

UNIVERSIDAD CATÓLICA SEDES SAPIENTIAE
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRARIA



Determinación del riesgo ambiental del Cadmio y Cromo utilizando
como bioindicador la especie *Tetrapygnus niger* (Molina 1782) y sus
efectos en su desarrollo embrionario

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AMBIENTAL

AUTOR

Oswaldo Andree Lumbre Soles

ASESOR

Roger Manuel Mestas Valero

Lima, Perú

2020

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

ACTA N° 024 - 2020/UCSS/FIA/DI

Siendo las 6:00 p.m. del día 16 de octubre de 2020 - Universidad Católica Sedes Sapientiae, el Jurado de Tesis, integrado por:

- | | |
|-----------------------------------|-----------------|
| 1. José Luis Rodríguez Núñez | presidente |
| 2. Segundo Octavio Zegarra Aliaga | primer Miembro |
| 3. Karina Matta Santivañez | segundo Miembro |
| 4. Roger Manuel Mestas Valero | asesor |

Se reunieron para la sustentación de la tesis titulada **Determinación del riesgo ambiental del Cadmio y Cromo utilizando como bioindicador la especie *Tetrapygus niger* (Molina 1782) y sus efectos en su desarrollo embrionario**, que presenta el bachiller en Ciencias Ambientales, **Oswaldo Andree Lumbré Soles** 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 **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**.

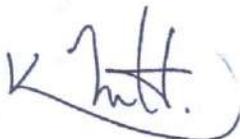
Lima, 16 de octubre de 2020.



José Luis Rodríguez Núñez
PRESIDENTE



Segundo Octavio Zegarra Aliaga
1° MIEMBRO



Karina Matta Santivañez
2° MIEMBRO



Roger Manuel Mestas Valero
ASESOR

DEDICATORIA

A Dios

Por haberme guiado hasta este punto y mostrarme que hasta lo sueños que se ven difíciles de conseguir no lo son, y que al menos con un poco de fe todo es posible.

A mis padres

Por enseñarme a soñar en grande y nunca rendirme, aunque me encuentre hundido; más que todo por su amor y nunca perder la fe en mí.

A mi hermana

Por apoyarme y ayudarme siempre en todo, por mostrarme cosas que a veces no soy capaz de ver y sobre todo por sus ejemplos de dedicación en las cosas que hace.

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento al Profesor Roger Mestas y al Profesor Armando Chiclla por su amistad y la gran ayuda desinteresada que me ofrecieron.

Al Profesor Mestas por su ayuda, cuando las cosas se pusieron difíciles y por haber aceptado ser mi asesor. Al Profesor Armando Chiclla por su apoyo, paciencia y guía desde el comienzo de la investigación, desde facilitarme el laboratorio de microbiología y biotecnología hasta enseñarme detenidamente las diferentes metodologías aplicadas en el experimento, sin esto esta investigación no sería posible.

A mis amigos que siempre me apoyaron y alentaron en esta etapa.

A todos los profesores del programa de estudios que con sus enseñanzas y valores contribuyeron a mi formación.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Índice general.....	v
Índice de tablas	vii
Índice de figuras.....	viii
Índice de apéndices.....	ix
Resumen	x
Abstract	xi
Introducción.....	1
Objetivos.....	3
CAPITULO I: MARCO TEÓRICO	4
1.1. Antecedentes	4
1.2. Bases teóricas especializadas	11
1.2.1. Organismos bioindicadores	11
1.2.2. Phylum equinoderma.....	11
1.2.3. Metales pesados.....	16
1.2.4. Evaluación de riesgo ambiental.....	18
1.2.5. Reglamentación y guía para bioensayo con erizos de mar	19
CAPITULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.1. Diseño de la investigación	20
2.2. Lugar y fecha	20
2.3. Descripción del experimento	22
2.4. Tratamientos	30
2.5. Unidades experimentales	32
2.6. Diseño estadístico	33
2.7. Análisis estadístico de datos	33
CAPITULO III: RESULTADOS	34
3.1. Prueba de toxicidad aguda	34
3.1.1. Cadmio.....	34
3.1.2. Cromo	36

3.2.	Evaluación del riesgo ambiental.....	38
3.2.1.	Cadmio.....	38
3.2.2.	Cromo	39
3.3.	Efectos de los metales pesados Cd y Cr en el desarrollo del erizo de mar	39
3.3.1.	Efectos del cadmio.....	39
3.3.2.	Efectos del cromo	41
CAPITULO IV: DISCUSIONES		48
4.1.	Comparación de prueba de toxicidad entre los metales pesados Cd y Cr	48
4.2.	Determinación del riesgo ambiental (RQ) del metal pesado Cd y Cr.....	50
4.3.	Evaluación del efecto de los metales pesados Cd y Cr en el desarrollo embrionario	51
CAPITULO V: CONCLUSIONES.....		54
CAPITULO VI: RECOMENDACIONES		55
Referencias		56
Terminología.....		61
Apéndices.....		63

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<i>Tabla 1. Clases de Equinodermos</i>	12
<i>Tabla 2. Erizos en el Perú</i>	13
<i>Tabla 3. Materiales empleados en el experimento</i>	21
<i>Tabla 4. Composición del agua de mar sintética</i>	24
<i>Tabla 5. Concentraciones promedias de cadmio expresadas en mg.l⁻¹</i>	24
<i>Tabla 6. Concentraciones promedias de cromo expresados en mg.l⁻¹</i>	25
<i>Tabla 7. Concentraciones de las sales de Cd y Cr propuestas para la prueba de desarrollo embrionario</i>	25
<i>Tabla 8. Concentraciones Prueba DL₅₀</i>	26
<i>Tabla 9. Interpretación de resultados para determinar el riesgo ecológico</i>	30
<i>Tabla 10. Tratamientos de cadmio y cromo para prueba de DL₅₀ (A.M.S: Agua de mar sintética, S.O: Suspensión de óvulos, M.E: Masa espermática)</i>	31
<i>Tabla 11. Tratamientos de cadmio y cromo para el desarrollo embrionario (E.T.N.: Embriones de T.niger, A.M.S: Agua de mar sintética)</i>	31
<i>Tabla 12. Variables dependientes y su mensuración</i>	32
<i>Tabla 13. Porcentaje de inhibición del Cd</i>	34
<i>Tabla 14. Contraste de chi-cuadrado de la prueba DL₅₀ para el Cd</i>	35
<i>Tabla 15. Resultado del efecto del Cd en la inhibición en la prueba DL₅₀ en mg.l⁻¹</i>	35
<i>Tabla 16. Porcentaje de inhibición del Cr</i>	37
<i>Tabla 17. Contraste de chi-cuadrado de la prueba DL₅₀ para el Cr</i>	37
<i>Tabla 18. Resultado del efecto de Cr en la inhibición en la prueba DL₅₀ en mg.l⁻¹</i>	38
<i>Tabla 19. Evaluación del riesgo ambiental o ecológico del Cd</i>	39
<i>Tabla 20. Evaluación del riesgo ambiental o ecológico del Cr</i>	39
<i>Tabla 21. Resultados del desarrollo embrionario del T. niger hasta las 22 h expresado en porcentajes</i>	44
<i>Tabla 22. Resultados del desarrollo embrionario del T. niger de 28 h hasta las 48 h expresado en porcentajes</i>	44
<i>Tabla 23. Valores hallados para DL₅₀ en la bibliografía para erizo de mar</i>	49
<i>Tabla 24. Valores hallados para riesgo ambiental en la bibliografía para T.niger</i>	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Punto de recolección del “erizo negro” <i>T. niger</i>	20
<i>Figura 2.</i> Flujograma de la investigación.....	22
<i>Figura 3.</i> Habilitación del erizo de mar	23
<i>Figura 4.</i> Extracción de gametos de erizo de mar.....	26
<i>Figura 5.</i> Prueba de toxicidad aguda.....	27
<i>Figura 6.</i> Sistema de desarrollo embrionario	28
<i>Figura 7.</i> Porcentaje de inhibición para el metal pesado cadmio.....	35
<i>Figura 8 .</i> Probit vs Dosis para el metal pesado cadmio.	36
<i>Figura 9.</i> Porcentaje de inhibición para el metal pesado cromo	37
<i>Figura 10.</i> Probit vs Dosis para el metal pesado Cromo.....	38
<i>Figura 11.</i> Cambios morfológicos en el desarrollo embrionario del <i>T. niger</i> expuestos a Cd y Cr: (A) fertilización normal; (B) 2 células; (E) Mórula; (C) Blástula; (D) Gástrula; Malformaciones; (F) Tipo campana; (G) Tipo hongo; (H) Spaces-ship Apollo; (I) Separación.	45
<i>Figura 12.</i> Resultados del desarrollo embrionario del <i>T. niger</i> para el metal pesado Cromo.. ..	46
<i>Figura 13.</i> Resultados del desarrollo embrionario del <i>T. niger</i> metal pesado Cromo	47
<i>Figura 14.</i> Estándares de Calidad Ambiental para Agua – Categoría 4.....	63
<i>Figura 15.</i> Manual de uso del pHotoFlex Turb para medir el pH.....	64
<i>Figura 16.</i> Manual uso para determinar el Cromo.....	65
<i>Figura 17.</i> Manual uso para determinar el Cadmio.....	66
<i>Figura 18.</i> (A) esperma y (B) ovocitos de <i>T.niger</i>	67
<i>Figura 19.</i> Tratamiento para la prueba de toxicidad aguda, etiqueta roja cromo, etiqueta verde cadmio.....	67
<i>Figura 20.</i> Exposición de los embriones de <i>T.niger</i> a las soluciones contaminadas	68
<i>Figura 21.</i> Tratamientos del desarrollo embrionario fijados con formol	68
<i>Figura 22.</i> Tratamientos para el desarrollo embrionario.....	69
<i>Figura 23.</i> Separación celular por efecto del Cr. Fuente: <i>Elaboración propia</i>	69
<i>Figura 24.</i> Efecto de aplastamiento debido a la falta de circulación	70

ÍNDICE DE APÉNDICES

	Pág.
Apéndice 1. Normas legales	63
Apéndice 2. Manual de uso del pFotoFlex Turb.....	64
Apéndice 3. Registro fotográfico.....	67
Apéndice 4. Estadístico del metal pesado Cromo	71
Apéndice 5. Estadístico del metal pesado Cadmio.....	77

RESUMEN

La investigación buscó determinar el riesgo ambiental del cadmio y cromo utilizando el erizo mar *Tetrapygus niger* (Molina 1782), y evaluar los efectos en el desarrollo embrionario. Este se inició con la preparación de agua de mar sintética y extracción de gametos de los erizos. Una vez obtenidos estos elementos, se procedió a realizar la prueba de toxicidad aguda exponiendo 1 ml de suspensión de óvulos y 10 μ l de masa espermática a cinco concentraciones diferentes de cada metal pesado: Cd (2 000, 4 000, 8 000, 1 600 y 32 000 μ g. l⁻¹), Cr (31,23, 62,5, 125, 250 y 500 μ g. l⁻¹). Asimismo, se evaluó el desarrollo embrionario a partir de una solución patrón a base de 2 ml de suspensión de óvulos y 0,1 ml de espermatozoides. Posteriormente, se procedió a agregar 1,0 ml de la solución patrón al control y a las muestras contaminadas (Cd: 0,5, 1, 5, 10 mg.l⁻¹) (Cr: 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 mg.l⁻¹), realizando los conteos durante 48 horas. Se obtuvo el valor de la DL₅₀ tanto para el Cd (41,770 mg.l⁻¹) como para el Cr (0,443 mg.l⁻¹); así como el riesgo ambiental, el cual se obtuvo dividiendo el menor DL₅₀ entre un factor (el cual fue 10) para luego volverlo a dividir entre el CEE, siendo este el ECA para aguas Categoría 4, E3. El riesgo resultante para el Cd fue de 0,0027607, mientras que para el Cr fue de 2,24502166; este último exhibe un riesgo ecológico alto para el ecosistema ya que es mayor a uno, a diferencia del Cd, que presenta un riesgo ecológico bajo al ser menor a uno. Igualmente, dentro de los resultados obtenidos en el desarrollo embrionario, se encontró que el Cr a las 48 horas presentó una tasa de malformaciones del 23,3 % a 0,05 mg.l⁻¹ y una mortalidad total en la concentración de 0,5 mg.l⁻¹; siendo estas mayores que las obtenidas en el Cd y el control.

Palabras Clave: *Tetrapygus niger*, cadmio, cromo, dosis letal media, riesgo ambiental, desarrollo embrionario, agua de mar sintética.

ABSTRACT

The research determined the environmental risk of cadmium and chromium by using the sea urchin *Tetrapygus niger* (Molina 1782), as well as the effects on their embryonic development. This began with the preparation of synthetic seawater and the extraction of gametes from sea urchins. Once these elements were obtained, the acute toxicity test was carried out exposing 1 ml of egg suspension and 10 μ l of sperm mass to five different concentrations for each heavy metal: Cd (2 000, 4 000, 8 000, 1 600 and 32 000 μ g. l⁻¹), Cr (31,23, 62,5, 125, 250 and 500 μ g. l⁻¹). The same, embryonic development was evaluated from a standard solution based on 2 ml of egg suspension and 0.1 ml of sperm. Subsequently, 1.0 ml of the standard solution was added to the control and to the contaminated samples (Cd: 0.5, 1, 5, 10 mg.l-1) (Cr: 0.01, 0.05, 0, 1, 0.5 mg.l-1), counting for 48 hours. The LD50 value was obtained for both Cd (41,770 mg.l-1) and Cr (0.443 mg.l-1); as well as the environmental risk, which was obtained by dividing the lower LD50 by a factor (which was 10) and then dividing it again by the CEE, which was the ECA for Category 4, E3 waters. The resulting risk for Cd was 0.0027607, and for Cr was 2.24502166; The latter displays a high ecological risk for the ecosystem since it is greater than one, unlike Cd, which presents a low ecological risk as it is less than one. Also, the results obtained in embryonic development, shows that Cr at 48 hours presented a malformation rate of 23.3 % at 0,05 mg.l⁻¹ and total mortality at the concentration of 0,5 mg.l⁻¹; these being greater than those obtained in the Cd and the control.

Key Words: *Tetrapygus niger*, cadmium, chromium, median lethal dose, environmental risk, embryonic development, synthetic seawater.

INTRODUCCIÓN

En diferentes partes del litoral se concentran diversas actividades como la industria pesquera, manufacturera, minera, entre otras, las cuales descargan sus aguas residuales de manera directa o indirecta al litoral, afectando el ambiente marino su biodiversidad y la zona costera. En algunos puertos del Perú, las condiciones ambientales indican que las aguas costeras se encuentran en proceso de deterioro (Cerna y López, 2013). La mayoría de estos contaminantes son bioacumulados en los órganos y tejidos blandos de peces, moluscos y algas presentes en el litoral, llegando al hombre a través de la cadena alimenticia (Rodríguez, 2010).

Esto es ratificado por Hernández (2015) que hace referencia a diversos trabajos sobre la concentración de diferentes elementos químicos en distintos grupos biológicos y ambientes marinos. Un ejemplo es el trabajo realizado por Rodríguez (2010), quien señala que los metales pesados tales como el cadmio y el cromo, se encuentran en trazas, disueltos en el agua de mar a concentraciones menores de 1 mg.l^{-1} siendo incrementados por la contaminación antropogénica, como coloides particulados, sólidos en suspensión, entre otros.

Los metales pesados se encuentran en una reacción de equilibrio en el medio acuático y con frecuencia se acumulan en los tejidos blandos de los organismos vivos presentes en este ecosistema, causando inhibición enzimática, teratológica, malformaciones y ocasionando la muerte. Estos metales al combinarse entre ellos ocasionan diferentes efectos ya sean sinérgicos, antagonistas entre otros (Morais *et al.*, 2012).

En este sentido, resulta de alto interés conocer de qué manera afectan los metales pesados al ambiente marino y en especial a organismos sésiles debido a que estos son sensibles a los cambios bióticos y abióticos que ocurren en las zonas marino-costeras. Esto hace que los “erizos de mar” sean considerados por la agencia europea como modelos alternativos debido

a que respetan los objetivos de las tres erres que son reducción, refinamiento y reemplazo de experimento con animales (Agnello *et al.*, 2017).

Los erizos de mar han sido ampliamente usados para ensayos con metales pesados y son considerados como un bioindicador debido a que tienen una gran sensibilidad a los cambios físicos y químicos, a su vez también son de fácil acceso debido a que se adhieren a las formaciones rocosas presentes en los mares (Chiarelli *et al.*, 2014).

Los metales pesados usados como tóxicos de referencia se escogieron debido a que en los trabajos realizados por Sánchez *et al.* (2008) y el Gobierno Regional del Callao (2013) muestran resultados elevados para el Cadmio en la zona del Callao, superando en gran cantidad a lo establecido por el estándar de calidad de agua (Ministerio del Ambiente [MINAM], 2017), de igual manera ocurre con el Cromo; aparte de esto también se los escogieron debido a que existen pocos estudios que mencionen trabajos realizados con estos en el país.

En este contexto, el objetivo del presente estudio es, utilizando gametos y embriones del erizo de mar *T. Niger* someterlos a los tóxicos de referencia cadmio y cromo a fin de determinar el riesgo ambiental de estos metales y los efectos en el desarrollo embrionario de *T. Niger*.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

Determinar el riesgo ambiental del cadmio y cromo utilizando el erizo de mar *Tetrapyqus niger* y los efectos en su desarrollo embrionario

Objetivos Específicos

- Determinar la toxicidad aguda del Cadmio y Cromo en gametos de *T. niger*
- Determinar el riesgo ecológico (RQ) de los metales pesados Cadmio y Cromo.
- Evaluar el efecto de los metales pesados Cadmio y Cromo en el desarrollo embrionario del erizo de mar *T. niger*.

CAPITULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

Garmendia, *et al.* (2009) elaboró un protocolo que tuvo como objetivo principal evaluar el efecto toxicológico de sedimentos marinos utilizando al erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816). La metodología indicó que para la obtención de gametos primero determinaron el número suficientes de erizos que aseguren al menos un individuo macho y hembra con gametos de buena calidad, para luego proceder a la extracción de los mismos mediante una inyección de 1 ml de KCl 0,5 M a través del peristoma. Una vez obtenidas las muestras, procedieron a fecundarlas agregando los ovocitos en una probeta con aproximadamente 100 ml de agua de mar filtrada, posteriormente, cuando la concentración estuvo homogénea y densa, añadieron una gota de esperma y agitaron muy suavemente dejando reposar las probetas por un tiempo entre 5 y 10 minutos. Finalmente, calcularon la efectividad de la fecundación extrayendo 20 μ l de cada replica para depositarla separadamente sobre una porta objeto cuadrículado, realizando el conteo de número de ovocitos fecundados frente al total de ovocitos de cada replica, obteniendo un promedio mayor al 90 %, parámetro que permitió el cálculo de la densidad de 25 huevos. ml^{-1} en vasos de 20 ml. A partir del cultivo de huevos recién fecundados y las muestras de elutriador y control, fueron trasvasadas del cultivo a las seis réplicas por muestras y 11 de control (las cuales contenían 20 ml de elutriado) para introducir las en la cámara incubadora donde permanecieron durante 48 horas a una temperatura de 20 °C. Tras 4 horas retiraron los vasos de la cámara y añadieron de tres a cinco gotas de formol al 40 % para detener el desarrollo larval, de esta manera contabilizaron el número de larvas plúteos normales entre las 100 primeras observadas. los autores concluyeron que, para considerar el bioensayo válido en el control, la efectividad de embriogénesis debe ser igual o mayor al 90 %. Al confirmarse este criterio, y para clasificar la muestra como toxica, la reducción debe exceder en más del 20 % respecto al control, así como de las diferencias significativas ($p < 0,05$). Según la necesidad de comprobación se aplicarán diferentes pruebas; como por ejemplo el test de Tukey, si es que se pretende comparar muestras entre sí.

Kobayashi y Okamura (2004) realizaron una investigación en la Universidad de Doshisha en Kyoto, Japón referida a los efectos de los metales pesados en el desarrollo embrionario del erizo de mar, la cual tuvo como objetivo evaluar la toxicidad de las aguas contaminadas originadas en una mina de plomo en desuso mediante bioensayos de erizo de mar y análisis de metales pesados. Para el análisis se usaron dos muestras de efluentes mineros cercanos y una muestra de agua de mar no contaminada; observando que las muestras de los efluentes mineros tuvieron una presencia más alta de Mn, Pb, Cd, Zn, Cr, Ni, Fe y Cu que la muestra de agua de mar. En este caso la metodología usada para obtener los ovocitos y las espermias consistió en inyectar 0,1 M (ca. 0,3 ml) de cloruro de acetilcolina en la cavidad del erizo, luego se procedió con la fecundación, y finalmente los embriones fueron contaminados usando sales de cada uno de los metales encontrados en las muestras combinadas con agua de mar sintética. Los resultados indicaron que en las muestras de análisis, el zinc no presentó una amplia variación a diferencia de los demás metales; además, al compararlo con las diferentes muestras, el zinc a una concentración de $480 \mu\text{g.l}^{-1}$ inhibe completamente el desarrollo embrionario mientras que a una concentración de $7,2 \mu\text{g.l}^{-1}$ fueron observados efectos inhibidores; en cambio, en una concentración de rango de $14 - 240 \mu\text{g.l}^{-1}$ fueron observadas anomalías como la exogástrula, llegando incluso a generar un efecto retardado en la fecundación. Los autores concluyeron que el zinc y otros metales pesados como el manganeso y el níquel son posibles sustancias causantes de una serie de anomalías en el desarrollo de embriones de erizo de mar, lo que ofrece la posibilidad de realizar ensayos sensibles para la investigación y el monitoreo.

Fernández (2002) realizó una investigación en la Universidad de la Coruña, España basada en la evaluación biológica de la contaminación marina costera mediante bioensayos con la finalidad de estandarizar una prueba con embriones y larvas del erizo de mar *P. lividus*; de esta manera buscó determinar la sensibilidad de los embriones para así detectar la toxicidad producida por los cationes bivalentes de mercurio, cobre, plomo y cadmio. Para este efecto, los gametos fueron extraídos directamente de las gónadas con una pipeta, previamente diseccionados por el plano ecuatorial; y para asegurar su viabilidad, fue comprobado en el microscopio que el espermia fuese móvil y los huevos redondos. En un periodo por debajo de 30 minutos, los óvulos fueron introducidos en una probeta con agua de mar de control y fueron fecundados con una alícuota de espermia; luego fueron agitados suavemente con un émbolo para facilitar la mezcla de los gametos. Transcurridos unos segundos, se tomaron 4

muestras de 20 μ l y fue calculada la densidad de embriones y el porcentaje de fecundación media. Si este porcentaje hubiera sido bajo, se tendría que hacer una corrección en los resultados finales, ya que de lo contrario estaría sobreestimada la mortalidad debida al tóxico estudiado. Los huevos fecundados fueron introducidos en recipientes de 20 ml conteniendo las soluciones experimentales a una densidad de 20-30 huevos/ml⁻¹. Cabe resaltar que se usaron recipientes de polipropileno para el mercurio, mientras que, para el resto de metales pesados, bioensayos con muestras naturales y demás compuestos orgánicos se usaron de vidrio. Para las pruebas con tóxicos individuales fueron establecidas cinco concentraciones en progresión geométrica: la CE₅₀ esperada, dos por encima y dos por debajo de esta. La solución patrón fue preparada en agua bidestilada 10 veces más concentrada que la concentración experimental más alta; y a partir de ella, por dilución con agua de mar sintética, se obtuvieron las demás concentraciones. Los resultados indican que el grado de inhibición no fue igual para todas las concentraciones tóxicas, sino que a concentraciones cada vez más altas se detuvo el desarrollo en estados embrionarios cada vez más tempranos. Además, se estableció el siguiente orden de toxicidad en el que el mercurio fue el más tóxico fue el mercurio, seguido del cobre, plomo y finalmente del cadmio. El autor concluyó que Hg y Cu inhiben la embriogénesis a concentraciones del orden de decenas de ppb, el Pb a centenas de ppm y el Cd a unidades de ppm.

Lorenzo *et al.* (2002) realizó una investigación en la Universidad de Vigo en Galicia, España cuyo objetivo fue evaluar el efecto de los ácidos húmicos sobre la especiación y toxicidad del cobre usando larvas de *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816) en agua de mar. La solución madre de ácido húmico (1,0 g.l⁻¹) fue preparada disolviendo la sal de sodio en una solución de 4×10^{-3} M NaOH, y fue almacenada a 4 °C en oscuridad para evitar el envejecimiento fotoquímico; mientras que las soluciones experimentales diluidas fueron preparadas en agua de mar sintética definida químicamente por el autor. Los erizos de mar adultos fueron recolectados de una población submareal en Canido, España. Los gametos fueron obtenidos mediante disección de un solo par de adultos, verificando su madurez mediante un microscopio. Posteriormente, fueron tomadas cinco muestras de 50 μ l para registrar el éxito de la fertilización y la densidad del huevo bajo el microscopio, por lo que cuatrocientos huevos fueron entregados en viales de polipropileno de 20 ml. Fueron analizadas cinco réplicas por los seis tratamientos y cinco blancos de agua de mar sintética para cada experimento. Los resultados evidenciaron que hubo una disminución notable en

los efectos tóxicos de las soluciones de Cu para las larvas de *P. lividus* con cantidades crecientes de ácido húmico (HA), vale decir, que para el Cu la inhibición del crecimiento tuvo un umbral más bajo que la inhibición de la embriogénesis, lo que significa que el crecimiento larvario fue una variable o un *endpoint* más sensible para evaluar la toxicidad del Cu. Además, buscaron determinar mediante un modelo logístico que utilizó los datos estadísticos obtenidos de las pruebas de Levene, Kolmogorov-Smirnov y Dunnett, si las diferencias entre lo observado y los valores previstos se reducen significativamente cuando la toxicidad se expresa en función de Cu lábil en lugar de Cu total. La prueba F realizada muestra una significativa mejora en el éxito predictivo del nuevo modelo ($P= 0,0008$ y $p<0,0001$ para el desarrollo y crecimiento larvario respectivamente), lo que significa que la concentración de Cu lábil es mejor predictor de la toxicidad del Cu en presencia de HA que la concentración total de Cu. Los autores concluyeron que la adición de HA causa una disminución en el pico de la corriente máxima en los voltamogramas; en este proceso, normalmente atribuido a la formación de complejos no volátiles entre Cu y HA, fue también verificado un aumento en el ancho del pico y un ligero cambio en el potencial máximo hacia valores más negativos.

Pagano *et al.* (1983) realizaron su investigación en el Instituto por el Estudio y la Cura del Tumor en Nápoles, Italia. Tuvieron como objetivo evaluar los efectos del cromo trivalente y hexavalente en el erizo de mar. La metodología para la preparación de las muestras contaminadas no solo usó cromato de sodio mezclado en agua de mar filtrada, también incluyeron pretratamientos a la masa espermática (dos minutos expuesto al tóxico de referencia) y a los óvulos previos a la fecundación (10 minutos expuesto al tóxico de referencia), los cuales fueron expuestos a los contaminantes de la prueba en diferentes intervalos. Los autores observaron los defectos del desarrollo por el pretratamiento, debido a que esta sustancia inflige un daño genético al espermatozoide. Los resultados de la investigación evidenciaron que la exposición de los embriones al cromo hexavalente en una proporción mayor a 10^{-4} M, ocasionan que el desarrollo esquelético sea totalmente suprimido. Asimismo, que una exposición temprana, entre los primeros 10 a 30 minutos, a una concentración menor de 10^{-3} M permite a los embriones recuperarse; en cambio al exponerlos de manera tardía al cromato en una concentración mayor a 10^{-4} M inhibe completamente el desarrollo larval. En consecuencia, los autores determinaron que a una mayor concentración de Cr hexavalente menor es la tasa de fertilización y mayor la tasa de

malformaciones; para el caso del Cr trivalente se determinó que no generó daños en el desarrollo o anormalidades; sin embargo, el resultado más relevante fue que al pre-tratar la masa espermática a una concentración mayor a 10^{-5} M, el ratio de fertilización resultó claramente inhibido. Los autores concluyeron que los efectos del cromato fueron directamente proporcionales a la concentración y al tiempo de exposición, en cambio el cromo trivalente afectó directamente al espermatozoide haciéndolo ineficiente.

Pagano *et al.* (1982) realizaron otra investigación en el Instituto por el Estudio y la Cura del Tumor en Nápoles, donde estudiaron la fertilización y el desarrollo larval en gametos y embriones de erizos de mar expuestos al cadmio; siendo su principal objetivo establecer la relación entre la teratogenicidad y la posible mutagenicidad entre el cadmio y el erizo de mar. Como parte de la metodología fueron realizados pretratamientos, antes de la fecundación, tanto a la masa espermática como a los óvulos, los cuales fueron expuestos a los contaminantes del test en diferentes intervalos. El cadmio fue disuelto con agua destilada y agua de mar para las soluciones stock; mientras que las observaciones fueron realizadas alrededor de las 24 horas para escisión o cleavage y 48 horas para plúteos. Los resultados obtenidos indicaron que al exponer los embriones al Cd en el rango de concentraciones de 5×10^{-5} molar (M) a 5×10^{-4} molar (M) daba como resultado un daño a nivel esquelético; así mismo, la severidad incrementó en función a la concentración de Cd, de tal manera que cuando fue expuesta a una concentración de 10^{-3} M la fertilización fue paralizada, mientras que una concentración menor de 10^{-4} M tuvo como resultado algunos efectos inconsistentes, sugiriendo una diversidad de efectos del Cd en los espermatozoides y los óvulos. A su vez, cuando los óvulos fueron pretratados con concentraciones de 10^{-3} M a 10^{-4} M, los resultados presentaron un ligero cambio en el ratio de fertilización; igualmente, los espermatozoides al pre-tratarlos en cortos periodos de exposición y a altos niveles de concentración presentaron una disminución en el ratio de fertilización. Los autores concluyeron que el aspecto más relevante del impacto ambiental del Cd fue el efecto de la capacidad de fertilización del esperma. Este fue el único efecto que pudo observarse para bajas concentraciones de Cd.

Paredes (2016) en la investigación realizada en la Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú evaluó el riesgo ecológico del sulfato de bario empleando la respuesta ecotoxicológica de 12 organismos destinatarios. Las pruebas ecotoxicológicas incluyeron a

las microalgas *Isochrysis* sp., *Chlorella* sp., las plantas terrestres *Medicago sativa* y *Zea mays*, los crustáceos *Daphnia* sp., *Emerita analoga* (Stimpson 1857) y *Apothyale* sp., el equinodermo *Tetrapygus niger*, el insecto acuático *Chironomus Calligraphus*, y los peces *Odontesthes regia regia* (Humbolt 1821), *Poecilia reticulata* (Peters 1859) y *Paracheirodon innesi* (Myers 1936). Fueron realizadas mediciones según los parámetros y protocolos para las pruebas de determinación del riesgo ecológico, siguiendo las pautas y recomendaciones de la United States Environmental Protection Agency y demás autores. Los resultados del sulfato de bario y otras formas determinaron un efecto perjudicial en el desarrollo celular de la microalga *Chlorella* sp. (96 h), registro una concentración de inhibición media (CI₅₀) de 0,1 g.l⁻¹ y una concentración efectiva no observable (NOEC) de 0,02 g.l⁻¹. El autor concluyó que existe alto riesgo ecológico (RQ) del sulfato de bario (RQ = 1,224) empleando la respuesta ecotoxicológica de doce organismos no destinatarios.

El Gobierno Regional del Callao (2013) en su informe sobre el estudio oceanográfico de la bahía del Callao, Ventanilla y zonas de influencia, “realizó una determinación sobre la situación oceanográfica de la Provincia Constitucional del Callao, Perú”; que permitirá establecer un sistema para la planificación y planeamiento para la zona costera. En el estudio fueron usados procedimientos de análisis de mapas batimétricos, caracterización de la geomorfología del litoral y fondo marino, caracterización de los factores fisicoquímicos, estudio de los procesos de contaminación y análisis de calidad ambiental del ecosistema, análisis de la erosión y sedimentación, zonificación de los ecosistemas marino costeros, diversidad biológica marítima, pesca y maricultura. Entre los resultados más notables, obtuvo que las concentraciones de los metales pesados presentes en los sedimentos muestran lo siguiente: el cobre indica un valor medio de 27,46 µg.g⁻¹, los cuales no exceden la tabla de protección costera de los estados unidos; el cadmio presentó un valor medio de 5,14 µg.g⁻¹, superando este valor la dosis letal mínima para producir efectos biológicos desfavorables a los organismos acuáticos estipulado por la USEPA; el plomo (3,32 µg.g⁻¹), hierro (2,12 %), zinc (114,71 µg.g⁻¹) y manganeso (250 µg.g⁻¹) no superaron las concentraciones estipuladas en esta tabla. El informe presentó como conclusiones que el área de estudio presentó niveles de contaminación, principalmente causada por los cauces de los ríos que desembocan en el océano pacífico y a los colectores, declarados y clandestinos. A pesar de ello, las trazas de metales pesados no superaron los niveles indicados para las 3 subcategorías de la categoría 2 y 4.

Sánchez, *et al.* (2008) fijó como objetivos en la evaluación ambiental en zonas marinas costeras del Perú realizada en la Bahía del Callao, Perú, evaluaron con respecto al agua de mar, sus parámetros ambientales físicos, químicos, los indicadores de contaminación microbiológica, las trazas de metales pesados en sedimentos y organismos, entre otros. Establecieron 17 estaciones hidrográficas donde se recolectaron diferentes muestras utilizando métodos propios del Instituto del Mar del Perú, también se registró la temperatura, salinidad, circulación marina con dirección e intensidad de flujos, oxígeno disuelto, pH, nutrientes, sólidos suspendidos, aceites y grasas, sulfuros de hidrógeno, demanda biológica de oxígeno (DBO₅) y coliformes. En las estaciones ya preestablecidas, se tomaron muestras para análisis de hidrocarburo (petróleo) y trazas de metales. Se obtuvo, del fondo marino, presencia de Cd (0,81 - 5,47 mg.g⁻¹), Pb (12,00 - 120,25 mg.g⁻¹), Cu (7,72 - 74,7 mg.g⁻¹) y Zn (8,94 - 197,16 mg.g⁻¹). Las concentraciones elevadas se encontraron alrededor del terminal portuario del Callao y la desembocadura del río Rímac, mientras que las concentraciones bajas fueron encontrados cerca a la isla San Lorenzo. También, se evaluaron trazas de metal en tres músculos: “almeja”, “Gari sólida”; “pique” o “señorita”, el “caracol negro” y otros. La calidad del agua de la bahía del Callao se ve deteriorada debido a los diferentes tipos de efluentes industriales y domésticos como también las aguas del río Rímac que llevan consigo carga contaminante, así como que se sobrepase los límites permisibles de la Ley General de aguas. Los autores concluyeron que se ha mantenido la clasificación de la bahía en contaminación grave de tipo crónica al no haber una disminución su contaminación en los últimos 22 años. De esto surge la necesidad de planificar y aplicar medidas de saneamiento directas e indirectas.

Olaechea, *et al.* (2006) mediante una investigación en el Laboratorio de Biología de Desarrollo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma en Lima, Perú, analizó el desarrollo embrionario de *Tetrapygnus niger* “erizo negro” en diferentes temperaturas con el objetivo principal de caracterizar las etapas del desarrollo embrionario en temperaturas controladas de 5 °C, 10 °C y 15 °C. La metodología empleada se basó en la obtención de gametos al inyectar 0,2 ml de KCl (0,53M) con el fin de inducir su liberación. Se caracterizaron los espermatozoides como una secreción blanca, mientras que los ovocitos como una secreción rojiza; los ovocitos fueron mantenidos en agua de mar mientras que la

masa espermática fue mantenida en seco. En la fertilización, se colocó en un vial 2 ml de suspensión de ovocitos, a la que se agregó 0,1 ml de la suspensión patrón de espermatozoides y diluido hasta 150 ml con agua de mar filtrada. Luego fueron colocadas 3 gotas del vial en una lámina base cubriéndola con una laminilla y fueron contados 100 embriones cada 30 minutos hasta visualizar el estadio de plúteos. Como resultado, los cigotos iniciaron la segmentación en todos los bioensayos, pero solo llegaron hasta el estadio de plúteos los que fueron expuestos a 10 °C y 15 °C. Los autores llegaron a la conclusión que los cigotos expuestos a 15 °C presentaron el menor tiempo de desarrollo, siendo este de 120 horas; a comparación de los cigotos expuestos a 10 °C que les tomó un tiempo de 345,5 horas.

1.2. Bases teóricas especializadas

1.2.1. Organismos bioindicadores

Un bioindicador es un organismo que contiene información sobre la calidad del medio ambiente o parte de él, es decir, son especies sensibles a procesos o contaminantes que pueden generar un cambio en la biodiversidad de un medio específico. Asimismo, pueden ser usados como sustitutos de comunidades más grandes, permitiéndoles ser un indicador de la condición de un hábitat en particular (Markert *et al.*,2003).

De acuerdo con el modo de acción, el bioindicador se clasifica en indicadores de acumulación, que son organismos que acumulan uno o más elementos y/o componentes del medio ambiente, e indicadores de efecto o impacto, que son organismos que demuestran efectos específicos y no específicos en respuesta a la exposición de ciertos elementos, componentes o sustancias; algunos de estos efectos pueden incluir cambios en la morfología, histología, estructura celular, entre otros (Markert *et al.*, 2003).

1.2.2. Phylum equinoderma

Los animales pertenecientes a este phylum son netamente marinos, se caracterizan por tener una simetría pentarradial, un esqueleto de calcita y un sistema vascular acuífero el cual regula la alimentación, movimiento y demás funciones. También se resalta que los

equinodermos cuentan con un sistema circulatorio hermal, sistema digestivo completo y sistema nervioso descentralizado. Los equinodermos pueden ser encontrados en cualquier tipo de ambiente marino, incluso los extremos y también en profundidades abismales mayores a 11 000 m. Este phylum tiene un total de 20 000 especies siendo 7 000 vivientes descritas hasta el momento y 13 000 fósiles (Solís-Marín *et al.*, 2014).

Clase de equinodermos

Los equinodermos se dividen en cinco clases, las cuales se mencionan en la Tabla 1.

Tabla 1

Clases de equinodermos

Clases	Nombres comunes
Crinoideos	Lirios de mar y estrellas plumas
Asteroideos	Estrellas de mar
Ophiuroideos	Cestas de mar u ofiuras
Equinoideos	Erizos de mar, bizcochos de mar entre otros
Holoturuoideos	Pepinos de mar

Fuente: Espinoza (2018).

Erizo de mar

Los erizos de mar son invertebrados marinos que se caracterizan por tener una morfología con simetría pentarradial y poseer un sistema ambulacral que les permite la locomoción. Presentan un caparazón de forma globosa dividido en diez placas de naturaleza calcárea unidas fuertemente entre sí y cubiertas por púas de longitud variable. Sobre cinco de estas placas se encuentran unos apéndices muy característicos, los pies ambulacrales, que les permiten desplazarse incluso por superficies verticales. Las otras cinco placas, de mayor tamaño, se denominan interradales o interambulacrales bajo las que se encuentran las gónadas, que se extienden desde el polo oral al aboral, comunicándose con el exterior a través de un canal que atraviesa el caparazón a nivel de las placas que rodean el ano (Fernández, 2002).

Erizos en el Perú

En la Tabla 2 se puede observar las diferentes especies de erizos en el Perú.

Tabla 2

Erizos en el Perú

Familia	Especies
Arbaciidae	<i>Tetrapygus niger</i> <i>Arbacia spatuligera</i> (Valenciennes 1846)
Parachinidae	<i>Loxechinus albus</i> (Molina 1782)
Echinometridae	<i>Carnocentrotus gibbosus</i> (L. Agassiz 1846)

Fuente: Espinoza (2018).

Ciclo de vida del Erizo de Mar

El ciclo de vida de los erizos de mar consta de las siguientes etapas:

- Fertilización del huevo.
- Desarrollo a través de la blástula y la gástrula hasta el plúteo.
- Crecimiento y desarrollo del plúteo alimenticio a una larva madura.
- Desarrollo del embrión del erizo dentro de la larva en crecimiento.
- Metamorfosis
- Crecimiento del erizo joven a un adulto reproductivo

Esta secuencia no es continua con las estructuras de cada etapa que dan lugar a la siguiente. La etapa del desarrollo del embrión del erizo es particularmente inusual, durante este período, el erizo, o más exactamente la mitad ventral del erizo, crece casi como un parásito dentro de la larva (Hinegardner, 1969).

Desarrollo embrionario normal del erizo de mar

Las etapas del desarrollo embrionario son descritas a continuación, según lo expuesto por Kobayashi y Okamura (2004):

- Fecundación: Comienza con la penetración de un espermatozoide en un óvulo no fertilizado. Sin embargo, a veces, la elevación de la membrana de fertilización puede retrasarse y los huevos pueden retener la característica de un huevo no fertilizado hasta que comience la escisión.
- Primera escisión: El huevo fertilizado se divide en dos células del mismo tamaño. Sin embargo, los óvulos fertilizados nunca se dividirán cuando los óvulos o los espermatozoides estén en malas condiciones o el agua de mar contenga algunas sustancias tóxicas, etc.
- Escisión Polispermética: La penetración de varios espermatozoides en un solo óvulo provocará la polispermia, luego el huevo se dividirá en varias celdas y al mismo tiempo formará una configuración bastante irregular, la cual se puede dividir entre 64 células.
- Gástrula: Los huevos que se desarrollan exitosamente con escisiones repetidas alcanzarán la blástula en un cierto tiempo y saldrán de la membrana de fertilización, luego la formación de espículas y la cavidad gastral comenzarán a alcanzar la etapa de gástrula. Hay una serie de cambios sucesivos en el desarrollo de blástula a la gástrula, pero parece extremadamente difícil verificar exactamente los cambios respectivos. En la actualidad, solo la gastrulación está disponible como un cambio significativo claramente definible.
- Plúteos: En plúteos normales, la etapa del cuerpo es claramente diferente de la etapa anterior, se completa el tracto digestivo y se desarrolla el esqueleto. La relación de normal a anormal de este estadio se utiliza como criterio para los efectos inhibitorios de productos químicos

Estadios del erizo de mar

Los estadios de los erizos se describen a continuación según lo expuesto por Bendita (2016):

Hembras

Inmaduro (I): Se caracteriza por que presentan ovarios muy pequeños, delgados y blanquecinos; propios de los ejemplares pequeños o virginales, donde no han iniciado su proceso de maduración.

En madurez (II): Ovocitos inmaduros y en madurez, adheridos frecuentemente a las paredes lobulares que son gruesas, en donde hay una activa producción de ovocitos, los cuales a medida que alcanzan su tamaño definitivo ingresan al lumen del lóbulo, experimentando la reducción meiótica que los transforma en óvulos maduros.

Maduro (III): La capa cortical va reduciéndose en extensión, siendo reemplazado por la masa de óvulos que en su máximo desarrollo presentan abundante citoplasma, ocupando prácticamente todo el espacio lobular, las paredes de los lóbulos se tornan delgadas y poco visibles debido a la presión ejercida entre los ovocitos, los cuales adquieren formas irregulares.

Desovante (IV): La cantidad de óvulos se reduce notoriamente presentándose la cavidad lobular parcial o totalmente vacía, ya que continúa produciéndose la ovogénesis en la capa cortical.

Post – desovante (V): Se desencadena un proceso de degeneración celular relativamente rápido, que transforma a los óvulos en una masa amorfa con vesículas basófilas, es posible ver ovocitos atrésicos, los cuales proliferan y se extienden hacia el lumen gonádico.

Machos

Inmaduro (I): Presentan abundante tejido conectivo, no pudiendo distinguirse el sexo para este estadio.

En madurez (II): Los estratos celulares basales de la región cortical de los lóbulos testiculares, se observa que es reemplazado el tejido conectivo por espermatogonias y espermatocitos que forman una banda de intenso color azul.

Maduro (III): Este estadio presenta una capa cortical, debido al progresivo aumento de la masa de espermios. Siendo esta la característica histológica de los testículos maduros.

Desovante (IV): La masa de espermios disminuye su diámetro en los lóbulos testiculares al ocurrir el desove, los estratos de células espermatogénicas

se comienzan a disgregar; sin embargo, la producción de espermios continúa, lo que implica que el proceso de maduración no se detiene con el desove, perdurando por un tiempo más.

Post desovante (V): El proceso de degeneración celular transforma primero a los espermatozoides para luego seguir con los espermios, lo cual se manifiesta por el notorio incremento de vesículas citoplasmáticas de color azul intenso. Este proceso es más lento que en las hembras, que termina con el consumo total de la masa de gametos masculinos. (p.13-14).

1.2.3. Metales pesados

Se denominan Metales pesados a los elementos metálicos que tiene un peso atómico mayor que 40,04 que es la masa atómica del calcio (García *et al.*, 2012). De igual manera, el término "metales pesados" en ecotoxicología está relacionado con contaminantes ambientales, mientras que "metales traza" corresponde a metales solo en concentraciones traza (0,01 %). En muchas ocasiones, ambos términos se han empleado para referirse a los mismos metales (Blasco *et al.*, 2017).

Los metales pesados ingresan al medio ambiente por medios naturales y antropogénicos; estos medios incluyen: meteorización natural de la corteza terrestre, minería, erosión del suelo, descarga industrial, efluentes de agua residual, agentes de control de plagas, entre otros. Además, la contaminación de metales pesados suele seguir un orden cíclico: industria, atmósfera, suelo, agua, alimentos y humanos. Aunque la toxicidad y la amenaza para la salud se dan en función de la concentración, es bien sabido que la exposición crónica de metales pesados y metaloides a niveles relativamente bajos puede causar efectos adversos. Aunque algunas personas estén principalmente expuestas a estos contaminantes en el lugar de trabajo, para la mayoría de las personas, la exposición a esos elementos tóxicos se suele dar a través de los alimentos y el agua (Morais *et al.*, 2012).

Cadmio

El uso del cadmio por el hombre es relativamente reciente y en las últimas décadas se ha considerado seriamente como posible contaminante. Este metal se encuentra naturalmente en el medio ambiente: aire, suelos, sedimentos e incluso en el agua de mar no contaminada. El cadmio es emitido al aire por minas, fundiciones de metales e industrias que utilizan compuestos de cadmio para aleaciones, baterías, pigmentos y plásticos, aunque muchos países tienen controles estrictos sobre estas emisiones (Morais *et al.*, 2012). Los contaminantes inorgánicos como el cadmio son tóxicos para la mayoría de las especies, su emisión global hacia el medio ambiente corresponde en aproximadamente 90 % a fuentes antropogénicas, ligadas a la producción del zinc ya sea por desechos de la producción de plásticos, pinturas, aleaciones de diversos metales, u otras operaciones de tipo industrial, lo que conduce a una amplia distribución del metal en trazas al ambiente, produciendo una carga contaminante creciente en los suelos, ríos y mares (Rodríguez, 2010).

En general, para las personas que no se encuentran expuestas ocupacionalmente, los productos alimenticios representan la mayor parte de la carga de exposición al cadmio. En los alimentos solo están presentes sales de cadmio inorgánicas. Los compuestos orgánicos de cadmio son muy inestables, a diferencia de los iones de plomo y mercurio, a su vez los iones de cadmio son fácilmente adsorbidos y se incorpora en todos los niveles de la cadena alimenticia, desde los microorganismos hasta el humano, el consumo de vegetales de hojas, pescados, mariscos, algas y agua; en el caso de las plantas se adsorbe desde las raíces hasta las hojas, frutos y semillas comestibles (Morais *et al.*, 2012). En Japón se registran más de 230 casos de envenenamiento por cadmio como consecuencia de la ingestión de alimentos contaminados, la fuente del metal fue el desagüe de los desechos de minas. El efecto en la salud es teratogénico, dolor en articulación, afecciones pulmonares y renales (Rodríguez, 2010).

El cadmio se acumula en el cuerpo humano y afecta negativamente a varios órganos: hígado, riñón, pulmón, huesos, placenta, cerebro y sistema nervioso central. Otros daños que se han observado incluyen la toxicidad para la reproducción y el desarrollo, efectos hepáticos, hematológicos e inmunológicos. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) recomienda para el cadmio la ingesta diaria tolerable provisional (PTWI) como 0,007 miligramos sobre kilogramos del peso del cuerpo. El nivel

máximo de la EPA para el cadmio en el agua es de 0,005 mg.l⁻¹, mientras que la OMS adoptó la directriz provisional de 0,003 mg.l⁻¹ (Morais *et al.*, 2012).

Cromo

El cromo trivalente no es un metal que se encuentre por si solo en la naturaleza como el cobre y en forma natural siempre está acompañada de otros metales, también se halla como subproducto de fundiciones de fierro y curtiembre (Cerna y López, 2013). En cambio, el cromo hexavalente es totalmente producido por actividades humanas a través de emisiones de industrias, también es usado como agente anticorrosivo en varios sistemas de enfriamiento y combustión (Shekhawat *et al.*, 2015).

Una de las formas más preocupantes de contaminación por cromo radica en los desechos provenientes de la industria de curtiduría. Aunque el cromo es esencial en el hombre, ya que sus propiedades van relacionadas con la actividad de la insulina, se sabe también que todos los metales pesados en exceso en el organismo tienen efectos nocivos que afectan al metabolismo celular, acumulándose en los tejidos y provocando intoxicaciones severas. El cromo en especial ocasiona úlceras crónicas en la piel y dermatitis en caso de contacto con la piel, al ser inhalado ocasiona úlceras y perforación en el sistema nasal. Al realizarse estudios en animales y exponerlos al cromo hexavalente por vía de inhalación se reportó la formación de tumores a nivel de los pulmones, en cambio al hacerlo de manera vial no se registraron formaciones de tumores. Esto muestra que el Cr hexavalente es solo tóxico si se inhala (Shekhawat *et al.*, 2015).

1.2.4. Evaluación de riesgo ambiental

La evaluación de riesgo ambiental (E.R.A.) tiene como objetivo “cuantificar la distribución de posibles efectos ecológicos sobre los ecosistemas por la exposición de uno o más estresores”. La E.R.A. se caracteriza por un conjunto de conceptos, “incluyendo el escenario de riesgo, la probabilidad de riesgo y los destinos de riesgo” que pueden también estar dados por tres cuestionamientos “de lo que puede suceder; lo que probablemente ha de suceder y cuáles son finalmente las medidas puntuales de las ocurrencias” . Esto se ha vuelto un paradigma estándar para la predicción del riesgo ambiental (Paredes Espinal, 2016).

1.2.5. Reglamentación y guía para bioensayo con erizos de mar

Reglamentación Estadounidense

La Agencia de protección ambiental de los estados unidos reglamenta los procedimientos para la estimación de toxicidad de efluentes, aguas continentales y marinas, usando diferentes organismos. En el caso del erizo de mar se reglamenta el uso de *Arbacia Punctulata* para la prueba de fertilización. El método consiste en exponer el esperma a una serie de concentraciones de un cuerpo de agua por 1 hora. Los ovocitos se agregan en las cámaras de prueba que contienen los espermatozoides. Luego de 20 minutos, la prueba finaliza y los efectos sobre los gametos expuestos se comparan con los controles para determinar si las concentraciones de efluentes tuvieron algún efecto sobre la fertilización. El porcentaje de fertilización se determinará mediante un examen microscópico de una alícuota de cada tratamiento; los resultados de la prueba se expresan como la concentración de la sustancia de prueba que causa una reducción estadísticamente significativa en la fertilización (EPA, 2002a).

Reglamentación Canadiense

La guía propuesta por la agencia de medio ambiente de Canadá proporciona orientación sobre las opciones de prueba, especímenes de prueba y las aplicaciones en equinoideos; no obstante, no se proporcionan instrucciones explícitas que podrían ser necesarias en un protocolo reglamentario. Los especímenes detallados en la guía son los siguientes: “erizo verde”, “erizo morado” del Pacífico, “Eccentric Sand Dollar”, “Arbacia”, “erizo blanco”. Igualmente se detalla un procedimiento universal para todos los especímenes ya antes mencionados teniendo en cuenta los diferentes parámetros, la preparación de las disoluciones, concentraciones, replicas entre otras; los procedimientos para la prueba de químicos como también para las diferentes muestras de efluentes y sedimentos se ven detallados en la guía; a su vez se detalla los procedimientos para la toma de la muestra y los reportes que se tiene que hacer y exige el gobierno canadiense (Environment Canada, 2011)

CAPITULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño de la investigación

La investigación presenta un diseño mixto debido a que se considera una parte experimental y otra no experimental. Presenta a su vez un enfoque mixto, al tener una respuesta cualitativa y cuantitativa (Hernández *et al.*, 2010). Esta investigación tiene un alcance correspondido a un estudio explicativo esto porque indica la influencia de los metales pesados en los resultados del riesgo ambiental y en el desarrollo embrionario del *T. niger*.

2.2. Lugar y fecha

La recolección del erizo negro y del agua de mar se realizó frente al terminal pesquero ubicado en la bahía del distrito de Chorrillos, Lima en el mes de Julio; exactamente en las coordenadas 865435,081 N, 279199,086 E UTM 18 S; las cuales se muestran en detalle en la Figura 1, juntamente con su ubicación en el distrito de Lima.

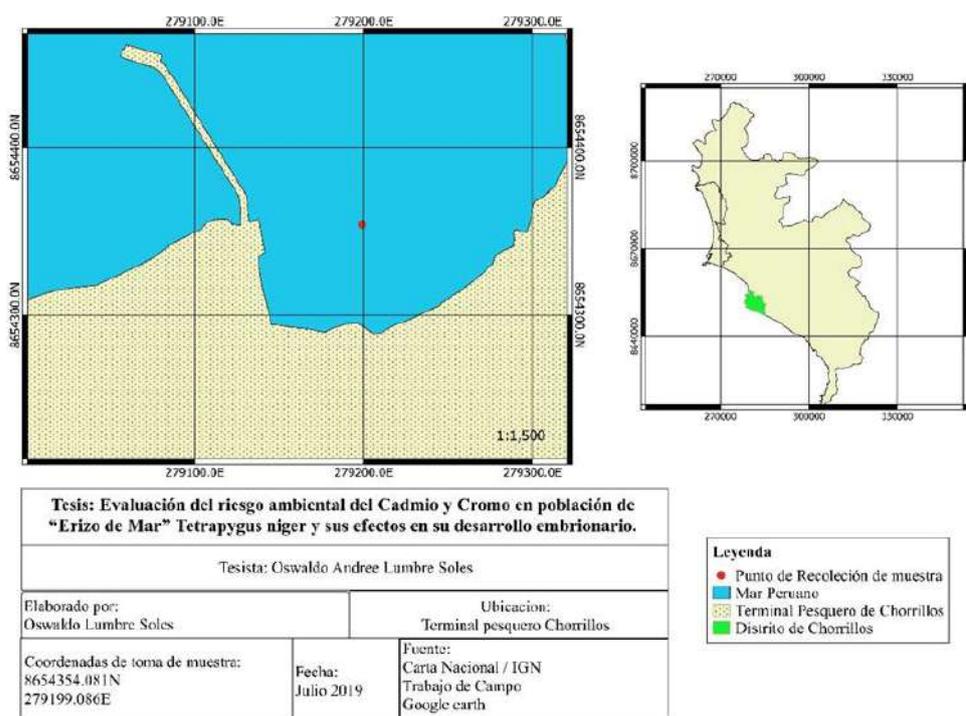


Figura 1. Punto de recolección del "erizo negro" *T. niger*. Fuente: Elaboración propia

Materiales y equipos

Los materiales y equipos utilizados en la investigación se describen en la Tabla 3, los cuales se dividen según su tipo: organismos biológicos, materiales de vidrio, equipos de laboratorio y materiales químicos.

Tabla 3

Materiales empleados en el experimento

Tipos de Materiales y Equipos	Elementos	Descripción	Cantidad
Organismos Biológicos	Erizos de mar	Especímenes en estadio Maduro	30 especímenes
	Matraz	1000 ml de capacidad	1 matraz
Materiales de Vidrio	Laminas cubre objetos	25 mm x 25 mm	3 paquetes
	Lamina base	75 mm x25 mm	3 paquetes
Equipos de Laboratorio	Microscopio binocular	Marca Primo Star	1 microscopio
	Micropipeta	100 - 1000 µl	1 micropipeta
	pH-metro	Marca Hanna	1 pH-metro
	Termómetro		2 termómetros
Materiales Químicos (Sales)	NaF	Fluoruro sódico	Tabla 4
	SrCl ₂ -6H ₂ O	Cloruro de estroncio	
	Na ₂ B ₄ O ₇ -10H ₂ O	Borato de sodio	
	KBr	Bromuro de potasio	
	KCl	Cloruro de potasio	
	CaCl ₂ -2H ₂ O	Cloruro de calcio dihidratado	
	Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio	
	MgCl ₂ -6H ₂ O	Cloruro de magnesio hexahidratado	
	NaCl	Cloruro de sodio	
	NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio	
CdCl ₂	Cloruro de cadmio		
K ₂ Cr ₂ O ₇	Dicromato de potasio		

Fuente: Elaboración propia.

2.3. Descripción del experimento

Flujograma de la investigación

La Figura 2 muestra el flujograma de la investigación que describe los pasos seguidos en la investigación.

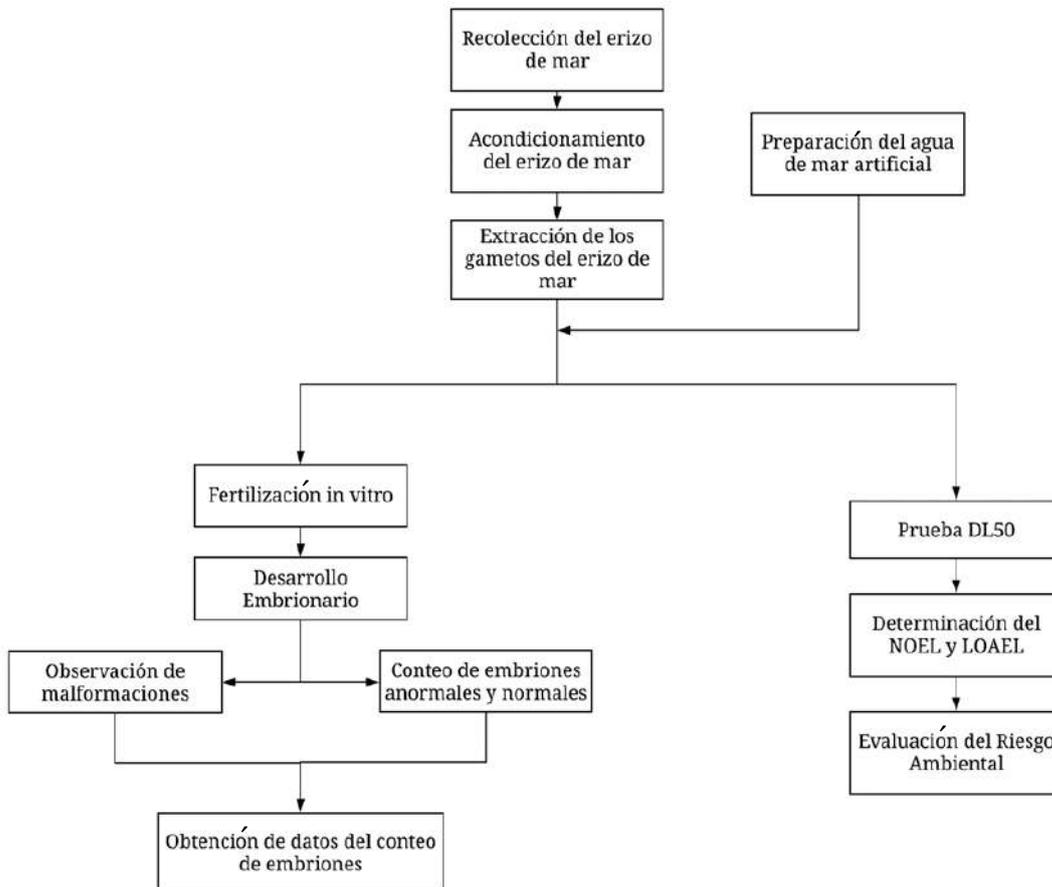


Figura 2. Flujograma de la investigación. Fuente: Elaboración propia

Recolección del erizo de mar

Con equipos de buceo se procedió a la captura de ejemplares de erizos *T. niger*, en forma aleatoria, localizados a profundidades de hasta 5 metros bajo el nivel mar. Los erizos capturados fueron alojados temporalmente en un cooler, manteniendo una temperatura promedio de 18 °C.

Habilitación del erizo de mar

En el laboratorio de microbiología y biotecnología de la UCSS-FIA; se depositaron los erizos recolectados en una pecera de medidas 50 cm x 35 cm x 40 cm, la misma que se llenó con agua de mar hasta el 80 % de su capacidad, después de esto se procedió a colocar oxigenadores, los cuales se conectaron a una bomba de membrana tal como se observa en la Figura 3. Seguidamente, se retiraron los erizos del cooler y se depositaron en la pecera ya habilitada para su uso posterior en el experimento; por último, se midió la temperatura del agua que indicaba $19 \pm 1,0$ °C.



Figura 3. Habilitación del erizo de mar. *Fuente:* Elaboración propia.

Preparación del agua de mar sintética

El agua sintética se preparó en el laboratorio de microbiología y biotecnología de la UCSS-FIA en un matraz de un 1 litro, para ello se usó de base agua destilada y se le añadieron las diferentes sales previamente pesadas en una balanza de precisión (Tabla 4) y adicionadas de manera ordenada, siendo luego homogenizadas y esterilizadas mediante la autoclave de acuerdo con lo expuesto por (Lorenzo *et al.*, 2002). Al terminar el proceso anterior se midió el pH que indicó un resultado de 7,9.

Tabla 4

Composición del agua de mar sintética

Sales	Cantidad (g.l ⁻¹)	Variables	
NaF	0,003	pH	8 ± 0,1
SrCl ₂ -6H ₂ O	0,024	Salinidad (ppt)	34 ± 0,3
Na ₂ B ₄ O ₇ -10H ₂ O	0,0475		
KBr	0,1		
KCl	0,7		
CaCl ₂ -2H ₂ O	1,47		
Na ₂ SO ₄	4		
MgCl ₂ -6H ₂ O	10,78		
NaCl	24,5		
NaHCO ₃	0,2		
CdCl ₂ *	0,1		
K ₂ Cr ₂ O ₇ *	0,005		

*Se usarán para las soluciones contaminadas *Fuente:* Elaboración Propia

El agua de mar sintética preparada fue dividida en tres partes; la primera para el control del experimento, a la segunda se le agregó cloruro de cadmio y al último dicromato de potasio en diferentes proporciones (Tabla 7) de acuerdo con lo expuesto por (Kobayashi y Okamura, 2005). Para la determinación de la proporción de sales de metales pesados se tomó en consideración los resultados obtenidos en los muestreos realizados por el Gobierno Regional del Callao (2013); además, otras investigaciones como la de Sánchez *et al.* (2008) y Cerna *et al.* (2013), las cuales resumen el valor promedio para el cadmio (Tabla 5) y para el cromo (Tabla 6). Ya aplicando estas concentraciones (Tabla 7) se realizó la comprobación usando el pHotoFlex Turb de la marca WTW con las pruebas de concentración de Cd y Cr, para luego congelar las soluciones a ser usadas al comienzo de las pruebas de toxicidad y desarrollo embrionario.

Tabla 5

Concentraciones promedias de cadmio expresadas en mg.l⁻¹

Fuente	Concentración del Cd mg.l ⁻¹	Año
--------	---	-----

Sánchez, Orozco, y Guzmán	3,34	2002
Gobierno Regional del Callao	5,14	2013

Fuente: Elaboración Propia.

Tabla 6

Concentraciones promedias de cromo expresados en mg.l⁻¹

Fuente	Concentraciones del Cr mg.l ⁻¹				Año
	Enero	Marzo	Mayo	Promedio	
Cerna y López	0,072	0,070	0,060	0,067	2011

Fuente: Elaboración Propia.

Tabla 7

Concentraciones de las sales de Cd y Cr propuestas para la prueba de desarrollo embrionario

Disoluciones	Concentraciones de Cd mg.l ⁻¹	Disoluciones	Concentraciones de Cr mg.l ⁻¹
1	10	1	0,5
1/2	5	1/5	0,1
1/10	1	1/10	0,05
1/20	0.5	1/50	0,01

Fuente: Elaboración Propia.

Extracción de los gametos del erizo de mar

En la Figura 4, se observa la obtención de los gametos mediante el método descrito por Kobayashi (1990). En este caso, se introdujo 0,5 ml de KCl de 0,5 M en la parte cava del erizo del mar para inducir la liberación de los gametos; seguidamente se colocó a cada ejemplar boca abajo sobre la superficie de una placa Petri a la espera de que arroje una secreción rojiza, se procedió a la recolección de los óvulos, los mismos que fueron lavados repetidamente con agua de mar estéril para eliminar las impurezas que interfieren con su fecundación; en cambio, si arrojó una secreción blanca se consideró como masa espermática conservándose sin ningún tipo de lavado.



Figura 4. Extracción de gametos de erizo de mar. Fuente: Elaboración Propia.

Prueba de toxicidad aguda

La prueba de toxicidad aguda se realizó con cinco concentraciones tóxicas del metal pesado Cd y Cr (Tabla 8 y Figura 5). Para el cadmio se siguió el procedimiento expuesto por Fernández (2012) y para el metal cromo según lo indicado por Pagano *et al.* (1983), el cual detalla una concentración media de este metal a 10^{-5} M ($519,9 \mu\text{g. l}^{-1}$), donde ya se observan problemas reproductivos.

Tabla 8

Concentraciones Prueba DL_{50}

Cd	Cr
$\mu\text{g. l}^{-1}$	$\mu\text{g. l}^{-1}$
2000	31,23
4000	62,5
8000	125
16000	250
32000	500

Fuente: Elaboración Propia.

Las condiciones para el desarrollo de la prueba DL_{50} fueron de $18 \pm 2,0$ °C de temperatura ambiental. Para realizar la prueba se emplearon viales de 20 ml de capacidad, en los que se

depositó la solución contaminada, 1 ml de una suspensión de óvulos y 10 μ l de masa espermática. Se consideró como criterio de validez del bioensayo un 75 % de fertilización, el cual se evaluó transcurrido 90 min; por lo que sí es validado, se le agrego 0,5 ml de formalina a cada tubo para conservar el material para una lectura posterior. Se realizaron tomas fotográficas.

Para la evaluación del porcentaje de fertilización se transfirió una alícuota de cada vial de prueba a una lámina para ser observada mediante un microscopio binocular. Se contabilizaron un total de 100 huevos por vial, separándolos en fertilizados y no fertilizados, cuyo criterio para diferenciarlos fue la ausencia de la membrana fertilizadora.



Figura 5. Prueba de toxicidad aguda. Fuente: Elaboración propia.

Fertilización *in vitro*

Este procedimiento se realizó según lo expuesto por Olaechea *et al.* (2006), para ello se preparó una suspensión patrón agregando una gota de masa espermática a 10 ml de agua de mar sintética anteriormente preparada; por otro lado, en una cubeta de vidrio se colocó 2 ml de la suspensión de ovocitos, a la que se le agrego 0,1 ml de la suspensión patrón de espermatozoides y se diluyó hasta 150 ml con agua de mar sintética. Todo esto a una temperatura de 18 ± 2 °C para lograr así un rango óptimo de fertilización de los ovocitos.

Evaluación del desarrollo embrionario expuesto a las soluciones contaminadas

Diez minutos después de la fertilización *in vitro* se extrajo 1,0 ml de esta, la cual tiene aproximadamente 500 embriones.ml⁻¹ para ser depositada en una de las soluciones contaminadas y así se repitió con cada vial, para luego ser llevado al sistema de desarrollo (Pagano, *et al.*, 1993). Toda esta etapa se realizó a 18 ± 2 °C. Cada cuatro horas se realizó los conteos de los embriones en sus distintas etapas buscando alteraciones en la morfología, comenzando luego de la observación de la primera escisión a las dos horas, luego a las 18 horas, hasta el lapso de 48 horas con el intervalo indicado. Se ejecutó las observaciones mediante el uso del microscopio colocando en una lámina con bordes de parafina una alícuota, cubriéndola con una laminilla contando un total de 300 embriones por tratamiento (Kobayashi, 1990). Se efectuaron tomas fotográficas de los diferentes estadios.

Sistema de desarrollo embrionario

En esta etapa se procedió a colocar los viales ya rotulados en una gradilla. Luego se introdujeron aireadores dentro de los viales, a los cuales se les reguló la presión de manera manual, para ser conectados a una bomba de membrana, y así poder lograr que los embriones se encuentren en movimiento dentro de la solución contaminante y evitar su sedimentación en el fondo, para evitar un aplastamiento entre ellos que dificulte su desarrollo (Figura 6). Para tener una mayor seguridad se realizó un sistema por contaminante.

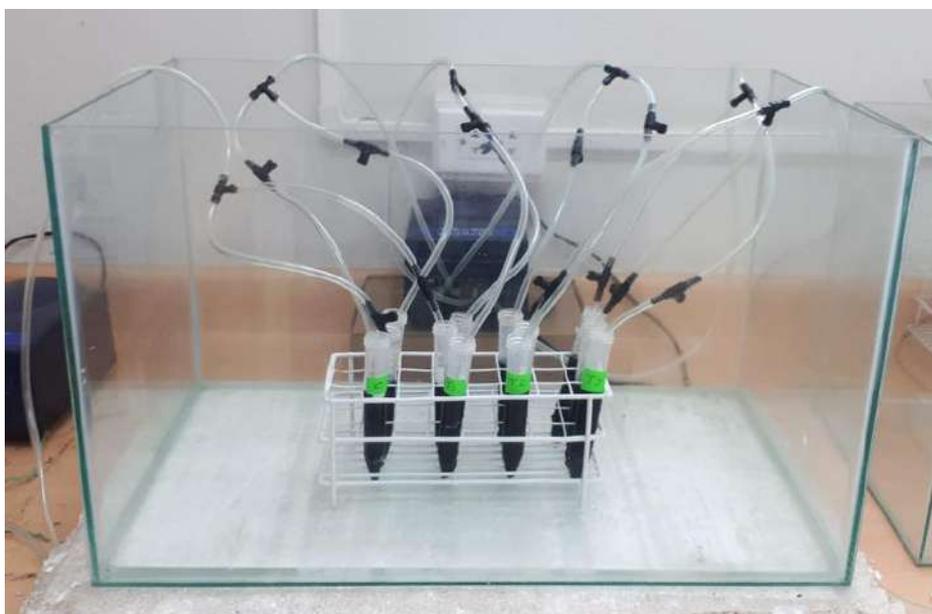


Figura 6. Sistema de desarrollo embrionario. Fuente: Elaboración propia.

Evaluación del Riesgo Ambiental o Ecológico

Para determinar el riesgo ecológico calculado (RQ) se siguió la metodología propuesta por Paredes (2016); quien explica que este riesgo es dado por el cociente de la concentración de exposición esperada (CEE) y la concentración que no causa efectos sobre los organismos (NEC).

Para establecer la CEE se asumió el valor de los estándares nacionales para el cadmio y cromo en agua, siendo para cadmio de 0,0088 mg.l⁻¹ y para cromo 0,05 mg.l⁻¹, según lo establecido por el Decreto Supremo N° 004-2017, categoría 4, Conservación del Ambiente Acuático; sub grupo E3, Ecosistemas costeros marino. (Ministerio del Ambiente [MINAM], 2017).

El valor de la NEC se obtuvo con el valor de la menor toxicidad aguda (CE₅₀ o CL₅₀), dividido sobre un factor de seguridad o de aplicación. Este factor de seguridad puede ser 10, 100 o 1000, el cual es inversamente proporcional a la cantidad y calidad de datos de toxicidad que se disponga; para el presente estudio se determinó usar el factor de 10. Para hallar el riesgo ambiental se usaron las fórmulas detalladas por Paredes (2016):

$$NEC = \frac{\text{Menor NOEC o CE50}}{\text{Factor}}$$

$$RQ = \frac{CEE}{NEC}$$

Donde:

Menor NOEC o CE50: Menor toxicidad aguda

NEC: Concentración que no causa efectos sobre los organismos

RQ: Riesgo Ecológico

CEE: Concentración de exposición esperada

La interpretación de los resultados del Riesgo ecológico (RQ) que se obtendrán en el experimento se hará de acuerdo con lo citado por Paredes (2016) y detallado en la Tabla 9.

Tabla 9

Interpretación de resultados para determinar el riesgo ecológico

Interpretación de resultados para determinar el Riesgo Ecológico (RQ)		
RQ < 1	Incluir otras pruebas ecotoxicológicas	Hay un riesgo Ecológico bajo para el ecosistema
RQ = 1	Redefinir la CEE	Hay un riesgo Ecológico medio para el ecosistema
RQ > 1	Reducir o tratar el estresor	Hay un riesgo Ecológico alto para el ecosistema

Fuente: (Paredes, 2016)

2.4. Tratamientos

En la Tabla 10 se describen los tratamientos de la prueba de DL₅₀. Para el Cd, se usó como primer tratamiento la concentración de 2000 µg.l⁻¹ de Cd más 1 ml de la suspensión de óvulos (S.O.), se adiciono 10 µl de masa espermática (M.E.), y se agregó agua de mar sintética (A.M.S.); para los demás tratamientos se siguió el mismo orden y concentraciones del principal solo variando las concentraciones del metal pesado Cd.

Para el Cr, se usó como primer tratamiento 500 µg.l⁻¹ de Cr más 1 ml de la suspensión de óvulos, adicionalmente 10 µl de masa espermática y agua de mar sintética; se repitió el tratamiento 4 veces, solo variando la concentración del metal pesado en cada tratamiento. Para el tratamiento control se usó agua de mar sintética sin metales pesados con 1,0 ml de suspensión de óvulos y 10 µl de masa espermática más agua de mar sintética.

Tabla 10

Tratamientos de cadmio y cromo para prueba de DL₅₀ (A.M.S: Agua de mar sintética, S.O: Suspensión de óvulos, M.E: Masa espermática)

Cd		Cr	
T1A	2000 µg.l ⁻¹ Cd+1ml de S.O+ 10 µl de M.E+ A.M.S	T1B	31,23 µg.l ⁻¹ Cr+1ml de S.O+ 10 µl de M.E+ A.M.S
T2A	4000 µg.l ⁻¹ Cd+1ml de S.O+ 10 µl de M.E+ A.M.S	T2B	62,5 µg.l ⁻¹ Cr +1ml de S.O+ 10 µl de M.E+ A.M.S
T3A	8000 µg.l ⁻¹ Cd+1ml de S.O+ 10 µl de M.E+ A.M.S	T3B	125 µg.l ⁻¹ Cr+1ml de S.O+ 10 µl de M.E+ A.M.S
T4A	16000 µg.l ⁻¹ Cd+1ml de S.O+ 10 µl de M.E+ A.M.S	T4B	250 µg.l ⁻¹ Cr+1ml de S.O+ 10 µl de M.E+ A.M.S
T5A	32000 µg.l ⁻¹ Cd+1ml de S.O+ 10 µl de M.E+ A.M.S	T5A	500 µg.l ⁻¹ Cr+1ml de S.O+ 10 µl de M.E+ A.M.S
TC	A.M.S. +1ml de suspensión de óvulos+ 10 µl de masa espermática		

Fuente: Elaboración propia.

Para la prueba de desarrollo embrionario con el metal pesado Cd se usó como primer tratamiento 10 mg.l⁻¹ Cd más 1,0 ml de embriones de *T. niger* (E.T.N.) y agua de mar sintética, se repitió de igual manera en los siguientes tratamientos con la única variación de la concentración del metal pesado (Tabla 11). Para el Cr se usó como primer tratamiento 0,5 mg.l⁻¹ Cr, adicionando 1,0 ml de embriones de *T. niger* y agua de mar sintética, se repitió 3 veces más, con la única variación de la concentración del metal pesado. Para el tratamiento control se usó agua de mar sintética sin metales pesados más 1,0 ml de embriones con 10 µl de masa espermática más agua de mar sintética.

Tabla 11

Tratamientos de cadmio y cromo para el desarrollo embrionario (E.T.N.: Embriones de T.niger, A.M.S: Agua de mar sintética)

Cd		Cr	
T1A	10 mg.l ⁻¹ Cd+ 1ml E.T.N+ A.M.S	T1B	0,5 mg.l ⁻¹ Cr+ 1ml E.T.N+ A.M.S
T2A	5 mg.l ⁻¹ Cd+ 1ml E.T.N+ A.M.S	T2B	0,1 mg.l ⁻¹ Cr+ 1ml E.T.N+ A.M.S
T3A	1 mg.l ⁻¹ Cd+ 1ml E.T.N+ A.M.S	T3B	0,05 mg.l ⁻¹ Cr+ 1ml E.T.N+ A.M.S
T4A	0,5 mg.l ⁻¹ Cd+ 1ml E.T.N+ A.M.S	T4B	0,01 mg.l ⁻¹ Cr+ 1ml E.T.N+ A.M.S
TC	A.M.S.+ 1ml embriones		

Fuente: Elaboración propia

2.5. Unidades experimentales

Se trabajó con un total de 24 unidades experimentales más un control para la prueba de desarrollo embrionario; los cuales consistieron en 4 tratamientos por metal y 3 réplicas por tratamiento. Para la prueba de DL₅₀ se trabajó con un total de 30 unidades experimentales y un control; 5 tratamientos por metal y 3 réplicas.

Identificación de variables y su mensuración

En la Tabla 12 se muestran las variables, independientes y dependientes; indicando sus dimensiones y mensuración. Para medir las variables “Desarrollo Embrionario” y “Embriones de Erizo de mar”, se realizó por el método de conteo, por observación al microscopio de las diferentes etapas de desarrollo y la presencia de malformaciones; solo en el caso de la variable “Riesgo Ambiental”, el resultado se obtuvo utilizando las fórmulas matemáticas determinadas en base del DL₅₀.

Tabla 12

Variables independientes y dependientes

	Variables	Dimensiones	Mensuración
Variables Independiente	Metal pesado de Cd y Cr	Concentraciones de los metales pesados Cd y Cr	mg.l ⁻¹
	Riesgo Ambiental (RQ)	DL ₅₀ /CEE	Und. de RQ % de malformaciones y las diferentes etapas del desarrollo embrionario
Variables Dependientes	Desarrollo Embrionario	Periodos de evaluación	

Fuente: Elaboración propia

Para poder obtener una concentración exacta del metal pesado Cd y Cr, se usó el fotómetro pHotoFlex Turb. En el caso del cadmio, se vertió 5,0 ml en el vial de ensayo marca WTW el cual contenía reactivos en su interior, para lo cual se mezcló y se agregó 0,20 ml de Cd-1K con una pipeta, se mezcló otra vez, se adicionó un nivel de microcuchara verde de Cd-2K y se cerró para agitarlo de manera continua. La mezcla reposó por dos minutos y se insertó dentro del pHotoFlex Turb para obtener la concentración expresada en mg.l⁻¹.

En el caso del Cr, se agregó seis gotas de Cr-3K en el vial de ensayo marca WTW el cual contenía reactivos, se agitó y se dejó reposar por un minuto. Luego se agregaron 5,0 ml de la muestra de Cr al mismo vial, se mezcló y se dejó reposar durante un minuto para luego insertarlo dentro del pHotoFlex Turb y de esta manera obtener la concentración expresada en mg.l^{-1} .

Al haberse llevado a cabo la prueba en un ambiente controlado, se realizó la medida de todos los parámetros inmersos en él. El potencial de hidrógeno del agua de mar sintética preparada para la prueba de desarrollo embrionario fue medida mediante el pHotoFlex Turb, al cual se le conectó la sonda correspondiente, obteniendo como resultado un pH de 7,9. Así mismo, se determinó la temperatura del agua donde se encontraban los erizos mediante la sumersión de un termómetro analógico, siendo esta de $19 \pm 1,0$ °C, y la temperatura interior del laboratorio mediante un termómetro con sensor, la cual fue de 18 ± 2 °C; dichos parámetros de temperatura se usaron en ambas variables, independientes y dependientes.

2.6. Diseño estadístico

Para el desarrollo del estudio se realizó un diseño estadístico completamente aleatorizado (DCA) de efectos fijos, el cual consiste en un diseño factorial de $2 \times 5 \times 3 + \text{control}$; dicho diseño fue seleccionado debido a que se usaron dos metales pesados, cinco dosis diferentes, tres repeticiones y un control. Para la prueba de toxicidad aguda se aplicó el modelo Probit 50.

2.7. Análisis estadístico de datos

Los datos obtenidos fueron transferidos al programa SPSS para analizar las diferencias significativas entre los tratamientos y horas de evaluación mediante ANOVA; así mismo se realizó la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey para las diferentes fases del desarrollo embrionario en cada tratamiento y a diferentes tiempos.

CAPITULO III: RESULTADOS

3.1. Prueba de toxicidad aguda

3.1.1. Cadmio

Se determinó el efecto del Cd en la fertilización Tabla 13 y Figura 7. Encontrando que para la concentración más baja de 2 mg.l⁻¹, solo un 82,00 % llegó a ser fecundado y el 18,00 % no fue fecundado. Para la concentración de 4 mg.l⁻¹, solo un 79,67 % pudo ser fecundado y el 20,33 % no fue fecundado, y para la última concentración de 32 mg.l⁻¹, un 48,00 % de los ovocitos fueron fecundados mientras que un 52,00 % no fueron fecundados.

Tabla 13

Porcentaje de inhibición del Cd

Concentración (mg.l ⁻¹)	Fecundado (%) (n)	No fecundado (%) (n)
Control	76,00 (228)	24,00 (72)
2,00	82,00 (246)	18,00 (54)
4,00	79,67 (239)	20,33 (61)
8,00	74,33 (223)	25,67 (77)
16,00	64,00 (192)	36,00 (108)
32,00	48,00 (144)	52,00 (156)

Fuente: Elaboración propia

Los resultados demuestran que el incremento de las concentraciones de Cd causa una disminución en la tasa de fertilidad. Al realizar el análisis PROBIT (Tabla 14 y 15; Figura 8) se estimó que el valor estimado del DL₅₀ es 41,77 mg.l⁻¹, siendo su valor inferior de 31,81 mg.l⁻¹ y su valor superior de 71,81 mg.l⁻¹.

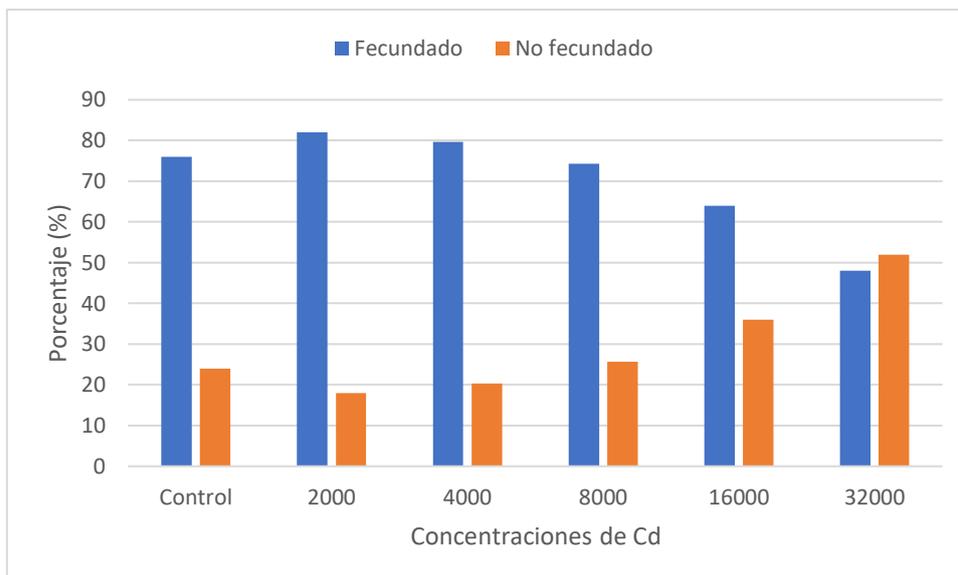


Figura 7. Porcentaje de inhibición para el metal pesado cadmio. Fuente: Elaboración Propia

Tabla 14

Contraste de chi-cuadrado de la prueba DL_{50} para el Cd

		Contrastes de chi-cuadrado		
		Chi-cuadrado	Gl	Significancia
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	14,676	12	0,260

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 15

Resultado del efecto del Cd en la inhibición en la prueba DL_{50} expresado en $mg.l^{-1}$

		Concentración	
PROBIT	Estimación	Límite inferior	Límite superior
0,250	17,529	8,602	23,535
0,500	41,770	31,875	71,814
0,750	99,536	61,914	418,025

Fuente: Elaboración propia

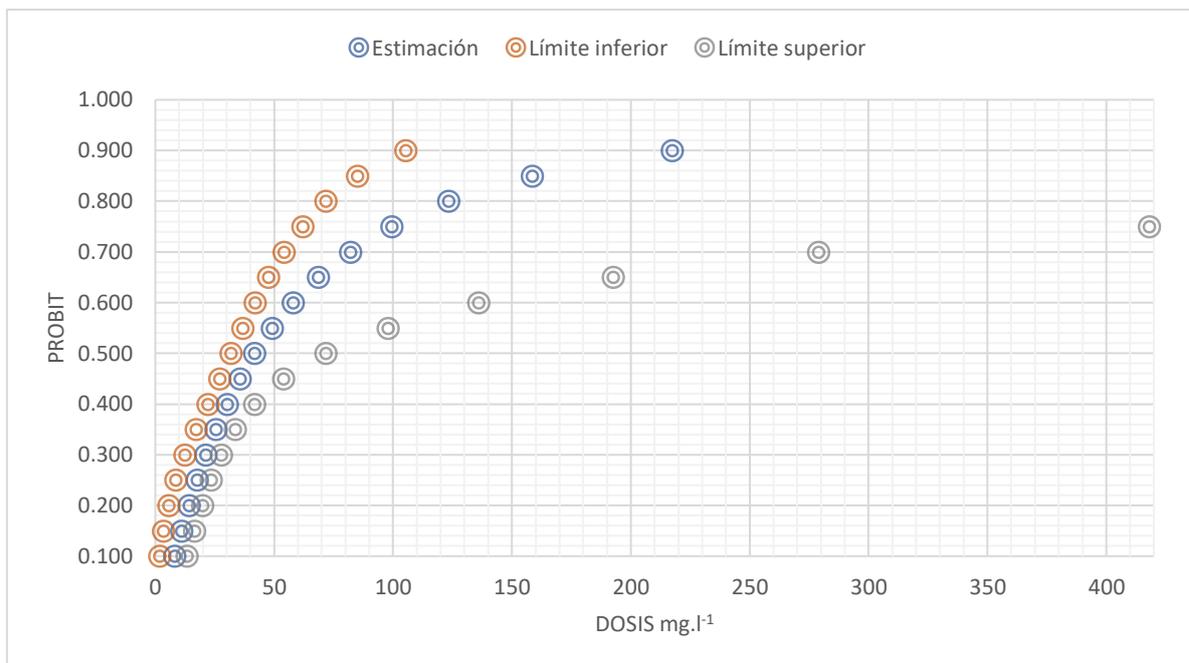


Figura 8 . Probit vs Dosis para el metal pesado cadmio. Fuente: Elaboración Propia.

3.1.2. Cromo

El cálculo de inhibición del Cr es expresado en la Tabla 16 y Figura 9. Al realizar la lectura de los tratamientos, se encontró que en la concentración más baja de 0,0312 mg.l⁻¹ solo un 84,00 % de ovocitos llegó a ser fecundado, quedando un 16,00 % sin fecundar. Para la concentración de 0.125 mg.l⁻¹, se observó que un 70,67 % ovocitos fueron fecundados mientras un 29,33 % no fueron fecundados. En la concentración más alta de 0,5 mg.l⁻¹, el 43,33 % de los ovocitos fueron fecundados mientras que un 56,67 % quedaron sin fecundar.

Obtenido esto, los resultados muestran que el incremento de las concentraciones de Cr causa una disminución marcada en la tasa de fertilidad, mostrando que el Cr presenta una mayor toxicidad en relación con el Cd. Al realizar el análisis PROBIT (Tabla 17, 18 y Figura 10) se determinó que el valor estimado del DL₅₀ es 0,443 mg.l⁻¹, su valor inferior es 0,222 mg.l⁻¹ y el superior es 0,715 mg.l⁻¹.

Tabla 16

Porcentaje de inhibición del Cr

Concentración (mg.l ⁻¹)	Fecundado (%) (n)	No fecundado (%) (n)
Control	76,00 (228)	24,00 (72)
0,031	84,00 (252)	16,00 (48)
0,062	82,00 (246)	18,00 (54)
0,125	70,67 (212)	29,33 (88)
0,250	54,33 (163)	45,67 (137)
0,500	43,33 (130)	56,67 (170)

Fuente: Elaboración propia.

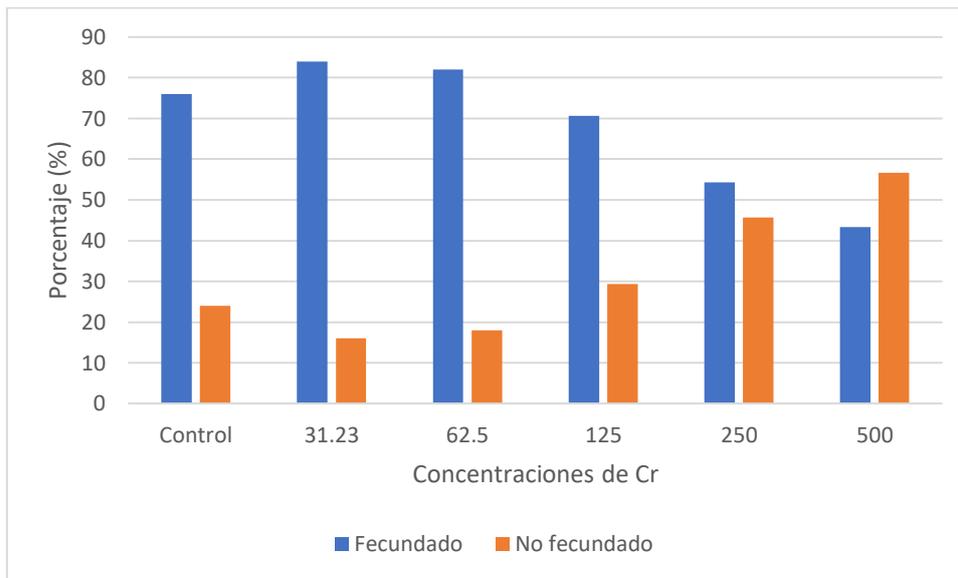


Figura 9. Porcentaje de inhibición para el metal pesado cromo. Fuente: Elaboración Propia

Tabla 17

Contraste de chi-cuadrado de la prueba DL₅₀ para el Cr

Contrastes de chi-cuadrado		Chi-cuadrado	gl	Significancia
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	32,478	12	0,001

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 18

Resultado del efecto del Cr en la inhibición en la prueba DL_{50} expresado en $mg.l^{-1}$

PROBIT	Concentración		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior
0,250	0,156	0,012	0,278
0,500	0,443	0,222	0,715
0,750	1,255	0,761	9,237

Fuente: Elaboración propia.

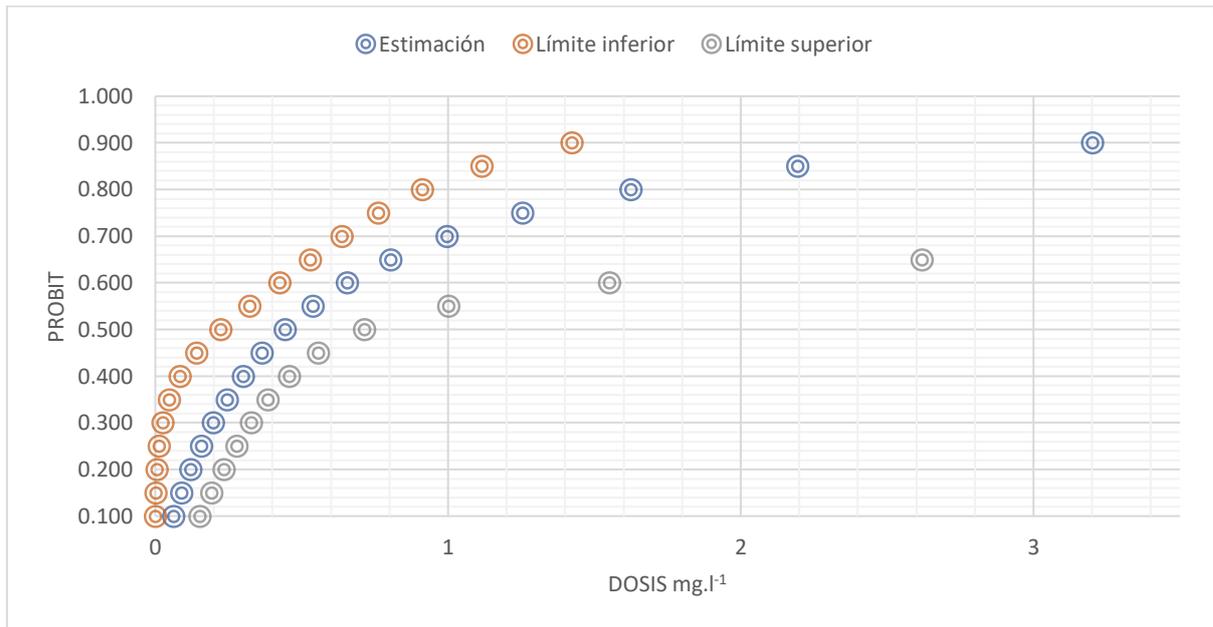


Figura 10. Probit vs Dosis para el metal pesado Cromo. Fuente: Elaboración Propia.

3.2. Evaluación del riesgo ambiental

3.2.1. Cadmio

Obtenidos los resultados de la prueba de DL_{50} se realizaron los cálculos para evaluar el riesgo ambiental (RQ), para lo cual, se estableció que el valor del NEC es de 3,1876; el cual se obtuvo dividiendo la menor toxicidad DL_{50} del cadmio ($31,876 mg.l^{-1}$) sobre el factor que es 10. El RQ se halló dividiendo el CEE entre el NEC obteniéndose como resultado 0,0027, este al ser menor a uno, nos indica un riesgo ecológico bajo para el ecosistema. Los resultados encontrados se detallan en la tabla 19.

Tabla 19

Evaluación del riesgo ambiental o ecológico del Cd

Metales Pesados	CL ₅₀ (mg.l ⁻¹)	Factor	NEC	CEE	RQ	Resultado
Cd	31,876	10	3,18760051	0,0088	0,0027607	Riesgo ecológico bajo para el ecosistema

Fuente: Elaboración propia.

3.2.2. Cromo

En el caso del cromo, se calculó que el valor del NEC es de 0,0222; el cual se determinó mediante el valor de la menor toxicidad aguda del cromo (0,2227 mg.l⁻¹) sobre el factor que se estableció con el valor de diez. Para determinar el RQ se dividió el CEE entre el NEC obteniéndose como resultado 2,24502, el cual al ser mayor a 1, bajo las condiciones de esta prueba, representa un riesgo ecológico alto para el ecosistema tal como se observa en la Tabla 20.

Tabla 20

Evaluación del riesgo ambiental o ecológico del Cr

Metales Pesados	CL ₅₀ (mg.l ⁻¹)	Factor	NEC	CEE	RQ	Resultado
Cr	0,222715	10	0,0222715	0,05	2,24502166	Riesgo ecológico alto para el ecosistema

Fuente: Elaboración propia.

3.3. Efectos de los metales pesados Cd y Cr en el desarrollo embrionario

3.3.1. Efectos del cadmio

En las Tablas 21, 22 y Figura 13 se observan los datos obtenidos en las diferentes fases de desarrollo embrionario del *T. niger*, en la Figura 11 se observan los estadios como las malformaciones. Para el Cd en las primeras 2 horas (h) con una concentración de 0,5 mg.l⁻¹, un 14,0 % de los embriones se encontraban en la fase de desarrollo celular (fecundación), 3,0 % en Mórula, 31,3 % en blástula, 19,7 % en gástrula, 4,0 % con malformaciones y 28,0 % muertos. Para la concentración de 1 mg.l⁻¹ un 5,3 % se encontraban en la fase de desarrollo celular, 3,3 % en Mórula, 32,2 % en blástula, 16,3 % en gástrula, 10,3 % con malformaciones

y 32,7 % muertos. Para la concentración de 5 mg.l⁻¹ 45,3 % de embriones se encontraban en fase de blástula, 3,7 % en gástrula, 15,7 % malformaciones y 35,3 % muertos, para la concentración de 10 mg.l⁻¹ 54,0 % se encontraban en fase de blástula, 6,7 % en gástrula, 3,3 % con malformaciones y 36,0 % muertos.

Transcurridas las 18 h, para la concentración de 0,5 mg.l⁻¹, 37,0 % se encontraban en fase de blástula, 17,3 % en gástrula, 7,7 % con malformaciones y 38,0 % muertos. Para la concentración de 1 mg.l⁻¹, 35,0 % se encontraban en fase de blástula, 12,0 % en gástrula, 19,7 % con malformaciones y 33,3 % muertos. Para la concentración de 5 mg.l⁻¹, 32,7 % se encontraban en fase de blástula, 10,0 % en gástrula, 9,0 % con malformaciones y 48,3 % muertos. Para la concentración de 10 mg.l⁻¹, 41,7 % se encontraban en fase de blástula, 5,7 % en gástrula, 8,0 % con malformaciones y 44,7 % muertos.

Después de las 22 h, en la concentración de 0,5 mg.l⁻¹, 25,7 % de los embriones se encontraban en fase de blástula, 35,0 % en gástrula, 8,3 % con malformaciones y 31,0 % muertos. Para la concentración de 1 mg.l⁻¹, 33,3 % se encontraban en fase de blástula, 18,0 % en gástrula, 13,7 % malformaciones y 35,0 % muertos. Para la concentración de 5 mg.l⁻¹ 37,3 % se encontraban en fase de blástula, 13,7 % en gástrula, 8,3 % con malformaciones y 40,7 % muertos, para la concentración de 10 mg.l⁻¹ 40,7 % se encontraban en fase de blástula, 9,3 % en gástrula, 4,7 % con malformaciones y 45,3 % muertos.

Pasadas las 28 h, en la concentración de 0,5 mg.l⁻¹ 19,0 % de los embriones se encontraban en fase de blástula, 34,0 % en gástrula, 12,3 % con malformaciones y 34,7 % muertos. Para la concentración de 1 mg.l⁻¹, 28,0 % se encontraban en fase de blástula, 21,3 % en gástrula, 12,7 % con malformaciones y 38,0 % muertos. Para la concentración de 5 mg.l⁻¹, 33,3 % se encontraban en fase de blástula, 17,0 % en gástrula, 6,7 % con malformaciones y 43,0 % muertos. Para la concentración de 10 mg.l⁻¹, 37,7 % se encontraban en fase de blástula, 12,3 % en gástrula, 3,0 % con malformaciones y 47,0 % muertos.

A las 48 h, se registró en la concentración de $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$, 13,3 % se encontraban en fase de blástula, 38,7 % en gástrula, 5,7 % con malformaciones y 42,3 % muertos. Para la concentración de 1 mg.l^{-1} 17,0 % se encontraban en fase de blástula, 25,0 % en gástrula, 11,7 % malformaciones y 46,3 % muertos. Para la concentración de 5 mg.l^{-1} , 19,7 % se encontraban en fase de blástula, 23,0 % en gástrula, 9,0 % con malformaciones y 48,3 % muertos. Para la concentración de 10 mg.l^{-1} 30,3 % se encontraban en fase de blástula, 13,0 % en gástrula, 4,7 % con malformaciones y 52,0 % muertos.

Al realizar el ANOVA a los tratamientos y horas de evaluación como factores fijos. Se encontraron que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) para las diferentes fases de desarrollo embrionario, de igual modo para las malformaciones y mortalidad (Apéndice 5).

Al realizar la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey para las diferentes fases de desarrollo embrionario en cada tratamiento mostraron en todas ellas diferencias significativas ($p < 0,05$), de igual forma ocurrió en la mortalidad de los embriones ($p < 0,05$) (Apéndice 5).

Al aplicar la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey para las diferentes fases de desarrollo embrionario evaluadas a diferentes tiempos muestran todas ellas diferencias significativas ($p < 0,05$) al igual que la mortalidad ($p < 0,05$), excepto en la fase Gástrula (22 h) y las malformaciones encontradas (22, 28 y 48 h) ($p > 0,05$) (Apéndice 5).

3.3.2. Efectos del cromo

En las Tablas 21, 22 y Figuras 12 se observan los datos obtenidos en las diferentes fases del desarrollo embrionario, en la Figura 11 se observan los estadios como las malformaciones. Para el Cr en las primeras 2 horas (h) a una concentración de $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$, 7,7 % se encontraban en la fase de desarrollo celular (fecundación), 1,7 % en Mórula, 36,3 % en blástula, 26,7 % en gástrula, 4,7 % con malformaciones y 23,0 % muertos. Para una

concentración de 0,05 mg.l⁻¹, un 15,0 % se encontraban en la fase de desarrollo celular, 3,0 % en Mórula, 28,3 % en blástula, 11,0% en gástrula, 18,7 % con malformaciones y 24,0 % muertos. A una concentración de 0,1 mg.l⁻¹ un 11,7 % se encontraban en la fase de desarrollo celular, 0,7 % en Mórula, 39,3 % en blástula, 5,0 % en gástrula, 17,3 % con malformaciones y 40,7 % muertos. Para la concentración de 0,5 mg.l⁻¹, un 1,3 % se encontraban en la fase de desarrollo celular, 5,3 % en mórula, 45,7 % en blástula, 4,3 % en gástrula, 2,7 % con malformaciones y 40,7 % muertos.

A las 18 h, en la concentración de 0,01 mg.l⁻¹, un 32,0 % de los embriones estaba en fase blástula, 27,0 % en gástrula, 9.0 % con malformaciones y 32 % muertos. Para la concentración de 0,05 mg.l⁻¹, un 27,3 % se encontraba en la fase blástula, 24,0 % en gástrula, 10,3 % con malformaciones y 38,00 % muertos. Para la concentración de 0,1 mg.l⁻¹, 2,0 % se encontraba en Mórula, 33.3 % en blástula, 9,7 % en gástrula, 13,3 % con malformaciones y 41,7 % muertos. Para la concentración de 0,5 mg.l⁻¹, en este tratamiento solo se hallaron un 100 % de embriones muertos, este porcentaje se continuo encontrando hasta el cierre del experimento.

Después de las 22 h, en la concentración de 0,5 mg.l⁻¹, 25,7 % de los embriones se encontraban en fase de blástula, 35,0 % en gástrula, 8,3 % con malformaciones y 31,0 % muertos. Para la concentración de 1 mg.l⁻¹, 33,3 % se encontraban en fase de blástula, 18,0% en gástrula, 13,7 % malformaciones y 35,0 % muertos. Para la concentración de 5 mg.l⁻¹ 37,3 % se encontraban en fase de blástula, 13,7 % en gástrula, 8,3 % con malformaciones y 40,7 % muertos, para la concentración de 10 mg.l⁻¹ 40,7 % se encontraban en fase de blástula, 9,3 % en gástrula, 4,7 % con malformaciones y 45,3 % muertos.

Pasadas las 28 h, en la concentración de 0,5 mg.l⁻¹ 19,0 % de los embriones se encontraban en fase de blástula, 34,0 % en gástrula, 12,3 % con malformaciones y 34,7 % muertos. Para la concentración de 1 mg.l⁻¹, 28,0 % se encontraban en fase de blástula, 21,3 % en gástrula, 12,7 % con malformaciones y 38,0 % muertos. Para la concentración de 5 mg.l⁻¹, 33,3 % se encontraban en fase de blástula, 17,0 % en gástrula, 6,7 % con malformaciones y 43,0 %

mueritos. Para la concentración de 10 mg.l⁻¹, 37,7 % se encontraban en fase de bástula, 12,3.% en gástrula, 3,0 % con malformaciones y 47,0 % mueritos.

Al cabo de 42 h, en la concentración de 0,5 mg.l⁻¹, 17,0 % de los embriones se encontraban en fase de bástula, 35,7 % en gástrula, 9,0 % con malformaciones y 38,3 % mueritos. Para la concentración de 1 mg.l⁻¹ 20,0 % se encontraban en fase de bástula, 26,3 % en gástrula, 10,0 % con malformaciones y 43,0 % mueritos. Para la concentración de 5 mg.l⁻¹ 23,7 % se encontraban en fase de bástula, 20,7 % en gástrula, 8,3 % con malformaciones y 47,3 % mueritos, para la concentración de 10 mg.l⁻¹ 35,0 % se encontraban en fase de bástula, 11,0 % en gástrula, 4,0 % con malformaciones y 55,0 % mueritos.

A las 48 h, se registró en la concentración de 0,01 mg.l⁻¹ un 3,3 % de embriones estaba en fase blástula, 34,7 % en gástrula, 10,7 % con malformaciones y 51,3 % mueritos. Para la concentración de 0,05 mg.l⁻¹ un 7,0 % se encontraba en la fase blástula, 15,0 % en gástrula, 18,0 % con malformaciones y 54,7 % mueritos. Para la concentración de 0,1 mg.l⁻¹, 10,3 % se encontraban en la fase blástula, 10,7 % en gástrula, 18,0 % malformaciones y 61,0 % mueritos, para la concentración de 0,5 mg.l⁻¹ el 100 % de embriones estaban mueritos.

los resultados del ANOVA realizados a los tratamientos y horas de evaluación como factores fijos mostraron que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) para las fases de Mórula, blástula, gástrula, así como para el número de malformaciones y mueritos (Apéndice 4).

la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey para las diferentes fases de desarrollo embrionario en cada tratamiento mostraron en todas ellas diferencias significativas ($p < 0,05$). Asimismo, la evaluación realizada a la mortalidad de embriones mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) en todos los tratamientos (Apéndice 4).

los resultados de las comparaciones múltiples de Tukey para las diferentes fases de desarrollo embrionario evaluado a diferentes tiempos mostraron todas ellas diferencias

significativas ($p < 0,05$), al igual que la mortalidad ($p < 0,05$), excepto la fase Gástrula (18, 28, 48 h) y las malformaciones (2, 18, 22, 42 y 48 h) ($p > 0,05$) (Apéndice 4).

Tabla 21

Resultados del desarrollo embrionario del T. niger hasta las 22 h expresado en porcentajes

Metales	Concentración (mg.l ⁻¹)	2h						18h						22h			
		Desarrollo celular	Mórula	Blástula	Gástrula	Mal formaciones	Muertos	Mórula	Blástula	Gástrula	Mal formaciones	Muertos	Blástula	Gástrula	Mal formaciones	Muertos	
Cr	0,01	7,7	1,7	36,3	26,7	4,7	23,0	0,0	32,0	27,0	9,0	32,0	15,3	27,3	16,7	40,7	
	0,05	15,0	3,0	28,3	11,0	18,7	24,0	0,0	27,7	24,0	10,3	38,0	21,0	19,0	14,0	46,0	
	0,1	11,7	0,7	39,3	5,0	17,3	26,0	2,0	33,3	9,7	13,3	41,7	33,0	7,7	11,0	48,3	
	0,5	1,3	5,3	45,7	4,3	2,7	40,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Cd	0,5	14,0	3,0	31,3	19,7	4,0	28,0	0,0	37,0	17,3	7,7	38,0	25,7	35,0	8,3	31,0	
	1,0	5,3	3,3	32,0	16,3	10,3	32,7	0,0	35,0	12,0	19,7	33,3	33,3	18,0	13,7	35,0	
	5,0	0,0	0,0	45,3	3,7	15,7	35,3	0,0	32,7	10,0	9,0	48,3	37,3	13,7	8,3	40,7	
	10	0,0	0,0	54,0	6,7	3,3	36,0	0,0	41,7	5,7	8,0	44,7	40,7	9,3	4,7	45,3	
Control		90,0	0,0	6,7	0,0	0,0	3,3	0,0	88,3	6,0	1,0	4,7	74,0	19,3	1,7	5,0	

Fuente: Elaboración propia

Tabla 22

Resultados del desarrollo embrionario del T. niger desde las 28 h hasta las 48 h expresado en porcentajes

Metales	Concentración (mg.l ⁻¹)	28 h				42 h				48h			
		Blástula	Gástrula	Mal formaciones	Muertos	Blástula	Gástrula	Mal formaciones	Muertos	Blástula	Gástrula	Mal formaciones	Muertos
Cr	0,01	12,0	30,7	15,0	42,3	6,0	34,3	11,0	48,7	3,3	34,7	10,7	51,3
	0,05	16,7	15,7	18,7	49,0	9,0	17,0	22,3	51,7	7,0	15,0	23,3	54,7
	0,1	23,3	10,0	14,0	52,7	15,0	12,7	17,0	55,3	10,3	10,7	18,0	61,0
	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cd	0,5	19,0	34,0	12,3	34,7	17,0	35,7	9,0	38,3	13,3	38,7	5,7	42,3
	1,0	28,0	21,3	12,7	38,0	20,0	26,3	10,0	43,7	17,0	25,0	11,7	46,3
	5,0	33,3	17,0	6,7	43,0	23,7	20,7	8,3	47,3	19,7	23,0	9,0	48,3
	10,0	37,7	12,3	3,0	47,0	35,0	11,0	4,0	50,0	30,3	13,0	4,7	52,0
Control		59,7	35,0	1,6	3,6	27,7	63,0	2,6	6,7	15,3	76,3	3,0	5,7

Fuente: Elaboración propia

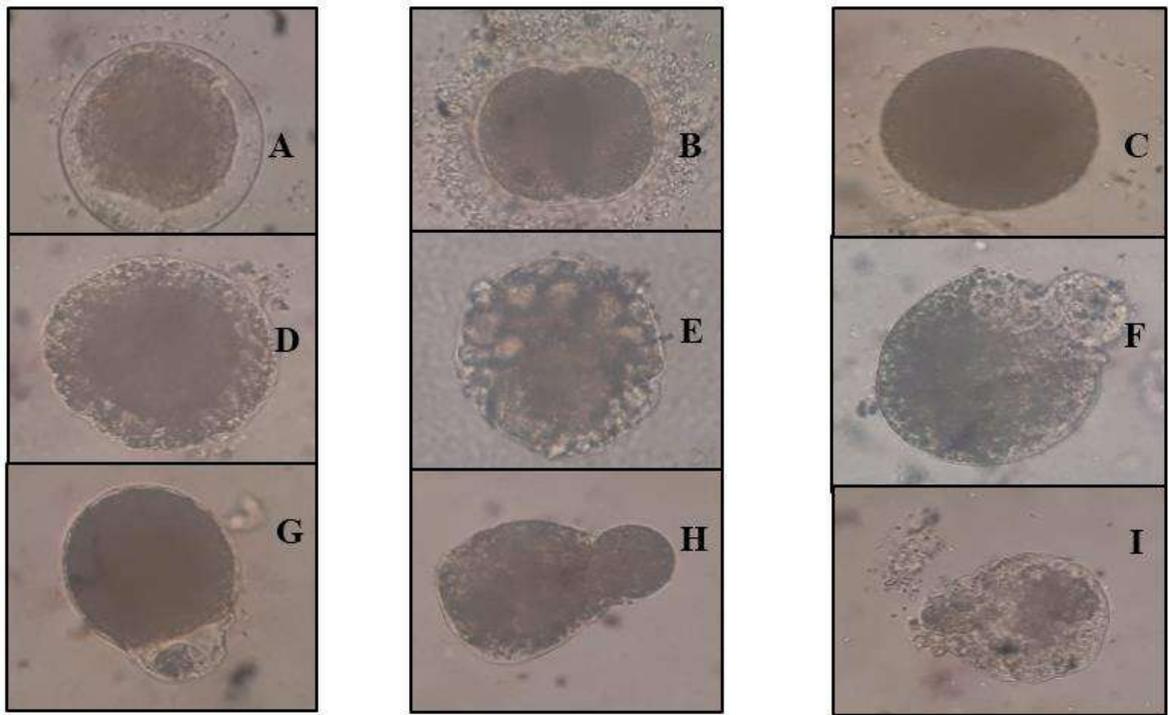


Figura 11. Cambios morfológicos en el desarrollo embrionario del *T. niger* expuestos a Cd y Cr: (A) fertilización normal; (B) 2 células; (E) Mórula; (C) Blástula; (D) Gástrula; Malformaciones: (F) Tipo campana; (G) Tipo hongo; (H) Spaces-ship Apollo; (I) Separación. *Fuente:* Elaboración propia

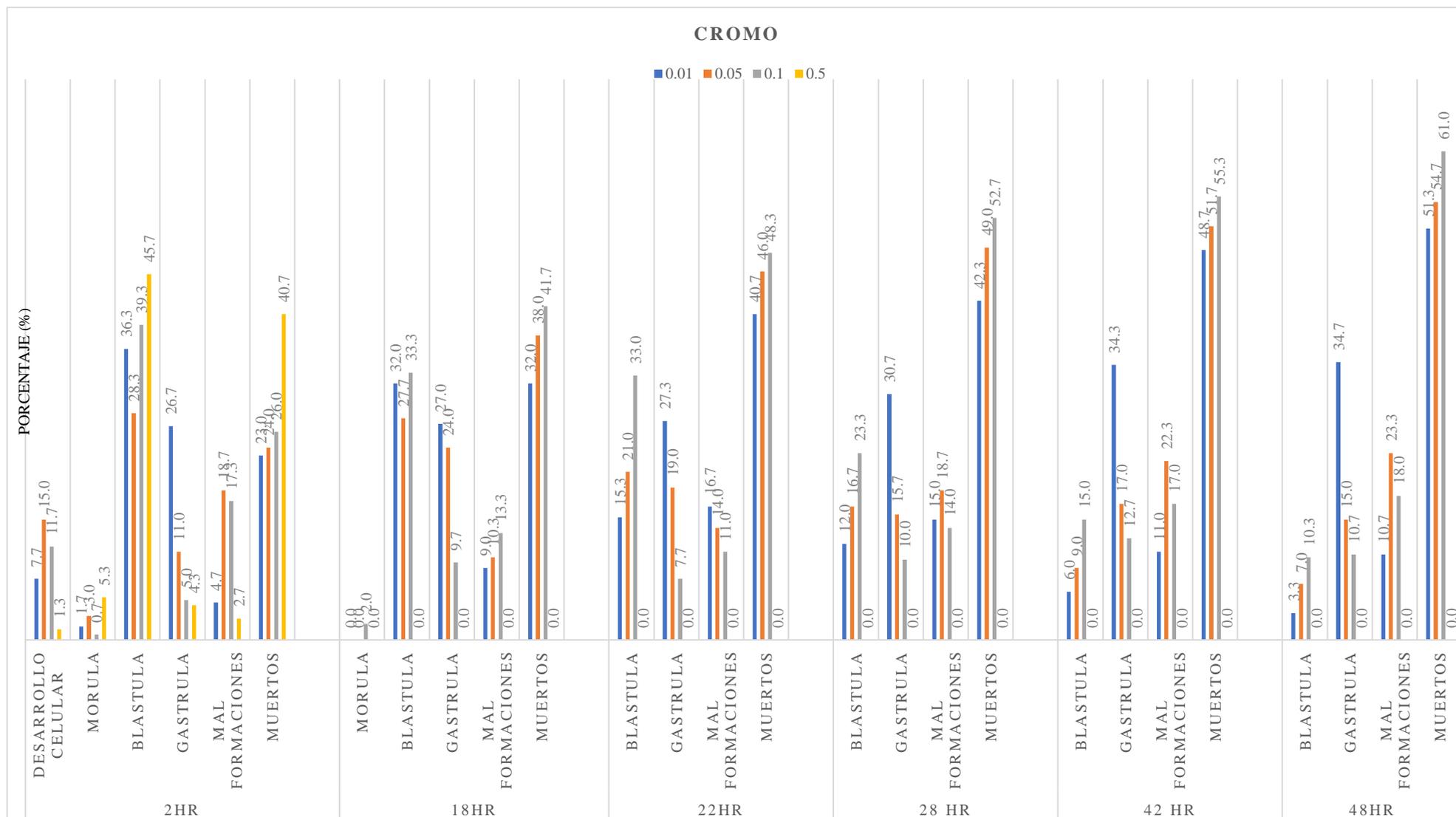


Figura 12. Resultados del desarrollo embrionario del *T. niger* para el metal pesado Cromo. Fuente: Elaboración Propia.

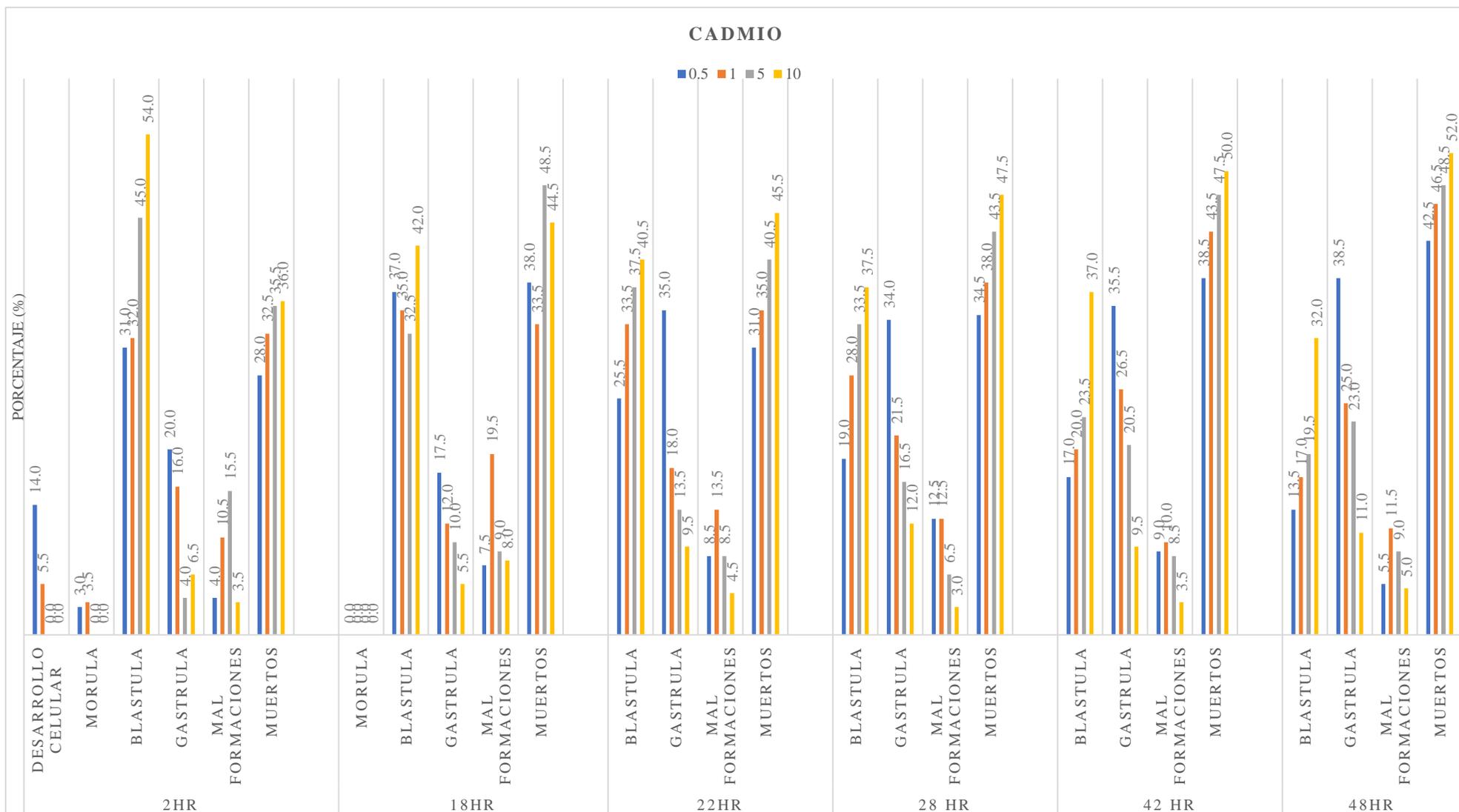


Figura 13. Resultados del desarrollo embrionario del *T. niger* metal pesado Cromo. Fuente: Elaboración Propia.

CAPITULO IV: DISCUSIONES

4.1. Determinación de la toxicidad (DL₅₀) para Cadmio y Cromo

Según los resultados obtenidos con los tóxicos de referencias, el orden de toxicidad sería Cr>Cd. En el presente trabajo, la DL₅₀ para el cadmio es de 41,7 mg.l⁻¹ a una temperatura de 18° C, este resultado muestra diferencias con los obtenidos por otros investigadores que trabajaron con el mismo tóxico de referencia en similares temperaturas (Tabla 23), tales son los casos de Arizzi *et al.* (2003) quien obtuvo valores de 0,23 mg.l⁻¹, Nacci *et al.* (1986), consiguió un valor del DL₅₀ de 13,9 mg.l⁻¹; Fernández y Beiras (2001) obtuvieron un valor de DL₅₀ de 9,24 mg.l⁻¹, Marín-Guirao *et al.* (2002) utilizaron tres tipos de erizos de mar obteniendo un DL₅₀ de 1,56 ; 1,49 ;1,65 mg.l⁻¹ , respectivamente. Garmendia *et al.* (2009) en su investigación, obtiene un DL₅₀ estimado de 7,5 mg.l⁻¹. King y Riddle (2001) evaluaron el DL₅₀, en ambientes fríos con temperatura de 0 ± 5 °C dando un valor de 6,94 mg.l⁻¹.

En cuanto al cromo, se obtuvo un DL₅₀ de 0,44 mg.l⁻¹ a una temperatura de 18 °C, marcando una diferencia con el estudio de Arizzi *et al.* (2003) que presenta una DL₅₀ de 3,06 mg.l⁻¹ a una temperatura de 18 °C.

Todos los organismos detallados muestran DL₅₀ diferentes respecto al del presente estudio, tanto para cadmio y cromo, incluso encontrándose en el mismo rango de temperatura. La diferencia entre los datos obtenidos pueden deberse a varios factores, siendo posiblemente el más influyente la especie de erizo de mar usado, esto debido a que no todas las especies son igualmente sensibles a los diferentes tipos de contaminantes presentes en el medio ambiente (Arsla y Karaaslan, 2016); esta diferencia no solo se aprecia en este estudio sino también al comparar como por ejemplo los resultados de Arizzi *et al.* (2003) con los de Fernández y Beiras (2001) para el cadmio, y los de Arizzi *et al.* (2003) con los nuestros en el caso del cromo.

Otro factor que puede influir es el lugar de recolección, ya que, al tener cargas contaminantes diferentes, posibilita que el organismo se encuentre aclimatado a determinadas condiciones de estrés que generan una mayor tolerancia en comparación a organismos recolectados en puntos distintos. Razón por la cual es muy probable que la DL₅₀ de una misma especie varíe de un lugar a otro (King y Riddle ,2001) como se ve en la Tabla 23.

Comparando la DL₅₀ obtenidos para Cd y Cr, se encontró que el Cr es más tóxico que el Cd, lo que difiere con los resultados obtenidos por Arrizi *et al.* (2003) esto podría deberse a que el *T. niger* es más susceptible al Cr que los erizos *P. lividus* evaluados por Arrizi *et al.* (2003).

Por último, uno de los efectos de la variación del resultado también radica en la condición en la que se realizó el experimento, tales como el tiempo de exposición, sales usadas, el tipo de agua usada, el estado del erizo, la calidad de los gametos, entre otros (Arizzi *et al.* 2003). Esto hace necesario repetir varias veces los ensayos, con el fin de evitar posibles errores generados por uno de estos factores, y así poder tener una data de las variaciones del DL₅₀ del bioindicador para ver la alteración del medio ambiente con respecto al tiempo.

A pesar de las diferencias encontradas en la investigación, los ensayos con erizos de mar son una manera viable no solo para comparar tóxicos de referencia, sino también para el estudio de sustancias complejas donde hay una interacción entre diferentes tóxicos como sedimentos y descargas de contaminantes.

Tabla 23

Valores hallados para DL₅₀ en la bibliografía para erizo de mar

Fuente	Especie	Lugar	Tóxico de Referencia	DL ₅₀
Arizzi <i>et al.</i> (2003)	<i>P. lividus</i>	Mar Adriático	Cr (mg.l ⁻¹)	3,06
Presente Investigación	<i>T. niger</i>	Chorrillos	Cr (mg.l ⁻¹)	0,44
King y Riddle (2001)	<i>S. neumayeri</i>	Antártida	Cd (mg.l ⁻¹)	6,94
Arizzi <i>et al.</i> (2003)	<i>P. lividus</i>	Mar Adriático	Cd (mg.l ⁻¹)	0,23
Fernández y Beiras, (2001)	<i>P. lividus</i>	Galicia	Cd (mg.l ⁻¹)	9,24
Garmendia <i>et al.</i> (2009)	<i>P. lividus</i>	País Vasco	Cd (mg.l ⁻¹)	7,50

Nacci, Jacki, y Walsh (1986)	<i>A. punctulata</i>	Narragansett	Cd (mg.l ⁻¹)	13,9
	<i>A. lixula</i>			1,56
Cesar <i>et al.</i> (2002)	<i>P. lividus</i>	Islas del Fraile, Aguila y Farrallon	Cd (mg.l ⁻¹)	1,49
	<i>S. granularis</i>			1,65
Fernández (2002)	<i>P. lividus</i>	Galicia	Cd (mg.l ⁻¹)	8,62
Presente Investigación	<i>T. niger</i>	Chorrillos	Cd (mg.l ⁻¹)	41,77

Fuente: Elaboración propia.

4.2. Determinación del riesgo ambiental (RQ) del metal pesado Cd y Cr

Se halló un RQ para el Cd de 0,0027 mientras que para el Cr se obtuvo un RQ de 2,2450, los cuales se comparan en la Tabla 24.

Debemos mencionar que se han realizado investigaciones afines con el mismo espécimen y periodos de análisis, pero con diferentes contaminantes, encontrándose variabilidad en los resultados hallados para RQ. Paredes (2016) halló un RQ de $3,88 \times 10^{-6}$ para el sulfato de bario a partir de la evaluación del porcentaje de inhibición a las dos horas. Por otro lado, Iannacone *et al.* (2007) empleó el “erizo” *T. niger* y obtuvo un RQ de 4,20 y 9,80 para el plaguicida Metamidofos Clase Ia y Ib respectivamente. Además, Iannacone *et al.* (2011) en su investigación con *T. niger*, sometido a una exposición del plaguicida Carbofurano en un intervalo de una hora, obtuvo un valor de RQ de 13,80. Más adelante, Iannacone *et al.* (2014) en su evaluación del riesgo ecotoxicológico del bioplaguicida Catahua consiguió un RQ de 2290,10; este RQ se determinó en base a valores de toxicidad comparados con la dosis promedio de aplicación del bioplaguicida para plagas de algodón.

Por lo expuesto, se deduce que el erizo *T. niger* no presenta la misma sensibilidad al contrastarlo con diferentes tóxicos referentes, lo que generaría diferentes efectos y reacciones aun habiendo realizado las mismas técnicas de obtención de gametos y fertilización. De acuerdo con los resultados encontrados el espécimen *T. niger* bajo las condiciones de prueba de la presente investigación, resultado ser más sensible al Cr que al Cd, ya que se evidencio que el Cr tiene un mayor efecto en la inhibición de la fecundación de los gametos a diferencia del Cd que mostro menor efecto.

Tabla 24

Valores hallados para riesgo ambiental en la bibliografía para *T.niger*

Fuente	Especie	Factor	Tóxico de Referencia	RQ	Riesgo ambiental o ecológico
Paredes (2016)	<i>T. niger</i>	% de inhibición	BaSO4	3,88x10 ⁻⁶	Bajo
Iannacone, <i>et al.</i> (2007)	<i>T. niger</i>	% de inhibición	Metamidofos Clase Ia	4,20	Alto
			Metamidofos Clase Ib	9,81	Alto
Iannacone, <i>et al.</i> (2011)	<i>T. niger</i>	% de inhibición	Carbofurano	13,80	Alto
Iannacone, <i>et al.</i> (2014)	<i>T. niger</i>	% de inhibición	Catahua	2290,10	Alto
Presente Investigación	<i>T. niger</i>	% de inhibición	Cd (mg.l ⁻¹)	0,0027	Bajo
Presente Investigación	<i>T. niger</i>	% de inhibición	Cr (mg.l ⁻¹)	2,245	Alto

Fuente: Elaboración propia.

4.3. Evaluación del efecto de los metales pesados Cd y Cr en el desarrollo embrionario

En el estudio realizado por Pagano *et al.* (1983) en los erizo de mar *P. lividus* y *S. granularis* con agua de mar filtrada para el metal pesado Cr y con una exposición de 48 h, se observa que a una concentración mayor a 11,5 mg.l⁻¹ de CrO₄⁻² el desarrollo del estadio gástrula es totalmente suprimida, afectando el desarrollo de ambas especies. Mientras que a una concentración igual a 11,5 mg.l⁻¹ se observa la inhibición de la formación del esqueleto y una evaginación de entre el 30 % al 70 % del cuerpo. Seguidamente, a una concentración de 111,5 mg.l⁻¹ el CrO₄⁻², no causa problemas en la fecundación pero genera separación celular. En la presente investigación, usando *T. niger* a una concentración de 0,5 mg.l⁻¹ de Cr y 18 h de exposición se observó separación celular, disgregando el contenido celular; mientras que en las tres concentraciones restantes se observó entre el 4 % al 24 % aproximadamente de malformaciones en el embrión (Figura 9) influenciadas por el tiempo de exposición y concentración del metal. Además, se registró una alta tasa de mortalidad en los tratamientos con altas concentraciones de Cr que a su vez afectaron el desarrollo embrionario. Por lo observado, se puede establecer que los efectos están relacionados con la concentración y el tiempo de exposición; así mismo, demuestra el efecto mutagénico que genera el cromo,

evidenciado en el cambio de la morfología externa como por ejemplo exogástrulas tipo campana, hongo y space-ship Apollo.

Pagano *et al.* (1983) reporta alteraciones en el desarrollo embrionario de los erizos *P. lividus*, *P. crotubercalaus* y *S. granularis* extraídos del golfo de Nápoles, Italia, los cuales al ser expuestos a una concentración de 10^{-3} M Cd^{2+} (112,411 mg.l^{-1}) presentan una blástula patológica o un estadio permanente. Posteriormente, reportan que a una concentración igual a 10^{-4} M Cd^{2+} (11,241 mg.l^{-1}) se presentaron algunos efectos inconsistentes, debido a las diversas acciones del Cd^{2+} en el desarrollo embrionario, sin afectar el desarrollo o la fertilización de los huevos. Por su parte, Kobayashi (1990) al trabajar con *H. pulcherrinus* a una temperatura de 18 °C con CdCl_2 establece que los embriones en algunos casos desarrollan anomalías, tales como exogástrula y alteraciones denominadas “space-ship Apolo”, así como un efecto retardado en el desarrollo embrionario, además de una baja tasa de mortalidad.

La presente investigación obtuvo similares resultados de tóxico de referencia reportados por Kobayashi (1990), quien emplea las mismas concentraciones que las utilizadas en el presente estudio, obteniendo resultados parecidos y además de similares malformaciones que fueron atribuidas a concentraciones cercanas a 10 mg.l^{-1} . Igualmente, se observa en el presente ensayo un retardo del desarrollo embrionario en comparación al control y al Cr; las malformaciones detalladas en la investigación de Kobayashi (1990) (Figura 9) son similares a las encontradas en el presente estudio, con la única diferencia de que en caso de Kobayashi, a las 48 h la concentración de 5 mg.l^{-1} registró el máximo número de malformaciones, mientras que en este estudio se registró el mismo valor pero a la concentración de 1 mg.l^{-1} . Esto puede deberse a la aclimatación del erizo de mar a las concentraciones presentes del ambiente donde se extrajo.

Por lo referido anteriormente, las diferentes concentraciones durante un periodo largo de tiempo generan diferentes tipos de resultados en la formación del embrión y posterior desarrollo, también al compararlo con el cromo se puede ver que este tiene una mayor capacidad de generación de malformaciones y mortalidad.

Las causas de los daños que ocasiona el Cd en el embrión de los erizos, son descritas por Agnello *et al.* (2007) en su investigación con embriones del erizo *P. lividus*, donde demuestran que la absorción intracelular del metal se incrementa con respecto al tiempo de exposición, lo que genera la activación de proteínas de estrés específicas. Además, en su investigación observó un incremento de embriones inducidos a activar los eventos de apoptosis en respuesta a las grandes concentraciones del tóxico de referencia, en este caso el Cd, donde el embrión al ser expuesto genera un aumento en la rotura del caspase-3, la cual es una de las moléculas claves para la apoptosis, esta rotura trae consigo el aumento de la rotura de α -fodrin y lamin A. La primera está asociada al desarrollo del citoesqueleto, cuya rotura ocasionaría malformaciones o inhibición de la formación del esqueleto; mientras que la segunda es una proteína membrana nuclear la cual al romperse causa la muerte celular, todo esto para evitar la fragmentación del ADN. También observaron que, si la concentración del Cadmio es baja, el embrión puede volver a su desarrollo normal, pero si es grande puede ocasionar un grave daño y fragmentación del ADN, provocando un desarrollo anormal. Por lo tanto, se puede inferir que la apoptosis sirve como un mecanismo de defensa ante los metales pesados.

Los efectos observados del Cr son explicados por Garman *et al.* (1997) quien realiza un ensayo con *Strongylocentrus purpuratus* e indica que el Cr y el Ni generan los mismos efectos en el desarrollo embrionario, debido a que afectan el sistema de transporte de aniones. Ryu *et al.* (2012), expone a los embriones del erizo *Strongylocentrus intermedius* al níquel, generando malformaciones tipo campana y hongo, similares a las observadas en esta investigación. Estas malformaciones ocurren debido a la alteración de los genes EGF3, PCSK9, proteína precursora apolipoprotein a las cuales se les atribuye los fenómenos anormales de desarrollo embrionario.

CAPITULO V: CONCLUSIONES

1. En base al resultado de la prueba de toxicidad aguda en *T. niger*, se concluye que el metal pesado cromo presenta un DL_{50} de $0,44 \text{ mg.l}^{-1}$, lo que representa un alto grado de toxicidad, el Cd, presento un DL_{50} de $41,77 \text{ mg.l}^{-1}$, lo que representa una menor toxicidad.
2. Se determinó un RQ de 2,245 para Cr, lo que representa un riesgo ecológico alto y para Cd el RQ fue de 0,0027 presentado un bajo riesgo ambiental a comparación del cromo, por ello este metal debe analizarse primordialmente en ecosistemas marinos.
3. El Cr presentó un mayor efecto mutagénico en el desarrollo embrionario del *T. niger* a diferencia del Cd. Se halló una mayor alteración en la fase de gástrula con un 23 % de malformaciones tales como exogástrulas a una concentración de $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$
4. Se observó que el Cr afecto la morfología de los embriones evidenciando malformaciones de diferentes tipos y una mayor tasa de mortalidad en relación con el tratamiento control.

CAPITULO VI: RECOMENDACIONES

1. Realizar pruebas de dosis letal media con los mismos organismos y tóxicos de referencia, a fin de obtener rangos de resultados comparables y significativos.
2. Ampliar los estudios eco toxicológicos con diferentes organismos marinos céciles, con la finalidad de hallar el organismo más sensible a determinados tóxicos y aplicar los resultados a fin de obtener valores más exactos de riesgo ambiental.
3. Realizar pruebas de desarrollo embrionario con mezclas de metales para encontrar efectos de sinergia, antagonismo, entre otros.

REFERENCIAS

- Agnello, M. (2017). Sea Urchin - Knowledge and Perspectives. *INTECH*, 3-16. doi:10.5772/intechopen.70415
- Agnello, M., Filosto, S., Scudiero, R., Rinaldi, A. M., y Roccheri, M. C. (2007). Cadmium induces an apoptotic response in sea urchin embryos. *Cell Stress Chaperones*, 12(1), 44–50. doi:10.1379/CSC-229R.1
- Aprueban Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua y Establecen Disposiciones Complementarias. Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM. Diario Oficial El Peruano, Lima, Perú, 07 de julio de 2017, pp. 10-19.
- Arizzi Novelli, A., Losso, C., Ghetti, P. F., and Volpi Ghirardini, A. (2003). Toxicity of heavy metals using sperm cell and embryo toxicity bioassays with *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea): Comparisons with exposure concentrations in the Lagoon of Venice, Italy. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(6), 1295–1301. doi:10.1002/etc.5620220616
- Arsila, Ö. C., and Karaaslan, M. A. (2016). Bioavailability of Sea Urchin to Aquatic Toxicity Test. *J Aquatic Pollution and Toxicology*, 1(1), 1-6.
- Bendita, H. (2016). *Determinación del ciclo reproductivo del " Erizo Verde" loechinus albus, asociados a periodos estacionales en la zona de Punta Coles-Ilo* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Moquegua, Ilo, Perú.
- Blasco, J., Chapman, P. M., Campana, O., and Hampel, M. (2017). *Marine Ecotoxicology: Current Knowledge and Future Issues*. New York: Academic Press.
- Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. (G. Castillo Morales, Ed.) México: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
- Cerna, D. I., y López, S. (2013). *Evaluación de metales pesados e indicadores de contaminación en el puerto de Paita* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, Paita, Perú.
- Cesar, A., Marín-Guirao, L., Vita, R., and Marín, A. (2002). Sensitivity of Mediterranean amphipods and sea urchin to reference toxicants. *Ciencias Marinas*, 28(4), 407-417

- Chiarelli, R., Agnello, M., Bosco, L., y Roccheri, M. (2014). Sea urchin embryos exposed to cadmium as an experimental model for studying the relationship between autophagy and apoptosis. *Marine Environmental Research*, 93, 47-55. doi:10.1016/j.marenvres.2013.06.001
- Diario Oficial El Peruano. (2017, julio 07). Aprueban Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua y Establecen Disposiciones Complementarias. Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM. pp. 10-19.
- Environment Canada. (2011). Biological test method: Fertilization assay using echinoids (sea urchins and sand dollars). *Second*. Ottawa, Ontario, Canada.
- EPA. (2002a). Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms. *Third Edition*. Office of Water, Cincinnati, OH. doi:EPA-821-R-02-014
- Espinoza, M. L. (2018). *Riqueza y tipos de hábitat de equinodermos en la Región Arequipa al 2017*. (Tesis de pregrado). Arequipa, Lima.
- Fernández, N. (2002). *Evaluación biológica de la contaminación marina costera mediante bioensayos con embriones del erizo de mar Paracentrotus lividus*. (Tesis doctoral). Universidade de Vigo, Vigo, España.
- Fernández, N., y Beiras, R. (2001). Combined Toxicity of Dissolved Mercury with Copper, Lead and Cadmium on Embryogenesis and Early Larval Growth of the Paracentrotus lividus Sea-Urchin. *Ecotoxicology*, 10, 263-271. doi:10.1023/A:1016703116830
- Morais, S., Garcia e Costa, F., and Pereira, M. L. (2012). Heavy Metals and Human Health. *Environmental Health - Emerging Issues and Practice*, 227-246. doi:10.5772/29869
- Garman, G. D., Anderson, S. L., and Cherr, G. N. (1997). Developmental abnormalities and DNA-protein crosslinks in sea urchin embryos exposed to three metals. *Aquatic toxicology*, 39, 247-265. doi:10.1016/S0166-445X(97)00033-7
- Garmendia, J. M., Menchaca, I., Belzunce, M., y Revilla, M. (2009). Protocolo del test de toxicidad de sedimentos marinos con larvas del erizo de mar Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816). *Revista de Investigación Marina*, 11-25.

- Gobierno Regional del Callao (2013). *Estudio oceanografico de la bahia del Callao - Ventanilla y zonas de influencia*. Callao.
- Google. (s.f). [Bahia de Chorrillos, Peru en Google Earth].
- Hernández, P. (2015). *Bioacumulación de Cd, Pb, Cu, Zn y Fe en un gasterópodo y dos especies de erizo por consumo de macroalgas asociadas a mantos de Sargassum spp.* (Tesis doctoral), Baja California Sur, México.
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2010). *Metodología de la investigación* (5ta ed.). Editorial McGraw-Hill Interamericana. México D.F.
- Hinegardner, R. (1969). Growth and development of the laboratory cultured sea urchin. *The Biological Bulletin*, 465-475.
- Iannacone, J. A., Ayala, H., Alvariño, L., Paredes Espinal, C., Villegas, W., Alomia, J., . . . Cruces, L. (2014). Riesgo ecotoxicológico acuático y terrestre del bioplaguicida catagua. *Toxicol*, 50-62.
- Iannacone, J., Alvariño, L., Onofre, R., Huanqui, O., Giraldo, J., Mamani, N., . . . Alvariño, L. (2007). Investigación evaluación del riesgo ambiental del insecticidametamidofos en bioensayos con cuatro organismosacuáticos no destinatarios. *Agricultura técnica*, 4, 126-138.
- Iannacone, J., Alvariño, L., Paredes, C., Alayo, M., Mamani, N., Bonifacio, J., . . . Miglio, M. (2011). Evaluación del riesgo ambiental de carbofurano en bioensayos con organismos no blanco. *Acta Toxicol. Argent.*, 19(1), 19-31.
- King, C. K., and 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. (1971). Fertilized sea urchin eggs as an indicatory material for marine pollution bioassay, preliminary experiments. *KURENAI*, 18(6), 379-406.
- Kobayashi, N. (1990). Marine pollution bioassay by sea urchin eggs, an attempt to enhance sensitivity. *KURENAI*, 225-237.

- Kobayashi, N., and Okamura, H. (2004). Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. 1. Tracing the cause by the effects. *Chemosphere*, 55, 1403-1412.
- Kobayashi, N., and 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*, 1198-1203.
- Lorenzo, J. L., Nieto, O., Beiras, R. (2002). Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *Paracentrotus lividus* larvae in seawater. *Aquatic Toxicology*, 58, 27-41.
- Markert, B. A., Breure, A. M., and Zechmeister, H. G. (2003). Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. *Bioindicators and Biomonitors: Principles, Concepts and Applications*, 6, 10-20.
- Mortensen, T. (1935). Bothriocidaroida, Melonechinoida, Lepidocentroida, and Stirodonta. In T. Mortensen, *A Monograph of the Echinoidea. II.* (pp. 582-584). Copenhagen y London: C. A. Reitzel y Oxford University Press.
- Nacci, D., Jacki, E., and Walsh, R. (1986). Comparative Evaluation of three rapid marine toxicity test: Sea urchin early embryo growth test, sea urchin sperm cell toxicity test and microtox. *Environmental toxicology and Chemistry*, 5, 521-525.
- Olaechea P., Panéz, J. y Gonzáles-Figueroa, H. (2006). Desarrollo embrionario de *Tetrapygus niger* (Molina, 1782) “erizo negro” en diferentes temperaturas. *Biotempo*, 6, 27-31.
- Pagano, G., Anselmi, B., Dinnel, P., Esposito, A., Guida, M., Iaccarino, M., . . . Trieff, N. (1993). Effects on Sea Urchin Fertilization And Embryogenesis of Water and Sediment from Two Rivers in Campania, Italy. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 20-26.
- Pagano, G., Esposito, A., and Giacomo, G. (1982). Fertilization and Larval Development in Sea Urchins Following Exposure of Gametes and Embryoa to Cadmium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 11, 47-57.
- Pagano, G., Esposito, A., Bove, P., De Angelis, M., Rota, A., and Giacomo Giordano, G. (1983). The Effects of hexavalent and trivalent Chromium on Fertilization and Development in Sea Urchins. *Environmental Research*, 30, 442-452.
- Paredes Espinal, C. E. (2016). *Riesgo Ecológico del Sulfato de Bario*. (Tesis de maestria). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

- Rodríguez, M. R. (2010). *Bioacumulación de los metales pesados trazas: Cd, Cu y Pb en Chondracanthus chamissoi., procedente del litoral del Departamento La Libertad.* (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.
- Ryu, T. K., Lee, G., Rhee, Y., Park, H.-S., Chang, M., Lee, S., . . . Lee, T.-K. (2012). Identification of nickel response genes in abnormal early developments of sea urchin by differential display polymerase chain reaction. *Ecotoxicology and environmental safety*, 84, 18-24. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.06.018
- Sanchez, G., Orozco, R., y Guzmán, M. (2008). *Bahía del Callao, Perú. Evaluación ambiental en marzo 2002.* Callao: IMARPE.
- Shekhawat, K., Chatterjee, S., and Joshi, B. (2015). Chromium Toxicity and its Health Hazards. *International Journal of Advanced Research*, 3, 167-172.
- Solís-Marín, F. A., Laguarda-Figueras, A., y Honey-Escandón, M. (2014). Biodiversidad de equinodermos (Echinodermata) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 441-449. doi:10.7550/rmb.31805
- Xylem Analytics Germany GmbH. (2010). Photometry Analysis Manual ba75509e15 pHotoFlex Turb. 1-106. Alemania.
- Xylem Analytics Germany GmbH. (2018). Instrucciones de operación ba75976s06 pHotoFlex® Turb. 1-106. Alemania.

TERMINOLOGÍA

Agua de mar sintética: Mezcla de sales minerales disueltas que simulan el agua de mar. El agua de mar sintética presenta importantes ventajas para pruebas de toxicidad: carece de materia orgánica, la cual puede causar toxicidad o alterar la debida a los metales, dada su capacidad para generar complejos de iones metálicos, y permite garantizar un contenido máximo en metales pesados (impurezas de las sales utilizadas) muy por debajo de los umbrales con efectos biológicos, siempre que se utilicen sales de calidad para análisis (Fernández, 2002).

Bioensayo: Ensayo en el cual el poder o potencia de una sustancia es medido a través de la respuesta de organismos vivos o sistemas vivientes (Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, 2004).

Contaminante: Sustancia ajena, presente en un sistema natural en una concentración más elevada de lo normal por causa de actividad antrópica directa o indirecta; pudiendo ser nocivos para la salud, la seguridad o bienestar de la población, o perjudiciales para la vida animal y vegetal, o que impidan el uso y goce de las propiedades y lugares de recreación (Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, 2004).

Control: Unidad experimental que reproduce iguales condiciones y factores que afectaran los resultados del ensayo, con excepción de la sustancia a analizar (Garmendia *et al.*, 2009).

EC50: La concentración letal del tóxico, se define como la concentración que ocasiona un efecto del 50% en la población del organismo empleado; también se puede encontrar como LC50 (Garmendia *et al.*, 2009).

Exposición: Contacto de los organismos con las muestras de estudio (Garmendia *et al.*, 2009).

Factores de aplicación: Multiplicadores aplicados a los CL50 para estimar posibles umbrales subletales de efecto en comunidades acuáticas. Los valores más comunes

derivados de la experiencia práctica son: 1/10, 1/20, 1/100 (Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, 2004).

LOEC: Concentración más baja a la cual se observa efecto (LOEC, por sus siglas en inglés) (Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, 2004).

Muestra: Sustancia (disolución o sedimento) objetivo del análisis (Garmendia *et al.*, 2009).

NOEC: Concentración a la cual no se observa efecto (NOEC, por sus siglas en inglés) (Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, 2004).

Punto final: Medida o valor que expresa el resultado de un ensayo (CL50/CE50/CI50). También significa la respuesta del organismo para mostrar el efecto que se utiliza para indicar la finalización del ensayo, definido por un porcentaje de organismos y un tiempo de exposición (Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, 2004).

Replicado: Es una cámara de ensayo, conteniendo un número especificado de organismos en una concentración de muestra definida. En un ensayo de toxicidad con cinco concentraciones de ensayo y un control que usa tres replicados, se utilizan 18 cámaras de ensayo con tres cámaras por concentración (Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, 2004).

Toxicidad aguda: Se define como el efecto letal o subletal de un tóxico sobre organismos en un periodo de tiempo determinado (Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, 2004).

Toxicidad crónica: Efecto tóxicos a largo plazo relacionados con cambios en el metabolismo, crecimiento o capacidad de supervivencia (Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, 2004).

Toxicidad: Es característica determinante de un elemento o combinación de estos para inducir efectos contrarios a organismos vivos (Garmendia *et al.*, 2009).

APÉNDICES

Apéndice 1

Normas legales

18 NORMAS LEGALES Miércoles 7 de junio de 2017 /  El Peruano						
Categoría 4: Conservación del ambiente acuático						
Parámetros	Unidad de medida	E1: Lagunas y lagos	E2: Ríos		E3: Ecosistemas costeros y marinos	
			Costa y sierra	Selva	Estuarios	Marinos
FÍSICOS- QUÍMICOS						
Aceites y Grasas (MEH)	mg/L	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Cianuro Libre	mg/L	0,0052	0,0052	0,0052	0,001	0,001
Color (b)	Color verdadero Escala Pt/Co	20 (a)	20 (a)	20 (a)	**	**
Clorofila A	mg/L	0,008	**	**	**	**
Conductividad	(μ S/cm)	1 000	1 000	1 000	**	**
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO ₅)	mg/L	5	10	10	15	10
Fenoles	mg/L	2,56	2,56	2,56	5,8	5,8
Fósforo total	mg/L	0,035	0,05	0,05	0,124	0,062
Nitratos (NO ₃ ⁻) (c)	mg/L	13	13	13	200	200
Amoniaco Total (NH ₃)	mg/L	(1)	(1)	(1)	(2)	(2)
Nitrógeno Total	mg/L	0,315	**	**	**	**
Oxígeno Disuelto (valor mínimo)	mg/L	≥ 5	≥ 5	≥ 5	≥ 4	≥ 4
Potencial de Hidrógeno (pH)	Unidad de pH	6,5 a 9,0	6,5 a 9,0	6,5 a 9,0	6,8 – 8,5	6,8 – 8,5
Sólidos Suspendidos Totales	mg/L	≤ 25	≤ 100	≤ 400	≤ 100	≤ 30
Sulfuros	mg/L	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
Temperatura	°C	Δ 3	Δ 3	Δ 3	Δ 2	Δ 2
INORGÁNICOS						
Antimonio	mg/L	0,64	0,64	0,64	**	**
Arsénico	mg/L	0,15	0,15	0,15	0,036	0,036
Bario	mg/L	0,7	0,7	1	1	**
Cadmio Disuelto	mg/L	0,00025	0,00025	0,00025	0,0088	0,0088
Cobre	mg/L	0,1	0,1	0,1	0,05	0,05
Cromo VI	mg/L	0,011	0,011	0,011	0,05	0,05
Mercurio	mg/L	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Níquel	mg/L	0,052	0,052	0,052	0,0082	0,0082
Plomo	mg/L	0,0025	0,0025	0,0025	0,0081	0,0081
Selenio	mg/L	0,005	0,005	0,005	0,071	0,071
Talio	mg/L	0,0008	0,0008	0,0008	**	**
Zinc	mg/L	0,12	0,12	0,12	0,081	0,081

Figura 14. Estándares de Calidad Ambiental para Agua – Categoría 4. Fuente: Diario Oficial El Peruano (2017) Aprueban Estandares de Calidad Ambiental para Agua y establecen disosiciones complementarias D.S. N°004-2017

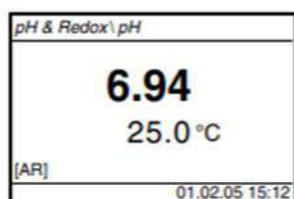
Apéndice 2

Manual de uso del pHotoFlex Turb

4.6.2 Medir el valor pH

1 Llevar a cabo las actividades preparativas conforme al párrafo 4.6.1.

2 Sumergir el electrodo de medición del pH en la solución de medición.



3 Presionar la tecla <M> (prolongadamente) las veces necesarias, hasta que quede seleccionado el parámetro pH.

AutoRead (control de deriva)

La función AutoRead (control de deriva) verifica continuamente la estabilidad de la señal de medición. La estabilidad de la señal tiene influencia decisiva sobre la reproducibilidad del valor medido. La indicación del parámetro parpadea, hasta que el valor medido se estabilice.

Criterios

Teniendo las mismas condiciones de medición, vale siempre:

Magnitud de medición	Reproducibilidad	Tiempo de respuesta
Valor pH	mejor 0,01	> 30 segundos

Figura 15. Manual de uso del pHotoFlex Turb para medir el pH. Fuente: Xylem Analytics Germany GmbH (2018) Instrucciones de operación ba75976s06 pHotoFlex® Turb.

Chrome
Program no.

5



WTW model no.:	14552
Category:	KT (reaction cell test)
Cell:	16 mm
Measuring range:	0.05 - 2.00 mg/l Cr
	Display in mmol/l possible

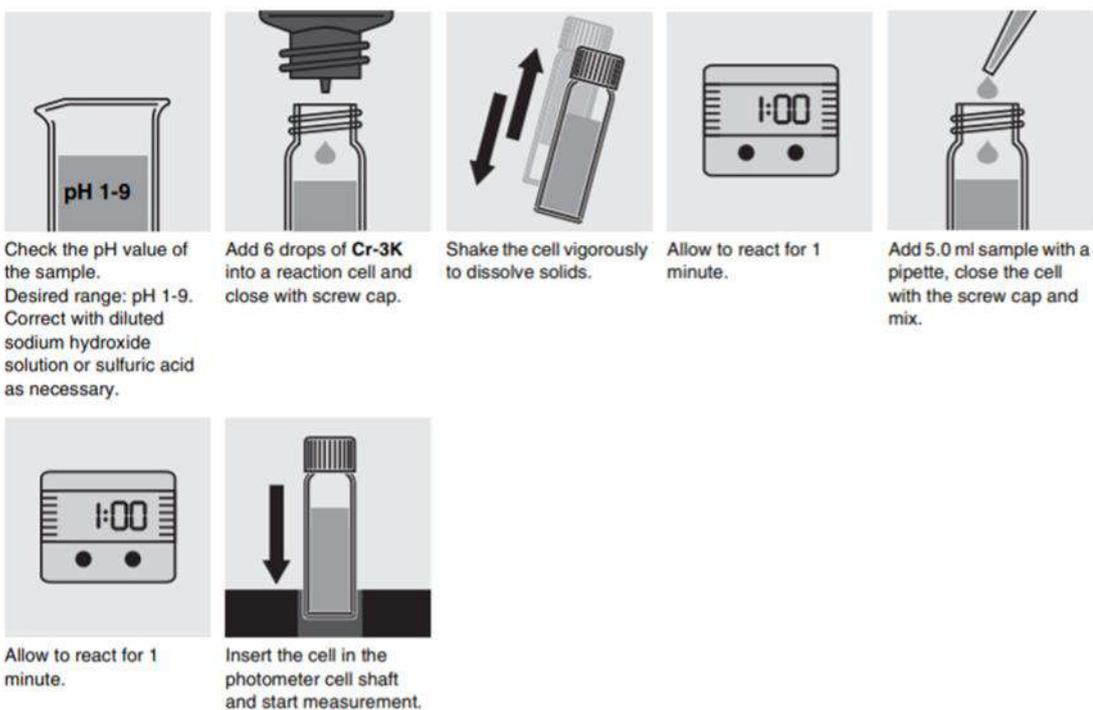


Figura 16. Manual uso para determinar el Cromo. Fuente: Xylem Analytics Germany GmbH (2010) Photometry Analysis Manual ba75509e15 pFotoFlex® Turb.

Cadmium

Program no.

4



WTW model no.:	14834
Category:	KT (reaction cell test)
Cell:	16 mm
Measuring range:	0.025 - 1.000 mg/l Cd
	Display in mmol/l possible

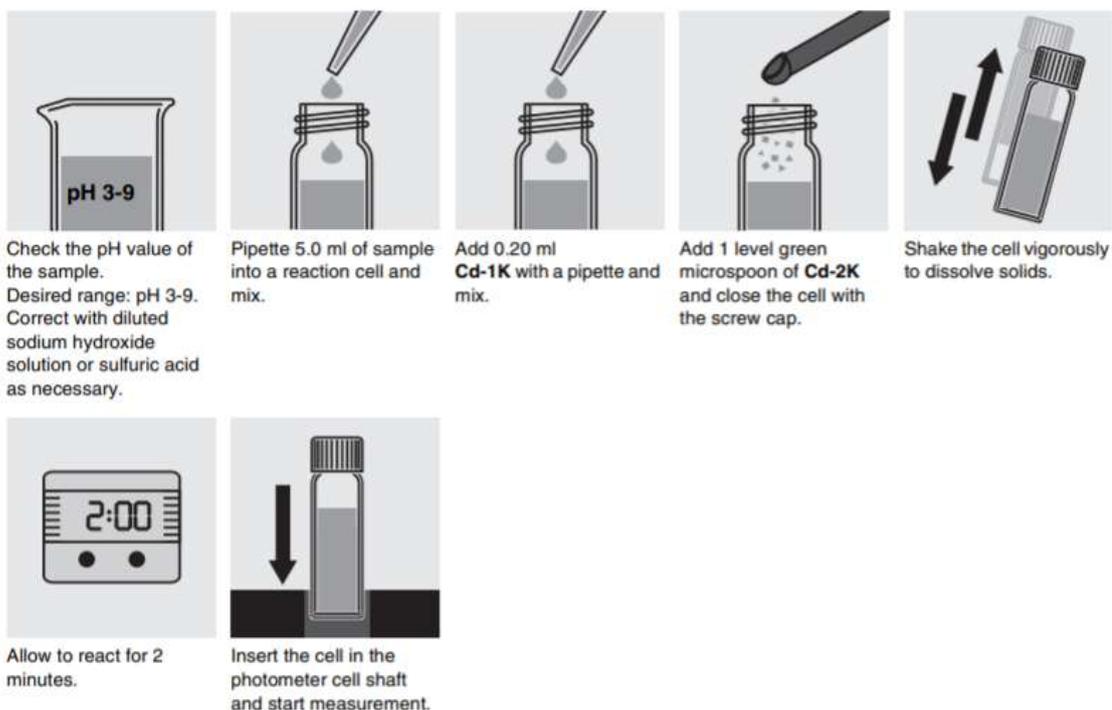


Figura 17. Manual uso para determinar el Cadmio. Fuente: Xylem Analytics Germany GmbH (2010) Photometry Analysis Manual ba75509e15 pFotoFlex® Turb.

Apéndice 3

Registro fotográfico

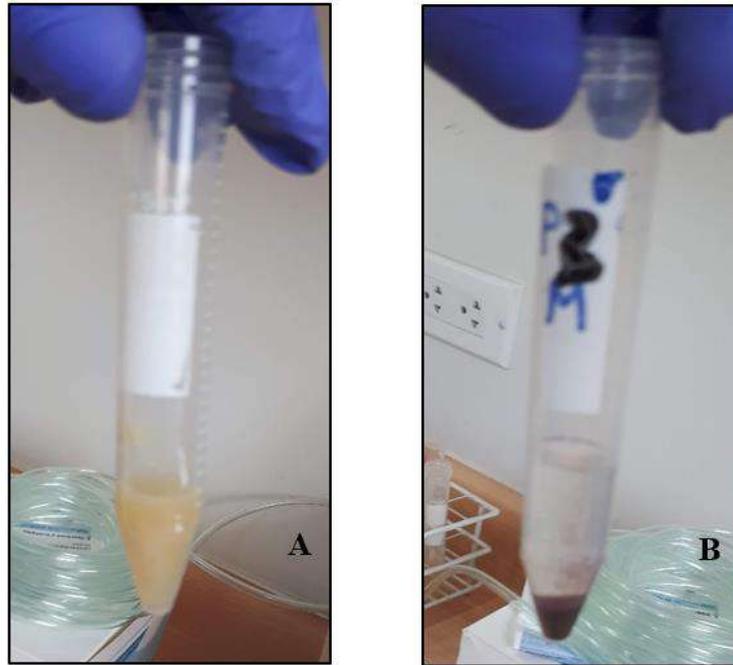


Figura 18. (A) esperma y (B) ovocitos de *T.niger*. Fuente: Elaboración propia.



Figura 19. Tratamiento para la prueba de toxicidad aguda, etiqueta roja cromo, etiqueta verde cadmio. Fuente: Elaboración propia.



Figura 20. Exposición de los embriones de *T.niger* a las soluciones contaminadas. Fuente: Elaboración propia.

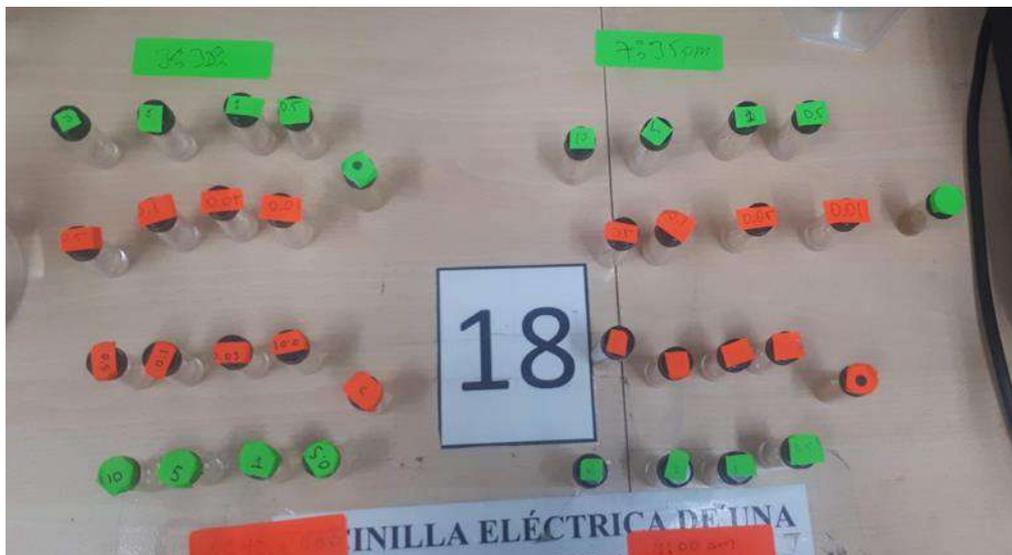


Figura 21. Tratamientos del desarrollo embrionario fijados con formol. Fuente: Elaboración propia.



Figura 22. Tratamientos para el desarrollo embrionario. *Fuente:* Elaboración propia.

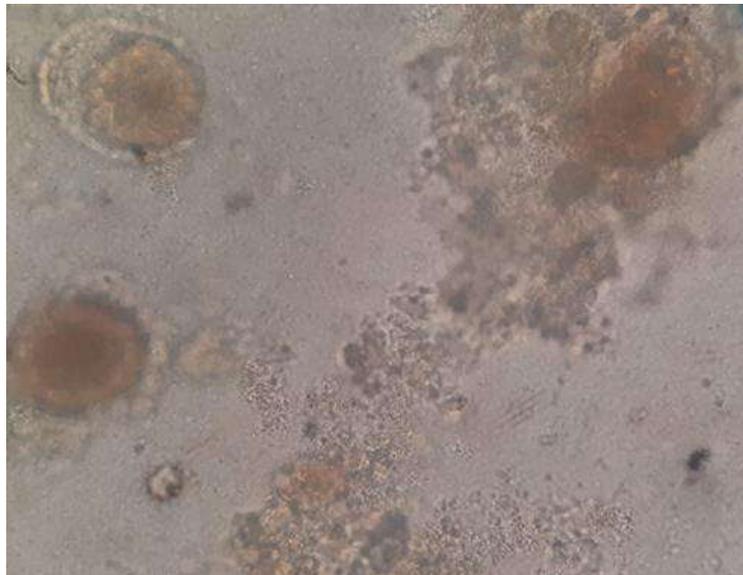


Figura 23. Separación celular por efecto del Cr. *Fuente:* Elaboración propia.

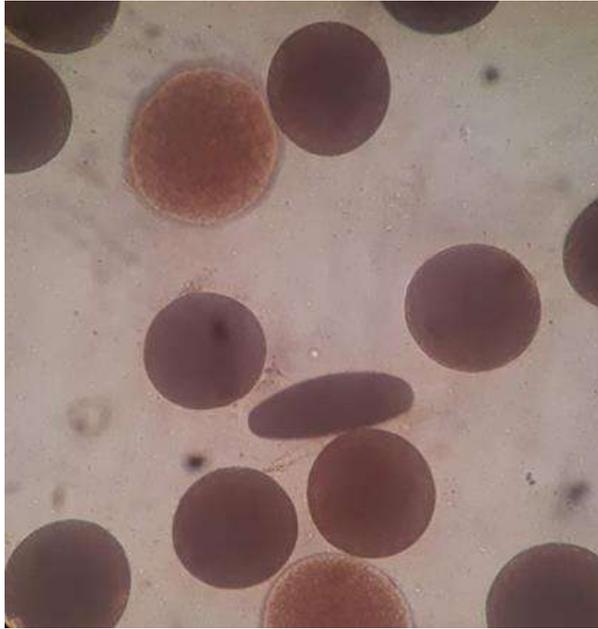


Figura 24. Efecto de aplastamiento debido a la falta de circulación. *Fuente:* Elaboración propia.

Apéndice 4

Estadístico del metal pesado Cromo

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	Mórula1	267,653 ^a	23	11.637	44.098	.000
	Blástula1	15085,111 ^b	23	655.874	286.200	.000
	Gástrula1	8980,653 ^c	23	390.463	315.880	.000
	Malformaciones1	4106,167 ^d	23	178.529	100.423	.000
	Muerte1	28642,444 ^e	23	1245.324	711.614	.000
Intersección	Mórula1	58.681	1	58.681	222.368	.000
	Blástula1	22330.889	1	22330.889	9744.388	.000
	Gástrula1	15167.014	1	15167.014	12269.944	.000
	Malformaciones1	9384.500	1	9384.500	5278.781	.000
	Muerte1	86805.556	1	86805.556	49603.175	.000
Tratamiento1	Mórula1	2.375	3	.792	3.000	.040
	Blástula1	3123.000	3	1041.000	454.255	.000
	Gástrula1	8484.042	3	2828.014	2287.831	.000
	Malformaciones1	3320.167	3	1106.722	622.531	.000
	Muerte1	19328.778	3	6442.926	3681.672	.000
Horas1	Mórula1	234.403	5	46.881	177.653	.000
	Blástula1	9428.611	5	1885.722	822.861	.000
	Gástrula1	69.236	5	13.847	11.202	.000
	Malformaciones1	200.167	5	40.033	22.519	.000
	Muerte1	1658.111	5	331.622	189.498	.000
Tratamiento1 * Horas1	Mórula1	30.875	15	2.058	7.800	.000
	Blástula1	2533.500	15	168.900	73.702	.000
	Gástrula1	427.375	15	28.492	23.049	.000
	Malformaciones1	585.833	15	39.056	21.969	.000
	Muerte1	7655.556	15	510.370	291.640	.000

a. R cuadrado = ,955 (R cuadrado corregida = ,933)

b. R cuadrado = ,993 (R cuadrado corregida = ,989)

c. R cuadrado = ,993 (R cuadrado corregida = ,990)

d. R cuadrado = ,980 (R cuadrado corregida = ,970)

e. R cuadrado = ,997 (R cuadrado corregida = ,996)

Pruebas post hoc tratamiento Cr

Mórula

DHS de Tukey^{a,b,c}

Tratamiento Cr	N	Subconjunto	
		1	
T1	18		.6111
T3	18		.8889
T2	18		1.0556
T4	18		1.0556
Sig.			.058

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,264.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = .05.

Blástula

DHS de
Tukey^{a,b,c}

Tratamiento Cr	N	Subconjunto		
		1	2	3
T4	18	7.6667		
T1	18		17.8333	
T2	18		18.7778	
T3	18			26.1667
Sig.		1.000	.254	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 2,292.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = .05.

Gástrula

DHS de
Tukey^{a,b,c}

Tratamiento Cr	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
T4	18	.7222			
T3	18		9.6111		
T2	18			17.4444	
T1	18				30.2778
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 1,236.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = .05.

Malformaciones en el desarrollo embrionario

DHS de
Tukey^{a,b,c}

Tratamiento Cr	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
T4	18	.4444			
T1	18		11.4444		
T3	18			15.4444	
T2	18				18.3333
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 1,778.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = .05.

Mortalidad

DHS de Tukey^{a,b,c}

Tratamiento Cr	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
T4	18	6.7778			
T1	18		39.8333		
T2	18			44.3889	
T3	18				47.8889
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 1,750.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = .05.

Pruebas post hoc horas Cr

Mórula

DHS de Tukey^{a,b,c}

Horas1	N	Subconjunto	
		1	2
22 horas	12	0.0000	
28 horas	12	0.0000	
42 horas	12	0.0000	
48 horas	12	0.0000	
18 horas	12	.5000	
2 horas	12		4.9167
Sig.		.182	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,264.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12,000

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = .05.

Blástula

DHS de Tukey^{a,b,c}

Horas1	N	Subconjunto					
		1	2	3	4	5	6
48 horas	12	5.1667					
42 horas	12		7.5000				
28 horas	12			13.0000			
22 horas	12				17.3333		
18 horas	12					23.2500	
2 horas	12						39.4167
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 2,292.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12,000

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = .05.

Gástrula

DHS de Tukey^{a,b,c}

Horas1	N	Subconjunto		
		1	2	3
2 horas	12	13.2500		
22 horas	12	13.5000		
28 horas	12	14.0833	14.0833	
48 horas	12		15.0833	15.0833
18 horas	12		15.1667	15.1667
42 horas	12			16.0000
Sig.		.453	.181	.347

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 1,236.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12,000

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = .05.

Malformaciones en el desarrollo embrionario

DHS de Tukey^{a,b,c}

Horas1	N	Subconjunto		
		1	2	3
18 horas	12	8.1667		
22 horas	12		10.4167	
28 horas	12		11.9167	11.9167
2 horas	12			12.4167
42 horas	12			12.5833
48 horas	12			13.0000
Sig.		1.000	.083	.363

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 1,778.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12,000

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = .05.

Mortalidad

DHS de Tukey^{a,b,c}

Horas1	N	Subconjunto					
		1	2	3	4	5	6
18 horas	12	27.9167					
2 horas	12		30.0000				
22 horas	12			33.7500			
28 horas	12				36.0000		
42 horas	12					38.9167	
48 horas	12						41.7500
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 1,750.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12,000

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = .05.

Apéndice 5

Estadístico del metal pesado Cadmio

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	Mórula2	167,875 ^a	23	7.299	175.174	.000
	Blástula2	7147,653 ^b	23	310.768	84.118	.000
	Gástrula2	7219,653 ^c	23	313.898	65.700	.000
	Malformaciones2	1098,542 ^d	23	47.763	38.639	.000
	Muerte2	2866,667 ^e	23	124.638	22.379	.000
Intersección	Mórula2	15.125	1	15.125	363.000	.000
	Blástula2	69130.014	1	69130.014	18711.883	.000
	Gástrula2	25350.014	1	25350.014	5305.817	.000
	Malformaciones2	5565.125	1	5565.125	4502.124	.000
	Muerte2	121032.000	1	121032.000	21731.431	.000
Tratamiento2	Mórula2	15.375	3	5.125	123.000	.000
	Blástula2	2657.375	3	885.792	239.763	.000
	Gástrula2	4604.042	3	1534.681	321.212	.000
	Malformaciones2	607.931	3	202.644	163.936	.000
	Muerte2	1252.778	3	417.593	74.979	.000
Horas2	Mórula2	75.625	5	15.125	363.000	.000
	Blástula2	3826.569	5	765.314	207.153	.000
	Gástrula2	2034.903	5	406.981	85.182	.000
	Malformaciones2	115.458	5	23.092	18.681	.000
	Muerte2	1348.667	5	269.733	48.431	.000
Tratamiento2 * Horas2	Mórula2	76.875	15	5.125	123.000	.000
	Blástula2	663.708	15	44.247	11.977	.000
	Gástrula2	580.708	15	38.714	8.103	.000
	Malformaciones2	375.153	15	25.010	20.233	.000
	Muerte2	265.222	15	17.681	3.175	.001

a. R cuadrado = ,988 (R cuadrado corregida = ,983)

b. R cuadrado = ,976 (R cuadrado corregida = ,964)

c. R cuadrado = ,969 (R cuadrado corregida = ,954)

d. R cuadrado = ,949 (R cuadrado corregida = ,924)

e. R cuadrado = ,915 (R cuadrado corregida = ,874)

Pruebas post hoc tratamiento Cd

Mórula

DHS de Tukey^{a,b,c}

Tratamiento Cd	N	Subconjunto	
		1	2
T3	18	0.0000	
T4	18	0.0000	
T2	18		0.83333333
T1	18		1
Sig.		1.0000	0.0813572

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,042.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = .05.

Blástula

DHS de
Tukey^{a,b,c}

Tratamiento Cd	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
T1	18	24.2778			
T2	18		27.4444		
T3	18			31.7778	
T4	18				40.4444
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 3,694.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = .05.

Gástrula

DHS de
Tukey^{a,b,c}

Tratamiento Cd	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
T4	18	9.0000			
T3	18		14.5556		
T2	18			21.0000	
T1	18				30.5000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 4,778.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = .05.

Malformaciones en el desarrollo embrionario

DHS de
Tukey^{a,b,c}

Tratamiento Cd	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
T4	18	4.6111			
T1	18		8.2778		
T3	18			9.5556	
T2	18				12.7222
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 1,236.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = .05.

Mortalidad

DHS de Tukey^{a,b,c}

Tratamiento Cd	N	Subconjunto		
		1	2	3
T1	18	35.8889		
T2	18		38.0000	
T3	18			44.1666667
T4	18			45.9444
Sig.		1.000	1.000	0.122

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 5,569.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = .05.

Pruebas post hoc horas Cr

Mórula

DHS de Tukey^{a,b,c}

Horas2	N	Subconjunto	
		1	2
18 horas	12	0.0000	
22 horas	12	0.0000	
28 horas	12	0.0000	
42 horas	12	0.0000	
48 horas	12	.0000	
2 horas	12	1	1

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,042.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12,000

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = .05.

Blástula

DHS de Tukey^{a,b,c}

Horas2	N	Subconjunto					
		1	2	3	4	5	6
48 horas	12	20.0000					
42 horas	12		24.3333				
28 horas	12			29.4167			
22 horas	12				34.0833		
18 horas	12					36.5833	
2 horas	12						41.5000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 3,694.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12,000

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = .05.

Gástrula

DHS de Tukey^{a,b,c}

Horas2	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
18 horas	12	11.1667			
2 horas	12	12.5833			
22 horas	12		19.0833		
28 horas	12		20.9167	20.9167	
42 horas	12			22.8333	
48 horas	12				26.0000
Sig.		.611	.328	.281	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 4,778.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12,000

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = .05.

Malformaciones en el desarrollo embrionario

DHS de
Tukey^{a,b,c}

Horas2	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
48 horas	12	7.0000			
42 horas	12	7.8333	7.833333333		
28 horas	12		8.6667	8.66666667	
22 horas	12		8.9167	8.9167	
2 horas	12			9.2500	
18 horas	12				11.0833
Sig.		.453	.181	.792	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 1,236.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12,000

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = .05.

Mortalidad

DHS de
Tukey^{a,b,c}

Horas2	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
2 horas	12	33.8333			
22 horas	12		38		
28 horas	12			41	
18 horas	12			41.1667	
42 horas	12				45
48 horas	12				47.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000	0.317

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 5,569.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12,000

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = .05.