmetro) para controlar el pH de cada muestra.

- Balanza: Destinada al pesaje de la carne de mariscos y también de los ratones. Se cuenta con una balanza marca Ohaus 730 de 3 brazos, con escalas 0 - 500 (1/10), 0 - 100 (1/10) y 0 - 10 (1/100); consta además de una jaula que permite el pesaje de animales vivos.

b) Materiales utilizados durante la inoculación:

- Jeringa de vidrio y aguja hipodérmica Nº 24

- Balanza (para el pesaje de los ratones, ya señalada anteriormente)

- Frascos de vidrio de aproximadamente 2 litros donde se depositan los ratones para su observación después de ser inoculados.
- Cronómetro
- Solución estandar de Saxitoxina. Se utiliza una solución estandar de 100 ug/ml. Este estandar es elaborado por la U.S. Food & Drug Administration de Cincinnati, Ohio (U.S.A.) El estandar que se utilizó en esta oportunidad corresponde al Lote 8, N° de serie 706 y se obtuvo gracias al gentil aporte de la Dra. Clarice Yentsch (Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, USA).

2.1.2. Bioterio

Sala.

Mide 4,10 x 2,05 m (Fig. 1); consta de un sistema de extracción de aire (Fig. 1 H) y de calefacción permanente (calentador marca Perfection de 11.400 BTU) con termostato, que permite mantener un ambiente controlado entre 19 - 22°C. Posee además iluminación artificial que asegura un fotoperíodo de 14:10 horas (luz:oscuridad) en los meses de invierno en que la luz diaria es menor de la requerida, creando de esta manera las condiciones aptas para la mantención y crianza de los ratones (Dr. Humberto Cerisola, U. Católica de Valparaíso, com. epistolar).

A lo largo de 3 de sus paredes, se han adosado los estantes donde se depositan las jaulas de los ratones (Fig. 1). Las dimensiones y capacidad de cada uno de ellos se señalan en la tabla 1.

Tabla 1.- Dimensiones (m) de los estantes y número máximo de jaulas en cada uno.

Estante	Largo (m)	Nº jaulas
E	3,20	76
F	0,90	16
G	4,00	80

Cada estante tiene 4 repisas en las que se pueden almacenar en total 172 jaulas de las dimensiones como las que se describen más adelante (tipo "i"). En situaciones extremas en que se requiera aumentar la capacidad del bioterio, se puede ocupar el nivel inferior de cada estante aumentando el número de jaulas a 210.

Jaula.

Consiste en una caja de policarbonato con su respectiva tapa enrejada de acero inoxidable. La tapa presenta una excavación en la parte media donde se depositan el alimento (pellets) y el frasco para el agua (mamadera).

De acuerdo al total de jaulas adquiridas actualmente, el bioterio puede mantener un stock máximo de aproximadamente 500 ratones de 20 g. (Tabla 2).

Tabla 2.- Dimensiones (cm), número de jaulas y capacidad.

Dimensiones (largo x ancho x alto)	Nº jaulas	Capacidad (Nº de ratones de 20 g.) por jaula	total
29 x 18 x 13 ("i")	50	5	250
48 x 27 x 20 ("ii")	4	60	240

Las jaulas tipo "i", se utilizan tanto para la reproducción como para la mantención. La reproducción incluye el período de cópula, gestación y amamantamiento hasta el destete de los juveniles. Las de tipo "ii" se utilizan para la mantención de ejemplares de igual sexo y/o edad y corresponden a los que están destinados o aptos para ser utilizados en el Bioensayo.

Alimento.

Se utiliza un alimento balanceado rico en proteínas y vitaminas y que es elaborado por Champion S.A. (Santiago). Los pellets se depositan sobre la tapa de la jaula en cantidades aproximadas de 5 g/ ratón.

El alimento se guarda en depósitos herméticos y en un lugar frío y seco.

Cama.

En cada jaula se coloca viruta en cantidad suficiente como para cubrir la jaula hasta media altura, conformando la "cama". Esta se cambia cada 2 días, ocasión en que se efectúa la limpieza. La viruta tiene la doble función de servir de nido a las crías y de absorber la humedad ocasionada por la acumulación de la orina.

Ratones.

Se trabajará con ratones de laboratorio pertenecientes a la cepa CF-1. El abastecimiento inicial y hasta que el bioterio esté en condiciones de autoabastecerse estará a cargo del Instituto de Salud Pública de Chile (Santiago). Ejemplares de esta misma cepa se destinarán a la reproducción.

2.1.3. Bioensayo.

La técnica para la determinación del Veneno Paralítico de los Mariscos que actualmente se practica fue diseñada por la Association of Official Analytical Chemists, Inc. en 1958 y se encuentra descrita en Prakash et al. (1971). Guzmán y Campodonico (1975) en la monografía "Marea Roja en Magallanes" incluyen una traducción del método; con lo cual ésta publicación se ha transformado en una fuente de consulta constante para la realización del bioensayo.

Adams y Miescier (1980), por otra parte, en un intento de clarificar la metodología de este bioensayo y en beneficio de la obtención de resultados comparables entre laboratorios, plantean sugerencias orientadas específicamente hacia la estandarización de esta técnica y hacia los cálculos de los niveles de VPM.

A continuación se presenta una síntesis de las diferentes etapas del método:

a) Estandarización del bioensayo.

La realización de esta etapa permite transformar los valores de los niveles de toxina expresados en Unidades Ratón (UR) a microgramos de toxina por 100 gramos de carne (ug/100 g. de carne).

Para ello se utiliza una solución estandar de saxitoxina de concentración conocida, que se diluye con distintos volúmenes de agua y se inyecta a ratas de peso conocido (20 g.). Se pretende determinar en primera instancia aquella concentración a la cual la muerte de los ratones ocurre entre los 5-7 minutos. Posteriormente y una vez seleccionada la concentración requerida se determinan los valores de UR usando la Tabla de Sommer (ver Apéndice 7.1) en aproximadamente 10 inoculaciones.

La razón entre ug. toxina y los valores UR obtenidos determinan el Factor de Conversión (FC). El FC así obtenido se aplica a la fórmula que se señala en el punto e.

b) Uso del estandar (patrón) en ensayos rutinarios.

Periodicamente debe comprobarse el FC obtenido; cuando se trabaja permanentemente se recomiendan mediciones semanales para comprobar el FC. En caso de controles esporádicos, cada vez que se proceda al análisis de nuevas muestras, debe calcularse el FC. Dado el gran número de ejemplares de ratones que se utilizan en cada comprobación (10 a 30), de ser posible, es conveniente trabajar simultáneamente un gran número de muestras.

c) Preparación de la muestra y obtención de los extractos.

Previo al proceso de obtención del extracto, deben obtenerse 100 gramos de carne de la muestra de marisco; para ello se remueve la parte blanda, se deja escurrir para eliminar el líquido y posteriormente se muele hasta obtener una masa homogénea. En caso de trabajarse con muestras en conserva (enlatados), la masa inicial deberá estar intregada por la carne más la porción líquida.

La extracción se realiza agregando 100 ml de solución de ácido clorhídrico (HCl) 0,1N a la carne, seguido de un calentamiento lento y ebullición durante 5 minutos. El extracto resultante es enrasado a 200 ml y posteriormente filtrado, el cual es utilizado en las inoculaciones.

d) Prueba con los ratones (inoculación).

Se inocula intraperitonealmente 1 ml del extracto a ratones que pesen 20 g. Se utiliza un ratón por cada muestra y se controla el tiempo de muerte. En caso de que éste sea superior a 7 min. debe repetirse la inoculación en un total de 3 ratones; de ser inferior a los 5 min., deben efectuarse diluciones progresivas del extracto hasta que se obtenga un tiempo de muerte entre 5-7 minutos. Debe tenerse en cuenta el número de diluciones realizadas.

Si el ratón sobrevive después de una hora de inoculado, se considera que la muestra no es tóxica.

e) Cálculo de la toxicidad.

En caso que los ejemplares inoculados hayan tenido un peso diferente a 20 g. debe hacerse una corrección en los tiempos de muerte de acuerdo a la Tabla de Sommer, obteniéndose un valor de Unidad Raton corregido (URC). Los ratones con peso superior a los 23 g. no deben ser utilizados en la inoculación.

La toxicidad de la muestra se calcula de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{ug toxina/ 100 g carne} = \text{FC} \times \text{URC} \times 200 \times \text{factor dilución}$$

Mariscos con niveles de toxina superiores a 80 ug/100 g se consideran no aptos para consumo humano.

2.2. Programación del muestreo.

2.2.1. Colecta de muestras de mariscos.

El presente estudio estará limitado al control toxicológico de los mariscos provenientes de las provincias de Última Esperanza y de Magallanes. La selección de las estaciones destinadas a ser controladas, se realizó en base a los antecedentes obtenidos de la Marea Roja tóxica ocurrida en 1972 (Guzmán et al., 1975) y de los obtenidos del Plan de Emergencia desarrollado el año recién pasado con motivo de las intoxicaciones registradas en Puerto Natales (Iembeye, 1981 b).

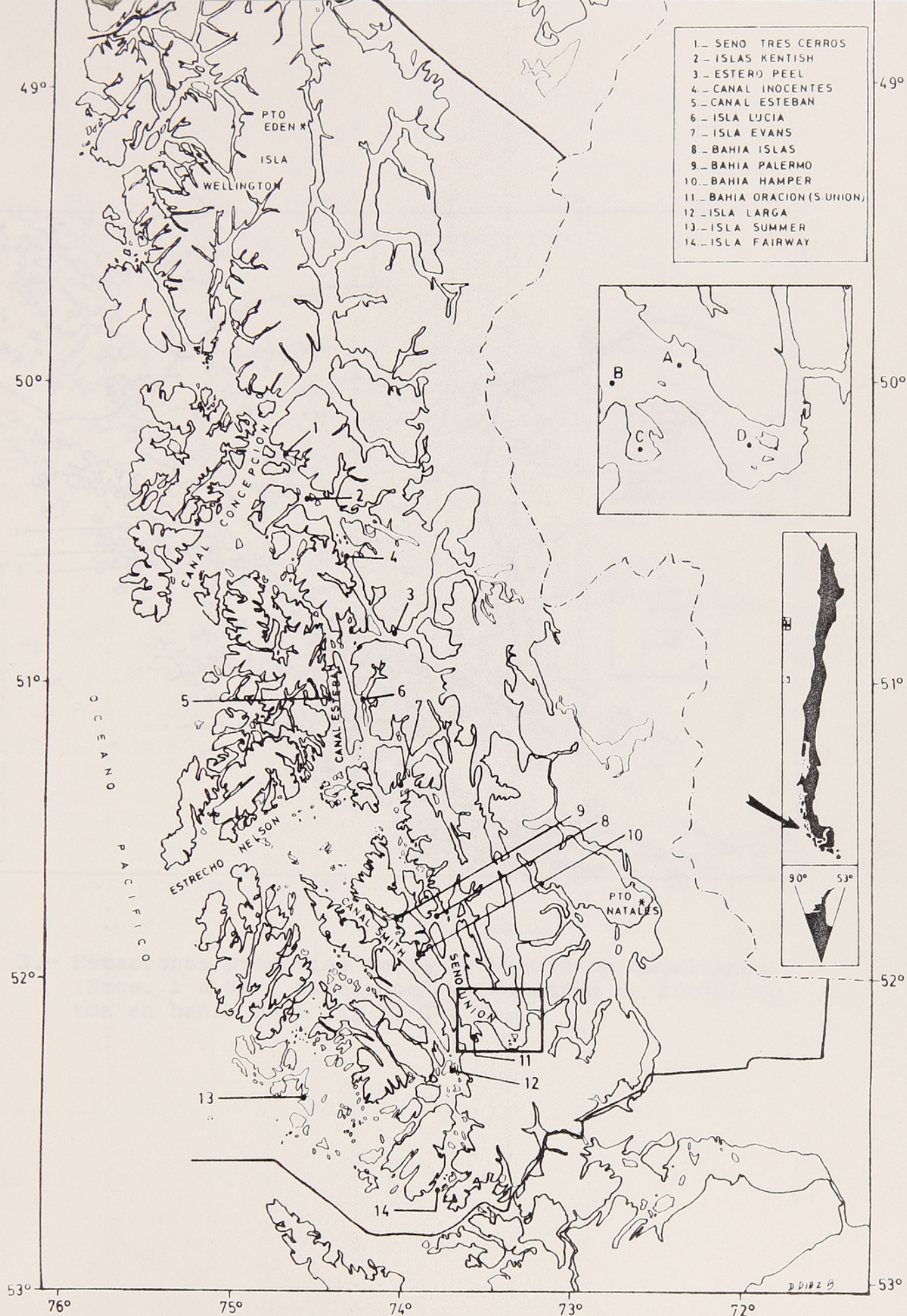


Fig. 2.- Estaciones primarias en la provincia de Ultima Esperanza (Nros. 1 a 14) y estaciones de muestreo de fitoplancton en seno Unión (A, B, C y D).

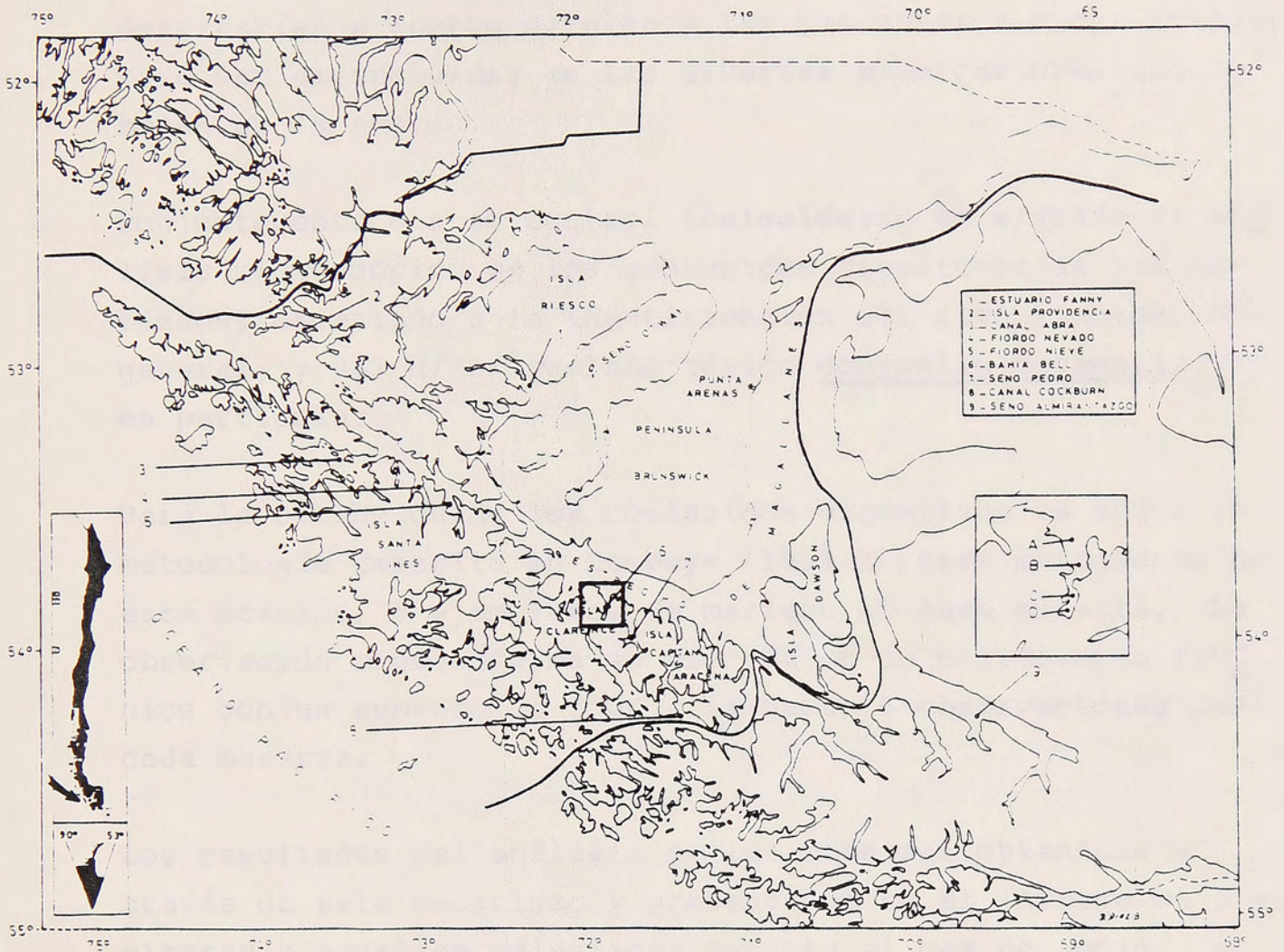


Fig. 3.- Estaciones primarias en la provincia de Magallanes (Nros. 1 a 9) y estaciones de muestreo de fitoplancton en bahía Bell (A, B, C y D).

El 11 de junio se inició la etapa de muestreo, al hacer entrega, en la oficina de la Gobernación Marítima de Punta Arenas, de un total de 350 bolsas, 250 de las cuales se destinarían a Puerto Natales y las restantes a Punta Arenas, para ser distribuidas en las diversas embarcaciones que la boran en la región.

Conjuntamente con el control toxicológico se efectúa el anál lisis microscópico de los contenidos digestivos de los mariscos, orientado a la identificación del fitoplancton, en general; y del dinoflagelado tóxico Gonyaulax catenella, en particular.

Para la obtención de los contenidos digestivos se sigue la metodología descrita en Lembeye (1981 b); pero utilizando en esta ocasión, 6 ejemplares de marisco en cada muestra. La observación microscópica se efectúa en un microscopio fotó nico con un aumento de 200X y se hacen 6 observaciones por cada muestra.

Los resultados del análisis de las muestras obtenidas a través de este mecanismo y presentados en el informe se limitaran a aquellas colectadas durante el mes de junio. En el Apéndice (7.3) se entrega, sin embargo, una lista con la totalidad de las muestras recepcionadas hasta la fecha de redacción del Informe (15 de julio).

2.2.2. Muestreo del fitoplancton.

Se programó la realización de un muestreo de fitoplancton en

los 2 sectores donde positivamente se ha detectado la presencia del VPM: bahía Bell y seno Unión (Fig. 2 y 3). En cada una de estas localidades se establecieron 4 estaciones, muestreándose en superficie y a los 5, 10, 20, 30 y 50 metros de profundidad. En cada nivel se registra la temperatura del agua y se colectan muestras para el análisis cuantitativo del fitoplancton y la determinación de la salinidad.

En cada estación además se colecta una muestra de fitoplancton de red con arrastre vertical y se mide la transparencia del agua con disco Secchi.

Las estaciones de seno Unión se muestrearán con una periodicidad de 45 días a partir de agosto (3 muestreos) y mensualmente en bahía Bell. A la fecha de redacción del presente informe, se ha efectuado la primera expedición a bahía Bell (17-22 de junio). Los resultados que se entregarán estarán limitados exclusivamente al análisis de las muestras de arrastre (análisis cualitativo del fitoplancton).

3. FUNCIONAMIENTO DEL BIOTERIO

3.1. Capacidad de producción de ratones.

Previo a efectuar estimaciones de la capacidad de producción del bioterio, es necesario tener en cuenta algunos antecedentes de la biología reproductiva y del crecimiento de los ratones de laboratorio, los que facilitarán la programación de su funcionamiento.

Algunas de estas características son:

- A) Ciclo ovárico = 5 días
- B) Tasa de fertilidad promedio = 6 días
- C) Proporción sexual = 1:1
- D) Tiempo de gestación = 21 días
- E) Tiempo desde el nacimiento hasta el destete = 28 días
- F) Edad a la que alcanzan un peso de 20 g = 3 meses

Aún cuando el método del bioensayo no lo estipula, las inoculaciones se efectuarán en ejemplares hembras, por cuanto diversos estudios han demostrado que la sensibilidad de la toxina es mayor en ese sexo (e.g. Prakash, et al., 1971). Los ejemplares machos serán eliminados casi en su totalidad, dejando sólo algunos destinados a reproducción.

Basándose en B y C y considerando que también deben destinarse crías hembras a la reproducción, además del bioensayo, se deduce que:

1 pareja ... 6 crías ... 3 hembras (1 destinada a reproducción + 2 destinadas a bioensayo)

Como el número de crías hembras que se destinan a reproducción es igual al número de parejas, se tiene:

N° hembras disponibles para el bioensayo = $2 \times (N^{\circ}$ hembras progenitoras).

Considerando que la capacidad potencial máxima de jaulas, destinadas a reproducción es de 210, se han diseñado dos sistemas alternativos de reproducción utilizando el bioterio en su máxima capacidad. Cada alternativa se ha esquematizado en las tablas 4 y 5.

Tabla 4.- Producción "constante" (alternativa A).

Semana	Días	Parejas inicial	en Reprod. total	Estado desarrollo de crías
0	0 (1 ^o Serie)	30 (a)	30	-
1	7	30 (b)	60	-
2	14	30 (c)	90	-
3	21	30 (d)	120	nacimiento de (a)
4	28	30 (e)	150	nacimiento de (b)
5	35	30 (f)	180	nacimiento de (c)
6	42	30 (g)	210	nacimiento de (d)
7	49		210	nacimiento de (e) + destete de (a)
8	56 (2 ^o Serie)	30 (a')	210	nacimiento de (f) + destete de (b)
9	63	30 (b')	210	nacimiento de (g) + destete de (c)
.	.	.	.	
.	.	.	.	
16	112 (3 ^o Serie)	30 (a'')	210	nacimiento de (f') + destete de (b') + (a) aptos para Bioensayos

Tabla 5.- Producción "en decrecimiento" (alternativa B).

Semana	Días	Parejas en Reprod. inicial	en total	Estado desarrollo de crías
0	0 (1 ^o Serie)	60 (a)	60	-
1	7	50 (b)	110	-
2	14	40 (c)	150	-
3	21	30 (d)	180	nacimiento de (a)
4	28	30 (e)	210	nacimiento de (b)
5	35	-	210	nacimiento de (c)
6	42	-	210	nacimiento de (d)
7	49	-	210	nacimiento de (e) + destete de (a)
8	56 (2 ^o Serie)	60 (a')	210	destete de (b)
9	63	50 (b')	210	destete de (c)
.	.			
.	.			
16	112 (3 ^o Serie)	60 (a'')	210	destete de (b') + (a) aptos para el bioensayo

La alternativa de producción "constante" (A) asegura un abastecimiento prácticamente permanente y constante de ratones. En efecto, semanalmente se dispondría de 60 ratones útiles para el bioensayo; sólo en 1 de cada 7 semanas, no se produciría aporte de nuevos individuos.

En la segunda alternativa (B), se obtiene un mayor aporte inicial de individuos (120 ejemplares hembras), pero este va decreciendo progresivamente (en 20 ejemplares) durante 5 semanas hasta alcanzar los 60 individuos. Sin embargo, de cada 5 semanas con producción, hay 3 sin aporte de nuevos ratones.

Ambas alternativas son factibles de adoptar; sin embargo, la elección dependerá de las necesidades de ratones. Y en

cualquiera de ellas, los primeros individuos (a) estarán aptos para ser utilizados en el bioensayo (peso 20 g), en la semana 16, cuando se esté iniciando la tercera Serie de parejas en reproducción.

3.2. Requerimientos de ratones según muestreo de mariscos diseñado.

Período otoño - invierno.

Se ha señalado como suficiente para este período el muestreo mensual en las 25 estaciones sugeridas.

Si no hay antecedentes previos de la presencia de VPM en los mariscos (e.g. toxicidad de los mariscos en los meses de verano), es suficiente emplear un ratón por cada muestra. Si se considera además que se utilizan aproximadamente 30 ratones para la determinación del Factor de Conservación, y si se reciben aproximadamente 25 muestras al mes, las necesidades mínimas de ratones durante este período serán de 55 (25 + 30) ratones/mes.

En base a este requerimiento el número de parejas en reproducción, necesarias para abastecer las necesidades de aproximadamente 55 ratones al mes, es de 30. (Nº parejas en reproducción = 2 x Nº hembras destinadas al bioensayo).

Período primavera - verano.

Tal como se señaló en el punto 2.2.1. a fin de asegurar la eficiencia del control toxicológico de los mariscos duranu

te este período, es rocomendable aumentar a una frecuencia semanal el muestreo de las estaciones. Por otra parte, y en beneficio de la confiabilidad de los resultados, se recomienda efectuar 3 inoculaciones por cada muestra. En consecuencia la cantidad de ratones requerida será de 75 (25 x 3) más 10 que se utilizarían para la confirmación del FC, totalizando 85 ratones por semana.

De acuerdo a ese requerimiento el número de parejas en reproducción será de 43.

En caso de detectarse la presencia de VPM, el número de ratones requeridos aumentará notablemente, estimándose un promedio de 5 ratones por muestra. En tal situación el número de ratones utilizados aumentará a 135; debiendo, en consecuencia mantenerse aproximadamente 70 parejas en reproducción semanalmente.

4. RESULTADOS

4.4. Control toxicológico.

4.1.1. Estandarización del método.

Para la determinación del Factor de Conservación (FC), se tomó como base la solución estandar de concentración 0,500 ug/ml (10 ml solución 1 ug/ml diluida con 10 ml de agua), por cuanto la inoculación de 1 ml de esta solución produjo la muerte en el rango de tiempo que el método estipula (5-7 min.).

En la tabla 6 se presentan los resultados obtenidos de las diluciones adicionales, con incrementos de 1 ml de agua, y que se utilizan para la determinación del FC final.

Tabla 6.- Serie de pruebas realizadas para determinar el Factor de Conservación (FC).

Diluc. Sol. Toxina	Peso ratón	Tiempo	URC ²	FC ³
ml Sol. ¹ + ml H ₂ O	(gramos)	min.:seg.		
10 + 10 (0,500 ug/ml)	19,1	5:10	1,804	0,277
10 + 10 (0,500 ug/ml)	19,7	5:35	1,665	0,300
10 + 11 (0,476 ug/ml)	19,3	5:05	1,862	0,256
10 + 11 (0,476 ug/ml)	20,0	5:45	1,670	0,285
10 + 11 (0,476 ug/ml)	19,8	4:40	2,080	0,229
10 + 12 (0,455 ug/ml)	19,5	5:15	1,803	0,252
10 + 12 (0,455 ug/ml)	20,6	6:00	1,624	0,280
10 + 12 (0,455 ug/ml)	20,0	4:55	1,960	0,232

(1) Solución de 1 ug/ml

(2) Unidades ratón corregidas

(3) Factor de Conversión = (ug/ml)/URC

El FC (final) se obtiene del promedio de los FC parciales obtenidos de los resultados de cada inoculación (Tabla 6). Este valor (FC=0,264) se aplicará posteriormente en el cálculo de los niveles de toxina de las muestras problemas.

4.1.2. Muestras colectadas en junio.

Según se puede observar en la Tabla 7, en junio se recibieron 9 muestras de mariscos, presentando todas ellas resultados negativos.

Tabla 7.- Resultados de los análisis toxicológicos efectuados en muestras colectadas en junio de 1982.

Muestra (1) Nº	Localidad	Fecha		Especie	ug toxina/ 100 g carne
		c	a		
18	Islote Pan de Azúcar	18/6/82	1/7/82	M. chilensis	(-)
19	Estero Núñez	12/6/82	"	A. ater	(-)
20	Puerto Cutter	21/6/82	"	M. chilensis	(-)
21	Isla Cayetano	20/6/82	"	A. ater	(-)
22	Bahía Bell	20/6/82	"	M. chilensis	(-)
23	Estuario Fanny	22/6/82	"	A. ater	(-)
24	Isla Jorge Montt	22/6/82	"	A. ater	(-)
25	Seno Profundo	28/6/82	"	M. chilensis	(-)
26	Seno Brookes	28/6/82	"	A. ater	(-)

(1) Los números corresponden al orden del registro interno de muestras procesadas en Laboratorio.

c Fecha colecta
a Fecha análisis

De acuerdo a las localidades señaladas sólo 2 muestras (Nros. 24 y 25) corresponden a la provincia de Última Esperanza. La mayoría de las estaciones, (Nros. 18 al 23) pertenecientes a la provincia de Magallanes fueron muestreadas durante la expedición realizada a bahía Bell, por personal del Instituto de la Patagonia.

4.1.3. Muestras colectadas en febrero de 1981.

Durante 1981, se recibieron varias muestras, de parte del Servicio de Salud, con antecedentes tóxicos y que fueron mantenidas a temperaturas de -18°C en espera de poder poner en práctica el bioensayo. Estas, actualmente, ya fueron procesadas (obtención de los extractos) y corresponden a los números 1 a 17 de los registros internos del laboratorio; sin embargo, no se han efectuado las inoculaciones de todas ellas dada la escasa disponibilidad momentánea de ratones.

Se seleccionaron, para ser analizadas en primera instancia, dos muestras colectadas en febrero de 1981 en Seno Unión. Una de ellas (Nº 13) corresponde a la partida de cholgas que ocasionó las intoxicaciones masivas en Puerto Natales y que fue obtenida el 19 de ese mes. La Nº 14, se colectó el día 25 (Tabla 8).

Tabla 8.- Concentración de toxina en dos muestras colectadas en febrero de 1981 en Seno Unión.

Muestra Nº	Dilución Vol. extrac.† Vol. H ₂ O	Tiempo muerte (min:seg)	Peso ratón (g)	URC ⁽¹⁾	ug toxina/ 100g carne
14	0	1:10	19,9		
	1 + 2	1:40	18,7		
	1 + 4	3:00	20,5		
	1 + 6	2:40	19,6		
	1 + 9	4:40	19,1		
	1 + 10	3:00	19,0		
	1 + 15	4:15	19,2		
	1 + 20	5:40	21,0	1,741 ⁽²⁾	1.838
	1 + 20	6:05	18,5	1,520	
	1 + 20	4:05	18,7	2,320	

(continuación tabla 8)

Muestra Nº	Dilución Vol. extrac.+ Vol. H ₂ O	Tiempo muerte (min:seg)	Peso ratón (g)	URC ⁽¹⁾	ug toxina/ 100g carne
13	1 + 20	4:45	20,5		
	1 + 25	5:54	18,0	1,525 ⁽²⁾	
	1 + 25	5:42	18,0	1,572	2.158
	1 + 25	4:55	17,9	1,823	

(1) Unidad Ratón Corregida, calculado de tabla de Sommer (Apéndice 7.1)

(2) Mediana

Según se observa en la Tabla 8, para obtener el valor correcto de la toxicidad de la muestra Nº 14, se efectuó una serie de diluciones del extracto, hasta llegar a aquella (1 - 20) en que el tiempo de muerte fue superior a 5 min.

De acuerdo al método, el cálculo de los valores de Unidades Ratón Corregidos se realizó sólo en aquellas diluciones seleccionadas anteriormente (el resto de los valores no son considerados), y según señalan Adams y Miescier (1980), para el cálculo de la toxicidad en unidades de microgramos/ 100g de carne, se consideró sólo el valor de la mediana de las tres mediciones.

El mismo procedimiento se siguió para la muestra Nº 13, sin embargo, en este caso se comenzó con la muestra ya diluída (1 + 20); obteniéndose el valor correcto en una segunda dilución (1 + 25).

Cabe destacar la notable diferencia en los niveles de toxina de las dos muestras las que fueron colectadas con una diferencia de 6 días.

4.2. Composición del fitoplancton

4.2.1. Composición del fitoplancton en el contenido digestivo de los moluscos.

El análisis cualitativo de las muestras moluscos, permitió reconocer el predominio de las diatomeas sobre los otros grupos del fitoplanton (Tabla 9). El único dinoflagelado identificado, Heterocapasa triquetra, corresponde a una especie no tóxica.

En general, el número de especies presentes en cada muestra es variable (3 a 13 especies); y la mayor riqueza (número de especies) relativa correspondiente a las muestras colectadas en bahía Bell (Nº 22) y estero Núñez (Nº 19) con 3 y 11 especies, respectivamente.

Tabla 9.- Composición fitoplanctónica del contenido digestivo en cholgas y choritos.

Especies	Muestras Nros.									
	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
<u>Diatomeas</u>										
Amphora sp.							x	x		
Caloneis sp.		x								
Cocconeis costatum									x	
Cocconeis sp.		x			x				x	
Coscinodiscus spp.	x	x			x	x	x	x		
Diploneis spp.		x			x					
Fragilaria virescens					x			x	x	
Grammatophora marina		x			x					
Mastogloia sp.					x					
Melosira sp.					x					
Navicula spp.	x			x	x		x			x
Paralia sulcata				x	x				x	x
Pleurosigma sp.		x								
Podosira (?)		x	x							x
Rhabdonema minutum			x							x
Surirella sp.		x								
Synedra sp.	x	x	x		x	x	x	x	x	x
Thalassionema sp.	x	x	x			x			x	
<u>Dinoflagelados</u>										
Heterocapsa triquetra									x	
No Identificado					x					
<u>Silicoflagelado</u>										
Dictyocha sp.	x									
<u>Otros organismos</u>										
Restos algas filamentosas										x
Tintínidos				x	x					
Espículas	x	x	x	x	x		x			

x: Presente

4.2.2. Composición del fitoplancton de red.

El análisis cualitativo de las muestras de red colectadas en cada una de las estaciones fijas de Ba. Bell (Fig. 3), demuestra la presencia exclusiva de las diatomeas. En general, el fitoplancton es escaso, pero notablemente más rico en las estaciones localizadas en el sector interior de bahía Bell (C y D).

Tabla 10.- Composición cualitativa del fitoplancton de red colectado en las estaciones de bahía Bell.

Especies	Estaciones			
	A	B	C	D
Diatomeas:				
Bacillaria paxillifer				x
Chaetoceros convolutus	x			x
C. debilis			x	
C. decipiens	x			
Ditylum brightwellii				x
Fragilaria virescens		x		
Grammatophora marina			x	
Pleurosigma sp.			x	x
Podosira (?)			x	
Rhabdonema minutum			x	x
Skeletonema costatum			x	
Synedra sp.			x	x
Surirella sp.				x

x: Presente

5. DISCUSION

Debido a que el estudio de control toxicológico ha requerido, en su primera etapa, de la habilitación de un laboratorio adaptado a la realización del bioensayo y de un bioterio que permita la crianza y mantención de ratones, la información presentada se refiere en gran medida a estos aspectos; en cambio, los resultados de los controles taxicológicos de los mariscos y del análisis de muestras de plancton que se entregan, son escasos.

5.1. Programación del muestreo.

El estudio se ha restringido a las provincias de Ultima Esperanza y de Magallanes pero no por ello se descarta la posibilidad de analizar material provenientes de las otras provincias de la región. La elección de 25 estaciones primarias que debieran ser muestreadas periódicamente, podrá ser un número relativamente alto, pero dado a que es el inicio de un estudio de este tipo, la región en estudio, debe cubrirse lo mejor posible. Sólo después de algunos años de control permanente se podrán tener antecedentes suficientes como para seleccionar un menor número de estaciones fijas o programar un muestreo diferido. No hay que descartar la eventualidad de que contrariamente se requiera de un aumento en el número de las estaciones de muestreo.

Cabe recordar que el criterio aplicado para la actual selección de estaciones, se basó en los estudios realizados con

motivo de las mareas rojas ocurridas en 1972 y 1981 (Guzmán et al., 1975 y Lembeye 1981, respectivamente), los que permitieron identificar algunas áreas donde se detectó el Veneno Paralítico de los Mariscos. En el futuro, es recomendable incluir la provincia de Tierra del Fuego, y a lo menos, parte de la provincia Antártica por cuanto ambas incluyen sectores de permanente explotación de mariscos (e.g. Seno del Almirante y otros con antecedentes tóxicos (Guzmán et al., op. cit.)

El limitado presupuesto otorgado para la ejecución del estudio, la destinación de gran parte de él a la instalación del laboratorio y puesta en marcha del bioterio, por una parte; y el alto costo que significa el arriendo de embarcación por otra parte, obligó a dejar en manos de la Gobernación Marítima y de pescadores (artesanales, principalmente), la responsabilidad de coleccionar la mayor parte de las muestras de mariscos (cholgas y choritos); dejando a cargo del Instituto de la Patagonia el control periódico de las estaciones fijas en bahía Bell y seno Unión y la colecta de muestras de mariscos en sectores adyacentes a éstas.

Debido a este mecanismo de obtención de muestras, no está, asegurada ni la periodicidad ni la cobertura de todas las estaciones establecidas. Como la etapa de inicio del muestreo comenzó después del 11 de junio, a la fecha (aproximadamente 1 mes después), se han recepcionado pocas muestras (22 incluyendo las 6 colectadas por personal del Instituto de la Patagonia); por lo cual es prematuro analizar la eficiencia con que se está llevando a cabo el programa de muestreo.

No obstante a modo ilustrativo, cabe señalar que del total de muestras recepcionadas (22), sólo 6 corresponden a localidades primarias. Es decir, en un mes de trabajo, el muestreo programado se ha cumplido en un 27%.

Cabe destacar, sin embargo que la participación de la Armada y del sector pesquero, a la fecha, ha sido de amplia colaboración.

5.2. Funcionamiento del bioterio.

El bioterio diseñado ha estado destinado, hasta la fecha, a la mantención de los ratones; la crianza se ha visto postergada debido a la demora en la recepción de las jaulas. Se estima, sin embargo, que estarán disponibles en el laboratorio a fines del mes de julio.

De iniciarse en julio, cualquiera de las dos alternativas de reproducción planteadas, las primeras hembras disponibles para el bioensayo, se obtendrán a mediados de noviembre. Ello obliga, mientras tanto a un abastecimiento de ratones desde Santiago. El hecho que el bioterio comience a autoabastecerse en primavera (noviembre), período en que se recomendó intensificar la frecuencia del muestreo, hace aconsejable adoptar el sistema de producción alternativa B (120 ratones inicialmente, decreciendo en 20 ejemplares semanalmente) a fin de asegurar un mayor número de ratones inicialmente.

Sin embargo, aún cuando se tenga el bioterio funcionando en su máxima capacidad, las necesidades de ratones de acuerdo a las cifras estimadas para el caso de una marea roja, (85-135 ratones semanales) no alcanzan a ser satisfechas. En efecto, el bioterio, estaría proporcionando semanalmente 60 ratones (alternativa A) o 120 pero disminuyendo progresivamente hasta 60 (alternativa B). Es decir, el bioterio proveerá entre el 44 - 71% las necesidades de ratones, por lo cual durante este período deberá complementarse el abastecimiento a través de la compra de animales.

Cabe destacar que se obtiene un abastecimiento del 100% durante el período otoño-invierno.

A fin de estar preparado para la eventualidad de una marea roja, en el futuro deberá duplicarse, a lo menos, la capacidad potencial máxima del actual bioterio.

5.3. Técnica del bioensayo.

Con el propósito de poner en práctica el método del bioensayo, se efectuó la extracción en muestras colectadas durante 1981; y la inoculación en los ratones sólo en dos reconocidas como tóxicas (Nros. 13 y 14). A través de estos análisis se pudo constatar que el número de ratones requeridos en la muestra tóxica es alto pudiendo necesitarse fácilmente 10 ejemplares/muestra.

En las inoculaciones se tuvo especial cuidado al aplicar la inyección. El método de por sí tiene un error causado por

la imposibilidad de tener total uniformidad en los ratones que se utilizan (Prakash, et al., 1971) y si la inoculación no es correcta, el error introducido es mayor, aumentando las variaciones de una misma medición. Steward et al. (1968) señalan que el inocular en un lugar distinto a la cavidad peritoneal, es un error inherente a la técnica y no puede ser reducido por simple modificación del proceso. El error por este concepto, puede explicar los fracasos ocasionales y que pueden ser detectados sólo cuando se puede predecir el resultado. Cabe mencionar, a modo de ejemplo, que cuando se efectuaron las inoculaciones con la solución estandar (y también con la muestra N^o 13), en que a priori se sabía debía originar la muerte en la rata, hubo sobrevivientes. Este hecho se puede atribuir a una mala inoculación (con eventual pérdida de extracto) y/o también a probables diferencias en los individuos. Esta posibilidad de error debe tenerse en cuenta al interpretar los resultados, en especial si se trabaja con un bajo número de ratones. Una manera de reducir al mínimo tales errores es efectuar varias inoculaciones para una misma muestra.

5.4. Resultados.

Era razonable esperar que los resultados del bioensayo de las muestras colectadas durante junio fueran negativos, por cuanto las apariciones del VPM ocurren de preferencia durante la primavera y el verano.

Las observaciones microscópicas realizadas tanto en las muestras de mariscos como las de red (en bahía Bell) demuestran

el predominio casi exclusivo de las diatomeas, característica por lo demás propia del plancton de invierno y que se constató también al analizar, microscópicamente, los tractos digestivos de las muestras de mariscos colectadas durante 1981 (Lembeye, 1981 b).

Por otra parte, la mayor abundancia de especies registradas en las muestras colectadas en el interior de bahía Bell (estaciones C y D) coincide con la situación detectada anteriormente por Lembeye et al. (1975) en este sector.

Un análisis detallado de la composición y abundancia del fitoplancton y de su relación con la temperatura y salinidad del agua, se presentará en el informe final.

LITERATURA CITADA

- ADAMS, W.N. y J.J. MIESCIER, 1980. Fish and other marine products. Commentary on AOAC Methods for Paralytic Shellfish Poisoning. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63 (6): 1336-1343.
- GUZMAN, L. e I. CAMPODONICO, 1975. Marea Roja en la Región de Magallanes. Public. Inst. Pat., Ser. Monografías Nº 9, 44 p.
- GUZMAN, L., I. CAMPODONICO y M. ANTUNOVIC, 1975. Estudios sobre un florecimiento tóxico causado por Gonyaulax catenella en Magallanes. IV.- Distribución y niveles de toxicidad del Veneno Paralítico de los Mariscos (noviembre de 1972-noviembre de 1973). ANS. INST. PAT., Punta Arenas (Chile), 6 (1-2): 209-224.

- LEMBEYE, G., 1981 a. Segunda aparición del Veneno Paralítico de los Mariscos (VPM) asociado a la presencia de Gonyaulax catenella, en Magallanes (1981). ANS. INST. PAT., Punta Arenas (Chile) 12 (en prensa).
- LEMBEYE, G., 1981 b. Plan de Emergencia Marea Roja Tóxica XII Región, 1981. Cuantificación del dinoflagelado Gonyaulax catenella en el tracto digestivo de moluscos filtradores. I.I.P. 8, 29 p.
- LEMBEYE, G., L. GUZMAN e I. CAMPODONICO, 1975. Estudios sobre un florecimiento tóxico causado por Gonyaulax catenella en Magallanes. III.- Fitoplancton asociado. ANS. INST. PAT., Punta Arenas (Chile), 6 (1-2):197-208.
- PRAKASH, A., J. MEDCOF y A. TENNANT, 1971. Paralytic Shellfish Poisoning in eastern Canada. Bull. Fish. Res. Bd. Canada, 177: 1-87.
- STEWART, J.P., E.P. ORNELLAS, K.D. BEERNINK y W.H. NORTHWAY, 1968. Errors in the Technique of Intraperitoneal Injection of Mice. Applied Microbiology, 16 (9): 1418-1419.

7. APENDICE

7.1. Tabla de Sommer

(Traducida de Prakash et al., 1971)

1.- Relación de Tiempo de muerte: Unidad ratón para Veneno Paralizante de los Mariscos. (ácido).

Tiempo de muerte ^x	Unid. Ratón	Tiempo de muerte	Unid. Ratón
1:00	100	5:00	1,92
10	66,2	05	1,89
15	38,3	10	1,86
20	26,4	15	1,83
25	20,7		
30	16,5	20	1,80
35	13,9	30	1,74
40	11,9	40	1,69
45	10,4	45	1,67
50	9,33	50	1,64
55	8,42		
2:00	7,67	6:00	1,60
05	7,04	15	1,54
10	6,52	30	1,48
15	6,06	45	1,43
20	5,66	7:00	1,39
25	5,32	15	1,35
30	5,00	30	1,31
35	4,73	45	1,28
40	4,48		
45	4,26	8:00	1,25
50	4,06	15	1,22
55	3,88	30	1,20
		45	1,18
3:00	3,70		
05	3,57	9:00	1,16
10	3,43	30	1,13
15	3,31		
20	3,19	10:00	1,11
25	3,08	30	1,09
30	2,98		
35	2,88	11:00	1,075
40	2,79	30	1,06
45	2,71		
50	2,63	12:00	1,05
55	2,56	13:00	1,03
		14:00	1,015
4:00	2,50	15:00	1,000
05	2,44	16:00	0,99
10	2,38	17:00	0,98
15	2,32	18:00	0,972
20	2,26	19:00	0,965
25	2,21	20:00	0,96
30	2,16	21:00	0,954
35	2,12	22:00	0,948
40	2,08	23:00	0,942
45	2,04	24:00	0,937
50	2,00	25:00	0,934
55	1,96	30:00	0,917
		40:00	0,898
		60:00	0,875

x Minutos: segundos

2 - Tabla de correcciones del peso de las ratas.

Peso del ratón (g)	Unidades ratón	Peso del ratón (g)	Unidades ratón
10	0,50	17	0,88
10,5	0,53	17,5	0,905
11	0,56	18	0,93
11,5	0,59	18,5	0,95
12	0,62	19	0,97
12,5	0,65	19,5	0,985
13	0,675	20	1,000
13,5	0,70	20,5	1,015
14	0,73	21	1,03
14,5	0,76	21,5	1,04
15	0,785	22	1,05
15,5	0,81	22,5	1,06
16	0,84	23	1,07
16,5	0,86		

7.2. Instrucciones colecta muestra de mariscos.

- Las muestras de mariscos podrán ser de cholgas o choritos.
- Cada bolsa plástica (doble) se utilizará para una muestra.
- Cada muestra consistirá aproximadamente de 15 ejemplares si es de cholga o de 20 a 30 ejemplares si es de chorito.
- Antes de introducir la muestra de marisco en la bolsa, saque la etiqueta de cartulina y complete los datos que en ella se solicitan. Utilice lápiz de grafito (de mina).
- Doble y guarde la etiqueta entre las dos bolsas plásticas.
- Ponga los ejemplares de la muestra en la bolsa plástica.
- Cuide de que no quede demasiado llena como para impedir cerrarla.
- Cierre la bolsa haciendo un nudo.
- Entregue las muestras en la Gobernación Marítima o en el Instituto de la Patagonia.

7.3. Registro de muestras recepcionadas desde el inicio del estudio hasta la fecha de redacción del informe (1^a de junio - 15 julio).

Nº registro	Fecha recepción en Laboratorio	Especie	Localidad	Fecha muestreo	Embarcación
18	22/6/82	Mytilus chilensis	Costa P. de Brunswick, frente islote Pan de Azúcar (53°20'S, 73°45'W)	18/6/82	Cutter San Cristóbal
19	22/6/82	Aulacomya ater	Interior estero Núñez (53°18'S; 72°29'W)	12/6/82	Cutter San Cristóbal
20	22/6/82	M. chilensis	Puerto Cutter (53°22'S; 72°25'W)	21/6/82	Cutter San Cristóbal
21	22/6/82	M. chilensis y A. ater	Punta Elvira, isla Cayetano (53°50'S; 72°01'W)	20/6/82	" "
22	22/6/82	M. chilensis	Fondo de bahía Bell (53°56'S; 71°48'W)	20/6/82	" "
23	22/6/82	A. ater	Entrada estuario Fanny (53°10'S; 72°10'W)	22/6/82	" "
24	25/6/82	M. chilensis	Isla Jorge Montt (51°20'S; 74°45'W)	22/6/82	PAM "Norase"
25	29/6/82	M. chilensis	Seno Profundo (52°41'S; 73°45'W)	28/6/82	M 373 "Alejandra"
26	1/7/82	A. ater	Seno Brooks (54°20'S; 69°55'W)	28/6/82	"Austral"
27	2/7/82	M. chilensis	Puerto Riquelme, Golfo Almirante Montt (51°59'S; 74°18'W)	29/6/82	Cutter "Elizabeth"
28	2/7/82	A. ater	Fiordo Nevada (53°30'S; 72°50'W)	1/7/82	"Arco Iris" 520
29	2/7/82	A. ater	Isla Diego, (?)	3/7/82	"Sarmiento" 265
30	4/7/82	A. ater	Estuario Sulliva, I. Riesco (53°15'S; 72°30'W)	27/6/82	"Dos Océanos" 400
31	4/7/82	M. chilensis	Pta. Pichintún, estuario Fanny (53°09'S; 72°09'W)	27/6/82	"Dos Océanos" 400
32	4/7/82	M. chilensis	Carlos III (53°40'S; 72°20'W)	2/7/82	"Arco Iris" 520
33	7/7/82	A. ater	Bahía Paulina, costa N paso Largo (53°24'S; 72°49'W)	6/7/82	"Guardian Brito" 13
34	7/7/82	A. ater	Seno Brooks (54°20'S; 69°55'W)	2/7/82	"Venus"
35	12/7/82	A. ater	Ang. Pomar (54°50'S; 70°30'W)	10/7/82	"Akade"
36	10/7/82	A. ater	Seno Borcosky (?)	8/7/82	"Carmer" 56
37	12/7/82	M. chilensis	Pto. Fanny (isla Steward) (54°52'S; 71°02'W)	10/7/82	"Akade"
38	14/7/82	A. ater	Isla Jorge Montt (51°12'S; 74°45'W)	7/7/82	"Zeebrugge"
39	14/7/82	A. ater	Pto. Zenteno estrecho de Magallanes (52°46'S; 70°47'W)	13/7/82	"Nieve" 476