





**CONSEJO DIRECTIVO DEL IMARPE**

*Vicealmirante (r) FERNANDO JIMÉNEZ ROMÁN*  
PRESIDENTE

*Ingeniero Pesquero ÁLVARO VALDEZ FERNÁNDEZ-BACA*  
VICEPRESIDENTE

*Economista GODOFREDO CAÑOTE SANTAMARINA*  
DIRECTOR EJECUTIVO

*Doctor LUIS ALFREDO ICOCHEA SALAS*  
DIRECTOR

*Biólogo ROGELIO VILLANUEVA FLORES*  
DIRECTOR

*Ingeniero Pesquero CÉSAR CHÁVEZ NAVARRO*  
DIRECTOR

*Contralmirante HÉCTOR SOLDI SOLDI*  
DIRECTOR



ISSN 0378 - 7702

INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ

# INFORME

Nº 161

Junio, 2001

## Manual Introductorio de Ecotoxicología Acuática

*Guadalupe Sánchez Rivas y Giovanna Vera Diego*

Callao, Perú

**Asesora científica**

*Dra. Norma Chirichigno Fonseca*

**Editor científico**

*Dr. Pedro G. Aguilar Fernández*

© 2001. Instituto del Mar del Perú

*Esquina Gamarra y General Valle*

*Apartado Postal 22*

*Callao, PERU*

*Teléfono 429-7630 / 420-2000*

*Fax (511) 465-6023*

*E-mail: imarpe@imarpe.gob.pe*

*Hecho el depósito de ley N° 2002-508*

*Reservados todos los derechos de reproducción total  
o parcial, la fotomecánica y los de traducción.*

*ISSN: 0378-7702 (International Center for the Registration of Serials, Paris).*

*Impresión: Fimart S.A.C.*

*Av. Del Río 111 - Pueblo Libre*

*Teléfono: 424-0662 / 424-0547 / 424-4503*

*Tiraje: 400 ejemplares.*

*Terminado de imprimir marzo 2002*

Portada: Vistas del monitoreo biológico, pruebas de toxicidad y organismos-prueba

Grupo de fotos: Bióloga GIOVANNA VERA DIEGO

# MANUAL INTRODUCTORIO DE ECOTOXICOLOGÍA ACUÁTICA

## INFORME N° 161

---

### CONTENIDO

RESUMEN .....	7
ABSTRACT .....	7
1. Introducción .....	7
2. Conceptos básicos en ecotoxicología acuática .....	8
3. Procedimientos generales para realizar una prueba de toxicología acuática .....	10
3.1 Criterios básicos para pruebas de toxicidad acuática .....	10
3.2 Criterios para la selección de organismos-prueba .....	10
3.3 Colecta, transporte, acondicionamiento y aclimatación de los organismos-prueba .....	10
3.4 Preparación de las soluciones stock y concentraciones experimentales .....	10
3.4.1 Sustancias miscibles .....	10
3.4.2 Sustancias no miscibles .....	11
4. Pruebas de toxicidad acuática .....	11
4.1 Tipo de pruebas de toxicidad acuática .....	11
4.1.1 Prueba estática .....	11
4.1.2 Prueba con renovación .....	11
4.1.3 Prueba de flujo continuo .....	11
4.1.4 Prueba de tanteo (Screening Test) .....	11
4.1.5 Prueba de bioacumulación .....	11
4.1.6 Prueba de bioestimulación .....	12
4.1.7 Prueba de cronicidad o subletalidad .....	12
4.2 Tiempo de exposición de las pruebas de toxicidad .....	12
4.2.1 Prueba de corta duración .....	12
4.2.2 Prueba de larga duración .....	12
4.3 Variables ambientales de control en las pruebas de toxicidad .....	12
4.4 Lectura de las respuestas .....	12
5. Procesamiento de la información .....	13
5.1 Métodos estadísticos .....	13
5.2 Archivo de resultados .....	14
5.2.1 Formulario para la colecta de muestras biológicas .....	14
5.2.2 Formulario para la colecta del agente tóxico (efluentes industriales, domésticos, etc) .....	14
5.2.3 Formulario para el registro de respuestas durante las pruebas de toxicidad y de parámetros fisicoquímicos .....	14

---

5.2.4 Formulario para el registro de fertilización en <i>Arbacia spatuligera</i> .....	14
5.3 Informe de resultados .....	14
6. Protocolos para la ejecución de pruebas de toxicidad con organismos marinos seleccionados del litoral peruano .....	15
6.1 Protocolo para el manejo y ejecución de pruebas de toxicidad con invertebrados marinos .....	15
6.1.1 EQUINODERMOS : Gametos de <i>Arbacia spatuligera</i> "erizo marrón" .....	15
6.1.2 CRUSTÁCEOS : Larvas zoea I de <i>Emerita analoga</i> "muy muy" .....	19
6.1.3 MOLUSCOS : Semillas de <i>Argopecten purpuratus</i> "concha de abanico" .....	22
6.2 Protocolo para el manejo y ejecución de pruebas de toxicidad con vertebrados marinos .....	25
6.2.1 PECES : Postlarvas de <i>Odontesthes (Austromenidia) regia regia</i> "pejerrey" .....	25
7. Referencias .....	28
Anexo 1. Cultivos de microalgas .....	30
Anexo 2. Obtención de nauplios de artemia .....	31
Anexo 3. Pruebas de toxicidad con gametos del "erizo marrón" <i>Arbacia spatuligera</i> .....	32
Anexo 4. Pruebas de toxicidad con larvas zoea I del "muy muy" <i>Emerita analoga</i> .....	33
Anexo 5. Pruebas de toxicidad con semillas de "concha de abanico" <i>Argopecten purpuratus</i> .....	34
Anexo 6. Pruebas de toxicidad con larvas del "pejerrey" <i>Odontesthes regia regia</i> .....	35
Anexo 7. Formulario para colecta de muestras biológicas para su utilización como organismo-prueba .....	36
Anexo 8. Formulario para la colecta del agente tóxico utilizado en pruebas de toxicología acuática .....	37
Anexo 9. Formulario para el registro de sobrevivencia durante las pruebas de toxicidad y de parámetros fisicoquímicos .....	38
Anexo 10. Formulario para el registro de fertilización en <i>Arbacia spatuligera</i> .....	40

# MANUAL INTRODUCTORIO DE ECOTOXICOLOGÍA ACUÁTICA

Guadalupe Sánchez Rivas<sup>1</sup> y Giovanna Vera Diego<sup>2</sup>

## RESUMEN

SÁNCHEZ, G. Y G. VERA. 2000. Manual Introductorio de Ecotoxicología Acuática. Inf. Inst. Mar Perú 161. 40 pp.

En este Manual se presentan métodos revisados de pruebas de toxicidad utilizados por agencias ambientales extranjeras, los cuales han sido adaptados empleando organismos que habitan el mar peruano. Se presenta la recopilación de las experiencias propias realizadas mediante la estandarización de protocolos que se han venido desarrollando desde 1988 en el Instituto del Mar del Perú.

Estas pruebas de toxicidad están basadas en la Ecotoxicología, disciplina científica que estudia la respuesta cuantificable de los organismos a la alteración del medio acuático a diferentes niveles de concentración del agente perturbador.

También se dan los conceptos y técnicas esenciales para el establecimiento de criterios y estándares de la calidad del medio acuático para la conservación y protección de la biota y prever el riesgo de la salud humana.

PALABRAS CLAVES: manual, ecotoxicología acuática, pruebas de toxicidad, mar peruano.

## ABSTRACT

SÁNCHEZ, G. Y G. VERA. 2000. Introductory Manual of Aquatic Ecotoxicology. Inf. Inst. Mar Perú 161. 40 pp.

This Manual presents revised methods of toxicity tests used by environmental agencies abroad. The methods have been adapted using organisms that inhabit the Peruvian sea. The summary of our own experiences developed since 1988 in the Instituto del Mar del Perú by the standarization of protocols is also included.

The ecotoxicology is the scientific discipline which studies the quantitative response of organisms to the alteration of the aquatic environment caused by different concentrations of the disturbing agent.

The concepts and essential techniques to establish criteria and quality standards of the aquatic environment for the conservation and protection of the biota, and to foresee the risk to the human health, are also given.

KEYWORDS: manual, aquatic ecotoxicology, bioassays, methods of toxicity tests, Peruvian sea.

## 1. INTRODUCCIÓN

La realización de bioensayos o pruebas de toxicidad para determinar el efecto de compuestos antropogénicos, viene proporcionando información valiosa para establecer el impacto potencial de contaminantes en el medio marino. Estas pruebas de toxicidad aguda o crónica son pilares importantes en el proceso de evaluación de los riesgos ambientales (WARRREN 1971), provocados en el ambiente acuático por la acción de sustancias químicas, efluentes y desechos de la actividad del hombre.

En el pasado se han utilizado muchos tipos de bioensayos desde una simple prueba de corta duración hasta los experimentos sofisticados de larga duración. Es recién en la década de los 70 cuando se efectuaron esfuerzos para utilizar técnicas apropiadas para estandarizar los procedimientos de estas pruebas (FAO 1977, Foster 1981). En 1977, la agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (USEPA) propuso los criterios de calidad del agua, dándose la Ley del Agua Limpia (Water Clean Act) ba-

sada en la respuesta de los organismos acuáticos a contaminantes tóxicos.

Posteriormente, los trabajos de BELLAN (1981), CPPS y PNUMA (1985), PNUMA/CPPS/WG (1988), la USEPA (1988a, 1988b, 1989), entre otros, dieron las pautas para establecer métodos mejorados que fueron con especies que tuvieron una clara respuesta a las pruebas y, por consiguiente, alcanzaron resultados con alta confiabilidad. En la década de los 90 y 2000 los estudios estuvieron más focalizados en determinar los efectos subletales o crónicos con trabajos relacionados a la bioacumulación de elementos contaminantes durante periodos variables de tiempo, relacionándolos con el tamaño de los organismos y las diferentes partes del cuerpo (ABLANEDO *et al.* 1990, GILEK *et al.* 1996). Otras evaluaciones que también están utilizando estas pruebas de toxicidad son las concernientes a efluentes de industrias químicas y metálicas (YANG *et al.* 1999), de hidrocarburos de petróleo (BARRÓN *et al.* 1999) y de origen pesquero (SÁNCHEZ *et al.* 2001).

<sup>1</sup> Unidad de Monitoreo y Gestión Marino Costera (UMGMC) DIAGC y AC. IMARPE.

<sup>2</sup> Línea de investigación en Ecotoxicología Acuática. UMGMC-DIAGC y AC. IMARPE.

Aunque el término *bioensayo y pruebas de toxicidad* no son sinónimos, en la práctica son usados con el mismo sentido. El término **bioensayo** es el más antiguo y hay más definiciones como la de RANDALL Y PETROCELLI (1985, en HUNN 1989) donde se describe como un evaluador de la toxicidad de un químico comparando sus efectos sobre un organismo vivo, contrastándolo con un estándar con el mismo organismo, su aplicación es referencial de hormonas o de toxicidad. Los mismos autores han definido a una **prueba de toxicidad** como el medio usado para determinar la toxicidad de un químico u otro material prueba. Cabe resaltar que estas pruebas de toxicidad se basan en los principios de la ecotoxicología acuática, como se explica en este manual, por lo que también se puede definir a estos ensayos como la medición del grado de respuesta de un organismo-prueba expuesto a un químico o a un efluente específico.

También es importante enfatizar que la información obtenida durante las pruebas agudas y crónicas en laboratorios, con métodos y protocolos estandarizados, pueden aplicarse durante el proceso de toma de decisiones tales como:

a) Fijar criterios sobre calidad del agua para la vida de organismos, y con ello establecer estándares de calidad acuática, así como los límites permisibles de emisión de contaminantes;

b) Caracterizar y controlar efectos tóxicos agudos y crónicos de la contaminación sobre organismos vivos, tanto en efluentes como en aguas receptoras de desechos industriales y domésticos;

c) Establecer vigilancia o biomonitoreo que permitan obtener información continua acerca de la calidad de efluentes.

Sin embargo, un aspecto muy importante a tener en cuenta para el éxito de estas pruebas, se refiere a la necesidad de perfeccionar las técnicas de cultivos de organismos en diferentes etapas del ciclo de vida, que asegure un adecuado suministro de animales u organismos prueba, como bien lo señala FOSTER (1981) cuando describe el uso de larvas de almejas asiáticas en evaluaciones de riesgo acuático.

Por lo expuesto, este Manual tiene como principal objetivo dar a conocer las técnicas y métodos aplicados en el campo de la Ecotoxicología Acuática, mediante la aplicación de las pruebas o bioensayos de toxicidad. Asimismo, se ha tomado en cuenta la metodología utilizada por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, e igualmente se han desarrollado protocolos basados en las propias experiencias obtenidas en el laboratorio de Ecofisiología y Ecotoxicología ubicado en el acuario del IMARPE.

## 2. CONCEPTOS BÁSICOS EN ECOTOXICOLOGÍA ACUÁTICA

**La Ecotoxicología** es una disciplina de las ciencias ambientales que estudia el efecto que causa un agente tóxico o nocivo sobre los ecosistemas. Las alteraciones ambientales producidas pueden ser evaluadas y cuantificadas, mediante respuestas que se observan a través de los bioensayos o pruebas de toxicidad.

El campo de la ecotoxicología comprende el ciclo completo de la contaminación, incluyendo el estudio de las fuentes de emisión de contaminantes, su naturaleza (características espaciales y temporales), así como el seguimiento de las transformaciones ambientales por sustancias introducidas (degradación, cambios metabólicos) (LARRAÍN 1995). Igualmente, se ocupa de las interacciones entre éstas y los seres vivos, como por ejemplo la bioacumulación en los tejidos de los organismos.

Las fuentes de contaminación de origen terrestre han sido descritas por BELLÁN (1981), y posteriormente en 1995, el Programa de Acción Mundial toma la estructura de esta clasificación para los diagnósticos ambientales marinos y dulceacuícolas. Por otro lado, se dan definiciones a los términos usados en la ecotoxicología que puedan ser orientadoras en los trabajos de esta especialidad. Se alcanzan los siguientes conceptos:

**Fuentes puntuales o fijas.** Cuando la descarga siempre ocurre en un mismo punto (ejemplo: efluentes domésticos urbanos, efluentes industriales). Las descargas son continuas e intermitentes.

**Fuentes de localización variable.** Se diferencia de la anterior en que la descarga varía geográficamente en el punto de emisión, y el área puede variar en tamaño. Las descargas pueden ocurrir intermitentemente, ocasionalmente o accidentalmente; en este último caso no son previsibles, ocurriendo en algún lugar o a cualquier hora. Por ejemplo: barcos, aeronaves, plataformas marinas, diques, entre otros.

**Fuentes difusas.** En ellas están considerados los ríos, efluentes, y la precipitación radioactiva nuclear atmosférica, la cual juega una parte activa de los contaminantes del medio ambiente.

**Efecto.** Es un cambio biológico determinado, producido por el tóxico, el cual es observable mediante técnicas biológicas o bioquímicas a nivel celular, tisular, de órgano u organismos.

**Respuesta.** Es la parte de la población-muestra o experimental afectada por el tóxico. Aunque hay proposiciones en este sentido, ambos términos, respuesta y efecto, se usan como sinónimos en la literatura especializada.

**Agente tóxico.** Es cualquier agente que introducido en un organismo y absorbido provoca efectos sistémicos o locales, considerados nocivos para dicho organismo.



Los agentes tóxicos pueden ser: químicos, físicos y biológicos, siendo peligrosos para el hombre y los ecosistemas. Producen daños estructurales, alteraciones bioquímicas o fisiológicas e incluso la muerte, dependiendo de su concentración y del tiempo de exposición.

Estos efectos se determinan mediante pruebas de toxicidad o bioensayos. Las pruebas de laboratorio permiten medir el efecto de uno o más contaminantes en una o más especies de organismos. Las pruebas son conducidas en varios espacios de tiempo, siendo de 96 horas la prueba más común. El organismo está expuesto a concentraciones incrementadas de un agente tóxico con el objetivo de determinar algunos cambios producidos. Esto se puede evidenciar con la muerte del organismo como criterio de respuesta en pruebas de corta duración.

**Toxicidad.** Es la capacidad de una sustancia para causar una lesión o alteración del metabolismo en un organismo vivo. Este concepto está ligado a varios aspectos que se debe tener en cuenta, como la cantidad del tóxico, la vía de administración, la dosificación en el tiempo, el tipo y gravedad de efecto producido.

**Efecto agudo.** Es el cambio que ocurre después de una exposición de 48 o 96 horas.

En los bioensayos de toxicidad aguda, se deberá tener especial cuidado en la definición de un criterio para indicar la muerte, considerando que en los ensayos muchas veces existe la dificultad para precisar si los individuos aún tienen señal de vida. El documento PNUMA-CPPS/WG (1988) al respecto señala que "existe un gran número de variables biológicas como respuestas que pueden ser seleccionadas como indicativas del efecto de un contaminante sobre los organismos marinos". Unas pueden tener más relevancia que otras con respecto al tipo de contaminante, y éstas generalmente varían desde ecosistemas a niveles enzimáticos.

**Efecto crónico.** Es el cambio que ocurre después de una exposición a largo plazo (no menor de 7 días), a menudo del orden de la décima parte de la vida media de la especie (CRITES Y TCHOBANOGLOUS 2000).

**Concentración letal media o LC50.** Es definida como la concentración estimada de contaminante que ocasiona la muerte al 50% de organismos en un periodo de tiempo determinado (e.g. 96 h, LC50).

**Concentración efectiva media o CE50.** Es la concentración estimada de contaminante que causa un efecto específico al 50% de organismos en un periodo de tiempo determinado (e.g. 96 h CE50). Estos experimentos son conducidos bajo condiciones controladas de laboratorio. Se emplean para esta cuantificación conceptos como NOEC o CENO (concentración de efectos no observables), y LOEC o CEMO (menor concentración que produce efectos observables).

Es de importancia señalar que la expresión de la toxicidad se da en unidades tóxicas la cual se mide a partir del LC50 y del NOEC.

**Los valores de cronicidad (VC).** Son la media geométrica de la CENO y CEMO resultantes de ensayos practicados en ciclos parciales y completos, y ensayos realizados con especies en sus primeras etapas de vida (CRITES Y TCHOBANOGLOUS 2000).

**Tóxico de referencia.** Es una sustancia química utilizada en bioensayos de toxicidad, cuyo efecto en los organismos, a determinadas concentraciones, es conocido y por lo tanto, permite establecer el estado de respuesta de los organismos de prueba empleados, así como comparar los resultados intra e inter laboratorios. El uso de estos tóxicos, proporciona también una evaluación general de la precisión (estabilidad y reproducibilidad) del método a través del tiempo (SECRETARÍA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL 1995).

**Estándares de calidad de agua,** o concentraciones máximas (stream standards) o mínimas permisibles (effluent standards) en el ambiente. Estos estándares deberán resultar de CRITERIOS DE CALIDAD DE AGUA, que son, en general, descripciones de los valores máximos o mínimos de algunas características físicas, químicas y biológicas del agua que reflejan las tolerancias y requerimientos de la biota acuática (THRURTON *et al.* 1979 en LARRAÍN, 1995) o en forma más específica, concentraciones máximas o niveles máximos de alguna característica que, sobre la base de datos científicos, no causarán efectos apreciables sobre un sistema acuático o sus usuarios (SPRAGUE 1990, en LARRAÍN 1995). Estos criterios pueden también aplicarse a los diversos usos de una determinada clasificación del agua. Asimismo, estas definiciones son utilizadas ampliamente en el desarrollo de las actividades tendientes a la determinación de los estándares de calidad acuática.

### 3. PROCEDIMIENTOS GENERALES PARA REALIZAR UNA PRUEBA DE TOXICOLOGÍA ACUÁTICA

#### 3.1 Criterios básicos para pruebas de toxicidad acuática

- a) Deben ser sensitivas y de posibles efectos predictivos para un amplio rango de sustancias químicas.
- b) Deben predecir efectos tanto letales como subletales.
- c) Deben tener una base estadística fundamentada y que pueda ser repetida en diferentes laboratorios con resultados similares.
- d) Deben ser ampliamente aceptadas por la comunidad científica
- e) Deben ser económicas y de fácil conducción.

#### 3.2 Criterios para la selección de organismos-prueba

- a) Incluir organismos de diferentes grupos taxonómicos, que involucren especies de importancia ecológica y económica.
- b) Organismos de fácil manejo en cultivos y mantenimiento en laboratorio durante el mayor tiempo del año.
- c) Organismos con tallas razonables para ser utilizados en las pruebas.
- d) Deben ser de amplia distribución geográfica en el litoral peruano, abundantes y de fácil disponibilidad.
- e) De ser posible, organismos propios de la zona.

El número de individuos utilizados para ser expuestos en cada concentración varía según los autores. Se recomienda un mínimo de 10 individuos por concentración, pero en la literatura y experimentos realizados, sugieren que este número sea entre 5 y 50.

En general, la decisión respecto al número puede basarse en la disponibilidad de individuos de cada especie, su tamaño, la homogeneidad de la población en el ambiente natural y la facilidad de su manejo y mantenimiento.

Efectuar pruebas de sensibilidad con los organismos seleccionados, utilizando una muestra de la población antes de realizar las pruebas de toxicidad. Para estas pruebas se sugiere utilizar reactivos de referencia: dicromato de potasio, sulfato de cobre o cloruro de cobre, entre otros.

#### 3.3 Colecta, transporte, acondicionamiento y aclimatación de los organismos-prueba

La colecta, transporte, acondicionamiento y aclimatación dependerán del tamaño, tipo de organismos seleccionados, así como de la distancia donde se realizó la

captura hasta el laboratorio.

Los organismos deben ser tratados con cuidado tanto en la colecta como en el transporte; la colecta debe ser realizada en lo posible manualmente, y deben rechazarse individuos que resulten lesionados. Así también, evitar mezclar organismos colectados en diferentes localidades.

Durante el transporte es necesario tener en cuenta que el agua de los recipientes que contienen los organismos se encuentre oxigenada, para lo cual debe evitarse la exposición prolongada al sol y, de ser posible, llevar bombas aireadoras a batería.

Además, tener en cuenta lo siguiente:

Durante el transporte los recipientes deben contener agua con características similares a las del medio donde fueron obtenidos los organismos y, si esto no es posible, se deben ajustar las variables de temperatura y la salinidad a estas condiciones.

Los organismos deberán aclimatarse en el laboratorio una semana como tiempo mínimo, y diariamente se controlará la temperatura, el oxígeno, pH y salinidad.

El acondicionamiento de los organismos deberá realizarse en forma inmediata al llegar al laboratorio, donde se proveerá de recipientes con capacidad calculada para el número y peso de los ejemplares, así como tener el alimento listo para proporcionarles después de las 24 horas de su estabulación.

Asimismo, se tendrá preparada la línea de aireación, la cual se instala de manera previa al agua enriquecida obtenida, con el fin de recepcionar los individuos para la prueba.

Se evitará cambios bruscos de temperatura del agua, para la cual los tanques deberán colocarse en ambientes con temperatura controlada.

#### 3.4 Preparación de las soluciones stock y concentraciones experimentales

##### 3.4.1 Soluciones miscibles.

En la preparación de las soluciones patrón (Stock) con el agente tóxico, se recomienda que las soluciones para las pruebas se preparen horas antes del inicio de la prueba, y debe asegurarse que todos los elementos químicos (e.g. metales) se hayan disueltos; en el caso de presentarse un precipitado, se descartará la solución o se filtrará, para separar el precipitado.

Después de filtrar la sustancia que se va probar, deberá verificarse la concentración del soluto, mediante métodos analíticos.

El rango de concentraciones dependerá del agente tóxico que se ensaya, generalmente se utiliza una prueba preliminar (o screening test) y los organismos se exponen a un

rango amplio de concentraciones en progresión logarítmica (0,01; 0,1; 1,0; 10 y 100 ppm). En este rango debe haber concentraciones que causen la mortalidad al 100% de los individuos y la sobrevivencia al 100% en los valores extremos.

Una vez establecido el rango preliminar es posible diseñar el ensayo definitivo, el cual deberá ofrecer concentraciones en una bisección progresiva de la escala logarítmica (1,0; 3,2; 5,5; 10,0; 32,0; 56,0 etc.) o una simple escala aritmética, dependiendo de la pendiente de la curva de toxicidad presuntiva. Es conveniente realizar al menos tres réplicas (con sus respectivos controles) por concentración, a fin de determinar el límite de 95% de confianza para cada serie y permitir la comparación estadística de los valores de la CL50 para determinar si hay diferencias significativas entre cada réplica.

### 3.4.2 Sustancias no miscibles

En el caso de sustancias no miscibles, es frecuente

que la sustancia a ensayar no sea perfectamente miscible en el agua y que forme una película sobre la superficie. En este caso se deberá mezclar el agua de dilución con el contaminante en cuestión, agitando vigorosamente. Una vez establecido el equilibrio entre el compuesto disuelto y el agua de dilución, se puede iniciar el ensayo previa determinación instrumental de la concentración en que se encuentra el compuesto; en la mayoría de los casos previamente se filtrará la solución.

En el caso de no existir suficiente información para establecer el rango de concentraciones requeridas en el ensayo definitivo, se recomienda repetir el mismo procedimiento, ya sea introduciendo concentraciones intermedias en el rango o ampliándolo.

Sólo en caso que sea sumamente indispensable utilizar un solvente para disolver en el caso de contaminantes químicos, y al usarlo no agregue más de 0,5 ppm, el solubilizador debe escogerse cuidadosamente para asegurar que su contribución a la toxicidad del sistema sea mínima.

## 4. PRUEBAS DE TOXICIDAD ACUÁTICA

### 4.1 Tipo de pruebas de toxicidad acuática

#### 4.1.1 Prueba estática

Este tipo de bioensayo, se efectúa con la misma solución durante toda la prueba y es de corta duración. La prueba generalmente es de 96 horas. Las condiciones más importantes para conducir la prueba son:

Los acuarios o contenedores no deben restringir o limitar la habilidad de los organismos para desplazarse libremente.

El volumen final para las pruebas en el cual incluye el contaminante no debe afectar el nivel adecuado de oxígeno disuelto; por ello es importante controlar los tenores de oxígeno del agua.

La temperatura del agua de mar debe ser controlada a lo largo de todo el bioensayo y debe ser constante en  $\pm 1$  °C, para lo cual se utilizan cámaras de cultivo o mesas controladoras de temperatura. La selección de la temperatura del agua y su rango de variación depende del tipo de agente tóxico y del organismo prueba.

#### 4.1.2 Prueba con renovación

Son bioensayos en los que la solución de la prueba es renovada periódicamente con solución reciente. El periodo de renovación depende de la especie utilizada y del tóxico empleado. Este tipo de prueba requiere del cambio de la solución prueba cada 24 horas durante el periodo de su realización.

#### 4.1.3 Prueba de flujo continuo

Este bioensayo es de tipo altamente sofisticado en el

cual la solución prueba es renovada continuamente. Este tipo de prueba es quizás la más realista, pero existen muchos problemas inherentes a esta prueba, como los requerimientos de un gran espacio, el uso de grandes cantidades de agua y un sistema complejo para la circulación de agua y las diluciones.

Durante la prueba es necesario el bombeo (en tiempos exactos) tanto de agua del control como de la sustancia ensayada durante el bioensayo; esto permitirá mantener constante las concentraciones del tóxico.

#### 4.1.4 Prueba de tanteo (Screening test)

Para efluentes o sustancias de toxicidad desconocida es necesario realizar un ensayo preliminar, en pequeña escala (utilizando un mínimo de concentraciones, usualmente tres a cuatro) pero con un rango amplio de concentraciones. La duración de estos ensayos de tanteo debe estar de acuerdo a la velocidad con que los organismos son afectados por la sustancia en cuestión, generalmente 24 horas.

#### 4.1.5 Prueba de bioacumulación.

La base teórica para determinar la bioacumulabilidad de una sustancia es la incapacidad de una especie sometida a una concentración dada, de metabolizar y excretar el compuesto. Para estas pruebas normalmente se utilizan concentraciones por debajo de la concentración letal media (LC50), a 96 h y por periodos más largos de tiempo. Es necesario establecer con precisión el nivel de concentración en el agua y en los tejidos del organismo. Por otro lado, el criterio para medir los efectos por bioacumulación es que permite la sobrevivencia de los organismos expuestos generalmente por debajo de la concentración letal media.

Existen diferentes métodos analíticos para determinar

exactamente las concentraciones de los contaminantes en los organismos, como espectrofotometría de absorción atómica o cromatografía de gases en columna capilar, dependiendo si los agentes contaminantes son metales pesados, hidrocarburos de petróleo o biocidas.

#### 4.1.6 Prueba de bioestimulación

Esta prueba es usada para evaluar el efecto de un tóxico sobre la productividad primaria. Las algas unicelulares son bioindicadores utilizados para las pruebas. Estos organismos son obtenidos de un stock cultivado en el laboratorio durante un periodo de tiempo y con un crecimiento standard.

La bioestimulación es medida ya sea por la producción de peso seco, o por el número de células por unidad de volumen y los resultados son comparados con el control.

Los tóxicos casi siempre consisten de una mezcla tal como aguas residuales u otros efluentes orgánicos. Al igual que en toda prueba de toxicidad, se utilizan réplicas para evaluar la variabilidad de los resultados y obtener un tratamiento estadístico aceptable.

#### 4.1.7 Prueba de cronicidad o subletalidad

La tasa de crecimiento se utiliza como una medida de subletalidad, requiriendo para ello alimentar a los organismos-prueba, utilizar un sistema de flujo continuo o de renovación periódica del tóxico. La base de crecimiento puede ser cuantificada ya sea determinando el peso del cuerpo o por medición del tamaño del organismo prueba. Estas medidas deberán ser registradas a lo largo del curso de un experimento de larga duración.

### 4.2 Tiempo de exposición de las pruebas de toxicidad

#### 4.2.1 Prueba de corta duración

Son conducidas durante un corto periodo de tiempo generalmente de 48 a 96 horas. Este último es el más usado; los organismos por lo general no son alimentados durante la prueba y la solución no es renovada. La muerte de los organismos-prueba es el criterio usado para evaluar la toxicidad de la solución. Por otro lado, la prueba de 96 horas tiene sus ventajas por los requerimientos mínimos de laboratorio y resultados rápidos. En estos ejercicios, los bioensayos de toxicidad aguda buscan establecer una relación dosis-respuesta, donde la respuesta corresponde a un criterio preestablecido. Entre las principales respuestas agudas esperadas se encuentran: la letalidad, la pérdida del equilibrio, el cese de los movimientos operculares en peces, la ausencia de reacción a estímulos táctiles, el porcentaje de células fecundadas en la fertilización de huevos de invertebrados, la dinámica de creci-

miento de una población algal *in vitro*, etc.

#### 4.2.2 Prueba de larga duración

Este tipo de bioensayo es de siete días hasta de uno a varios meses, dependiendo de las especies y de la aplicación de los resultados. Sin embargo, la mayoría de pruebas que se ejecutan tienen una duración mínima de 96 horas, involucrando en este tiempo la alimentación de los organismos prueba y renovación de la solución examinada.

Las pruebas de larga duración involucran crecimiento y reproducción como una medida de toxicidad subletal o de cronicidad. Estas pruebas por lo general requieren de mucha habilidad en su diseño y conducción. En estas pruebas los resultados de cada concentración son comparados con el control. Los criterios para ello incluyen tasa de crecimiento, desarrollo de elementos reproductores y el número de huevos o larvas producidas.

### 4.3 Variables ambientales de control en las pruebas de toxicidad

Los principales parámetros que se deben controlar durante las pruebas de toxicidad son: temperatura, pH, salinidad y concentración de oxígeno disuelto. Generalmente estos parámetros se registran en periodos de 24 horas. Adicionalmente se pueden incluir mediciones de la concentración del contaminante que se está probando, a fin de asegurar que éstas no varíen en más de un 10% de su concentración, así como también otras que podrían ser relevantes para las pruebas.

### 4.4 Lectura de las respuestas

Durante las pruebas de tanteo deberán realizarse observaciones cada seis horas, registrando el comportamiento de los individuos, debido a que en esta etapa se puede anticipar si la serie de diluciones elegida es la correcta. En caso contrario deberá repetirse el ensayo.

En las pruebas definitivas, tanto en las diluciones de exposición como en los controles, deberá hacerse cada 24 horas registrándose el número de individuos muertos.

En algunas especies es difícil determinar la mortalidad; una medida práctica para hacerlo es retirar los individuos aparentemente muertos y dejarlos en recipientes con agua limpia hasta confirmar su inactividad. Debe también registrarse cualquier comportamiento anormal. A menudo estas observaciones pueden ser de utilidad en la interpretación de los resultados o en la calibración del experimento; junto a las observaciones del comportamiento de los organismos, se debe mantener una estrecha vigilancia de la calidad del agua y sus principales parámetros tal como se ha mencionado líneas arriba.

En principio, no debe haber mortalidades en los acuarios de control, ello revelaría alguna anomalía con la población sometida a ensayo o con la calidad del agua. En

ningún caso deben reutilizarse los individuos que quedaron vivos después de un ensayo; después de un periodo de observación deben ser descartados. Los registros de mortali-

dad deben ser anotados en una tabla (ver anexos 9 y 10), con sus respectivas concentraciones para su posterior análisis. El agua de los acuarios de ensayo debe ser descartada de una manera segura y los acuarios lavados proflijamente.

## 5. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

### 5.1 Métodos estadísticos

Existen numerosos métodos para registrar y calcular los resultados que se obtienen durante una prueba de toxicidad o de la información estadística derivada del mismo.

La toxicidad es generalmente expresada en términos de la concentración que producirá un efecto específico para una proporción definida de la población expuesta después de un periodo definido de tiempo. La medida estadística más utilizada es la *Mediana*, generalmente definida como la concentración media efectiva para un periodo de tiempo, generalmente 24, 48 ó 96 horas (CE50 48h, CE50 96h). Igualmente, es necesario conocer el tiempo tomado por el 50% de la población ensayada para dar una respuesta indicativa de la toxicidad, lo que generalmente se expresa como

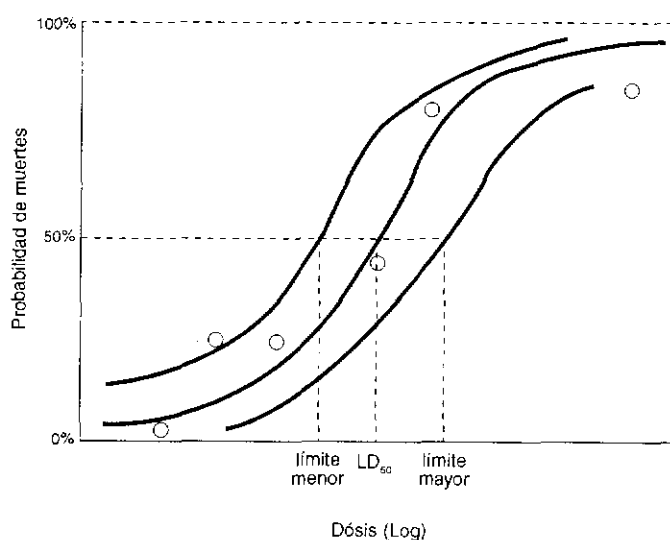


FIGURA 1. Curva PROBIT de BLISS.

tiempo medio efectivo o ET50.

La información obtenida del comportamiento dosis-respuesta permite construir una curva de toxicidad. Esta curva también denominada la curva PROBIT de BLISS (1935) (Fig. 1) plantea a través de los datos observados una curva sigmoideal, ploteando la probabilidad de muerte versus el logaritmo de la dosis o concentración del tóxico, la cual es graficada y analizada estadísticamente

para establecer su fiabilidad (o su significancia) y permitir la interpolación de resultados a objeto de entregar un valor de trabajo, usualmente expresado en términos de CE50%, valor de la concentración letal para el 50% de los organismos sometidos a la influencia de la sustancia en estudio, expresada comúnmente en término de partes por mil o partes por millón.

La USEPA en la década de los 80 preparó programas computacionales como el PROBIT, el DUNNET y el TOXSTAT.

El PROBIT es un programa que tiene mucha aplicación por la rapidez y precisión en la obtención de los resultados, puesto que realiza una regresión probit entre una variable dependiente limitada de 0 a 1 (porcentaje de mortalidad) y una variable independiente (concentración del tóxico). Además ajusta un modelo que incluye tres parámetros: un intercepto, una pendiente y un umbral mínimo de respuesta espontánea, que es estimado basado en datos del control.

El PROBIT se utiliza para las pruebas de toxicidad aguda y proporciona una medida de la concentración letal media (LC50 o CE50) y sus límites de confianza, estimados del promedio ( $\mu$ ) y la desviación estándar ( $\sigma$ ) de la distribución de la tolerancia, así como una estadística de heterogeneidad con distribución chi-cuadrado como indicador de la bondad de ajuste. También para estas pruebas agudas de toxicidad se aplica el programa computacional de análisis estadístico denominado TOXSTAT desarrollado por la USEPA (WEST Y GULLEY 1996)

Para las pruebas cortas de cronicidad con organismos acuáticos, se aplican los programas computacionales PROBIT y el DUNNETT (1995). Este último, igualmente, permite la obtención de los LOEC o CEMO y NOEC o CENO (estos términos ya han sido explicados en el capítulo 2: conceptos de ecotoxicología acuática), para lo cual es necesario incorporar dos análisis de varianza (ANVA), y una comparación múltiple de tratamiento de las media del control. El ANVA es usado para obtener el valor de error. Este programa indica cual de las medias de las concentraciones tóxicas, estadísticamente son diferentes de la media del control a un nivel del 5 % de significancia.

El valor de cronicidad (VC), es el punto calculado de la concentración que se presume segura (No efecto), que se encuentra entre el CEMO y el CENO, y derivada del cálculo de la mediana geométrica del CEMO y CENO. Se asume que la mediana geométrica (VC) es la concentración "segura". Se calcula con la siguiente ecuación:

$$VC = \sqrt{(CEMO) (CENO)}$$



## 5.2 Archivo de resultados

Los resultados deben ser archivados en formularios según los modelos que se encuentran en los anexos 7, 8, 9 y 10.

### 5.2.1. Formulario para la colecta de muestras biológicas

Contiene un código de la muestra, el lugar y la fecha de la colecta. Se especifica la especie, el número de individuos y si estuviese disponible la edad (e.g. semillas adquiridas en hatchery). Además deben registrarse los parámetros ambientales tales como la temperatura, oxígeno, salinidad, pH, análisis microbiológico, siendo opcionales la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>), Demanda Química de Oxígeno (DQO), conductividad, sólidos suspendidos, grasas, amonio y sulfuros. Finalmente, se anotarán las observaciones adicionales, como por ejemplo, el porcentaje de reproductores maduros o inmaduros, profundidad del lugar de la colecta, etc. Además, deben registrarse los nombres de los colectores y de las personas que reciben las muestras biológicas para un mejor control (Anexo 7).

### 5.2.2 Formulario para la colecta del agente tóxico (efluentes industriales, domésticos, etc.)

Contiene además del código, el lugar (posición geográfica) y la fecha, el volumen de la muestra colectada, el tipo de tóxico, si éste es químico (orgánico o inorgánico), si es biológico (sólido o líquido) e incluir qué tipos de análisis serán realizados para su caracterización. Otros datos que se deben registrar son: el tipo de descarga (ocasional, continua o discontinua), las observaciones, los nombres de los colectores y el personal que recibe las muestras (Anexo 8).

### 5.2.3. Formulario para el registro de respuestas durante las pruebas de toxicidad y de parámetros fisicoquímicos

Contiene el código del agente tóxico, fecha e inicio de la prueba, el nombre del organismo prueba, el estadio o fecha de eclosión, el tipo de alimentación, de prueba y si lleva aireación o no durante la prueba, la concentración o dilución del

agente tóxico, la etiqueta del color que le corresponde a cada acuario, el número de réplicas, la supervivencia cada 24 horas, los registros de los parámetros fisicoquímicos: temperatura, salinidad oxígeno disueltos, pH, amoníaco u otra sustancia.

Si se alimenta a los organismos durante la prueba se debe anotar la hora y la cantidad de alimento que se le administra. Se registran además otros tipos de análisis si fuera el caso de demanda bioquímica de oxígeno, microbiológico, aceites y grasas, hidrocarburos, metales, sólidos suspendidos, entre otros contaminantes (Anexo 9).

### 5.2.4 Formulario para el registro de fertilización en *Arbacia spatuligera*

Contiene la fecha, la hora de inicio y término de la prueba, el agente tóxico (la procedencia y la fecha del muestreo) y datos que se deben registrar durante el procedimiento, finalmente se registran los resultados por concentración y por réplica; estos datos se promedian obteniéndose un total de la respuesta en porcentaje. Los resultados obtenidos son procesados en los diferentes programas computacionales, dependiendo del objetivo de las pruebas de toxicidad (Anexo 10).

## 5.3 Informe de resultados

En el informe de los resultados se debe registrar en forma resumida el material biológico, es decir, el organismo prueba utilizado (nombre científico, nombre común y estadio, o fase larvaria de la especie); además del tipo de bioensayo, duración del bioensayo (tiempo de exposición), las condiciones de la prueba (número de organismos por concentración, el número de réplicas, aspectos sobre el número de concentraciones, las condiciones ambientales (temperatura, oxígeno, pH, salinidad).

Los datos de las pruebas de toxicidad obtenidos como los valores de concentración letal media (EC50) y sus límites de confianza se presentarán con los resultados de CEMO y CENO si la prueba ha sido diseñada para obtener valores de cronicidad. Finalmente, se presentará la conclusión de los resultados obtenidos y la referencia bibliográfica consultada.

En los análisis de los resultados también debe considerarse cualquier comportamiento anormal de los organismos durante el periodo de la prueba.

## 6. PROTOCOLOS PARA LA EJECUCIÓN DE PRUEBAS DE TOXICIDAD CON ORGANISMOS MARINOS SELECCIONADOS DEL LITORAL PERUANO

### 6.1. Protocolo para el manejo y ejecución de pruebas de toxicidad con invertebrados marinos.

#### 6.1.1 EQUINODERMOS : Gametos de *Arbacia spatuligera* "erizo marrón" (Figs. 2 - 6)

##### 6.1.1.1 Material biológico

- La prueba de toxicidad con células espermáticas de equinodermos es una prueba rápida, que se lleva a cabo usando gametos de especies de erizo de mar del litoral rocoso.

- Esta prueba fue implementada en Estados Unidos en el Programa de Pruebas Marinas con efluentes complejos llevados a cabo por el Laboratorio de Investigación Medio Ambiente de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos de Norteamérica con *Strongylocentrotus droebachiensis* (DINNEL *et al.* 1982) y *Arbacia punctulata* (WEBER *et al.* 1989).

- Los gametos de esta especie son altamente sensibles y de rápida respuesta a un amplio rango de tóxicos, incluyendo compuestos complejos orgánicos e inorgánicos. Además, estos elementos biológicos son muy utilizados en pruebas con efluentes complejos de la industria y de plantas de tratamiento de aguas servidas.

##### - Taxonomía

Phylum : Echinodermata

Clase : Echinoidea

Subclase : Echinoidea

Orden : Arbacioida

Familia : Arbaciidae

Género : *Arbacia*

Especie : *Arbacia spatuligera*

##### - Distribución

Esta especie se encuentra distribuida, de norte a sur de los Estados Unidos, Baja California, México, Ecuador, Perú y Chile; asociada mayormente a fondos rocosos intermareal hasta 30 metros de profundidad (CASO 1978).

##### 6.1.1.2 Materiales, equipos y reactivos

- Incubadora o cámara de aclimatación
- Centrifuga
- Microscopio compuesto
- Micropipetas
- Balanza analítica
- Termómetro
- Potenciómetro
- Transformador 12 v
- Cámara de Sedgewick Rafter
- Hemocitómetro o Cámara de Neubauer
- Sistema de esterilización de agua de mar

- Blower
- Pipetas volumétricas
- Sistema de filtración de agua de mar.
- Contador manual
- Viales
- Placas petri
- Pipetas Pasteur
- Hielera
- Vasos de precipitación de 300 y 1000 mL
- Parafilm
- Portaobjetos
- Tubos de ensayo
- Guantes desechables
- Gradilla para tubos de ensayo

##### - Reactivos

- Ácido acético al 10 %
- Formalina al 10 %
- Solución KCl 5M
- Agua destilada
- Agua de mar estéril, control

##### 6.1.1.3 Colecta y mantenimiento del stock de reproductores

- La colección de los reproductores se realiza en playas rocosas del sur de Lima, por ejemplo, San Bartolo; y San Lorenzo. En estas áreas al momento de la colecta se deben registrar los parámetros fisicoquímicos tales como temperatura, oxígeno disuelto, pH y salinidad.

- En el laboratorio, los individuos son colocados en acuarios con agua de mar filtrada, aireada por espacio de 24 horas.

- Luego se procede a sexarlos a través de estimulación eléctrica y los individuos se mantienen separados por sexo en tanques de 300 litros.

- El agua de mar de los acuarios debe ser renovada diariamente, filtrándose y manteniendo un flujo discontinuo; además, se limpia el fondo del tanque de las excretas de los animales. Se les puede mantener en buenas condiciones dándoseles abundante alimento, constituido por algas (*Ulva* sp.).

- Cada dos semanas los tanques son vaciados y lavados con detergente y ácido muriático diluido y enjuagados con abundante agua dulce, descartándose los animales débiles o que presentan pérdidas de púas.

- La temperatura debe mantenerse entre  $17 \pm 2$  °C

y con salinidad 35 ups.

- La dieta consiste de macroalgas como la *Ulva* sp. que se obtendrá de la zona intermareal, renovándose cada 2 semanas por algas frescas

- Diariamente se registrarán los parámetros físico-químicos tales como: temperatura, oxígeno, pH y salinidad.

#### 6.1.1.4 Colección de gametos

##### *Machos*

Para ejecutar una prueba se seleccionan cuatro machos, que se colocan en recipientes con escasa agua. La estimulación para la inducción de la evacuación del esperma se realiza al producirse una descarga eléctrica por baterías de 12 v durante 30 segundos, cerca a los poros genitales o con 1 mL de cloruro de potasio (KCl) 0,5M, los espermios son de color crema.

El esperma se colecta de los 4 ejemplares usando una jeringa descartable (aproximadamente 1 mL de esperma) y se coloca en un vasito de vidrio con muy poca agua y en hielo. Esta esperma puede utilizarse hasta una hora después de colectada. Se deberá registrar la hora de colecta.

##### *Hembras*

Igualmente se seleccionan cuatro hembras y se colocan en un recipiente con poca agua.

Se estimula el desove de igual forma que en los machos y se colectan los óvulos con un jeringa o una pipeta Pasteur con boca ancha. Registrar la hora de colecta y colocar la muestra en un tubo de centrifuga cónico (colectar al menos 15 mL de un stock de óvulos). Los óvulos son de color rojizo.

Este stock puede permanecer a temperatura ambiente por varias horas antes de usarlo.

#### 6.1.1.5 Preparación de concentración de espermatozoides en muestras para pruebas

El agua de control es usada para diluir la muestra concentrada de esperma a  $5 \times 10^7$  espermios por mililitro (EPM). La concentración de espermios es primeramente estimada en la muestra original, como se describe a continuación.

- Preparar 5 viales y rotularlos con letras mayúsculas de la A a la E. Luego se les adiciona 20, 10, 10, 10 y 4 mL de agua de control, consecutivamente. Poner en hielo los viales y preparar una solución de 10% de ácido acético en agua de mar (V/V).

- Efectuar las diluciones del esperma de 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400 usando agua de mar 35 ups como sigue:

1. Agregar 400 uL (microlitros) de la muestra de esperma concentrada originalmente a los 20 mL de agua de mar en vial A (1:50 dilución). Mezclar por

inversión.

2. Agregar 10 mL de la suspensión de esperma del vial A al vial B (1:100 dilución). Mezclar por inversión.
3. Agregar 10 mL de suspensión del vial B al vial C (1:200 dilución). Mezclar por inversión.
4. Agregar 10 mL del vial C al vial D (1:400 dilución). Mezclar por inversión. En el vial C agregue ácido acético al 10% para fijar la muestra y de este vial sacar 1 mL al vial E (1:2000 dilución). Mezclar por inversión.
5. Descartar 10 mL del vial D (el volumen de todas las suspensiones debe de quedar en 10 mL).

- Con la suspensión de 1:2000 de esperma fijado con la solución ácido acético (Vial E), se determinará el número de espermatozoides por mL (EPM) en la forma siguiente:

1. Agregar una alícuota de la esperma en suspensión del vial E a ambos lados de la cámara de conteo Neubauer. Esperar que la esperma se sedimente por 15 minutos.
2. Contar al azar el número de espermatozoides en diez de los 400 cuadrados centrales en ambos lados del hemocitómetro usando un microscopio compuesto (100x). Promedie el conteo de ambos lados.
3. El promedio de espermios por mililitro (EPM) en el vial E debe estar cerca del promedio de conteo de  $10.000 \text{ EPM} \text{ o } \times 10^4$ .

- Calcular los EPM en las suspensiones aún "vivas" de los viales del A, B y D usando el EPM en el vial E de arriba:

1. Precise EPM en vial A =  $40 \times \text{EPM en vial E}$ .
2. Precise EPM en vial B =  $20 \times \text{EPM en vial E}$ .
3. Precise EPM en vial D =  $5 \times \text{EPM en vial E}$ .
4. Precise EPM en la muestra original de espermatozoides =  $2000 \times \text{EPM en vial E}$ .

- Diluir cualquiera de las suspensiones de arriba con un EPM mayor hasta  $5 \times 10^7$  EPM siguiendo la ecuación:  
$$\text{Actual EPM} / (5 \times 10^7) = \text{FD (factor dilución)} (10 \times \text{FD}) - 10 = \text{mL de agua de mar que debe agregarse al vial.}$$

#### 6.1.1.6 Preparación de la suspensión de óvulos

- Lavar la muestra original de óvulos concentrados tres veces, usando el agua de control con una centrifugación suave.

- Esto se realiza agregando agua de mar a los tubos de centrifuga, donde los huevos son colocados y rotando a la más baja velocidad durante 3 minutos usando una centrífuga de mesa.

- De forma suave descargue el agua sobrenadante y repita 2 veces más. Si el agua comienza a colorearse de rojo debe ser descartada por lisis de los óvulos. Finalmente, diluir los óvulos a una concentración de 2000 óvulos  $\cdot \text{mL}^{-1}$  siguiendo el método siguiente:

- En forma cuidadosa vaciar los óvulos del tubo de centrifuga dentro de un pequeño beaker; agregue agua de control para que los óvulos alcancen a un volumen de 200

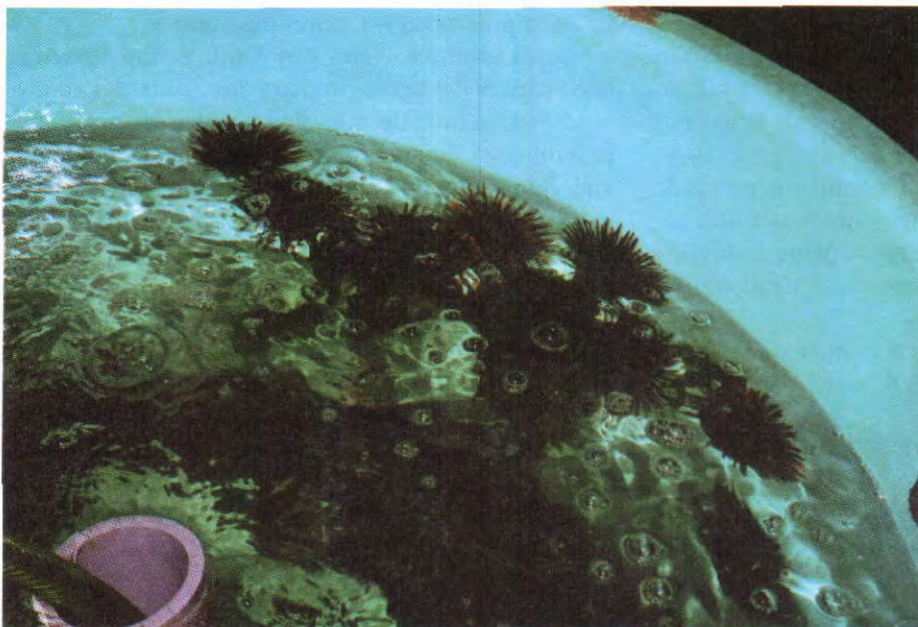


FIGURA 2. Acondicionamiento de reproductores del erizo *Arbacia spatuligera* en tanques de fibra de vidrio de 300 L.



FIGURA 3. Separación de sexos del erizo *Arbacia spatuligera* en bandejas de 40 L por inducción eléctrica.



FIGURA 4. Preparación de las diluciones de espermios de los erizos para obtener la concentración óptima  $5 \times 10^7$  espermios  $\text{mL}^{-1}$ .



FIGURA 5.- Incubación de los óvulos de erizos para comprobar la fertilidad de los espermios después de estos han sido expuestos al contaminante (e.g. efluente pesquero).

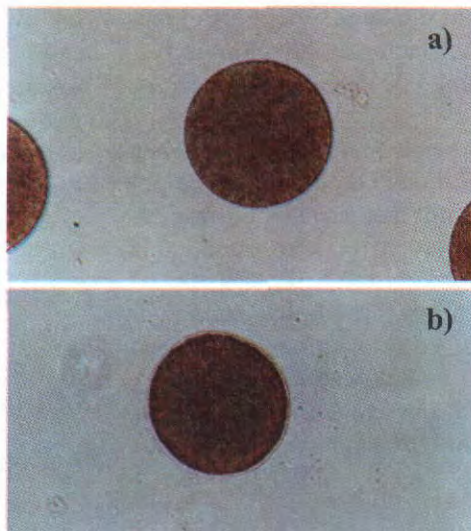


FIGURA 6. Óvulo de *Arbacia spatuligera*, a) no fertilizado y b) fertilizado, presencia de la membrana de fertilización.



mL ("stock de óvulos").

- Mezcle el stock de óvulos usando una aireación suave. Con una pipeta de boca ancha, transfiera 1 mL de óvulos del stock a un vial que contenga 9 mL de agua control (dilución 1:10).

- Mezcle el contenido del vial usando una pipeta de boca ancha, transfiera 1 mL de óvulos del vial a una cámara de conteo de Sedgewick-Rafter. Cuente todos los óvulos en la cámara usando un microscopio de disección a 24x ("conteo de óvulos").

- Calcular la concentración de óvulos en el stock. Los óvulos mL<sup>-1</sup> debe ser igual a 10 veces el conteo de óvulos.

Diluir el stock de óvulos a 2000 óvulos mL<sup>-1</sup> por la siguiente secuencia:

1. Si los óvulos contados son iguales o mayores que 200: (conteo óvulos) - 200 = mL de agua control para agregar al stock de óvulos.
2. Si el conteo de óvulos es menor que 200, permitir que los óvulos se sedimenten y retirar el agua control lo suficiente para concentrar los óvulos a más de 200 mL<sup>-1</sup>, entonces diluir el stock de óvulos como en "1".
3. Confirmar si los óvulos mL<sup>-1</sup> por transferencia de un mililitro del stock de óvulos diluido en un vial conteniendo 9 mL de agua control es la concentración requerida. Mezclar bien, entonces transferir 1 mL del vial a una cámara de conteo de Sedgewick-Rafter. Contar todos los óvulos usando un estereoscopio. El conteo deberá ser 200 ± 20.

### 6.1.1.7 Diseño experimental

- Es necesario definir previamente el diseño experimental, estableciendo el objetivo y las hipótesis de la prueba de toxicidad.

- Se establecerá previamente una prueba preliminar o screening test (24 - 48 h) donde se determine el rango de concentraciones con un factor de dilución de 0,1, para después establecer el rango de concentraciones para las pruebas definitivas.

- Previamente a las pruebas preliminares se deben realizar las pruebas de sensibilidad con dicromato de potasio del stock de los organismos que se van a utilizar durante el bioensayo, para comprobar el buen estado y la sensibilidad de los organismos.

- Los materiales, equipos y formularios para la colecta de material biológico, colecta del agente tóxico (efluentes, agua receptora o contaminante específico) y formularios de sobrevivencia, que exigen las pruebas de toxicidad deben estar disponibles antes de iniciar toda prueba.

### 6.1.1.8 Procedimiento de las pruebas de toxicidad

- Preparar los viales etiquetados con diferentes colores que diferencien las concentraciones del agente tóxi-

co de la prueba en los viales del control.

- Llenar los viales con 5 mL de las diferentes concentraciones del agente tóxico y las aguas del control.

- Una hora después de la colección, agregar 100 uL (microlitros) de esperma apropiadamente diluida a cada vial. Registre el tiempo en que se adiciona la esperma.

- Incubar todos los viales a 20 °C por una hora.

- Pasado el tiempo de una hora mezclar la suspensión de óvulos diluidos, usando aireación en forma suave y agregar 1 mL de óvulos diluidos de la suspensión, a cada vial de prueba usando una pipeta de boca ancha. Incubar 20 minutos a 20°C.

- Treinta minutos siguientes a la adición de óvulos a la esperma, terminada la prueba, se preservan las muestras con 0,5 mL de formalina para cada vial, los cuales pueden ser evaluados inmediatamente o tapados y almacenado por varios días.

- Para determinar la fertilización, transferir cerca de 1 mL de huevos del fondo del vial de prueba a una cámara de conteo Sedgewick-Rafter. Examinar los huevos usando un microscopio compuesto (100x). Cuente 100 huevos por muestra y registre el número no fértil. Esto se verifica por la presencia o ausencia de la membrana de fertilización.

Los datos serán registrados en formatos que se alcanzan al final del manual para su posterior análisis estadístico (Anexo 10).

Organismo prueba	Gametos de <i>Arbacia spatuligera</i>
Tipo de prueba	Estática
Agitación	NO
Aireación	NO
Agua de dilución	Agua de mar filtrada, estéril
Salinidad	35 ups
Temperatura	20 ± 0,1°C
Luz	Ambiente
N°de óvulos	2000 óvulos/ mL
N°de espermios	5 x 10 <sup>7</sup>
N°de réplicas	4
Volumen de dilución	5 mL
Tiempo de exposición	1 h 30 mín (no mayor de 2 horas)
Efecto medido	Fertilización
Criterio de Aceptación:	El control de fertilización debe ser mayor del 50%

### 6.1.1.9 Condiciones de la prueba

### 6.1.1.10 Análisis de los resultados

Para estimar las concentraciones efectivas (CE-1, CE10 y CE50), que causan un efecto en la no fertilidad de los espermios en los óvulos, se utiliza el programa Probit. Para obtener los CENO o CEMO es necesario realizar un análisis de varianza entre los tratamientos incluyendo el control. El programa DUNNET y TOXSTAT de la EPA se encuentran implementados para ello.



## 6.1.2 CRUSTÁCEOS: Larvas zoea I de *Emerita analoga* (Stimpson, 1857) "muy muy" (Figs. 7-11)

### 6.1.2.1 Material biológico

- El muy-muy *Emerita analoga*, es un crustáceo, decápodo anomuro que habita en relativa abundancia las playas arenosas del litoral peruano; constituye el principal segundo nivel trófico (consumidores primarios) del ecosistema de playas arenosas, soportando gran predación por parte de peces y aves marinas litorales que tienen como base de alimentación a esta especie (EFFORD 1976, SÁNCHEZ 1988).

- La reproducción se realiza durante todo el año con fluctuaciones estacionales de intensidad, siendo mayor en los meses de primavera y verano (SÁNCHEZ Y ALAMO 1974).

- Asimismo, la población de esta especie ha sido utilizada como bioindicadores y se ha determinado que acumulan metales, hidrocarburos de petróleo y plaguicidas (BURNETT 1971, ROSSI *et al.* 1978, WENNER 1988 en BARRÓN *et al.* 1999).

#### - Taxonomía

Phylum	: Artropoda
Clase	: Crustacea
Subclase	: Decapoda
Orden	: Anomura
Género	: <i>Emerita</i>
Especie	: <i>Emerita analoga</i> (Stimpson, 1857)

#### - Distribución

*Emerita analoga* tiene una distribución discontinua desde la Isla Kodiak (Alaska), al sur de Baja California (México), y de Lambayeque (Perú) a Aysén (Chile) (CHIRICHIGNO 1970, ALVITRES *et al.* 1999).

### 6.1.2.2. Materiales y equipos

- Estereoscopio
- Oxímetro
- Medidor de pH
- Refractómetro
- Mesa de incubación
- Termómetro
- Blower
- Mangueras
- Sistema de filtración de agua de mar
- Acuarios
- Sistema de esterilización de agua de mar
- Jarras de 2 L
- Piedras difusoras
- Tamices de nylon con diferentes diámetros de abertura
- Baldes de 14 L
- Arena del lugar de colecta

### 6.1.2.3 Colecta y mantenimiento de reproductoras ovígeras

- La colecta de los ejemplares hembras ovígeras se realiza todos los meses en las playas arenosas de San Bartolo, Santa María y Puerto Viejo.

- Se registrarán los parámetros físico-químicos del agua de mar al momento de la colecta: temperatura, oxígeno disuelto, pH y salinidad.

- El transporte se realiza usando baldes con 3-4 cm de arena en el fondo, y agua de mar fresca con suficiente oxígeno, para evitar el estrés del transporte al laboratorio; si éste se encuentra muy distante se usan difusores de aire.

- En el laboratorio se les acondicionará con un flujo de agua de mar fresca por un tiempo de 15 a 30 minutos. Después se separarán las hembras ovígeras en dos acuarios: uno para las no maduras (masa de huevos naranja claro) y otra para las maduras (masa de huevos grises).

- Los acuarios estarán provistos de un fondo de arena y con aireación constante.

- El alimento suministrado serán microalgas (ej. *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros gracilis*, entre otras diatomeas y algunas clorofíceas).

- El control de parámetros físico-químicos (temperatura, oxígeno, pH y salinidad), se realizará diariamente, así como la renovación del agua.

- El mantenimiento de los acuarios se realizará una vez por semana. Estos se lavarán con detergente biodegradable con repetidos enjuagues de agua dulce.

### 6.1.2.4 Separación y mantenimiento de larvas zoeas I

- Cuando las hembras ovígeras se encuentren con las ovas bastante maduras (color gris), se trasladan a otro acuario para inducir la eclosión de las larvas con alimento (microalgas).

- Las zoeas I al eclosionar serán dispuestas en otro acuario, para luego utilizarlas en las pruebas de toxicidad dentro de las 24 horas.

### 6.1.2.5 Diseño experimental

- Es necesario definir previamente el diseño experimental, estableciendo el objetivo y las hipótesis de la prueba de toxicidad.

- Se establecerá previamente una prueba preliminar o screening test (24 - 48 h) donde se determine el rango de concentraciones con un factor de dilución de 0,1, a fin de establecer después el rango de concentraciones para las pruebas definitivas.

- Previamente a las pruebas preliminares se deben realizar las pruebas de sensibilidad con dicromato de pota-



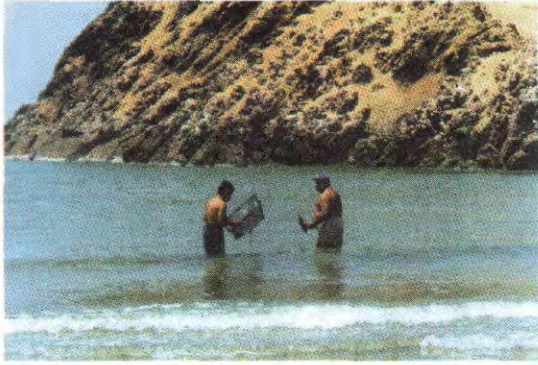


FIGURA 7. Colecta del crustáceo *Emerita analoga* ("muy muy") en las playas del sur de Lima.



FIGURA 8. Acondicionamiento y mantenimiento de las reproductoras de *E. analoga* en bandejas de 60 L con un lecho de 3 cm de arena del mismo lugar de la colecta, y dispuestas sobre mesas con temperatura regulada.



FIGURA 9. Larvas zoea I de *Emerita analoga*, eclosionadas en el laboratorio de Ecofisiología. Vista previa a la exposición a diferentes concentraciones tóxicas.

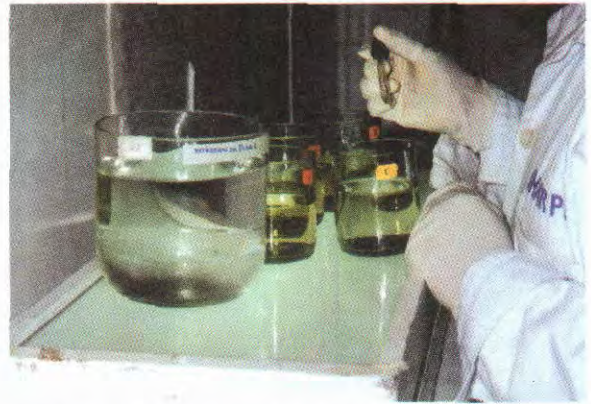


FIGURA 10. Colecta de zoea I de *E. analoga* con ayuda de la cámara de la luz para exponerlas a las diferentes concentraciones de contaminantes o agentes tóxicos.



FIGURA 11. Corrida de prueba toxicológica con larvas zoea I de *E. analoga* en mesas con temperatura regulada



sio, del stock de los organismos que se van a utilizar durante el bioensayo, para comprobar el buen estado y la sensibilidad de los organismos.

### 6.1.2.6 Procedimiento de la prueba de toxicidad

- Los organismos-prueba a utilizar son larvas de estadio zoea I, las cuales deben ser separadas y dejadas sin alimento durante 24 horas, antes de empezar las pruebas.

- El agua de dilución se mantiene en la mesa termorreguladora o de incubación, para su ambientación a la temperatura de la prueba; esta agua debe oxigenarse a saturación al menos 1 hora previa a su utilización. Generalmente se utilizan de 50 a 100 litros de agua de mar tratada.

- Rotular con etiquetas de colores los acuarios donde se efectuarán las pruebas, para diferenciar las concentraciones o diluciones del agente tóxico.

- Se prepararán las diferentes diluciones o concentraciones del agente tóxico a partir de una solución stock.

- Cada dilución o concentración preparada será vertida en los diferentes acuarios; estos acuarios se dispondrán al azar sobre las mesas termorreguladoras o de incubación para que la temperatura vaya homogenizándose en cada acuario.

- Cuando la temperatura sea homogénea para todos los acuarios, se colocaran cuidadosamente 20 ejemplares, mínimo 10 individuos por acuario, esto quiere decir que se tendrán de 40 a 80 individuos por concentración incluyendo el control o blanco.

- Se registrarán los parámetros ambientales de temperatura, oxígeno, pH y salinidad al inicio de la prueba, para luego realizar la misma operación cada 24 horas. Debe realizarse una evaluación a las 6 primeras horas de corrida la prueba, para observar si las diluciones preparadas han sido las óptimas.

- Los acuarios deben cubrirse con sus respectivas tapas de vidrio.

- Retirar a diario los individuos muertos teniendo un registro de cada 24 horas, tanto de la sobrevivencia como de los parámetros físico-químicos.

- Los datos son registrados en formatos que se anexan al final del manual para posteriormente ser evaluados

estadísticamente.

- Correr las pruebas por 24 a 48 h cuando se trata de sustancias volátiles, máximo 96 horas, considerando que las larvas zoea I mudan a zoea II entre 5 a 6 días.

### 6.1.2.7 Condiciones de la prueba de toxicidad

Organismo Prueba	Zoeas I de <i>Emerita analoga</i> , "muy muy"
Tipo de prueba	Estática sin recambio, 96 h
Agitación	NO
Aireación	No requiere, sólo si el oxígeno baja de 6 mg.L <sup>-1</sup>
Agua de dilución	Agua de mar filtrada,estéril
Salinidad	35 ups
Temperatura	16 ±1°C
Fotoperiodo	11 h Luz: 13 h Oscuridad
Edad de los Organismos Prueba	Recién eclosionado hasta las 24 horas de nacidas
Número de Organismos por acuario	Mínimo 10 organismos para las pruebas de efluentes y aguas receptoras.
Número de replicas por concentración	4 réplicas tanto para la determinación de los LC50 como CENO y CEMO.
Número de organismos por concentración	40 individuos mínimo tanto para la determinación de LC50 como CENO y CEMO.
Alimentación	Se requiere alimentarlos a partir de 24 h.
Limpieza de los acuarios	No requiere limpieza
Concentraciones de prueba	Mínimo 5
Respuesta	Muerte
Criterio de aceptabilidad de la prueba	Un 90 % o más de sobre vivientes en los controles.

### 6.1.2.8 Análisis de los resultados

Para estimar las concentraciones letales CL50, que causan la muerte del 50 % de los individuos debido a la exposición del agente tóxico, se utiliza el programa Probit.

Para obtener los CENO o CEMO es necesario realizar un análisis de varianzas entre los tratamientos incluyendo el control. El programa DUNNET y TOXSTAT de la EPA se encuentran implementado para ello.



### 6.1.3. MOLUSCOS: Semillas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) "concha de abanico" (Figs. 12 - 15)

#### 6.1.3.1 Material biológico

- Los moluscos están ampliamente distribuidos en todo nuestro litoral y tienen un gran valor alimenticio para el hombre. La mayoría de los bioensayos son conducidos con moluscos entre ellos pelecypodos, especialmente chorros, ostras, conchas de abanico y almejas.

- Los gasterópodos acuáticos han sido utilizados de manera limitada, pero los chitones, escafópodos y cefalópodos no han sido usados en los laboratorios de prueba de manera rutinaria. Las técnicas para conducir los bioensayos son similares para muchas especies.

- Las semillas y las larvas han sido utilizadas para evaluar la toxicidad aguda o crónica y medir los efectos que causan los diferentes tipos de descargas, sean orgánicas o inorgánicas, al medio marino; la obtención de larvas están descritos en BREESE *et al.* (1975).

- Los efectos que causan estos tóxicos es interferir con la fertilización, con el normal desarrollo de los embriones, el crecimiento, la secreción del filamento bysial, reproducción, y a nivel de los tejidos. Estos efectos son las bases de las pruebas de toxicidad aguda y crónica.

- Los bivalvos reproductores o adultos no son muy apropiados para la determinación de concentraciones letales agudas, debido a sus habilidades de cerrar sus conchas y autoprotgerse de los tóxicos.

#### - Taxonomía

- Phylum : Mollusca
- Clase : Bivalvia
- Orden : Lamelibranquia
- Familia : Pectinidae
- Género : *Argopecten*
- Especie : *Argopecten purpuratus*

#### - Distribución

Esta especie se halla ampliamente distribuida en todo nuestro litoral, desde Paita, Isla Lobos de Afuera y Lobos de Tierra, Chimbote, Isla Don Martín, Ancón, Isla San Lorenzo, Pucusana, Islas Chincha, Bahía Independencia, Pisco (ALAMO Y VALDIVIESO 1987).

#### 6.1.3.2 Materiales y equipos

- Microscopio estereoscópico
- Oxímetro
- Medidor de pH
- Refractómetro
- Mesa termorreguladora o de incubación
- Termómetro
- Blower
- Mangueras
- Sistema de filtración de agua de mar

- Bandejas de 40 - 60 L
- Sistema de esterilización de agua de mar
- Acuarios 20x 30x10 cm
- Piedras difusoras
- Jarras de 2 L
- Tamices de nylal con diferentes diámetros de abertura
- Baldes de 14 L

#### 6.1.3.3 Colecta y acondicionamiento de semillas de concha de abanico

- La colecta de las semillas puede realizarse directamente de bancos naturales mediante buceo autónomo, o mediante la compra en un criadero de conchas de abanico, que es mucho más preciso para conseguir las tallas requeridas para la prueba.

- Todos los organismos prueba, deben tener tallas similares o aproximadas. Los ejemplares menores a 20 mm son utilizados de preferencia, ya que es una etapa muy sensible a los cambios que pueden ocurrir en el ambiente, además existe una menor probabilidad que desoven durante la prueba de toxicidad.

- Los animales, antes de ser utilizados en las pruebas, deben ser aseados de todo "fouling" y acondicionados en acuarios por siete días, con agua de mar filtrada, alimento fitoplanctónico (*Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* y *Dunaliella tertiolecta*), y a una temperatura de 20 °C aproximadamente.

#### 6.1.3.4 Procedimiento de la prueba de toxicidad

- No alimentar durante las 24 h previas a las pruebas de toxicidad, al stock de organismos que se utilizará.

- El agua de dilución se mantiene en la mesa termorregulada o de incubación para su ambientación a la temperatura de la prueba, esta agua debe oxigenarse a saturación al menos 1 h previa a su utilización (20°C, 6 mg L<sup>-1</sup>) con ayuda de aireadores eléctricos. Generalmente se utilizan de 50 litros de agua de mar tratada, dependiendo de la cantidad de diluciones y réplicas.

- Se realizan las pruebas de sensibilidad con dicromato de potasio con el stock de los organismos que se va a utilizar.

- Rotular con etiquetas de colores los acuarios donde se efectuarán las pruebas, para diferenciar las concentraciones o diluciones del agente tóxico.

- Se prepararán las diferentes diluciones o concentraciones del agente tóxico a partir de una solución stock.

- Cada dilución o concentración preparada será vertida en acuarios diferentes; estos acuarios se dispondrán al azar sobre las mesas termorreguladoras o de incubación para que la temperatura vaya homogenizándose en cada uno.

- Cuando la temperatura sea homogénea para todos los acuarios, se colocará como mínimo diez individuos en cada acuario, de tallas 20 a 30 mm. La aireación no es necesaria para





FIGURA 12. Biometría de los individuos juveniles de concha de abanico que intervienen en las pruebas de toxicidad.

FIGURA 13. Acondicionamiento y mantenimiento de semillas de *Argopecten purpuratus*, en bandejas de 60 L dispuestas sobre mesas con temperatura regulada.



FIGURA 14. Determinación de los pesos (g) de cada individuo juvenil de concha de abanico que interviene en las pruebas.

FIGURA 15. Lectura de sobrevivencia y separación de los organismos muertos durante las pruebas de toxicidad con juveniles de concha de abanico.





una prueba de 96 h; sin embargo, si los organismos mueren durante una prueba preliminar, es necesario reducir el número de ejemplares en el acuario, sin reducir la cantidad de agua.

- Las concentraciones deben ser cinco, más un control con 10 animales por acuario como mínimo, con cuatro réplicas haciendo un total de 24 acuarios por prueba. Todos los acuarios deben ser cubiertos con tapas de vidrio.

- Se registrarán los parámetros ambientales de temperatura, oxígeno, pH y salinidad al inicio de la prueba, para luego realizar la misma operación cada 24 horas. Debe realizarse una evaluación a las seis primeras horas de corrida la prueba, para observar si las diluciones preparadas han sido las óptimas.

- Con respecto a la lectura, generalmente los pecypodos saludables tienen sus valvas entreabiertas. Las valvas son cerradas estrechamente cuando se les molesta o se encuentran bajo estrés. Las valvas de una especie moribunda o muerta están usualmente abiertas, y no se cierran cuando las tocan. Los bivalvos no necesariamente son los mejores organismos prueba para un periodo de 96 horas, por su habilidad de cerrar sus valvas estrechamente durante los periodos de estrés. Es necesario realizar una prueba preliminar antes de correr la prueba final, para adquirir familiaridad en reconocer e interpretar el comportamiento en los bivalvos moribundos y finalmente reconocer los muertos.

- Se debe examinar cada individuo diariamente y registrar las muertes. Todo individuo muerto deberá ser removido para prevenir el "fouling" del agua, y esto requiere que a las 48 horas de la lectura se realice un recambio parcial evitando perturbar a los organismos prueba.

- Se registran los resultados en formatos que se anexan al final del manual, para su posterior tratamiento estadístico.

### 6.1.3.5 Condiciones de la prueba

Organismo prueba	<i>Argopecten purpuratus</i> "concha de Abanico"
Tipo de prueba	Estática con recambio diario, 96 h
Agitación	NO
Aireación	No requiere, sólo si el O <sub>2</sub> baja de 6 mg.L <sup>-1</sup>
Agua de dilución	Agua de mar filtrada, estéril
Salinidad	35 ups
Temperatura	20 ± 1°C
Fotoperiodo	11 h Luz : 13 h Oscuridad
Edad de los organismos-prueba	2 meses (20 mm a 30 mm de longitud)
Número de organismos por acuario	Mínimo 10 organismos para las pruebas de efluentes y aguas receptoras.
Número de réplicas por concentración	4 réplicas tanto para la determinación de los LC50 como CEMO y CENO.
Número de organismos por concentración	40 individuos mínimo tanto para la determinación de LC50 como CEMO y CENO
Alimentación	No se requiere alimentarlos
Limpieza de los acuarios	Requiere limpieza a las 24 h
Concentraciones de prueba	Mínimo 5
Respuesta	Muerte
Criterio de aceptabilidad de la prueba	Un 90 % o más de sobrevivientes en los controles.

### 6.1.3.6 Análisis de los resultados

Para estimar las concentraciones letales (CL50, 96h), que causan la muerte del 50 % de los individuos debido a la exposición del agente tóxico, se utiliza el programa Probit que es una estadística paramétrica, o utilizar la estadística no paramétrica de Spearman Karber de la USEPA.

Para obtener los CENO y los CEMO es necesario realizar un análisis de varianzas entre los tratamientos incluyendo el control. El programa DUNNET y TOXSTAT de la EPA se encuentran implementados para ello.



## 6.2 Protocolo para el manejo y ejecución de prueba de toxicidad con vertebrados marinos.

### 6.2.1 PECES: Postlarvas de *Odontesthes (Austromeniidae) regia regia* (Hildebrand) "pejerrey" (Figs. 16 - 19)

#### 6.2.1.1 Material biológico

Las pruebas de toxicidad con postlarvas de peces marinos son de importancia ecológica y económica. Esta especie es de fácil manejo y de mantenimiento en cautiverio.

Durante el desarrollo embrionario, el tamaño de los huevos fluctúan entre 1,30 y 2,00 mm, hay poca variación durante su desarrollo, sólo el vitelo disminuye en vísperas a eclosionar.

La larva libre, recién nacida, mide entre 5 a 7 mm, aunque el embrión está enrollado normalmente dentro de un huevo, que rara vez sobrepasa los 2,00 mm (CHIRINOS Y CHUMÁN 1964).

En esta etapa se observan los ojos y mandíbulas funcionales, presencia de aletas embrionaria media y pectorales, características propias del desarrollo embrionario y presumiblemente establecido por algunas diferencias adaptativas en su ecología. Esta larva es mantenida en condiciones controladas hasta alcanzar el estadio postlarval a los 16 días de eclosionada.

#### - Taxonomía

- Clase : Teleostomi
- Subclase : Actinopterygii
- Orden : Atheriniformes
- Familia : Atherinidae
- Género : *Odontesthes*
- Especie : *Odontesthes regia regia*

#### - Distribución

Esta especie se encuentra distribuida desde Punta Aguja (Perú) a Iquique (Chile) (CHIRICHIGNO Y VÉLEZ 1998).

#### 6.2.1.2 Materiales y equipos

- Estereoscopio
- Oxímetro
- Medidor de pH
- Refractómetro
- Mesa de incubación
- Termómetro
- Blower
- Mangueras
- Sistema de filtración de agua de mar
- Tanques de fibra de vidrio 300L
- Acuarios de 9.8 x 10 x 20 cm.
- Piedras difusoras
- Sistema de esterilización de agua de mar.
- Tamices de nylal
- Baldes de 14 L
- Jarras de 2 L

#### 6.2.1.3 Colecta y acondicionamiento de ovas de pejerrey

- La época de desove del pejerrey en el litoral peruano se realiza de abril hasta diciembre, siendo de mayor intensidad de abril a julio.

- La colecta se efectúa durante ese periodo; se pueden encontrar a orillas de la playa, en zonas expuestas a la marea u obtenerlas con frecuencia ligadas a las redes de los pescadores, en macroalgas (e.g. *Polysiphonia* sp.). También las podemos colectar en los terminales pesqueros, en ejemplares frescos donde las ovas se encuentran aún ligadas al cuerpo de la hembra (CHIRINOS DE VILDOSO 1964).

- Las ovas son transportadas en baldes con agua de mar suficientemente aireada, y llevadas al laboratorio para ser acondicionadas.

- El acondicionamiento de las ovas para su óptimo desarrollo dependerá mucho del continuo flujo de agua de mar (recambios), así como de la cantidad de ovas dispuestas en los acuarios.

- Después del acondicionamiento de las ovas a las condiciones del laboratorio, se llevará un control diario de los parámetros físico-químicos del agua de mar después de cada recambio, tales como oxígeno, temperatura, salinidad y pH. También es necesario observarlas por estereoscopio para ver el estadio en que se encuentran y darle el manejo debido.

- Los recambios de agua de mar se realizan tres veces al día como mínimo, en los primeros estadios, luego dos veces al día, tratando de manipularlas lo menos posible.

#### 6.2.1.4 Separación y mantenimiento de larvas de pejerrey

- No todas las larvas emergen a la vez, por ello, las larvas obtenidas serán trasladadas a otro acuario, cuidando no maltratarlas durante el transporte.

- El acuario debe estar provisto de una piedra difusora de aire para proporcionar suficiente oxígeno al agua de mar.

- Los parámetros físico-químicos deberán registrarse tal como se ha indicado.

- A partir del tercer día se les irá proporcionando nauplios de *Artemia*, como alimento.

- Los recambios de agua se realizan diariamente y el mantenimiento de los acuarios se hace una vez por semana utilizando detergente biodegradable y enjuagando repetidamente con agua dulce.

- El mantenimiento de las mangueras de los acuarios debe realizarse diariamente con detergente, ácido muriático diluido y abundante agua dulce.

- El mantenimiento de los peces será aproximadamente por dos semanas, tiempo en el cual se observará la tasa de crecimiento, comportamiento y su grado de adaptabilidad.





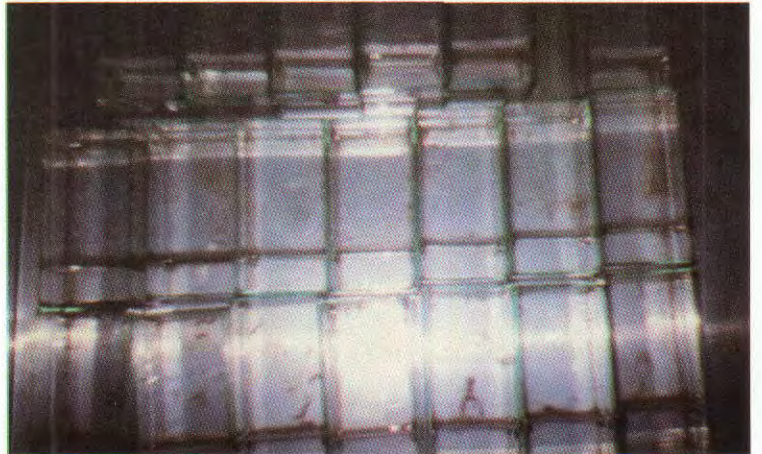
FIGURA 16. Acondicionamiento y mantenimiento de las ovas del pejerrey *Odontesthes regia regia* en el laboratorio de Ecofisiología.

FIGURA 17. Mantenimiento de las larvas de pejerrey en tanques de fibra de vidrio de 300 L.



FIGURA 18. Preparación de las diluciones de concentraciones menores a mayores (e.g. efluentes pesqueros), colocándolas al azar en pequeños acuarios y diferenciándolos por el color de las etiquetas (de blanco a rojo).

FIGURA 19. Exposición de las postlarvas de pejerrey a diferentes concentraciones en acuarios de 1 L.





- Sólo los organismos saludables serán sometidos a las pruebas de toxicidad.

### 6.2.1.5 Procedimiento de la prueba de toxicidad

- Dejar sin alimentación a los organismos 24 horas antes de inicio las pruebas de toxicidad.

- El agua de dilución se mantendrá en la mesa termorreguladora o de incubación para su ambientación. Generalmente se utilizan de 50 a 100 litros de agua de mar tratada. El tratamiento del agua de dilución será la misma que en los casos anteriores (agua saturada de oxígeno).

- Se realizan las pruebas de sensibilidad con dicromato de potasio, al stock de organismos que se van a utilizar durante la prueba.

- Rotular con etiquetas de colores los acuarios donde se efectuarán las pruebas, para distinguir las diferentes concentraciones o diluciones del agente tóxico.

- Se prepararán las diferentes diluciones o concentraciones del agente tóxico a partir de una solución stock. Cada dilución o concentración preparada será vertida en los diferentes acuarios pero en volúmenes de 300 mL. Estos acuarios se dispondrán al azar sobre las mesas con temperatura regulada, o de incubación, con la finalidad de mantener una temperatura estable.

- Cuando la temperatura sea homogénea para todos los acuarios, se colocarán las larvas en número de 10, luego completar o enrasar a 600 mL. Cubrir los acuarios con tapas de vidrio. La aireación no es necesaria para una prueba de 96 h.

- Las concentraciones deben ser en número de cinco, más un control con 10 animales por acuario como mínimo, con cuatro réplicas haciendo un total de 24 acuarios por prueba. Todos los acuarios deben ser cubiertos con tapas de vidrio.

- Se registraran los parámetros ambientales de temperatura, oxígeno, pH y salinidad al inicio de la prueba, para luego realizar la misma operación cada 24 horas. Debe realizarse una evaluación a las 6 primeras horas de corrida la prueba, para observar si las diluciones preparadas han sido las óptimas.

- Retirar a diario los ejemplares muertos teniendo un registro cada 24 horas. Los registros de los datos se realizarán en formatos, tal como se anexan al final del manual para su posterior evaluación estadística.

En caso de:

- Efectuar pruebas estáticas con contaminantes metálicos se pueden airear los acuarios, no así en caso de hidrocarburos de petróleo y de compuestos orgánicos.

- Correr pruebas de siete a más días, proporcionar

una dieta diaria, tratando que sea la ración exacta para los individuos. La limpieza de las excretas de los acuarios diariamente es necesaria.

- Correr pruebas para obtener valores de cronicidad, se evaluará la tasa de crecimiento, midiendo y pesando las larvas sin dañarlas.

- Si se trata de una muestra de efluentes o aguas receptoras, se podrá realizar una prueba preliminar, sólo si las muestras tienen como máximo 24 horas de colectadas.

### 6.2.1.6 Condiciones de la prueba

#### 6.2.1.7 Análisis de los resultados

Organismo prueba	Larvas de 16 días <i>Odontesthes regia regia</i> "Pejerrey"
Tipo de prueba	Estática sin recambio, 96 h
Agitación	NO
Aireación	No requiere sólo si este baja de 6 mg L <sup>-1</sup>
Agua de dilución	Agua de mar filtrada, estéril
Salinidad	35 ups
Temperatura	16 ± 1°C
Luz	11 h Luz : 13 h Oscuridad
Edad de los organismos de prueba	A partir de los 16 días de edad (después de la absorción del saco vitelínico)
Número de organismos por acuario	Mínimo 10 organismos para las pruebas de efluentes y aguas receptoras.
Número de réplicas por concentración	4 réplicas tanto para la determinación de los LC50 como CEMO y CENO.
Número de organismos por concentración	40 individuos tanto para la determinación de LC50 como CEMO y CENO.
Alimentación	No se requiere alimentarlos*
Limpieza de los acuarios	Se requiere limpieza
Concentraciones de prueba	Mínimo 5
Respuesta	Muerte
Criterio de aceptabilidad de la prueba	Un 90 % o más de sobreviviente en los controles.

\* salvo lo especificado anteriormente en pruebas de cronicidad

Para estimar las concentraciones letales CL50, 96h, que causan la muerte del 50 % de los individuos debido a la exposición del agente tóxico, se utiliza el programa Probit que es una estadística paramétrica, o utilizar la estadística no paramétrica de Spearman Karber de la USEPA.

Para obtener los CENO y CEMO es necesario realizar un análisis de varianzas entre los tratamientos incluyendo el control. El programa DUNNET y TOXSTAT de la EPA se encuentran implementados para ello. Luego se calcula el valor de cronicidad, siguiendo la técnica descrita líneas arriba.



## 7. REFERENCIAS

- ABLONADO N., H. GONZALES, M. RAMÍREZ, I. TORRES. 1990. Evaluación del erizo de mar *Echinometra lucunter* como indicador de contaminación por metales pesados, Cuba. *Aquat. Living Resour.* 3: 113-120.
- ALAMO, V. Y V. VALDIVIESO. 1997. Lista Sistemática de Moluscos Marinos del Perú. Segunda Edición. Publicación especial. Inst. Mar Perú. 184 pp.
- ALVEAL, K., M. FERRARIO, E. OLIVEIRA Y E. SAR. 1995. Manual de métodos ficológicos. Universidad de Concepción- Chile, 863p
- ALVITRES, V., J. CHANAMÉ, J. FUPUY, A. CHAMBERGO Y M. CORTÉZ. 1999. Cambios en la Prevalencia de los Helmintos Parásitos de *Emerita analoga* por efecto de El Niño 1997-98. *Rev. peruana Biol.* Vol. Extraordinario:69-76.
- BARRÓN, M.G., T. PODRABSKY, R.S. OGLE, J.E. DUGAN, R. W. RICKER. 1999. Sensitivity of the Sand Crab *Emerita analoga* to a Weathered oil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62:649-475.
- BELLAN, G. 1981. Manual of methods in aquatic environment research, part 7. Selected bioassays for the Mediterranean. Food and Agriculture Organization (FAO), Fish. Tech. paper 208: 31 pp.
- BLISS, C.I. 1935. The calculation of the dosage - mortality curve. *Ann. Appl. Biol.* 22: 135-165.
- BREESE, W.P. Y R. MALOUF. 1975. Hatchery manual for the Pacific Oyster. Oreg. State Univ. Sea Grant Coll. Prog. Publ. N° ORESU H-75-002, Oregon State University, Corvallis. 22p.
- BURNETT, R. 1971. DDT residues: distribution of concentration in *Emerita analoga* (Stimpson) along the coastal California. *Science* 174: 606-608.
- Caso, M. 1978. Los equinoideos del Pacífico de México. Centro de Ciencias del Mar y Limnología. Univ. Auton. México. 54 pp.
- CASTRO, T. y C. GALLARDO 1993. *Artemia* sp. Universidad Autónoma Metropolitana División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento El Hombre y su Ambiente, México. 54 pp.
- CPPS Y PNUMA . 1985. Procedimiento para efectuar bioensayos y pruebas de toxicidad en organismos marinos del Pacífico Sudeste. Formulario F.02. CONPACSE 1 e Instructivo. 34 pp.
- CRITES, R. Y G. TCHOBANOGLIOUS 2000. Tratamiento de Aguas Residuales en Pequeñas Poblaciones. Traducido de Ira. Ed. Small Decentralized Wastewater Managment Systems. Mc Graw-Hill Interamericana, S.A. : 776 pp.
- CHIRICHIGNO, N. y J. VÉLEZ. 1998. Clave para identificar los peces Marinos del Perú. 2da Edición. Publicación Especial. Inst. Mar Perú. 500 pp.
- CHIRICHIGNO, N. 1970. Lista de Crustáceos del Perú (Decapoda y Stomatopoda). Informe Inst. Mar Perú N° 35. 93 pp.
- CHIRINÓS DE VILDOSO, A. Y E. CHUMÁN. 1964. Notas sobre el desarrollo de huevos y larvas del pejerrey *Odontesthes (Austromeniidae) regia regia* (Humboldt). *Bol. Inst. Mar Perú* 1(1): 1-31.
- DINNEL, P.A., STOVER, Q.J., CRUMLEY, S.C. & NAKATANI, R.E. 1982. Development of a sperm cell toxicity test for marine waters. In *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment (15<sup>th</sup> Conference, eds.)*; ASTM STP 766 (J.G. Pearson, R.B. Foster & W.E. Bishop). 82-98. American Society of Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA.
- DUNNETT, C. W. 1995. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with control. *J. Am. Statist. Ass* 50: 1096-1121.
- EFFORD, I. E. 1976. Distribution of the sand crabs in the genus *Emerita* (Decapoda, Hippidae). *Crustaceana* 30:169-183.
- FAO. 1977. Bases for selecting biological tests to evaluate marine pollution. *Fish. Tech. Pap.*, 164:31 pp.
- FOGG, G. 1965. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. The University of Wisconsin Press. 126 pp.
- FOSTER, R.B. 1981. Use of Asiatic Clam Larvae in Aquatic Hazard Evaluations, *Ecological Assessments of Effluent Impacts on Communities of Indigenous Aquatic Organisms*. ASTM STP 730, J. M. Bates and C.I. Weber, (Eds.), American Society for Testing and Materials: 280-288 pp.
- GILEK M., M. BJÖRK, C. NÄF. 1996. Influence of body size on the uptake, depuration and bioaccumulation of polychlorinated biphenyl congeners by Baltic Sea blue mussels, *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 125:499-510.
- GUILLARD, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrate. In: W.L. Smith and M.H. Chanley, (Eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals*: 29-60. Plenum Press, N.Y.
- HOFF, F. and T. SNELL. 1993. *Plankton Culture Manual*. Florida Agua Farms Inc. Third Edition. 147p.
- HUNN, J. 1989. History of acute toxicity tests with fish, 1863-1987. *Investigations in fish control* N° 98:10pp U.S. Fish and Wildlife Service. National Fish. Research Center-La Crosse. Wisconsin.
- LARRAIN, A. 1995. Criterios ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: Importancia de los bioensayos de toxicidad. *Cienc. Tec. Mar. CONA* (N° especial): 39-47.
- MODICA, G., G. MORRISON and E. PETROCELLI. 1991. Development of a Short-Term Toxicity Test Using the Euryhaline Coot-Clam, *Mulinia lateralis*. (Draft).
- ORTIZ, F., M. SANDOVAL y G. ARANEDA. 1991. Metodologías y recomendaciones técnicas para la cualificación y utilización de las cepas nativas de *Artemia*. *Boletín Red Acuicultura*, Santa Fé de Bogotá - Colombia. 5 (3): 15-23
- PANIAGUA, J., F. BUCKLE, C. GRANADOS y D. LOYA. 1989. Manual de Metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. 2da Edición. 63 pp.
- PELTIER, W. y C.I. WEBER. 1985. Methods for measuring acute toxicity of effluents to freshwater and marine organism. Third edition. Environmental Monitoring and Support Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio 45268. EPA - 600/ 4-85-013. 230 pp.
- PNUMA/CPPS/WG. 1988. Bioensayos y pruebas de toxicidad en organismos marinos del Pacífico Sudeste. Cartagena- Colombia, 11-21 abril de 1988.
- RANDALL G.M. Y S.R. PETROCELLI. 1985. *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publishing Corporation, New York. 666 pp.
- ROSSI, S.S., G. W. ROMMEL, A.A. BENSON. 1978. Hydrocarbons in sand crabs (*Emerita analoga*) from southern California. *Chemosphere* 2: 131- 141.
- SÁNCHEZ, G. y V. ALAMO. 1974. Algunos aspectos de la biología del muy muy *Emerita analoga*. Informe Especial IMARPE N°167: 6 pp.
- SÁNCHEZ, G. 1988. Algunos aspectos bio-ecológicos del muy muy *Emerita analoga* (Stimpson, 1857) (Decapoda : Anomura) en playas al Sur de Lima. Tesis para optar el grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, UNMSM.
- SÁNCHEZ, G., J. TAM Y G. VERA. 2001. Pruebas ecotoxicológicas de efluentes pesqueros para determinar la calidad de agua de mar en la bahía de Paracas (Pisco, Perú) .*Inf. Prog. Inst. Mar Perú*



Nº 130.

- SECRETARÍA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL. 1995. Evaluación de toxicidad con *Artemia franciscana* Kellogg (Crustacea-Anostraca) - Método de Prueba. Norma Mexicana - AA- 110- 1995- SCFI.
- SORGELOOS, P., P. LAVENS, P. LEGER, W. TACKAERT and D. VERSICHELE. 1977. Manual para el Cultivo y Uso de Artemia en Acuicultura. Universidad del Estado en Gent- Bélgica, ONU-FAO. 301 pp.
- SPRAGUE, J. B. 1990. Aquatic Toxicology. Ch. 15. In: Schreck, C.B. and P.B. Moyle (eds.), Methods for Fish Biology. American Fisheries Society, Water Quality Section, Bethesda, Maryland, U.S.A.
- THOMANN, R. 1988. Orientación para muestreo, monitoreo y análisis de datos en Manual de Evaluación y Manejo de Sustancias Tóxicas en Aguas Superficiales. Sección 5.
- THRURSTON, R.V., R.C. RUSSO, C.M. FETTEROLF, T.A. EDSALL Y Y.M. BARBER (EDS.). 1979. A review of the EPA red book: quality criteria for water. American Fisheries Society, Water Quality Section, Bethesda, Maryland, USA.
- U.S. EPA. 1988a. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. EPA 600/4-87/028. USEPA Environmental Research Laboratory, Cincinnati, OH.
- U.S.EPA. 1988b. Introduction to water quality standards. USEPA Office of Water, Washington, D.C.
- U.S.EPA. 1989. Biomonitoring for control of toxicity in effluent discharges to the marine environment. EPA/625/8-89/015. USEPA Environmental Research Laboratory, Cincinnati, OH.
- WARREN, C.E. 1971. Biology and water pollution control. Philadelphia, W.B. Saunders Co. 434 pp.
- WEBER, C.I., HORNING, W.B., KLEMM, D.J., NEIHEISEL, T. W., LEWIS, P. A., ROBINSON, E.L., MENKEDICK, J. & KESSLER, F. 1989. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms (EPA/ 600/ 4-87/028). US Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, USA.
- WEST, INC AND DAVE GULLEY. 1996. Toxstat version 3.5. Univ. Wyoming, USA.
- YANG, R., J. PICKARD, K. OMOTANI. 1999. Assessment of Industrial Effluent Toxicity Using Flow-Trough Fish Egg/Alevins/Fry (EAF) Toxicity Test. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 62:440-447.



**ANEXO 1**

**CULTIVO DE MICROALGAS**

Las microalgas o fitoplancton constituyen un elemento importante en todo laboratorio de ecotoxicología, ya que son un requerimiento nutricional para especies herbívoras o para especies cuyos estadios de su ciclo de vida tienen esta dieta.

La dieta en los reproductores filtradores debe ser óptima y suficiente durante su acondicionamiento para la obtención de larvas saludables.

Para realizar el cultivo de microalgas en laboratorio se debe tener en cuenta lo siguiente:

El tamaño de la microalga. El tamaño es básico y va a depender de la capacidad de filtración, tamaño de la boca y esófago, estas variables determinan el tamaño del alimento.

La eficiencia nutritiva de un alimento se basa en la composición nutricional de la microalga, la digestibilidad (limitada por la pared celular) y la toxicidad de los metabolitos que se derivan.

En cuanto al crecimiento y a los factores que afectan el desarrollo en los cultivos se cuenta con mucha bi-

bliografía al respecto ALVEAL *et al.* (1995), PANIAGUA *et al.* (1989), HOFF *et al.* (1993), así como es necesario conocer la ecología del fitoplancton según FOGG (1965) entre otros.

El medio de cultivo que se utiliza comúnmente es el f/2 de GUILLARD (1975), encontrándose otros medios de cultivo según el requerimiento de las algas en las publicaciones ya mencionadas.

Diluir y completar con agua destilada hasta 100 mL.

Solución de metales en traza utilizando cloruro férrico y sodio -EDTA.

Disuelva 3,15 g de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  y 4,36 g de  $Na_2EDTA$  en 900 mL de agua destilada; adicione 1 mL de cada solución stock de metal traza y lleve a 1 000 mL.

El pH de esta solución es de alrededor de 2,0. La solución permanecerá clara si es dejada a pH 2,0. El pH puede ser elevado a 4,5 si se agregan 7 mL de NaOH 1N, formándose un precipitado.

Nota: Si la solución de metales traza es mantenida en pH 2,0 el efecto del pH en el agua de mar es mínimo y, a menos que se use en una cantidad 8 veces superior a la usual ( 8 mL L<sup>-1</sup>), bajará el pH del medio f/2 desde 7,8 a 7,2.

La solución stock de vitaminas preparadas deben llevarse a frascos de 10 mL para guardarlos en el freezer, así evitaremos que se contaminen. Para obtener 1 litro de f/2 se agregará a 1 litro de agua de mar filtrada (0,45 micras) y autoclavada: 1 mL de macronutrientes, 1 mL de metales trazas y 0,5 mL de vitaminas.

FIGURA 20. Cultivo de microalgas marinas. En el primer nivel del estante se halla el cepario (*Chaetoceros* sp., *Isochrysis galbana*, *Dunaliella tertiolecta*, *Dunaliella salina*, *Skeletonema costatum*, entre otras). En el segundo y tercer nivel están los cultivos intermedios (de 1 a 5 L)



FIGURA 21. En el cuarto nivel del estante se observan los cultivos finales en bombonas de 20 litros.

**MEDIOS DE CULTIVO**

**Medio Guillard f/2**

Constituyentes	Fórmula	g/100 m Agua destilada
<b>Macronutrientes</b>		
Nitrato de sodio	$NaNO_3$	7,5
Fosfato de sodio Monobásico	$NaH_2PO_4 \cdot 4H_2O$	0,5
Silicato de Sodio	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	3,0
<b>Metales traza</b>		
Cloruro de Hierro	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	3,15
Secuestrante EDTA	$Na_2Fe \cdot EDTA$	4,36
Sulfato cúprico	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,98
Sulfato de Zinc	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2,20
Cloruro de cobalto	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,00
Cloruro Manganoso	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	18,00
Molibdato de sodio	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,63
<b>Vitaminas</b>		
Biotina	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	1,0 mg
Cianocobalamina(B12)	$C_{63}H_{88}CoN_{14}P$	1,0 mg
Tiamina clorhídrica	$C_{12}H_{17}ClN_4OS$	200 mg

## ANEXO 2

### OBTENCIÓN DE NAUPLIOS DE *ARTEMIA*

La utilización de la *Artemia* en los cultivos de organismos marinos es amplia, desde los primeros estadios larvales hasta adulto sirve de alimento para peces y crustáceos, debido a su fácil manejo y principalmente por su contenido nutricional.

En las pruebas de toxicidad de larga duración se hace necesaria la alimentación de los organismos-prueba de dieta carnívora, y para ello uno de los crustáceos que más se utilizan son los nauplios de artemia obtenidos a partir de los quistes o cápsulas.

#### Obtención de nauplios de artemia a partir de quistes

A la fecha, muchos investigadores trabajan sobre la evaluación y comparación de cepas de *Artemia* debido a dos razones:

La calidad de la *Artemia*, varía notablemente de una zona geográfica a otra.

No todos los quistes de artemia pueden ser utilizados bajo una misma metodología, por lo que deben conocerse las características propias de cada cepa, con el fin de darle un manejo que permita su máximo aprovechamiento.

La variabilidad de una cepa puede manifestarse en diferentes aspectos: tamaño de los quistes, grosor de la cápsula, tamaño del huevo, del nauplio y del adulto, las cuales son variables difíciles de cambiar y que sólo podemos manejar para obtener el mejor provecho. Desde luego existe el manejo genético.

Otros aspectos son los relativos a la eficiencia en producción de nauplios, que puede estar muy influenciada por la forma de colecta, la limpieza y la conservación de los quistes.

La eficiencia de eclosión va a depender, a parte de lo ya mencionado, con respecto a la variabilidad y a la co-

lecta, a la metodología de eclosión de los quistes. Un ejemplo claro es el tiempo de la descapsulación, que varía dependiendo del grosor del corión, la salinidad, la temperatura, que son factores importantes para la eclosión y cuyos valores oscilan de una cepa a otra (SORGEOLOS *et al.* 1977; ORTIZ *et al.* 1991; HOFF *et al.* 1993; CASTRO Y GALLARDO 1993).

#### Descapsulación

La cápsula o corión, que envuelve el embrión de *Artemia*, es una protección natural para poder mantener vivo al futuro nauplio, ante los cambios del clima y en general de un medio ambiente agresivo. La técnica de descapsulación, propuesta por SORGEOLOS *et al.* (1977) consiste en:

- Los quistes secos son hidratados en un contenedor de fondo cónico con agua dulce o marina, y se mantienen en suspensión por medio de aireación desde el fondo.

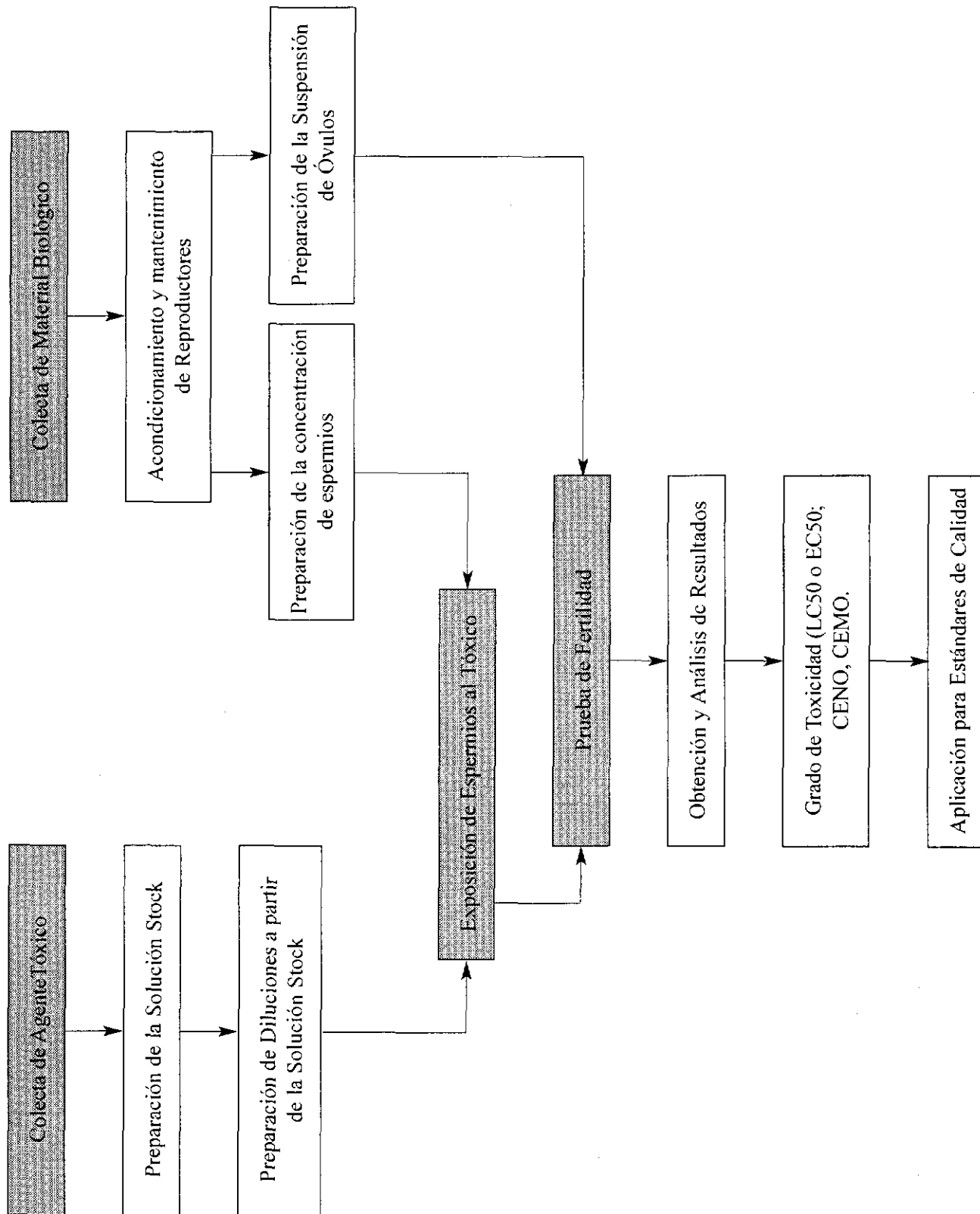
- Pasada una hora, los quistes son puestos en una solución al 2,12% de hipoclorito de sodio. El proceso de oxidación se inicia inmediatamente y como los coriones se disuelven se observa un cambio en la coloración que va del café al blanco o naranja.

- Entre 7 a 10 minutos los coriones desaparecen completamente, y los quistes descapsulados deben ser enjuagados en agua dulce o marina.

- Los quistes tratados son incubados en una pera de decantación y con aireación directamente para su eclosión.

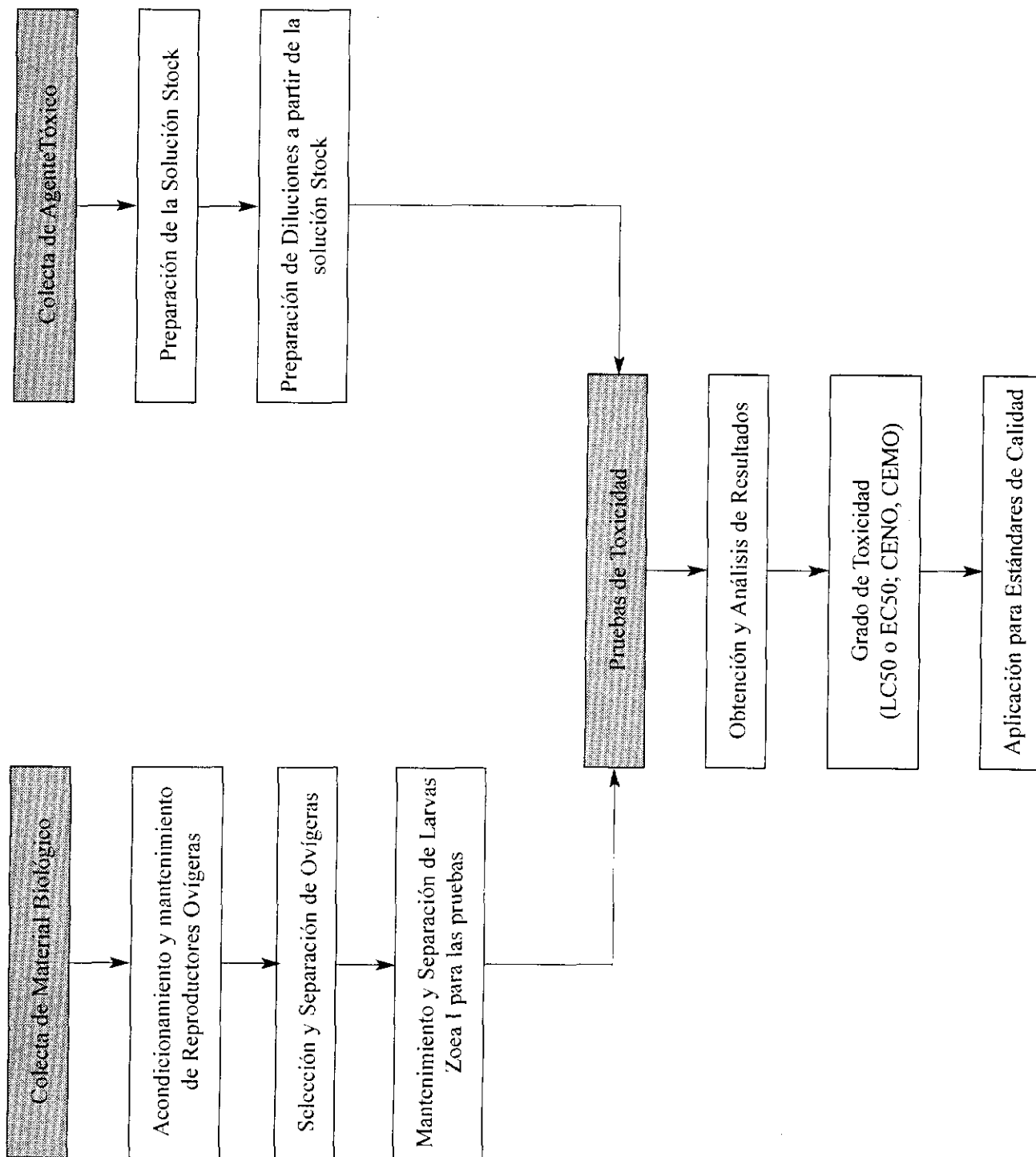
- Obtenida la eclosión máxima pasada las 24 horas, suspender la aireación para que los nauplios se concentren en el fondo de la pera, colectarlos con un tamiz de nylon de 100 micras de abertura y lavarlos con agua de mar estéril para luego proporcionarlos a los organismos - prueba, si la prueba lo requiere.

ANEXO 3. PRUEBAS DE TOXICIDAD CON GAMETOS DEL "ERIZO MARRÓN" *ARBACIA SPATULIGERA*

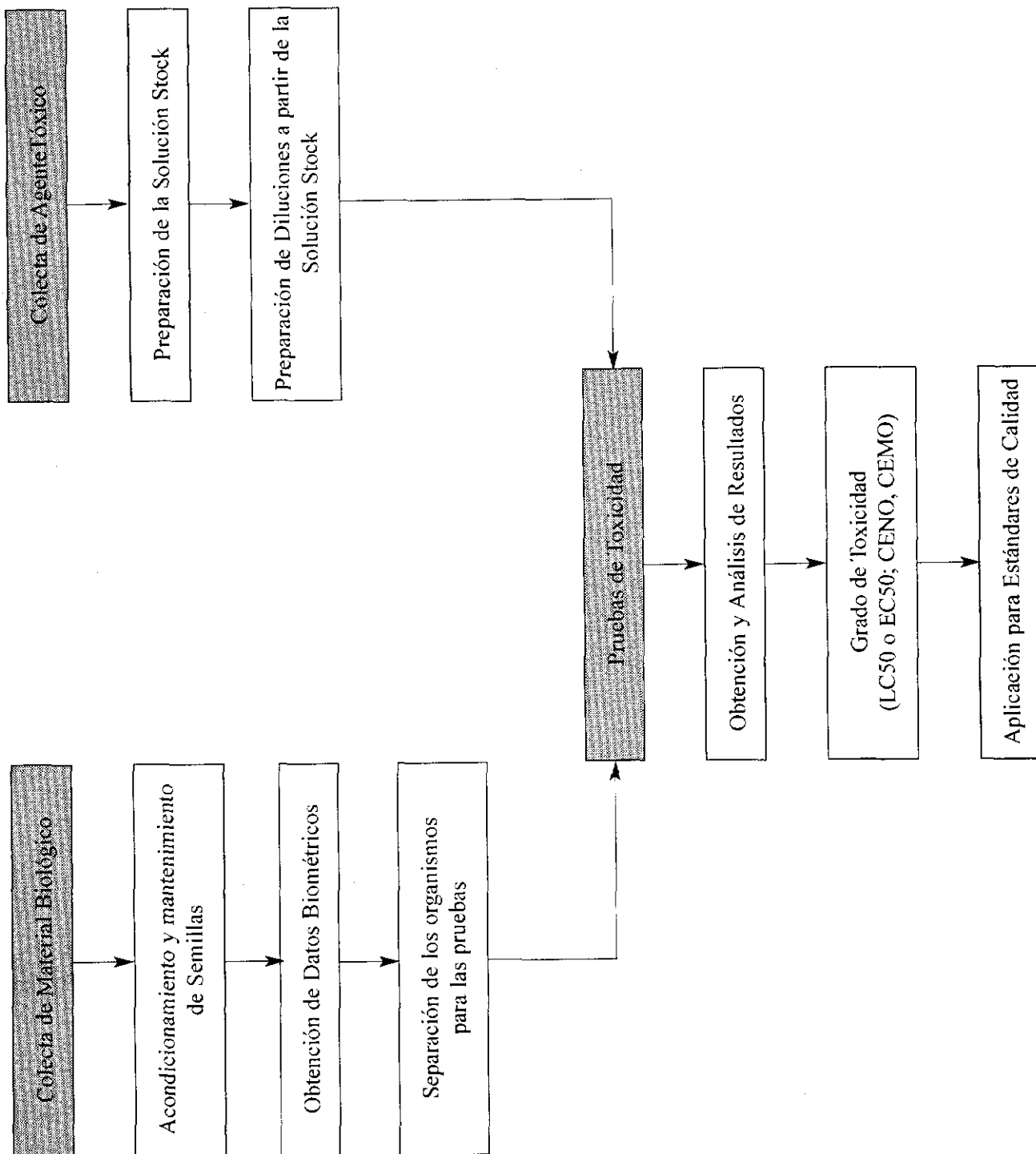




ANEXO 4. PRUEBAS DE TOXICIDAD CON LARVAS ZOEIA I DEL "MUY MUY" EMERITA ANALOGA.

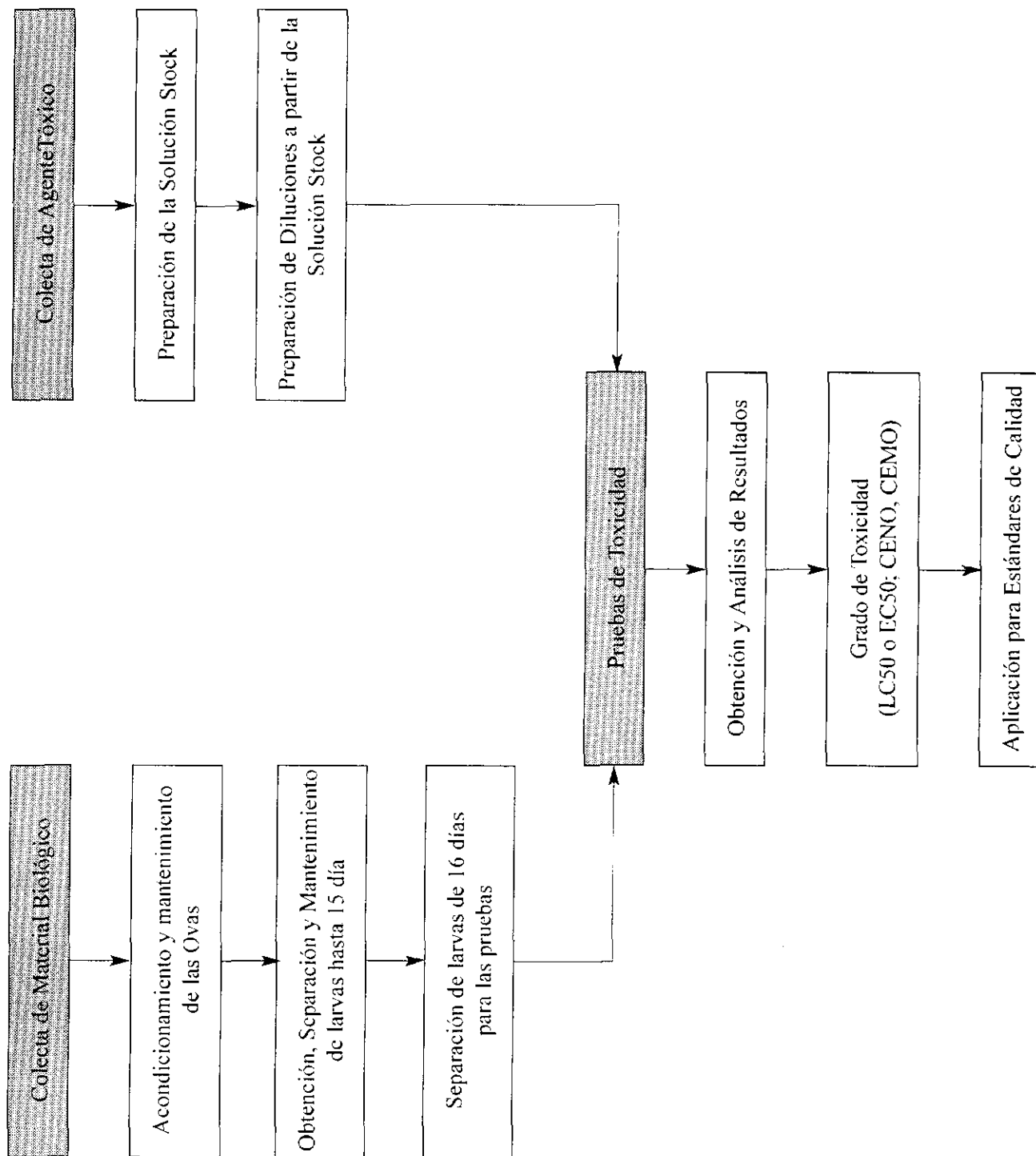


ANEXO 5. PRUEBAS DE TOXICIDAD CON SEMILLAS DE "CONCHA DE ABANICO" *ARGOPECTEN PURPURATUS*.





ANEXO 6. PRUEBAS DE TOXICIDAD CON LARVAS DEL "PEJERREY" *ODONTESTHES R. REGIA*.



### ANEXO 7. FORMULARIO PARA LA COLECTA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA SU UTILIZACIÓN COMO ORGANISMO - PRUEBA

Código de la Muestra : \_\_\_\_\_

Lugar de la colecta : \_\_\_\_\_

Fecha de la colecta : \_\_\_\_\_

Especie/Edad : \_\_\_\_\_

Número de individuos: \_\_\_\_\_

Parámetros ambientales del lugar de la colecta:

Temperatura (°C)		Coliformes termotolerantes		SST	
Oxígeno (N°botella)*		DBO5		Grasas	
Salinidad		DQO		Amonio	
pH		Conductividad		Sulfuros	

OBSERVACIONES:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

INFORME ADICIONAL:

Colector (es) : \_\_\_\_\_

Fecha de recepción : \_\_\_\_\_

Recepción por : \_\_\_\_\_

\*N° de botella: En el recuadro se anotará el número o código de la botella donde se colectó la muestra.



**ANEXO 9. FORMULARIO PARA EL REGISTRO DE SOBREVIVENCIA DURANTE LAS PRUEBAS DE TOXICIDAD Y DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS.**

CÓDIGO DEL AGENTE TÓXICO : \_\_\_\_\_  
 FECHA DE LA PRUEBA : \_\_\_\_\_  
 HORA DE LA PRUEBA : \_\_\_\_\_  
 ORGANISMO -PRUEBA : \_\_\_\_\_  
 LARVA SI  NO  FECIA DE ECLOSION: \_\_\_\_\_  
 ADULTO SI  NO   
 SEXO II  M

ALIMENTO : \_\_\_\_\_  
 TIPO DE PRUEBA : \_\_\_\_\_  
 AIREACION : SI  NO   
 RESPONSABLES : \_\_\_\_\_

CONCENTRACIÓN/COLOR:		Replica:						
HORAS	0	24	48	72	96	120	144	168
Supervivencia								
Temperatura								
Salinidad								
O <sub>2</sub>								
pH								
Amoniaco u otros gases								
Nº de organismos								

CONCENTRACIÓN/COLOR:		Replica:						
HORAS	0	24	48	72	96	120	144	168
Supervivencia								
Temperatura								
Salinidad								
O <sub>2</sub>								
pH								
Amoniaco u otros gases								
Nº de organismos								

CONCENTRACIÓN/COLOR:		Replica:						
HORAS	0	24	48	72	96	120	144	168
Supervivencia								
Temperatura								
Salinidad								
O <sub>2</sub>								
pH								
Amoniaco u otros gases								
Nº de organismos								

DÍA	0	1	2	3	4	5	6	7
Hora de alimentación								
Cantidad de alimento								

CONCENTRACIÓN/COLOR:		Replica:						
HORAS	0	24	48	72	96	120	144	168
Supervivencia								
Temperatura								
Salinidad								
O <sub>2</sub>								
pH								
Amoniaco u otros gases								
Nº de organismos								

CONCENTRACIÓN/COLOR:		Replica:						
HORAS	0	24	48	72	96	120	144	168
Supervivencia								
Temperatura								
Salinidad								
O <sub>2</sub>								
pH								
Amoniaco u otros gases								
Nº de organismos								

CONCENTRACIÓN/COLOR:		Replica:						
HORAS	0	24	48	72	96	120	144	168
Supervivencia								
Temperatura								
Salinidad								
O <sub>2</sub>								
pH								
Amoniaco u otros gases								
Nº de organismos								

DBO 5       HIDROCARBUROS   
 MICROBIOLÓGICO       METALES   
 ACHITES Y GRASAS       SOL SUSPENDIDOS



Anexo 9. Continuación.

CONCENTRACIÓN/COLOR:		Replica:						
HORAS	0	24	48	72	96	120	144	168
Supervivencia								
Temperatura								
Salinidad								
O <sub>2</sub>								
pH								
Amoníaco u otros gases								
Nº de organismos								

CONCENTRACIÓN/COLOR:		Replica:						
HORAS	0	24	48	72	96	120	144	168
Supervivencia								
Temperatura								
Salinidad								
O <sub>2</sub>								
pH								
Amoníaco u otros gases								
Nº de organismos								

CONCENTRACIÓN/COLOR:		Replica:						
HORAS	0	24	48	72	96	120	144	168
Supervivencia								
Temperatura								
Salinidad								
O <sub>2</sub>								
pH								
Amoníaco u otros gases								
Nº de organismos								

CONCENTRACIÓN/COLOR:		Replica:						
HORAS	0	24	48	72	96	120	144	168
Supervivencia								
Temperatura								
Salinidad								
O <sub>2</sub>								
pH								
Amoníaco u otros gases								
Nº de organismos								

CONCENTRACIÓN/COLOR:		Replica:						
HORAS	0	24	48	72	96	120	144	168
Supervivencia								
Temperatura								
Salinidad								
O <sub>2</sub>								
pH								
Amoníaco u otros gases								
Nº de organismos								

CONCENTRACIÓN/COLOR:		Replica:						
HORAS	0	24	48	72	96	120	144	168
Supervivencia								
Temperatura								
Salinidad								
O <sub>2</sub>								
pH								
Amoníaco u otros gases								
Nº de organismos								

OBSERVACIONES:

---



---



---



---

**ANEXO 10. FORMULARIO PARA EL REGISTRO DE FERTILIZACIÓN EN *ARBACIA SPATULIGERA***

ORGANISMO PRUEBA : \_\_\_\_\_  
 FECHA DEL BIOENSAYO : \_\_\_\_\_  
 HORA DE INICIO : \_\_\_\_\_  
 HORA DE TÉRMINO : \_\_\_\_\_  
 AGENTE TÓXICO : \_\_\_\_\_

PROCEDENCIA : \_\_\_\_\_  
 FECHA DE MUESTREO : \_\_\_\_\_

PROCEDIMIENTO :

NÚMERO DE ÓVULOS : Sedgwick-Rafter : N° de óvulos contabilizados

Tubo Ov 1 = \_\_\_\_\_

Tubo Ov 2 = \_\_\_\_\_

Promedio = \_\_\_\_\_ = NOM

NOM - 200 = \_\_\_\_\_ mL de agua de mar para agregar al stock de óvulos

NÚMERO DE ESPERMIOS : Hematocitómetro : N° de espermios (tubo D) contabilizados

Lado 1 \_\_\_\_\_

Lado 2 \_\_\_\_\_

Promedio ( 5 ) \_\_\_\_\_ x 25 x 10,000 = NEM en tubo D = \_\_\_\_\_

NEM D x 2,000 = \_\_\_\_\_ NEM del stock original

N° DE DILUCIONES : \_\_\_\_\_

N° DE RÉPLICAS : \_\_\_\_\_

VOLUMEN TOTAL : \_\_\_\_\_

PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DEL AGUA DE MAR:

TEMPERATURA: \_\_\_\_\_

SALINIDAD: \_\_\_\_\_

pH: \_\_\_\_\_

RESULTADOS:

NÚMERO DE ÓVULOS FERTILIZADOS Y NO FERTILIZADOS

COLOR/DILUCIÓN	RÉPLICA 1		RÉPLICA 2		RÉPLICA 3		RÉPLICA 4		TOTAL
	Fertiliz.	No fert.	Fertiliz.	No fert.	Fertiliz.	No fert.	Fertiliz.	No fert.	RESPUESTA
Blanco									

OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_

RESPONSABLE (S): \_\_\_\_\_