

UNIVERSIDAD CATÓLICA SEDES SAPIENTIAE

FACULTAD DE INGENIERÍA AGRARIA



Efectos de la contaminación marina producida por las fábricas de
harina de pescado en el desarrollo embrionario del “Erizo de mar”
Tetrapygus niger (Molina, 1782)

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AMBIENTAL**

AUTOR

Keyla Yashira Sánchez Chinga

ASESOR

Roger Manuel Mestas Valero

Huara, Perú

2020

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

ACTA N° 04.- 2020/UCSS/FIA/DI

Siendo las 15:00 p.m. del día 02 de marzo de 2020, en Aula N° 5 de la Filial Huaura: Végueta - Universidad Católica Sedes Sapientiae, el Jurado de Tesis, integrado por:

- | | |
|---------------------------------------|-----------------|
| 1. Dr. José Luis Rodríguez Núñez | Presidente |
| 2. Mg. Sc. Wilfredo Mendoza Caballero | Primer Miembro |
| 3. Mg. Segundo Octavio Zegarra Aliaga | Segundo Miembro |
| 4. Dr. Roger Manuel Mestas Valero | Asesor |

Se reunieron para la sustentación de la tesis titulada: "EFECTOS DE LA CONTAMINACIÓN MARINA PRODUCIDA POR LAS FÁBRICAS DE HARINA DE PESCADO EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL "ERIZO DE MAR" (*Tetrapygus niger* Molina)", que presenta la bachiller en Ciencias Ambientales, la Sra. Keyla Yashira Sánchez Chinga cumpliendo así con los requerimientos exigidos por el reglamento para la modalidad de titulación; la presentación y sustentación de un trabajo de investigación original, para obtener el Título Profesional de **Ingeniero Ambiental**.

Terminada la sustentación y luego de deliberar, el Jurado acuerda:

APROBAR

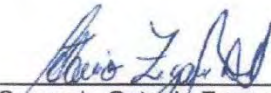
DESAPROBAR

La tesis, con el calificativo de *Muy Buena* y eleva la presente Acta al Decanato de la Facultad de Ingeniería Agraria, a fin de que se declare EXPEDITA para conferirle el TÍTULO de INGENIERO AMBIENTAL.

Firmado en Huaura, 02 de marzo de 2020.


Dr. José Luis Rodríguez Núñez
PRESIDENTE


Mg. Sc. Wilfredo Mendoza Caballero
1° MIEMBRO


Mg. Segundo Octavio Zegarra Aliaga
2° MIEMBRO


Dr. Roger Manuel Mestas Valero
ASESOR

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación va dedicado a Dios porque ha estado conmigo en cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza.

A mis padres Valentín Sánchez Guerrero y Rosa Chinga Martínez, quienes a lo largo de mi vida han velado por mí, a ti papito que siempre has buscado darme lo mejor, porque no importaba que llegaras cansado del trabajo, siempre preferías estar con tu familia, a ti mamita por todo tu apoyo incalculable para poder culminar con la carrera, tus palabras de aliento y sobre todo tu paciencia.

A mi esposo Vladimir Duran Melgarejo por tu apoyo incondicional, por creer en mi capacidad como esposa, amiga y mujer.

A mi querida hija Isumi Duran Sánchez por ser mi fuente de motivación para poder superarme cada día más y permitirme luchar para que la vida nos depare un futuro mejor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Católica Sedes Sapientiae por permitirme ser parte de ella, así mismo a todos los docentes que formaron parte de la carrera brindando sus conocimientos y apoyo, al profesor Lenin Cabracancho, Heidi Sánchez Torres, Juan Ignacio Pastén, José Luis Rodríguez, Walter Yasuda y Gloria Rivera Añaguari, entre otros.

Agradezco también a mi asesor, el Ing. Roger Mestas Valero por haberme brindado sus conocimientos científicos y capacidad para guiarme durante todo el desarrollo de la tesis, así mismo, al Biólogo Armando Chiclla Salazar por su apoyo incalculable en el desarrollo de la tesis durante la etapa de laboratorio, análisis de muestras, entre otros aspectos, mi agradecimiento no solo por sus enseñanzas a lo largo de mi carrera universitaria, sino también por haber formado parte de las pocas personas en las que puedo confiar, y sobre todo por sus consejos.

Mi agradecimiento también va dirigido a todas las personas que de alguna manera contribuyeron con su apoyo para esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE APÉNDICES.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	2
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	3
1.1. Antecedentes.....	3
1.1.1. Antecedentes internacionales	3
1.1.2. Antecedentes nacionales	6
1.2. Bases teóricas especializadas	9
1.2.1. Contaminación marina en el Perú.....	9
1.2.2. Contaminación marina en el Perú por efluentes industriales pesqueros.....	9
1.2.3. Contaminación ambiental por la actividad de procesamiento de Harina de pescado.....	10
1.2.4. Contaminación por metales pesados.....	12
1.2.5. Contaminación del mar en la zona norte de Lima	13
1.2.6. Sedimentos marinos.....	13
1.2.7. Evaluación de la contaminación usando bioensayos	14
1.2.8. “erizo de mar” (<i>Tetrapygyus niger</i>).....	15
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1. Diseño de la investigación.....	19
2.2. Lugar y fecha.....	19
2.3. Descripción del experimento.....	19
2.3.1. Trabajo en campo	20
2.3.2. Trabajo en laboratorio.....	22
2.4. Tratamientos.....	27
2.5. Unidades experimentales	28

2.6. Diseño estadístico	30
2.7. Análisis estadísticos de datos	30
CAPÍTULO III: RESULTADOS	31
3.1. Resultados	31
3.1.1. Descripción de los agentes contaminantes presentes en el elutriado.....	31
3.1.2. Resultado del efecto antimitótico en el desarrollo embrionario de <i>T. niger</i> ..	32
3.1.3. Defectos del desarrollo embrionario.....	38
3.1.4. Resultados de la evaluación de la toxicidad aguda (DL ₅₀) del elutriado sobre la fertilización de gametos de <i>T. niger</i>	43
CAPÍTULO IV: DISCUSIONES	46
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES	51
CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES.....	52
REFERENCIAS	53
TERMINOLOGÍA.....	60
APÉNDICES	62

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Tratamientos de la presente investigación.....	27
Tabla 2. Valores iniciales de los parámetros correspondientes al análisis fisicoquímico de la muestra del elutriado del sedimento marino.....	32
Tabla 3. Porcentaje de las divisiones celulares a los 90 minutos de evaluación (promedio \pm D.S)	34
Tabla 4. Análisis de varianza de los tratamientos con el porcentaje de división celular	35
Tabla 5. Porcentaje de los estadios de desarrollo de erizo de mar T. niger en los diferentes tratamientos	37
Tabla 6. Análisis de varianza entre los porcentajes de los estadios embrionarios y los tratamientos	38
Tabla 7. Defectos del desarrollo embrionario (%) registrados en los tratamientos	39
Tabla 8. Resultados del conteo de huevos no fértiles a la exposición con el elutriado	44
Tabla 9. Resultados del análisis Probit para la determinación de la DL ₅₀ del elutriado	44

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<i>Figura 1.</i> <i>Tetrapygyus niger</i> (Molina, 1782). Testa, vista aboral.	15
<i>Figura 2.</i> Etapas del desarrollo de <i>Tetrapygyus niger</i> “Erizo negro” (400X)..	17
<i>Figura 3.</i> Draga Van Veen usada en la extracción de sedimentos marinos.	20
<i>Figura 4.</i> Orilla rocosa de la Playa de San Francisco - Ancón.	21
<i>Figura 5.</i> Acondicionamiento de los Erizos de mar en el laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la UCSS.	22
<i>Figura 6.</i> Extracción del elutriado del sedimento y su caracterización físico química.	23
<i>Figura 7.</i> Determinación del punto de muestreo de los sedimentos marinos en la Caleta de Carquín - Huaura.	24
<i>Figura 8.</i> Obtención de gametos de los erizos de mar.....	25
<i>Figura 9.</i> Exposición de los huevos de erizo de mar a diferentes concentraciones del elutriado. <i>Fuente:</i> Elaboración propia	26
<i>Figura 10.</i> Evaluación de la toxicidad aguda (DL ₅₀) en erizos de mar.	30
<i>Figura 11.</i> Clivaje normal de células fértiles (2, 4, 8 y 32 células) a los 90 minutos. Microfotografías realizadas a 400 X.....	33
<i>Figura 12.</i> Porcentaje de clivaje celular a los 90 minutos.	34
<i>Figura 13.</i> Estadios de desarrollo (Blástula, Gástrula, Prisma y Pluteus temprano) normales. Microfotografías realizadas a 400X.....	36
<i>Figura 14.</i> Porcentajes obtenido vs los cuatro tratamientos y el control.	37
<i>Figura 15.</i> Anomalías del desarrollo de embriones a las primeras horas de desarrollo. Microfotografía realizada a 400X.....	40
<i>Figura 16.</i> Lisis de célula a nivel de blástula, en donde se observa rompimiento de las membranas que protegen al embrión. Microfotografía a 400X.	40
<i>Figura 17.</i> Embrión con blastómeros disgregados, se observaron a las 12 horas. Las microfotografías están a 40X.....	41
<i>Figura 18.</i> Rompimiento de la membrana de los embriones y adherencia de células no desarrolladas. Microfotografías a 40X.....	42
<i>Figura 19.</i> Huevos fértiles de <i>T. niger</i> . Microfotografía realizada a 400X.	45
<i>Figura 20.</i> Huevos no fértiles de <i>T. niger</i> . Microfotografía realizada a 400X.	45

ÍNDICE DE APÉNDICES

	Pág.
Apéndice 1. Prueba de Tukey del tratamiento y el porcentaje de clivaje celular.....	62
Apéndice 2. Prueba de Tukey de las células en división y el porcentaje de división celular	63
Apéndice 3. Prueba de Tukey de los estadios y su porcentaje	64
Apéndice 4. Desarrollo normal embrionario del erizo.....	65
Apéndice 5. Registro fotográfico de la investigación	66

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar los efectos de la contaminación marina producida por las fábricas de harina de pescado en el desarrollo embrionario del “erizo de mar” (*Tetrapyqus niger* Molina). Se recolectó muestras de sedimentos de la zona marina cercana a la zona de arrojado de los lixiviados de las empresas pesqueras, ubicadas en la Caleta de Carquín (Lat.: 11 ° 5' 14.39" S, Long. 77° 38' 12.59" O), las cuales fueron trasladadas al laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la Universidad Católica Sedes Sapientiae para la extracción del elutriado (400 ml). Los “erizos de mar” fueron recuperados de la zona rocosa de la playa San Francisco - Ancón y trasladados al laboratorio para ser mantenidas en acuarios. Se realizó la fecundación in vitro de gametos recuperados a partir de los erizos adultos. Se aplicaron 4 tratamientos a diversas concentraciones del elutriado (100 %, 50 %, 25 %, 12.5 % y control) sobre los huevos fecundados y se realizó, además la evaluación de la toxicidad aguda (DL₅₀) del elutriado sobre la fertilización de gametos del erizo de mar. Los resultados de la presente investigación muestran que el porcentaje de fecundación disminuye conforme se incrementa las concentraciones del elutriado de manera significativa ($p < 0.05$) (81 % de fecundación para una concentración de 12.5 % y 22 % para una concentración de 100 % del elutriado). También se observó que a medida que aumenta las concentraciones del elutriado, el porcentaje de embriones con división normal va disminuyendo. El tratamiento 1 y el tratamiento 2 que contenían elutriado al 100 % y 50 % de concentración respectivamente, generaron el mayor efecto inhibitorio del desarrollo embrionario, registrándose solo la presencia de los estadios de blástula y gástrula en ellos y con gran presencia de embriones anómalos, mientras que el control logró su desarrollo normal hasta larva pluteus a las 76 horas de evaluación. La prueba de toxicidad aguda (DL₅₀) registró una dosis de 10.73 % de la concentración del elutriado.

Palabras claves: Desarrollo embrionario, *Tetrapyqus niger*, elutriado, sedimentos marinos.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the effects of marine pollution produced by fishmeal factories on the embryonic development of the “sea urchin” (*Tetrapygus niger* Molina). Sediment samples were collected from the marine area near the area of the leachate of the fishing company (Lat.: 11° 5' 14.39" S, Long. 77° 38' 12.59" W) which were transferred to the Laboratorio de Microbiología y Biotecnología of the university Católica Sedes Sapientiae for the extraction of elutriado (400 ml). The sea urchins were obtained from the rocky area of San Francisco - Ancon beach and transferred to the laboratory to be kept in aquariums. The in vitro fertilization of gametes obtained from adult urchins was performed. Four treatments were applied to different concentrations of the elutriated (100 %, 50 %, 25 % y 12.5 %) on the fertilized eggs and the evaluation of the acute toxicity (DL₅₀) of the elutriated on the fertilization of gametes of the sea urchin was carried out. The results of the present investigation show that the percentage of fecundation decreases; as elutriate concentrations are increased significantly ($p < 0.05$) (81 % fertilization for a concentration of 12.5 % and 22 % for a concentration of 100 % elutriate). It was also observed that as the elutriated concentrations increase, the percentage of embryos with normal cleavage decreases. Treatment 1 and treatment 2 containing 100 % elutriated and 50 % concentration, respectively, generated the greatest inhibitory effect of embryonic development, with only the presence of the blastula and gastrula stages in them and with a high presence of abnormal embryos, while control achieved its normal development until larva pluteus at 76 hours of evaluation. The water toxicity test (DL₅₀) recorded a dose of 10.73 % of the elutriated concentration.

Key words: Embryonic development, *Tetrapygus niger*, elutriated, marine sediments.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo industrial en los últimos años está generando problemas ambientales a nivel mundial. En el Perú la industria pesquera está provocando problemas de alto impacto como es la pérdida de recursos marinos producto de la contaminación marina (Cabrera *et al.*, 2005). En el norte de Lima y en especial el distrito de Caleta de Carquín, la industria pesquera presenta un incremento en los últimos años lo que se refleja en un mayor desembarque de recursos hidrobiológicos y un mayor vertido de efluentes líquidos industriales como son agua de bombeo, agua de cola, sanguaza y aguas industriales. Estos efluentes han provocado desequilibrios en el contenido nutricional de las aguas marinas, provocando la pérdida paulatina de la biodiversidad principalmente presente en las áreas costeras de esta región.

Es por ello que en la actualidad se busca evaluar la calidad ambiental de muestras de sedimentos de ecosistemas marinos a través del uso de bioensayos en etapas embrionarias y larvarias de organismos marinos (Carr *et al.*, 1996). El equinodermo más usado para evaluar la toxicidad de sedimentos marinos es el erizo de mar, debido a las numerosas ventajas que presenta (Fernández, 2002).

Además, el erizo de mar es un organismo cosmopolita, abundante y de fácil recolección, ya que puede mantenerse en condiciones de laboratorio sin presentar dificultades. Asimismo, posterior a obtener gametos, se logra la fecundación y el desarrollo embrionario *in vitro* de una manera sencilla (Ghorani *et al.*, 2012).

En la presente investigación se evaluó los efectos de la contaminación marina, producida por las fábricas de harina de pescado ubicadas en la Caleta de Carquín, a través de la evaluación del desarrollo embrionario del “erizo de mar” (*Tetrapygus niger*) en presencia de diferentes concentraciones del elutriado procedente de los sedimentos marinos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar los efectos de la contaminación marina producida por las fábricas de harina de pescado presentes en el elutriado del sedimento marino, en el desarrollo embrionario del “erizo de mar” (*Tetrapygyus niger* Molina).

Objetivos Específicos

- Evaluar la presencia de agentes contaminantes presentes en el elutriado en el desarrollo embrionario del “erizo de mar” (*Tetrapygyus niger*).
- Evaluar el efecto antimitótico en el desarrollo embrionario de *T. niger* y las malformaciones embrionarias por efecto del elutriado.
- Evaluar la toxicidad aguda (DL₅₀) del elutriado sobre la fertilización de gametos de erizo de mar *T. niger*.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

1.1.1. Antecedentes Internacionales

Mendiola *et al.*, (1998) realizaron una investigación cuyo objetivo fue evaluar el potencial contaminante de los vertidos al mar procedentes de las harinas y aceites de pescado. El estudio estuvo centrado en la localidad de Santoña, España. La metodología usada para esta investigación consistió en analizar muestras de aguas durante cinco días sucesivos, los parámetros considerados fueron la temperatura, pH, tamaño de partícula, materia orgánica, demanda química de oxígeno y presencia o ausencia de Salmonellas. Adicionalmente se realizó un perfil de ácidos grasos de los aceites de pescado mediante un cromatógrafo Perkin-Elmer 8600. Los resultados mostraron bajos valores en el porcentaje de peso de la materia orgánica del efluente analizado; además, una ausencia de Salmonellas en el agua, así como, un valor de pH de las aguas moderadamente ácidas (5,5) muy cercanas a valores óptimos para la vida de organismos acuáticos. Otro resultado a tener en cuenta es una alta concentración de grasas en el efluente evaluado. Los autores concluyeron que estas aguas presentan un bajo potencial contaminante, que podría revertirse si la constancia de vertido aumenta. Se recomienda realizar un plan preventivo de descontaminación disminuyendo el volumen de los residuos.

Manzo (2004) realizó bioensayos modificados de la prueba de embriotoxicidad usando un número limitado de óvulos. El objetivo de este trabajo fue verificar la fiabilidad de la prueba de embriotoxicidad de erizo de mar simplificada, para lo cual evaluó su repetitividad y comparó los resultados con los recuperados en un bioensayo tradicional bajo las mismas condiciones de prueba. En este estudio usó embriones de especímenes adultos de *Paracentrotus lividus* (Lamarck) colectados del mar Tirreno (bahía de Nápoles), Italia. Los embriones fueron criados en agua de mar filtrada y expuestos al aumento de

concentraciones de dicromato de potasio y sulfato de cobre. Luego calculó el DL₅₀. El análisis de los resultados evidenció una buena repetibilidad. Los límites de confianza en todas las pruebas lo superpusieron; además el análisis de correlación de datos entre los resultados de ambas pruebas mostró una alta correlación significativa. El autor concluye que esta nueva prueba de embriotoxicidad parecía ser una buena alternativa frente a los métodos tradicionales, además, las técnicas como la criopreservación de huevos fertilizados podrían ser una herramienta útil para mejorar la velocidad de la prueba y tener disponibilidad de embriones todo el año; incluso, podría ser un primer paso hacia un nuevo kit ecotoxicológico de rutina para el agua de mar.

Martínez *et al.*, (2006) evaluaron la calidad ambiental de sedimentos en la costa española a través del ejercicio interlaboratorio de bioensayos con embriones del “erizo de mar” *Paracentrotus lividus*; el primer ejercicio se realizó en el año 2003 con el dragado de varios puertos de España, en la que se evaluó la toxicidad de seis muestras de sedimentos. Los embriones utilizados en la prueba fueron procedentes de una pareja de *P. lividus*, recogidos *in situ*, que a través de la fecundación *in vitro* se obtuvo el material biológico del “erizo de mar”, donde se introdujeron de 20 a 30 embriones en recipientes de incubación conteniendo los lixiviados con cuatro réplicas por cada lixiviado, más el respectivo control conformado por agua de mar. Luego se incubó durante 48 horas a 20 °C en oscuridad. Posteriormente las muestras lo fijaron con unas gotas de formaldehído al 40 %. El segundo ejercicio lo realizaron en el año 2004 para lo cual el ensayo siguió el procedimiento establecido en el ejercicio primero. Sin embargo, hubo algunas modificaciones en función a una mejora en la homogeneidad metodológica, principalmente en la aireación de los lixiviados previo a la incubación con el objetivo de evitar falsos positivos generados por la existencia de sulfuros o amonio en las respectivas muestras. El análisis de los resultados lo realizaron mediante el análisis de varianza ANOVA y el método de Tukey, asimismo, utilizando el software SPSS 11.5. El coeficiente de variación medio para la Fase I o primer ejercicio fue de 61 %, donde el mayor porcentaje fue en la muestra B con 116 % y para el control un valor de 9.7 %. El coeficiente de variación medio para la Fase II o segundo ejercicio fue de 49 %, donde el mayor porcentaje fue en la muestra E con 162.9 % y para el control un valor de 1.0 %; respecto a la variabilidad interlaboratorio del ensayo fue de 63 % cuando calibraron la EC₅ (concentración efectiva que genera una disminución de la respuesta en el 50 % de la población). Observaron una reducción en las larvas pluteus normales superior a 20 % en

relación a la muestra control. Asimismo, la muestra E fue encontrada altamente tóxica en comparación a las muestras C, D y F y las muestras A y B resultaron no tóxicas.

Cerón *et al.*, (2014) evaluaron la toxicidad aguda de un fluido de exploración *offshore* en la fecundación del “erizo de mar” *Lytechinus variegatus* (Lamarck). El estudio lo realizaron durante nueve meses en el Laboratorio de Bioprospección Marina del Invemar – Colombia. El material biológico *L. variegatus* fue recolectado en la Bahía de Chengue donde se inició con el proceso de cuarentena, luego procedieron a la inducción y obtención de gametos; el mantenimiento de gametos; la determinación de la calidad de los gametos; el manejo de gametos para conteo y realización de diluciones. En tanto el ensayo de fecundación obtuvieron al fecundar 2 000 ovocitos con 50 000 000 espermatozoides y se contaron 200 ovocitos para determinar el porcentaje de fecundación en cada una de las réplicas. Respecto a los ensayos con tóxico de referencia y lodo, utilizaron el sulfato de cobre pentahidratado (sustancia con características tóxicas frente a organismos acuáticos). Estos ensayos lo prepararon a diferentes concentraciones del tóxico a partir de una solución madre de 200 mg. l⁻¹, mientras que para los ensayos con el lodo trabajaron con una dilución de 1:9 (lodo: agua) (v/v). Por lo tanto, para los experimentos con el sulfato de cobre pentahidratado y la fase suspendida particulada del lodo utilizaron el procedimiento del bioensayo de fecundación en la determinación de la concentración de esperma. La CE₅₀ en 20.45 +/- 1.90 mg. l⁻¹ para el tóxico y 3 649 mg. l⁻¹ +/- 400 mg. l⁻¹ correspondiente a la fase suspendida particulada del lodo. En el diseño experimental y análisis estadístico desarrollaron el índice de fecundación que se requirió para obtener la CE₅₀ a través del análisis Probit. Los resultados indicaron un alto grado de sensibilidad de los gametos de *L. variegatus* en relación al lodo de perforación para explotación offshore de hidrocarburos.

1.1.2. Antecedentes nacionales

Cabrera *et al.*, (2005) han realizado estudios sobre el impacto de la contaminación por los vertimientos de industrias pesqueras. Esta investigación tuvo como objetivo principal la evaluación de las condiciones ambientales de la bahía de Paita, Perú y su entorno. Así como buscar la solución a “diversos problemas ambientales presentados para lograr una mejoría en la calidad de vida de la población con la debida conservación del medio ambiente y sus recursos naturales”. Ellos realizaron como metodología el análisis ambiental territorial que incluyó varios aspectos, tales como el ecosistema construido a través de evaluaciones hidro-oceanográficas, trabajo de campo en playas y trabajo de campo en el entorno urbano en los meses de abril y octubre de 2003 en el área de estudio. Además, aplicaron las más importantes metodologías de análisis físico, químico y biológico de las principales variables ambientales en concordancia con normas nacionales e internacionales. En la investigación obtuvieron como resultado que las condiciones ambientales en el agua de mar durante el mes de abril de 2003 fueron: una concentración de oxígeno disuelto en el rango de 1.15 ml. l⁻¹ a 2.85 ml. l⁻¹, la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) llegó a un máximo de 10 mg. l⁻¹ en la Estación 7, frente al Centro de Entrenamiento Pesquero. Asimismo, la concentración máxima de grasas y aceites fue de 74.14 mg. l⁻¹ y los rangos de sólidos suspendidos oscilaron entre 54.48 mg. l⁻¹ y 66.33 mg. l⁻¹. Los sedimentos marinos presentaron concentraciones de materia orgánica total (MOT) entre 8.6 % y 13.32 %, presentándose las más altas concentraciones de MOT en la parte norte de la bahía, frente a Punta Colán. Los autores concluyeron que existía deterioro del espacio físico y urbano de la bahía; así como incompatibilidad de actividades; lo que denotaba una falta de ordenamiento territorial.

Castañeda *et al.*, (2006) hicieron una investigación cuyo objetivo fue estudiar los posibles efectos citotóxicos y embriotóxicos de la *Alchornea castaneifolia* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) A. Juss. utilizando el erizo de mar y raíces de bulbo de cebolla como organismos para los bioensayos. Este experimento fue llevado a cabo en el Instituto de Investigación de la Universidad San Martín de Porres, Lima – Perú. Para la evaluación de la actividad antimitótica fueron usados raíces de bulbos de la cebolla germinados a 25 °C durante tres días, de donde se extrajeron y colorearon células que fueron observadas al microscopio, comparándose los índices mitóticos del control frente a diferentes concentraciones del extracto del Hiporuro. La actividad embriotóxica fue realizada con erizos de mar, del cual

se extrajeron gametos que fueron fecundados para obtener huevos y posteriormente embriones. Los resultados mostraron un retardo en el desarrollo del ciclo celular de la cebolla y un lento desarrollo embrionario del “erizo de mar”, principalmente de la fase blástula y gástrula; así como, un aumento significativo de la mortalidad de estos embriones. Los autores concluyen que estos estudios in vitro son de gran utilidad por ser de fácil implementación y bajo costo y que *Alchornea castaneifolia* genera un retardo sobre las células de la “cebolla” y una actividad toxica sobre los embriones del erizo.

Olaechea *et al.*, (2006) realizaron un estudio con erizos colectados de la playa de Punta Negra al sur de la ciudad de Lima, Perú; y puestos a las temperaturas de 5, 10 y 15 °C para su respectiva evaluación desde la formación de huevo hasta la formación de larva pluteus. En los resultados observaron que la alteración de la temperatura del agua afecta en la segmentación del “erizo de mar” alterando las etapas de su ciclo celular. Determinaron que la temperatura óptima para el desarrollo embrionario temprano de “erizo negro” *Tetrapygyus niger* varía de 14 a 16 °C. Los autores concluyeron que las diferentes especies de “erizo de mar” requerían de una temperatura óptima para un buen desarrollo desde la fase cigote hasta la fase pluteus y que esta variaba de acuerdo al hábitat de cada especie tal como lo corroboró con las especies *Echinometra lucunter* L, *Strongylocentrotus droebachiensis* O.F. Müller “erizo verde”, *Strongylocentrotus purpuratus* Stimpson “erizo púrpura” y *Arbacia punctulata* Lamarck.

Iannacone *et al.*, (2007) realizaron una investigación cuyo objetivo fue evaluar el efecto ecotoxicológico del plaguicida metamidofos, en dos presentaciones comerciales, la primera Monofos y Tamaron, sobre cuatro organismos acuáticos no destinatarios: el “erizo negro” *Tetrapygyus niger* Molina; la lombriz roja *Chironomus calligraphus* Goeldi; el neón tetra *Paracheirodon innesi* Raboulet y la trucha *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma, Lima – Perú. Se colectaron organismos de diversas localidades del Perú para realizar los bioensayos con las cinco concentraciones de cada plaguicida. El diseño experimental correspondió a uno de bloques completamente al azar con cuatro repeticiones cada una. Todas las evaluaciones fueron hechas a través de un análisis de varianzas de dos vías, previa

transformación de los datos a la raíz cuadrada del arcoseno para poder ser sometidos a pruebas paramétricas. Los resultados muestran una mayor cantidad de mortalidad en *Chironomus calligraphus* frente al metamidofos. El bioensayo de mortalidad este organismo ocupó el cuarto lugar de sensibilidad seguido de *Tetrapygyus niger*, *Oncorhynchus mykiss* y *Paracheirodon innesi*. Todos los organismos mostraron un alto valor de riesgo ambiental para metamidofos clase IA. Los autores concluyeron que a través del cociente de riesgo ambiental se mostró un alto riesgo del metamidofos en el ambiente acuático.

Paredes (2016) realizó una investigación cuyo objetivo fue evaluar el riesgo ecológico del contaminante sulfato de bario, empleando la respuesta toxicológica de doce organismos no destinatarios, a fin de conocer los posibles efectos que este compuesto puede generar en organismos marinos y continentales. Este estudio lo realizó en el Laboratorio de Ecofisiología animal de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional Federico Villareal, Lima. Los organismos usados en esta investigación fueron: *Isochrysis* sp., *Chlorella* sp., las plantas *Medicago sativa* L. y *Zea mays* L., los crustáceos *Daphnia* sp., *Emerita análoga* Stimpson y *Apohyale* sp., el equinodermo *Tetrapygyus niger*, el insecto acuático *Chironomus calligraphus*, y a los peces *Odontesthes regia regia* Humboldt, *Poecilia reticulata* Peters y *Paracheirodon innesi* Myers. Empleó un kilogramo de sulfato de bario mezcladas con agua destilada para las pruebas ecotoxicológicas. Los equinodermos como el erizo de mar fueron evaluados a través de la inhibición de su fecundación, observable por la presencia o formación de la zona pelúcida. Las condiciones aplicadas a las plantas fueron: sin iluminación (ambiente de laboratorio y alimentados con agua potable declorinada. Los resultados presentaron un efecto negativo del sulfato de bario sobre el crecimiento de la microalga *Chlorella* sp., de igual manera obtuvo un efecto negativo en el crecimiento foliar del maíz. En erizo de mar el sulfato de bario bajo las condiciones de prueba no afectó a esta especie considerándola “no peligrosa”. El autor concluyó que existía un alto riesgo ecológico (RQ) del sulfato de bario en sus formas solubles (RQ = 37 500).

1.2. Bases teóricas especializadas

1.2.1. Contaminación marina en el Perú

En el Perú, los principales contaminantes del mar están comprendidos principalmente en las descargas domésticas y mineras, por el volumen que llevan y por el tipo de sustancias tóxicas que se liberan a los cuerpos de agua. Tarazona *et al.*, (1985) realizaron estudios de aguas marinas de la costa central, concluyendo que estas aguas están relacionadas con el fenómeno El Niño, mostrando aumentos de la temperatura superficial en más de cinco grados y aumento en el nivel del mar en más de 40 centímetros en varias de estas zonas.

Entre las principales fuentes de contaminación, Tarazona *et al.*, (1985), identifican las siguientes:

- La pesca y la industria pesquera que descarta desechos sólidos.
- La agroindustria, por el uso de plaguicidas.
- Los cultivos de productos de consumo doméstico por su utilización de plaguicidas.
- Aspersiones aéreas de herbicidas.
- La minería ilegal que genera contaminación de suelos y ríos, particularmente por el uso de mercurio, además de procesos de deforestación y una alta conflictividad social. Puntualmente se refieren a que los sitios de explotación minera más críticos están localizados en el entorno o dentro de áreas protegidas, particularmente en la zona andina.
- La actividad hidrocarburífera, en lo que se refiere a derrames de hidrocarburos por la rotura del oleoducto (Martinez *et al.*, 2006).

1.2.2. Contaminación marina en el Perú por efluentes industriales pesqueros

Según el Instituto del Mar del Perú [IMARPE] (2010), el efluente conocido como agua de bombeo es el principal subproducto que se genera en el proceso de elaboración de harina y aceite de pescado. Esta agua de bombeo se produce al usar el agua de mar como mecanismo de transporte de la anchoveta. Posteriormente, los peces son almacenados y procesados, esto genera etapas de proceso como: la cocción a vapor, el prensado y finalmente el secado.

Seguidamente, los efluentes generados en todas las etapas del proceso, incluidas el envasado de la harina, así como el agua residual del bombeo es expulsada al mar, los cuales producen una serie de problemas que implican la afección a organismos que viven en la zona marino costera e indirectamente también al hombre.

Entre los principales factores causantes de la problemática que acarrear los efluentes industriales pesqueros son los siguientes:

- Insuficiente o poca tecnología óptima o apropiada para el tratamiento y disposición del agua de bombeo.
- Una alta variabilidad en la calidad de la materia prima.
- Problemáticas que acarrear el régimen de vientos.
- Una alta complejidad en el sistema de corrientes marinas.
- La alta facilidad de captación del cuerpo de agua de mar.

En nuestro litoral marino-costero, estos factores negativos han podido generar la existencia de zonas de alta contaminación tal como lo observamos en las bahías de El Ferrol de Chimbote, Carquín, Chancay y Huacho en Lima, y Paracas en Ica. Algunas presentan un menor impacto de contaminación entre las que tenemos las zonas de Tambo de Mora, Ilo, Samanco y Sechura (Padilla *et al.*, 2014).

1.2.3. Contaminación ambiental por la actividad de procesamiento de Harina de pescado

En el Perú operan 26 plantas procesadoras de harina de pescado convencional dedicadas exclusivamente al procesamiento de harina y vierten sus residuos al mar a través de tuberías, algunas de ellas sus efluentes son tratados y otras no. Estas presentan una capacidad de

procesamiento de 1 300 TM/h, descargando entre otros elementos, altas cargas de materia orgánica (Grillo *et al.*, 2018).

La producción anual de residuos sólidos que se liberan al mar es de 1 256 TM, aproximadamente, sólo el 5 % son recuperados usando algún sistema. Esto manifiesta el gran deterioro que se viene causando al mar y a la costa ribereña.

Una serie de contaminantes son vertidos y que van a generar un fluido conocido como sanguaza (agua más sangre), rica en compuestos sulfurosos, grasas, películas de escamas que no permiten la oxigenación de los fondos marinos y que generan la muerte de organismos vivos. Otros contaminantes que se liberan vienen con el aceite, combustible y grasa de los motores, aunado al agua de sentina que es expulsada al mar, generando manchas aceitosas que modifican la calidad del agua.

Uno de los contaminantes mayores de esta industria es el agua de bombeo cuya composición principalmente son: Sólidos Totales (32-79 g/L), Grasa (0.16-7.5 g/L), Proteínas Solubles (0.3-7.50 g/L), Ceniza (no reporta), DBO5 (4 600 ppm), DQO (490-12 600 ppm) y un pH 6.2 (Castro, 2009).

La Sanguaza se genera por la presión que ejerce el pescado en las zonas de almacenamiento. Este efluente presenta una considerable carga orgánica. Además, presenta entre 6.0 a 8.0 % de sólidos totales y entre 1.0 – 2.0 % de grasa (Ministerio de la Producción [PRODUCE], 2009).

Las Emisiones gaseosas que se generan en esta actividad industrial son principalmente fruto del proceso de combustión interna necesarios para producir energía y por maquinas usadas en la operación de secado y otros. El azufre es el contaminante mayor presente en los combustibles, que luego de la combustión producen anhídrido sulfuroso (SO₂), Monóxido de carbono (CO), trimetilaminas, etc. Un secador de la planta harinera produce 10 TM/h de

harina, llega a consumir 141 galones de petróleo residual, eliminando 41.351 m³/h de gases y vapores.

El Proceso de molienda se realiza a través de una máquina de martillos, la que permite que se desprenda sólidos en suspensión que se mezclan con el aire circundante afectando su calidad.

Los residuos industriales líquidos, en todo el momento de operación concentran los vertidos de los otros procesos, conteniendo sustancias extremadamente tóxicas como la soda caustica y otras sustancias con altas cargas orgánicas e inorgánicas lo que va a conllevar a cambios en el sedimento y en el agua de mar. Otras alteraciones van a ver afectadas por variaciones en la salinidad, bajas en la oxigenación, el aumento de la DBO, el aumento de nutrientes (PO₄, NO₃), altas cargas de sulfuros y amonio en los sedimentos, llevando a generar un proceso de eutrofización.

Con respecto al paisaje marino, se ve deteriorado, porque los residuos de aceites, grasas y sólidos en suspensión llegan a las playas generando una mala apariencia estética. Se pierden de esta manera playas, bahías etc. (Grillo *et al.*, 2018).

1.2.4. Contaminación por metales pesados

Los compuestos metálicos generados por la actividad humana dentro del ecosistema marino han llegado a ser considerados un asunto de gran interés. Se tiene conocimiento que los metales son un constituyente común de casi todos los efluentes y no solo por sus efectos tóxicos directos sino por que expresan el comportamiento de ciertos desechos. Los procesos de concentración de metales pesados en los diferentes niveles tróficos son de gran interés en la mayoría de especies que sirven de alimento para el hombre, las cuales son potencialmente peligrosos para la salud (Simpson *et al.*, 1974).

El plomo y el mercurio son dos metales pesados con más alta toxicidad para el hombre, ya sea en sus formas elementales y de compuestos; afectando los procesos biológicos. Recientes estudios demuestran sus máximas concentraciones en las zonas costeras principalmente, debido a su continuo uso en una serie de actividades industriales marítimas. Por otro lado, el plomo se acumula principalmente en los organismos y puede interactuar como un inhibidor de enzimas y/o deteriorar el metabolismo celular. El mercurio fácilmente se acumula en forma de metilmercurio en los organismos marinos, incluyendo peces y mariscos. Sus compuestos tienen una gran persistencia prolongada en el ambiente marino, antes que eventualmente se sumerjan en los sedimentos del fondo. El metilmercurio es el más tóxico de los compuestos orgánicos de mercurio, normalmente se halla en el agua de mar en concentraciones alrededor de 0.1 % del total contenido de mercurio. Los niveles normales de mercurio en peces varían de 6.01 a 0.2 ppm. La contaminación que se dan en los océanos por metales puede concentrarse en la cadena alimenticia, como el caso del metilmercurio, el cual conlleva a pérdidas económicas de peces y otros recursos pesqueros. El límite permisible de mercurio es de 0.5 ppm y muchos peces como el “atún” y otros contienen con frecuencia valores más altos tal como lo refiere Kannan *et al.*, (1998). Otros metales contaminantes son: cadmio, cromo, zinc, arsénico, selenio, etc.

1.2.5. Contaminación del mar en la zona norte de Lima

Desde el 2000 se iniciaron los estudios de contaminación circunscritos a las bahías de Carquín y Huacho, y posteriormente se incorporaron las bahías de Chancay y Végueta. Hasta el año 2005, estos estudios han permitido identificar y caracterizar las diversas fuentes contaminantes de origen terrestre, destacando las aguas residuales domésticas e industrial pesquera. El exceso de materia orgánica y la elevada carga microbiana constituyen los principales contaminantes que alteran la calidad del medio marino receptor (Elliot *et al.*, 2012, p. 88).

1.2.6. Sedimentos marinos

Los sedimentos marinos son el destino final de las sustancias producidas principalmente en las aguas superficiales y de aquellas ingresadas al mar por procesos naturales y o producto de la actividad humana. Las principales sustancias que concentran estos sedimentos son los compuestos orgánicos persistentes, nutrientes, combustibles, radionúclidos, patógenos y

metales pesados. Estos últimos han sido los más estudiados ampliamente por que se encuentran asociados a diversas actividades industriales, aun cuando todos ellos se encuentran presentes en forma natural en los ambientes marinos (Stevenson, 2001).

1.2.7. Evaluación de la contaminación usando bioensayos

Román (2010) menciona que las evaluaciones de la contaminación se utilizan bioensayos. A través de ellos se pueden evaluar el grado de toxicidad de distintas sustancias o el grado de respuesta de distintos organismos de distintas especies a un mismo tóxico. La presencia de estas sustancias tóxicas en el medio ambiente es amplia y pueden generar muchos efectos negativos a distintos ecosistemas y diferentes niveles. Se han probado una gran variedad de metodologías estandarizadas para su evaluación. Los test de toxicidad o bioensayos, por la versatilidad en sus pruebas y por lo sencillo y económico, son los más recomendados para evaluar el efecto que genera en un organismo vivo la aplicación de una sustancia química requerida para producir efectos negativos en el organismo. Estos bioensayos son justificables por presentar un protocolo estandarizado, reproducible, de fácil control y barata. Los estudios de toxicidad acuática presentan un enfoque relacionado con los cuerpos de agua y su afección a comunidades y poblaciones que se desarrollan en este ecosistema. Otra forma de evaluar este daño, es a través del estudio de ecosistemas experimentales mediante el cual someten poblaciones de dos a más especies a un tóxico o sustancia contaminante. Los bioensayos ofrecen varias ventajas al evaluar la toxicidad relativa de ciertas sustancias químicas por ejemplo en efluentes de descargas. Por el contrario, los test de toxicidad aguda solo nos permiten tener una información general del efecto del contaminante limitándose solamente a mostrar sólo los efectos letales del compuesto químico.

Los requisitos que deben de cumplir los organismos para ser usados en los bioensayos están avalados por organismos internacionales como la *United State Environmental Protection Agency* [USEPA] (1994), en los que se considera principalmente que sean organismos de fácil adquisición y de preferencia sean especies nativas, aunque en algunos casos se tenga que recurrir a especies foráneas. Existe ventajas que deben de considerarse teniendo en cuenta si son especies autóctonas, la primera de ellas es el uso como especies indicadoras de perturbaciones en ecosistemas locales (Román, 2010, p. 45).

Generalmente la caracterización de contaminantes en los sedimentos estaba limitada solamente a la realización de análisis físico químicos, siendo las concentraciones máximas registradas en la legislación por patrones numéricos. Sin embargo, la cuantificación de las sustancias químicas por separado no proporciona la suficiente información sobre los efectos negativos causados a los organismos acuáticos; así como sus interacciones, tiempo efectivo y biodisponibilidad. Presentando estas sustancias una amplia diversidad y complejidad, se muestra inviable su caracterización, no solamente desde un punto de vista analítico, sino desde un punto de vista económico (Rand, 1995).

1.2.8. “erizo de mar” *Tetrapygyus niger*

Los equinodermos son herbívoros ecológicamente importantes en todos los sistemas marinos del mundo, ejerce relaciones muy íntimas con las algas en las zonas mareales e intermareales. *Tetrapygyus niger* (Molina, 1782) es uno de los representantes presentes en Perú y Chile, no presentan valor comercial y tiene una amplia abundancia. Esta especie es un herbívoro de amplia capacidad dietaria al punto de consumir algas fijas en el substrato como a la deriva (Rodríguez, 2003), debido a esto puede generar y mantener zonas libres de macroalgas. Muchos de ellos consumen regularmente presas animales y la evidencia indica que pueden ser omnívoros de forma permanente o facultativa (Knip y Scheibling, 2007). El potencial omnívoro de *T. niger* es un aspecto poco conocido, que hasta ahora solo ha sido inferido o documentado de forma indirecta (Figura 1).

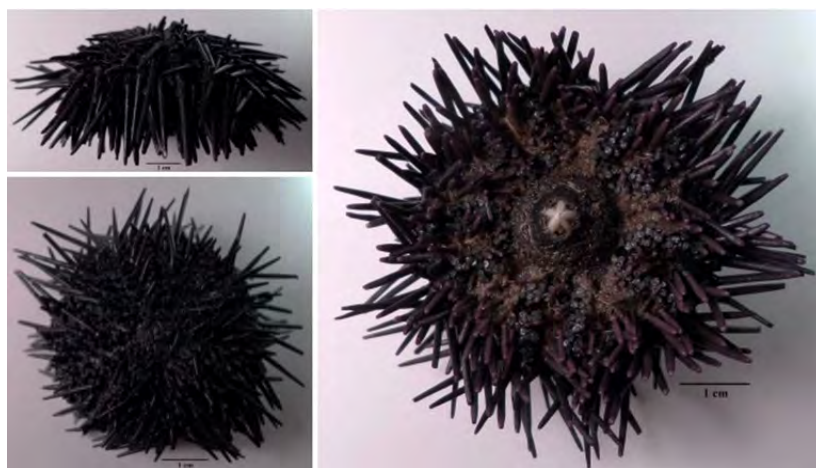


Figura 1. *Tetrapygyus niger* (Molina, 1782). Testa, vista aboral. Fuente: Larraín (1975).

Todos los erizos son organismos dioicos, y no presentan diferenciación sexual externamente. Un erizo hembra libera miles de ovocitos (gametos femeninos), mientras el erizo macho libera espermatozoides en proporciones y cantidades similares. El gameto femenino fecundado son de tipo oligolecíticos, por presentar su material de reserva o vitelo dentro de su citoplasma, en forma de pequeñas granulaciones distribuidas en toda la matriz celular. Su segmentación es de tipo holoblástica, semejante a la que realizan muchos mamíferos (Gilbert, 2003). *T. niger* “erizo de mar” constituye uno de los organismos más representativos dentro de los equinodermos y más utilizados en los estudios de fecundación y desarrollo embrionario temprano, ya que es un organismo que guarda mucha semejanza en cuanto a dichos procesos con respecto a los mamíferos. Además, es un excelente modelo utilizado en estudios de biología del desarrollo (Zamora y Stotz, 1993).

a. El desarrollo embrionario de los erizos

El desarrollo embrionario presenta los cambios sucesivos por los que pasa la especie desde que las células sexuales se fusionan formando una célula única que se desarrolla por múltiples divisiones y diferenciaciones celulares hasta originar el nuevo individuo. Campbell y Reece (2007) describen el desarrollo animal, donde se destaca el modelo animal de los erizos y comprenden cambios que se dan en 4 fases:

- Gametogénesis: Es el proceso donde las células germinales migran hacia las gónadas y se diferencian en células reproductivas con una cantidad establecida de cromosomas.
- Fecundación: Es el proceso por el cual el espermatozoide ingresa en el óvulo, seguida de la generación de una membrana de fecundación que impide la penetración de otros espermatozoides (poliespermia). Se genera la fusión del material genético y se estimula el inicio del desarrollo del cigoto diploide formado.
- Segmentación: En este proceso el embrión sufre divisiones mitóticas simétricas y sincrónicas siguiendo un patrón por ejes y planos meridionales perpendiculares o ecuatoriales y forma blastómeros cada vez más reducidos (mesómeros, macrómeros y micrómeros) hasta llegar al estadio de mórula. En esta fase se ahueca formando una esfera llamada blástula con un espacio interior, el blastocele, que continúa expandiéndose y desarrolla unos cilios que rompen la membrana de fecundación (Figura 2).

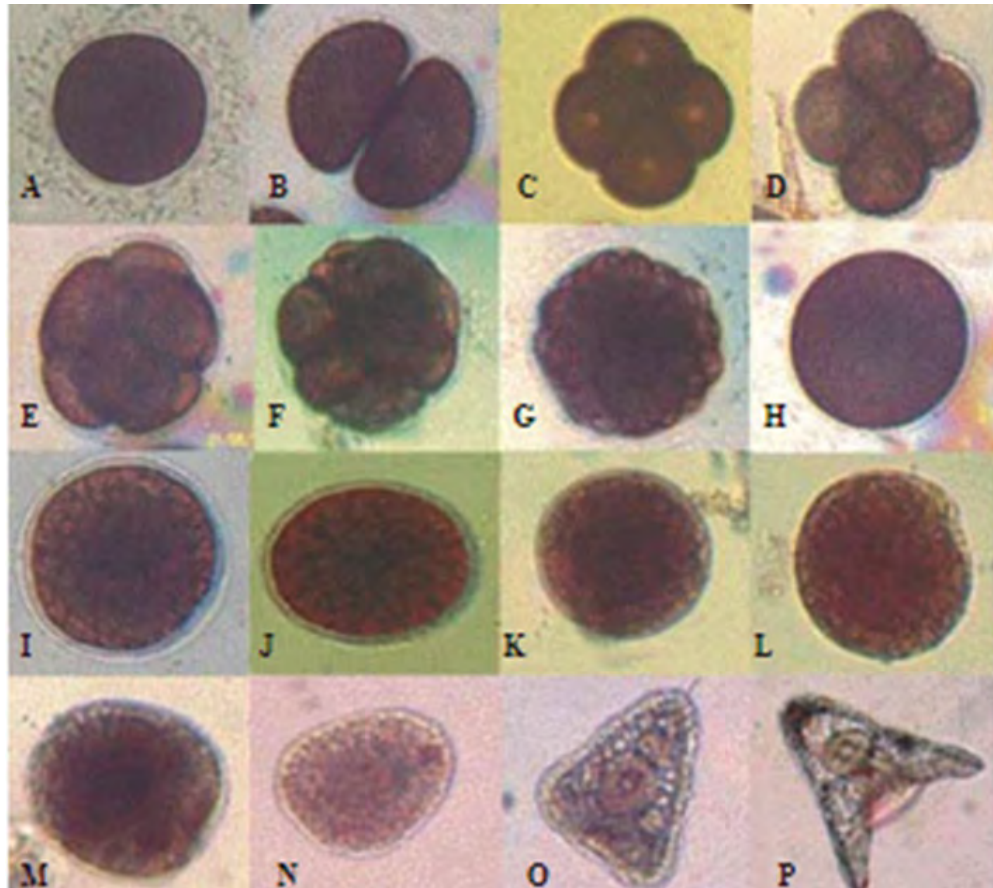


Figura 2. Etapas del desarrollo de *Tetrapygyus niger* “erizo negro” (400X). A) Zigote. B) 2 Células. C) 4 Células. D) 8 Células. E) 16 Células. F) 32 Células. G) Mórula. H) Blástula temprana. I) Blástula media. J) Blástula tardía. K) Gástrula temprana. L) Gástrula media. M) Gástrula tardía. N) Prismático. O) Pluteus temprano. P) Pluteus tardío. *Fuente:* Olaechea *et al.*, 2006.

Pasos de la segmentación

Gastrulación: los blastómeros generan tres hojas embrionarias: ectodermo (de la cual se genera la epidermis y el sistema nervioso), endodermo (que formará todo el aparato digestivo) y mesodermo (que formarán órganos como son el corazón, gónadas, tejido conjuntivo y citoesqueleto).

- Organogénesis y morfogénesis: En esta fase las células presentan una alta diferenciación, es decir, sufren una variación en sus componentes bioquímicos y funcionales para ser tipos celulares altamente especializados mediante una expresión específica de genes. Se

observa el desarrollo de órganos y una organización de ellos. Se moldea la forma anatómica y finalmente se llega a un estadio larvario ciliado nadador planctónico heterótrofo. En el erizo, la gástrula se convierte en una larva móvil ciliada. Pasado el mes la larva sufrirá una metamorfosis: se degenerarán órganos larvarios, otros órganos se readaptarán y se formarán órganos adultos. A los dos años el erizo de mar es completamente adulto.

b. Pruebas de toxicidad con el erizo negro *Tetrapygyus niger* (Echinodermata: Arbaciidae)

Este organismo marino de amplia distribución en América del Sur, ha sido usado en una gran cantidad de investigaciones relacionadas con su fisiología y en su biología molecular Medina *et al.*, (2001). Las principales investigaciones han radicado en evaluar el desarrollo embrionario, así como bioensayos para estudiar el efecto de sustancias tóxicas presentes en el agua sobre la fertilización. Se han usado para estos estudios una gran cantidad de especies de erizos como: *Arbacia spatuligera* Valenciennes, *Paracentrotus lividus* Lamarck, *Psammechinus miliaris* Müller, *Sphaerechinus granularis* Lamarck, Bella *et al.*, (2005). Investigaciones realizadas por Arévalo *et al.* (2001) emplearon el bioensayo de fertilización con “erizos de mar” para monitorear las actividades de liberación de aguas de lastres de embarcaciones en Chile. Así también Martínez *et al.*, (2006) emplearon bioensayos de fertilización con erizos de mar expuestos a efluentes procedentes de lixiviados de sedimentos para determinar su toxicidad.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño de la investigación

Se utilizó un diseño metodológico experimental, se manipuló diferentes concentraciones del elutriado de los sedimentos marinos (variable independiente) para comprobar si era un agente perturbador de la progresión del desarrollo embrionario temprano (DET) del “erizo negro de mar” *Tetrapygus niger* tal como lo sugiere Cier *et al.*, (2017). El enfoque que abordó la investigación es de tipo mixto, en donde se evalúan variables cualitativas como cuantitativas.

2.2. Lugar y fecha

La investigación se realizó entre los meses de junio y diciembre del año 2018, en dos etapas: la toma de muestras y la parte experimental. La primera etapa se realizó en la zona del litoral perteneciente al distrito Caleta de Carquín de la provincia de Huaura y el desarrollo de la parte experimental se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología de la Facultad de Ingeniería Agraria de la Universidad Católica Sedes Sapientiae - Sede Lima.

2.3. Descripción del experimento

El desarrollo de la presente investigación se realizó en dos etapas las cuales son la fase de campo y la fase de laboratorio.

2.3.1. Trabajo en campo

a. Recolección de las muestras de sedimentos

La recolección de muestras de sedimentos se realizó en la zona marina cercana a la zona de arrojo de los lixiviados de las empresas pesqueras ubicada en la Caleta de Carquín. La ubicación de las coordenadas (Lat.: 11° 5' 14.39" S, Long. 77° 38' 12.59" O.) se muestra detallada en la Figura 7. La toma de muestras se realizó siguiendo las normas técnicas para el procedimiento del muestreo de agua de mar y sedimento marino (Programa Desarrollo Institucional Ambiental [PRODIA], 2004).

La toma de muestras del sedimento marino se hizo con el uso de una draga tipo Van Veen de 0.04 m² (Figura 3), en cada estación de muestreo y por triplicado. Se usó un deslizador de pesca de 70 HP para el traslado a cada estación de muestreo en alta mar. Las réplicas se utilizaron para obtener una sub-muestra de aproximadamente 500 g de donde se extrajo el elutriado. Estas sub-muestras fueron refrigeradas antes del análisis en laboratorio.



Figura 3. Draga Van Veen usada en la extracción de sedimentos marinos.

Fuente: Elaboración propia.

b. Obtención de los erizos de mar

Los erizos fueron recolectados de las zonas rocosas de la playa de San Francisco del distrito de Ancón (Figura 4). Se extrajeron especímenes de tamaños superiores a los 40 mm de diámetro. Los especímenes recogidos fueron introducidos en recipientes con agua para su transporte al laboratorio. Una vez en el laboratorio los erizos adultos se mantuvieron en acuarios con abundante agua marina y condiciones de temperatura a 21 °C adecuados hasta su inducción al desove, tal como se aprecia en la Figura 5.



Figura 4. Orilla rocosa de la Playa de San Francisco - Ancón. *Fuente:* Elaboración propia



Figura 5. Acondicionamiento de los Erizos de mar en el laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la UCSS. *Fuente:* Elaboración propia

2.3.2. Trabajo en laboratorio

a. Extracción del elutriado de los sedimentos marinos

Las muestras de sedimentos fueron trasladadas al laboratorio y trabajadas inmediatamente para evitar alteraciones en ella. Se tomaron 100 g de sedimento marino con una paleta y se depositó en un vaso vidriado de 500 ml. Posteriormente se añadió agua de mar filtrada hasta rebosar (aprox. 400 ml). Seguidamente se agitó por espacio de 30 minutos, en un agitador a 60 rpm y se dejó decantar durante 12 h a 21 °C en condiciones estériles en total oscuridad siguiendo la metodología descrita por Beiras (2002). Posteriormente se filtró con papel

Watman de 150 mm. Una vez recuperado el elutriado, se guardó en oscuridad y a una temperatura de 4 °C para su posterior uso (Figura 6).



Figura 6. Extracción del elutriado del sedimento y su caracterización físico química.

Fuente: Elaboración propia



Figura 7. Ubicación del punto de muestreo de los sedimentos marinos en la Caleta de Carquín - Huaura. Fuente: Elaboración propia.

b. Obtención de gametos

Para la obtención de los gametos se procedió a realizar una inducción mediante una inyección de 1 ml de cloruro de potasio (KCl) a 0.5 molar en la zona blanda que rodea la boca. Todos los erizos son organismos dioicos, y no presentan diferenciación sexual externamente. Se hizo el reconocimiento de las hembras cuando estas liberan ovocitos de coloración rojiza en proporciones de 2.0 a 5.0 ml por individuo. El erizo macho fue reconocido por liberar un fluido blanquecino y no mayor de 2.0 ml por individuo. Posteriormente, el material gonadal femenino fue colocado en vasos precipitados y lavados con agua de mar estéril (Figura 8). De los erizos machos se recolectaron los espermios secos, sin ningún diluyente. La fecundación *in vitro* se realizó siguiendo el método sugerido por Cier *et al.*, (2017). La fertilización fue corroborada por la observación de la membrana de fertilización bajo microscopía.



Figura 8. Obtención de gametos de los erizos de mar. *Fuente:* Elaboración propia.

c. Aplicación del elutriado a los huevos de erizo fecundados

Los huevos fertilizados fueron expuestos a diferentes concentraciones del elutriado del sedimento por un periodo de 76 horas a condiciones de laboratorio (Figura 9). Los tratamientos contenían 20 ml del elutriado aplicados sobre los huevos fecundados in vitro. Se realizó 3 réplicas de cada tratamiento experimental. Se evaluó el efecto antimitótico durante el desarrollo del embrión, determinándose el porcentaje de desarrollo hasta alcanzar la larva pluteus. Las etapas evaluadas comprendieron:

- Las etapas de segmentación.
- La etapa de Mórula.
- La etapa de Blástula.
- La etapa de Gástrula.
- Larva Pluteus temprana

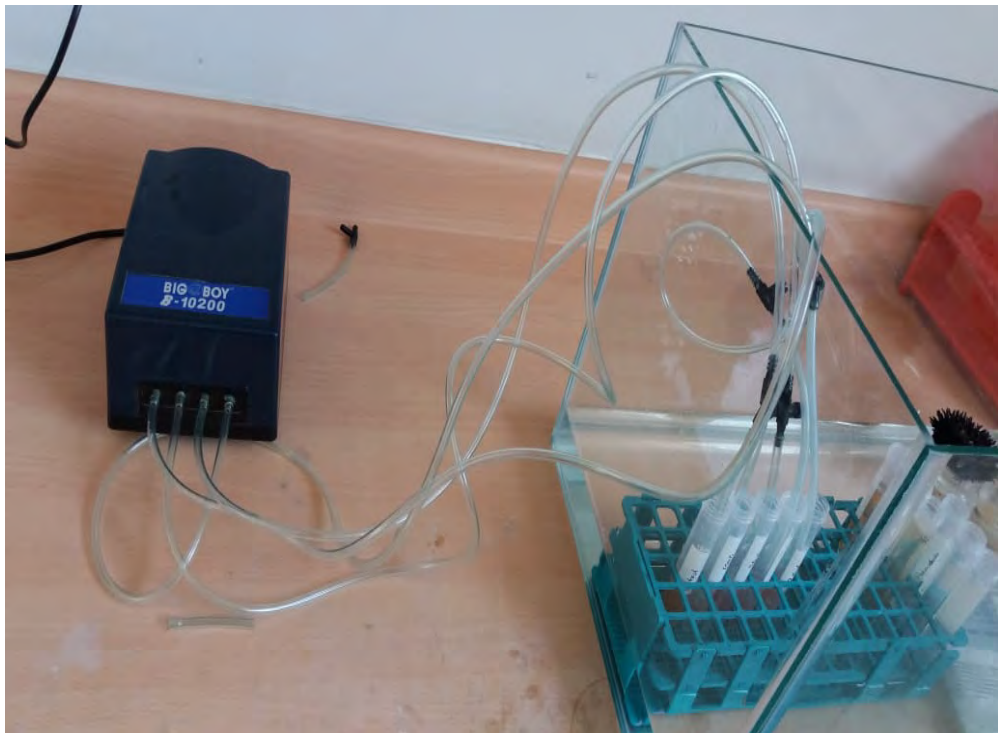


Figura 9. Exposición de los huevos de erizo de mar a diferentes concentraciones del elutriado. *Fuente:* Elaboración propia

d. Medición de parámetros en el laboratorio

Los parámetros fisicoquímicos analizados al inicio del bioensayo fueron: temperatura, pH, conductividad, oxígeno disuelto, sulfatos y amonio, los cuales fueron obtenidos de la siguiente manera:

- Temperatura (T): Se midió la temperatura con la ayuda de un termómetro.
- pH: Este parámetro fue medido con un potenciómetro.
- Conductividad eléctrica: El conductímetro fue el instrumento usado para medir la conductividad.
- Oxígeno Disuelto (OD): Se midió el oxígeno disuelto con un Oxímetro.
- Sulfatos: Se determinó por fotometría.
- Amonio. Se determinó por fotometría.

2.4. Tratamientos

Los tratamientos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Tratamientos de la presente investigación

Tratamientos	Descripción
Control	Huevos fecundados de <i>T. niger</i> + agua de mar estéril
Tratamiento 1	Huevos fecundados de <i>T. niger</i> + Elutriado al 100 %
Tratamiento 2	Huevos fecundados de <i>T. niger</i> + Elutriado al 50 %
Tratamiento 3	Huevos fecundados de <i>T. niger</i> + Elutriado al 25 %
Tratamiento 4	Huevos fecundados de <i>T. niger</i> + Elutriado al 12.5 %

Fuente: Elaboración propia.

Las características de cada tratamiento se detallan a continuación:

Todos los tratamientos y la muestra control contienen 5 ml de huevos fecundados, la variación que se presento es en la proporción de agua de mar estéril y la proporción de la

concentración del elutriado. Todos los tratamientos estuvieron sometidos a 21°C, que correspondió al agua de mar estéril, así como del elutriado.

- El T1 presentó el 100 % de la concentración del elutriado más 5 ml de huevos fecundados, en cantidades exactas es 15 ml de elutriado.
- El T2 presentó el 50 % de la concentración del elutriado más 5ml de huevos fecundados, en cantidades exactas es 7.5 ml de agua de mar estéril y 7.5 ml de elutriado.
- El T3 presentó el 25 % de la concentración del elutriado más 5ml de huevos fecundados, en cantidades exactas es 11,25 ml de agua de mar estéril y 3.75 ml de elutriado.
- El T4 presentó el 12.5 % de la concentración del elutriado más 5ml de huevos fecundados, en cantidades exactas es 13.125 ml de agua de mar estéril y 1.875 ml de elutriado.

Según Cier *et al.*, (2017) indica que aproximadamente en un 1ml de contenido de gametos fecundados hay 500 huevos fecundados, por lo que 5 ml agregado a cada tratamiento contendrá aproximadamente 2 500 huevos fecundados.

2.5. Unidades experimentales

Se contaron con 12 unidades experimentales. La unidad experimental estará conformada por cada una de las cámaras incubadoras, es decir un vial de capacidad de 20 ml donde se evaluarán los resultados de embriotoxicidad, donde las muestras del elutriado serán puestas en contacto con los ovocitos con 3 repeticiones por cada prueba más 1 control.

a. Actividad antimitótica

Las evaluaciones de la actividad antimitótica se realizaron a condiciones de laboratorio a una temperatura de 21 °C. Se evaluó la actividad antimitótica en las diferentes etapas del desarrollo embrionario sometidas al elutriado, expresado en porcentaje, según lo propuesto por Cier *et al.*, (2017). Las evaluaciones consistirán en dos fases:

1. Evaluación de la división celular a las 2, 4, 8, 16 y 32 células
2. Evaluación del desarrollo embrionario

b. Defectos en el desarrollo larval

Los defectos en el desarrollo de la larva pluteus fueron registrados siguiendo lo mencionado por Zavaleta *et al.*, (2013), que se resumen como:

- Desarrollo de defectos en embriones expuestos durante el desarrollo temprano.
- Anomalías citogenéticas.
- Cambio en el éxito de la fertilización.

c. Evaluación de la toxicidad aguda (DL₅₀) del elutriado sobre la fertilización de gametos de *T. niger*

Para la evaluación de la toxicidad aguda (DL₅₀) del elutriado se siguió el método propuesto por Iannacone *et al.*, (1999) y se consideró como valores validos del bioensayo a un 75 % de fertilización en el tratamiento control. Este criterio de validez fue propuesto por Iannacone *et al.*, (1999) para el erizo de mar *A. spatuligera* en virtud a lo establecido anteriormente por Nacci, Jackim y Walsh (1986), al evaluar tres test de toxicidad se logró establecer rangos, siendo no validos si las fertilizaciones del control fueran superiores a 90 % o menos del 60 %, considerándose aceptar para futuros estudios el punto medio (75 %).

Para la evaluación del porcentaje de fertilización se transfirió la cantidad de 1,0 ml de suspensión que contendrá espermios con óvulos (Figura 10). Posteriormente se contabilizó los huevos fertilizados y no fertilizados. Se empleó las mismas concentraciones antes mencionadas (12.5; 25.0; 50.0 y 100 %). Todas presentaron tres repeticiones. La DL₅₀ se calculó usando el programa computarizado Probit (*United States Environmental Protection Agency* [USEPA], 1994) con un intervalo de confianza del 95 %.

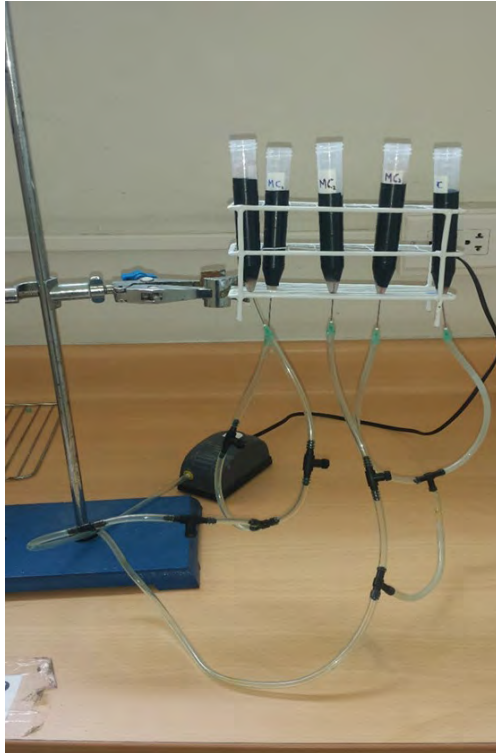


Figura 10. Evaluación de la toxicidad aguda (DL_{50}) en erizos de mar. *Fuente:* Elaboración propia

2.6. Diseño estadístico

Para el desarrollo del estudio se aplicó un diseño estadístico completamente aleatorizado (DCA) de efectos fijos.

2.7. Análisis estadísticos de los datos

Los datos obtenidos se pasaron al programa Microsoft Excel para realizar las tablas y gráficos y un análisis de contraste lineal, para poder observar la dinámica de los parámetros analizados en el experimento.

La diferencia significativa entre la respuesta a las distintas concentraciones del elutriado se determinó mediante ANOVA y el test de Tukey. Previamente se comprobará la homocedasticidad de los datos aplicando el test de Levene. Para estos análisis se usaron el software estadístico SPSSv.12.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1. Resultados

3.1.1. Descripción de los agentes contaminantes presentes en el elutriado

Se hizo la descripción físico química de los agentes contaminantes del elutriado (pH, Conductividad eléctrica, oxígeno disuelto, sulfatos y amonio) estos fueron analizados en condiciones de laboratorio cuyos resultados se muestran en la Tabla 2.

Los resultados obtenidos con respecto al valor de pH (7.6 ± 0.42) muestran un elutriado levemente alcalino, esta condición es más propensa a sedimentar los metales pesados o sustancias tóxicas presentes cuando el pH es ácido, por lo que existe una probabilidad alta de encontrar contaminantes disueltos en este tipo de elutriado.

Los valores de conductividad eléctrica que contiene el elutriado, indican un comportamiento de conductividad alta similar a la conductividad de agua de mar (Aproximadamente $40 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ del mar, en donde el valor encontrado fue de $38.2\pm 1.2 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ de conductividad eléctrica.

El oxígeno disuelto que presenta el elutriado es bajo ($1.176\pm 0.42 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) y generalmente es producto del oxígeno absorbido de la atmosfera al ser enviado de estanques de tratamiento de la planta pesquera hacia el mar y permite entender estudios de descomposición y oxidación de la materia orgánica.

La presencia de amonio en el elutriado ($2.2 \pm 0.92 \text{ mg. L}^{-1}$) se debe principalmente a fuentes nitrogenadas depositadas en los sedimentos originados por la fábrica de harina de pescado.

Los sedimentos son el principal sumidero de sulfatos generados en el proceso de la fabricación de harina de pescado que al ser expulsado se convierte en el segundo ion más abundante del mar y cuyo incremento es altamente tóxico para cualquier organismo. Se registró el valor de $160.5 \pm 7.2 \text{ mg. L}^{-1}$ para sulfatos en el elutriado

Tabla 2

Valores iniciales de los parámetros correspondientes al análisis fisicoquímico de la muestra del elutriado del sedimento marino

Parámetro	Unidades	Valores
pH		7.6 ± 0.42
Conductividad eléctrica	mS.cm^{-1}	38.2 ± 1.2
Oxígeno disuelto	mg.L^{-1}	1.176 ± 0.42
Amonio	mg. L^{-1}	2.2 ± 0.92
Sulfatos	mg.L^{-1}	160.5 ± 7.2

Fuente: Elaboración propia.

3.1.2. Resultados del efecto antimitótico en el desarrollo embrionario de *T. niger*

a. Evaluación de la división celular a las 2, 4, 8, 16 y 32 células

El resultado de la actividad antimitótica del elutriado en las diferentes divisiones celulares de *T. niger* se observan en la Tabla 3 y la Figura 12. En ella se muestra los valores promedio de los porcentajes de división evaluados a 90 minutos de exposición. Las divisiones celulares fueron contabilizadas en todos los tratamientos cuando presentaron 2 células, 4 células, 8 células, 16 células y 32 células (Figura 11).

El T1 presentó células sin división en un mayor porcentaje ($80.2\pm 1.52\%$) y un menor porcentaje en 4 células en división ($1.33\pm 0.5\%$). El T2 presentó células sin dividir en un $51.6\pm 0.57\%$ y no se registró divisiones de 2 células al momento de su evaluación, pero presentó un porcentaje de $10.6\pm 0.57\%$, $10.3\pm 1.52\%$, $13.3\pm 1.5\%$ y $15\pm 1.0\%$ en 4, 8, 16 y 32 células en división respectivamente. El T3 presentó un mayor porcentaje a las 16 células ($40.0\pm 2.0\%$) y un menor porcentaje a las 2 células ($4.0\pm 1.0\%$). El T4 presentó el mayor porcentaje a las 32 células ($51.0\pm 1.0\%$) y el menor porcentaje a 2 células ($1.0\pm 1.0\%$).

El análisis de varianza de los efectos del elutriado y el porcentaje obtenido de las divisiones celulares de *T. niger* resultaron ser significativas ($p < 0.001$) en todos los tratamientos tal como se verifica en la prueba de Tukey (Apéndice 1), tal como se aprecia en la Tabla 4. La prueba de Tukey mostró 2 subgrupos homogéneos en los tratamientos con diferencias significativas entre ellos (ver Apéndice 1). La Figura 11 muestra la división normal mitótica de células fértiles que aumentan rápidamente en número de células, tal como se observa en la figura, las células se vuelven más pequeñas con cada división de la segmentación y a estas se les denomina blastómeras. La segmentación es de 2, 4, 8, 16 etc. hasta que su aspecto toma la forma de una mora y a esto se denomina mórula. Los porcentajes de la división normal mitótica de *T. niger*, en condiciones de laboratorio, a los 90 minutos de evaluación se hallan detallados en el control de la Tabla 3.

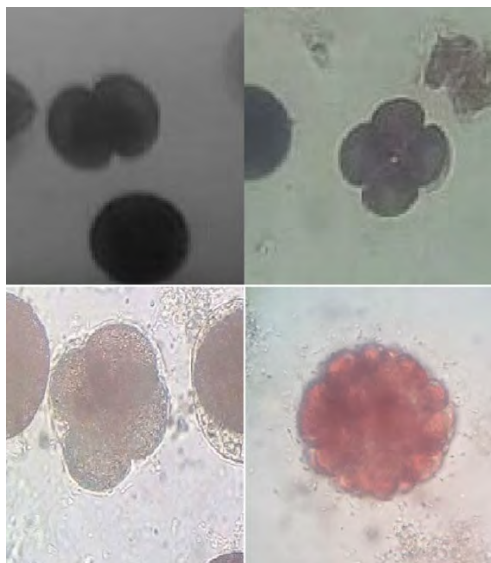


Figura 11. División normal de células fértiles (2, 4, 8 y 32 células) a los 90 minutos. Microfotografías realizadas a 400 X. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3

Porcentaje de las divisiones celulares de *T. niger* en cada uno de los tratamientos a los 90 minutos de evaluación (promedio \pm D. S)

Tratamientos	Porcentaje de divisiones celulares a los 90 minutos					
	Sin dividir	2 células	4 células	8 células	16 células	32 células
T1	80.2 \pm 1.52	1.33 \pm 0.57	1.33 \pm 0.5	4.0 \pm 1.0	12.0 \pm 1.0	2.3 \pm 1.5
T2	51.6 \pm 0.57	0	10.6 \pm 0.57	10.3 \pm 1.52	13.3 \pm 1.5	15 \pm 1.0
T3	21 \pm 3.0	4.0 \pm 1.0	7.3 \pm 0.57	8.6 \pm 0.57	40.0 \pm 2.0	31.0 \pm 1.0
T4	6.0 \pm 1.0	1.0 \pm 1.0	2.0 \pm 1.0	11.0 \pm 0.57	30.0 \pm 2.0	51.0 \pm 1.0
Control	0	0	4.33 \pm 0.57	10.3 \pm 0.57	14.0 \pm 1.0	72.0 \pm 2.0

Fuente: Elaboración propia.

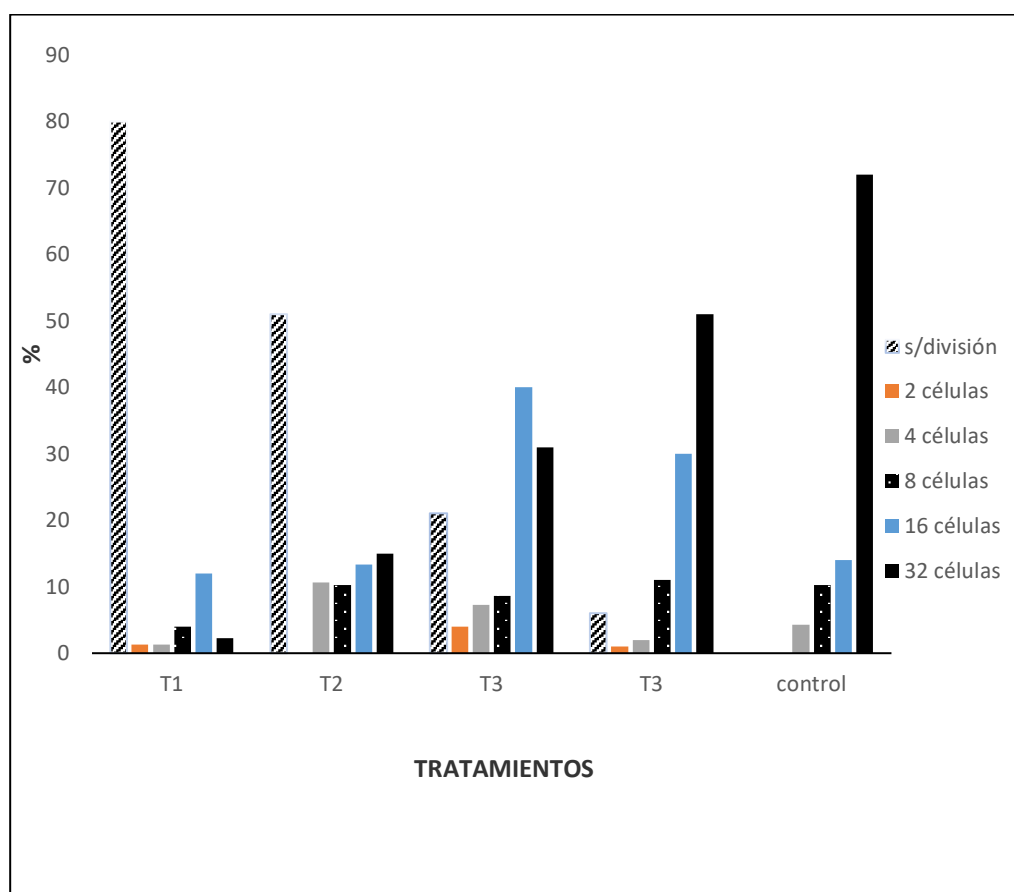


Figura 12. Porcentaje de división celular de *T. niger* a los 90 minutos de exposición al elutriado. Fuente: Elaboración propia

Tabla 4

Análisis de varianza de los tratamientos con el porcentaje de división celular

Variable dependiente: porcentaje del clivaje celular					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	40 927.656 ^a	29	1 411.298	977.053	.000
Interceptación	27 422.678	1	27 422.678	18 984.931	.000
Tratamientos	145.822	4	36.456	25.238	.000
Células	15 795.389	5	3 159.078	2 187.054	.000
tratamientos * células	24 986.444	20	1 249.322	864.915	.000
Error	86.667	60	1.444		
Total	68 437.000	90			
Total corregido	41 014.322	89			

Fuente: Elaboración propia.

b. Evaluación del desarrollo embrionario de *T. niger*

Los resultados de la evaluación del efecto del elutriado sobre el desarrollo embrionario se muestran en las Tabla 5. En ella se detallan los porcentajes de los diferentes estadios embrionarios de desarrollo de *T. niger* como son; blástula, gástrula, prisma y pluteus; así como los porcentajes de embriones muertos y embriones con anomalías en los diferentes tratamientos, sometidos a 76 horas de evaluación. La morfología normal de estos estadios embrionarios se observa en la Figura 13 y explicados en el Apéndice 4.

En el T1 se observó sólo el desarrollo de los estadios de blástula (8.0 %) y gástrula (3.6 %), mientras el porcentaje de embriones muertos fue de 66.4 % y de anómalos fue de 22.0 %. En el T2 se registró sólo los estadios de blástula (16.0 %) y gástrula (22.0 %), mientras el porcentaje de embriones muertos fue de 51.0 % y de anómalos en 11,0 %. El T3 presentó los estadios de blástulas (9.0 %), gástrula (26.8 %), prisma (10.5 %), pluteus (2.1 %), mientras el porcentaje de embriones muertos fue de 47.0 % y anómalos en 4.6 %. El T4

presentó los estadios de blástula (4.0 %), gástrula (13 %), prisma (28 %) y pluteus (12 %), mientras el porcentaje de embriones muertos fue de 41 % y presentó embriones anómalos de 2 %.

El análisis de varianza de los efectos del elutriado y el porcentaje obtenido de los diferentes estadios embrionarios de *T. niger* resultaron ser significativas en los tratamientos y sus respectivas repeticiones ($p < 0.001$) tal como se aprecia en la Tabla 6. La prueba de Tukey muestra diferencias significativas en todos los porcentajes de los estadios embrionarios, excepto en el estadio de blástula (ver Apéndice 3). En la Figura 14 se muestra que la fase de la gástrula fue la más representativa de los estadios, al ser registrado en todos los tratamientos con mayor porcentaje seguida de prisma, blástula y pluteus.

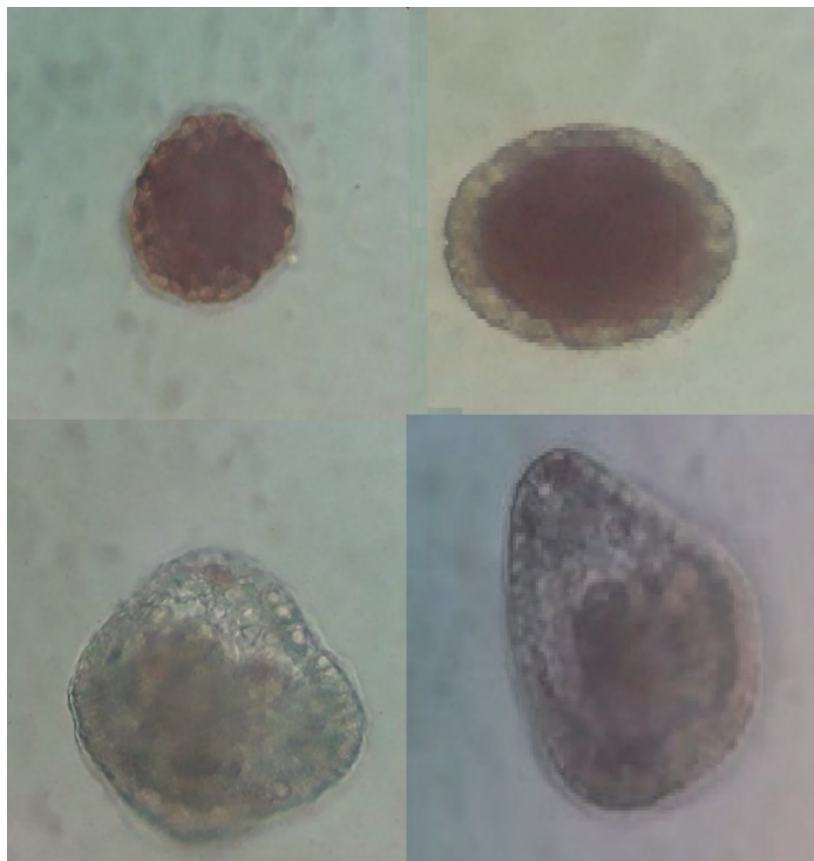


Figura 13. Estadios de desarrollo (Blástula, Gástrula, Prisma y Pluteus temprano) normales. Microfotografías realizadas a 400X. *Fuente:* Elaboración propia

Tabla 5

Porcentaje de los estadios embrionarios de erizo de mar *T. niger* en los diferentes tratamientos (Temperatura de 25 °C)

Tratamientos	Estadio embrionario (%)					
	Blástula	Gástrula	Prisma	Pluteus	Muertos	Anómalos
T1	8.0	3.6	0	0	66.4	22.0
T2	16.0	22.0	0	0	51.0	11.0
T3	9.0	26.8	10.5	2.1	47.0	4.60
T4	4.0	13.0	28.0	12.0	41.0	2.00
Control	12.4	36.0	14.4	31.00	6.2	0

Fuente: Elaboración propia.

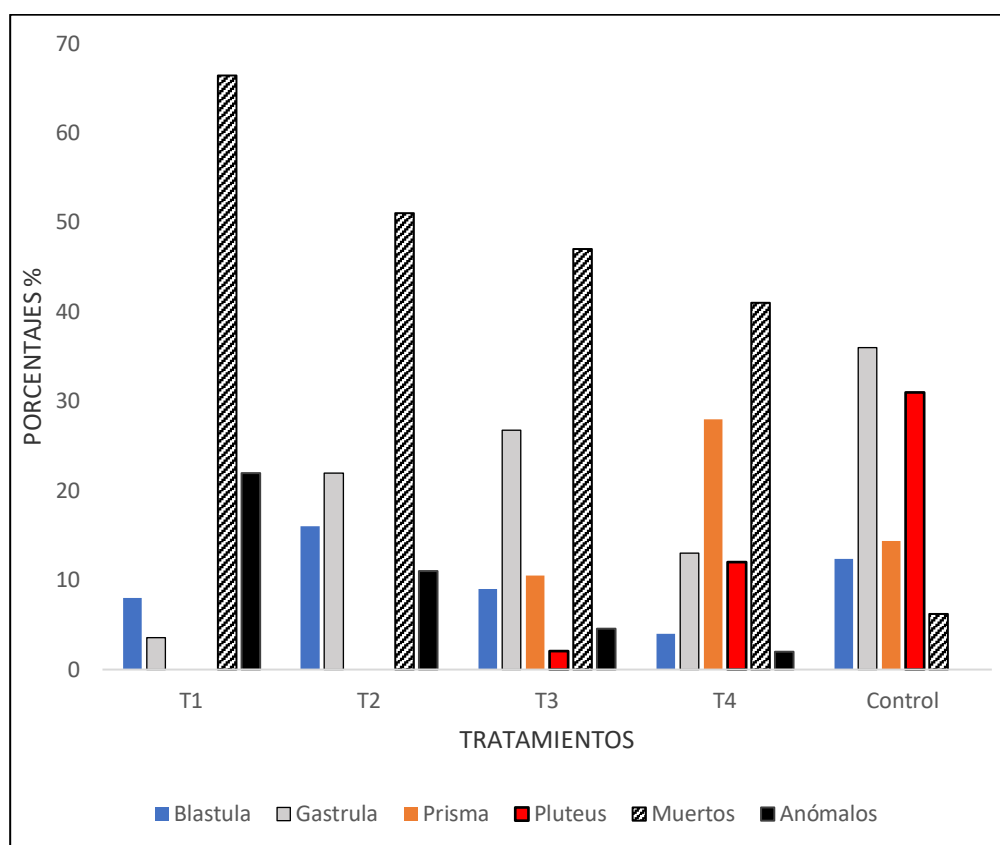


Figura 14. Porcentajes obtenido vs los cuatro tratamientos y el control. Fuente: Elaboración propia

Tabla 6

Análisis de varianza entre los porcentajes de los estadios embrionarios y los tratamientos

Pruebas de efectos inter-sujetos					
Variable dependiente: Porcentajes %					
Origen	Tipo III de suma	gl	Cuadrático		Sig.
	de cuadrados		promedio	F	
Modelo corregido	6 948.249 ^{ae}	19	365.697	478.766	.000
Intercepción	9 208.248	1	9 208.248	1 2055.311	.000
estadio	1 205.190	3	401.730	525.939	.000
tratamientos	2 621.769	4	655.442	858.096	.000
estadio *	3 121.289	12	260.107	340.529	.000
tratamientos					
Error	30.553	40	0.764		
Total	16 187.050	60			
Total corregido	6 978.802	59			

2. R al cuadrado = .996 (R al cuadrado ajustada = .994)

Fuente: Elaboración propia.

3.1.3. Defectos del desarrollo embrionario

La Tabla 7 muestra los defectos del desarrollo embrionario registrados en porcentajes. De un total de 100 embriones evaluados se detectó 38 embriones afectados. Para la descripción de los defectos del desarrollo embrionario se siguieron lo mencionado por Zavaleta *et al.*, (2013), que describe como los más comunes:

- a. Desarrollo anormal del cono de fecundación
- b. Lisis de embriones
- c. Blastómeros disgregados
- d. Afección a nivel de la membrana

Tabla 7

Defectos del desarrollo embrionario (%) registrados en los tratamientos

Tratamientos	Defecto en embriones (%)			
	Cono de fecundación	Lisis embrionaria	Blastómeros disgregados	Afección de la membrana
T1	31.5	13.5	7.8	5.2
T2	0	21.05	5.2	2.6
T3	0	2.6	10.52	0
T4	0	0	5.2	0
Control	0	0	0	0

Fuente: Elaboración propia

a. Desarrollo anormal del cono de fecundación

La Figura 15 se observa anomalías de los embriones que se muestran a las primeras horas del desarrollo embrionario (2 h). Se observa una evaginación correspondiente al cono de fecundación anormal.

En la Tabla 7 se puede observar que se registra esta anomalía en T1 con 31.5 % mientras que en los otros tratamientos no se evidencia esta anomalía (0 %). El T1 es que presenta la mayor concentración del elutriado que los otros tratamientos.

b. Lisis de embriones

La lisis que consiste en el rompimiento de las capas protectoras del embrión y que produce la salida de células es observada en la Figura 16. Esta anomalía en los embriones se observa en T1, T2 y T3 con 13.5 %, 21.05 % y 2.6 % respectivamente. El T4 y el control no presentó esta anomalía (0 %)

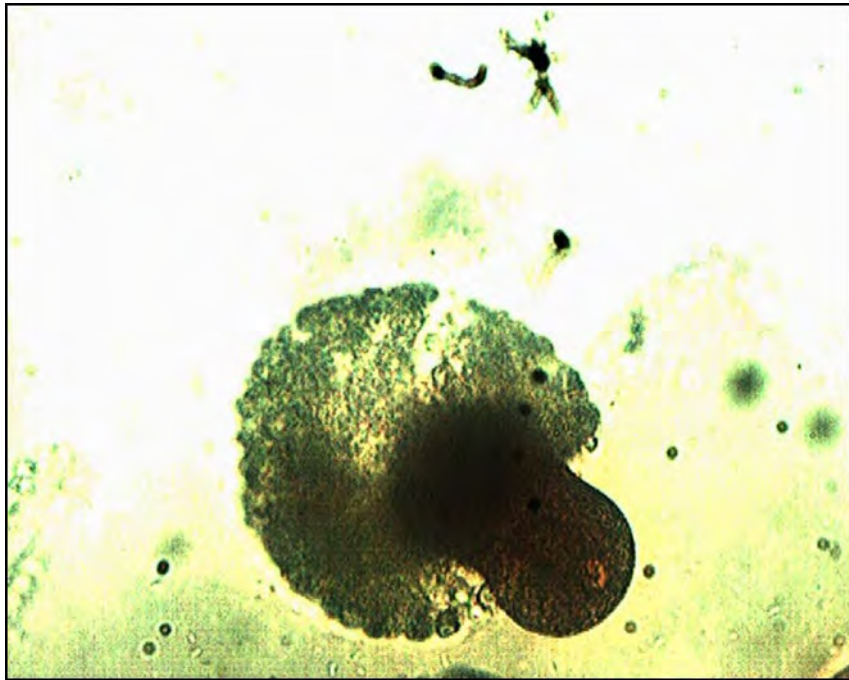


Figura 15. Anomalías del desarrollo de embriones a las primeras horas de desarrollo. Microfotografía realizada a 400X. *Fuente:* Elaboración propia.

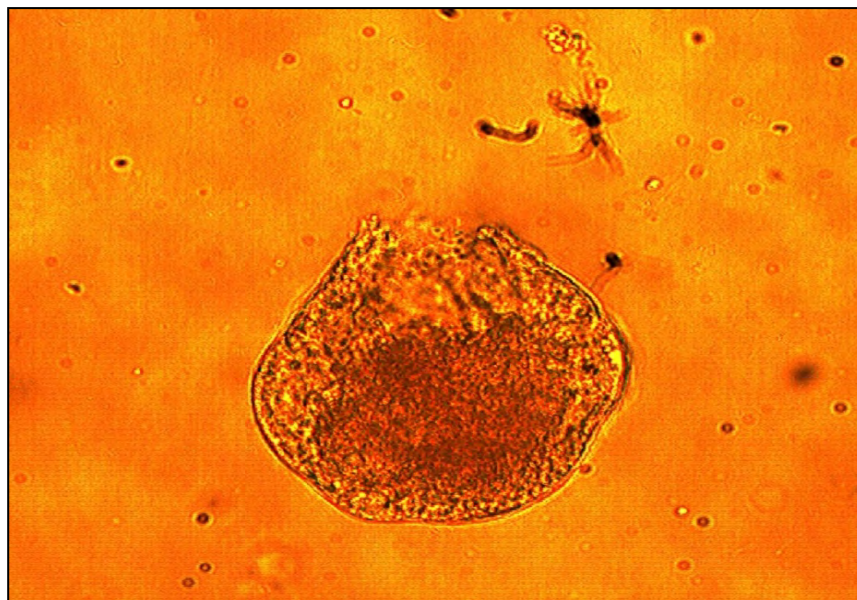


Figura 16. Lisis de célula a nivel de blástula, en donde se observa rompimiento de las membranas que protegen al embrión. Microfotografía a 400X. *Fuente:* Elaboración propia

c. Embrión con blastómeros disgregados

La Figura 17 muestra a embriones con blastómeros disgregados y mal compactadas. Esta anomalía es la más frecuente y se registró para los cuatro tratamientos; así T1 presento un 7.8 %, T2 presento 5.2 %, mientras que el T3 fue el que registró el mayor porcentaje para esta anomalía (10.52 %) y T4 registro 5.2 %.

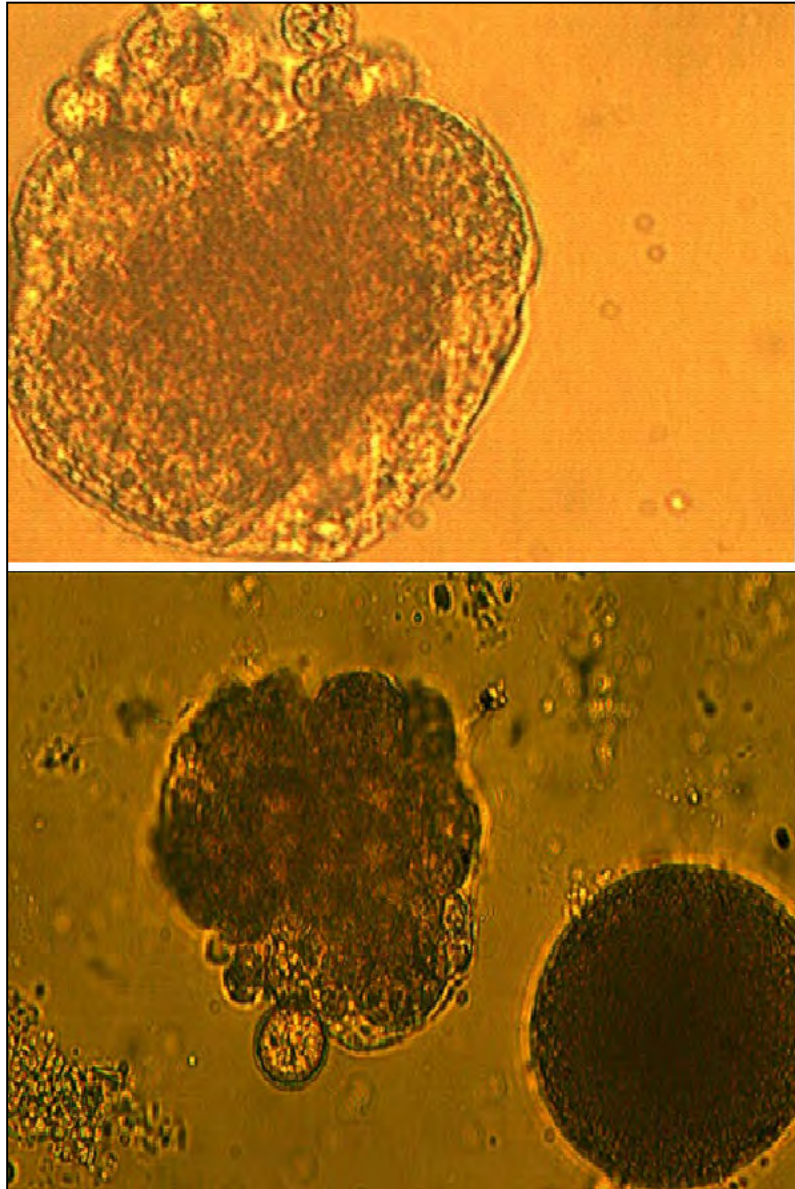


Figura 17. Embrión con blastómeros disgregados, se observaron a las 12 horas. Las microfotografías están a 400X. *Fuente:* Elaboración propia

d. Afecciones a nivel de la membrana

Se identificó numerosos embriones que presentaron afecciones a nivel de la membrana. Se observó rotura de la membrana, liberando el contenido celular de los embriones; así como la adherencia de células no fecundadas, tal como se aprecia en la Figura 18.

En la Tabla 7 se puede observar que se registra esta anomalía en T1 con 5.2 % y T2 con 2.6 % mientras que en los otros tratamientos no se evidencia esta anomalía (0 %).

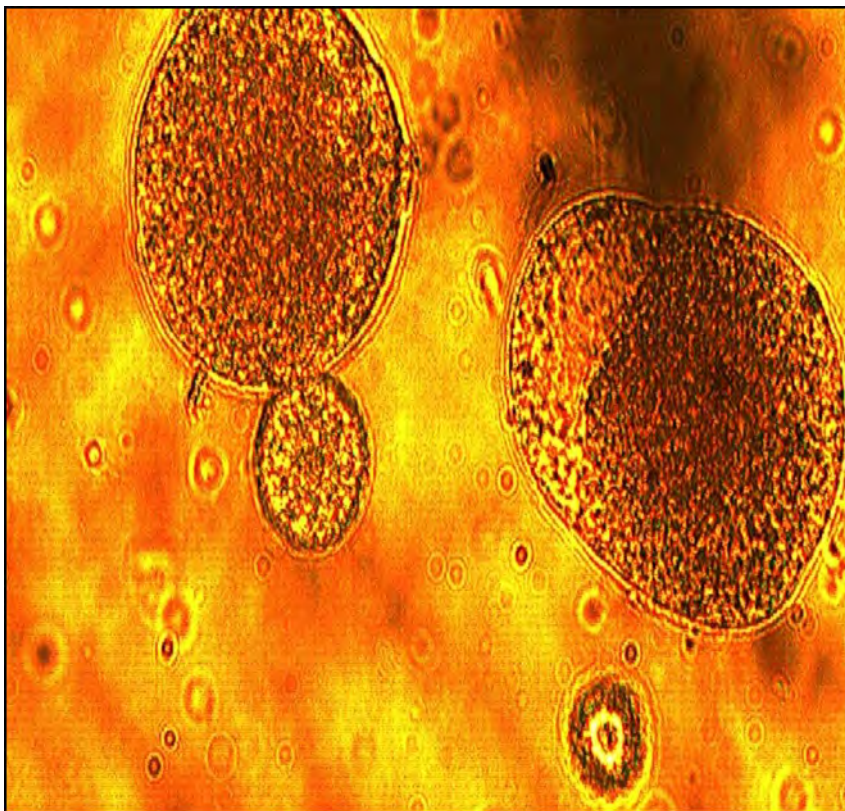


Figura 18. Rompimiento de la membrana de los embriones y adherencia de células no desarrolladas. Microfotografías a 400X. *Fuente:* Elaboración propia

3.1.4. Resultados de la evaluación de la toxicidad aguda (DL₅₀) del elutriado sobre la fertilización de gametos de *T. niger*

Para realizar la evaluación de la toxicidad aguda del elutriado sobre la fertilización de gametos de *T. niger* se contabilizaron 100 huevos para cada concentración del elutriado. Se registró los huevos no fertilizados (Figuras 19 y 20) después de exponerlos directamente por una hora a las diferentes concentraciones del elutriado, tal como se aprecia en la Tabla 8.

Los resultados muestran que en promedio 77 huevos no fueron fértiles a una concentración del 100 % del elutriado. A una concentración de 50 % del elutriado se registró 31 huevos no fértiles, mientras que a la concentración de 25.0 % y 12.5 % del elutriado, se registró 21 y 9 huevos no fértiles respectivamente.

La Tabla 9 muestra el resultado del análisis PROBIT para determinar la DL₅₀ del elutriado extraído del sedimento marino, que corresponde a una dosis de 10.73 % de la concentración del elutriado, es decir, para alcanzar un 50 % de la no fertilización de huevos de *T. niger* es necesario una dosis de 10.73 % del elutriado.

La muestra control presentó un 89 % de fertilización (se considera el mínimo aceptable de 75 %). Este criterio de validez fue propuesto para el erizo de mar *A. spatuligera* en virtud a lo establecido anteriormente por para esta prueba según Nacci *et al.*, (1986), y Iannacone *et al.*, (1999),

Tabla 8

Resultados del conteo de huevos no fértiles a la exposición con el elutriado

Dosis (concentración del elutriado)	Respuesta (huevos no fértiles)
	78
100 %	79
	76
	30
50 %	32
	30
	20
25 %	23
	21
	8
12.5 %	9
	10

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 9

Resultados del análisis Probit para la determinación de la DL₅₀ del elutriado

	Parámetro	Estimación	Error Standar	Z.	Sig.
PROBIT	Dosis	10.73	18.47	0.545	0.586
	intercepto	-10.336	20.245	-0.512	0.609

Fuente: Elaboración propia.

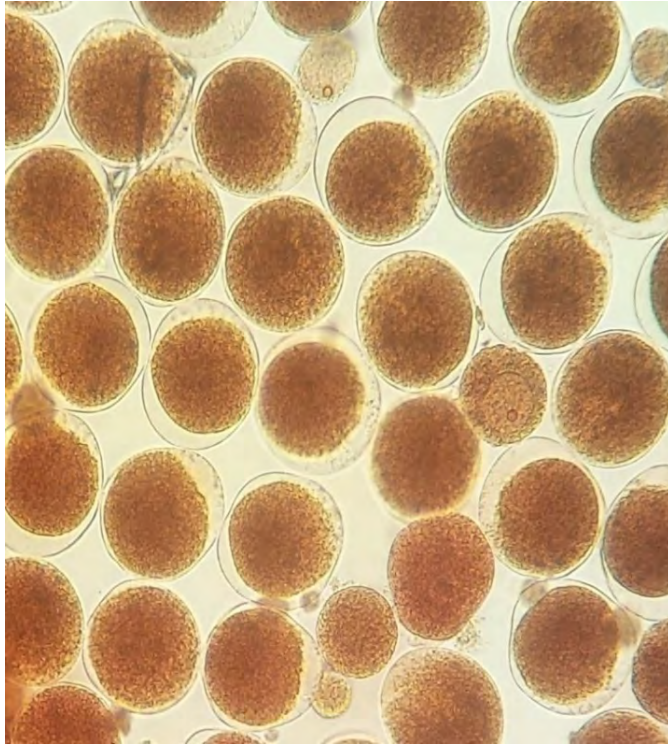


Figura 19. Huevos fértiles de *T. niger*. Microfotografía realizada a 400X. *Fuente:* Elaboración propia



Figura 20. Huevos no fértiles de *T. niger*. Microfotografía realizada a 400X. *Fuente:* Elaboración propia

CAPÍTULO IV: DISCUSIONES

4.1. Descripción de los agentes contaminantes presentes en el elutriado

La evaluación de los sedimentos contaminados por la acumulación de compuestos químicos, asociados a material particulado proveniente a la actividad antropogénica, principalmente la industria pesquera, es un factor en aumento que fue estudiada en la presente investigación. La caracterización Físicoquímica permite establecer valores que no pueden ser comparados en el Perú, por no contar con una legislación que establezca estándares para la calidad de los sedimentos, mientras que los estándares recomendados por las Canadian Environmental Quality Guidelines (CEQGS, 2003) contempla principalmente a contaminantes metálicos, por lo que los estudios en donde se utilicen herramientas ecotoxicológicas son cada vez más necesarias; así, Rudolph *et al.*, (2014), realizaron evaluaciones del sedimento marino en la zona sur de Chile, en donde utilizaron como organismo de ensayo a el “erizo negro” *Arbacia*, cuyos embriones de este equinodermo permitieron conocer la calidad del sedimento logrando un 95 % de fertilización del erizo, similar al reportados por Aguirre *et al.* (2009) también en el “erizo negro” *Arbacia*, con un 98 % en la fecundación, ambos estudios asocian escasa contaminación del elutriado extraído del sedimento, mientras que en nuestra investigación se evidenció sólo una fecundación del 19 % siendo afectado por la poca oxigenación ($1,17 \text{ mg.L}^{-1}$) del elutriado tal como lo refiere Mudge y Seguel (1999) y Zúñiga *et al.*, (1995). El amonio es otra sustancia encontrada en el elutriado (2.2 mg. L^{-1}) y cuya presencia es altamente tóxica para embriones de erizos, el cual presenta umbrales de toxicidad desde los 80 ugL^{-1} tal como los reporta Saco *et al.*, (2010). También se determinó altas concentraciones de sulfatos (160.5 mg. L^{-1}), lo que podría estar relacionado con la presencia de sulfuro de hidrógeno en los sedimentos. Esta sustancia está presente de forma natural en los sedimentos anóxicos y cuya concentración puede aumentar durante el almacenamiento de la muestra, pudiendo producir afecciones a organismos bentónicos como a poblaciones de erizo en especial *T. niger*, tal como lo menciona Paredes (2016).

4.2 Efecto antimitótico en el desarrollo embrionario de *T. niger*

Evaluación de la división celular a las 2, 4, 8, 16 y 32 células

Los resultados que se observa en la Tabla 3 sobre el porcentaje de las divisiones celulares de *T. niger* en cada uno de los tratamientos a los 90 minutos de evaluación, disminuyen con respecto al control. Ello se debe posiblemente a la influencia del sustrato béntico presente en los sedimentos, pudiendo tener repercusión sobre células en división tal como lo refiere García (2000) en sus investigaciones en “erizo de mar” *Paracentrotus lividus*. De igual manera Zúñiga *et al.*, (1995) expresan que las descargas orgánicas e inorgánicas de origen industrial tiene un efecto negativo significativo sobre la fertilización y la división celular de erizos de mar.

Adicionalmente, Kobayashi (1990), menciona que ante una alta contaminación marina los huevos fertilizados de erizo, no podrán generar divisiones celulares de manera normal, debido a una amplia variedad de sustancias tóxicas. En la presente investigación los resultados de los tratamientos mostraron un alto porcentaje de células sin división (80.2 %), esto conforme se incrementa las concentraciones del elutriado. Asimismo, se puede establecer en esta investigación, que la captación del elutriado al ser hecha de la zona de depósito de efluentes de las plantas harineras, podrían contener una gran cantidad de sustancias químicas cuya interacción podrían causar la inhibición de las células en división.

Evaluación del desarrollo embrionario de *T. niger*

Los resultados que se muestran en la Tabla 5, sobre el porcentaje de los estadios embrionarios de erizo para T1 y T2, que fueron expuestas a las más altas concentraciones del elutriado, sólo se encontró los estadios de blástula (T1=8 %, T2=12 %) y gástrula (T1=3.6 %, T2=22 %) en bajos porcentajes, así como un gran porcentaje de embriones muertos (T1=66.4 %, T2= 51 %) y anómalos. Así mismo, el T3 y T4 que fueron expuestos a una menor concentración del elutriado, presentaron los estadios de blástula, gástrula, prisma y pluteus en porcentajes significativos. Similares efectos de ausencia de estadios fueron reportados en el erizo *P. lividus* por Marin *et al.*, (2001), ellos reportan la ausencia del estadio pluteus al aumentar la concentración del elutriado evaluado. Asimismo, Pagano,

et al., (1983) para los erizo de mar *P. lividus* y *S. granularis* con agua de mar filtrada para el metal pesado Cr, en 48 horas de exposición, observaron que el desarrollo de la gástrula es totalmente suprimido, afectando el desarrollo de ambas especies evaluadas. En la presente investigación, la ausencia de estadios; así como, el alto porcentaje de embriones muertos y anómalos reflejan la alta sensibilidad del bioensayo con embriones de erizo para detectar contaminantes presentes en el elutriado.

Existe una gran cantidad de investigaciones que se han hecho con los “erizos de mar” en especial para evaluar el grado de toxicidad de sustancias químicas como las reportadas en la presente investigación, en donde se utilizaron especies de *T. niger* para evaluar el efecto en el desarrollo embrionario por parte del elutriado. Como el trabajo de Iannacone y Alvaríño (2007) quienes evaluaron los extractos acuosos de la planta *Paullina clavigera* usando gametos de *T. niger*, encontrando que la concentración del extracto al 5 % provoca efectos inhibitorios en la fertilización y desarrollo embrionario.

El albendazol ha sido evaluado por Zavaleta *et al.*, (2013) quienes usaron el “erizo negro” *T. niger*, para dicha evaluación prepararon diferentes concentraciones del tóxico (400 ppm; 800 ppm y 1 200 ppm) para aplicar sobre el desarrollo embrionario de *T. niger* “erizo de mar”; Cada unidad experimental presentó 200 ml de agua de mar estéril y tamizada a un pH neutro y a temperatura ambiente. Encontraron que el fármaco en estudio a diferentes concentraciones y periodos de exposición alteran el desarrollo embrionario de *T. niger* “erizo de mar”.

Otras especies de erizos han sido evaluados como la especie *Lytechinus variegatus*; como el trabajo de Cerón *et al.*, (2014) quienes evaluaron sustancias tóxicas en áreas marinas, usando lodo sobre la fecundación del erizo, logrando evidenciar su alta sensibilidad de prueba ante estas sustancias. También Warnau y Pagano (1994) realizaron estudios en el “erizo” *Paracentrotus lividus*, quienes evaluaron las afecciones del metal pesado plomo a diferentes concentraciones, reportando malformaciones a nivel de embriones y larvas del “erizo de mar”. El mismo metal pesado fue evaluado por Ghorani *et al.*, (2012) en el “erizo de mar”

Echinometra mathaei, quienes evaluaron el desarrollo de las larvas del erizo a 6 concentraciones de agua conteniendo plomo y obtuvieron como resultado un decrecimiento en el desarrollo de las larvas al incrementar la concentración del plomo. Todas las investigaciones realizadas a las sustancias químicas usando embriones y larvas de los erizos logran ubicar a este organismo cosmopolita como buen bioindicador de contaminación química; como se ha demostrado en el presente estudio.

4.3. Defectos del desarrollo embrionario

De los resultados del estudio de los defectos del desarrollo embrionario, se ha podido determinar embriones con divisiones anormales, observándose embriones con blastómeros disgregados y con escasa compactación, esto podría ser debido a la falta de adhesión celular, ya que el elutriado podría estar interfiriendo este proceso celular, alterando el normal funcionamiento de las cadherinas y cateninas principalmente dependientes del ion calcio. Similares efectos relacionados a divisiones anormales, se han reportado en embriones tempranos de *T. niger* sometidos al contacto del fármaco Albendazol a 120 minutos de exposición; según refiere Zavaleta *et al.*, (2013), esto podría deberse a la naturaleza propia del contaminante asociado a factores como la temperatura. Los mismos investigadores relacionan la disminución del porcentaje de fecundación con la inhibición del movimiento de los espermatozoides por acción de las sustancias contaminantes y que en nuestra investigación podrían estar contenidos en el elutriado. En la presente investigación, se ha observado un retraso en las células en desarrollo comparadas con el control. Este retraso de desarrollo celular y la dispersión de blastómeros es común en células expuestas a contaminantes inorgánicos como los metales pesados, tal como lo refiere Kobayashi y Okamura (2005) en estudios realizados en el erizo de mar *Anthocidaris crassispina*, ellos manifiestan que los metales podrían tener una fuerte influencia sobre la división celular estableciendo un orden de toxicidad decreciente sobre el embrión.

4.4. Evaluación de la toxicidad aguda (DL₅₀) del elutriado sobre la fertilización de gametos de *T. niger*

En referencia a la evaluación de la toxicidad aguda (DL₅₀) del elutriado, Cerón *et al.* (2014) obtuvo un DL₅₀ fue de 3 649 mg. L⁻¹ en sedimentos marinos usando el “erizo de mar” *Lytechinus variegatus*. En el presente estudio se ha establecido una DL₅₀ de 10.73 % de la concentración del elutriado, que es equivalente a 10 730 mg. L⁻¹, esta toxicidad aguda superior a los 10 000 mg. L⁻¹ es considerada moderadamente tóxica por Cerón (2013) por presentar a esta concentración lisis y/o deformación de los embriones de *Lytechinus variegatus*. El valor de la DL₅₀ obtenido del elutriado se considera alto si se compara con los DL₅₀ registrados para el erizo *Arbacia spatuligera* que obtuvo 4.69 mg. L⁻¹ Rudolph *et al.* (2005) y para *Paracentrotus lividus* (entre 0.016 mg. L⁻¹ y 0.069 mg. L⁻¹) Lera *et al.*, (2006). Por lo tanto, se puede establecer que los “erizos de mar” reaccionan de diferente manera al contaminante de referencia. Esto puede deberse al lugar de colecta del organismo, lo que posibilita que el organismo sea menos o más tolerante que otros tal como lo menciona King y Riddle (2001). Otro factor observado, es la sensibilidad de los erizos a diferentes tóxicos, generando que los valores de la DL₅₀ varien (Ianaconne y Alvariño, 2007) y finalmente las condiciones del experimento.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

1. De la caracterización físico química del elutriado extraído del sedimento procedente de la zona costera de Carquín se determinó que esta presentó poca oxigenación (1.17 mg. L⁻¹), una presencia de amonio (2.2 mg. L⁻¹) en cantidades tóxicas y altas concentraciones de sulfatos (160.5 mg. L⁻¹). Con estos parámetros el elutriado afecta el desarrollo embrionario del “erizo de mar” *T. niger*.
2. De la evaluación del efecto antimitótico en el desarrollo embrionario de *T. niger* se determinó un alto porcentaje de células sin división (80.2 %), una ausencia de estadios prisma y pluteus en los T1 y T2, así como, un alto porcentaje de embriones muertos y anómalos en todos los tratamientos a medida que las concentraciones del elutriado aumentan, lo que reflejan la alta sensibilidad del bioensayo con embriones de erizo para detectar contaminantes presentes en el elutriado.
3. Se obtuvo malformaciones embrionarias por efecto a la exposición con el elutriado, siendo los embriones con blastómeros disgregados la anomalía más frecuente, registrándose para los cuatro tratamientos; así T1 presentó un 7.8 %, T2 presentó 5.2 %, mientras que el T3 fue el que registró el mayor porcentaje para esta anomalía (10.52 %) y para T4 5.2 %.
4. De lo evaluado en la prueba de toxicidad aguda en *T. niger* se obtuvo que el elutriado extraído del sedimento marino presenta una toxicidad moderada con un DL₅₀ equivalente a 10 730 mg. L⁻¹.

CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar un monitoreo, midiendo algunos parámetros fisicoquímicos en la zona costera de la caleta de Carquín, con la finalidad de establecer las fluctuaciones de los efluentes enviados por las plantas harineras de pescado que perjudican principalmente a las poblaciones bentónicas locales.
2. Se debe realizar una caracterización química de los metales pesados contenidos en el elutriado, para poder establecer la relación con las anomalías detectadas en los embriones de *T. niger*.
3. Se debe de controlar la temperatura en toda la investigación, dado que su variación podría provocar alteraciones en el desarrollo embrionario de *T. niger* como las obtenidas y corregidas en esta investigación.
4. Se recomienda contar con una población considerable de erizos de mar (n=25), con la finalidad de asegurarse de porciones parejas de especímenes macho y hembras para la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arévalo, V., Inda, F., Bay, E., y Larraín, A. (2001). Bioensayo de Fertilización con Erizo de Mar (*Arbacia spatuligera*) para Fiscalizar la Maniobra de Recambio de Lastre Limpio en los Buques. *Ciencia y Tecnología*, 24, 61-69
- Aguirre-Martínez, G. Rudolph, A., Ahumada, R., Loyola, L. y Medina, V. (2009). Toxicidad no específica en sedimentos portuarios, una aproximación al contenido de contaminantes críticos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 44(3): 725-735.
- Beiras, R. (2002). Comparison of methods to obtain a liquid phase in marine sediment toxicity bioassays with *Paracentrotus lividus* sea urchin embryos. *Arch Environ Contam Toxicol*, 42(1), 23.
- Bellas, J., Beiras, R., Balsa, J., y Fernández, N. (2005). Toxicity of organic compounds to marine invertebrate embryos and larvae: a comparison between the sea urchin embryogenesis bioassay and alternative test species. *Ecotoxicology*, 14(3), 337-353.
- Cabrera, C. (2002). *Estudio de la contaminación de las aguas costeras de la bahía de Chancay*. (Tesis de Magister). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Cabrera, C., Guadalupe, E., Maldonado, M., Arévalo, W., Pacheco, R., Giraldo, A., y Quispe, J. (2005). Evaluación ambiental de la bahía de Paita. *Revista del Instituto de Investigación FIGMMG*, 8(15), 14-18.
- Campbell, N., y Reece, J. (2007). *Biología* (Séptima ed.). E. M. Panamericana, Ed.México.
- Castro, P. (2004). *Recuperación de la materia orgánica del agua de cola y su aprovechamiento como fuente de nitrógeno en suelos agrícolas*. (Tesis para optar el título de Ingeniero Ambiental). Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú.
- CEQG (Canadian Environmental Quality Guidelines) (2003). Valores Guías de Calidad Ambiental Canadiense: sedimentos marinos.
- Cerón, S. (2013). *Evaluación de la toxicidad aguda de un fluido de exploración offshore en la fecundación del erizo de mar *Lytechinus variegatus**. (Tesis de grado). Universidad de Nariño, Pasto, Colombia.

- Cerón, S., Santos, M., Gómez, A., Ospina, G., Imupes, M., y Gómez, J. (2014). Evaluación de la toxicidad aguda de un fluido de exploración offshore en la fecundación del erizo de mar *Lytechinus variegatus*. *Boletín de investigaciones Marinas y Costeras*, 43(2), 383-405.
- Cesar, A. (2003). *Análisis ecotoxicológico integrado de la contaminación marina en los sedimentos de la costa de Murcia: el caso de Portmán. Murcia Sudeste - España*. (Tesis doctoral). Universidad de Murcia.
- Chang, L. (1970). Contaminates potenciales que pueden afectar a los organismos del ambiente marino a lo largo de la costa de Perú. *Marine Pollution and sea Life*, 106.
- Cier, A., Espinoza, R., Tarazona, X., y Gonzáles, F. (2017). Capacidad Antimitótica del extracto acuoso de las semillas de *Lupinus mutabilis* "Tarwi" en el desarrollo embrionario de *Tetrapygus niger* "Erizo negro de mar". *Revista de ciencias*, 13, 22-30.
- Contreras, S. y Castilla, J. (1987). Feeding behavior and morphological adaptations in two sympatric sea urchin species in central Chile. *Marine Ecology*, 38, 217-224.
- Elliot, W., Gonnzáles, R., Blas, N., Ramírez, A., Maldonado, C., Jacinto, M., y Flores, M. (2012). Seguimiento de las pesquerías y calidad ambiental 2001-2005. IMARPE-Huacho. *Informe del Instituto Mar del Perú*, 39(1-2), 88-101.
- Fernández, N. (2002). *Evaluación biológica de la contaminación marina costera mediante bioensayos con embriones del erizo de mar Paracentrotus lividus*. (Tesis doctoral). Universidad de Vigo. España.
- García, M. (2000). *Análisis de la composición bioquímica y de posibles biomarcadores de contaminación en el erizo de mar, Paracentrotus lividus, Lmk*. (Tesis doctoral). Universidad de Santiago de Compostela. España.
- Garmendia, J., Menchaca, I., Belzunce, M., y Revilla, M. (2009). Protocolo del test de toxicidad de sedimentos marinos con larvas del erizo de mar *Paracentrotus lividus*. *Revista de Investigación Marina*, 11, 25.

- Ghorani, V., Mahdavi, N., Ghassemzadeh, F., y Mortazavi, M. (2012). The effect of lead toxicity on embryonic development and early larval growth of the *Echinometra matthaei* sea urchin (Persian Gulf), morphologic and morphometric studies. *Indian Journal of Geo Marine Sciences*, 42(1).
- Gilbert, F. (2003). *Biología del desarrollo*. Madrid, España: Panamericana.
- Grillo, J.; Gozzer, R.; Sueiro, J. C.; Riveros, J.C.(2018). *Producción ilegal de harina de pescado en Perú a partir de anchoveta extraída por la flota artesanal y de menor escala*. Reporte preparado para OCEANA.
- Iannacone, J., L. Alvarino, M. Dionisio, y J. Sánchez.(1999). Efecto del Cu²⁺ en la embrionación del erizo negro *Tetrapygus niger* (Molina) y en la fertilización del erizo marrón, *Arbacia spatuligera* (Valenciennes) (Echinodermata). *Bol. Soc. Quim. Perú* 65:182-190
- Iannacone, J., L. Alvarino, y W. Dale. (1999). Pruebas ecotoxicológicas como herramientas para la evaluación del impacto ambiental. *Boletín de Lima* (Perú) 113:53-68. .
- Iannacone, J., y Alvarino, L. (2007). Citotoxicidad de los extractos acuosos de corteza y hoja de sachá yoco *Paullinia clavifera* sobre gametos del erizo negro *Tetrapygus niger*. *Scientia*, IX(9), 173-181.
- Iannacone, J., Onofre, C., Huanqui, O., Giraldo, J., Mamani, N., Miglio, M y Alvarino, L. (2007). Evaluación del riesgo ambiental del insecticida metamidofos en bioensayos con cuatro organismos acuáticos no destinatarios. *Agricultura técnica*, 67(2), 126-138.
- Instituto del Mar del Perú [IMARPE]. (2010). Informe nacional sobre el estado del ambiente marino del Perú. *Informe de consultoría convenio IMARPE - CPSS CALLAO*. (G. Sánchez, N. Blas, & G. Chau, Edits.) Callao, Perú.
- Jernolov, A. (1974). Persistent pesticides and heavy metals. En FAO, *Lectures presented at the First FAO/SIDA Training-course on Marine pollution in relative to Protection of living Resources* (pp. 59-76). Roma-Italia: FAO.
- Kannan, K., Smith Jr, R. G., Lee, R. F., Windom, H. L., Heitmuller, P. T., Macauley, J. M. y Summers, J. K. (1998). Distribution of total mercury and methyl mercury in water, sediment, and fish from south Florida estuaries. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 34(2), 109-118.

- Knip, D., y Scheibling, R. (2007). Invertebrate fauna associated with kelp enhance reproductive output of green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 351, 150-159.
- King, C. K., & Riddle, M. J. (2001). Effect of metal contaminants on the development on the common Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* and comparisons of sensitivity with tropical and temperate echinoides. *Marine Ecology Progress Series*, 215, 143-154. doi:10.3354/meps215143
- Kobayashi, N., y Okamura, H. (2005). Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. Part 2. Interactive toxic effects of heavy metals in synthetic mine effluents. *Chemosphere*, 61(8), 1198–1203.
- Kobayashi, N. (1971). Fertilized sea urchin eggs as an indicatory material for marine pollution bioassay, preliminary experiments. *KURENAI*, 18, 379-406.
- Kobayashi, N., y Okamura, H. (2004). Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. 1. Tracing the cause by the effects. *Chemosphere*, 55, 1403-1412.
- Lapota, D., Duckworth, D., y Word, J. (2000). Confounding factors in sediment toxicology. Issue papers. *Issue Paper Confounding Factors in Sediment Toxicology*, 19.
- Larraín, A. P., (1975). Los equinoideos regulares fósiles y recientes de Chile. *Guayana Zoológica*, 35: 188 pp.
- Lera, S., Macchia, S. y Pellegrini, D. (2006). Standardizing the methodology of sperm cell test with *Paracentrotus lividus*. *Environ. Monit. Asses.*, 122: 101-109.
- Nacci, D., Jackim, E., & Walsh, R. (1986). Comparative evaluation of three rapid marine toxicity tests: sea urchin early embryo growth test, sea urchin sperm cell toxicity test and Microtox. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 5(6), 521-525.
- Manzo, S. (2004). Sea urchin embryotoxicity test: proposal for a simplified bioassay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 123-128.
- Marin, M., Da Ros, L., Moschino, V. y Campesan, G. (2001) Sediment elutriate toxicity testing with embryos of sea urchin (*Paracentrotus lividus*), *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 4:2, 215-221, DOI: 10.1080/14634980127709

- Martínez, M., Fernández, N., Lloret, J., Marín, A., Martínez, C., Riba, I., y Del Valle, T. (2006). Ejercicio interlaboratorio con bioensayos marinos para la evaluación de la calidad ambiental en sedimentos sosteros. III. Bioensayo con embriones del erizo de mar *Paracentrotus lividus*. *Ciencias marinas*, 32(1b), 139-147.
- Medina, R., Paredes, R., Puchi, M., Imschenetzky, M., y Montecino, M. (2001). Developmentally-regulated interaction of a transcription factor complex containing CDP/cut with the early histone H3 gene promoter of the sea urchin *Tetrapygus niger* is associated with changes in chromatin structure and gene expression. *Gene*, 272, 237-248.
- Mendiola, S., Achútegui, J., Sánchez, F., y San José, J. (1998). Potencial contaminante del mar ppr aguas residuales de las industrias de harina y aceites de pescado. *Grasas y aceites*, 49, 30-33.
- Molina, G. (1782). *Saggio sulla storia naturale del Chili*. (T. Stamperia, Ed.) Bologna.
- Mudge, S. y Seguel, C. (1999). Organic contamination of San Vicente Bay, Chile. *Marine Pollution Bulletin* 11(38): 1011-1021.
- Olaechea, P., Panéz, J., y Figueroa, H. (2006). Desarrollo embrionario de *Tetrapygus niger* (Molina, 1872) "Erizo negro" en diferentes temperaturas. *Biotiempo*, 6, 27-31.
- Padilla, A., Cerna, M., Vila, E., Tuesta, L., y Aredo, R. (2014). Impacto ambiental generado por erosión costera en la zona litoral de Buenos Aires Norte, Distrito de Víctor Larco Herrera, La Libertad, Perú. *Revista Rebiol*, 33 (2), 11 – 22.
- Pagano, G., Esposito, A., Bove, P., De Angelis, M., Rota, A., y Giacomo Giordano, G. (1983). The Effects of hexavalent and trivalent Chromium on Fertilization and Development in Sea Urchins. *Environmental Research*, 30, 442-452.
- Paredes, C. (2016). *Riesgo ecológico del sulfato de bario*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima, Perú.
- Ministerio de la Producción [PRODUCE] (2009). Decreto Supremo N° 010-2008. Guía para la actualización del plan de manejo ambiental para que los titulares de los establecimientos industriales pesqueros alcancen el cumplimiento de los Límites Máximos Permisibles.

- Programa Desarrollo Institucional Ambiental [PRODIA] (2004). Metodologías: Monitoreo de aguas y sedimentos en cursos superficiales y de suelos afectados por contaminantes de origen industrial. Ministerio de Desarrollo Social y Medio Ambiente. 170. Argentina.
- Rand, G. (1995). *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental, fate and risk assessment* (2° ed.). Washington, D.C.: Taylor & Francis.
- Rodríguez, S. (2003). Consumption of drift kelp by intertidal populations of the sea urchin *Tetrapygus niger* on the central Chilean coast: possible consequences at different ecological levels. *Marine ecology progress series*, 251, 141-151.
- Román, F. (2010). *Estudio integrado de la contaminación acuática mediante bioensayos y parámetros fisiológicos y bioquímicos indicadores de estrés ambiental*. (Tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires.
- Rudolph, A., Moscoso, J. Aguirre, G. y Ahumada, R. (2005). Calidad de los sedimentos en el mar interior de Chiloé (41. 5° a 43 latitud Sur) en función de pruebas de toxicidad. http://www.shoa.cl/n_cendhoc/productos/cimar10/resumenes/pdf/16_rudolph.pdf. 15/08/2014
- Rudolph, A., Novoa, V., Ahumada, R., Saez, K., y Silva, N. (2014). Calidad de los sedimentos marinos entre el Estrecho de Magallanes y el Cabo de Hornos (Patagonia chilena), en función de pruebas toxicidad. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(1), 7-16. doi:10.4067/S0718-19572014000100002
- Shepherd, J. (2008). Annual From. *International Fishmeal and Fish Oil Organisation*, 12-23.
- Silva, D. (2003). *Elaboración de harina de pescado*. (Tesis de grado). Universidad Católica Argentina, Buenos Aires–Argentina.
- Simpson, R., Horwitz, W., y Roy, C. (1974). Survey of mercury levels in fish and other foods. *Pest. Monit. J.*, 7:127.
- Stevenson, A. (2001). Metal concentrations in marine sediments around Scotland: a baseline for environmental studies. *Continental Shelf Research*, 21(8-10), 879-897.

- Tarazona, J., Paredes, C., Romero, L., Blaskovich, V., Guzmán, S., y Sánchez, S. (1985). Características de la vida planctónica y colonización de los organismos bentónicos durante el Fenómeno El Niño. *Boletín del Instituto del Mar del Perú IMARPE*, 41-49.
- United States Environmental Protection Agency [U.S.EPA] (1994). User's guide: Probit Program versión 1.5 . *Ecological Monitoring Researc División. Cincinatti. Ohio, USA*.
- Warnau, M., y Pagano, G. (1994). Developmental toxicity of PbCL₂ in the echinoid *Paracentrotus lividus* (echinodermata). *Bull Environ Contam Toxicol*. 53: 434-441.
- Zamora, S., y Stotz, W. (1993). Ciclo reproductivo de *Tetrapygus niger* (Echinodermata: Echinoidea) en las localidades de la IV Región, Coquimbo, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 66, 155-169.
- Zavaleta, G., Morey, J., Saldaña, J., Blas, W., y Tuesta, L. (2013). El Albendazol a diferentes concentraciones y tiempos de exposición afecta el proceso de fecundación y segmentación temprana en *T. niger* "erizo de mar". *Scientia Agropecuaria*, 4(3), 251-256.
- Zuñiga, M., Riveros, A., Becerra, J. Larraín, A. (1995). *Integración de Bioensayos de Laboratorio, Variables Ambientales y Niveles de Contaminantes Orgánicos e Inorgánicos en Aguas Costera de la VIII Región*. Libro Resúmenes XV Jornadas de Ciencias del Mar. Coquimbo. Pg. 173.

TERMINOLOGÍA

Los términos descritos a continuación han sido extraídos del artículo “Protocolo del test de toxicidad de sedimentos marinos con larvas del erizo de mar *Paracentrotus lividus* de Garmendia, Menchaca, Belzunce y Revilla (2009).

- Control: Esta referido dentro de una investigación a las condiciones y factores que generalmente no están afectados directamente con el experimento, presentando las condiciones básicas o específicas de análisis. El tratamiento control debe mostrar todas las formas de la exposición, sin tener el contaminante a estudiar. El tratamiento control permite verificar los efectos externos de la prueba en análisis (pág. 3).
- DL₅₀: Es la concentración que muestra el 50% de la muerte de la población en estudio. Presenta sinónimos dependiendo del efecto, pudiendo ser: Concentración letal media (LC₅₀), Concentración de inhibición media (CI₅₀) (pág. 3).
- Elutriado: Es la solución que se obtiene cuando se mezcla una sustancia sólida con líquidos, principalmente agua destilada, sometiéndolo a agitación. Se habla especialmente de agua destilada o agua natural. Posteriormente la mezcla obtenida se centrifuga a revoluciones estándares (pág. 3).
- Exposición: Referido a la unión o contacto de los organismos (larvas de erizo negro) con las muestras de estudio (elutriado) (pág. 3).
- Muestra: Sustancia (disolución o sedimento) que es analizada en la investigación (pág. 3).
- Sensibilidad tóxica: Conocida también como intolerancia ambiental y está relacionada a la exposición de un organismo a diversas sustancias tóxicas en bajas concentraciones.

- Toxicidad: Propiedad que refiere una sustancia de provocar efectos adversos a organismos vivos. El efecto que puede ocasionar puede ser la muerte del organismo (letal) o ser subletal (pág. 3).

- Tóxico de referencia: Sustancia química utilizada para evaluar la afección de los organismos utilizados en los bioensayos. Pudiera ser lo que contiene el elutriado debidamente caracterizado (pág. 3).

- Variable objetivo: Criterio establecido para determinar la finalización de un test y que generalmente es la mortalidad del individuo en estudio (pág. 3).

APÉNDICES

Apéndice 1.

Prueba de Tukey del tratamiento y el porcentaje de clivaje celular

Porcentaje del clivaje celular

HSD Tukey^{a,b}

Tratamientos	N	Subconjunto	
		1	2
control	18	16,7778	
Tratamiento 4	18	16,7778	
Tratamiento 2	18	16,8333	
Tratamiento 1	18	16,8889	
Tratamiento 3	18		20,0000
Sig.		,999	1,000

. Alfa = .05.

Apéndice 2.

Prueba de Tukey de las células en división y el porcentaje de división celular

HSD Tukey ^{a,b}		Subconjunto					
células	N	1	2	3	4	5	6
2 células	15	1,2667					
4 células	15		5,1333				
8 células	15			8,8000			
16 células	15				21,8667		
sin dividir	15					31,8000	
32 células	15						35,8667
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 1,444.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 15,000.

b. Alfa = .05.

Apéndice 3.

Prueba de Tukey de los estadios y su porcentaje

HSD Tukey ^{a,b}		Porcentaje		
		Subconjunto		
estadio	N	1	2	3
pluteus	15	9,1400		
blastula	15	9,8133	9,8133	
prisma	15		10,4933	
gastrula	15			20,1067
Sig.		,167	,161	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,764.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 15,000.

b. Alfa = .05.

Apéndice 4.

Desarrollo normal embrionario del erizo de mar

Fecundación	Es un proceso donde se unen los gametos femeninos y masculinos del erizo de mar y se caracteriza por la presencia de una membrana de fertilización y al microscopio se denota un halo oscuro que rodea al huevo formado.
Primera escisión	Cuando se realiza la fecundación, las células comienzan a dividirse de manera secuencial, esto podría ser inhibido por una serie de sustancias tóxicas presentes en los efluentes evaluados.
Presencia de polispermia	Suele presentarse malformaciones en el desarrollo embrionario y esto principalmente por una polispermia. Esta polispermia es consecuencia del ingreso de abundantes gametos masculinos en un solo gameto femenino y que por multiplicación generan abultamientos irregulares en el embrión.
Blástula y Gástrula	Se realizan divisiones sucesivas en el huevo fertilizado alcanzando inicialmente la forma de blástula. Posteriormente, esta sufrirá modificaciones que la podrán identificar en la etapa de gástrula.
Larva pluteus	Las formas pluteus son casi transparentes y presentan una especie de esqueleto; a su vez, se le identifica por los movimientos de desplazamiento que realiza en el medio líquido.

Fuente: Kobayashi (1971, 2004)

Apéndice 5

Registro fotográfico de la investigación

Lugar de la toma de muestra del sedimento. Se observa las empresas pesqueras en la Caleta de Carquín



Análisis fisicoquímicos del elutriado en el laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la UCSS.



Extracción del elutriado y su caracterización física en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la UCSS



Extracción de los gametos masculinos de *T. niger*

