

**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DE UN FLUIDO DE EXPLORACIÓN
OFFSHORE EN LA FECUNDACIÓN DEL ERIZO DE MAR *Lytechinus*
variegatus.**

SANDRA MILENA CERÓN BENAVIDES

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
PASTO, COLOMBIA
2013**

**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DE UN FLUIDO DE EXPLORACIÓN
OFFSHORE EN LA FECUNDACIÓN DEL ERIZO DE MAR *Lytechinus*
variegatus.**

SANDRA MILENA CERÓN BENAVIDES

**Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar al título de
Ingeniero en Producción Acuícola.**

**Directora
MARISOL SANTOS ACEVEDO
Bióloga e Investigadora en INVEMAR**

**Co-directores
ARIEL EMIRO GÓMEZ CERÓN
GLORIA HELENA OSPINA SALAZAR
Biólogos Marinos**

**Asesor estadístico
MARCO ANTONIO IMUES FIGUEROA
Zootecnista.**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
PASTO, COLOMBIA
2013**

“Las ideas y conclusiones aportadas en la Tesis de Grado, son responsabilidad exclusiva de su autor”

Artículo 1ero del acuerdo N° 324 de octubre 11 de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN:

MARISOL SANTOS ACEVEDO. Bióloga
Directora de tesis

ARIEL EMIRO GÓMEZ CERÓN. Biólogo Marino
Co-director de tesis

GLORIA HELENA OSPINA SALAZAR. Biólogo Marino
Co-directora de tesis

JULBRINNER SALAS BENAVIDES Biólogo
Jurado delegado

JUAN JOSÉ LOZADA CASTRO M.Sc., Ph.D.
Jurado

San Juan de Pasto, Septiembre de 2013

DEDICO A:

A Dios, por haberme dado la vida y permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi formación profesional, a mis padres Rosaura Benavides Burgos y Colon Everardo Cerón que han sabido formarme, por su valioso apoyo y lo más importante haberme brindado la posibilidad de realizar mis estudios superiores; a mi hermana Mónica Patricia por su ayuda incondicional, a Ginna Ximena por su colaboración y a mis padrinos por su apoyo facilitando el desarrollo de mi carrera y del presente trabajo fuera de la ciudad.

SANDRA MILENA CERÓN BENAVIDES

“La naturaleza no hace nada superfluo, nada inútil, y sabe sacar múltiples efectos de una sola causa”

Nicolás Copérnico

“Nunca la naturaleza dice una cosa y la sabiduría otra”

Decimus Junius Juvenal

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis más sinceros agradecimientos a:

Marisol Santos Acevedo	Bióloga., Cand. M. Sc. Investigadora INVEMAR
Gloria Helena Ospina Salazar	Bióloga marina., M. Sc. Investigadora INVEMAR
Ariel Emiro Gómez Cerón.	Biólogo Marino., Esp., Docente Ing. Producción Acuícola UDENAR
Marco Antonio Imuez Figueroa	Zoot., Esp., M. Sc. Docente Ing. Producción Acuícola UDENAR
Jorge Nelson López Macías	MVZ., Esp., M. Sc., Sc.D. Director del programa de Ingeniería en producción acuícola
Javier Gómez León	Biólogo marino. Ph.D. Investigador INVEMAR
Katherine Carreño Hernández	Bióloga marina. Auxiliar de investigación INVEMAR
Carlos Puentes Acosta	Químico. Investigador INVEMAR
Johann López Navarro	Ingeniero pesquero. Investigador INVEMAR
Miguel Sánchez Arrieta	Auxiliar de investigación INVEMAR
Marlon Montero Marín	Auxiliar de investigación INVEMAR
Camilo Guerrero Romero	Lennin Ing. Producción Acuícola
Piedad Santacruz	Mejía Secretaria Ing. Producción Acuícola UDENAR
Oscar Iván Santacruz	Mejía Economista UDENAR

Y a todas las personas de la Universidad de Nariño y del Instituto de Investigaciones Marinas José Benito De Andrés-INVEMAR que colaboraron y contribuyeron al desarrollo exitoso de mi trabajo de grado.

CONTENIDO

pág.

INTRODUCCIÓN	20
1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	22
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	23
3. OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GENERAL	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4. MARCO REFERENCIAL	25
4.1 GENERALIDADES DE LOS ERIZOS DE MAR	25
4.1.1 <i>Lytechinus variegatus</i>	26
4.1.2 Fecundación	27
4.2 HIDROCARBUROS	29
4.3 TOXICOLOGÍA	30
4.3.1 Tipos de toxicidad.	31
4.3.2 Valores clave	31
4.3.3 Tóxico de referencia	31
4.3.4 Muestra.	32
4.3.5 Carta control	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS	33
5.1 LOCALIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	33
5.2 INSTALACIONES	33
5.3 MATERIALES, EQUIPOS E INSUMOS	34
5.4 PRINCIPALES PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS CONTROLADOS PARA EL MANTENIMIENTO DE ORGANISMOS EN LABORATORIO....	35
5.5 PLAN DE MANEJO	35
5.5.1 Obtención de reproductores	35
5.5.2 Adecuación de canaletas.	36
5.5.3 Aclimatación y cuarentena.	37
5.5.4 Alimentación	38
5.5.5 Sifoneo.	40
5.6 INDUCCIÓN, OBTENCIÓN Y MANEJO DE GAMETOS	41
5.6.1 Inducción y obtención de gametos	41
5.6.2 Calidad de los gametos	42
5.6.3 Manejo de gametos para el conteo y realización de diluciones.	42
5.7 PROTOCOLO DE FECUNDACIÓN	43
5.7.1 Protocolo de fecundación a diferentes concentraciones espermáticas.	43
5.7.2 Protocolo de fecundación para los ensayos con tóxico de referencia y con lodo	45
5.7.3 Carta control en tóxico de referencia y lodo	47
5.8 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48

5.8.1	Formulación de hipótesis	52
5.9	VARIABLES EVALUADAS	53
5.9.1	Porcentaje de fecundación.....	53
5.9.2	Índice de fecundación (IF).....	53
5.9.3	CE ₅₀	53
6.	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	54
6.1	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ESPERMATOZOIDES APTA PARA OBTENER PORCENTAJES DE FECUNDACIÓN MAYORES AL 85%.....	59
6.2	CONCENTRACIÓN EFECTIVA (CE _{50-60 minutos}) DE SULFATO DE COBRE (CuSO ₄) COMO TÓXICO DE REFERENCIA EN LA FECUNDACIÓN DEL ERIZO DE MAR <i>Lytechinus variegatus</i>	63
6.2.1	Estandarización del protocolo.	63
6.2.2	Supuestos estadísticos.	66
6.2.3	CE ₅₀	67
6.2.4	Carta control.....	67
6.3	CONCENTRACIÓN EFECTIVA 50% (CE _{50-60 minutos}) DEL FLUIDO DE EXPLORACIÓN OFFSHORE EN LA FECUNDACIÓN DEL ERIZO DE MAR <i>Lytechinus variegatus</i>	69
6.3.1	Estandarización del protocolo.	69
6.3.2	Supuestos estadísticos.	74
6.3.3	CE ₅₀	74
6.3.4	Carta control.....	75
6.4	PRINCIPALES PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS REGISTRADOS DURANTE LOS ENSAYOS	77
6.4.1	Para ensayos a diferentes concentraciones espermáticas	77
6.4.2	Para ensayos con tóxico de referencia y lodo.....	77
7.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	87
7.1	CONCLUSIONES.....	87
7.2	RECOMENDACIONES	88
	BIBLIOGRAFÍA	89
	ANEXOS	96

LISTA DE TABLAS

pág.

Tabla 1. Composición nutricional de Cyclop-eeze® y de Ital Mojarra 24®	39
Tabla 2. Concentraciones stock y cantidad del esperma utilizada.....	49
Tabla 3. Concentraciones del tóxico de referencia	50
Tabla 4. Concentraciones de lodo utilizadas	51
Tabla 5. Peso y talla de algunos erizos de mar maduros ingresados al LABBIP...	54
Tabla 6. Alimentación realizada para lotes de <i>Lytechinus variegatus</i>	56
Tabla 7. Mortalidad en los lotes de <i>L. variegatus</i> ingresados al LABBIP	57
Tabla 8. Valores promedio mensuales de temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y pH de seis canaletas.....	58
Tabla 9. Resultados de la CE ₅₀ obtenidos en la fecundación de <i>L. variegatus</i> utilizando sulfato de cobre como tóxico de referencia.	68
Tabla 10. Resultados de la CE ₅₀ obtenidos en la fecundación de <i>Lytechinus</i> <i>variegatus</i> con un fluido de exploración offshore.	76
Tabla 11. Valores de pH, salinidad, oxígeno disuelto y temperatura del AMF+UV utilizada para los ensayos a diferentes concentraciones espermáticas.....	77
Tabla 12. Valores promedio de temperatura a diferentes concentraciones de CuSO ₄ (mg/L) y lodo (%) con su respectivo ± D.E.....	78
Tabla 13. Valores promedio de oxígeno disuelto a diferentes concentraciones del tóxico de referencia y de lodo con su respectivo ± D.E.....	80
Tabla 14. Valores promedio de salinidad a diferentes concentraciones de sulfato de cobre y lodo con su respectivo ± D.E.	83
Tabla 15. Valores promedio de pH a diferentes concentraciones de sulfato de cobre y de lodo con su respectivo ± D.E.....	85
Tabla 16. Parámetros fisicoquímicos durante el mes de noviembre en cada una de las unidades experimentales utilizadas para el mantenimiento de la especie	97
Tabla 17. Parámetros fisicoquímicos durante el mes de diciembre en cada una de las unidades experimentales utilizadas para el mantenimiento de la especie	97
Tabla 18. Parámetros fisicoquímicos durante el mes de enero en cada una de las unidades experimentales utilizadas para el mantenimiento de la especie	97
Tabla 19. Parámetros fisicoquímicos durante el mes de febrero en cada una de las unidades experimentales utilizadas para el mantenimiento de la especie	98
Tabla 20. Parámetros fisicoquímicos durante el mes de marzo en cada una de las unidades experimentales utilizadas para el mantenimiento de la especie.....	98

Tabla 21. Parámetros fisicoquímicos durante el mes de abril en cada una de las unidades experimentales utilizadas para el mantenimiento de la especie	98
Tabla 22. Ensayos a diferentes concentraciones de sulfato de cobre que no produjeron resultados esperados.....	106
Tabla 23. Cuatro ultimo ensayos en los que se encontraron porcentajes de fecundación deseados a fin de encontrar la CE ₅₀ del toxico de referencia en <i>L. variegatus</i>	108
Tabla 24. Once ensayos a diferentes concentraciones del fluido de exploración offshore, en los cuales se obtuvieron resultados esperados y no esperados en cuanto a la fecundación de los gametos del erizo de mar	115
Tabla 25. Tres últimos ensayos de lodo, obteniendo resultados deseados para la fecundación de gametos del erizo de mar <i>L. variegatus</i>	118
Tabla 26. Temperaturas bajas utilizadas antes de realizar ensayos con lodo	122
Tabla 27. Temperaturas altas utilizadas antes de realizar ensayos con lodo	122
Tabla 28. Parámetros fisicoquímicos con respecto a tres ensayos bajo las mismas concentraciones de sulfato de cobre que no produjeron resultados esperados en la fecundación de gametos del erizo de mar <i>L. variegatus</i>	125
Tabla 29. Parámetros fisicoquímicos con respecto a los últimos cuatro ensayos que produjeron resultados esperados respecto a la fecundación	126
Tabla 30. Parámetros fisicoquímicos para ensayos con resultados no esperados de fecundación en gametos del erizo de mar bajo las mismas concentraciones que aquellos que si dieron lo esperado	127
Tabla 31. Parámetros fisicoquímicos para los tres últimos ensayos de los cuales se encontró la CE ₅₀ del fluido de exploración offshore	128
Tabla 32. ANOVA para temperatura de los tres ensayos que no produjeron resultados esperados.....	128
Tabla 33. ANOVA para temperatura de los últimos cuatro ensayos con los cuales se estableció la CE ₅₀	128
Tabla 34. ANOVA para temperatura de los seis primeros ensayos de lodo que no produjeron resultados esperados.....	129
Tabla 35. ANOVA para temperatura de los tres últimos ensayos a concentraciones de 0,01, 0,5, 0,6, 0,8 y 1% de lodo que produjeron resultados esperados	129
Tabla 36. ANOVA para oxígeno disuelto de los tres ensayos que no produjeron resultados esperados.....	129
Tabla 37. ANOVA para oxígeno disuelto los últimos cuatro ensayos con los cuales se estableció la CE ₅₀	129
Tabla 38. ANOVA para oxígeno disuelto de los seis primeros ensayos de lodo que no produjeron resultados esperados.....	130
Tabla 39. ANOVA para oxígeno disuelto de los tres últimos ensayos a concentraciones de 0,01, 0,5, 0,6, 0,8 y 1% de lodo que produjeron resultados esperados	130

Tabla 40. ANOVA para la salinidad de los tres ensayos que no produjeron resultados esperados.....	130
Tabla 41. ANOVA para la salinidad de los últimos cuatro ensayos con los cuales se estableció la CE_{50}	130
Tabla 42. ANOVA para salinidad de los seis primeros ensayos a concentraciones de 0,01, 0,5, 0,6, 0,8 y 1% de lodo que no produjeron resultados esperados	131
Tabla 43. ANOVA para salinidad de los tres últimos ensayos a concentraciones de 0,01, 0,5, 0,6, 0,8 y 1% de lodo que produjeron resultados esperados	131
Tabla 44. ANOVA para pH de los ensayos que no produjeron resultados esperados	131
Tabla 45. ANOVA para pH de los últimos cuatro ensayos con los que se estableció la CE_{50}	131
Tabla 46. ANOVA para pH de los seis primeros ensayos a concentraciones de 0,01, 0,5, 0,6, 0,8 y 1% de lodo que no produjeron resultados esperados	132
Tabla 47. ANOVA para pH de los tres últimos ensayos a concentraciones de 0,01, 0,5, 0,6, 0,8 y 1% de lodo que produjeron resultados esperados	132

LISTA DE FIGURAS

pág.

Figura 1. Distribución de <i>Lytechinus variegatus</i>	27
Figura 2. Espermatozoide de erizo de mar	28
Figura 3. Ovocito de erizo de mar	29
Figura 4. Laboratorio de Bioprospección Marina del INVEMAR	33
Figura 5. Zona de bioensayos en el LABBIP del INVEMAR	34
Figura 6. Lugar de recolección de <i>Lytechinus variegatus</i> (Bahía Chengue; Santa Marta; Colombia)	36
Figura 7. Recolección de <i>L. variegatus</i> en la Bahía Chengue	36
Figura 8. Canaletas para el mantenimiento de <i>L. variegatus</i>	37
Figura 9. Ingreso y aclimatación de erizos	38
Figura 10. Preparación del pellet a base de Ital Mojarra 24 [®] y cyclop-eeze [®]	39
Figura 11. Algas suministradas a los lotes de <i>Lytechinus variegatus</i>	40
Figura 12. Alimentos complementarios para lotes de <i>Lytechinus variegatus</i>	40
Figura 13. Inducción y obtención de gametos del erizo de mar <i>L. variegatus</i>	41
Figura 14. Proceso de fecundación con gametos del erizo de mar <i>L. variegatus</i> . ..	44
Figura 15. Preparación del lodo a una relación 1:9 con AMF+UV	46
Figura 16. Distribución de 5 mL de tóxico de referencia y lodo en cajas Petri	47
Figura 17. Aceptación de diferentes alimentos por parte de <i>L. variegatus</i>	56
Figura 18. Pérdida de púas observada en el erizo de mar	57
Figura 19. Porcentajes de fecundación y sus respectivos errores estándar con diferentes cantidades espermáticas	59
Figura 20. Relación promedio de No. de espermatozoides/porcentaje de fecundación en <i>Lytechinus variegatus</i>	60
Figura 21. Gráfico de cajas y bigotes a diferentes concentraciones espermáticas de <i>L. variegatus</i>	61
Figura 22. Ovocitos en buen estado	62
Figura 23. Concentraciones de CuSO ₄ con un FD de 0,5	63
Figura 24. Estandarización del ensayo para establecer las concentraciones de sulfato de cobre	64
Figura 25. Ovocitos afectados a concentraciones ≥30 mg/L de CuSO ₄	65
Figura 26. Ensayos definitivos con el tóxico de referencia	65
Figura 27. Índice de fecundación promedio a diferentes concentraciones de CuSO ₄ en <i>L. variegatus</i>	66
Figura 28. Gráfico de cajas y bigotes para las diferentes concentraciones de CuSO ₄ (mg/L)	67
Figura 29. Carta control para la fecundación en <i>Lytechinus variegatus</i> con sulfato de cobre como tóxico de referencia	68
Figura 30. Primer ensayo con un FD 0,5 para las diferentes concentraciones del lodo (%)	69

Figura 31. Ensayos a concentraciones menores del 3%	70
Figura 32. Ovocitos no fecundados y afectados a concentraciones $\geq 1\%$ de lodo ..	71
Figura 33. Ensayos con fluido de exploración offshore a concentraciones $< 3\%$..	71
Figura 34. Ensayos definitivos realizados a diferentes concentraciones del lodo..	73
Figura 35. Índice de fecundación promedio obtenido con diferentes concentraciones de lodo para <i>L. variegatus</i>	74
Figura 36. Gráfico de cajas y bigotes para el índice de fecundación en ensayos con fluido de exploración offshore	75
Figura 37. Carta control para la fecundación en gametos del erizo de mar <i>L. variegatus</i> con un fluido de exploración offshore	76
Figura 38. Temperatura promedio y su error estándar en las diferentes concentraciones de CuSO_4 (mg/L)	79
Figura 39. Temperatura promedio y su error estándar en las diferentes concentraciones de lodo	79
Figura 40. Oxígeno disuelto promedio y su error estándar a diferentes concentraciones de CuSO_4 (mg/L)	81
Figura 41. Oxígeno disuelto promedio y su error estándar a diferentes concentraciones de lodo	82
Figura 42. Salinidad promedio en cada concentración del tóxico de referencia, acompañado del $\pm$ D.E.	83
Figura 43. Salinidad promedio y su $\pm$ D.E. en cada concentración del lodo	84
Figura 44. pH y $\pm$ D.E. en ensayos con CuSO_4 sobre la fecundación de gametos en <i>L. variegatus</i>	85
Figura 45. pH y $\pm$ D.E. en ensayos con lodo sobre la fecundación de gametos en <i>L. variegatus</i>	86

LISTA DE ANEXOS

pág.

Anexo 1. Parámetros fisicoquímicos evaluados en el mantenimiento de <i>L. variegatus</i>	97
Anexo 2. Diagrama del protocolo para la elaboración de bioensayos de toxicidad en gametos del erizo de mar <i>Lytechinus variegatus</i>	99
Anexo 3. Porcentajes de fecundación y su respectivo error estándar a diferentes cantidades espermáticas	100
Anexo 4. Patología presentada en el laboratorio de Bioprospección Marina y Costera del INVEMAR	101
Anexo 5. Porcentajes de fecundación a diferentes cantidades espermáticas en los ensayos 1 y 2.	103
Anexo 6. ANOVA realizado para índice de fecundación por tratamiento para dos ensayos a diferentes cantidades espermáticas	105
Anexo 7. Prueba de Múltiples rangos para índice de fecundación por No. de espermatozoides (prueba de Duncan)	105
Anexo 8. Porcentaje e índice de fecundación a diferentes concentraciones de CuSO_4 con su respectivo error estándar en trece ensayos	106
Anexo 9. ANOVA para Aseno IF	113
Anexo 10. Suma de cuadrados de tipo II	113
Anexo 11. Comparación múltiple para asenoif por concentración (Prueba de Tukey)	113
Anexo 12. Análisis Spearman-karber	114
Anexo 13. Porcentaje e índice de fecundación para diferentes concentraciones en ensayos con el lodo	115
Anexo 14. Modificación de la temperatura cinco días previos a cada ensayo con el fluido de exploración offshore	122
Anexo 15. ANOVA; para el Índice de fecundación	122
Anexo 16. ANOVA; suma de cuadrados tipo II	123
Anexo 17. Prueba de Tukey HSD para IF por concentración para lodo	123
Anexo 18. Supuestos estadísticos para tóxico de referencia y fluido de exploración offshore	123
Anexo 19. Análisis Probit; pruebas de razón de verosimilitud	123
Anexo 20. Análisis Probit; tabla de predicciones inversas para concentración	124
Anexo 21. Registro de temperatura ambiente para cuatro ensayos con toxico de referencia	125
Anexo 22. Parámetros fisicoquímicos registrados para siete ensayos bajo las mismas concentraciones con tóxico de referencia	125
Anexo 23. Temperatura ambiente en la realización de tres ensayos con lodo	126
Anexo 24. Parámetros fisicoquímicos en ensayos de lodo con resultados esperados y no esperados bajo las mismas concentraciones.	127

pág.

Anexo 25. ANOVA para temperatura con tóxico de referencia.....	128
Anexo 26. ANOVA para temperatura con lodo	129
Anexo 27. ANOVA en oxígeno disuelto con tóxico de referencia	129
Anexo 28. ANOVA para oxígeno disuelto con lodo.....	130
Anexo 29. ANOVA en salinidad con tóxico de referencia	130
Anexo 30. ANOVA para salinidad con lodo	131
Anexo 31. ANOVA en pH con tóxico de referencia.....	131
Anexo 32. ANOVA para pH con lodo	132

GLOSARIO

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.

CARTA CONTROL: es un gráfico usado para seguir cambios a través del tiempo del punto final medido para un compuesto, utilizando un tóxico de referencia o muestra. En el eje x se grafica la fecha de ensayo y en el eje y la concentración tóxica efectiva.

CONTAMINANTE: sustancia ajena a un sistema natural en cierta concentración, que se presenta generalmente por causa de actividad antrópica directa o indirecta.

CONTROL NEGATIVO: es el tratamiento que en una investigación duplica todos los factores que puedan afectar el resultado, excepto la condición que está siendo investigada.

CONTROL POSITIVO: evaluación de la respuesta tóxica con una sustancia de referencia, utilizada para controlar la sensibilidad de los organismos en el momento en el cual se evalúa el material problema.

CE₅₀: concentración del material en agua, suelo o sedimento que se estima afecta al 50% de los organismos de ensayo.

ECOTOXICOLOGÍA: estudia y analiza los efectos de agentes químicos y físicos sobre organismos vivos, con particular atención a poblaciones y comunidades de ecosistemas definidos.

EFFECTOS AGUDOS: Es la respuesta que se produce tras una exposición aguda, y pueden ser reversibles o irreversibles.

EXPOSICIÓN AGUDA: exposición de corta duración (horas, días).

ENSAYO DE TOXICIDAD: determinación del efecto de un material o mezcla sobre un grupo de organismos seleccionados bajo condiciones definidas. Mide el efecto luego de la exposición a la muestra.

ÍNDICES DE TOXICIDAD: expresan los resultados de diferentes ensayos de toxicidad como un único valor numérico que clasifica a la muestra. No existen reglas fijas para la designación de los índices.

PROTOCOLO: conjunto de procedimientos explícitos para un ensayo o experimento, de acuerdo con lo establecido entre las partes y descrito en un documento.

PUNTO FINAL: medida o valor que expresa el resultado de un ensayo ($CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$). 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.

TIEMPO DE LATENCIA: es el tiempo que transcurre entre la primera aplicación y la aparición de un efecto o respuesta observable.

TOXICIDAD: la capacidad intrínseca que posee un agente químico a producir efectos adversos.

XENOBIÓTICO: sustancia extraña al organismo.

POLISPERMIA: penetración de más de un espermatozoide dentro del ovocito en el proceso de fecundación.

RESUMEN

Actualmente la industria petrolera está interesada en conocer los efectos que pueden ocasionar sustancias producto de sus actividades en áreas marinas, particularmente frente a organismos nativos de las zonas de influencia, razón por la cual se seleccionó el bioensayo de fecundación del erizo de mar *Lytechinus variegatus*; organismo que además de ser autóctono del Caribe colombiano presenta alta sensibilidad en el desarrollo de ensayos frente a diferentes tóxicos, tiene amplia distribución geográfica, es de fácil recolección y mantenimiento en laboratorio; con el fin de estandarizar un protocolo que permita cuantificar los efectos adversos de los fluidos producto de aquellas actividades, direccionado a minimizar el impacto sobre el ecosistema y que permita a quien corresponda valorar los efectos y tomar medidas precautelatorias.

El objetivo principal de este proyecto fue cuantificar la toxicidad aguda (CE_{50}) de un fluido de exploración offshore en la fecundación de gametos en erizo de mar *Lytechinus variegatus*, para lo cual se estandarizó el protocolo de obtención de gametos y el de fecundación, con el fin de realizar los ensayos que permitan evaluar la toxicidad de una sustancia que entra en contacto con el ambiente marino del Caribe colombiano, en especial con miras a la aplicación de una muestra producto de la exploración offshore, en los bioensayos también se incluye la estandarización con el tóxico de referencia el cual se utiliza para garantizar y validar los resultados.

En el proceso de fecundación se determinó, que al fertilizar 2.000 ovocitos, con 50.000.000 espermatozoides en una relación ovocito: espermatozoide 1:25.000 se obtienen porcentajes mayores al 85%, porcentaje mínimo recomendado para este tipo de ensayos con otras especies de erizo de mar. Para los ensayos de fecundación se contaron 200 ovocitos (10%) en cada una de las réplicas para determinar el grado de afectación del tóxico de referencia o del lodo. El porcentaje de fecundación arrojó un valor de CE_{50} para el sulfato de cobre de $20,45 \pm 1,90$ mg/L y de lodo $0,36 \pm 0,044\%$, este valor tomado a partir de una solución madre, preparada a una relación lodo-agua de 1:9.

Los resultados muestran el alto grado de sensibilidad de los gametos del erizo de mar *Lytechinus variegatus* a la acción del lodo de perforación para exploración offshore de hidrocarburos.

ABSTRACT

Actually the oil industry is interested in knowing the effects produced by their activities in marine areas, particularly, against to native organisms in the area of influence, for that reason in this research was selected the bioassay of sea urchin *Lytechinus variegatus* fecundation, which is a Colombian Caribbean native organism, with high sensitivity in the development of assays against different toxics, it has a wide geographic distribution, is easy to collect and maintain in laboratory. This study allows standardizing a protocol which makes it possible to quantify the side effects of those oil activities addressed to minimize the impact on those ecosystems, and inform people in charge of them to take the appropriate precautionary measures to assess its effects.

The main objective of this project was to quantify the acute toxicity (CE_{50}) of a fluid used in offshore exploration on sea urchin's *Lytechinus variegatus* gametes fecundation, for which it was necessary to standardize the obtaining of gametes and fecundation protocol, in order to perform tests for evaluating the toxicity of a substance which comes into contact with the Colombian Caribbean marine environment, especially with the aim of applying it to the samples of the hydrocarbons exploration offshore. The bioassay includes the standardization with the toxic of reference which is used to guarantee and validate its results.

In the fecundation process it was determined, that when fertilizing 2.000 oocytes at 50.000.000 sperm and in a relationship oocyte:sperm 1:25.000 obtained fecundation percentages greater than 85%, which is the minimum percentage recommended for this type of assays with other sea urchin species. For the fecundation assays, it was counted 200 oocytes (10%) in each replicate in order to determine the degree of affectation of the reference toxic or mud. The fecundation percentage gave a CE_{50} copper sulphate value of $20,45 \pm 1,90$ mg/L and $0,36 \pm 0,044\%$ for mud, this value was taken from a stem solution prepared according to a mud-water relationship of 1:9.

The results show a high sensitivity degree on sea urchin *Lytechinus variegatus* gametes to drilling mud action to offshore hydrocarbon exploration.

INTRODUCCIÓN

El erizo de mar *Lytechinus variegatus* es una especie autóctona del Caribe colombiano, sus gónadas son apetecidas en muchos países, entre ellos Venezuela; la especie es relativamente abundante y se caracteriza por ser de fácil manipulación, pero también evidencia alta sensibilidad frente a agentes externos, tales como el alimento suministrado, la densidad y la calidad fisicoquímica del medio en el que se encuentre. El cultivo de esta especie en Colombia no se ha desarrollado, por ende cualquier actividad o estudio está expuesta a obtener altas mortalidades, todo debido al desconocimiento de su comportamiento en el medio natural, así como frente a agentes extraños y a cualquier actividad de intervención humana, por ejemplo a lodos de perforación utilizados por empresas petroleras.

Dávila y Forero¹ definen a los lodos como fluidos de exploración offshore y se utilizan dentro de la perforación para enfriar y lubricar brocas, transportar o circular los cortes de roca desde el fondo del pozo hasta la superficie y equilibrar hidrostáticamente la columna del fluido de perforación, de manera que se contrarreste la presión ejercida hacia arriba por los fluidos de las formaciones que se perforan. La composición de los mismos ha variado hasta la actualidad, la gran mayoría son artificiales y se aplican a condiciones especiales de los pozos, cuyos costos son considerables.

El manejo inadecuado de los lodos dentro de las actividades de perforación puede ocasionar derrames al medio, afectando la vida y bienestar de muchas especies acuáticas. Para evaluar el efecto de estos lodos se emplean bioensayos ecotoxicológicos, con los cuales se determina el nivel de toxicidad exponiendo organismos a una serie de diluciones del lodo a evaluar, teniendo como base ensayos previos que indiquen que tan sensible es el organismo acuático y cómo se comporta frente a otros tóxicos.

La resolución No. 1315 del MAVDT² menciona que se deben realizar los ensayos toxicológicos según el programa de monitoreo de lodos y cortes de perforación, en el cual se debe presentar laboratorio y las especies a utilizar. Especifica que las pruebas de toxicidad del fluido de exploración offshore son herramientas adecuadas para determinar el efecto del agente toxico en organismos bajo

¹DÁVILA, Eric y FORERO, Clemente. La innovación y el aprendizaje tecnológico en la historia de Ecopetrol. En: ECOPETROL. Villegas editores. 2011. p. 113-230.

²COLOMBIA. Ministerio de Ambiente, Vivienda, y Desarrollo Territorial (MAVDT). Resolución No. 1315. "Por la cual se otorga una licencia ambiental y se toman otras determinaciones".Junio.2011.pp. 26-95.

condiciones controladas, los organismos para realizar los bioensayos de acuerdo con esta resolución son los misidáceos de la clase *Malacostraca* y erizos de mar de la especie *Lytechinus variegatus*, los cuales presentan alta distribución en el Caribe colombiano pero sin reportes respecto a pruebas de toxicidad. De aquí el interés por realizar pruebas con una especie propia del territorio, de gran abundancia y que puede ser afectada frente a la exposición de lodos de perforación en nuestro país.

Para la realización de los ensayos primero es necesario desarrollar la estandarización de cada una de las actividades, es decir; el proceso debe estar claramente establecido para garantizar la validez de los resultados. Los ensayos ecotoxicológicos tienen como objetivo principal establecer el daño potencial que sobre una especie puede ocasionar el lodo de exploración al entrar en el ambiente marino; efecto que puede ser extrapolado al ecosistema y al ser humano a mediano y/o largo plazo.

1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

En la actualidad, debido a los avances en la industria petrolera y a los estudios de factibilidad para la obtención de hidrocarburos del mar, se ha generado una nueva tendencia que implica estudiar el lecho marino y sus ecosistemas con el fin de tratar de cuantificar el efecto de los procesos de obtención de estos hidrocarburos en los organismos autóctonos y minimizar las actividades que puedan ser altamente dañinas. Se deberían realizar valoraciones costo-beneficio, medir los impactos de las actividades petroleras aguas afuera, generar resultados que sirvan a las entidades encargadas como el MAVDT, las CAR, DIMAR, y a las empresas de exploración offshore en general para implementar las medidas de uso, prevención o restauración adecuadas para la conservación del recurso, el cual modificado altera el equilibrio natural del ecosistema y/o de la cadena trófica.

En este momento existen metodologías estandarizadas a nivel mundial para evaluar toxicidad aguda, como el que menciona Fuentealba, *et al.*³ en *Diplodon chilenses*, pero ninguna para evaluar con gametos del erizo de mar *Lytechinus variegatus* la concentración a la cual un fluido de exploración offshore produce un efecto adverso sobre el 50% de la población en breve periodo de tiempo, en el ambiente acuático marino del Caribe colombiano; aunque ha sido utilizado en pruebas anteriores por Newmark, *et al.*⁴ para evaluar el efecto sobre la mitosis de sustancias obtenidas de organismos marinos con el fin de determinar el potencial anticancerígeno de los mismos. La especie es parte del grupo de los Equinodermos y como manifiesta Guirao, *et al.*⁵ se considera dentro de los escasos grupos aceptados internacionalmente para su utilización en test de toxicidad, de ahí otra razón por la cual se la utiliza en este trabajo.

³FUENTEALBA, Carmen. SILVA, Jeannette. BAY-SCHMITH, Enrique y LARRAIN, Alberto. Standarization of the acute toxicity bioassay with *Diplodon chilenses* using a reference toxicant. Universidad de Concepción, Chile.2007. pp. 1-7.

⁴NEWMARK, F. SANTOS-ACEVEDO, M. CHAVES, A. MORA, J. ARIAS, J. y S. ZEA. Manual de métodos de Bioactividad. INVEMAR. Mayo. 2005. p.28.

⁵GUIRAO MARÍN, L. VITA, R. MARÍN, A y A, Cesar. Sensitivity of Mediterranean amphipods and sea urchins to reference toxicants. En: Ciencias Marinas. 2002. Vol. 28, no. 4. p. 3.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Debido a la escasa información acerca de la toxicidad presentada por fluidos de exploración offshore sobre especies autóctonas del Caribe colombiano, surge la necesidad de estandarizar ensayos con dichos organismos, en este caso se seleccionó el ensayo de fecundación con gametos del erizo de mar *Lytechinus variegatus*, identificando mediante pruebas de toxicidad aguda la CE_{50} , es decir la concentración de un tóxico que se puede pronosticar causará un efecto definido en el 50% de una población dada bajo condiciones controladas.

Con base en los anteriores argumentos, se ha formulado la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la concentración efectiva media (CE_{50}) de un fluido producto de la exploración offshore que afecta el 50% de la normal fecundación (>85%), equivalente a un índice del 0,5 en gametos del erizo de mar *Lytechinus variegatus* en pruebas de laboratorio?

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la CE_{50} de un fluido de exploración offshore sobre la fecundación de gametos de erizo de mar *Lytechinus variegatus* en condiciones de laboratorio.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Determinar la concentración de espermatozoides que garantice porcentajes de fecundación mayores al 85% mediante la realización del protocolo de fecundación para *L. variegatus* en condiciones controladas de laboratorio.

3.2.2 Calcular la CE_{50} de un tóxico de referencia que afecte la fecundación de gametos en el erizo de mar *L. variegatus* en un 50%.

3.2.3 Establecer la CE_{50} de un fluido de exploración offshore que afecte en un 50% la fecundación en gametos del erizo de mar *L. variegatus*.

4. MARCO REFERENCIAL

El ser humano ha utilizado sustancias de origen tanto animal como vegetal para lograr objetivos como la caza de su alimento, objetivos en los que ha trabajado con la finalidad de mejorar su estilo de vida y desde 1850 ha desarrollado anestésicos y desinfectantes dando comienzo a una rama llamada toxicología moderna, la cual los últimos 30-50 años ha manifestado según Hernández⁶ su máximo desarrollo. De acuerdo con Peña, *et al.*⁷ el propósito principal de esta rama es obtener información para lograr la protección de organismos acuáticos frente a los desechos tóxicos. La información menciona Rivera⁸ que se obtiene mediante pruebas, ensayos y/o estudios y será validada solo si se han llevado a cabo con los principios de unas Buenas Prácticas en Laboratorio (BPL).

Arévalo, *et al.*⁹ sostiene que es de gran importancia el organismo objeto de estudio, el cual debe contar con una probada sensibilidad ante la presencia de tóxicos en su medio y a su vez manifestar una respuesta biológica concreta y/o específica, es por esta razón que se seleccionó para evaluar los potenciales efectos tóxicos en aguas colombianas a *Lytechinus variegatus*, ya que gametos de erizos de mar se han utilizado en la realización de bioensayos para evaluar los efectos biológicos de diferentes agentes como lo mencionan Böttger y McClintock¹⁰.

4.1 GENERALIDADES DE LOS ERIZOS DE MAR

“Los erizos de mar son animales que se caracterizan por tener testas redondas, esféricas u ovaladas radicalmente simétricas, con anatomía plana, con placas unidas en los bordes y la presencia de espinas largas, cortas, o ambas alrededor

⁶HERNANDEZ, Jesús. Introducción a la Toxicología. *En*: Toxicología alimentaria diplomatura de nutrición humana y dietética. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. 2011. p. 2.

⁷PEÑA, Carlos. CARTER, Dean y FIERRO, Félix. Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. *En*: Toxicología Ambiental. The University of Arizona. México. 2001. p. 194.

⁸RIVERA, Beatriz. La Aplicación de los Principios de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL). Entidad Nacional de Acreditación ENAC. CI-ENAC-BPL Rev.2. Madrid. Enero. 2008. p.2.

⁹AREVALO, V. INDA, F. BAY-SCHMITH, E y LARRAÍN, A. Bioensayo de fertilización con erizo de mar (*Arbacia spatuligera*) para fiscalizar la maniobra de recambio de lastre limpio en los buques. *En*: Revista Ciencia y Tecnología del Mar. 2001.p.67.

¹⁰BÖTTGER, S. Anne. MCCLINTOCK, James B. The effects of organic and inorganic phosphates on fertilization and early development in the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea) *En*: Comparative Biochemistry and Physiology Part C. USA. 2001. pp.1-2.

de toda su testa”¹¹. Pertenecen al Phylum Echinodermata, según Benavides, *et al.*¹² es un grupo muy diversificado de metazoos, cuya clasificación taxonómica está bien definida.

4.1.1 *Lytechinus variegatus*. Esta especie de erizo de mar de acuerdo con Espinoza, *et al.*¹³, se ubica taxonómicamente así:

Phylum	Echinodermata
Clase	Echinoidea
Género	<i>Lytechinus</i>
Especie	<i>Lytechinus variegatus</i> (Lamarck, 1816).

Según el mismo autor¹⁴, García y Criales¹⁵, Gómez¹⁶ y Watts, *et al.*¹⁷ *L. variegatus* se encuentra en aguas tranquilas, generalmente sobre pastos marinos los cuales hacen parte de su dieta, por ser una especie omnívora en ambientes cercanos a la costa, se alimenta comúnmente de *Thalassia testudinum* pero puede consumir gran variedad de algas marinas y alimentos de origen animal. Se distribuye desde el sureste de Estado Unidos hasta Brasil; incluyendo el mar Caribe colombiano (Figura 1).

¹¹BORRERO, Giomar Helena; SOLANO, Oscar David y BENAVIDES, Milena. Lista revisada de los erizos (Echinodermata: Echinoidea) del Mar Caribe colombiano. En: Biota Colombiana. 2002. Vol. 3, número 1. p.2.

¹²BENAVIDES SERRATO, Milena. BORRERO PÉREZ, Giomar Elena y DIAZ SANCHEZ, Christian Michael. Equinodermos del Caribe colombiano I: Crinoidea, Asteroidea, y Ophiuroidea. Museo de Historia Natural Marina de Colombia. Series de Publicaciones Especiales de Invemar 22. Santa Marta. 2011. p.19.

¹³ESPINOZA G, R.A. REYES, J.L. HIMMELMAN, J.H. y LODEIROS, C. Actividad reproductiva de los erizos *Lytechinus variegatus* y *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea) en relación con factores ambientales en el Golfo de Cariaco, Venezuela. En: Revista de Biología Tropical. 2008. Vol. 56.p.1.

¹⁴ *Ibíd.*, p.1.

¹⁵GARCÍA, Camilo y CRIALES, María. Primera evaluación de la respiración de *Lytechinus variegatus*(Echinodermata: Echinoidea) en la bahía de Chengue, Parque Nacional Tayrona, Caribe colombiano. En: Revista Académica Colombiana de Ciencias. 2005. Vol. XXIX. No. 110.2005.p. 2.

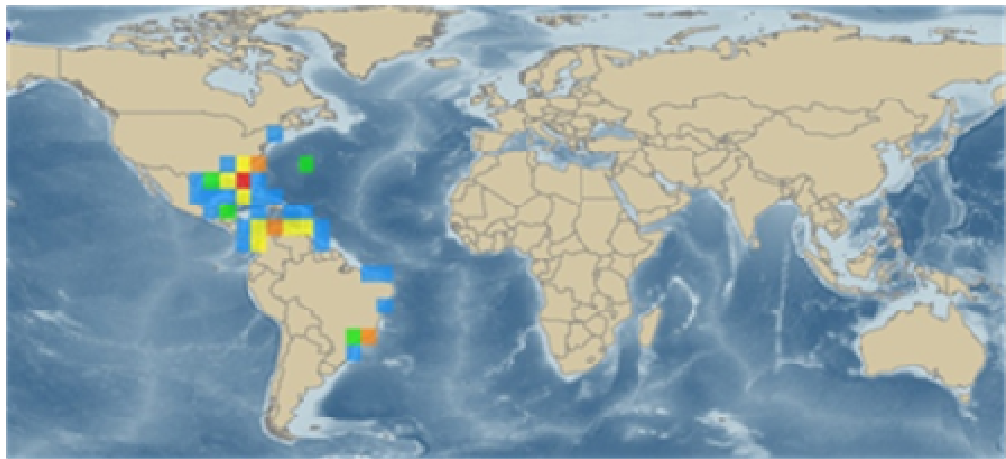
¹⁶GOMEZ, Alfredo. Diámetro-peso y proporción cromática del erizo *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Toxopneustidae) en las Islas Margarita y Cubagua, Venezuela. En: Revista de Biología Tropical. 2003. Vol 51, Supl. 4. p.1.

¹⁷WATTS, Stephen. McCLINTOCK, James y LAWRENCE, John. The ecology of *Lytechinus variegatus*. Department of biology, University of Florida y Alabama.2001. pp.380-381.

Domínguez, *et al.*¹⁸ mencionan que es una especie con alta importancia comercial y por su rápido crecimiento y maduración se podrían ejecutar estudios, desarrollando técnicas de cultivo para uso, conservación y repoblación.

Lytechinus variegatus en el medio natural prefiere ciertos rangos en cuanto a parámetros fisicoquímicos se refiere, como lo mencionan Montealegre y Gómez¹⁹ y Gómez²⁰ la existencia de la especie se da en lugares con temperatura de 24 a 30°C, salinidades de 35 a 37 ups y oxígeno disuelto entre 2,72 a 5,16 mg/L.

Figura 1. Distribución de *Lytechinus variegatus*



Tomada de www.iobis.org/mapper/?taxon=Lytechinus+variegatus

4.1.2 Fecundación. *Lytechinus variegatus* se caracteriza según Benavides, *et al.*²¹ por ser dioico, no tener dimorfismo sexual, fecundación externa la cual se realiza mediante la unión de dos gametos; espermatozoide y ovocito.

¹⁸DOMINGUEZ, Astrid. ROSAS, Jesús. VELÁZQUEZ, Aidé. CABRERA, Tomas y MATA, Ernesto. Desarrollo, Supervivencia y crecimiento del erizo *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata: Echinoidea) alimentado con microalgas a dos salinidades y temperaturas diferentes. En: Revista de Biología Marina y Oceanografía. Abril.2007.p.2.

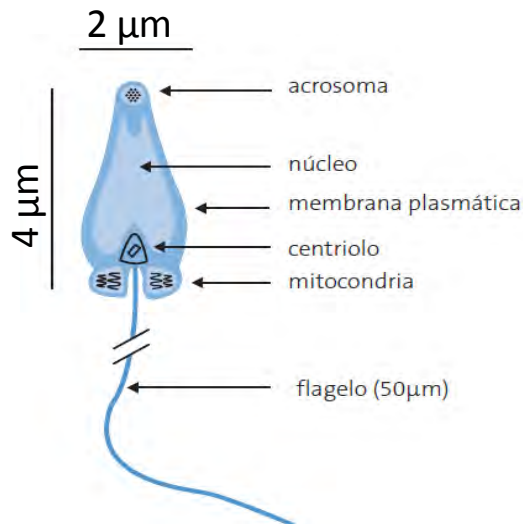
¹⁹MONTEALEGRE QUIJANO, Santiago y GÓMEZ GASPAS, Alfredo. Ciclo reproductivo de *Lytechinus variegatus* (Echinoidea :Toxopneustidae) en el sur de Isla Margarita, Venezuela. En: Rev. Biol. Trop. December, 2005. Vol. 53. no 3. pp.307.

²⁰GÓMEZ GASPAS, Alfredo. Abundancia de *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Toxopneustidae) en la Isla de Cubagua, Venezuela. En:Rev. Bio. Trop. Agosto, 2000. Vol. 48. no 1. p.3.

²¹BENAVIDES SERRATO, Milena. BORRERO PÉREZ, Giomar Elena y DIAZ SANCHEZ, Christian Michael. Op. cit., p.21.

Según Darszon²² el espermatozoide del erizo de mar es una célula especializada, constituida como cualquier otro espermatozoide por dos partes; una cabeza y un flagelo (Figura 2), la primera contiene enzimas hidrolíticas que ayudan al espermatozoide a atravesar al ovocito, contiene el núcleo, la vesícula acrosomal y un centriolo. Su movimiento flagelar esta generado por el axonema, complejo aparato formado por proteínas como las tubulinas y las dinein-ATPasas. Sus movimientos están regulados por la composición del medio y especialmente por el Ca^{2+} . Dentro de la gónada se presenta una alta concentración de CO_2 que hace que el semen mantenga un pH de 7.2 impidiendo la movilidad de los espermatozoides. Una vez liberados al agua de mar, el CO_2 desciende y el pH es alcalinizado activando la dineína, permitiendo a su vez la respiración mitocondrial y su movilidad.

Figura 2. Espermatozoide de erizo de mar



Tomada
de: www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_03.pdf

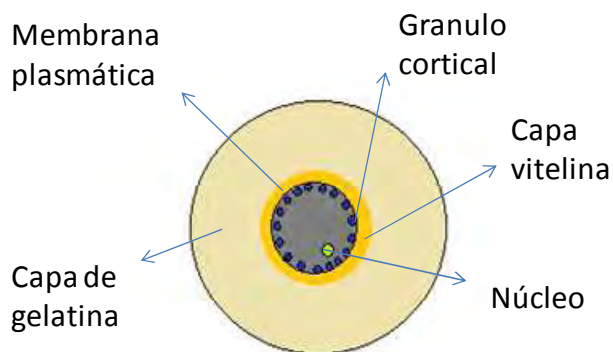
De acuerdo con el mismo autor²³ el ovocito es una célula de mayor tamaño que el espermatozoide, tiene un tamaño de 100 μm aproximadamente, su estructura es mucho más compleja, necesaria para la formación del nuevo individuo. Está compuesto por una membrana plasmática y dos capas externas, la más externa es de gelatina y la siguiente la capa vitelina formada por glicoproteínas (Figura 3). El polímero sulfato fucosa (FSP) es el responsable de los cambios morfológicos y

²² DARSZON, Alberto. Canales, iones y cómo el espermatozoide interpreta los mensajes del óvulo. *En: Biotecnología*. Noviembre. 2007. Vol 14. pp. 31-33.

²³ *Ibíd.*, p.6.

fisiológicos que ocurren en el espermatozoide y la capa de gelatina por contener péptidos, es la responsable de producir efectos en la fisiología del espermatozoide ya que lo preparan y lo guían hacia el ovocito.

Figura 3. Ovocito de erizo de mar



Tomada de
www.revistaequim.com/numeros/17/erizo.htm

Uno de los posibles resultados dentro de la fecundación es la polispermia, es decir la unión de un ovocito con varios espermatozoides, fenómeno que se presenta cuando la concentración de espermatozoides es muy alta con relación a la cantidad de ovocitos.

Wolpert, *et al.*²⁴ mencionan que para evitar la polispermia existe una reacción cortical dentro del proceso de fecundación; la cual consiste en que los gránulos corticales unidos a la membrana plasmática liberan su contenido para unirse con la membrana vitelina y formar una membrana más resistente que luego se separa del huevo recién formado y evita el ingreso de más espermatozoides.

4.2 HIDROCARBUROS

Con base en estudios²⁵ y publicaciones²⁶ se ha determinado que el petróleo crudo y las fracciones que provienen de él, están conformados por moléculas

²⁴WOLPERT, Lewis. SMITH, Jim. JESSELL, Tom. LAWRENCE, Peter. ROBERTSON, Elizabeth. MEYEROWITZ, Elliot. Reacción cortical por la fecundación en el erizo de mar. En: Principios del desarrollo. 3ra edición. Editorial Médica Panamericana. España. 2010. p. 434.

²⁵ Cámara Argentina del gas natural comprimido. HIDROCARBUROS. Contenidos Didácticos. Secretaría de energía de Argentina. Argentina. 2008. pp.2-33.

denominadas hidrocarburos y pueden ser solubles entre sí en todas las proporciones, estas moléculas son contaminantes y ponen en riesgo a quien entre en contacto con ellas, este es el caso de los ecosistemas marinos y particularmente de los organismos, los cuales puede presentar como respuesta a esta contaminación efectos agudos o crónicos dependiendo de factores como el tipo de hidrocarburo derramado, tipo de fluido de exploración utilizado, volumen del mismo y las características físicas del ambiente; en consecuencia, la contaminación por hidrocarburos o el proceso de exploración pueden producir efectos directos en los organismos como la muerte, efectos a corto o mediano plazo por cubrimiento, asfixia, contacto o exposición al tóxico, destrucción de fuentes básicas de alimento, rompiendo la cadena alimenticia, perjudicando desde su sistema inmunológico hasta el funcionamiento y dinámica normal de organismos y ecosistemas. En pocas palabras se puede manifestar que si bien el ambiente marino posee una gran capacidad de depuración también como todo ecosistema tiene sus límites de tolerancia, por lo que la introducción de sustancias químicas como el petróleo y sus derivados alteran dicho equilibrio y la resiliencia del ecosistema.

4.3 TOXICOLOGÍA

De acuerdo a Silbergeld²⁷ la toxicología se encarga de identificar y cuantificar los efectos adversos asociados a la exposición de agentes físicos, elementos o compuestos químicos sobre un tipo de organismo, población o ecosistema, su objetivo según Jakubowski²⁸ es mejorar la limitación sustancial de los efectos que tiene sobre la salud la exposición a esos agentes peligrosos en el ambiente.

Conforme a esta terminología “el efecto adverso es el cambio en la morfología, fisiología, crecimiento, desarrollo o tiempo de vida de un organismo que tiene como resultado un deterioro de la capacidad de compensar un aumento de la susceptibilidad a los efectos nocivos de otras influencias ambientales, cuya valoración requiere el juicio de un experto”²⁹.

²⁶ HARO, Cristian. Efectos de los derrames de hidrocarburos. Fundación Cethus Argentina. Disponible en Internet:< http://www.cethus.org/mar_limpio/impacto_s4.html>

²⁷ SILBERGELD, Ellen. Introducción. Toxicología; Herramientas y enfoques. En: Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Madrid: Jeanne MagerStellman,1998. p.1427.

²⁸ JAKUBOWSKI, Marck. Órgano Diana y efectos críticos. Toxicología; Herramientas y enfoques. En: Enciclopedia de Salud en el trabajo. Madrid: Jeanne Mager Stellman,1998. p.1441.

²⁹ Ibíd., p.16.

En opinión de Díaz, *et al.*³⁰ una prueba de toxicidad implica un estímulo y un sujeto sobre el cual se va a evaluar determinada respuesta, la magnitud del estímulo se puede medir con una concentración y la del sujeto con la ocurrencia de algún fenómeno, como la disminución del crecimiento, infecundidad, o incluso la muerte. La información obtenida permite la cuantificación de la relación de dos variables (dosis-respuesta). El mismo autor también señala que la variación en los ensayos puede suceder dentro y entre los ensayos; debido a errores en las diluciones, al medir volúmenes, en el conteo, por las condiciones de los organismos, entre otras.

4.3.1 Tipos de toxicidad. De acuerdo con Ronco, *et al.*³¹ existen dos tipos de toxicidad: aguda, que consiste en detectar efectos adversos que ocurren sobre organismos de ensayo en una prueba durante un periodo de exposición relativamente corto y por su parte, la toxicidad crónica, que son los efectos adversos que ocurren a largo plazo como resultado de dosis repetidas con una sustancia química sobre la mayor parte de vida de un organismo, afectando su metabolismo, crecimiento, o capacidad de supervivencia.

4.3.2 Valores clave. En los ensayos toxicológicos de acuerdo con Díaz, *et al.*³² y la U.S EPA³³ se puede establecer la CE₅₀ como parámetro para obtener un valor clave sobre el efecto adverso de un tóxico, lo anterior mediante una respuesta discreta en un 50% del material de prueba. El valor de la CE₅₀ se puede obtener utilizando métodos estadísticos como el Probit, Spearman-Kärber, etc.

4.3.3 Tóxico de referencia. De acuerdo con Díaz, *et al.*³⁴ es un compuesto de origen químico orgánico o inorgánico de pureza mayor al 99%, con el cual se pueden realizar pruebas de toxicidad con el fin de establecer un intervalo de concentración del compuesto seleccionado que produce un efecto esperado.

³⁰DÍAZ, María. ROSSINI, Gustavo y GRANADOS, Yolanda. Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad. En: Ensayos toxicológicos y Métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización Intercalibración, Resultados, y Aplicaciones. México: Gabriela Castillo Morales, 2004.p.100.

³¹ RONCO, Alicia. DÍAZ, María y GRANADOS, Yolanda. Conceptos Generales. En: Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas; Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. México: Gabriela Castillo Morales, 2004. p.22.

³² DÍAZ, María. SOBRERO, María y GRANADOS, Yolanda. Aseguramiento y control de calidad de bioensayos. En: Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas; Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. México: Gabriela Castillo Morales, 2004. p.139.

³³U.S. Environmental Protection Agency Office of Water.Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms. Third Edition.1200 Pennsylvania Avenue, NW Washington, DC 20460.October 2002.pp. 15-16.

³⁴ DÍAZ, María. SOBRERO, María y GRANADOS, Yolanda. Aseguramiento y control de calidad de bioensayos. Op.cit., p. 127.

“Dentro de los posibles tóxicos de referencia, se mencionan; cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), cloruro de cadmio (CdCl₂), sulfato de cobre (CuSO₄), dodecil sulfato de sodio (SDS) y dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇)”³⁵, entre otros. La importancia de utilizarlo es certificar los resultados obtenidos al comparar con un patrón y verificar que no cambia a medida que pasa el tiempo.

4.3.4 Muestra. La muestra debe tener la menor alteración en el transcurso del proyecto. Ronco, *et al.*³⁶ explica que para conservar la integridad de las muestras deben ser procesadas en el menor tiempo posible para evitar cambios en su composición, los bioensayos deben realizarse en su mayoría con la muestra original, pero si esta interfiere en el comportamiento de los organismos se deberán eliminar las interferencias, por ejemplo; cuando haya material particulado, el mismo autor³⁷ recomienda sedimentar o filtrar la muestra, cuando las aguas son ricas en bacterias filtrar o centrifugar; respecto al pH, este deberá estar entre 6 y 9 (el cual es tolerable por la biota acuática), las muestras con valores extremos deben ser neutralizadas con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.

4.3.5 Carta control. Según Díaz, *et al.*³⁸ es un medio de referencia para evidenciar la sensibilidad del organismo de prueba y la estabilidad de su respuesta a un tóxico de referencia o muestra con un margen de confianza del 95%. El mismo autor aclara que los gráficos control pueden cambiar en el tiempo, reduciendo o aumentando los intervalos de variación, la incidencia a obtener valores fuera de los límites establecidos no será mayor al cinco por ciento y si los valores se alejan significativamente del intervalo esperado, se deberá realizar una revisión sobre la sensibilidad de los organismos, sobre el procedimiento y repetir las pruebas con un nuevo lote de organismos.

³⁵ *Ibíd.*, p.127.

³⁶ RONCO, Alicia. DÍAZ, María y GRANADOS, Yolanda. Monitoreo Ambiental. *En:* Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas; Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. México: Gabriela Castillo Morales, 2004. p. 26.

³⁷ *Ibíd.*, p.28.

³⁸ DÍAZ, María. SOBRERO, María y GRANADOS, Yolanda. Aseguramiento y control de calidad de bioensayos. *Op.cit.*, pp. 128-129

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 LOCALIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

El trabajo se desarrolló en el laboratorio de Bioprospección Marina del INVEMAR – LABBIP, ubicado a 11° 15' 02,54" N 74° 13' 12,81" O en Santa Marta -Colombia (Figura 4A y B) durante nueve meses. Según Ospina, *et al.*³⁹ el laboratorio está diseñado con base en un sistema de recirculación en el que se realizan bioensayos, mantenimiento y cultivo de organismos marinos, especialmente peces ornamentales, también cuenta con áreas y sistemas que aseguran la viabilidad del cultivo, extrapolando y ajustando los parámetros de acuerdo a los requerimientos de los organismos.

Figura 4. Laboratorio de Bioprospección Marina del INVEMAR



(A), ubicación (B), vista frontal del LABBIP

(A), Modificada de www.maplandia.com (B), Tomado de: Ospina *et al.*, 2011.

5.2 INSTALACIONES

El LABBIP cuenta con una zona de bioensayos con seis canaletas rectangulares de 500 L, aeración constante, termostatos para regular temperatura y un mesón destinado solo para bioensayos (Figura 5).

³⁹ OSPINA-SALAZAR, Gloria. SANTOS-ACEVEDO, Marisol. LÓPEZ-NAVARRO, Johann. GÓMEZ-LÓPEZ, Diana Isabel. ÁLVAREZ-BARRERA, Javier. GÓMEZ-LEÓN, Javier. Instalación e infraestructura. En: *Avances en la reproducción y mantenimiento de peces marinos ornamentales*. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras INVEMAR. Santa Marta: Marisol Santos Acevedo y Javier Gómez León. 2011. pp. 19-23.

Figura 5. Zona de bioensayos en el LABBIP del INVEMAR



5.3 MATERIALES, EQUIPOS E INSUMOS

Neveras
Guantes
Nasas
Baldes con capacidad de 30 L
Equipo de disección
Canaletas rectangulares de 250 L de capacidad
Termostatos
Blower
Balanza analítica
Agitador
Jeringa de 5 mL
Balones volumétricos de 500 mL y 1000 mL
Beakers de 50 mL, 200 mL, 500 mL y 1000 mL
Aire acondicionado
Micropipeta de 1-10 μ L, 10-1.000 μ L y 1-5 mL
Probeta de 50 mL y 100 mL
Termómetro de mercurio
Oxímetro digital WTW
pH metro digital SARTORIUS
Conductímetro-salinómetro YSI
KCl 0,5M
Ácido Acético 10%
Formaldehído al 2%

Papel secante
Cajas Petri de 50 mm
Marcador
Frascos de vidrio de 4 L
Cronómetro
Registros
Cámara Neubauer
Cámara Sedgwick-Rafter
Pipetas Pasteur
Gradilla
Contador scientific
Tubos cónicos tipo falcón de 15 mL
Microscopio
Cámara digital
Molino IKA RW11

5.4 PRINCIPALES PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS CONTROLADOS PARA EL MANTENIMIENTO DE ORGANISMOS EN LABORATORIO

El laboratorio de acuerdo con Ospina, *et al.*⁴⁰ maneja rangos respecto a la temperatura de 22 a 30°C, 29 a 37 ups de salinidad, 7,5 a 8,5 de pH y oxígeno disuelto siempre mayor a 5 mg/L, estos valores hacen referencia al mantenimiento de peces marinos ornamentales en general, los cuales deben mantenerse lo más constantes posibles para garantizar la supervivencia de los organismos y la estabilidad del sistema de recirculación, se aclara que los parámetros mencionados se pudieron modificar en el desarrollo del presente proyecto dependiendo de las necesidades del mismo.

5.5 PLAN DE MANEJO

5.5.1 Obtención de reproductores. Los ejemplares de *L. variegatus* se recolectaron mediante buceo a pulmón en la Bahía de Chengue (departamento del Magdalena) y se trasladaron al laboratorio en neveras provistas de agua y espuma de poliuretano para evitar su maltrato (Figura 6 y 7A, B y C). En total se

⁴⁰OSPINA-SALAZAR, Gloria. SANTOS-ACEVEDO, Marisol. LÓPEZ-NAVARRO, Johann. GÓMEZ-LÓPEZ, Diana Isabel. ÁLVAREZ-BARRERA, Javier. GÓMEZ-LEÓN, Javier. Instalación e infraestructura. En: Avances en la reproducción y mantenimiento de peces marinos ornamentales. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras INVEMAR. Santa Marta: Marisol Santos Acevedo y Javier Gómez León. 2011. p.32.

recolectaron 721 erizos de mar los cuales llegaban de acuerdo a la demanda de ejemplares para el desarrollo del proyecto

Figura 6. Lugar de recolección de *Lytechinus variegatus* (Bahía Chengue; Santa Marta; Colombia)



Imagen tomada de Google Earth.

Figura 7. Recolección de *L. variegatus* en la Bahía Chengue

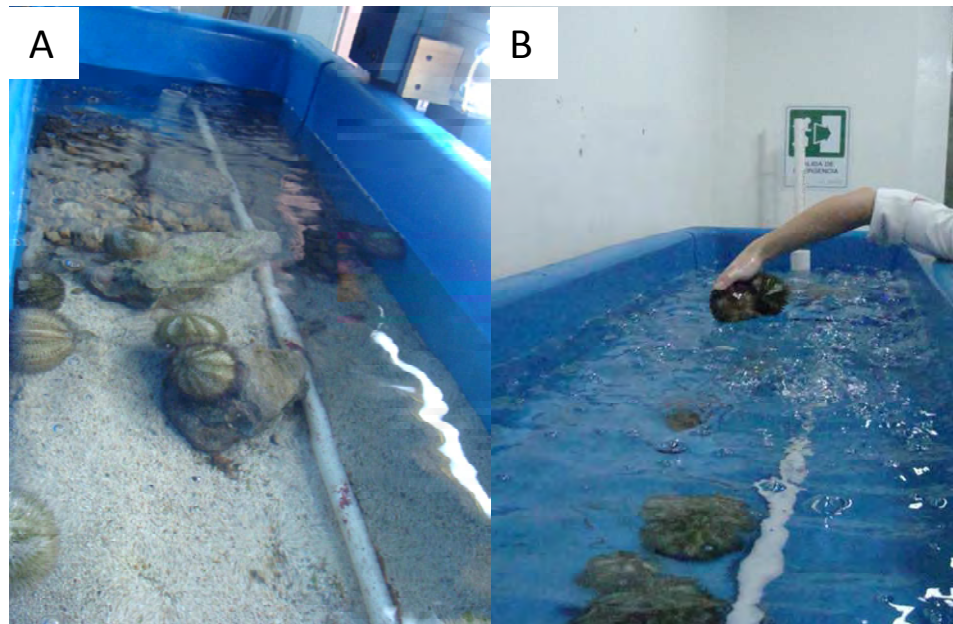


(A), colecta de ejemplares (B), nasa con erizos (C), erizos en nevera con espuma.

5.5.2 Adecuación de canaletas. Al iniciar la investigación, los animales colectados se ubicaron en canaletas provistas de sustrato arenoso, pero se observó que el material orgánico se quedaba retenido deteriorando la calidad del agua y dificultando la limpieza de las mismas, por lo tanto se mejoró la supervivencia y se facilitaron las labores de limpieza manteniendo los erizos sin sustrato.

Para limpiar cada canaleta se retiró el sustrato, se lavó con abundante agua dulce y posteriormente se llenó con agua de mar del laboratorio, quedando listas para sembrar y mantener los erizos (Figura 8A y B).

Figura 8. Canaletas para el mantenimiento de *L. variegatus*

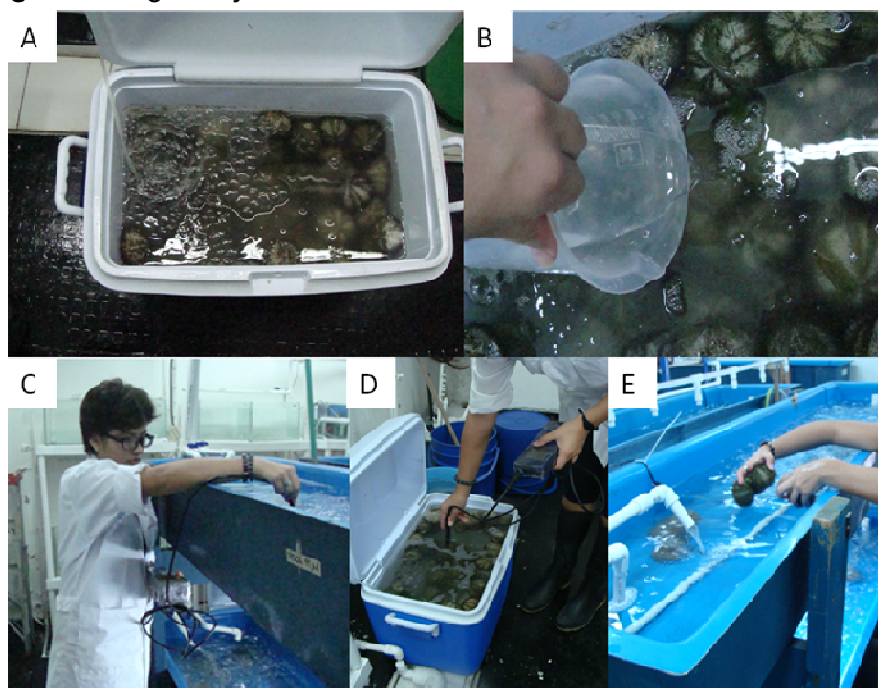


(A), con sustrato (B), sin sustrato.

5.5.3 Aclimatación y cuarentena. Los erizos de mar recolectados fueron sometidos a un proceso de aclimatación y cuarentena. La aclimatación consistió en extraer previamente la espuma de cada nevera y adicionar cada 15 minutos dos litros de agua del sistema a cada una de ellas, lo anterior hasta igualar los valores de temperatura, oxígeno disuelto, pH y salinidad, una vez logrado se procedió a ubicar los erizos en las canaletas (Figura 9A, B, C, D y E).

La cuarentena consistió en mantener a los organismos aislados, es decir en cada unidad experimental se mantuvo flujo cerrado durante un periodo de cinco días, en el transcurso de este tiempo se realizó una observación constante de acuerdo a las normas del laboratorio, una vez finalizada la cuarentena los erizos eran incorporados al sistema de recirculación con lo cual se facilitó el control de los parámetros anteriormente mencionados y su mantenimiento.

Figura 9. Ingreso y aclimatación de erizos



(A), nevera con erizos y sin espuma (B), adición de agua del sistema (C y D), toma de parámetros (E), siembra.

5.5.4 Alimentación. Los juveniles de *L. variegatus* según Buitrago y Lodeiros⁴¹ aseguran excelentes supervivencias con alimentación a base de peletizado de camarones de agua marina y algas de la especie *Ulva lactuca* y al ser una especie omnívora y preferir según Espinoza, *et al.*⁴², García y Criales⁴³, Gómez⁴⁴ y Watts, *et al.*⁴⁵ gran variedad de hierbas marinas, se suministró *ad libitum* tres veces al día (Anexo 2):

- Alimento peletizado: Se utilizaron dos clases, el primero Ital Mojarra 24[®] y el segundo elaborado en laboratorio a base de Ital Mojarra 24[®] adicionado con Cyclop-eeze[®] con el fin de aportar un mayor porcentaje de proteínas y lípidos (Tabla 1) tratando de suplir la mayoría de requerimientos nutricionales de la especie.

⁴¹ BUITRAGO, Esperanza y LODEIROS, César. Producción de larvas y postlarvas del erizo verdiblanco del Caribe *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea) en condiciones de cultivo. Fundación la Salle de Ciencias Naturales e Instituto Oceanográfico de Venezuela. Venezuela. 2005.pp. 322-326.

⁴² ESPINOZA G, R.A. REYES, J.L. HIMMELMAN, J.H. y LODEIROS, C. Op. cit.,p.1.

⁴³ GARCÍA, Camilo y CRIALES, María. Op. cit., p. 2.

⁴⁴ GOMEZ, Alfredo. Op. cit., p.1.

⁴⁵ WATTS, Stephen. McCLINTOCK, James y LAWRENCE, John. Op.cit., pp.380-381.

Tabla 1. Composición nutricional de Cyclop-eeze® y de Ital Mojarra 24®

Componente	Alimento	Cyclop-eeze®	Ital Mojarra 24® (Italcol)
Proteína		61%	24%
Fibra cruda		0,5%	8%
Humedad		5%	12%
Ceniza		3%	12%
Grasa cruda		31%	6%
Fósforo		0,1%	
Omega 3			
Eicosapentánico		13,4%	
Docosahexanoico		12,8%	

Fuente: Producto Cyclop-eeze® Aquatic Nutrient. A Bio-engineered nutritional organism. ITALCOL. Alimento concentrados. Disponible en Internet: <http://www.italcol.com/acuacultura/mojarras/ital-mojarra-24/>

Para preparar el pellet mejorado se trituraron y tamizaron 211 g del pellet Ital Mojarra 24® y se incorporaron a 2,11 g de Cyclop-eeze® en 10 mL de agua. Una vez homogenizado se formaron tiras de concentrado con una jeringa de 5 mL y transcurridas las 24h se formando los nuevos pellets, los cuales se caracterizaron por tener diámetro igual a 6 mm (Figura 10A, B y C).

Figura 10. Preparación del pellet a base de Ital Mojarra 24® y cyclop-eeze®

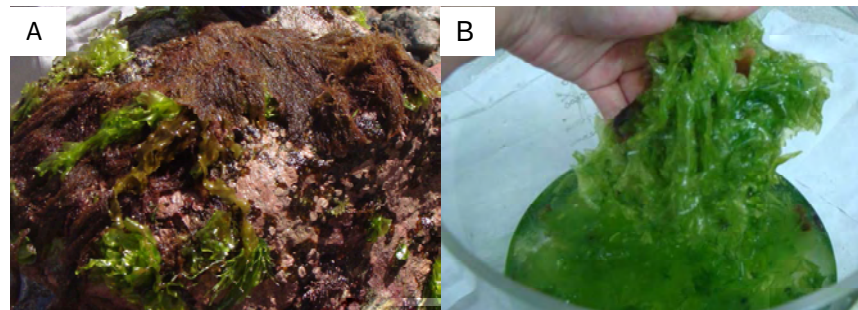


(A), tamizaje (B), homogenización de pellet Ital Mojarra 24® más Cyclop-eeze® (C), peletizado.

- Algas enteras de la especie *Gracilaria* sp y *Ulva lactuca*, alimentos naturales que se suministraron porque fueron aceptados inmediatamente por el erizo de mar y porque según Calva⁴⁶ el suministro de algas a organismos maduros incrementa considerablemente el tamaño de sus gónadas (Figura 11A y B).

⁴⁶ CALVA, Laura Georgina. Hábitos alimenticios de algunos equinodermos. Parte 2 erizos de mar y pepinos de mar. En: Revista ContactoS. 2003. no.47. pp. 56-58.

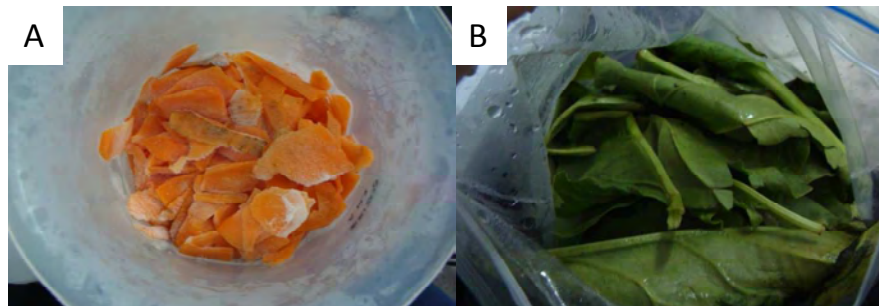
Figura 11. Algas suministradas a los lotes de *Lytechinus variegatus*



(A), *Gracilaria* sp (B), *Ulva lactuca*.

- Alimentos complementarios: espinaca entera y trozos de zanahoria de 5 cm de largo por 0,5 cm de grosor, se adicionaron debido a que según George, *et al.*⁴⁷ y Lawrence, *et al.*⁴⁸ sus contenidos de carotenoides favorecen una mayor calidad de la gónada y producción de gametos en el erizo de mar (Figura 12A y B).

Figura 12. Alimentos complementarios para lotes de *Lytechinus variegatus*



(A), trozos de zanahoria (B), espinaca entera.

5.5.5 Sifoneo. Para evitar sobresaturación de alimento no consumido y materia orgánica, las unidades experimentales se sifonearon una vez al día con una manguera de ½" de diámetro (Anexo 2).

⁴⁷ GEORGE, Sophie. LAWRENCE, John. SMILEY, Joey y PLANK, Larry. Carotenoids in the adult diet enhance egg and juvenile production in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. Aquaculture. USA. 2001.pp.353-369.

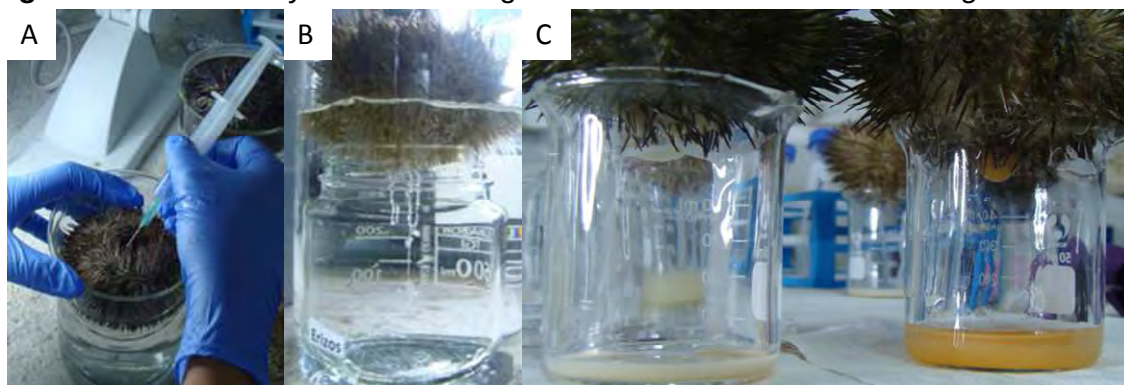
⁴⁸ LAWRENCE, J.M. PLANK, R. y LAWRENCE, I. The effect of dietary carotenoids on gonad production and carotenoid profiles in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. En: Journal of the World Aquaculture Society. Junio. 2002. Vol 33. No 2. pp.127-137.

5.6 INDUCCIÓN, OBTENCIÓN Y MANEJO DE GAMETOS

El protocolo empezó con la inducción al desove y posterior obtención de gametos mediante una inyección de KCl 0,5M el cual cumple la función de que una o varias de las gónadas se contraigan para expulsar el material gonádico, los ovocitos y espermatozoides desovados fueron evaluados para determinar su calidad y se contabilizaron para lograr las concentraciones deseadas mediante el manejo adecuado de los gametos (Anexo 2).

5.6.1 Inducción y obtención de gametos. Se realizó aplicando 0,5 mL de KCl 0,5M, sustancia encontrada comercialmente con el 98% de pureza y que Newmark, *et al.*⁴⁹ y Germendia, *et al.*⁵⁰ han utilizado para esta actividad; definiéndola como la sustancia inductora en la mayoría de estudios con erizos. La inyección se efectuó a través del peristoma y se dejó reposar el erizo sobre un recipiente con agua de mar apoyado sobre su cara aboral, luego de uno a cinco minutos se obtuvo material gonadal: los machos con esperma de color blanco y las hembras ovocitos de color naranja; una vez iniciado el desove y de acuerdo con los protocolos de Guirao, *et al.*⁵¹ y Newmark, *et al.*⁵² el erizo se trasladó a beakers de 50 mL para recolectar los gametos en “seco” (Figura 13A, B y C).

Figura 13. Inducción y obtención de gametos del erizo de mar *L. variegatus*.



(A), inyección intracelómica (B), inicio del desove (C), colecta en seco de esperma y ovocitos.

⁴⁹NEWMARK, F. SANTOS-ACEVEDO, M. CHAVES, A. MORA, J. ARIAS, J. y S. ZEA. Op. cit., pp.17-18.

⁵⁰ GERMENDIA, Joxe .MENCHACA, Iratxe. BELZUNCE, María y REVILLA, Marta. Protocolo del test de toxicidad de sedimentos marinos con larvas del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). En: Revista de Investigación Marina. Abril. 2009.no 1. p. 5.

⁵¹ GUIRAO, Marín. VITA, R. MARÍN, A y A, Cesar. 2002. Op.cit., pp. 5-8.

⁵²NEWMARK, F. SANTOS-ACEVEDO, M. CHAVES, A. MORA, J. ARIAS, J. y S. ZEA. Op. cit., p.18.

5.6.2 Calidad de los gametos. Se tomó una muestra de material gonádico, se observó al microscopio y según parámetros de Germendia, *et al.*⁵³ se determinó su calidad; ovocitos caracterizados por estar redondos y turgentes, con bordes claramente definidos y diámetro cercano a 100 µm, mientras que la de los espermatozoides se evidenció por su forma y movilidad, los productos gaméticos de baja calidad se descartaron. Se confirmó la calidad de los gametos en los ensayos con toxico y lodo cuando el porcentaje de fecundación dentro de los controles negativos daba mayor al 85% de fecundación.

5.6.3 Manejo de gametos para el conteo y realización de diluciones.

5.6.3.1 Esperma. Una vez obtenido el esperma directamente desde el gonoporo se prosiguió a su conteo con el método de la Environment Canada⁵⁴ el cual consistió en elaborar una dilución 1:500, es decir se adicionaron 10 µL del esperma en 4.990 µL de ácido acético (1:2.000). El ácido acético puro se diluyó al 10% para obtener una solución madre de acuerdo a lo sugerido por Environment Canada⁵⁵ y está se diluyó a 1:2000, solución con la cual se fijaron correctamente los espermatozoides del erizo de mar facilitando su conteo.

La dilución 1:500 se elaboró en tubos Falcón para facilitar la homogenización de la muestra y poder agregar el volumen requerido sin efecto de espuma ni aglomeración de espermatozoides como ocurrió al utilizar tubos Eppendorf. El resultado del conteo fue producto de la observación al microscopio de dos muestras en la cámara de Neubauer, adicionado 10 µL de la dilución a cada cámara, por último se determinó la cantidad por mililitro utilizando la fórmula propuesta por Cisneros⁵⁶.

$$\frac{\text{No.de espermatozoides}}{\text{ml}} = \text{No.de espermatozoides} * 50.000 * \text{FD}$$

Donde FD: es el factor de dilución.

⁵³ GERMENDIA, Joxe .MENCHACA, Iratxe. BELZUNCE, María y REVILLA, Marta. Op. cit., p.6.

⁵⁴ Environment Canada. Biological Test Method: Fertilization Assay Using Echinoids (Sea Urchins and Sand Dollars). EPS 1/RM/27 Second Edition. Science and Technology Branch. February 2011. p.59.

⁵⁵ *Ibíd.*, p.59.

⁵⁶ CISNEROS, Javier. Desarrollo de un Método para la Determinación Rápida de la Concentración Espermática en Eyaculados de Bovino, Ovino, y Cerdo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Veracruzana. Veracruz. Ver. Agosto. 2011.p.29.

5.6.3.2 Ovocitos. Los gametos de la hembra recogidos dentro de un Beaker de 50 mL de acuerdo con Newmark, *et al.*⁵⁷ se llevaron a un volumen de 100, 150 o 200 mL en agua de mar filtrada e irradiada con UV (AMF+UV), lo anterior dependiendo de la cantidad de muestra. Con los ovocitos concentrados se elaboraron dos diluciones 1:10 - 1:100 en AMF+UV y se realizó el conteo en cámara Sedwig-Rafter.

$$\frac{\text{No. de ovocitos}}{\text{ml}} = \text{No. de ovocitos} * \text{FD}$$

5.7 PROTOCOLO DE FECUNDACIÓN

Para realizar el proceso de fecundación se utilizó agua de mar filtrada e irradiada con UV, cajas Petri, la concentración deseada de gametos y un tiempo de exposición para los mismos, como se describe a continuación.

5.7.1 Protocolo de fecundación a diferentes concentraciones espermáticas.

Para determinar la concentración stock del esperma se siguió el procedimiento descrito por Newmark, *et al.*⁵⁸, para lo cual se utilizaron cajas Petri de 50 mm, las diferentes cantidades espermáticas y los 2.000 ovocitos; cada tratamiento se trabajó con mínimo tres de las cinco replicas determinando de esta manera a qué cantidad y concentración stock se producen porcentajes de fecundación superiores al 85%.

Teniendo en cuenta investigaciones realizadas por Garza, *et al.*⁵⁹ y Martínez, *et al.*⁶⁰ la concentración para cada ensayo fue de 2.000 ovocitos/mL por replica y de esperma concentraciones stock entre 100.000 a 70.000.000 espermatozoides/mL (Anexo 3), estas últimas se ajustaron por diluciones en AMF+UV, para esto se tomó una pequeña alícuota de la muestra original después del desove y de acuerdo al valor calculado se diluyó dentro de un tubo Falcón a un volumen total

⁵⁷ NEWMARK, Federico. ZEA, Sven, SANTOS-ACEVEDO, Marisol, MORA, Jennyfer y ARÍAS, Jazmín. Op. cit., p.18.

⁵⁸ *Ibíd.*, p.18.

⁵⁹ GARZA, A. ITUARTE, E. SIERRA, G. LOPEZ, R y RODRIGUEZ, R. Producción de juveniles de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* (Echinodermata: Echinoidea) en Baja California, México. Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, 2005. p 350.

⁶⁰ MARTÍNEZ, Gabriela. RUDOLPH, Anny. AHUMADA, Ramón. LOYOLA, Rodrigo y MEDINA, Valentina. Toxicidad no específica en sedimentos portuarios, una aproximación al contenido de contaminantes críticos. *En: Rev. de Biol. Mar. y Ocean.* Vol. 44. No.3. Diciembre.2009.p.4.

de 10 mL. La alícuota a tomar se calculó como lo sugiere la Environment Canada⁶¹ según la siguiente fórmula:

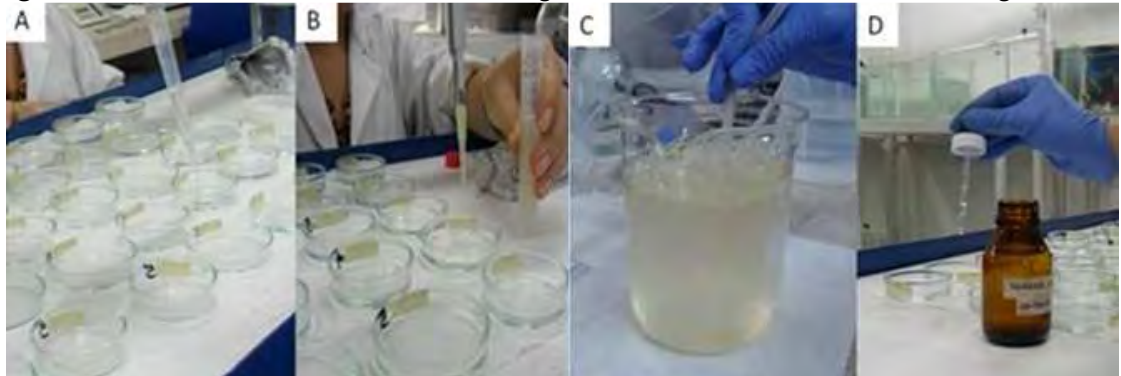
$$C1 * V1 = C2 * V2$$

C = Concentración

V= Volumen

Al adicionar AMF+UV para obtener las concentraciones stock establecidas se inició el proceso de activación del esperma de acuerdo con Berdyshev⁶², se activó durante 30 minutos, tiempo después de lo cual se procedió con la realización del bioensayo de fecundación, que consistió modificando lo sugerido por Riveros y Zuñiga⁶³ en adicionar 100 µL de la concentración stock del esperma (debido a que un mililitro de cada una de ellas alteraba el volumen de cada caja Petri dificultando su homogenización y conteo) sobre 5 mL de AMF+UV y dejar reposar durante una hora; luego agregar un mililitro de ovocitos en las cajas Petri, esperar 20 minutos mientras se efectúa la fecundación y proceder a detener el proceso agregando 7 gotas de formalina al 2% (Figura 14A, B, C y D). Cada vez que se adicionaba esperma, ovocitos o formol a las cajas Petri se homogenizaba la muestra en cada una de las réplicas con cinco movimientos suaves en forma de ocho (Anexo 2).

Figura 14.Proceso de fecundación con gametos del erizo de mar *L. variegatus*.



(A), adición de: AMF+UV (B), adición de esperma (C), ovocitos (D), formalina al 2%.

⁶¹Environment Canada. Preparing Standard Suspensions of Gametes. En: Biological Test Method: Fertilization Assay Using Echinoids (Sea Urchins and Sand Dollars). Op. cit.,p.60.

⁶² BERDYSHEV, Evgueni. Inhibition of sea urchin fertilization by fatty acid ethanolamides and cannabinoids. Institute of Marine Biology. Russia. 1999.p. 2.

⁶³ RIVEROS, A y ZÚÑIGA, M. Viabilidad de espermios de Erizo de Mar (*Tetrapygus niger*) para evaluar a la toxicidad de aguas Marinas: Casos Colcura, Playa Blanca, Lengua, Rocuant, Coliumo y Dichato-VIII Región. En: Libro resúmenes XIII Jornadas Ciencias Del Mar. Villa del Mar. 1993.pp. 85-86.

Terminado este proceso se inició con el conteo y registro de 200 ovocitos, los cuales presentaron la membrana de fecundación en buen estado y de aquellos sin fecundar que estaban en buen estado pero sin membrana. De esta manera se buscó la concentración espermática, independiente de si esta concentración estaba por fuera o dentro del rango de concentraciones ya establecidas dentro de la metodología.

5.7.2 Protocolo de fecundación para los ensayos con tóxico de referencia y con lodo. Para realizar los ensayos se prepararon soluciones seriadas para obtener un rango de toxicidad de 0 a 1 aproximadamente, estas soluciones se elaboraron de acuerdo con Fuentealba, *et al.*⁶⁴, para el tóxico desde una solución madre de 200 mg/L y para el lodo desde una solución madre preparada con una dilución 1:9 con el lodo original, seguido por un proceso de decantado y tamizado.

El sulfato de cobre (CuSO_4) utilizado como tóxico de referencia se escogió porque cumple con la mayoría de criterios propuestos por Reyes, *et al.*⁶⁵, es decir está clasificado como un contaminante ambiental, hay disponibilidad de este producto en el mercado con pureza consistente, solubilidad y estabilidad en agua, lo que facilita el acceso en la cantidad y presentación deseada para el desarrollo de este trabajo. Además, cumplió con el criterio propuesto por la investigación y el laboratorio; según la cual el tóxico de referencia seleccionado debe ser efectivo pero con la menor toxicidad para las personas que trabajaron con el mismo.

El lodo ingresado al laboratorio se caracterizó por tener un pH entre 6 y 9, por lo que no fue necesario adoptar la recomendación de Ronco, *et al.*⁶⁶ de adicionar ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, aunque si mantuvo salinidades mayores a 40 por lo que se tuvo que ajustar a 35, es decir a la salinidad que tenía al agua de mar filtrada e irradiada con UV del control negativo, teniendo en cuenta lo anterior se igualó la salinidad agregando AMF+UV y agua destilada a 40 mL de lodo, se mezcló durante treinta minutos para homogenizar la mezcla y como propone la EPA⁶⁷ en una relación 1:9 hasta un volumen total de 400 mL, luego se dejó decantar por una hora, tiempo en el cual la mayoría de sólidos se separaron del líquido no miscible, se descartó el precipitado y se tamizó el resto por 20, 40 y 60

⁶⁴FUENTEALBA, Carmen. SILVA, Jeannette. BAY-SCHMITH, Enrique. LARRAIN, Alberto. Op. cit., p. 3.

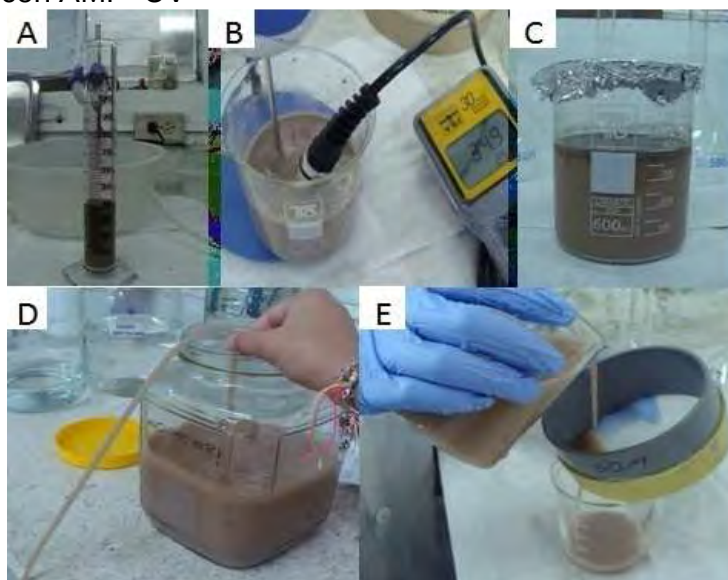
⁶⁵ REYES, Maria. HONDAL, Onelio. HERNANDEZ, José y TORRES, María. Sulfato de Cobre como sustancia de referencia en ensayo de toxicidad en larvas de rana cubana *Osteopilus septentrionalis*. En: Revista de toxicología en línea. Octubre-Diciembre, 2003, no.24. p. 3.

⁶⁶ RONCO, Alicia. DÍAZ, María y GRANADOS, Yolanda. Monitoreo Ambiental. En: Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas; Op.cit.,p. 26.

⁶⁷U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Analytic Methods for the Oil and gas Extraction Point Source Category. Washington, D .C. EPA-821-R-11-004.2011.p. 23.

μm (Figura 15A, B, C D y E) con el fin de separar sólidos con tamaño mayor o igual a 20 micras los cuales dificultaban la observación y el conteo de los ovocitos.

Figura 15. Preparación del lodo a una relación 1:9 con AMF+UV



(A), 40 mL de lodo para la relación 1:9 (B), igualar salinidad con la del control (C), decantar (D), retirar sobrenadante (E), tamizar el lodo recolectado.

La solución madre, una vez preparada, se consideró como el 100%, de ahí se elaboraron las diferentes diluciones para la realización del *screening test*, el cual es un método que mediante el uso de concentraciones seriadas o escalonadas permite aproximarse al rango en el que se encuentra la concentración que se busca. Para preparar las soluciones Díaz, *et al.*⁶⁸ y Espinosa, *et al.*⁶⁹ sugieren emplear diluciones logarítmicas de la muestra o en forma secuencial aplicando un factor de dilución de 0,5 (100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125%), a partir de los resultados obtenidos se realizaron múltiples ensayos con aquellas concentraciones que producían porcentajes de fecundación por encima y por debajo del 50% y/o índices de fecundación por encima y por debajo del 0,5, para obtener cinco concentraciones entre 0 y 100% aproximadamente y puntos intermedios más o menos equidistantes con los cuales poder calcular la CE_{50} .

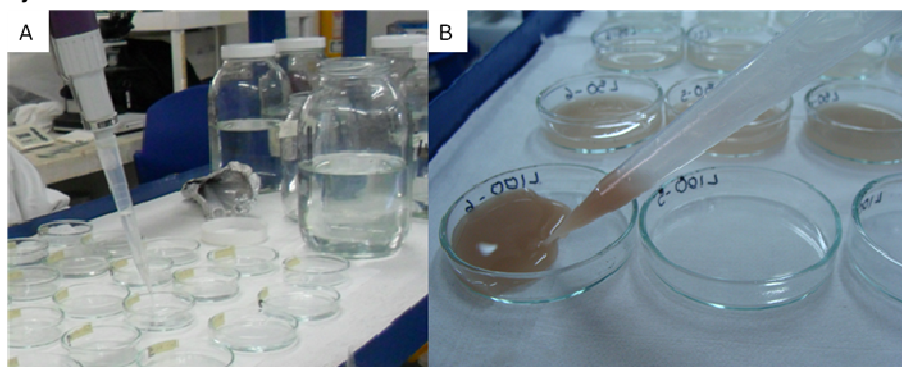
⁶⁸ DÍAZ, María. GRANADOS, Yolanda y RONCO, Alicia. Bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*. En: Ensayos toxicológicos y Métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización Intercalibración, Resultados, y Aplicaciones. México: Gabriela Castillo Morales, 2004.p.60.

⁶⁹ ESPINOSA, Adriana. BÁEZ, María y LOPÉZ, María. Pruebas de Toxicidad Acuática; Fundamentos y Métodos. En: Ingeniería e investigación. Abril. 2009. V.29. n 1. p. 75.

Ruck, *et al.*⁷⁰ especifican que una buena prueba de detección (*screening test*) debe ser capaz de separar los efluentes o en este caso las soluciones a diferentes concentraciones en términos de grados variables de toxicidad en lugar de simplemente decir tóxicos o no tóxicos. Cada concentración se preparó con AMF + UV y se evaluaron para el tóxico un control negativo y seis concentraciones en donde sus unidades (mg/L) hacen referencia al reactivo original con el que se prepararon ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), de aquí en adelante se mencionara solo como sulfato de cobre; en el caso del lodo se trabajó cinco concentraciones, un control negativo y uno positivo que se estableció en 20 mg/L del tóxico de referencia.

Para los experimentos con el tóxico y con el lodo se siguió el mismo procedimiento de fecundación propuesto por Riveros y Zúñiga⁷¹, reemplazando los 5 mL de AMF + UV por 5 mL de cada concentración de la sustancia de prueba (Figura 16A y B).

Figura 16. Distribución de 5 mL de tóxico de referencia y lodo en cajas Petri



(A), tóxico de referencia (B), lodo.

5.7.3 Carta control en tóxico de referencia y lodo. De acuerdo con Díaz, *et al.*⁷² se elaboró a partir de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos, de los cuales se obtuvo la CE_{50} . Para la elaboración del gráfico control se tuvo en cuenta el número de ensayos (eje x) y el valor promedio de la concentración efectiva media (eje y). Posteriormente se obtuvo la desviación estándar (σ) de toda la población de datos.

⁷⁰ J.G, Ruck. M, Martin y M, Mabon. Evaluation of toxkits as methods for monitoring water quality in New Zealand. *En*: New Microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring. United States: Guido Persoonee. Colin Janssen y Win Coen, 2000. p.110.

⁷¹ RIVEROS, A y ZÚÑIGA, M. Op. cit., p. 125.

⁷² DÍAZ, María. SOBRERO, María y GRANADOS, Yolanda. Aseguramiento y control de calidad de bioensayos. Op.cit., pp. 128-129

Los valores límite definieron el rango de variabilidad de la concentración efectiva media y para calcularlos se utilizó un intervalo de confianza del 95% que de acuerdo con Silva, *et al.*⁷³: permite mayor exactitud intralaboratorio y es el rango dentro del cual se encuentra el verdadero valor de toxicidad para el toxico de referencia y/o lodo, los valores se determinaron con $\pm$ dos veces la desviación estándar sobre o bajo la media. Un intervalo de confianza del 99% con límites de $\pm$ tres veces la desviación estándar no fue apropiado encontrar debido a que lo ideal es exigir mayor exactitud en el valor de la CE_{50} , el cual debe estar cada vez más alejado de los límites y más cerca de su línea de tendencia.

Los valores límite se calcularon de la siguiente manera:

Concentración límite superior: promedio + 2 σ

Concentración límite inferior: promedio – 2 σ

La precisión en cada prueba se estableció con el coeficiente de variación calculado con la fórmula propuesta por el mismo autor:

$$CV = [(\sigma / \text{media}) \times 100]$$

5.8 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las pruebas de esperma se evaluaron mediante un diseño completamente al azar (DCA), conformado por seis tratamientos relacionados con diferentes cantidades espermáticas, cada una de ellas provino de una concentración stock de esperma como se indica en la Tabla 2, sumando los ovocitos fecundados de dos ensayos para obtener el porcentaje de fecundación; cada unidad experimental estuvo constituida por una caja Petri de 50 mm de diámetro, por 2.000 ovocitos provenientes de una sola hembra y por la cantidad de espermatozoides establecida proveniente de una mezcla de mínimo dos machos (relación macho : hembra 2:1). Para todos los casos se asumió un $\alpha = 0,05$.

El modelo teórico para representar el diseño experimental utilizado fue:

⁷³ SILVA, Jeannette. TORREJÓN, Guillermo. BAY-SCHMITH, Enrique y LARRAIN, Alberto. Calibration of the acute toxicity bioassay with *Daphnia pulex* (crustacea. cladocera) using a reference toxicant. En: Revista Guayana (concepción). 2003. Vol 67.no 1. p 4.

$$y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij} = Variable de respuesta (% de fecundación)

μ = media del porcentaje de fecundación

T_i = Efecto de la i-esima concentración espermática (tratamiento)

ε_{ij} = Error experimental asociado a la j-iesima replica que recibió la i-esima concentración espermática.

Con los resultados de la variable porcentaje de fecundación se realizó un análisis de varianza para verificar la existencia de diferencias significativas y una prueba de comparación múltiple de Tukey con el fin de establecer las diferencias entre medias. Estos datos también se consolidaron en una tabla de medias y en gráficos de barras.

Cada figura es presentada con los valores de error estándar y con una línea roja cuando se logra el 85% de fecundación.

Tabla 2. Concentraciones stock y cantidad del esperma utilizada

Tratamientos	Concentración stock del esperma (espermatozoides/mL)	Cantidad de esperma para 2000 ovocitos
T1	62.500.000	6.250.000
T2	125.000.000	12.500.000
T3	250.000.000	25.000.000
T4	500.000.000	50.000.000
T5	1.000.000.000	100.000.000
T6	1.200.000.000	120.000.000

Las pruebas para medir el efecto del tóxico de referencia sobre la fecundación de los gametos del erizo de mar, se aplicaron utilizando un diseño en bloques completos al azar con submuestreo, conformado por cuatro bloques consistentes en el mismo número de ensayos (cuatro), y siete tratamientos relacionados con diferentes concentraciones del tóxico incluyendo el control negativo de la investigación, cuya distribución se indica en la Tabla 3; cada unidad experimental estuvo constituida por una caja de Petri de 50 mm de diámetro con 2.000 ovocitos, 50.000.000 espermatozoides y 5 mL de cada concentración; el conteo se realizó tomando una muestra de 200 ovocitos.

Tabla 3. Concentraciones del tóxico de referencia

Tratamientos	Concentración (mg/L)
Control Negativo	AMF + UV
1	10
2	15
3	20
4	30
5	40
6	60

El modelo teórico para representar el diseño experimental utilizado es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \tau_j + \eta_{k(ij)}$$

Y_{ijk} = Variable de respuesta (índice de fecundación)

μ = Media del índice de fecundación

τ_j = Efecto de la j-esima concentración del toxico u lodo.

$\eta_{k(ij)}$ = Error del conteo asociado a la k- esima replica.

Los datos correspondientes al índice de fecundación fueron transformados mediante el modelo arcoseno (y), con los cuales se verificaron los supuestos estadísticos de normalidad, homogeneidad de varianzas e independencia, procediendo a realizar un análisis de varianza y una prueba de Tukey. Los datos también fueron presentados en forma de tabla e histograma.

La prueba de toxicidad con el fluido de exploración offshore sobre la fecundación en el erizo de mar se evaluó mediante un diseño en bloques completos al azar con submuestreo, conformado por tres bloques consistentes en el mismo número de ensayos (tres), y siete tratamientos relacionados con cinco diferentes concentraciones del fluido las cuales se tomaron mediante el *screening test*, en donde una vez conocido el valor aproximado de CE_{50} se reajustaron con el fin de reducir el rango y estar más cerca a la concentración efectiva media, siempre se respetó la existencia de al menos dos concentraciones superiores y dos inferiores al valor buscado, se incluyó también un control negativo y uno positivo, los cuales se muestran en la Tabla 4; cada unidad experimental estuvo constituida por una caja Petri de 50 mm de diámetro con 2.000 ovocitos, 50.000.000 espermatozoides y 5 mL de cada concentración. Se realizó el conteo tomando una muestra de 200 ovocitos.

Tabla 4. Concentraciones de lodo utilizadas

Tratamientos	Concentración (%)
1(control negativo)	AMF + UV
2 (control positivo)	Sulfato de cobre (20 mg/L)
3	0,01
4	0,5
5	0,6
6	0,8
7	1

El modelo teórico que representó el diseño experimental para los ensayos con lodo fue el mismo que se utilizó para los ensayos con el tóxico de referencia. Previamente al análisis estadístico se efectuó con el índice de fecundación un estudio de datos atípicos e influyentes, con lo cual se pudo depurar la base de datos para asegurar la veracidad de los mismos.

Con el fin de verificar los supuestos estadísticos se realizaron las pruebas de Chi-cuadrado, Shapiro-Wilk y Asimetría para normalidad, la prueba de Chocran para homogeneidad de varianzas y Durbin-Watson para independencia; esto con miras a realizar un análisis de varianza para determinar la estandarización de los protocolos a lo largo de los ensayos.

Los datos de índice de fecundación obtenidos en las pruebas de toxicidad con el tóxico de referencia en gametos de erizo de mar *L. variegatus* fueron ajustados mediante el modelo Spearman-Kärber recomendado por Díaz, *et al.*⁷⁴ y para el lodo mediante el modelo Probit aplicando la metodología recomendada por StatPoint tecnologías⁷⁵ para predecir el CE₅₀.

Todos los datos se presentan como la media por tratamiento (Y) y el error estándar (ES) en el formato $Y \pm ES$, además todas las figuras muestran: el error estándar de cada porcentaje o índice de fecundación, y una línea roja punteada resaltando el valor de 0,85 u 85% según corresponda, de manera que se pueda apreciar el cumplimiento de este valor dentro del control negativo para cada uno de los ensayos realizados.

⁷⁴DÍAZ, María. ROSSINI, Gustavo y GRANADOS, Yolanda. Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad. Op.cit., p. 108.

⁷⁵STATPOINT TECNOLOGIAS, Inc. Analisis Probit. En: STATGRAPHICS Centurion. 2006.pp.1-6.

5.8.1 Formulación de hipótesis

5.8.1.1 Prueba de hipótesis para los tratamientos o concentraciones

- **Hipótesis nula** $H_0: \mu_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_i$. El efecto medio de las diferentes concentraciones con la sustancia de prueba fue igual
- **Hipótesis alterna** $H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5 \neq \mu_i$. Existe por lo menos una concentración que presentó un efecto medio diferente en el índice de fecundación con la sustancia de prueba.

μ_i = media de la i -ésima concentración de los ensayos con toxico y lodo

5.8.1.2 Prueba de hipótesis para ensayos

- **Hipótesis nula** $H_0: \mu_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_j$ el efecto medio de los ensayos con la sustancia de prueba fue igual
- **Hipótesis alterna** $H_1: \mu_j \neq \mu_{j'}, j \neq j'$. Existe por lo menos un ensayo que presentó un efecto medio diferente con la sustancia de prueba.

μ_j = media del j -ésimo ensayo con el toxico u lodo

Para el análisis Probit y Sperman-Karber, las hipótesis son las siguientes.

$H_0: \beta_1 = 0$. No hay relación lineal de dependencia.

$H_1: \beta_1 \neq 0$. Hay relación lineal de dependencia.

En todos los casos, la regla de decisión fue: Si $p \leq 0,05$ se rechazó H_0 y, consecuentemente se aceptó la alterna.

5.9 VARIABLES EVALUADAS

Las variables evaluadas durante el transcurso de esta investigación fueron el número de ovocitos fecundados y no fecundados, las cuales se midieron para realizar los siguientes cálculos:

5.9.1 Porcentaje de fecundación. Es la relación entre el número de ovocitos fecundados y el total de ovocitos, por 100.

$$\% \text{ de fecundación} = \left(\frac{\text{Número de ovocitos fecundados}}{\text{Número de ovocitos totales}} \right) * 100$$

5.9.2 Índice de fecundación (IF). Representa la variable dependiente del estudio y es la relación entre la variante independiente (200 ovocitos muestreados) y el número de ovocitos no fecundados. puede consistir en un conjunto de proporciones, cada uno entre 0 y 1.

$$Y \text{ (IF)} = \frac{\text{Ovocitos muestreados}}{\text{Ovocitos no fecundados}}$$

5.9.3 CE₅₀. Estimación de la concentración del tóxico o muestra que puede causar un efecto adverso en la mitad del número de gametos normalmente fecundados, determinado por el método Spearman-Kärber y/o PROBIT.

6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Al laboratorio ingresaron diferentes lotes de erizos con el fin de realizar las inducciones y la obtención de gametos. Para el desarrollo de estas actividades se debió realizar el mantenimiento de los organismos, para lo cual inicialmente se registró peso y talla (Tabla 5) con la intención de encontrar diferencias que pudieran servir para establecer si eran machos o hembras y si se podían relacionar estos parámetros con la talla de madurez de los erizos, pero al analizar los datos no se observaron diferencias que permitieran determinar el sexo ni la talla de madurez; debido en parte a que durante la recolección de los individuos se buscaban organismos de tallas similares y de tamaño grande, además como lo menciona Montealegre y Gómez⁷⁶ establecer la madurez gonádica solo es posible sacrificando varios animales o una muestra que incluya organismos de todas las tallas, lo cual no fue objeto de este estudio.

Como indica la tabla 5, el peso y talla mínima encontrada para hembras fue de 42,02 mg y 4,74 cm y para machos de 57,95 mg y 5,0 cm respectivamente. Garmendia, *et al.*⁷⁷, asegura que el tamaño mínimo aconsejado para asegurar la madurez en erizos de la especie *P. lividus* es de 4 cm de diámetro, lo cual es similar a la información obtenida en el laboratorio para *L. variegatus*. Además Montealegre y Gómez⁷⁸ menciona que los erizos pueden tener picos de maduración entre los meses de junio y julio, pero en el laboratorio durante todos los meses de ensayo (julio a marzo) se obtuvo buena disponibilidad de gametos.

Parte fundamental del bioensayo también fue garantizar el suministro del material gonádico, por lo tanto se desarrolló como objetivo adyacente al proyecto la estandarización del mantenimiento de *L. variegatus* en condiciones controladas de laboratorio, resultado de interés debido a que la información existente sobre el manejo de esta especie en cautiverio es escasa.

Tabla 5. Peso y talla de algunos erizos de mar maduros ingresados al LABBIP

Erizo	Peso húmedo (mg) hembras	Talla (cm) hembras	Peso húmedo (mg) machos	Talla (cm) machos
1	<u>42,02</u>	<u>4,74</u>	105,83	7,0
2	87,69	5,87	64,51	<u>5,0</u>
3	83,39	5,56	90,97	6,0
4	74,76	6,32	79,59	5,51
5	74,08	5,54	<u>57,95</u>	5,11

⁷⁶ MONTEALEGRE QUIJANO, Santiago y GÓMEZ GASPAR, Alfredo. Op. cit., pp.308-309.

⁷⁷ GERMENDIA, Joxe .MENCHACA, Iratxe. BELZUNCE, María y REVILLA, Marta. Op. cit., p.5.

⁷⁸ MONTEALEGRE QUIJANO, Santiago y GÓMEZ GASPAR, Alfredo. Op. cit., pp.308-309.

Erizo	Peso húmedo (mg) hembras	Talla (cm) hembras	Peso húmedo (mg) machos	Talla (cm) machos
6	90,54	5,33	94,6	5,92
7	73,55	5,23	85,03	5,74
8	77,06	6,1	90,03	5,94
9	57,96	5,06	91,98	5,9
10	68,37	4,94	80,03	5,7
11	150,2	6,61	80,94	5,29
12	90,26	5,5	83,28	5,4
13	78,84	5,7	62,18	7,39
14	90,94	5,5	80,19	5,56
15	59,82	5,13	86,08	5,7
16	92,62	5,53	83,42	5,6
17	49,68	4,77	100,61	6,44
18	103,55	5,96	62,53	5,5
Promedio	80,30	5,52	72,43	5,3

Valores subrayados representan el menor peso y talla muestreada

Mientras se desarrollaba el mantenimiento, en algunos meses se presentaron variaciones con respecto a la alimentación, densidad de siembra, algunos parámetros fisicoquímicos y manejo en general de las canaletas que pudieron afectar el estado de los organismos.

➤ La alimentación de la especie se inició de acuerdo a la metodología, pero se limitó al ver a finales de año que la abundancia de las algas en el medio natural no era constante (*Ulva lactuca* y *Gracilaria* sp.), por lo tanto a los pocos meses de iniciar el trabajo de campo se vio la necesidad de sólo suministrar los alimentos complementarios a la dieta, como trozos de zanahoria y espinaca, los cuales podrían aportar minerales (calcio, hierro, magnesio, potasio, sodio, fósforo, zinc y yodo) y vitaminas, mientras que el pellet Ital Mojarra 24® y el pellet mejorado (Ital Mojarra 24® + Cyclop-eeze®) constituyeron el aporte de proteína en la dieta.

Los cuatro alimentos se suministraron una vez al día y *ad libitum* en cada una de las canaletas, desde los primeros días se observó que el alimento era consumido en su totalidad por lo tanto se decidió seguir alimentando *ad libitum* pero con mayor frecuencia (tres veces al día), con un tipo de alimento diferente en cada ración (Tabla 6) observando la aceptación y el apropiado consumo por parte de todos los organismos (Figura 17A, B y C), así como una mejora en su apariencia física.

En la medida en que las algas reaparecían en el medio natural se fueron incluyendo nuevamente en la dieta ya establecida, con el fin de complementar los requerimientos nutricionales de los erizos de mar.

Tabla 6. Alimentación realizada para lotes de *Lytechinus variegatus*

Alimentación	Tipo de alimento
1ra	Pellet 24® ó pellet mejorado (Mojarra 24® + Cyclop-eeze®)
2da	Espinaca ó trozos de zanahoria
3ra	Algas (<i>Ulva lactuca</i> y <i>Gracilaria</i> sp.) o Pellet mejorado (Mojarra 24® + Cyclop-eeze®)

Figura 17. Aceptación de diferentes alimentos por parte de *L. variegatus*.



(A), erizo consumiendo pellet (B), erizos consumiendo espinaca (C), erizo consumiendo un trozo de zanahoria.

➤ Durante los meses de estudio muchos erizos presentaron pérdida de púas (Figura 18) produciéndose la mortalidad de los mismos a los pocos días, por lo tanto se trató de eliminar todo posible factor de estrés: cambios bruscos en la manipulación de los organismos, en las recolecciones y transporte, así como durante las inducciones, también se disminuyó la densidad de siembra de 30 a 20 organismos/canaleta (1 erizo/12L), aunque según Gómez⁷⁹ y Gómez⁸⁰ se han encontrado en su medio natural hasta densidades de 52 y 82 erizos/m² en las Islas del Rosario e Isla Cubagua respectivamente; lo anterior dependiendo en la mayoría de los casos de la disponibilidad de fanerógamas. Con los cambios realizados se evidenció una mejora en el estado de los organismos en cautiverio facilitando encontrar al primer o segundo erizo desovado alta calidad en sus productos sexuales.

⁷⁹ GÓMEZ GASPAS, Alfredo. Abundancia de erizo *Lytechinus variegatus* (LAMARCK) en la costa norte, este y oeste de la Isla de Margarita (Venezuela). En: Acta Científica Venezolana. Enero, 2002. vol. 53.n.1. pp. 15-20.

⁸⁰ GÓMEZ GASPAS, Alfredo. Abundancia de *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Toxopneustidae) en la Isla de Cubagua, Venezuela. Op. cit., p.3.

Figura 18. Pérdida de púas observada en el erizo de mar



- La limpieza (sifoneo) se realizó cada 24, debido a que al aumentar las raciones diarias de alimento se incrementó también el ingreso de materia orgánica al sistema, por lo tanto se debía sifonear con mayor frecuencia para mantener la calidad del agua.
- En el transcurso del trabajo como lo muestra la tabla 7, se presentaron diferentes porcentajes de mortalidad atribuibles al proceso de adaptación al cautiverio; es decir el proceso de recolecta, traslado al laboratorio, aclimatación, cuarentena y consumo de nuevos alimentos, los cuales produjeron en los organismos estrés y como respuesta cambios fisiológicos, enfermedades (Anexo 4) o incluso la muerte. Aunque las actividades se hayan realizado con cuidado, los organismos eran sometidos a nuevas condiciones extremas, ajenas a las de su medio natural.

Tabla 7. Mortalidad en los lotes de *L. variegatus* ingresados al LABBIP

Año	Meses	Cantidad de erizos ingresados	Mortalidad	Total de erizos en el Labbip	Total de erizos devueltos al medio
2012	Noviembre	112	18%	92	0
	Diciembre	0	0	92	0
	Enero	73	3%	104	58
2013	Febrero	0	9%	95	0
	Marzo	66	14%	148	148
	Abril	0	0%	0	0
Promedio mortalidad				11%	

En la tabla 7 se observa que al inicio de las labores de mantenimiento, la mortalidad fue alta, posiblemente debido a la alta densidad mantenida en las canaletas, sumado a la poca experiencia en el manejo de los organismos,

ocasionó la mayor mortalidad a lo largo del periodo de estudio. Las mortalidades ocurridas durante los siguientes meses están asociadas al ingreso de nuevos lotes y a su adaptación al cautiverio.

➤ Los valores de temperatura, oxígeno disuelto, salinidad y pH se mantuvieron constantes desde noviembre hasta abril, en los meses anteriores se trabajó en el mantenimiento mientras se estandarizaban los parámetros en pro de iniciar con cada ensayo toxicológico (Anexo 1). En días previos a algunas inducciones, ciertos parámetros fueron modificados para realizar pruebas y ajustes y así mejorar su efecto sobre el proceso de calidad gonádica.

Teniendo en cuenta los valores de temperatura presentados en la tabla 8 solo los primeros meses (noviembre, diciembre y enero) tuvieron una variación de 0,3 a 0,5°C, el uso de termostatos de enero en adelante disminuyeron la variación, de igual forma, la misma no debió afectar el bienestar de los erizos dentro del laboratorio ya que de acuerdo con Gómez⁸¹, Montealegre y Gómez⁸² en su medio natural se encuentran en óptimas condiciones entre 24 y 30°C, salinidad de 35-37 ups y 2,7 a 5,1 mg/L de oxígeno disuelto. Además la salinidad, el oxígeno disuelto y el pH no tuvieron variación significativa ($p < 0,05$) entre canaletas ni entre los meses de estudio.

Tabla 8. Valores promedio mensuales de temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y pH de seis canaletas

Mes	Temperatura (°C)	Salinidad (ups)	Oxígeno disuelto (mg/L)	pH
Junio	25,33 ± 0,01	37,59 ± 0,2	7,84 ± 0,01	7,97 ± 0,01
Julio	26,7 ± 0,3	34,6 ± 0,03	7,7 ± 0,12	8,3 ± 0,01
Agosto	25,25 ± 0,2	37,92 ± 0,1	7,64 ± 0,02	8,31 ± 0,02
Septiembre	24,72 ± 0,8	36,85 ± 0,3	8,10 ± 0,13	8,15 ± 0,01
Octubre	23,79 ± 0,3	34,56 ± 0,5	7,88 ± 0,15	8,17 ± 0,01
Noviembre	25,2 ± 0,5	35,6 ± 0,2	7,7 ± 0,1	8,1 ± 0,0
Diciembre	25,1 ± 0,3	35,0 ± 0,1	7,6 ± 0,1	7,9 ± 0,0
Enero	26,2 ± 0,3	35,7 ± 0,1	8,0 ± 0,0	8,1 ± 0,0
Febrero	26,0 ± 0,0	35,3 ± 0,0	7,8 ± 0,0	8,1 ± 0,0
Marzo	25,9 ± 0,2	35,2 ± 0,1	7,7 ± 0,0	8,0 ± 0,0
Abril	26,1 ± 0,2	35,1 ± 0,0	7,9 ± 0,0	8,1 ± 0,0

Zona sombreada: meses de solo mantenimiento, zona sin sombra: meses de mantenimiento y ensayos

La tabla 8 también muestra que durante los primeros cinco meses se presentaron altas salinidades, casi alcanzando valores de 38 ups, lo anterior debido a que

⁸¹ *Ibíd.*, p.4.

⁸² MONTEALEGRE QUIJANO, Santiago y GÓMEZ GASPAR, Alfredo. Op. cit., p. 307.

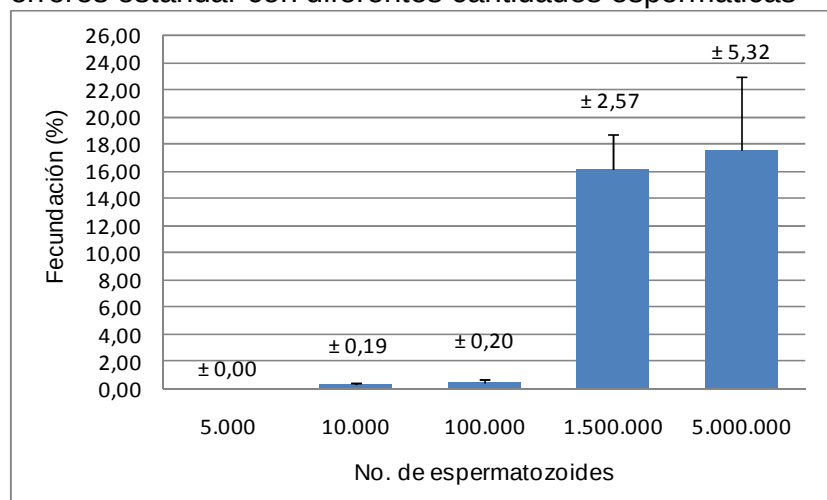
durante agosto y septiembre se mantuvieron en cuarentena por la presencia de una patología la cual se manifestó en los erizos por una mancha negra alrededor de toda su testa, como consecuencia caída de púas y finalmente la muerte (Anexo 4), por consiguiente al tener el flujo de agua cerrado dificultó mantener la estabilidad de los parámetros, los cambios bruscos de 36 a 38 ups en menos de veinticuatro horas era perjudiciales para los erizos, por lo cual este factor también influyo en aumentar el estrés y mortalidad en los organismos.

Con lo anterior se estableció que para el mantenimiento del erizo de mar se debe mantener en promedio una temperatura de 26°C, salinidad de 35 ups, oxígeno disuelto de 7,7 mg/L y un pH de 8,05.

6.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ESPERMATOZOIDES APTA PARA OBTENER PORCENTAJES DE FECUNDACIÓN MAYORES AL 85%

Las concentraciones espermáticas que se establecieron en la metodología fueron aplicadas en previos estudios para las especies *S. franciscanus* y *A. spatuligera* y como produjeron los porcentajes de fecundación deseados (>80%) se procedió a evaluarlas con los gametos de *L. variegatus*; dentro del trabajo de campo para obtener valores entre el cero y >85% de fecundación se incluyó una concentración stock menor a las establecidas (50.000 espermatozoides/mL), pero se obtuvieron porcentajes < 20% como se observa en la figura 19, por tal razón se establecieron nuevas cantidades entre 6.250.000 a 120.000.000 espermatozoides.

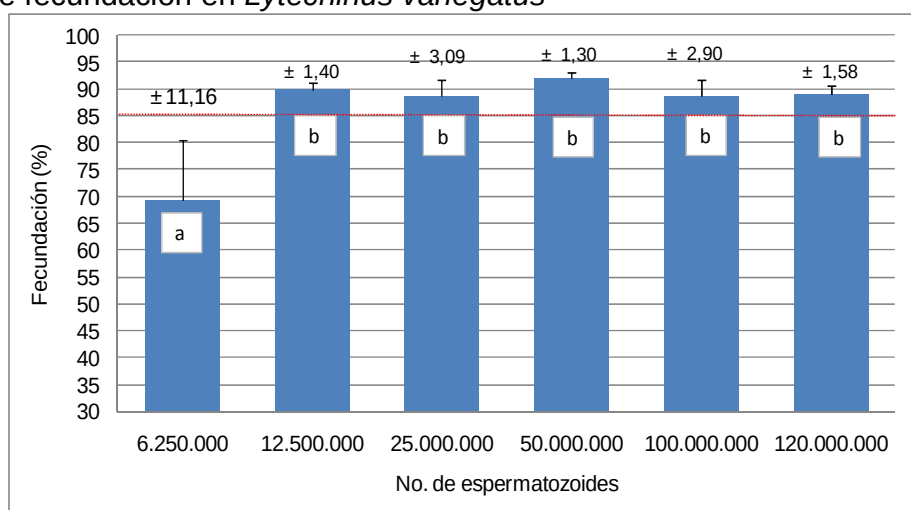
Figura 19. Porcentajes de fecundación y sus respectivos errores estándar con diferentes cantidades espermáticas



Como resultado de este ajuste a la metodología, se obtuvieron valores de fecundación cercanos al 85% requerido en la propuesta de investigación (Anexo 5).

Es importante resaltar que en el ensayo anterior (Figura 19) el mayor porcentaje de fecundación fue de 18%, mientras que al aumentar a 6.250.000 espermatozoides desde una concentración stock de 62.500.000 espermatozoides/mL (Figura 20) se incrementó sustancialmente llegando al 69%. Lo anterior debido a que las concentraciones establecidas dentro de la metodología se utilizaron en sus respectivos estudios bajo una fecundación inmediata, mientras que en esta investigación se trabajó con sesenta minutos de exposición, tiempo durante el cual los espermatozoides van gastando su energía reduciendo la fecundación a un 18% con la mayor cantidad espermática ensayada, además evidencia la importancia de conocer la relación ovulo: espermatozoide para que ocurra la fecundación; la cual de acuerdo con los datos y garantizando el porcentaje de fecundación mayor al 85% se determinó en 1:25.000.

Figura 20. Relación promedio de No. de espermatozoides/porcentaje de fecundación en *Lytechinus variegatus*

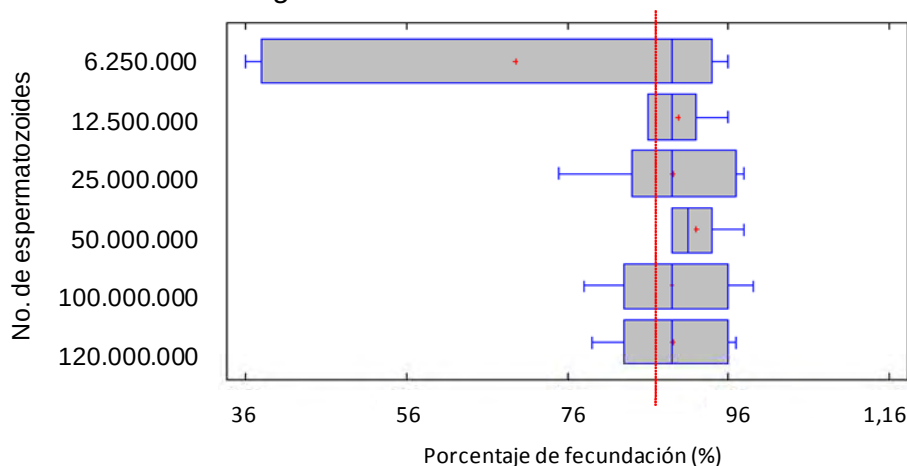


Diferentes letras expresan diferencias significativas entre los tratamientos

El ANOVA, para los dos ensayos entre 6.250.000 a 120.000.000 espermatozoides mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos (Anexo 6) y la prueba de Duncan indicó que el único tratamiento que presenta diferencias significativas con respecto a los demás es el T1 (6.250.000 espermatozoides), con una media de $69 \pm 11\%$, los demás tratamientos no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) (Anexo 7).

En la figura 21 para 6.250.000 espermatozoides se puede observar una alta variabilidad, es posible que a pesar de que el número de células es alto, puedan existir variables no evaluadas que influyen en el porcentaje de fecundación, entre ellas se podría suponer que algunos espermatozoides no son viables, que podrían tener alguna diferencia en su morfología o tamaño, que otros pueden agotar muy rápidamente su reserva de energía o sufrir daños físicos durante las diluciones y aplicaciones en los diferentes recipientes, estas variables son de normal ocurrencia dentro de cualquier ensayo sin opción de ser controlables porque todo procedimiento de laboratorio tiene un nivel de error, en este caso de variabilidad dando menor posibilidad al espermato de fecundar los ovocitos, esta concentración hace que la diferencia con los otros tratamientos sea notoria. Al incrementar el número de espermatozoides se aumenta la posibilidad de tener suficientes células viables y se garantiza que se fecunde el 85% de los ovocitos. La baja variabilidad en 50.000.000 espermatozoides asegura también una adecuada homogeneidad en las réplicas. Al analizar los resultados y con el fin de asegurar un control negativo que produzca porcentajes de fecundación mayores al 85% se eligió a 50.000.000 espermatozoides, como la equidistante entre la mínima y la máxima, teniendo en cuenta su baja variabilidad y que los resultados a cantidades iguales o superiores a 12.500.000 espermatozoides dan un porcentaje de fecundación deseado sin efectos secundarios (polispermia) con lo cual se evitó exceso o déficit de espermato dentro de los ensayos disminuyendo la variabilidad en el porcentaje de fecundación (Figura 21).

Figura 21. Gráfico de cajas y bigotes a diferentes concentraciones espermáticas de *L. variegatus*



El comportamiento del porcentaje de fecundación vs concentración espermática obtenido es similar al reportado por Garza, *et al.*⁸³, quien también obtuvo un

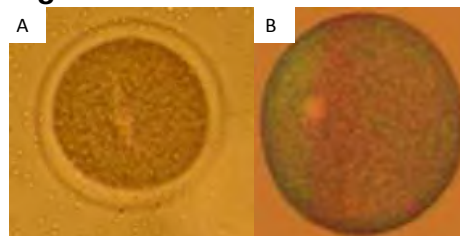
⁸³ GARZA, A. ITUARTE, E. SIERRA, G. LOPEZ, R y RODRIGUEZ, R. Op. cit., p.6.

incremento en la fecundación a medida que aumentaba la concentración, lo anterior hasta obtener valores muy cercanos al 100% sin la aparición de larvas anormales. Es decir después de llegar a cierta concentración de esperma, el incremento de la misma produce iguales porcentajes de fecundación sin afectar el normal desarrollo larval del erizo de mar.

Los mismos autores⁸⁴ mencionan que la mayor concentración espermática estudiada para la especie *Strongylocentrotus franciscanus* ha sido de 10.000.000 espermatozoides/mL presentando porcentajes superiores al 90% de fecundación inmediata y Buitrago y Lodeiros⁸⁵ menciona que para *L. variegatus* efectuando también una fecundación inmediata, a razón de ovocito: espermatozoide de 1:30 se han producido porcentajes de fecundación mayores al 80%; en ambos casos la concentración espermática es mucho menor comparada con la de la presente investigación (12.500.000 espermatozoides). Por lo tanto, para cada metodología implementada, tiempo de exposición y especie de erizo de mar, hay una concentración espermática diferente para obtener el valor deseado en el porcentaje de fecundación. Por ejemplo; si el tiempo de exposición es cambiado de una a dos horas se va a necesitar más de 25.000 espermatozoides por ovocito para lograr una fecundación superior al 85%, debido a que las células estarán perdiendo energía y algunas falleciendo tras las dos horas de nado al azar que realizan mientras entran los ovocitos al medio fecundante, el porcentaje de fecundación no va a ser el mismo bajo diferentes tiempos de exposición, de ahí el porqué varía la cantidad gamética para asegurar el 85% bajo un tiempo de exposición específico en la especie objeto de estudio.

En cada ensayo se realizó el conteo de los ovocitos en buen estado, tanto fecundados como no fecundados para un total de 200 unidades por muestra, lo anterior con el fin de establecer el porcentaje o índice de fecundación (Figura 22A y B).

Figura 22. Ovocitos



(A), ovocito con fecundación definida
(B), ovocito sin fecundación definida.

⁸⁴ *Ibíd.*, p. 6.

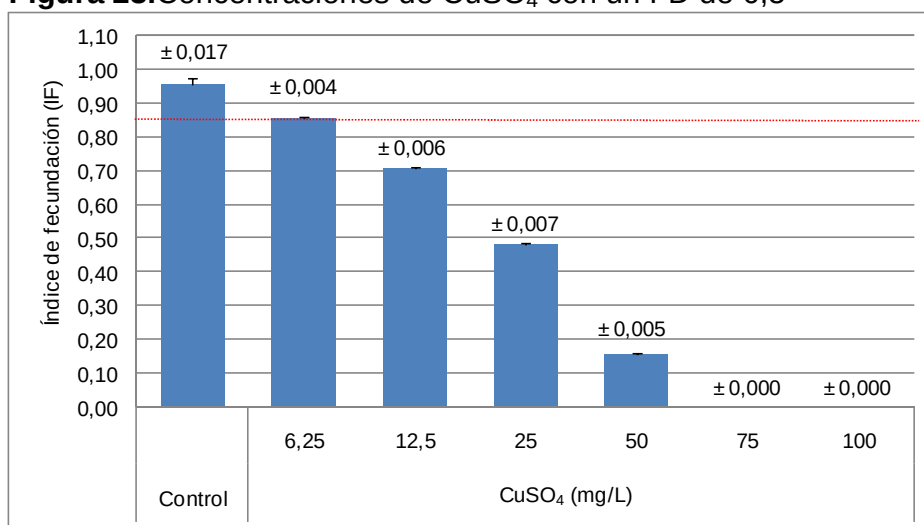
⁸⁵ BUITRAGO, Esperanza y LODEIROS SEIJO, César. *Op. cit.*, pp. 320-323.

6.2 CONCENTRACIÓN EFECTIVA (CE_{50-60 minutos}) DE SULFATO DE COBRE (CuSO₄) COMO TÓXICO DE REFERENCIA EN LA FECUNDACIÓN DEL ERIZO DE MAR *Lytechinus variegatus*.

Una vez establecida la concentración adecuada de espermatozoides y de ovocitos para que los ensayos cumplan con todos los requisitos y sean viables se procedió a realizar los ensayos con el tóxico de referencia hasta lograr su estandarización.

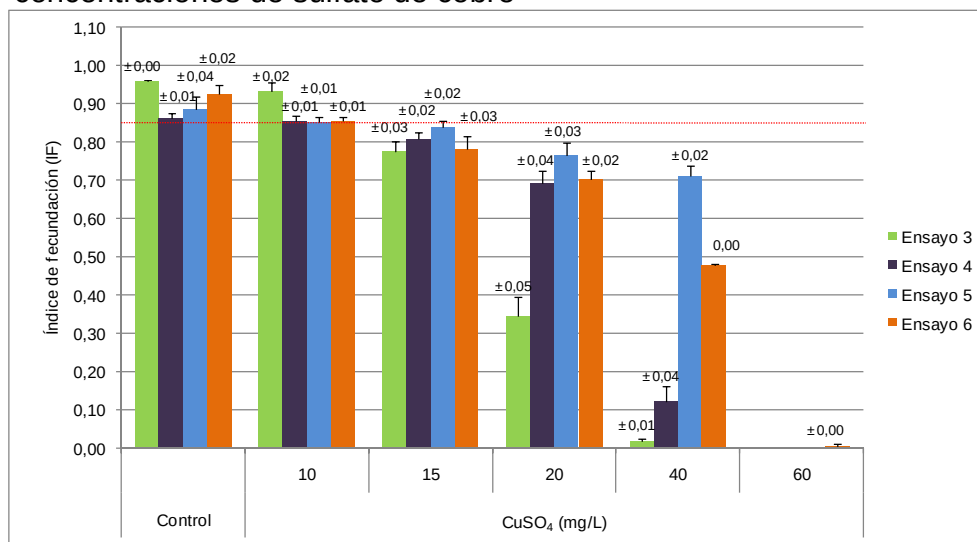
6.2.1 Estandarización del protocolo. Una vez establecida la metodología se realizó la serie de ensayos con diferentes concentraciones de sulfato de cobre. Para obtener las concentraciones seriadas se realizaron 13 ensayos (Anexo 8) hasta lograr determinar las concentraciones requeridas que presenten índices de fecundación de 0 a 1 aproximadamente, para desarrollar los ensayos de toxicidad definitivos y elaborar la tabla control que garantiza la validez de los resultados; el primer ensayo fue utilizando el factor de dilución de 0,5 y los demás aproximándose con base en los resultados previos (Figura 23).

Figura 23.Concentraciones de CuSO₄ con un FD de 0,5



Con el primer ensayo (Figura 23) se detectó que concentraciones iguales o mayores de 75 mg/L de sulfato de cobre daban como resultado la ausencia de fecundación y menores a 12,5 mg/L daban porcentajes superiores al 70% o 0,7 según el índice de fecundación. Por lo tanto se realizaron más ensayos ajustando las concentraciones para obtener los índices de fecundación deseados, y algunas aproximándose al 50% de fecundación o 0,5 según el IF, estas concentraciones fueron; 10, 15, 20, 40 y 60 mg/L de sulfato de cobre (Figura 24).

Figura 24. Estandarización del ensayo para establecer las concentraciones de sulfato de cobre



Como se muestra en la figura 24, todos los controles tienen índices de fecundación mayor al 0,85, se puede apreciar también que la concentración a la cual se afecta el 0,5 de la fecundación está entre 20 y 40 mg/L, por lo tanto, se decidió realizar un ajuste abarcando las anteriores concentraciones y una adicional de 30 mg/L, con el fin de obtener valores más cercanos a la CE₅₀.

Los ensayos 2, 7, 8, y 9 no presentaron los índices de fecundación esperados para el control y por ende no se pueden aceptar los resultados obtenidos con las demás concentraciones de sulfato de cobre, lo anterior ocurrió debido a errores indeterminados mientras en campo se ganaba experiencia para controlar cada uno de los pasos de la metodología.

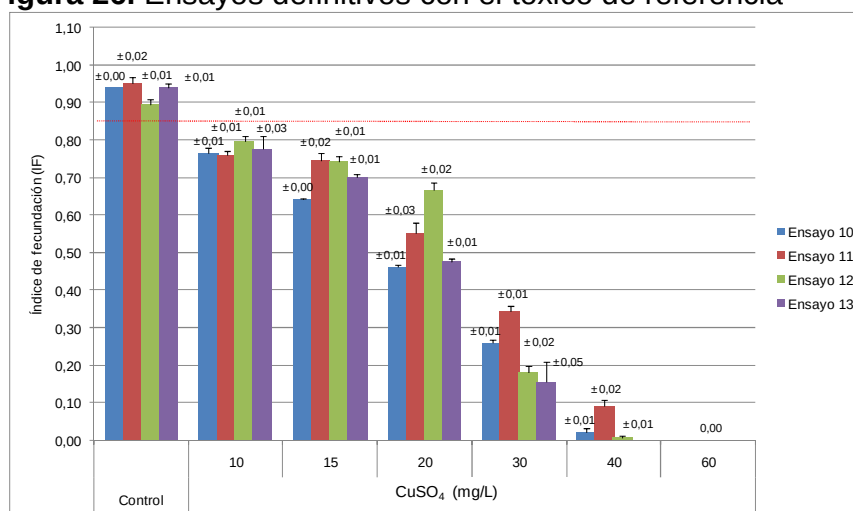
Adicionalmente a los resultados obtenidos en los ensayos se observó que a concentraciones mayores de 30 mg/L gran cantidad de ovocitos perdieron su forma redondeada y se tornaron arrugados es decir perdieron tonicidad (Figura 25). Es probable que este efecto sea producto de la acidificación, es decir a la reacciones químicas entre los componentes, donde el azufre reaccionó con el dióxido de carbono del aire y con los iones hidroxilo produciendo mayor acidez a medida que aumentaba la concentración del tóxico de referencia, este efecto causa daños en la estructura de los ovocitos, sin embargo esta variación no influyó en los resultados de fecundación, ya que el conteo se realizó como en todos los casos solamente con los ovocitos en buen estado anatómico.

Figura 25. Ovocitos afectados a concentraciones ≥ 30 mg/L de CuSO_4



La figura 26 muestra en promedio los índices de fecundación que se buscaban al terminar de controlar cada paso en el protocolo de fecundación, lo anterior con el fin de aplicar el análisis estadístico y determinar la existencia o no de diferencias significativas, soportando tales valores mediante los supuestos estadísticos. La figura muestra claramente que a concentraciones superiores a 40 mg/L no hay fecundación después de exponer el esperma 60 minutos al agente tóxico, mientras que con dosis menores o iguales a 15 mg/L se puede obtener fecundaciones mayores o iguales al 0,7 ó 70%.

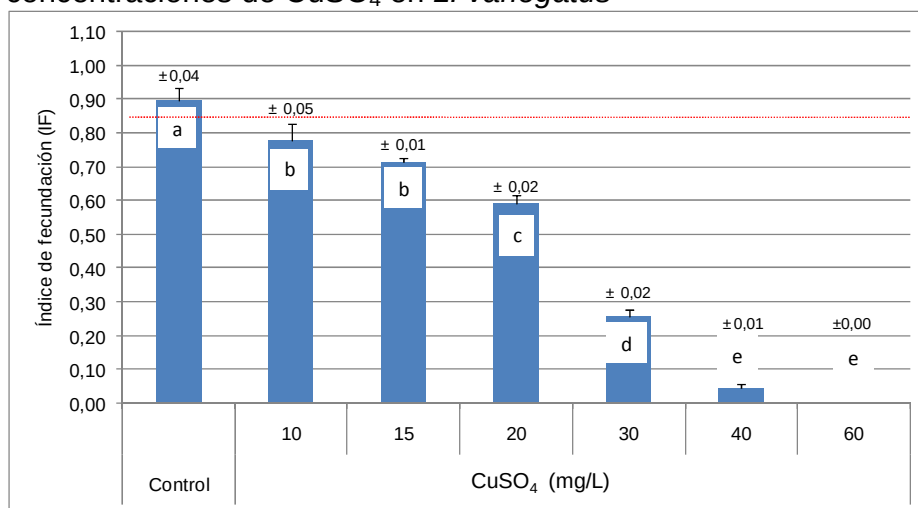
Figura 26. Ensayos definitivos con el tóxico de referencia



El análisis de varianza estableció que no existen diferencias entre ensayos ($p > 0,05$), indicando que no hay variación entre los diferentes experimentos por lo que se acepta la hipótesis nula. Este mismo análisis mostró la presencia de diferencias significativas entre el efecto de las concentraciones de sulfato de cobre sobre el índice de fecundación aceptando la hipótesis alterna ($p < 0,05$) (Anexo 9 y 10), ya que a medida que aumenta la concentración del tóxico ocurre una disminución del número de ovocitos fecundados.

La confiabilidad de todos los resultados se muestra con el índice promedio obtenido en el control negativo, es decir que el índice de fecundación promedio dentro de este control en los cuatro diferentes ensayos fue mayor al 0,85, lo cual permite asegurar que la concentración a la cual se ve afectada el 0,5 de la fecundación promedio es efectivamente alrededor de los 20 mg/L (Figura 27). La prueba de Tukey indicó que las diferencias significativas entre las concentraciones más bajas (10 y 15 mg/L) y entre las más altas (40 y 60 mg/L) no fueron significativas, por cuanto las primeras produjeron una fecundación cercana a 0,80 y las últimas casi una inhibición total de la fecundación; las demás concentraciones presentaron diferencias significativas en el índice de fecundación ($p < 0,05$) (Figura 27) (Anexo 11).

Figura 27. Índice de fecundación promedio a diferentes concentraciones de CuSO_4 en *L. variegatus*



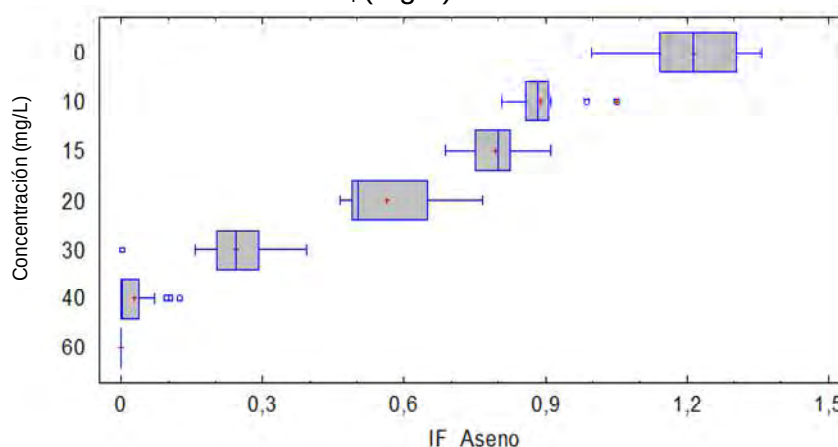
Barras con letras iguales indican la no diferencia significativa entre tratamientos, mientras que letras diferentes indican que si la hay.

6.2.2 Supuestos estadísticos. Los resultados obtenidos se soportaron en el análisis de varianza; el supuesto de normalidad muestra una distribución normal de los datos en cada uno de los ensayos ($p > 0,05$) validado con la prueba de chi-cuadrado (0,0) y el valor de z-asimetría (0,45); el supuesto de Homogeneidad muestra por la prueba de Cochran una homogeneidad de varianzas ($p > 0,05$) aunque el número de muestras sean diferentes en cada uno de los experimentos y el supuesto de Independencia muestra una no correlación serial, puesto que la prueba no se realizó en una serie de tiempo, es decir solo se evaluó el índice de fecundación al tiempo de 60 minutos de exposición.

6.2.3 CE₅₀. La concentración efectiva calculada por el método Spearman-Kärber donde existe el 0,5 de fecundación en los gametos expuestos al sulfato de cobre es 20,45 mg/L por lo que se permite aceptar la hipótesis alterna, el valor de la CE₅₀ tiene como límite inferior de 19,10 mg/L y límite superior de 21,89 mg/L, se presenta también un coeficiente de variación de 9,29 con un porcentaje mayor al 95% de confianza (Anexo 12). El valor de CE₅₀ reportado se considera alto si se compara con el reportado por Rudolph, *et al.*⁸⁶ para *Arbacia spatuligera* el cual fue de 4,69 mg/L, es decir *L. variegatus* es más tolerante frente a este tóxico.

La figura 28 muestra la variabilidad que presentó el índice de fecundación bajo las diferentes concentraciones. La CE₅₀ no tiene una distribución simétrica, por lo que su media no se encuentra en el centro de la caja, algo que si se presenta en las mayoría de las concentraciones evaluadas, por lo tanto tiene mayor probabilidad de alterarse su resultado hasta un índice de 0,7 aproximadamente.

Figura 28. Gráfico de cajas y bigotes para las diferentes concentraciones de CuSO₄ (mg/L)



6.2.4 Carta control. Con los resultados obtenidos se elaboró la carta control de acuerdo con Díaz, *et al.*⁸⁷, la cual se realizó para establecer los intervalos aceptables de variación de la respuesta de los gametos al tóxico de referencia con un margen de confianza del 95%. La tabla 9 y figura 29 muestran la sensibilidad de la especie y la estabilidad de su respuesta al sulfato de cobre.

⁸⁶RUDOLPH, Anny. MOSCOSO, Julio. AGUIRRE, Gabriela y AHUMADA, Ramón. Calidad de los sedimentos en el mar interior de Chiloé (41,5° a 43° latitud sur) en función de pruebas de toxicidad. Universidad Católica de la Santísima Concepción. Concepción. 2005. p. 164.

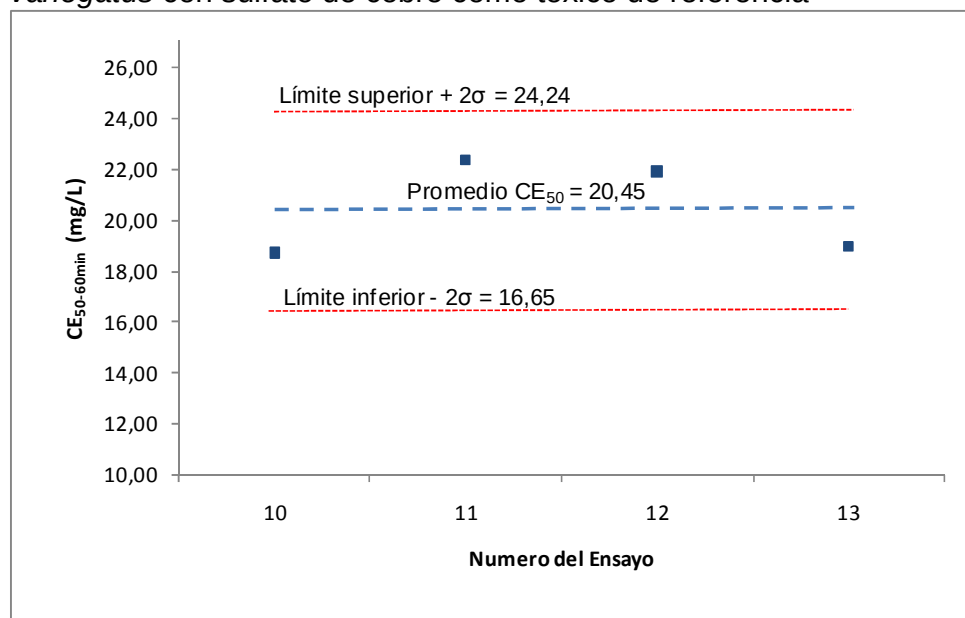
⁸⁷DÍAZ, María. SOBRERO, María y GRANADOS, Yolanda. Aseguramiento y control de calidad de bioensayos. Op.cit., p. 128.

Tabla 9. Resultados de la CE_{50} obtenidos en la fecundación de *L. variegatus* utilizando sulfato de cobre como tóxico de referencia.

Según Spearman-Karber					
ENSAYO	CE ₅₀ (mg/L)	límite superior (mg/L)	Límite inferior (mg/L)	Límite superior promedio (mg/L)	Límite inferior promedio (mg/L)
10	18,68	20,10	17,36	21,89	19,10
11	22,30	24,09	20,65		
12	21,86	23,19	20,60		
13	18,94	20,18	17,78		
Promedio (CE ₅₀)				20,45 mg/L	
Error estándar (σ)				1,90	
Coeficiente de variación				9,29%	
Límite superior (L. superior + 2σ)				24,24 mg/L	
Límite inferior (L. inferior - 2σ)				16.65 mg/l	

El intervalo de variación aceptable en la obtención de la CE_{50} para futuros ensayos con el toxico de referencia estará entre 16,65 y 24,24 mg/L. La estabilidad de la respuesta del CE_{50} con cada ensayo realizado puede cambiar con el tiempo transcurrido, de acuerdo a los resultados varió desde 18,68 a 22,30 mg/L, para reducirse la variación se deberá adquirir mayor habilidad y exactitud en los procedimientos, aunque también puede aumentarse por condiciones externas.

Figura 29. Carta control para la fecundación en *Lytechinus variegatus* con sulfato de cobre como tóxico de referencia



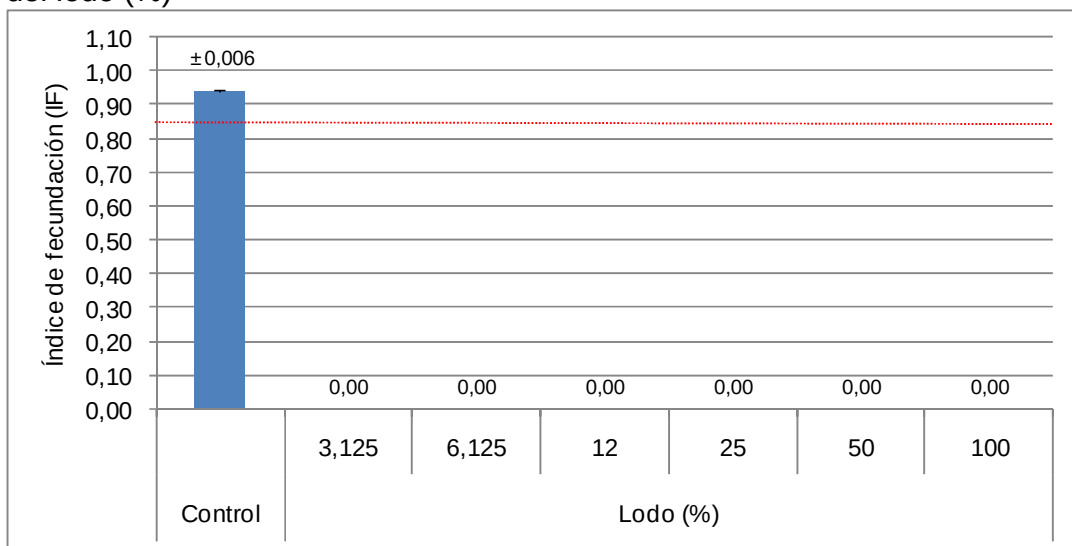
6.3 CONCENTRACIÓN EFECTIVA 50% (CE_{50-60 minutos}) DEL FLUIDO DE EXPLORACIÓN OFFSHORE EN LA FECUNDACIÓN DEL ERIZO DE MAR *Lytechinus variegatus*

La concentración adecuada de gametos al igual que los ensayos con tóxico de referencia se estableció con el fin de realizar los ensayos de lodo y lograr la concentración a la cual el 0,5 de la fecundación es afectada.

6.3.1 Estandarización del protocolo. De acuerdo a la metodología establecida para encontrar aquellas concentraciones que produzcan índices de fecundación entre el cero y uno se tuvieron que realizar 11 ensayos (Anexo 13), donde solo los últimos tres se tuvieron en cuenta para establecer la CE₅₀ del fluido de exploración offshore.

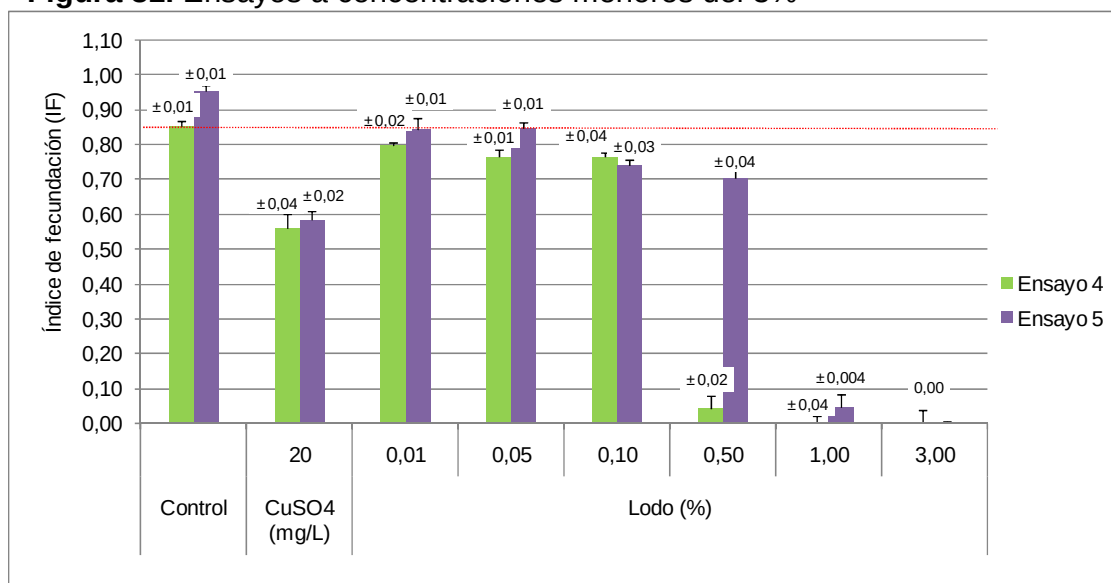
El primer ensayo para iniciar con el *screening test* consistió en realizar diferentes concentraciones del lodo a un factor de dilución de 0,5, partiendo de un 100% de la solución madre. Se observó que en el control negativo se obtuvo un IF promedio >0,85, sin embargo para concentraciones mayores a 3,125% del fluido de exploración offshore no se produce fecundación de los ovocitos, por lo tanto fue necesario desarrollar más ensayos con concentraciones menores a 3% de lodo (Figura 30).

Figura 30. Primer ensayo con un FD 0,5 para las diferentes concentraciones del lodo (%)



Los ensayos 2, 3, 4 y 5 se realizaron con dos controles, uno negativo y uno positivo; el negativo lo constituyen los mismos elementos del ensayo sin el lodo de exploración, solo AMF+UV y el positivo una concentración conocida de sulfato de cobre (20 mg/L). Los valores de fecundación arrojados por los dos primeros ensayos a concentraciones de 0,01 a 3%, no fueron acordes a lo esperado, es decir el control negativo arrojó un índice menor a 0,34 y el positivo aproximado a cero, lo anterior debido a que durante los primeros ensayos se debió controlar nuevamente algunos de los pasos en el protocolo para manejar con destreza dos tóxicos en un solo ensayo, en el proceso se produjo lo esperado, en los ensayos 4 y 5 (Figura 31) los valores de fecundación fueron aceptables respecto al control negativo ($> 0,85$) y positivo (0,50 aproximadamente), con lo cual se pudo establecer que el 0,5 de no fecundación se encuentra entre 0,5 y 1% del lodo, por lo tanto se realizaron ensayos a concentraciones de 0,01, 0,5, 0,6, 0,8, y 1%. Es probable que durante la realización del ensayo número 4, entre concentraciones de 0,5 y 1% se haya cometido algún descuido en la realización del protocolo, por ejemplo en la siembra de los gametos, en el tiempo de exposición, entre otros, por lo cual se obtuvo un bajo índice de fecundación.

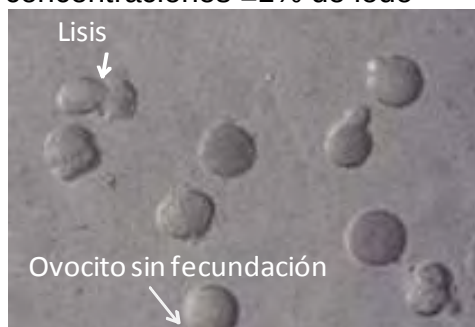
Figura 31. Ensayos a concentraciones menores del 3%



Por otra parte, en la figura 32 se observa el efecto del lodo sobre los gametos una vez terminado el ensayo; los ovocitos expuestos a concentraciones mayores a 1% de lodo son afectados de tal manera que no se produce fecundación, se presenta lisis y deformación de la mayoría, posiblemente debido a factores químicos relacionados con los elementos con los cuales se prepara el lodo, el cual contiene diversos compuestos pero cuya composición exacta no fue dada a conocer

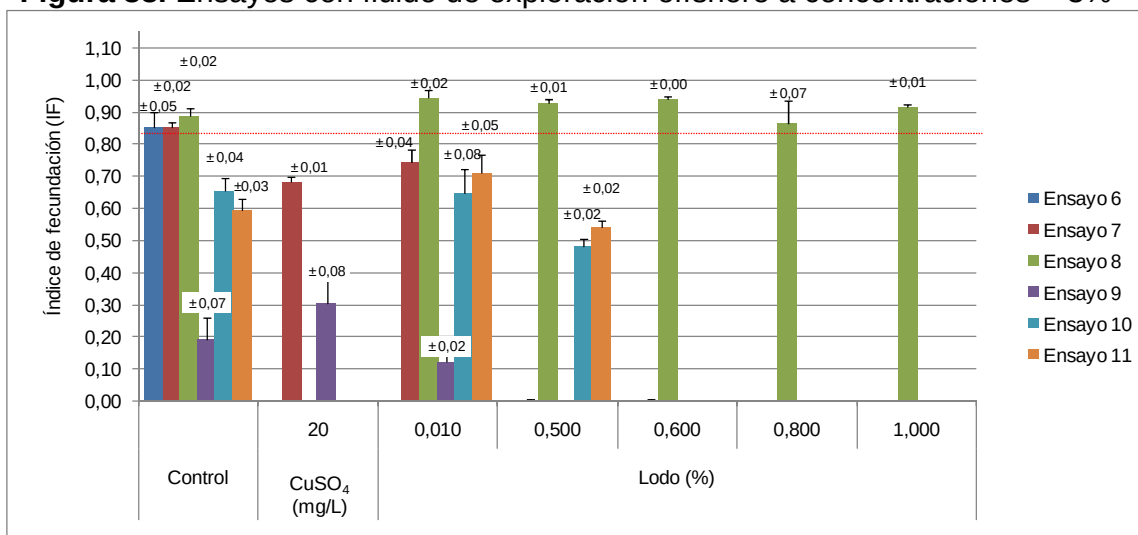
durante la investigación; también puede haber un efecto físico por la presencia de abundantes sólidos en suspensión que pueden dificultar que los espermatozoides lleguen rápidamente a los ovocitos.

Figura 32. Ovocitos no fecundados y afectados a concentraciones $\geq 1\%$ de lodo



Durante el siguiente set de ensayos a concentraciones de lodo entre 0,01 a 1% no fue posible obtener en los controles índices de fecundación mayores a 0,85 para el negativo y de 0,5 para el positivo. En la figura 33 se observan estos resultados y se evidencia que en el ensayo ocho, los resultados fueron los esperados para el control negativo, pero se tuvo que descartar porque no arrojó el valor esperado para el control positivo, lo anterior debido a factores externos propios de los animales que ingresaban constantemente del medio natural.

Figura 33. Ensayos con fluido de exploración offshore a concentraciones $< 3\%$



Al encontrar tan alta variación dentro de los resultados para seis ensayos, se decidió revisar el estado de los organismos ingresados y mantenidos dentro del laboratorio. De acuerdo a lo descrito por Espinoza, *et al.*⁸⁸ en los meses de enero a marzo ingresaron al laboratorio organismos que se encontraban según su ciclo anual con un bajo desarrollo gonadal, los nuevos lotes de erizos durante esos meses posiblemente fueron los causantes de la variación entre ensayos por la calidad de los gametos obtenidos en las inducciones en estos erizos. Además, el mismo autor⁸⁹ indica que para *L. variegatus* las temperaturas bajas parecen ser un factor de gametogénesis y las altas están asociadas al desarrollo y maduración gonádica.

Germendia, *et al.*⁹⁰, Spirlet, *et al.*⁹¹ y Shpigel, *et al.*⁹² también aclaran que en cautividad la manipulación de las condiciones ambientales como temperatura y el fotoperiodo pueden provocar gametogénesis fuera del periodo natural en los erizos de mar; publican que se ha trabajado con diferentes temperaturas en la especie *Paracentrotus lividus* y se ha determinado que según el lugar en que se encuentren, temperaturas entre 18 a 24°C aumentan crecimiento, desarrollo y calidad gonadal. Por lo tanto para que las gónadas del erizo de mar sean de la mejor calidad posiblemente deben pasar por temperaturas tanto bajas como altas, lo cual no ocurría con los lotes que se mantenían en el laboratorio porque estaban en condiciones constantes de temperatura.

Con esta información más los rangos de temperatura de *L. variegatus* se incluyeron cinco días de preparación previos a cada semana de ensayo. Durante los primero tres días se mantuvo baja la temperatura del agua en las canaletas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) y dos días antes de iniciar con los ensayos se incrementó a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ (Anexo 14), con esta actividad se empezaron a obtener nuevamente los resultados esperados (Figura 34).

El control negativo y positivo en los ensayos 12 al 14 arrojaron los índices de fecundación esperados, $>0,85$ y $\pm 0,5$ respectivamente; en la figura 34 se observan los resultados de los dos controles por medio de los cuales se aceptaron los obtenidos en las diferentes concentraciones del fluido de exploración offshore.

⁸⁸ ESPINOZA, R. REYES, J. HIMMELMAN, J y LODEIROS, C. Op.cit., p.344.

⁸⁹ *Ibíd.*, p.348.

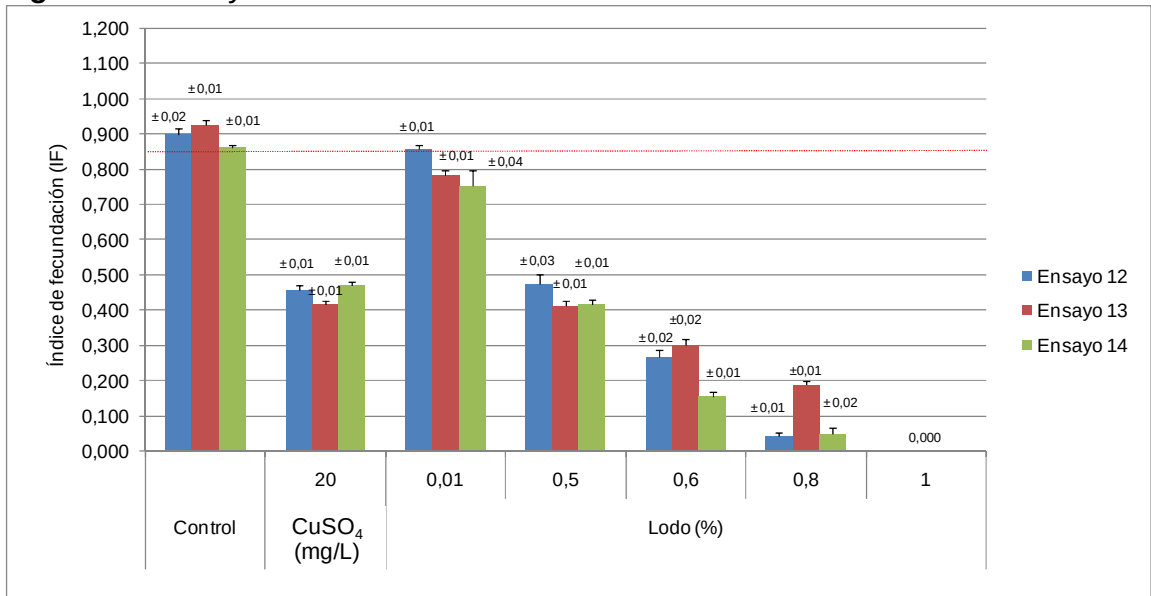
⁹⁰ GERMENDIA, Joxe .MENCHACA, Iratxe. BELZUNCE, María y REVILLA, Marta. Op.cit., p. 3

⁹¹ SPIRLET, Christine. GROSJEAN, Philippe y JANGOUX, Michel. Optimization of gonad growth by manipulation of temperature and photoperiod in cultivated sea urchins, *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata). *En: Aquaculture*. May, 2000. Vol 185. pp. 85-99.

⁹² SHPIGEL, Muki. McBRIDE, Susan. MARCIANO, Sharon y LUPATSCH, Ingrid. The effect of photoperiod and temperature on the reproduction of European sea urchin *Paracentrotus lividus*. *En: Aquaculture*. April, 2004. Volumen 232. pp. 343-355.

La desviación de los datos no supera los $\pm 0,04$ en el índice de fecundación, por lo que se puede recomendar no sobrepasar el mismo para obtener mayor exactitud en los resultados.

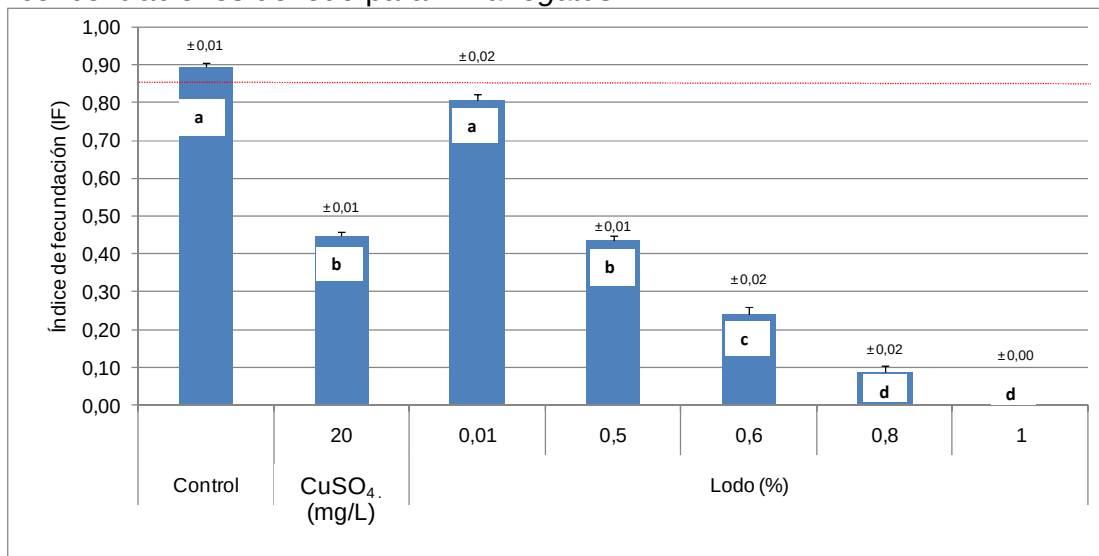
Figura 34. Ensayos definitivos realizados a diferentes concentraciones del lodo



Las concentraciones respectivas por ensayo, así como el índice de fecundación determinaron la existencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) por lo que se acepta la hipótesis alterna (Figura 35) y la ausencia de la misma entre ensayos ($p > 0,05$) aceptando la hipótesis nula (Anexo 15 y 16), de esta manera se acepta el protocolo realizado para el fluido de exploración offshore. Lo anterior surgió una vez depurados los datos en los últimos tres ensayos. La figura 35 muestra la variación en el índice de fecundación con cada concentración de lodo expuesta en los ensayos y evidencia que el erizo de mar es altamente sensible frente al fluido de exploración offshore, encontrando que la concentración efectiva del 50% u 0,5 según el IF es cercana a 0,5%.

La prueba de Tukey mostró que entre las concentraciones de los extremos, es decir tanto entre las bajas (0 y 0,01%) como entre las altas (0,8% - 1%) no hay diferencias significativas, mientras que en el resto el IF sí fue significativo ($p < 0,05$) (Figura 35) (Anexo 17).

Figura 35. Índice de fecundación promedio obtenido con diferentes concentraciones de lodo para *L. variegatus*



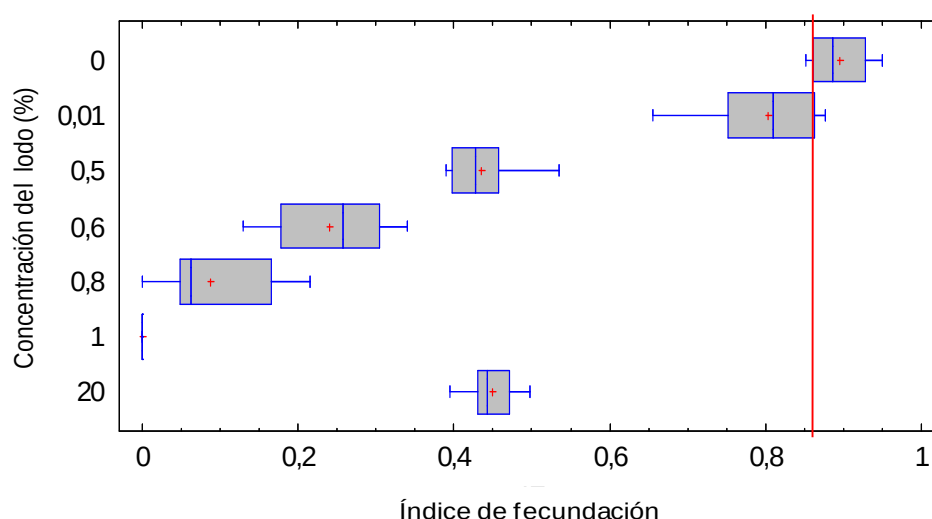
Letras iguales representan que no hay diferencias significativas entre tratamientos

6.3.2 Supuestos estadísticos. Con el fin de soportar los resultados obtenidos en el análisis de varianza, al igual que como se realizó con el tóxico de referencia, se establecieron los supuestos estadísticos; el supuesto de Normalidad muestra una distribución normal de los datos en cada uno de los ensayos ($p > 0,05$) validado con la prueba de chi-cuadrado (0,0) y el valor de z-asimetría (0,086); el supuesto de Homogeneidad, muestra por la prueba de Cochran, homogeneidad de varianzas ($p > 0,05$), aunque el número de muestras o replicas sean diferentes en cada uno de los experimentos, debido a la depuración de datos que se realizó estadísticamente antes de llevar a cabo los análisis; el supuesto de Independencia muestra una correlación serial ($p > 0,05$), aunque este supuesto no puede decir con precisión y confiabilidad su resultado debido a que los ensayos no se realizaron en una serie de tiempo y se evaluaron en un periodo demasiado corto (60 minutos) (Anexo 18).

6.3.3 CE₅₀. Se determinó que la concentración efectiva donde se observa una afectación del 0,5 de la fecundación en los gametos expuestos al lodo es de 0,36% permitiendo aceptar la hipótesis alterna donde si existe una relación lineal de dependencia, el valor de la CE₅₀ presenta un límite inferior y superior de 0,36% y 0,37% respectivamente, adicional se establece que el coeficiente de variación para esta concentración efectiva es de 12% con el cual se puede deducir que se debe aumentar la precisión de cada procedimiento en las futuras pruebas (Anexo 19 y 20).

En la figura 36 se determina que a concentraciones de 0,6 y 0,8% no existe una distribución normal de los datos, mientras que a 0,01 y 0,5% de lodo hay una aproximación considerable a una distribución normal debido a que su media se encuentra casi en el centro de la caja. Los bigotes por el contrario demuestran que el índice de fecundación puede variar drásticamente en cada concentración de lodo, por ejemplo; para la concentración de 0,01% el índice puede disminuir drásticamente o indicar una tendencia con la repetitividad de los ensayos de 0,80 a 0,65, de igual forma puede aumentar el índice de fecundación hasta un 0,55 para 0,5% de lodo

Figura 36. Gráfico de cajas y bigotes para el índice de fecundación en ensayos con fluido de exploración offshore



6.3.4 Carta control. La tabla 10 y figura 37 indica que la sensibilidad de los erizos de mar al lodo es alta ya que con sólo 0,36% de lodo disuelto en el agua se observa una afectación del 0,5 de fecundación en los gametos de *L. variegatus*. Al comparar la CE_{50} del lodo con la publicada por Martínez, *et al.*⁹³ quien al trabajar con sedimentos portuarios en función de hidrocarburos y otros contenidos obtuvo en gametos de *Arbacia spatuligera* un valor de 7 µg/L, se puede deducir que la especie objeto del presente estudio si demuestra alta sensibilidad frente a sustancias de exploración offshore en comparación con otros erizos de mar, debido a que la concentraciones presentadas son bajas.

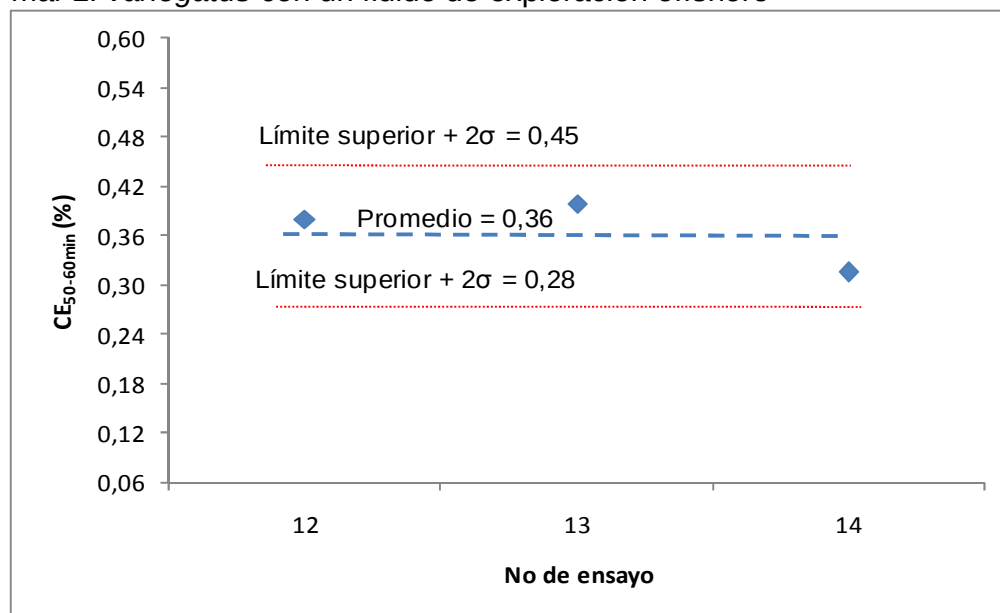
⁹³MARTÍNEZ, Gabriela. RUDOLPH, Anny. AHUMADA, Ramón. LOYOLA, Rodrigo y MEDINA, Valentina. Op.cit.,p 5.

Tabla 10. Resultados de la CE_{50} obtenidos en la fecundación de *Lytechinus variegatus* con un fluido de exploración offshore.

Según Probit					
ENSAYO	CE_{50} (%)	Límite inferior (%)	Límite superior (%)	Límite inferior promedio (%)	Límite superior promedio (%)
12	0,38	0,3696	0,3959		
13	0,40	0,3839	0,4142	0,36	0,37
14	0,32	0,3305	0,3002		
Promedio					0,36
Error estándar					0,0438
Coefficiente de variación (σ)					12,01%
Concentración límite superior (%) (L. superior + 2σ)					0,45
Concentración límite inferior (%) (L. superior - 2σ)					0,28

El intervalo de variación aceptable en la obtención de la CE_{50} para futuros ensayos con el lodo estará entre 0,28 a 0,45%. La estabilidad de la respuesta del CE_{50} con cada ensayo realizado puede cambiar con el tiempo transcurrido, de acuerdo a los resultados vario desde 0,32 a 0,40%, es aparentemente reducida pero puede lograr mayor exactitud en los futuros ensayos con una mejor destreza y perfeccionamiento del protocolo, sin desmeritar el efecto de causas externas.

Figura 37. Carta control para la fecundación en gametos del erizo de mar *L. variegatus* con un fluido de exploración offshore



6.4 PRINCIPALES PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS REGISTRADOS DURANTE LOS ENSAYOS

Los ensayos se realizaron con AMF + UV, con la cual se elaboraron las soluciones de tóxico de referencia y lodo, las diferentes concentraciones espermáticas, las diluciones de los ovocitos y los 5 mL de cada réplica por tratamiento.

6.4.1 Para ensayos a diferentes concentraciones espermáticas. Todos los ensayos se realizaron a una temperatura ambiente entre 26,5 y 27°C.

Tabla 11. Valores de pH, salinidad, oxígeno disuelto y temperatura del AMF+UV utilizada para los ensayos a diferentes concentraciones espermáticas

Parámetros Concentración	pH	Salinidad (ups)	Oxígeno disuelto (mg/L)	Temperatura (°C)
AMF+UV	7,96 ± 0,05	34,8 ± 0,42	8 ± 0,01	26,2 ± 0,49

Según la investigación de López y Sánchez⁹⁴ la salinidad para la fecundación en algunas especies de erizo de mar no debe sobrepasar los 43,4‰ y teniendo en cuenta el rango registrado para *L. variegatus* por Montealegre y Gómez⁹⁵ y Gómez⁹⁶ la salinidad con la que se trabajó en los ensayos (34,8 ≈ 35 ups) estuvo dentro del rango establecido para la especie en el medio natural (35-37 ups), al igual que los valores de temperatura (24 a 30°C), y oxígeno disuelto (2,72 a 5,16 mg/L). Si bien no hay registro del pH en esta especie en su medio, Ospina, *et al.*⁹⁷ mencionan que para la vida marina es apropiado el valor manejado en este proyecto (7,5 a 8,5).

6.4.2 Para ensayos con tóxico de referencia y lodo. Los ensayos de fecundación con el sulfato de cobre y con el fluido de exploración offshore se realizaron a una temperatura ambiente promedio de 26,87 ± 0,24°C y 26,3 ± 0,36°C respectivamente (Anexo 21, 22, 23 y 24).

⁹⁴ LÓPEZ ORTIZ, Estela y SÁNCHEZ, Alberto. Effect of increased salinity in the ovum fertilization of sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus* and *Lytechinus anamesus*. *En: Hidrobiológica*. Agosto, 2009. Vol 19.no 2. p. 181.

⁹⁵ MONTEALEGRE QUIJANO, Santiago y GÓMEZ GASPAS, Alfredo. Op. cit., pp.307.

⁹⁶ GÓMEZ GASPAS, Alfredo. Abundancia de *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Toxopneustidae) en la Isla de Cubagua, Venezuela. Op. cit., p.3.

⁹⁷ OSPINA SALAZAR, Gloria Helena. SANTOS ACEVEDO, Marisol. LÓPEZ NAVARRO, Johann. GÓMEZ LÓPEZ, Diana Isabel. ÁLVAREZ BARRERA, Javier E y GÓMEZ LEÓN, Javier. Op.cit., p.32.

6.4.2.1 Temperatura. Para los siete ensayos de sulfato de cobre se registraron temperaturas promedio entre 23,4 y 24,7°C y para los nueve ensayos a concentraciones de 0,01, 0,5, 0,6, 0,8 y 1% de lodo se registraron temperaturas promedio entre 25,8 y 26,2°C, estos valores se aprecian mejor en la tabla 12.

Tabla 12. Valores promedio de temperatura a diferentes concentraciones de CuSO₄ (mg/L) y lodo (%) con su respectivo $\pm$ D.E.

Ensayo	$\sqrt{X}$	Temperatura (°C)						
		Control	Concentración de CuSO ₄ (mg/L)					
			10	15	20	30	40	60
7,8 y 9	X	24,57 $\pm$ 0,41	24,0 $\pm$ 0,56	23,8 $\pm$ 0,68	24,1 $\pm$ 0,59	24,0 $\pm$ 0,62	24,0 $\pm$ 0,56	23,9 $\pm$ 0,62
10,11,12 y 13	$\sqrt{X}$	24,74 $\pm$ 0,70	23,8 $\pm$ 0,88	23,6 $\pm$ 0,70	23,7 $\pm$ 0,61	23,8 $\pm$ 0,48	23,4 $\pm$ 0,83	23,7 $\pm$ 0,90
Ensayo	$\sqrt{X}$	Control	CuSO ₄ (20mg/L)	Concentración de Lodo (%)				
				0,010	0,500	0,600	0,800	1,000
6,7,8,9, 10 y 11	X	26,1 $\pm$ 0,27	26,1 $\pm$ 0,27	25,9 $\pm$ 0,17	26,0 $\pm$ 0,23	26,1 $\pm$ 0,27	26,0 $\pm$ 0,23	26,1 $\pm$ 0,27
12,13 y 14	$\sqrt{X}$	26,2 $\pm$ 0,40	25,9 $\pm$ 0,16	25,83 $\pm$ 0,20	25,87 $\pm$ 0,16	26,17 $\pm$ 0,40	26,03 $\pm$ 0,31	26,00 $\pm$ 0,35

$\sqrt{X}$ = Ensayos con IF >0,85 y $\pm$ 0,5 dentro de los control negativo y positivo respectivamente validando los IF obtenidos en las concentraciones de tóxico o lodo.

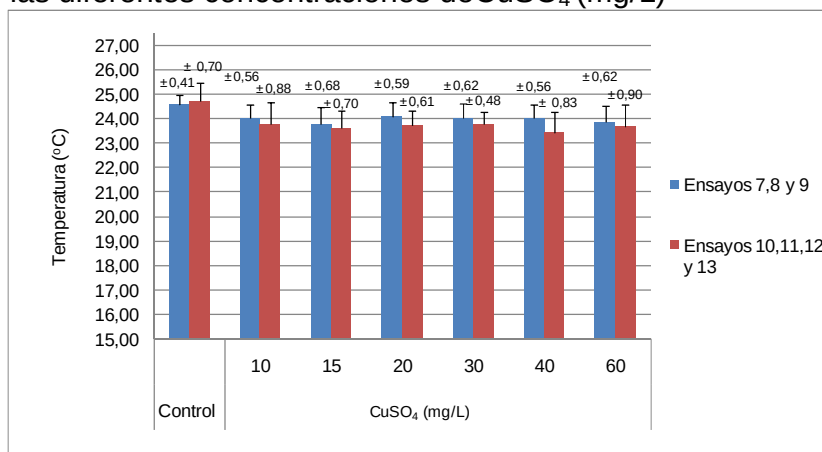
X=Ensayos donde el control negativo y positivo presentan un IF errado, es decir <0,85 y significativamente diferente a 0,5 respectivamente.

- La temperatura promedio para todas las concentraciones de sulfato de cobre en los ensayos con resultados esperados ($\sqrt{X}$) se mantuvo en 23,8°C $\approx$ 24°C (Figura 38), valor encontrado en el medio natural para *L. variegatus* como lo registra Gómez⁹⁸.

Los valores de temperatura entre los índices de fecundación esperados y no esperados (X) son similares y no es posible asegurar que la variación sea la causa en los resultados no esperados ya que estos valores son el promedio de diferentes ensayos; se evidencia también que los resultados no esperados tuvieron valores de temperatura más altos que el resto de ensayos, por lo que se sugiere que la temperatura este entre 23,8 y 24,6°C.

⁹⁸GÓMEZ GASPAR, Alfredo. Abundancia de *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Toxopneustidae) en la Isla de Cubagua, Venezuela. Op. cit., p.4.

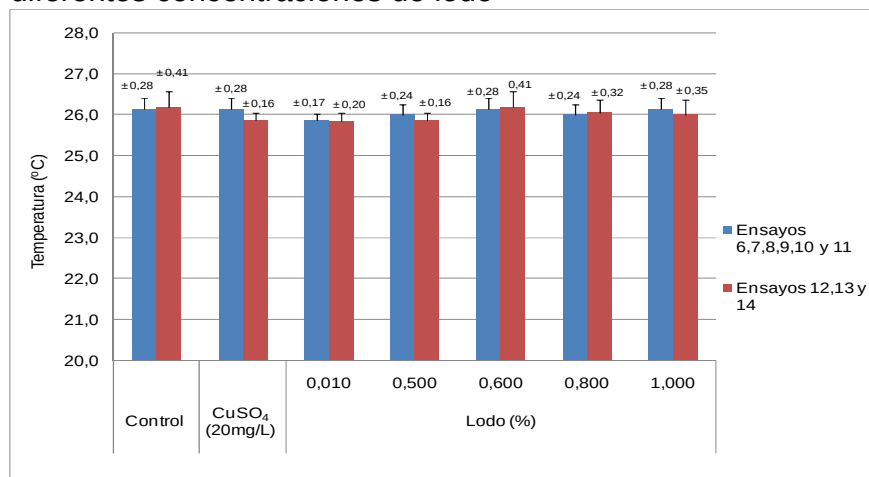
Figura 38. Temperatura promedio y su error estándar en las diferentes concentraciones de CuSO_4 (mg/L)



El ANOVA mostró que no existen diferencias significativas entre las temperaturas de los diferentes tratamientos para los ensayos 7, 8 y 9 ni para los ensayos 10 al 13 ($p > 0,05$) (Anexo 25). Además el comportamiento de la temperatura en las diferentes concentraciones (Figura 38) permitió observar que en todas ellas existen promedios estables con error estándar menor a 0,90.

- De acuerdo con los datos presentados en la figura 39, la temperatura se mantuvo lo más constante a $26^\circ\text{C} \pm 0.04$ en todos los ensayos con el lodo, por lo tanto este parámetro no influyó negativamente sobre el proceso de fecundación. Además, este parámetro no es influenciado por las concentraciones de la muestra.

Figura 39. Temperatura promedio y su error estándar en las diferentes concentraciones de lodo



De acuerdo con el ANOVA, los ensayos 12, 13 y 14 mostraron que no hay diferencias significativas entre las temperaturas de los tratamientos ($p > 0,05$) al igual que para aquellas concentraciones que no produjeron resultados esperados en cuanto al porcentaje de fecundación (ensayos 6, 7, 8, 9, 10 y 11) (Anexo 26). Lo anterior permite aceptar el manejo de la temperatura para la realización de tres ensayos con lodo dentro del laboratorio de Bioprospección Marina del INVEMAR bajo las condiciones establecidas en la metodología.

6.4.2.2 Oxígeno disuelto. Para los siete ensayos de sulfato de cobre se encontraron valores promedio de oxígeno disuelto entre 7,88 y 8,04 mg/L, y para los nueve ensayos de lodo se registraron valores promedio de oxígeno disuelto entre 7,9 y 8,3 mg/L (Tabla 13).

Tabla 13. Valores promedio de oxígeno disuelto a diferentes concentraciones del tóxico de referencia y de lodo con su respectivo $\pm$ D.E.

Oxígeno disuelto (mg/L)								
Ensayo	Control	$\sqrt{X}$	Concentración de CuSO_4 (mg/L)					
			10	15	20	30	40	60
7,8 y 9	$8,04 \pm 0,08$	X	$8,0 \pm 0,03$	$7,8 \pm 0,24$	$7,8 \pm 0,29$	$7,98 \pm 0,00$	$7,9 \pm 0,15$	$7,8 \pm 0,14$
10,11,12 y 13	$8,04 \pm 0,05$	$\sqrt{X}$	$7,97 \pm 0,06$	$7,91 \pm 0,05$	$7,92 \pm 0,02$	$7,88 \pm 0,06$	$7,96 \pm 0,01$	$8,03 \pm 0,03$
Ensayo	Control	$\sqrt{X}$	CuSO_4 (20mg/L)	Concentración de Lodo (%)				
				0,01	0,50	0,60	0,80	1,00
6,7,8,9,10 y 11	$8,0 \pm 0,008$	X	$7,9 \pm 0,037$	$8,0 \pm 0,022$	$8,0 \pm 0,012$	$8,0 \pm 0,052$	$8,0 \pm 0,051$	$8,0 \pm 0,048$
12,13 y 14	$8,3 \pm 0,34$	$\sqrt{X}$	$8,1 \pm 0,049$	$8,0 \pm 0,078$	$8,0 \pm 0,032$	$8,0 \pm 0,032$	$8,0 \pm 0,015$	$8,0 \pm 0,057$

$\sqrt{X}$ = Ensayos con IF $>0,85$ y $\pm 0,5$ dentro de los control negativo y positivo respectivamente validando los IF obtenidos en las concentraciones de tóxico o lodo.

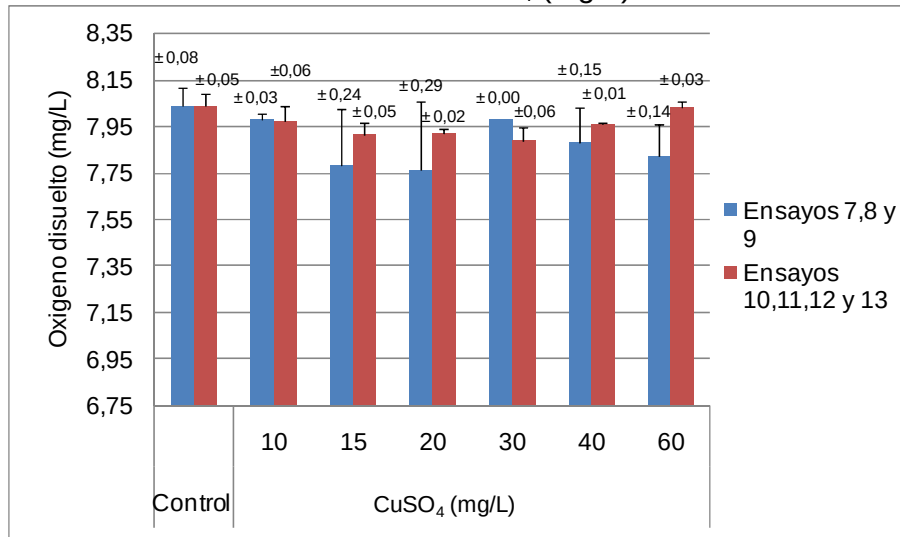
X=Ensayos donde el control negativo y positivo presentan un IF errado, es decir $<0,85$ y significativamente diferente a 0,5 respectivamente.

- En la figura 40 se puede observar cierto grado de variación entre las diferentes concentraciones de sulfato de cobre y entre aquellos ensayos que presentaron o no índices de fecundación deseados. Todos los ensayos con resultados esperados presentaron valores $\geq 7,8$ mg/L, se puede decir que el parámetro se mantuvo según Ospina, *et al.*⁹⁹ dentro de los valores establecidos en el laboratorio

⁹⁹ OSPINA SALAZAR, Gloria Helena. SANTOS ACEVEDO, Marisol. LÓPEZ NAVARRO, Johann. GÓMEZ LÓPEZ, Diana Isabel. ÁLVAREZ BARRERA, Javier E y GÓMEZ LEÓN, Javier. Op.cit., p.32.

para el mantenimiento de organismos marinos, por lo tanto la variación no debió afectar el proceso normal de fecundación.

Figura 40. Oxígeno disuelto promedio y su error estándar a diferentes concentraciones de CuSO_4 (mg/L)

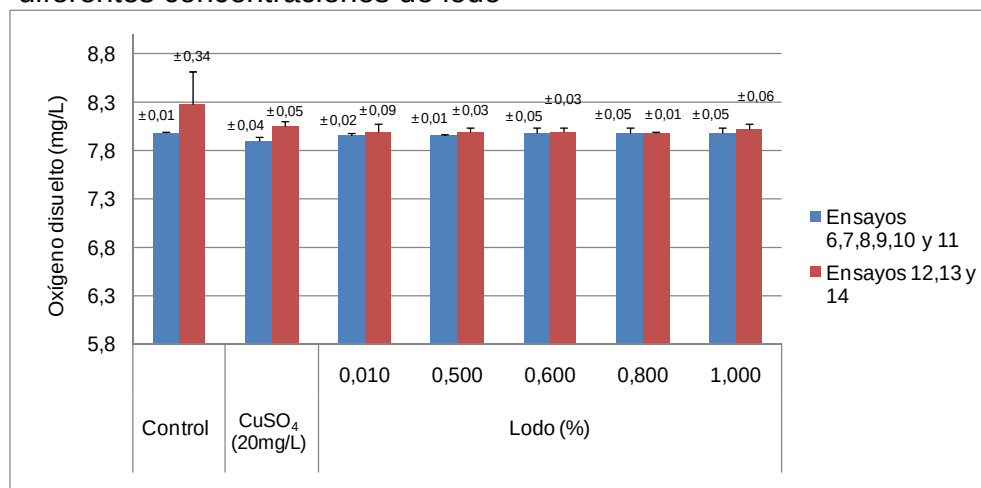


Para los últimos cuatro ensayos, del 10 al 13 el ANOVA demostró que existen diferencias significativas entre las concentraciones de oxígeno disuelto ($p < 0,05$), al igual que para aquellas concentraciones entre ensayos con resultados no deseados (Anexo 27), destacando que los valores presentados son un promedio de diferentes ensayos, se puede suponer que el sulfato de cobre altera cada valor por concentración ya que la homogenización de las muestras estaba estandarizada para los ensayos. Además todas las concentraciones para estos ensayos tienen un coeficiente de variación menor a 0,06 mientras que ensayos con resultados no esperados mantuvieron una variación menor a 0,29, es posible que variaciones mayores a 0,06 en el oxígeno disuelto afecten negativamente el proceso normal de fecundación.

- La figura 41 muestra que los valores de oxígeno disuelto para los ensayos con el lodo se mantuvieron por encima de 7,9, es decir que estuvieron de acuerdo con Ospina, *et al.*¹⁰⁰ dentro de lo que exige el laboratorio para el bienestar de la vida marina.

¹⁰⁰ Ibid., p.32.

Figura 41. Oxígeno disuelto promedio y su error estándar a diferentes concentraciones de lodo



Se demostró con el ANOVA que no existen diferencias significativas entre los tratamientos para los últimos tres ensayos ($p > 0,05$) al igual que para las concentraciones de aquellos ensayos que no produjeron resultados esperados (Anexo 28). Se sugiere que los ensayos con lodo se realicen con valores promedio de oxígeno disuelto de 8,1 mg/L, así sus concentraciones no superaran un error estándar de 0,34 y se garantizara una buena homogeneidad en el momento de airear las muestras para los diferentes ensayos.

6.4.2.3 Salinidad. Para los ensayos a concentraciones de 10 a 60 mg/L de sulfato de cobre se encontraron salinidades entre 34,63 y 35,2 ups y para los ensayos a concentraciones de 0,01 a 1% de lodo se registraron valores entre 34,4 y 34,5 ups como se observa en la tabla 14.

Tabla 14. Valores promedio de salinidad a diferentes concentraciones de sulfato de cobre y lodo con su respectivo $\pm$ D.E.

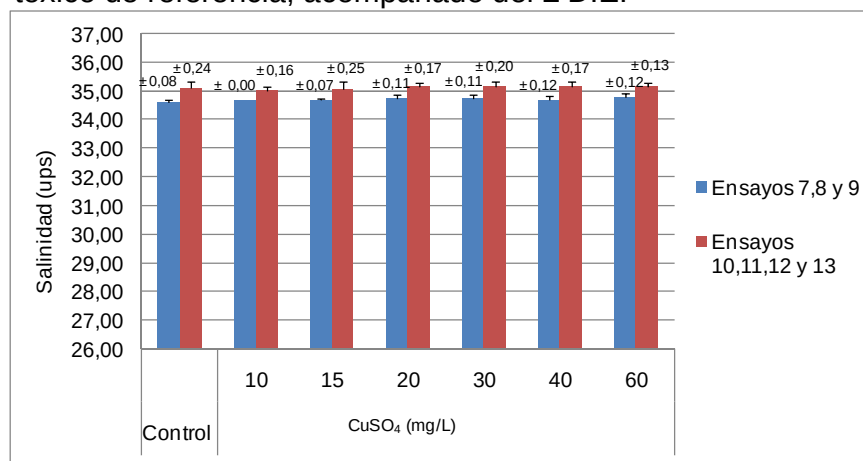
Salinidad (ups)								
Ensayo	Control	√ X	Concentración de CuSO ₄ (mg/L)					
			10	15	20	30	40	60
7,8 y 9	34,63 ± 0,08	X	34,7 ± 0,00	34,7 ± 0,07	34,8 ± 0,11	34,8 ± 0,11	34,7 ± 0,12	34,8 ± 0,12
10,11,12 y 13	35,10 ± 0,24	√	35,0 ± 0,16	35,1± 0,25	35,1 ± 0,17	35,2 ± 0,20	35,2 ± 0,17	35,2 ± 0,13
Ensayo	Control	√ X	CuSO ₄ (20mg/L)	Concentración de Lodo (%)				
				0,010	0,500	0,600	0,800	1,000
6,7,8,9,10 y 11	34,5 ± 0,12	X	34,5 ± 0,096	34,4 ± 0,096	34,5 ± 0,12	34,5 ± 0,09	34,5 ± 0,10	34,5 ± 0,10
12,13 y 14	34,4 ± 0,21	√	34,4 ± 0,18	34,43 ± 0,16	34,40 ± 0,18	34,40 ± 0,18	34,43 ± 0,16	34,43 ± 0,16

√= Ensayos con IF $>0,85$ y $\pm 0,5$ dentro de los control negativo y positivo respectivamente validando los IF obtenidos en las concentraciones de tóxico o lodo.

X=Ensayos donde el control negativo y positivo presentan un IF errado, es decir $<0,85$ y significativamente diferente a 0,5 respectivamente.

- López y Sánchez¹⁰¹ determina que para las especies *Lytechinus anamesus* y *Strongylocentrotus franciscanus* la salinidad alcanza a influir sobre la fecundación a valores de 48,4 y 43,8 ups respectivamente, por lo tanto el que la figura 42 muestre diferencias entre los valores de ensayos con resultados no esperados y los esperados no determina lo contrario, sino que avala la posibilidad de realizar más pruebas con variación en las salinidades entre 34,63 a 35,2 ups y con errores estándar de hasta $\pm 0,25$ sin que esto influya sobre la fecundación.

Figura 42. Salinidad promedio en cada concentración del tóxico de referencia, acompañado del $\pm$ D.E.

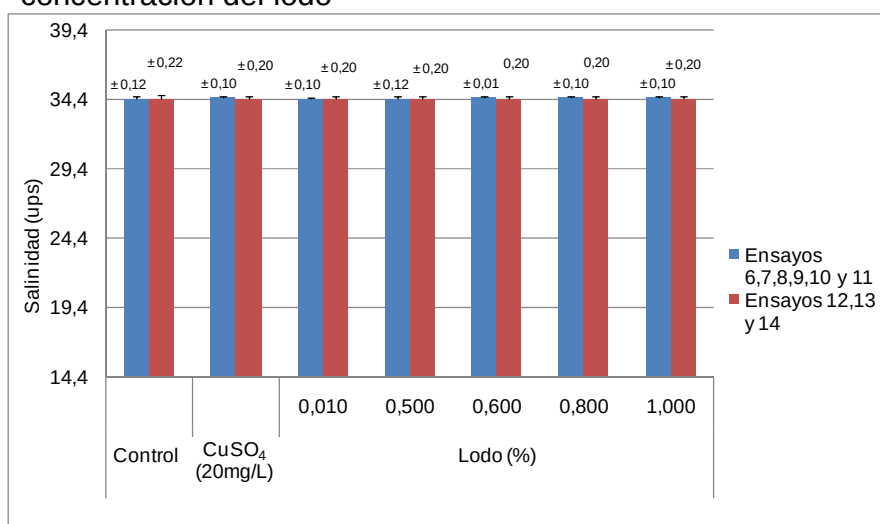


¹⁰¹ LOPÉZ ORTIZ, Estela B. y SÁNCHEZ, Alberto. Op. cit., p. 3.

Según el ANOVA no existen diferencias significativas entre concentraciones para los ensayos con resultados esperados (10, 11, 12 y 13) ($p>0,05$) y tampoco para los ensayos con resultados no esperados (7, 8 y 9) (Anexo 29) (Figura 42), pero si existen diferencia significativa de valores entre los ensayos, por lo anterior la salinidad requerida para el desarrollo de este bioensayo debería ser 35 ups, además porque los valores de los últimos cuatro ensayos se manejaron dentro de los rangos establecidos para el erizo de mar (35 ups), valores mencionados por Montealegre y Gómez¹⁰² y Gómez¹⁰³.

- Todos los ensayos realizados con el lodo no presentaron variación en el valor promedio de la salinidad, como se observa en la figura 43 fue de 34,4 ups, por lo tanto la salinidad no afectó la respuesta en los resultados de fecundación.

Figura 43. Salinidad promedio y su $\pm$ D.E. en cada concentración del lodo



No existen diferencias significativas entre concentraciones ($p>0,05$) en ninguno de los grupos de ensayos (Anexo 30), por lo tanto, con salinidad promedio de 34.4 ups se garantizan buenos resultados al realizar ensayos con lodo.

6.4.2.4 pH. Para los siete ensayos de sulfato de cobre se encontraron valores de pH entre 7,6 a 8,13 y para los ensayos con lodo se registraron valores promedio de pH de 7,89 a 8,06, estos valores se resumen en la tabla 15.

¹⁰²MONTEALEGRE QUIJANO, Santiago y GÓMEZ GASPAR, Alfredo. Op.cit., p.307.

¹⁰³GÓMEZ GASPAR, Alfredo. Op.cit., p.3.

Tabla 15. Valores promedio de pH a diferentes concentraciones de sulfato de cobre y de lodo con su respectivo $\pm$ D.E.

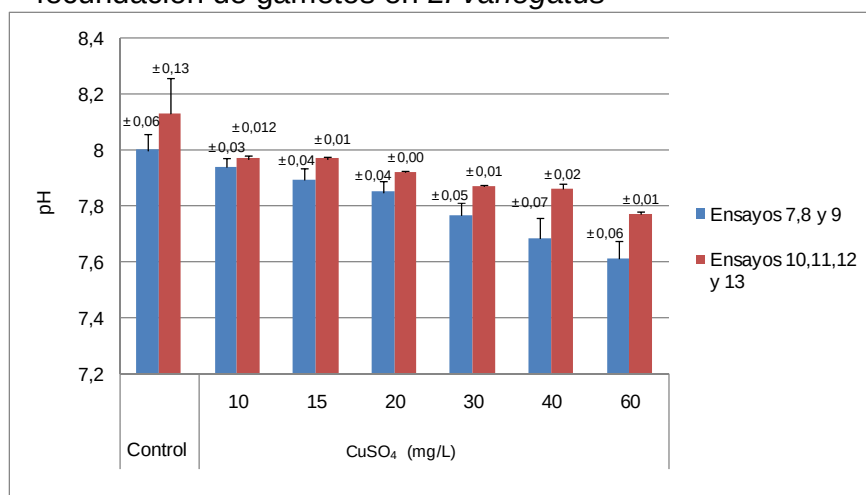
pH								
Ensayo	Control	√ X	Concentración de CuSO ₄ (mg/L)					
			10	15	20	30	40	60
7,8 y 9	8,00 ±	X	7,9 ±	7,9 ±	7,9 ±	7,8 ±	7,7 ±	7,6 ±
	0,057		0,032	0,040	0,039	0,047	0,070	0,064
10,11,12 y 13	8,13 ±	√	7,97 ±	7,97 ±	7,92 ±	7,87 ±	7,86 ±	7,77 ±
	0,126		0,011	0,0058	0,0033	0,0055	0,019	0,010
Ensayo	Control	√ X	CuSO ₄ (20mg/L)	Lodo (%)				
				0,010	0,500	0,600	0,800	1,000
6,7,8,9,10 y 11	8,0 ±	X	8,0 ±	8,0 ±	8,0 ±	8,0 ±	8,0 ±	8,0
	0,032		0,063	0,067	0,069	0,032	0,027	±0,060
12,13 y 14	8,0 ±	√	7,9 ±	7,98 ±	7,89 ±	8,03 ±	8,04 ±	8,06 ±
	0,078		0,043	0,012	0,16	0,043	0,037	0,059

$\sqrt$ = Ensayos con IF $>0,85$ y $\pm 0,5$ dentro de los control negativo y positivo respectivamente validando los IF obtenidos en las concentraciones de tóxico o lodo.

X=Ensayos donde el control negativo y positivo presentan un IF errado, es decir $<0,85$ y significativamente diferente a 0,5 respectivamente.

- Como se observa en la figura 44 cada muestra se acidifica a medida que aumenta la concentración de sulfato de cobre. Se trabajó con estos valores debido a estuvieron entre 7,6 y 8,13, valores dentro del rango establecido como apto (7,5 y 8,5) para el mantenimiento de la vida marina de acuerdo con Ospina, et al.¹⁰⁴.

Figura 44. pH y $\pm$ D.E. en ensayos con CuSO₄ sobre la fecundación de gametos en *L. variegatus*

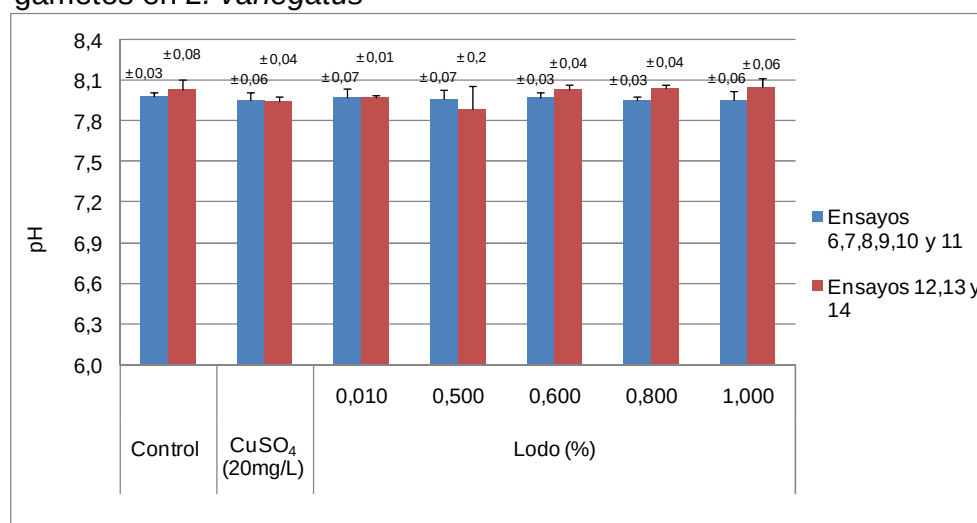


¹⁰⁴ OSPINA SALAZAR, Gloria Helena. SANTOS ACEVEDO, Marisol. LÓPEZ NAVARRO, Johann. GÓMEZ LÓPEZ, Diana Isabel. ÁLVAREZ BARRERA, Javier E y GÓMEZ LEÓN, Javier. Op.cit., p.32.

Según el ANOVA para todos los ensayos existen diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) (Anexo 31) (Figura 44), por lo tanto cada valor de pH se ve influenciado por la concentración de sulfato de cobre que se encuentre en la muestra. Es probable que la acidificación tenga un efecto sobre la fecundación como se observa en aquellos ensayos que no produjeron resultados esperados, los cuales tuvieron los valores más bajos de pH ya que como lo menciona Carballreira, *et al.*¹⁰⁵ aquellos valores menores a 7,6 registra efectos significativos sobre la fecundación y segmentación de los ovocitos en las especies *Arbacia lixula* y *Paracentrotus lividus*. Por lo anterior se sugiere que para realizar este tipo de ensayos el pH debe mantenerse en valores superiores a 7,7.

- Todos los ensayos de acuerdo con la figura 45 presenta valores de pH entre 7,8 y 8 con una variación menor a 0,16 para los nueve ensayos con lodo, de esta manera se evidencia que no hubo efecto del pH en el porcentaje de fecundación obtenido en los diferentes ensayos.

Figura 45. pH y $\pm$ D.E. en ensayos con lodo sobre la fecundación de gametos en *L. variegatus*



Ningún ensayo presenta diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0,05$) (Anexo 32), por lo tanto cada valor de pH no se ve influenciado por la concentración de lodo que se encuentre en las muestras. Los ensayos se pueden realizar bajo los presentes valores o bajo un promedio de 8,0 con variaciones menores a 0,078.

¹⁰⁵ CARBALLEIRA, C. DÍAZ MARTÍN, L. DELVALLS, T.A. Influence of salinity on fertilization and larval development toxicity tests with two species of sea urchin. *En: Marine Environmental Research*. Octubre, 2011. Vol. 72. no 4. p. 200.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

La metodología para lograr una fecundación mayor al 85% en el erizo de mar *Lytechinus variegatus* se obtuvo con un tiempo de exposición de 60 minutos, temperatura ambiente promedio de 27°C, valores promedio de temperatura, oxígeno disuelto, salinidad y pH del agua de mar filtrada e irradiada con UV de 26,2°C, 8,0 mg/L, 34,8 ups y 7,96 respectivamente y con cantidades iguales o superiores a 12.500.000 espermatozoides para 2.000 ovocitos, la menor variación en el porcentaje se logra con 50.000.000 espermatozoides provenientes de una concentración stock de 500.000.000 espermatozoides/mL, equivalente a una relación ovulo: espermatozoide de 1: 25.000.

Los gametos de *L. variegatus* presentaron una $CE_{50-60\text{minutos}}$ de 20,45 mg/L para el sulfato de cobre utilizado como tóxico de referencia tras los 60 minutos de exposición, siendo las concentraciones bajas (1mg/L) no tóxicas por presentar porcentajes de fecundación iguales al control. Lo anterior logrado con una temperatura ambiente promedio de 26,8°C, y valores promedio de temperatura con 23,8°C, oxígeno disuelto de 7,8 mg/L, salinidad de 35 ups y pH de 7,7 tanto para el agua de mar filtrada e irradiada con UV como para las diferentes concentraciones del toxico de referencia.

La $CE_{50-60\text{minutos}}$ con el fluido de exploración offshore fue de 0,36%, evidenciando una alta sensibilidad de los gametos del erizo de mar para pruebas de toxicidad aguda con lodo, lo anterior utilizando un tiempo de exposición de sesenta minutos, temperatura ambiente promedio de 26,5°C, y valores promedio de temperatura, oxígeno disuelto, salinidad y pH de 26°C, 7,9 mg/L, 34,4 ups y 8,0 respectivamente en los controles y en las diferentes concentraciones del lodo.

La $CE_{50-60\text{minutos}}$ del tóxico de referencia presenta menor heterogeneidad o dispersión en sus valores (9,29%) con respecto a los obtenidos en los ensayos con el fluido de exploración offshore (12,01%).

7.2 RECOMENDACIONES

Realizar el mantenimiento en laboratorio de *Lytechinus variegatus* con temperaturas entre 25,1 y 26°C, salinidad entre 35,0 y 35,7 ups, oxígeno disuelto entre 7,6 y 8,0 mg/L y valores de pH entre 7,9 y 8,1, además una adecuada alimentación con tres raciones a base de: algas (*Ulva lactuca* y *Gracilaria* sp.), trozos de zanahoria, espinaca, pellet Ital Mojarra 24® y el pellet mejorado (Ital Mojarra 24® + Cyclop-eeze®) suministradas *ad libitum* cada día para suplir en el laboratorio los requerimientos nutricionales de la especie y garantizar la producción de gametos de buena calidad.

Continuar con la estandarización en condiciones de laboratorio del mantenimiento de la especie *Lytechinus variegatus*, con el fin de mejorar las condiciones biológicas de los organismos facilitando la realización de futuros estudios toxicológicos.

Efectuar más ensayos con el tóxico de referencia y lodo con el fin de disminuir el porcentaje de variación de manera que se logre mayor estabilidad en la respuesta de la CE₅₀.

Desarrollar nuevas investigaciones con especies nativas del Caribe colombiano con el fin de determinar su potencial como especies indicadoras la toxicidad de cualquier sustancia que ingrese al medio marino.

Incluir este tipo de evaluaciones toxicológicas con organismos marinos nativos en los planes de manejo ambiental para exploración offshore, vertimientos o derrames, con el fin de comprender mejor los impactos y direccionar las medidas de contingencia.

BIBLIOGRAFÍA

AREVALO, V. INDA, F. BAY-SCHMITH, E y LARRAÍN, A. Bioensayo de fertilización con erizo de mar (*Arbacia spatuligera*) para fiscalizar la maniobra de recambio de lastre limpio en los buques. En: Revista Ciencia y Tecnología del Mar. 2001. 9 p.

BENAVIDES SERRATO, Milena. BORRERO PÉREZ, Giomar Elena y DIAZ SANCHEZ, Christian Michael. Equinodermos del Caribe colombiano I: Crinoidea, Asteroidea, y Ophiuroidea. Museo de Historia Natural Marina de Colombia. Series de Publicaciones Especiales de Invemar 22. Santa Marta. 2011. 388 p.

BERDYSHEV, Evgueni. Inhibition of sea urchin fertilization by fatty acid ethanolamides and cannabinoids. Institute of Marine Biology. Russia. 1999. 4 p.

BORRERO, Giomar Helena; SOLANO, Oscar David y BENAVIDES, Milena. Lista revisada de los erizos (Echinodermata: Echinoidea) del Mar Caribe colombiano. En: Biota Colombiana. 2002. Vol. 3, número 1. 9 p.

BÖTTGER, S. Anne. McCLINCKOCK, James B. The effects of organic and inorganic phosphates on fertilization and early development in the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea) En: Comparative Biochemistry and Physiology Part C. USA. 2001. 9 p.

BITRAGO, Esperanza y LODEIROS, César. Producción de larvas y postlarvas del erizo verdiblanco del Caribe *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea) en condiciones de cultivo. Fundación la Salle de Ciencias Naturales e Instituto Oceanográfico de Venezuela. Venezuela. 2005. 10 p.

CALVA, Laura Georgina. Hábitos alimenticios de algunos equinodermos. Parte 2 erizos de mar y pepinos de mar. En: Revista ContactoS. 2003. no.47. pp. 56-58.

Cámara Argentina del gas natural comprimido. HIDROCARBUROS. Contenidos Didácticos. Secretaria de energía de Argentina. Argentina. 2008. 69 p.

CARBALLEIRA, C. DÍAZ MARTÍN, L. DELVALLS, T.A. Influence of salinity on fertilization and larval development toxicity tests with two species of sea urchin. En: Marine Environmental Research. Octubre,2011. Vol. 72.no 4. 8 p.

CISNEROS, Javier. Desarrollo de un Método para la Determinación Rápida de la Concentración Espermiática en Eyaculados de Bovino, Ovino, y Cerdo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Veracruzana. Veracruz. Ver. Agosto. 2011. 57 p.

MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA, Y DESARROLLO TERRITORIAL (MAVDT). Resolución No. 1315. "Por la cual se otorga una licencia ambiental y se toman otras determinaciones".Junio.2011. 101 p.

DARSZON, Alberto. Canales, iones y cómo el espermatozoide interpreta los mensajes del óvulo. En: Biotecnología. Noviembre. 2007. Vol 14. 14 p.

DÁVILA, Eric y FORERO, Clemente. La innovación y el aprendizaje tecnológico en la historia de Ecopetrol. En: ECOPETROL. Villegas editores. 2011. 289 p.

DÍAZ BÁEZ, María Consuelo. PICA GRANADOS, Yolanda. RONCO, Alicia. SOBRERO, Cecilia. BULUS ROSSINI, Gustavo. FEOLA, Gabriela. FORGET, Gilles. SÁNCHEZ-BAIN, Andrés. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas; Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. México-Canadá: Gabriela Castillo Morales, 2004. 190 p.

DOMINGUEZ, Astrid. ROSAS, Jesús. VELÁZQUEZ, Aidé. CABRERA, Tomas y MATA, Ernesto. Desarrollo, Supervivencia y crecimiento del erizo *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata: Echinoidea) alimentado con microalgas a dos salinidades y temperaturas diferentes. En: Revista de Biología Marina y Oceanografía. Abril .2007. 9 p.

Environment Canada. Biological Test Method: Fertilization Assay Using Echinoids (Sea Urchins and Sand Dollars). EPS 1/RM/27 Second Edition. Science and Technology Branch. February 2011. 140 p.

ESPINOSA, Adriana. BÁEZ, María y LOPÉZ, María. Pruebas de Toxicidad Acuática; Fundamentos y Métodos. En: Ingeniería e investigación. Abril. 2009. V.29. n 1. 142 p.

ESPINOZA G, R.A. REYES, J.L. HIMMELMAN, J.H. y LODEIROS, C. Actividad reproductiva de los erizos *Lytechinus variegatus* y *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea) en relación con factores ambientales en el Golfo de Cariaco, Venezuela. En: Revista de Biología Tropical. 2008. Vol. 56.10 p.

FUENTEALBA Carmen. SILVA, Jeannette. BAY-SCHMITH, Enrique y LARRAIN, Alberto. Standarization of the acute toxicity bioassay with *Diplodon chilenses* using a reference toxicant. Universidad de Concepción, Chile.2007. 7 p.

GARCÍA, Camilo y CRIALES, María. Primera evaluación de la respiración de *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea) en la bahía de Chengue, Parque Nacional Tayrona, Caribe colombiano. En: Revista Académica Colombiana de Ciencias. 2005. Vol. XXIX. No. 110.2005. 2 p.

GARZA, A. ITUARTE, E. SIERRA, G. LOPEZ, R y RODRIGUEZ, R. Producción de juveniles de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* (Echinodermata: Echinoidea) en Baja California, México. Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, 2005. 12 p.

GEORGE, Sophie. LAWRENCE, John. SMILEY, Joey y PLANK, Larry. Carotenoids in the adult diet enhance egg and juvenile production in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. Aquaculture. USA. 2001. 16 p.

GERMENDIA, Joxe .MENCHACA, Iratxe. BELZUNCE, María y REVILLA, Marta. Protocolo del test de toxicidad de sedimentos marinos con larvas del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). En: Revista de Investigación Marina. Abril. 2009. no 1. 27 p.

GÓMEZ GASPAR, Alfredo. Diámetro-peso y proporción cromática del erizo *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Toxopneustidae) en las Islas Margarita y Cubagua, Venezuela. En: Revista de Biología Tropical. 2003. Vol 51, Supl. 4.4 p.

-----Abundancia de erizo *Lytechinus variegatus* (LAMARCK) en la costa norte, este y oeste de la Isla de Margarita (Venezuela). En: Acta Científica Venezolana. Enero, 2002. vol. 53.n.1. 7 p.

----- Abundancia de *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Toxopneustidae) en la Isla de Cubagua, Venezuela. En: Rev. Bio. Trop. Agosto, 2000. Vol. 48. no 1. p.3.

GUIRAO MARÍN, L. VITA, R. MARÍN, A y A, Cesar. Sensitivity of Mediterranean amphipods and sea urchins to reference toxicants. En: Ciencias Marinas. 2002. Vol. 28, no. 4. 12 p.

HARO, Cristian. Efectos de los derrames de hidrocarburos. Fundación Cethus Argentina. Disponible en Internet: http://www.cethus.org/mar_limpio/impacto_s4.html

HERNANDEZ, Jesús. Introducción a la Toxicología. En: Toxicología alimentaria diplomatura de nutrición humana y dietética. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. 2011. 11 p.

JAKUBOWSKI, Marck. Órgano Diana y efectos críticos. Toxicología; Herramientas y enfoques. En: Enciclopedia de Salud en el trabajo. Madrid: Jeanne Mager Stellman,1998. p.1441.

LAWRENCE, J.M. PLANK, R. y LAWRENCE, I. The effect of dietary carotenoids on gonad production and carotenoid profiles in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. En: Journal of the World Aquaculture Society. Junio. 2002. Vol 33. No 2. 10 p.

LÓPEZ ORTIZ, Estela y SANCHEZ, Alberto. Effect of increased salinity in the ovum fertilization of sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus* and *Lytechinus anamesus*. En: Hidrobiológica. Agosto, 2009.Vol 19.no 2. 5 p.

MARTÍNEZ, Gabriela. RUDOLPH, Anny. AHUMADA, Ramón. LOYOLA, Rodrigo y MEDINA, Valentina. Toxicidad no específica en sedimentos portuarios, una aproximación al contenido de contaminantes críticos. En: Rev. de Biol. Mar. y Ocean. Vol. 44. No.3. Diciembre.2009. 11 p.

MONTEALEGRE QUIJANO, Santiago y GÓMEZ GASPAR, Alfredo. Ciclo reproductivo de *Lytechinus variegatus* (Echinoidea:Toxopneustidae) en el sur de Isla Margarita, Venezuela. En: Rev. Biol. Trop. December, 2005. Vol. 53. no 3. 8 p.

NEWMARK, F. SANTOS-ACEVEDO, M. CHAVES, A. MORA, J. ARIAS, J. y S. ZEA. Manual de métodos de Bioactividad. INVEMAR. Mayo. 2005. 28 p.

OSPINA-SALAZAR, Gloria. SANTOS-ACEVEDO, Marisol. LÓPEZ-NAVARRO, Johann. GÓMEZ-LÓPEZ, Diana Isabel. ÁLVAREZ-BARRERA, Javier. GÓMEZ-LEÓN, Javier. Avances en la reproducción y mantenimiento de peces marinos ornamentales. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras INVEMAR. Santa Marta: Marisol Santos Acevedo y Javier Gómez León, 2011. 100 p.

PEÑA, Carlos. CARTER, Dean y FIERRO, Félix. Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. En: Toxicología Ambiental. The University of Arizona. México. 2001. 204 p.

REYES, Maria. HONDAL, Onelio. HERNANDEZ, José y TORRES, María. Sulfato de Cobre como sustancia de referencia en ensayo de toxicidad en larvas de rana cubana *Osteopilus septentrionalis*. En: Revista de toxicología en línea. Octubre-Diciembre, 2003, no.24. 10 p.

RIVERA, Beatriz. La Aplicación de los Principios de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL). Entidad Nacional de Acreditación ENAC. CI-ENAC-BPL Rev.2. Madrid. Enero. 2008. 28 p.

RIVEROS, A y ZÚÑIGA, M. Viabilidad de espermios de Erizo de Mar (*Tetrapygus niger*) para evaluar a la toxicidad de aguas Marinas: Casos Colcura, Playa Blanca, Lenga, Rocuant, Coliumo y Dichato-VIII Región. En: Libro resúmenes XIII Jornadas Ciencias Del Mar. Villa del Mar. 1993.1 p.

RUCK,J.G., MARTIN M. y M. MABON. Evaluation of toxkits as methods for monitoring water quality in New Zealand. En: New Microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring. United States: PERSONEE, Guido. JANSSEN, Colin y Win Coen. 2000. 16 p.

RUDOLPH, Anny. MOSCOSO, Julio. AGUIRRE, Gabriela y AHUMADA, Ramón. Calidad de los sedimentos en el mar interior de Chiloé (41,5° a 43 latitud sur) en función de pruebas de toxicidad. Universidad Católica de la Santísima Concepción. Concepción. 2005. 11 p.

SHPIGEL, Muki. McBRIDE, Susan. MARCIANO, Sharon y LUPATSCH, Ingrid. The effect of photoperiod and temperature on the reproduction of European sea urchin *Paracentrotus lividus*. En: Aquaculture. April, 2004. Volumen 232. 12 p.

SILBERGELD, Ellen. Toxicología; Herramientas y enfoques. En: Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Madrid: Jeanne MagerStellman, 1998. 1720 p.

SILVA, Jeannette. TORREJÓN, Guillermo. BAY-SCHMITH, Enrique y LARRAIN, Alberto. Calibration of the acute toxicity bioassay with *Daphnia pulex* (crustacea. cladocera) using a reference toxicant. En: Revista Guayana (concepción). 2003. Vol 67.no 1. p 4.

SPIRLET, Christine. GROSJEAN, Philippe y JANGOUX, Michel. Optimization of gonad growth by manipulation of temperature and photoperiod in cultivated sea urchins, *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata). En: Aquaculture. May, 2000. Volume 185. 14 p.

STATPOINT TECNOLOGIAS, Inc. Analisis Probit. En: STATGRAPHICS Centurion. Virginia. 2006.6 p.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY OFFICE OF WATER. Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms. Third Edition. 1200 Pennsylvania Avenue, NW Washington, DC 20460. October 2002. 486 p.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Analytic Methods for the Oil and gas Extraction Point Source Category. Washington, D .C. EPA-821-R-11-004. 2011. 121 p.

WATTS, Stephen. McCLINTOCK, James y LAWRENCE, John. The ecology of *Lytechinus variegatus*. Department of biology, University of Florida y Alabama. 2001. 19 p.

WOLPERT, Lewis. SMITH, Jim. JESSELL, Tom. LAWRENCE, Peter. ROBERTSON, Elizabeth. MEYEROWITZ, Elliot. Reacción cortical por la fecundación en el erizo de mar. En: Principios del desarrollo. 3ra edición. Editorial Médica Panamericana. España. 2010. 35 p.

ANEXOS

Anexo 1. Parámetros fisicoquímicos evaluados en el mantenimiento de *L. variegatus*

Tabla 16. Parámetros fisicoquímicos durante el mes de noviembre en cada una de las unidades experimentales utilizadas para el mantenimiento de la especie

Canaleta	Temperatura (°C)	Salinidad	Oxígeno (mg/L)	pH
1	26±1,76	35,70±1,36	7,66±0,48	8,06±0,09
2	24±1,65	35,43±1,02	7,90±0,37	8,10±0,06
3	24±1,82	36,16±1,75	7,80±0,39	8,08±0,07
4	25±0,86	34,63±0,46	7,69±0,49	8,12±0,04
5	27±1,18	35,74±1,41	7,58±0,52	8,08±0,08
6	25±2,03	35,71±1,31	7,55±0,42	8,09±0,08

Tabla 17. Parámetros fisicoquímicos durante el mes de diciembre en cada una de las unidades experimentales utilizadas para el mantenimiento de la especie

Canaleta	Temperatura (°C)	Salinidad	Oxígeno (mg/L)	pH
1	26,17 ± 1,18	34,96 ± 0,30	7,78 ± 2,10	8,00 ± 0,14
2	24,99 ± 1,21	34,93 ± 0,26	7,54 ± 0,75	7,99 ± 0,26
3	24,66 ± 1,45	35,26 ± 0,42	7,46 ± 0,73	7,96 ± 0,26
4	24,99 ± 1,14	35,02 ± 0,33	7,34 ± 0,84	7,86 ± 0,62
5	24,33 ± 0,77	34,87 ± 0,39	7,60 ± 0,90	7,86 ± 0,32
6	25,47 ± 0,84	35,01 ± 0,30	7,58 ± 0,93	7,88 ± 0,26

Tabla 18. Parámetros fisicoquímicos durante el mes de enero en cada una de las unidades experimentales utilizadas para el mantenimiento de la especie

Canaleta	Temperatura (°C)	Salinidad	Oxígeno (mg/L)	pH
1	26,99 ± 0,69	35,76 ± 0,98	8,04 ± 0,39	8,07 ± 0,03
2	26,49 ± 1,14	35,83 ± 0,88	8,07 ± 0,45	8,08 ± 0,05
3	26,50 ± 1,08	35,86 ± 0,85	7,91 ± 0,49	8,07 ± 0,03
4	26,28 ± 0,91	35,88 ± 0,82	8,00 ± 0,50	8,08 ± 0,03
5	25,20 ± 1,59	35,46 ± 0,51	7,98 ± 0,63	8,05 ± 0,07
6	25,74 ± 0,39	35,27 ± 0,19	7,91 ± 0,63	8,07 ± 0,04

Tabla 19. Parámetros fisicoquímicos durante el mes de febrero en cada una de las unidades experimentales utilizadas para el mantenimiento de la especie

Canaleta	Temperatura (°C)	Salinidad	Oxígeno (mg/L)	pH
1	26 ± 0,77	35,32 ± 0,73	7,86 ± 0,17	8,08 ± 0,05
2	26 ± 1,01	35,38 ± 0,71	7,88 ± 0,22	8,09 ± 0,05
3	26 ± 0,92	35,35 ± 0,72	7,84 ± 0,22	8,09 ± 0,05
4	26 ± 1,16	35,32 ± 0,77	7,83 ± 0,24	8,08 ± 0,05
5	26 ± 0,52	35,15 ± 0,37	7,83 ± 0,25	8,11 ± 0,06
6	26 ± 0,43	35,16 ± 0,34	7,83 ± 0,28	8,11 ± 0,07

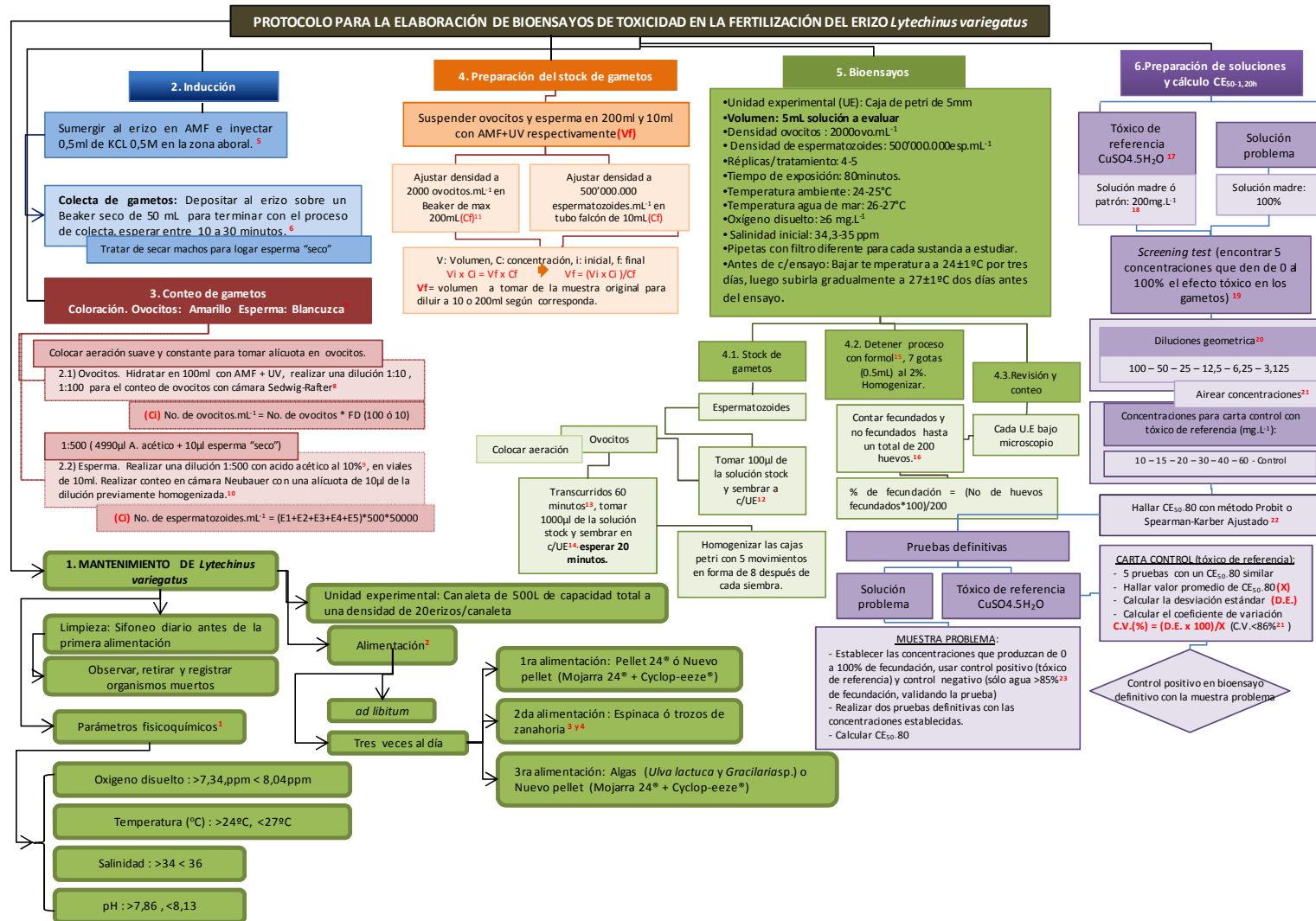
Tabla 20. Parámetros fisicoquímicos durante el mes de marzo en cada una de las unidades experimentales utilizadas para el mantenimiento de la especie

Canaleta	Temperatura (°C)	Salinidad	Oxígeno (mg/L)	pH
1	26,2 ± 1,6	35,2 ± 0,3	7,7 ± 0,2	8,00 ± 0,1
2	26,2 ± 1,4	35,2 ± 0,3	7,8 ± 0,1	8,00 ± 0,1
3	26,1 ± 1,4	35,1 ± 0,2	7,7 ± 0,2	8,00 ± 0,1
4	26,00 ± 1,6	35,4 ± 0,5	7,6 ± 0,3	8,00 ± 0,1
5	25,08 ± 1,1	35,0 ± 0,3	7,6 ± 0,2	8,00 ± 0,1
6	25,5 ± 0,9	35,0 ± 0,3	7,7 ± 0,2	8,00 ± 0,1

Tabla 21. Parámetros fisicoquímicos durante el mes de abril en cada una de las unidades experimentales utilizadas para el mantenimiento de la especie

Canaleta	Temperatura (°C)	Salinidad	Oxígeno (ppm)	pH
1	26,3 ± 2,0	35,1 ± 0,4	7,83 ± 0,2	8,06 ± 0,1
2	26,6 ± 1,6	35,08 ± 0,3	7,84 ± 0,3	8,07 ± 0,1
3	26,2 ± 1,0	35,07 ± 0,3	7,8 ± 0,2	8,05 ± 0,1
4	25,8 ± 1,4	35,2 ± 0,3	7,81 ± 0,2	8,02 ± 0,1
5	26,3 ± 0,9	34,97 ± 0,4	7,97 ± 0,2	8,095 ± 0
6	25,4 ± 1,2	34,9 ± 0,4	7,95 ± 0,2	8,13 ± 0,1

Anexo 2. Diagrama del protocolo para la elaboración de bioensayos de toxicidad en gametos del erizo de mar *Lytechinus variegatus*.



Anexo 3. Porcentajes de fecundación y su respectivo error estándar a diferentes cantidades espermáticas

No. espermatozoides	Replica	Ovocitos fecundados	Ovocitos no fecundados	Ovocitos totales	% de fecundación	% fecundación promedio
5.000	1	0	200	200	0	0
	2	0	200	200	0	
	3	0	200	200	0	
	4	0	200	200	0	
10.000	1	2	199	200	1	0,3
	2	1	199	200	1	
	3	0	200	200	0	
	4	0	200	200	0	
100.000	1	0	200	200	0	0,5
	2	2	198	200	1	
	3	1	199	200	1	
	4	1	199	200	1	
2.500.000	2	35	165	200	18	19
	3	49	151	200	25	
	4	33	168	200	16	
5.000.000	1	59	142	200	29	23
	3	24	176	200	12	
	4	53	148	200	26	
7.000.000	1	39	162	200	19	23
	2	53	147	200	27	
	3	58	143	200	29	
	4	38	162	200	19	

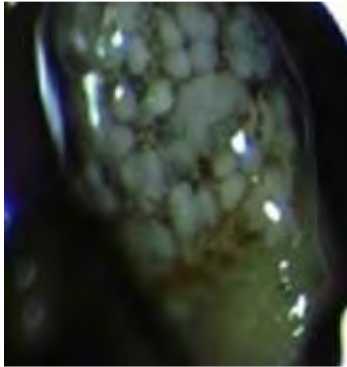
Anexo 4. Patología presentada en el laboratorio de Bioprospección Marina y Costera del INVEMAR

Los erizos de la especie *Lytechinus variegatus* presentaron en su mayoría una mancha negra sobre su testa antes de la extracción del sustrato a cada una de las canaletas, como lo muestra la siguiente figura.



La patología obligo a seleccionar los animales enfermos y se separaron de los que no presentaban ninguna anomalía en su morfología. Los enfermos se mantuvieron en acuarios de 12 L funcionales, bajo aireación y temperatura constante de aproximadamente 25°C.

La mancha negra se analizó bajo microscopio donde se identificó la posible existencia de gusanos y saco de huevos de los mismos como se indica en la siguiente figura, por ende se trató en lo posible de rescatar el lote con tratamientos a base de formol al 4%, aplicado sobre la testa directamente a unos pocos erizos los cuales murieron instantáneamente, y aplicando 3 gotas de formol en el agua del acuario, con este último tratamiento los erizos presentaron movilidad y buen consumo de alimento durante los 5 primeros días, la mancha no desapareció ni tampoco aumento su tamaño.



Al cabo del mes se volvió a examinar al microscopio y se vio la presencia de bacterias, los animales empezaron nuevamente a mantenerse quietos sin consumo de alimento, por ende se subió a 4 gotas de formol, pero no surtió efecto, incluso el diámetro de la mancha empezó a aumentar y se empezó a presentar mortalidad en los acuarios. Al cabo de 3 meses de aparecer la patología, se tuvo que sacrificar el lote enfermo, debido a que se estaba ocupando espacio, personal y alimento en algo que no produjo una solución inmediata y que interfería con nuestro objetivo de estudio, así que por no encontrarse en buenas condiciones el lote se sacrificó con un exceso de benzocaina. Los animales muertos fueron secados y posteriormente desechados y procesados por una empresa especializada en la eliminación de residuos peligrosos.



Los nuevos lotes que llegaban al laboratorio también contenían algunos erizos con mancha negra sobre su testa, posiblemente debido a un factor estresante que también se estaba dando dentro del laboratorio como dentro de su medio natural. Estos erizos se descartaron para la realización de los ensayos.

Anexo 5. Porcentajes de fecundación a diferentes cantidades espermáticas en los ensayos 1 y 2.

Ensayo 1							
No. espermatozoides	Repli ca	Ovocitos fecundad os	Ovocitos no fecundados	Ovocitos totales	% de fecundaci ón	Índice de fecundación	% de fecundación promedio
6.250.000	1	76	124	200	38	0,38	37,8
	2	80	120	200	40	0,40	
	3	71	129	200	36	0,35	
12.500.000	1	178	22	200	89	0,89	86,8
	2	172	28	200	86	0,86	
	3	171	29	200	86	0,85	
25.000.000	1	189	11	200	95	0,94	96,2
	2	193	7	200	97	0,96	
	3	195	5	200	98	0,97	
50.000.000	2	196	4	200	98	0,98	95,8
	3	187	13	200	94	0,93	
100.000.000	1	192	8	200	96	0,96	96,0
	2	198	2	200	99	0,99	
	3	186	14	200	93	0,93	
120.000.000	1	192	8	200	96	0,96	95,3
	2	194	6	200	97	0,97	
	3	186	14	200	93	0,93	

Ensayo 2							
No. espermatozoides	Replica	Ovocitos fecundados	Ovocitos no fecundados	Ovocitos totales	% de fecundación	Índice de fecundación	% de fecundación promedio
6.250.000	1	191	9	200	96	0,95	92,9
	2	188	13	200	94	0,93	
	3	178	23	200	89	0,88	
	4	187	13	200	94	0,93	
12.500.000	1	193	8	200	96	0,96	92,2
	2	185	16	200	92	0,92	
	3	182	18	200	91	0,91	
	4	179	22	200	89	0,89	
25.000.000	1	172	29	200	86	0,85	83,2
	2	168	33	200	84	0,83	
	3	150	51	200	75	0,74	
	4	177	23	200	89	0,88	
50.000.000	1	178	22	200	89	0,89	90,0
	2	181	20	200	90	0,90	
	3	184	17	200	92	0,91	
	4	178	22	200	89	0,89	
100.000.000	1	166	34	200	83	0,83	83,4
	2	169	31	200	85	0,84	
	3	155	45	200	78	0,77	
	4	178	23	200	89	0,88	
120.000.000	1	159	42	200	79	0,79	84,5
	2	174	27	200	87	0,86	
	3	167	34	200	83	0,83	
	4	178	23	200	89	0,88	

Anexo 6. ANOVA realizado para el porcentaje de fecundación por tratamiento para dos ensayos a diferentes cantidades espermáticas

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,240659	5	0,0481318	2,62	0,0408
Intra grupos	0,642229	35	0,0183494		
Total (Corr.)	0,882888	40			

Anexo 7. Prueba de Múltiples rangos para el porcentaje de fecundación por No. de espermatozoides (prueba de Duncan)

Método: 95,0 porcentaje Duncan

<i>No. espermatozoides</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
6.250.000	7	0,695714	X
100.000.000	7	0,89	X
25.000.000	7	0,891429	X
120.000.000	7	0,891429	X
12.500.000	7	0,898571	X
50.000.000	6	0,92	X

Anexo 8. Porcentaje e índice de fecundación a diferentes concentraciones de CuSO₄ con su respectivo error estándar en trece ensayos

Tabla 22.Ensayos a diferentes concentraciones de sulfato de cobre que no produjeron resultados esperados

Ensayo	Concentración		Ovocitos fecundados	Ovocitos sin fecundar	% de fecundación promedio	Error estándar	IF	Error estándar
1	Control		187	13	93,69	0,63	0,9369	0,0063
	CuSO ₄ (mg/L)	1	192	8	96,00	0,65	0,9600	0,0065
		10	185	15	92,38	0,60	0,9238	0,0060
		15	187	13	93,62	0,92	0,9362	0,0092
		20	186	14	92,98	1,20	0,9298	0,0120
		40	162	38	86,54	1,43	0,8654	0,0143
		60	106	94	72,06	6,10	0,7206	0,0610
2	Control		111	89	55,67	3,86	0,5567	0,0386
	CuSO ₄ (mg/L)	1	138	62	72,36	3,89	0,7236	0,0389
		10	128	72	73,17	13,91	0,7317	0,1391
		15	56	144	48,92	12,13	0,4892	0,1213
		20	36	164	23,90	7,15	0,2390	0,0715
		40	0	200	0,00	0,00	0,0000	0,0000
		60	0	200	0,00	0,00	0,0000	0,0000
3	Control		191	9	96	0,498	0,9571	0,0050
	CuSO ₄ (mg/L)	10	186	14	93	2,043	0,9324	0,0204
		15	155	45	77	2,876	0,7728	0,0288
		20	69	131	35	5,053	0,3450	0,0505
		40	4	196	2	0,706	0,0176	0,0071
		60	0	200	0	0,000	0,0000	0,0000
4	Control		173	28	86	1,160	0,8625	0,0116
	CuSO ₄ (mg/L)	10	171	29	85	1,361	0,8544	0,0136
		15	161	39	81	1,886	0,8068	0,0189
		20	138	62	69	3,595	0,6896	0,0359
		40	24	176	12	3,955	0,1218	0,0395
		60	0	200	0	0,000	0,0000	0,0000

Ensayo	Concentración		Ovocitos fecundados	Ovocitos sin fecundar	% de fecundación promedio	Error estándar	IF	Error estándar
5	Control		177	23	88	3,556	0,8831	0,0356
	CuSO ₄ (mg/L)	10	170	30	85	1,336	0,8513	0,0134
		15	168	32	84	1,570	0,8386	0,0157
		20	153	47	77	3,226	0,7650	0,0323
		40	142	58	71	2,444	0,7118	0,0244
		60	0,0	200	0	0,000	0,0000	0,0000
6	Control		185	15	93	2,245	0,9250	0,0225
	CuSO ₄ (mg/L)	10	171	29	85	1,023	0,8544	0,0102
		15	156	44	78	3,502	0,7800	0,0350
		20	141	60	70	2,192	0,7025	0,0219
		40	95	105	48	0,415	0,4769	0,0041
		60	1	199	1	0,415	0,0056	0,0041
7	Control		45	155	23	3,951	0,2260	0,0395
	CuSO ₄ (mg/L)	10	50	150	25	2,806	0,2500	0,0281
		15	58	143	29	1,969	0,2875	0,0197
		20	18	182	9	5,127	0,0888	0,0513
		30	7	193	4	0,177	0,0363	0,0018
		40	0	200	0	0,177	0,0013	0,0018
		60	0	200	0	0,000	0,0000	0,0000
8	Control		192	9	96	0,599	0,9575	0,0060
	CuSO ₄ (mg/L)	10	0	200	0	0,000	0,0000	0,0000
		15	0	200	0	0,000	0,0000	0,0000
		20	79	121	40	3,561	0,3950	0,0356
		30	35	165	18	0,493	0,1758	0,0049
		40	13	187	7	0,586	0,0658	0,0059
		60	0	200	0	0,000	0,0000	0,0000
9	Control		65	135	33	3	0,3273	0,0274
	CuSO ₄ (mg/L)	10	0	200	0	0	0,0000	0,0000
		15	0	200	0	0	0,0000	0,0000
		20	0	200	0	0	0,0000	0,0000
		30	0	200	0	0	0,0000	0,0000
		40	0	200	0	0	0,0000	0,0000
		60	0	200	0	0	0,0000	0,0000

Tabla 23. Cuatro ultimo ensayos en los que se encontraron porcentajes de fecundación deseados a fin de encontrar la CE₅₀ del toxico de referencia en *L. variegatus*

Ensayo	Concentración		Replíca	Ovocitos fecundados	Ovocitos no fecundados	% Fecundación	% Fecundación promedio	# ovocitos fecundados/ 200	Error estándar	Asensibilidad
10	Control		1	182	18	91	94	0,9100	0,01	1,1433
			2	188	13	94		0,9375		1,2154
			3	196	5	98		0,9775		1,3583
			4	183	18	91		0,9125		1,1494
			5	195	6	97		0,9725		1,3357
			6	193	7	97		0,9650		1,3054
			7	195	5	98		0,9750		1,3467
			8	168	32	84		0,8400		0,9973
			9	187	13	94		0,9350		1,2083
			10	193	7	97		0,9650		1,3054
	CuSO ₄ (mg/L)	10	1	156	44	78	77	0,7800	1,37	0,8947
		10	2	153	48	76		0,7625		0,8672
		10	3	146	55	73		0,7275		0,8147
		10	4	158	42	79		0,7900		0,9108
		15	1	129	72	64	64	0,6425	0,37	0,6978
		15	2	127	73	64		0,6350		0,6880
		15	3	131	70	65		0,6525		0,7109
		15	4	128	72	64		0,6400		0,6945
		20	1	94	106	47	46	0,4700	0,52	0,4893
		20	2	91	110	45		0,4525		0,4696
		20	3	95	105	48		0,4750		0,4950
		20	4	93	107	47		0,4650		0,4836
		20	5	90	111	45		0,4475		0,4640

Ensayo	Concentración		Replic a	Ovocitos fecunda- dos	Ovocitos no fecundados	% Fecundación	% Fecun- dación promedio	# ovocitos fecunda- dos/ 200	Error estándar	Asenoi f
10	CuSO ₄ (mg/L)	30	1	52	148	26	26	0,2600	0,79	0,2630
		30	2	46	155	23		0,2275		0,2295
		30	3	55	146	27		0,2725		0,2760
		30	4	48	152	24		0,2400		0,2424
		30	5	58	143	29		0,2875		0,2916
		30	6	55	145	28		0,2750		0,2786
		30	7	51	150	25		0,2525		0,2553
		40	1	8	193	4	2	0,0375	0,99	0,0375
		40	2	14	186	7		0,0700		0,0701
		40	3	4	197	2		0,0175		0,0175
		40	4	0	200	0		0,0000		0,0000
		40	5	7	194	3		0,0325		0,0325
		40	6	0	200	0		0,0000		0,0000
		40	7	0	200	0		0,0000		0,0000
		60	1	0	200	0	0	0,0000	0	0,0000
		60	2	0	200	0		0,0000		0,0000
		60	3	0	200	0		0,0000		0,0000
		60	4	0	200	0		0,0000		0,0000
		60	5	0	200	0		0,0000		0,0000
		60	6	0	200	0		0,0000		0,0000
		60	7	0	200	0		0,0000		0,0000
11	Control		1	195	5	98	95	0,9750	1,60	1,3467
			2	194	6	97		0,9700		1,3252
			3	191	10	95		0,9525		1,2613
			4	181	19	91		0,9050		1,1314
	CuSO ₄ (mg/L)	10	1	154	47	77	76	0,7675	1,16	0,8749
		10	2	153	47	77		0,7650		0,8710
		10	3	156	45	78		0,7775		0,8907
		10	4	145	55	73		0,7250		0,8110

Ensayo	Concentración		Replica	Ovocitos fecundados	Ovocitos no fecundados	% Fecundación	% Fecundación promedio	# ovocitos fecundados/ 200	Error estándar	Asenof
11	CuSO ₄ (mg/L)	15	1	158	42	79	44	0,7900	1,92	0,9108
		15	2	147	53	74		0,7350		0,8257
		15	3	153	48	76		0,7625		0,8672
		15	4	140	60	70		0,7000		0,7754
		20	1	121	79	61	42	0,6050	2,69	0,6498
		20	2	97	104	48		0,4825		0,5035
		20	3	109	92	54		0,5425		0,5734
		20	4	117	84	58		0,5825		0,6218
		30	1	77	124	38	34	0,3825	1,39	0,3925
		30	2	69	132	34		0,3425		0,3496
		30	3	64	137	32		0,3175		0,3231
		30	4	67	134	33		0,3325		0,3390
		40	1	9	191	5	9	0,0450	1,66	0,0450
		40	2	21	179	11		0,1050		0,1052
		40	3	25	176	12		0,1225		0,1228
		40	4	19	181	10		0,0950		0,0951
		60	1	0	200	0	0	0,0000	0	0,0000
		60	2	0	200	0		0,0000		0,0000
		60	3	0	200	0		0,0000		0,0000
		60	4	0	200	0		0,0000		0,0000
12	Control		1	180	20	90	90	0,9000	1,41	1,1198
			2	181	19	91		0,9050		1,1314
			3	183	18	91		0,9125		1,1494
			4	184	17	92		0,9175		1,1617
			5	168	32	84		0,8400		0,9973
	CuSO ₄ (mg/L)	10	1	157	43	79	80	0,7850	1,33	0,9027
		10	2	155	45	78		0,7750		0,8867
		10	3	167	33	84		0,8350		0,9881
		10	4	158	42	79		0,7900		0,9108

Ensayo	Concentración	Replica	Ovocitos fecundados	Ovocitos no fecundados	% Fecundación	% Fecundación promedio	# ovocitos fecundados/ 200	Error estándar	Asenoi f
12	CuSO ₄ (mg/L)	15	1	144	56	72	0,7200	1,28	0,8038
		15	2	147	53	74			0,8257
		15	3	155	45	78			0,8867
		15	4	144	57	72			0,8002
		15	5	155	45	78			0,8867
		20	1	123	77	62	0,6150	1,81	0,6624
		20	2	139	61	70			0,7684
		20	3	138	63	69			0,7580
		20	4	135	66	67			0,7376
		30	1	46	155	23	0,2275	1,60	0,2295
		30	2	31	169	16			0,1556
		30	3	34	167	17			0,1683
		30	4	35	165	18			0,1759
		40	1	6	195	3	0,0275	0,52	0,0275
		40	2	1	200	0			0,0025
		40	3	0	200	0			0,0000
		40	4	0	200	0			0,0000
		40	5	1	199	1			0,0050
		60	1	0	200	0	0,0000	0	0,0000
		60	2	0	200	0			0,0000
		60	3	0	200	0			0,0000
		60	4	0	200	0			0,0000
13	Control	1	188	13	94	94	0,9375	0,89	1,2154
		2	189	12	94		0,9425		1,2300
		3	188	12	94		0,9400		1,2226
		4	181	20	90		0,9025		1,1255
		5	191	9	96		0,9550		1,2697
		6	194	7	97		0,9675		1,3151

Ensayo	Concentración	Replica	Ovocitos fecundados	Ovocitos no fecundados	% Fecundación	% Fecundación promedio	# ovocitos fecundados/ 200	Error estándar	Asenof
13	CuSO ₄ (mg/L)								1,0502
		10	2	154	46	77	0,7700		0,8788
		10	3	145	56	72	0,7225		0,8074
		10	4	151	50	75	0,7525		0,8518
		15	1	145	56	72	0,7225		0,8074
		15	2	140	61	70	0,6975	0,83	0,7719
		15	3	141	59	71	0,7050		0,7824
		15	4	137	64	68	0,6825		0,7512
		20	1	100	100	50	0,5000		0,5236
		20	2	96	105	48	0,4775		0,4978
		20	3	97	104	48	0,4825	0,73	0,5035
		20	4	95	106	47	0,4725		0,4921
		20	5	91	109	46	0,4550		0,4724
		30	1	45	156	22	0,2225		0,2244
		30	2	1	200	0	0,0025	5,19	0,0025
		30	3	41	160	20	0,2025		0,2039
		30	4	41	160	20	0,2025		0,2039
		40	1	0	200	0	0,0000		0,0000
		40	2	0	200	0	0,0000	0	0,0000
		40	3	0	200	0	0,0000		0,0000
		40	4	0	200	0	0,0000		0,0000
		40	5	0	200	0	0,0000		0,0000
		60	1	0	200	0	0,0000		0,0000
		60	2	0	200	0	0,0000	0	0,0000
		60	3	0	200	0	0,0000		0,0000
		60	4	0	200	0	0,0000		0,0000

Anexo 9. ANOVA para Aseno IF

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	27,5715	116	0,237685	12,01	0,0000
Residuo	0,356209	18	0,0197894		
Total (Corr.)	27,9277	134			

Anexo 10. Suma de cuadrados de tipo II

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Bioensayo	0,0678224	3	0,0226075	1,14	0,3588
Concentración	27,2018	6	4,53364	229,09	0,0000
Muestra (Bioensayo*Concentración)	0,325834	107	0,00304517	0,15	1,0000
Residuo	0,356209	18	0,0197894		
Total (corregido)	27,9277	134			

Anexo 11. Comparación múltiple para asenoif por concentración (Prueba de Tukey)

Método: 95,0 porciento HSD de Tukey

<i>Concentración</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
60	19	0,0023769	0,0324202	X
40	21	0,0298873	0,0307936	X
30	19	0,24472	0,0324202	X
20	18	0,567016	0,0331857	X
15	17	0,793085	0,0341426	X
10	16	0,888226	0,0351687	X
0	25	1,22021	0,0284494	X

Anexo 12. Análisis Spearman-karber

DATE:	26/12/2012	TEST NUMBER:	1	DURATION:	60 MINUTOS	
CHEMICAL:	SULFATO DE COBRE	SPECIES:	L. variegatus			
RAW DATA:						
CONCENTRATION (mg/L)	10.00	15.00	20.00	30.00	40.00	60.00
NUMBER EXPOSED:	200	200	200	200	200	200
MORTALITIES:	47	72	108	148	196	200
SPEARMAN-KARBER TRIM:		23,50%				
SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:	EC50:				18.68	
	95% LOWER CONFIDENCE:				17.36	
	95% UPPER CONFIDENCE:				20.10	
DATE:	22/01/2013	TEST NUMBER:	2	DURATION:	60 MINUTOS	
CHEMICAL:	SULFATO DE COBRE	SPECIES:	L. variegatus			
RAW DATA:						
CONCENTRATION (mg/L)	10.00	15.00	20.00	30.00	40.00	60.00
NUMBER EXPOSED:	200	200	200	200	200	200
MORTALITIES:	48	51	89	131	182	200
SPEARMAN-KARBER TRIM:		24,00%				
SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:	EC50:				22.30	
	95% LOWER CONFIDENCE:				20.65	
	95% UPPER CONFIDENCE:				24.09	
DATE:	24/01/2013	TEST NUMBER:	3	DURATION:	60 MINUTOS	
CHEMICAL:	SULFATO DE COBRE	SPECIES:	L. variegatus			
RAW DATA:						
CONCENTRATION (mg/L)	10.00	15.00	20.00	30.00	40.00	60.00
NUMBER EXPOSED:	200	200	200	200	200	200
MORTALITIES:	41	51	67	164	199	200
SPEARMAN-KARBER TRIM:		20,50%				
SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:	EC50:				21.86	
	95% LOWER CONFIDENCE:				20.60	
	95% UPPER CONFIDENCE:				23.19	
DATE:	24/01/2013	TEST NUMBER:	4	DURATION:	60 MINUTOS	
CHEMICAL:	SULFATO DE COBRE	SPECIES:	L. variegatus			
RAW DATA:						
CONCENTRATION (mg/L)	10.00	15.00	20.00	30.00	40.00	60.00
NUMBER EXPOSED:	200	200	200	200	200	200
MORTALITIES:	44	60	105	169	200	200
SPEARMAN-KARBER TRIM:		22,00%				
SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:	EC50:				18.94	
	95% LOWER CONFIDENCE:				17.78	
	95% UPPER CONFIDENCE:				20.18	

Anexo 13. Porcentaje e índice de fecundación para diferentes concentraciones en ensayos con el lodo

Tabla 24. Once ensayos a diferentes concentraciones del fluido de exploración offshore, en los cuales se obtuvieron resultados esperados y no esperados en cuanto a la fecundación de los gametos del erizo de mar

Ensayo	Concentración		Promedio ovocitos fecundados	Promedio ovocitos sin fecundar	% de fecundación promedio	IF	Error estándar
1	Control		188	12	94	0,94	0,006
	Lodo (%)	3,125	0	200	0	0,00	0,000
		6,125	0	200	0	0,00	0,000
		12	0	200	0	0,00	0,000
		25	0	200	0	0,00	0,000
		50	0	200	0	0,00	0,000
		100	0	200	0	0,00	0,000
2	Control		68	133	34	0,34	0,149
	CuSO ₄ (mg/L)	20	4	196	2	0,02	0,004
	Lodo (%)	0,01	99	101	49	0,49	0,151
		0,05	100	101	50	0,50	0,016
		0,10	93	107	46	0,46	0,113
		0,50	36	164	18	0,18	0,023
		1,00	0	200	0	0,00	0,000
		3,00	0	200	0	0,00	0,000
3	Control		0	200	0	0,00	0,000
	CuSO ₄ (mg/L)	20	0	200	0	0,00	0,000
	Lodo (%)	0,01	0	200	0	0,00	0,000
		0,05	0	200	0	0,00	0,000
		0,10	0	200	0	0,00	0,000
		0,50	0	200	0	0,00	0,000
		1,00	0	200	0	0,00	0,000
		3,00	0	200	0	0,00	0,000

Ensayo	Concentración		Promedio ovocitos fecundados	Promedio ovocitos sin fecundar	% de fecundación promedio	IF	Error estándar
4	Control		170	30	85	0,85	0,019
	CuSO ₄ (mg/L)	20	112	88	56	0,56	0,042
	Lodo (%)	0,010	159	41	80	0,80	0,018
		0,050	153	47	77	0,77	0,012
		0,100	153	47	77	0,77	0,039
		0,500	8	192	4	0,04	0,022
		1,000	0	200	0	0,00	0,039
		3,000	0	200	0	0,00	0,000
5	Control		191	9	95	0,95	0,013
	CuSO ₄ (mg/L)	20	117	83	58	0,58	0,024
	Lodo (%)	0,010	168	32	84	0,84	0,015
		0,050	169	31	85	0,85	0,015
		0,100	148	52	74	0,74	0,035
		0,500	141	60	70	0,70	0,038
		1,000	9	191	5	0,05	0,004
		3,000	0	200	0	0,00	0,000
6	Control		170	30	85	0,85	0,050
	CuSO ₄ (mg/L)	20	0	200	0	0,00	0,000
	Lodo (%)	0,010	0	200	0	0,00	0,000
		0,500	0	200	0	0,00	0,000
		0,600	0	200	0	0,00	0,000
		0,800	0	200	0	0,00	0,000
		1,000	0	200	0	0,00	0,000

Ensayo	Concentración		Promedio ovocitos fecundados	Promedio ovocitos sin fecundar	% de fecundación promedio	IF	Error estándar
7	Control		170	30	85	0,85	0,018
	CuSO ₄ (mg/L)	20	136	64	68	0,68	0,015
	Lodo (%)	0,01	148	52	74	0,74	0,039
		0,5	1	199	0	0,00	0,003
		0,6	0	200	0	0,00	0,002
		0,8	0	200	0	0,00	0,000
		1	0	200	0	0,00	0,000
8	Control		178	22	89	0,89	0,024
	CuSO ₄ (mg/L)	20	0	200	0	0,00	0,000
	Lodo (%)	0,010	189	12	94	0,94	0,024
		0,500	186	14	93	0,93	0,010
		0,600	188	12	94	0,94	0,006
		0,800	173	27	86	0,86	0,072
		1,000	183	17	91	0,91	0,010
9	Control		38	162	19	0,19	0,071
	CuSO ₄ (mg/L)	20	61	140	30	0,30	0,077
	Lodo (%)	0,010	25	175	12	0,12	0,017
		0,500	0	200	0	0,00	0,000
		0,600	0	200	0	0,00	0,000
		0,800	0	200	0	0,00	0,000
		1,000	0	200	0	0,00	0,000
10	Control		131	69	65	0,65	0,041
	CuSO ₄ (mg/L)	20	0	200	0	0,00	0,000
	Lodo (%)	0,010	129	71	65	0,65	0,076
		0,500	96	104	48	0,48	0,023
		0,600	0	200	0	0,00	0,000
		0,800	0	200	0	0,00	0,000
		1,000	0	200	0	0,00	0,000

Ensayo	Concentración		Promedio ovocitos fecundados	Promedio ovocitos sin fecundar	% de fecundación promedio	IF	Error estándar
11	Control		119	81	60	0,60	0,035
	CuSO ₄ (mg/L)	20	0	200	0	0,00	0,000
	Lodo (%)	0,010	142	58	71	0,71	0,053
		0,500	108	92	54	0,54	0,022
		0,600	0	200	0	0,00	0,000
		0,800	0	200	0	0,00	0,000
		1,000	0	200	0	0,00	0,000

Tabla 25. Tres últimos ensayos de lodo, obteniendo resultados deseados para la fecundación de gametos del erizo de mar *L. variegatus*

Ensayo	Concentración		Replica	Ov. fecundados	Ov. No fecundados	IF	% de fecundación	% de fecundación promedio
12	Control		1	187	13	0,9367	93,67	89,83
			2	172	28	0,8617	86,17	
			3	184	16	0,9217	92,17	
			4	175	25	0,8733	87,33	
	CuSO ₄ (mg/L)	20	1	89	111	0,4450	44,50	45,75
			2	92	108	0,4600	46,00	
			3	98	102	0,4900	49,00	
			4	87	113	0,4350	43,50	
	LODO (%)	0,01	1	175	25	0,8767	87,67	85,97
			2	171	29	0,8533	85,33	
			3	165	35	0,8267	82,67	
			4	175	25	0,8733	87,33	
		0,5	5	174	26	0,8683	86,83	47,38
			1	79	121	0,3967	39,67	
			2	94	106	0,4700	47,00	
			3	99	101	0,4933	49,33	
			4	107	93	0,5350	53,50	

Ensayo	Concentración		Replic a	Ov. fecundados	Ov. No fecundados	IF	% de fecundación	% de fecundación promedio
12	LODO (%)	0,6	1	41	159	0,2067	20,67	26,58
			2	52	148	0,2600	26,00	
			3	62	138	0,3083	30,83	
			4	58	142	0,2883	28,83	
		0,8	1	4	196	0,0183	1,83	4,31
			2	13	187	0,0633	6,33	
			3	12	188	0,0617	6,17	
			4	10	190	0,0483	4,83	
			5	12	188	0,0600	6,00	
			6	1	199	0,0067	0,67	
		1	1	0	200	0,0000	0,00	0,00
			2	0	200	0,0000	0,00	
			3	0	200	0,0000	0,00	
			4	0	200	0,0000	0,00	
			5	0	200	0,0000	0,00	
			6	0	200	0,0000	0,00	
13	Control		1	190	10	0,9500	95,00	92,50
			2	183	17	0,9150	91,50	
			3	189	11	0,9450	94,50	
			4	178	22	0,8900	89,00	
	CuSO ₄ (mg/L)	20	1	88	112	0,4400	44,00	35,69
			2	85	115	0,4250	42,50	
			5	79	121	0,3950	39,50	
			6	82	118	0,4100	41,00	

Ensayo	Concentración		Replica	Ov. fecundados	Ov. No fecundados	IF	% de fecundación	% de fecundación promedio
13	LODO (%)	0,01	1	162	38	0,8100	81,00	78,50
			3	150	50	0,7500	75,00	
			4	160	40	0,8000	80,00	
			5	156	44	0,7800	78,00	
		0,5	2	89	111	0,4450	44,50	41,38
			4	80	120	0,4000	40,00	
			5	84	116	0,4200	42,00	
			6	78	122	0,3900	39,00	
		0,6	1	68	132	0,3400	34,00	30,13
			2	62	138	0,3100	31,00	
			3	51	149	0,2550	25,50	
			6	60	140	0,3000	30,00	
		0,8	1	39	161	0,1950	19,50	19,00
			3	33	167	0,1650	16,50	
			4	43	157	0,2150	21,50	
			6	37	163	0,1850	18,50	
		1	1	0	200	0,0000	0,00	0,00
			2	0	200	0,0000	0,00	
			3	0	200	0,0000	0,00	
			4	0	200	0,0000	0,00	
			5	0	200	0,0000	0,00	
			6	0	200	0,0000	0,00	
14	Control		3	171	29	0,8550	85,50	86,31
			4	173	28	0,8625	86,25	
			5	177	24	0,8825	88,25	
			6	171	30	0,8525	85,25	
	CuSO ₄ (mg/L)	20	1	89	112	0,4425	44,25	47,06
			2	100	101	0,4975	49,75	
			3	95	106	0,4725	47,25	
			5	94	106	0,4700	47,00	

Ensayo	Concentración		Replica	Ov. fecundados	Ov. No fecundados	IF	% de fecundación	% de fecundación promedio
14	LODO (%)	0,01	1	150	51	0,7475	74,75	75,44
			2	131	69	0,6550	65,50	
			3	151	50	0,7525	75,25	
			4	173	28	0,8625	86,25	
		0,5	1	81	119	0,4050	40,50	41,81
			2	78	122	0,3900	39,00	
			3	89	112	0,4425	44,25	
			4	87	113	0,4350	43,50	
		0,6	1	37	164	0,1825	18,25	15,38
			2	26	174	0,1300	13,00	
			3	35	166	0,1725	17,25	
			4	26	174	0,1300	13,00	
		0,8	1	16	185	0,0775	7,75	5,00
			2	14	186	0,0700	7,00	
			3	0	200	0,0000	0,00	
			4	11	190	0,0525	5,25	
		1	1	0	200	0,0000	0,00	0,00
			2	0	200	0,0000	0,00	
			3	0	200	0,0000	0,00	
			4	0	200	0,0000	0,00	

Anexo 14. Modificación de la temperatura cinco días previos a cada ensayo con el fluido de exploración offshore

Tabla 26. Temperaturas bajas utilizadas antes de realizar ensayos con lodo

Canaleta	Fecha	T (°C)	Salinidad	Oxígeno (mg/L)	pH
1	3 días a "baja temperatura"	26	35	7,71	8,07
2		26	35	7,65	8,08
3		26	35	7,72	8,13
4		25	35	7,63	8
5		26	35	8,24	8,13
6		24	35	8,05	8,15

Tabla 27. Temperaturas altas utilizadas antes de realizar ensayos con lodo

Canaleta	Fecha	T (°C)	Salinidad	Oxígeno (mg/L)	pH
1	2 días con "alta temperatura"	28	35	7,71	8,07
2		28	35	7,65	8,08
3		27	35	7,72	8,13
4		27	35	7,63	8
5		28	35	8,24	8,13
6		28	35	8,05	8,15

Anexo 15. ANOVA; para el Índice de fecundación

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	8,61162	65	0,132486	14,39	0,0000
Residuo	0,092093	10	0,0092093		
Total (Corr.)	8,70371	75			

Anexo 16. ANOVA; suma de cuadrados tipo II

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Bioensayo	0,0454239	2	0,022712	2,47	0,1347
Concentración	8,53082	5	1,70616	185,27	0,0000
Muestra(Bioensayo*Concentración)	0,0643968	58	0,00111029	0,12	1,0000
Residuo	0,092093	10	0,0092093		
Total (corregido)	8,70371	75			

Anexo 17. Prueba de Tukey HSD para IF por concentración para lodo

<i>Concentración (%)</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	16	-0,00449952	0,0250768	X
0,8	14	0,0854373	0,0268119	X
0,6	12	0,240275	0,0288599	X
0,5	12	0,435208	0,0288599	X
0,01	13	0,803439	0,0277536	X
0	12	0,895492	0,0288599	X

Anexo 18. Supuestos estadísticos para tóxico de referencia y fluido de exploración offshore

<i>Supuestos estadísticos</i>	<i>Prueba</i>	<i>CuSO₄ . 5H₂O</i>	<i>fluido de exploración offshore (lodo)</i>
Normalidad	Chi-cuadrado	0	0,0
	Valor-Z para asimetría	0,4584	0,0861
Varianza	Cochran	0,1020	0,5391
Independencia	R-cuadrado	98,72	98,95
	Estadístico Durbin-Watson	0	0,2361

Anexo 19. Análisis Probit; pruebas de razón de verosimilitud

<i>Factor</i>	<i>Chi-Cuadrada</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Concentración	1,17568	1	0,2782

Anexo 20. Análisis Probit; tabla de predicciones inversas para concentración

Porcentaje	Concentración (%)	LC Inferior 95,0%	LC Superior 95,0%
		Límite Conf.	Límite Conf.
0,1	1,36158	1,33812	1,38614
0,5	1,19599	1,1762	1,21669
1,0	1,11569	1,09763	1,13455
2,0	1,02794	1,01174	1,04485
3,0	0,97227	0,957202	0,987976
4,0	0,93039	0,916157	0,945211
5,0	0,896324	0,882753	0,910442
6,0	0,867328	0,854308	0,880862
7,0	0,841905	0,829355	0,854937
8,0	0,819141	0,807002	0,831736
9,0	0,798438	0,786663	0,810644
10,0	0,779382	0,767933	0,791238
15,0	0,700481	0,690277	0,710998
20,0	0,637773	0,628402	0,647382
25,0	0,583976	0,575175	0,59295
30,0	0,535664	0,527235	0,544208
35,0	0,490896	0,482677	0,499176
40,0	0,448415	0,440265	0,456576
45,0	0,407314	0,399105	0,415485
50,0	0,366868	0,358481	0,375168
55,0	0,326421	0,317744	0,334963
60,0	0,28532	0,276245	0,294212
65,0	0,24284	0,233254	0,25219
70,0	0,198072	0,187857	0,207996
75,0	0,14976	0,13878	0,160393
80,0	0,0959621	0,0840426	0,10747
85,0	0,0332544	0,0201501	0,0458718
90,0	-0,0456462	-0,0603444	-0,0315294
91,0	-0,064703	-0,0797998	-0,0502105
92,0	-0,0854057	-0,100941	-0,0705
93,0	-0,108169	-0,124191	-0,0928037
94,0	-0,133593	-0,150165	-0,117707
95,0	-0,162588	-0,179796	-0,146102
96,0	-0,196654	-0,214617	-0,179454
97,0	-0,238534	-0,257437	-0,220444
98,0	-0,294206	-0,314375	-0,274916
99,0	-0,381952	-0,404149	-0,36074
99,5	-0,462258	-0,486337	-0,43926
99,9	-0,627843	-0,655862	-0,601104

Anexo 21. Registro de temperatura ambiente para cuatro ensayos con toxico de referencia

Parámetro	Ensayos				Promedio	Error estándar
	1	2	3	4		
Temperatura min. Ambiente (°C)	25	25	25,5	25,5	25,875	0,245
Temperatura max. Ambiente (°C)	26,5	27	26,5	26,5		

Anexo 22. Parámetros fisicoquímicos registrados para siete ensayos bajo las mismas concentraciones con tóxico de referencia

Tabla 28. Parámetros fisicoquímicos con respecto a tres ensayos bajo las mismas concentraciones de sulfato de cobre que no produjeron resultados esperados en la fecundación de gametos del erizo de mar *L. variegatus*

Ensayo	Tratamiento		pH	Salinidad	Oxígeno (mg/L)	Temperatura (°C)
7	Control		8,1	34,7	8,1	25,0
	CuSO ₄ (mg/L)	10	8,0	34,7	8,02	24,9
		15	7,9	34,7	7,97	24,9
		20	7,9	34,9	7,97	25,0
		30	7,8	34,9	7,98	25,0
		40	7,8	34,8	8,01	24,9
		60	7,7	34,9	7,89	24,9
8	Control		8,0	34,7	8,1	24,8
	CuSO ₄ (mg/L)	10	7,9	34,7	7,97	23,7
		15	7,9	34,6	7,99	23,4
		20	7,9	34,6	8,03	23,8
		30	7,8	34,6	7,98	23,4
		40	7,7	34,5	7,99	23,4
		60	7,6	34,6	7,97	23,3
9	Control		7,95	34,5	7,91	23,9
	CuSO ₄ (mg/L)	10	7,9	34,7	7,95	23,4
		15	7,83	34,8	7,39	23,1
		20	7,79	34,8	7,28	23,4
		30	7,71	34,8	7,98	23,6
		40	7,61	34,8	7,64	23,7
		60	7,53	34,9	7,59	23,5

Tabla 29. Parámetros fisicoquímicos con respecto a los últimos cuatro ensayos que produjeron resultados esperados respecto a la fecundación

Ensayo	Tratamiento		pH	Salinidad	Oxígeno (mg/L)	Temperatura (°C)
10	Control		8,03	34,9	7,97	26,0
	CuSO ₄ (mg/L)	10	7,94	34,9	8,13	24,1
		15	7,93	34,9	7,96	24,0
		20	7,90	34,9	7,87	24,2
		30	7,85	34,9	7,99	24,1
		40	7,76	35,0	7,97	24,4
		60	7,70	34,9	8,01	24,2
11	Control		8,05	35,4	7,97	25,1
	CuSO ₄ (mg/L)	10	7,99	35,3	7,89	25,7
		15	7,95	35,6	7,77	25,1
		20	7,90	35,5	7,87	24,9
		30	7,86	35,6	7,92	24,8
		40	7,81	35,5	7,97	24,9
		60	7,74	35,4	8,10	25,6
12	Control		8,08	35,0	8,01	24,5
	CuSO ₄ (mg/L)	10	7,97	34,7	7,92	22,5
		15	7,93	34,7	7,93	22,6
		20	7,91	34,9	7,94	22,8
		30	7,84	34,9	7,79	23,1
		40	7,83	34,9	7,99	22,2
		60	7,71	35,0	8,11	22,4
13	Control		8,49	34,4	8,16	23,1
	CuSO ₄ (mg/L)	10	7,97	34,7	7,92	22,5
		15	7,93	34,7	7,93	22,6
		20	7,91	34,9	7,94	22,8
		30	7,84	34,9	7,79	23,1
		40	7,83	34,9	7,99	22,2
		60	7,71	35,0	8,11	22,4

Anexo 23. Temperatura ambiente en la realización de tres ensayos con lodo

Ensayo	Temperatura (°C)		Promedio	Error estándar
	min	máx.		
1	25	27	26,333	0,365
2	26	27		
3	26	27		

Anexo 24. Parámetros fisicoquímicos en ensayos de lodo con resultados esperados y no esperados bajo las mismas concentraciones.

Tabla 30. Parámetros fisicoquímicos para ensayos con resultados no esperados de fecundación en gametos del erizo de mar bajo las mismas concentraciones que aquellos que si dieron lo esperado

Ensayo	Tratamientos		Temperatura (°C)	Salinidad	Oxígeno (mg/L)	pH
6			No se tomaron	34,2	No se tomaron	
7	CONTROL		25,5	34,5	8,0	8,0
	CuSO ₄ (20 mg/L)		25,5	34,5	7,9	7,9
	LODO(%)	0,010	25,4	34,3	7,91	8,0
		0,500	25,5	34,6	7,98	7,97
		0,600	25,5	34,6	7,89	7,95
		0,800	25,5	34,6	7,92	7,99
		1,000	25,5	34,6	7,95	7,95
8	CONTROL		26,5	34,5	8,0	8,0
	CuSO ₄ (20 mg/L)		26,5	34,4	7,88	8,1
	LODO (%)	0,010	26,0	34,4	8,00	8,0
		0,500	26,5	34,2	7,93	8,10
		0,600	26,5	34,4	8,00	8,05
		0,800	26,0	34,4	8,01	7,97
		1,000	26,5	34,4	7,95	7,89
9 y 10	CONTROL		26,0	34,7	8,01	7,90
	CuSO ₄ (20 mg/L)		26,5	34,7	8,00	7,87
	LODO (%)	0,010	26,0	34,7	7,94	7,82
		0,500	26,0	34,7	7,96	7,81
		0,600	26,0	34,7	7,94	7,92
		0,800	26,0	34,7	7,91	7,89
		1,000	26,0	34,7	7,93	7,89
11	CONTROL		26,5	34,1	7,99	8,01
	CuSO ₄ (20 mg/L)		26,0	34,3	7,88	7,97
	LODO (%)	0,010	26,0	34,3	7,97	8,10
		0,500	26,0	34,3	7,97	7,99
		0,600	26,5	34,3	8,10	7,99
		0,800	26,5	34,3	8,10	7,99
		1,000	26,5	34,3	8,11	8,11

Tabla 31. Parámetros fisicoquímicos para los tres últimos ensayos de los cuales se encontró la CE₅₀ del fluido de exploración offshore

Ensayo	Tratamientos		Temperatura (°C)	Salinidad	Oxígeno (mg/L)	pH
12	Control		25,5	34,5	8,8	8,0
	CuSO ₄ (20 mg/L)		25,6	34,2	8,1	8,0
	LODO (%)	0,01	25,5	34,3	7,9	8,0
		0,5	25,6	34,2	8,0	8,1
		0,6	25,5	34,2	8,0	8,0
		0,8	25,6	34,3	8,0	8,0
		1	25,5	34,3	8,0	8,1
13	Control		26,5	34,7	8,0	8,1
	CuSO ₄ (20 mg/L)		26,0	34,7	8,1	8,0
	LODO (%)	0,01	26,0	34,7	8,0	8,0
		0,5	26,0	34,7	8,1	7,6
		0,6	26,5	34,7	8,1	8,0
		0,8	26,0	34,7	8,0	8,0
		1	26,0	34,7	8,0	8,0
14	Control		26,5	34,1	8,0	8,0
	CuSO ₄ (20 mg/L)		26,0	34,3	8,0	7,9
	LODO (%)	0,01	26,0	34,3	8,1	8,0
		0,5	26,0	34,3	8,0	8,0
		0,6	26,5	34,3	8,0	8,1
		0,8	26,5	34,3	8,0	8,1
		1	26,5	34,3	8,1	8,1

Anexo 25. ANOVA para temperatura con tóxico de referencia

Tabla 32. ANOVA para temperatura de los tres ensayos que no produjeron resultados esperados

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,07905	6	0,179841	0,27	0,9442
Intra grupos	9,49333	14	0,678095		
Total (Corr.)	10,5724	20			

Tabla 33. ANOVA para temperatura de los últimos cuatro ensayos con los cuales se estableció la CE₅₀

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4,01357	6	0,668929	0,41	0,8669
Intra grupos	34,6275	21	1,64893		
Total (Corr.)	38,6411	27			

Anexo 26. ANOVA para temperatura con lodo

Tabla 34. ANOVA para temperatura de los seis primeros ensayos de lodo que no produjeron resultados esperados

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,27	6	0,045	0,24	0,9601
Intra grupos	4,02	21	0,191429		
Total (Corr.)	4,29	27			

Tabla 35. ANOVA para temperatura de los tres últimos ensayos a concentraciones de 0,01, 0,5, 0,6, 0,8 y 1% de lodo que produjeron resultados esperados

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,358095	6	0,0596825	0,32	0,9163
Intra grupos	2,62	14	0,187143		
Total (Corr.)	2,9781	20			

Anexo 27. ANOVA en oxígeno disuelto con tóxico de referencia

Tabla 36. ANOVA para oxígeno disuelto de los tres ensayos que no produjeron resultados esperados

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentración	0,214381	6	0,0357302	1,47	0,2695
B:Ensayo	0,480581	2	0,24029	9,85	0,0029
RESIDUOS	0,292619	12	0,0243849		
TOTAL (CORREGIDO)	0,987581	20			

Tabla 37. ANOVA para oxígeno disuelto los últimos cuatro ensayos con los cuales se estableció la CE₅₀

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,138243	6	0,0230405	3,85	0,0096
Intra grupos	0,1257	21	0,00598571		
Total (Corr.)	0,263943	27			

Anexo 28. ANOVA para oxígeno disuelto con lodo

Tabla 38. ANOVA para oxígeno disuelto de los seis primeros ensayos de lodo que no produjeron resultados esperados

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0193929	6	0,00323214	0,80	0,5836
Intra grupos	0,085275	21	0,00406071		
Total (Corr.)	0,104668	27			

Tabla 39. ANOVA para oxígeno disuelto de los tres últimos ensayos a concentraciones de 0,01, 0,5, 0,6, 0,8 y 1% de lodo que produjeron resultados esperados

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,15619	6	0,0260317	0,77	0,6060
Intra grupos	0,473333	14	0,0338095		
Total (Corr.)	0,629524	20			

Anexo 29. ANOVA en salinidad con tóxico de referencia

Tabla 40. ANOVA para la salinidad de los tres ensayos que no produjeron resultados esperados

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0580952	6	0,00968254	0,52	0,7830
Intra grupos	0,26	14	0,0185714		
Total (Corr.)	0,318095	20			

Tabla 41. ANOVA para la salinidad de los últimos cuatro ensayos con los cuales se estableció la CE₅₀

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,139286	6	0,0232143	0,21	0,9698
Intra grupos	2,3275	21	0,110833		
Total (Corr.)	2,46679	27			

Anexo 30. ANOVA para salinidad con lodo

Tabla 42. ANOVA para salinidad de los seis primeros ensayos a concentraciones de 0,01, 0,5, 0,6, 0,8 y 1% de lodo que no produjeron resultados esperados

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0221429	6	0,00369048	0,09	0,9966
Intra grupos	0,855	21	0,0407143		
Total (Corr.)	0,877143	27			

Tabla 43. ANOVA para salinidad de los tres últimos ensayos a concentraciones de 0,01, 0,5, 0,6, 0,8 y 1% de lodo que produjeron resultados esperados

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,00571429	6	0,000952381	0,01	1,0000
Intra grupos	0,926667	14	0,0661905		
Total (Corr.)	0,932381	20			

Anexo 31. ANOVA en pH con tóxico de referencia

Tabla 44. ANOVA para pH de los ensayos que no produjeron resultados esperados

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,34999	6	0,0583317	12,06	0,0001
Intra grupos	0,0677333	14	0,0048381		
Total (Corr.)	0,417724	20			

Tabla 45. ANOVA para pH de los últimos cuatro ensayos con los que se estableció la CE₅₀

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,480086	6	0,0800143	11,17	0,0000
Intra grupos	0,1504	21	0,0071619		
Total (Corr.)	0,630486	27			

Anexo 32. ANOVA para pH con lodo

Tabla 46. ANOVA para pH de los seis primeros ensayos a concentraciones de 0,01, 0,5, 0,6, 0,8 y 1% de lodo que no produjeron resultados esperados

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,00204286	6	0,000340476	0,04	0,9996
Intra grupos	0,171825	21	0,00818214		
Total (Corr.)	0,173868	27			

Tabla 47. ANOVA para pH de los tres últimos ensayos a concentraciones de 0,01, 0,5, 0,6, 0,8 y 1% de lodo que produjeron resultados esperados

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0561905	6	0,00936508	0,76	0,6152
Intra grupos	0,173333	14	0,012381		
Total (Corr.)	0,229524	20			