



Facultad de Ciencias  
Instituto de Ciencias Biológicas y Químicas  
Escuela de Ingeniería Ambiental

## **DETERMINACIÓN DE CALIDAD ECOTOXICOLÓGICA DE AGUAS MARINAS SUPERFICIALES EN LA BAHÍA DEL PUERTO DE SAN ANTONIO**

**Trabajo de titulación para optar al título profesional de  
Ingeniero Ambiental**

Director de Tesis : Dr. Hernán Gaete Olivares

Co-director de Tesis: Msc. Donald Brown González

Por: Srta. Marianela Alejandra Galleguillos Santis

Valparaíso- Chile -2006.

## **DEDICATORIA**

Dedico mi proyecto de título a mí querida madre, por ser un ejemplo en mi vida y por brindarme su apoyo incondicional en cada uno de los proyectos que he comenzado.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Sr. Hernán Gaete, director de este proyecto de título, por no permitir que perdiera el horizonte del trabajo, por confiar en mis capacidades para el desarrollo de la técnica y por proporcionar el instrumental necesario para el desarrollo del proyecto.

Al Sr. Donald Brown, co-director de este proyecto de título, por su fundamental apoyo en el desarrollo e implementación de la técnica de bioensayo, por facilitar las dependencias e instrumental del Laboratorio de Biología de la Reproducción y del Desarrollo, y por su indudable aporte a la redacción final del trabajo.

Al Sr. Esteban Cabrera, Encargado de Medio Ambiente de la Gobernación Marítima de San Antonio, por su fundamental apoyo en el muestreo de la bahía, por su valioso aporte de ideas al proyecto y por ayudarme a comprender la dinámica costera que determina la calidad de agua del puerto.

Al Sr. Pedro Bodor, Encargado del Departamento de Protección Ambiental del Servicio de Salud, por su contribución en la búsqueda de datos de calidad de agua y por facilitar estudios del departamento.

Al los profesionales de la DIRINMAR y SHOA, por su aporte de información al proyecto y por su orientación hacia los contaminantes que debían ser considerados.

Al profesor Julio Neuling, por ayudar a comprender el complejo proceso de contaminación marina.

Al Sr. Carlos Echeverría, Presidente de la Caleta de pescadores San Pedro de Cartagena, por su contribución en la extracción de animales de prueba.

A la Escuela de Ciencias del Mar de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, por facilitar los estanques para la mantención de los animales de prueba.

A cada uno de los integrantes de mi familia, especialmente a mi madre por todo su cariño, comprensión, y apoyo en mi formación como mujer y profesional.

A mi padre, que ha sido siempre mi estrella guardiana desde el cielo.

A mis grandes amigas, Maria Paz y Macarena, por brindarme su apoyo incondicional y por acompañarme en estos largos años de cambio.

A mis compañeras y amigas Jocelyn, Germainne, Claudia y Mayte, por las largas noches de estudio y carrete, por dejarme entrar en sus vidas y por acompañarme en la obtención de los que un día pensamos era un sueño.

Por último, a Eduardo, por su apoyo en los momentos difíciles, por dejar que los erizos nos unieran y por permitirme ver y entrar en su corazón.

## **INDICE DE CONTENIDOS**

<b>INDICE DE CONTENIDOS</b>	<b>1</b>
<b>Índice de Tablas</b>	<b>3</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>6</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>7</b>
<b>1. Contaminación del medio ambiente marino</b>	<b>7</b>
1.1 Fuentes de generación de contaminantes	8
1.2 Impactos sobre la calidad del agua	9
1.3 Principales compuestos químicos encontrados en puertos	10
1.3.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)	10
1.3.2 Metales Pesados	11
<b>2. Regulaciones ambientales aplicables a los puertos</b>	<b>13</b>
2.1 Ley 19.300 y propuesta de norma secundaria para aguas marinas	13
<b>3. Test de toxicidad con equinodermos aplicados a los ecosistemas acuáticos</b>	<b>15</b>
3.1. Pruebas de toxicidad acuáticas	16
3.2 Bioensayo de fertilización con erizos	17
3.2.1 Características reproductivas y proceso de fertilización de <i>Tetrapygnus níger</i> (Molina, 1782)	18
<b>4. Antecedentes del Puerto de San Antonio.</b>	<b>20</b>
4.1 Contaminantes presentes en la columna de agua del puerto.	20
4.2 Factores que influncian la dinámica costera del Puerto de San Antonio	21
4.2.1 Relación Puerto- Río Maipo	22
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>24</b>
<b>1. Recopilación bibliográfica de información de Línea Base del puerto de San Antonio</b>	<b>24</b>
<b>2. Implementación técnica de bioensayo</b>	<b>24</b>
2.1. Extracción y mantención animales de prueba <i>Tetrapygnus níger</i>	24
2.2 Técnica de Bioensayo de Fertilización con <i>Tetrapygnus níger</i>	25
2.2.1 Análisis confirmativo de Fertilización	26
2.3 Bioensayo de Fertilización con tóxicos de referencia	28
<b>3. Determinación de la Calidad Ecotoxicológica del agua en la Bahía del Puerto</b>	<b>28</b>
3.1. Metodología de Muestreo	28
3.2 Bioensayo de fertilización con <i>Tetrapygnus níger</i> con agua del Puerto de San Antonio.	31
<b>4. Método análisis de resultados</b>	<b>32</b>
4.1 Método para análisis estadístico de los bioensayos con tóxicos de referencia.	32
4.2 Método de análisis estadístico de bioensayo con agua del Puerto de San Antonio.	32

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
<b>1. Información de línea de base del Puerto de San Antonio: Calidad ambiental del sector del puerto de San Antonio</b>	<b>33</b>
1.1 Concentración de HAP en matriz superficial de agua marina.	33
1.2 Concentración de metales en aguas marinas en desembocadura río Maipo.	33
1.3 Concentración de metales en aguas marinas en sector del Puerto de San Antonio.	34
<b>2. Resultados de bioensayo con tóxicos de referencia sobre la fertilización de <i>Tetrapygyus niger</i></b>	<b>36</b>
<b>3. Bioensayo de Fertilización con aguas del Puerto de San Antonio</b>	<b>38</b>
3.1.1 Primer muestreo, Invierno 2005.	38
3.1.2 Análisis estadístico de los resultados.	39
3.2.1 Segundo muestreo, Primavera 2005.	42
3.2.2 Análisis estadístico de los resultados.	43
3.3 Análisis conjunto de monitoreos del puerto de San Antonio	46
CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFÍA CITADA	52
ANEXOS	56
Anexo N°1: Datos línea de base San Antonio	56
Anexo N°2: Matrices asociadas a la legislación aplicable a los puertos	62
ANEXO N°3: Procedimiento bioensayos de fertilización con <i>Tetrapygyus niger</i> (Modificado de Standard Methods Commitee, 1998 para <i>Arbacia spatuligera</i> )	64

## Índice de Tablas

Tabla 1: Concentración natural de metales traza en agua de mar. _____	11
Tabla Nº 2: Principales fuentes de metales hacia el ambiente acuático. _____	12
Tabla 3: Valor relativo de bioensayos de toxicidad con invertebrados en evaluaciones ambientales (1=pobre, 2=regular, 3= bueno, 4= excelente) _____	17
Tabla 4: Ubicación de las estaciones de muestreo monitoreadas en el Puerto de San Antonio ____	31
Tabla 5: Concentración de metales en distintos puntos de la desembocadura del Río Maipo ____	34
Tabla 6: Concentración de metales en diferentes puntos del puerto de San Antonio. _____	35
Tabla 7: Concentración que provoca una disminución del 50% de fertilización en bioensayos con tóxico de referencia en <i>Tetrapygnus niger</i> _____	36
Tabla 8: Condición del agua Puerto de San Antonio y respuesta de <i>Tetrapygnus niger</i> al bioensayo de fertilización, Invierno 2005. _____	38
Tabla 9: Análisis estadístico con distintos métodos para la respuesta de <i>Tetrapygnus niger</i> al bioensayo de fertilización con aguas del puerto de San Antonio, Invierno 2005. _____	41
Tabla 10: Condición del agua Puerto de San Antonio y respuesta de <i>Tetrapygnus niger</i> al bioensayo de fertilización, Primavera 2005. _____	42
Tabla 11: Análisis estadístico con distintos métodos para la respuesta de <i>Tetrapygnus niger</i> al bioensayo de fertilización con aguas del puerto de San Antonio, Primavera 2005. _____	45
Tabla Nº 12: Análisis de Calidad de Agua Programa de Observación del Ambiente Litoral, Armada de Chile. Situación Histórica 1997-2003 de Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos en el Puerto de San Antonio _____	56
Tabla 13: Concentración de metales pesados e hidrocarburos en aguas del Río Maipo (R1 y R2), en agua de mar (M1 a M6) y en sedimentos marinos (S1 a S5) _____	57
Tabla 14: Análisis de Calidad de Agua y Sedimento, Muestras E1, E2, E3 ubicadas frente a la desembocadura del Río Maipo _____	58
Tabla 15: Concentración de arsénico, mercurio y plomo en agua de mar para distintas épocas del año, año 1998. _____	59
Tabla Nº16: Análisis de Calidad de Agua y Sedimento, Muestra Ca1 en sector de la poza de San Antonio, Muestra Ca2 en sector de Entrada de la Poza del Puerto de San Antonio, Muestra Ca3 en sector al sur del Molo Sur del Puerto de San Antonio y Muestras S6 y S7 ubicadas en la zona del Sitio 1 del Puerto de San Antonio. _____	60
Tabla 17: Análisis de Calidad de Agua y Sedimento, Muestras Ca4, Ca5 y Ca6 ubicadas frente a Panul en el Puerto de San Antonio _____	61
Tabla Nº18: Valores máximos de concentración a considerar para la elaboración de las normas secundarias de calidad ambiental para las aguas marinas y estuarinas. _____	62
Tabla 19: Tabla resumen de las condiciones experimentales y criterios de aceptación en bioensayos de fertilización en <i>Tetrapygnus niger</i> _____	68

### Índice de Figuras

Figura 1: <i>Tetrapygyus niger</i> (Molina, 1782)	20
Figura 2: Detalle de la influencia y orientación de la pluma del río Maipo sobre el Puerto de San Antonio.	23
Figura 3: Stock de animales mantenidos en laboratorio.	25
Figura 4: Erizos en proceso de evacuación de los gametos. A: erizo macho, B: erizo hembra.	26
Figura 5: Criterios de evaluación de ecotoxicidad. Fotomicrografías que muestran distintos estados desde la fertilización y espermatozoides aglutinados de <i>Tetrapygyus niger</i> , A: Óvulo en contacto con espermatozoides sin fertilizar. B: Huevo fertilizado, se aprecia formación de la membrana de fecundación. C: Óvulo sin fertilizar y huevo fertilizado. D: Estado 1 de segmentación, se aprecian las dos primeras blastómeras. E: Huevo sin fertilizar y embrión al estado 1 de segmentación. F: Espermatozoides aglutinados por efecto del tóxico o agua de prueba.	27
Figura 6: Ubicación puntos de muestreo bahía del Puerto San Antonio	29
Figura 7: Características y distancia de la costa a la que fueron tomadas las muestras superficiales de agua en cada punto de muestreo.	30
Figura 8: LC50 de <i>Tetrapygyus niger</i> en bioensayos de fertilización con tóxico de referencia	37
Figura 9: Porcentaje de huevos fertilizados de <i>Tetrapygyus niger</i> en bioensayo de fertilización con agua del puerto de San Antonio, invierno 2005.	39
Figura 10: Porcentaje de huevos fertilizados de <i>Tetrapygyus niger</i> en bioensayo de fertilización con agua del puerto de San Antonio, Primavera 2005.	43
Figura 11: Respuesta conjunta de porcentaje de huevos fertilizados en bioensayo de fertilización con agua del puerto de San Antonio sobre <i>Tetrapygyus niger</i> , Invierno y Primavera 2005.	47

## **INTRODUCCIÓN**

El puerto de San Antonio se ubica en la V región de Valparaíso y actualmente es el puerto más importante del país, llegando el 2003 a transferir 9.7 millones de toneladas de carga. Está dedicado especialmente a la transferencia de contenedores, graneles líquidos y sólidos, tanques para depósito de líquidos, pesca artesanal, actividades industriales, reparación de naves pesqueras y servicios turísticos

Al ser uno de los principales puertos del país, y debido al crecimiento de la economía en las últimas décadas, se ha originado un incremento tanto en las exportaciones como importaciones que a través de él transitan. Tal incremento, va ligado a un mayor tráfico de naves, mayor número de residuos y la necesidad creciente de aumentar la infraestructura portuaria, generando un impacto cada vez mayor en el ecosistema marino de la zona. Las políticas ambientales nacionales e internacionales denotan la necesidad no solo de realizar monitoreos de calidad de agua, sino de medir los efectos reales en las comunidades del sector.

Actualmente, existen estudios fisicoquímicos de la calidad del agua del lugar, por lo cual no es conocido su efecto sobre los organismos vivos. Ello demuestra la necesidad de obtener y evaluar información desde el punto de vista de los individuos y no desde la concentración, ya que la exposición por sí sola no es suficiente para evaluar un impacto sobre las especies que habitan el sector.

El presente estudio determinará la calidad del agua del puerto de San Antonio y su efecto en la fertilización de *Tetrapygyus niger* en base a criterios ecotoxicológicos de bioensayos de fertilización en diversos puntos de la bahía del puerto

## **OBJETIVOS**

- Objetivo General

Determinar la calidad ecotoxicológica del agua en la bahía del Puerto de San Antonio, a través de bioensayos de fertilización con *Tetrapygnus niger*.

- Objetivos Específicos

- I. Implementar la técnica de bioensayo de fertilización con *Tetrapygnus niger* (Molina, 1782)
- II. Analizar los datos de calidad de agua del puerto de San Antonio
- III. Determinar toxicidad de las aguas superficiales del Puerto de San Antonio y sectores adyacentes a través de bioensayos de toxicidad con *T. niger*.

## **ANTECEDENTES**

La zona costera tiene una gran importancia por la amplia gama de bienes, servicios y funciones que sus diversos recursos y ecosistemas generan para el hombre y el medio ambiente. La actual y creciente diversidad de actividades y utilización que el hombre realiza del mar, lo enfrenta a una serie de conflictos que de tales usos se derivan, particularmente en la zona costera, donde se hace presente con especial énfasis, el mayor impacto de los usos del mar. Chile ha visto acelerar sustancialmente la utilización de su zona costera, producto del desarrollo urbano de las ciudades e industrias que ahí se localizan, generándose con ello una serie de problemas en su uso (Camaño y Silva, 1993) debido a que muchos de ellos son incompatibles. Dentro de los usos se encuentran la pesca, acuicultura, industrias, turismo, transporte, puertos, etc, los cuales al igual que toda actividad humana generan en mayor o menor proporción productos que al ingresar al medio ambiente acuático pueden provocar problemas de contaminación de diversas magnitudes.

### 1. Contaminación del medio ambiente marino

Según la definición dada por el grupo GESAMP (Group of Experts on the Scientific Aspects on Marine Environmental Protection), y adoptada por la comunidad internacional en la convención de las Naciones Unidas sobre el Derecho del Mar, por “contaminación del medio marino se entiende la introducción por el hombre, directa o indirectamente, de sustancias o de energía en el medio marino incluidos los estuarios, que produzca o pueda producir efectos nocivos tales como daños a los recursos vivos y a la vida marina, peligros para la salud humana, obstaculización de las actividades marítimas, incluidas la pesca y otros usos legítimos del mar, deterioro de la calidad del agua del mar para su utilización y menoscabo de los lugares de esparcimiento” (Escobar., 2002). Ello deja de manifiesto que la contaminación es el primer factor de degradación del medio marino.

En general, el problema de la degradación del mar por procesos de contaminación tiene modalidades y actores múltiples, tanto para la capacidad asimiladora del cuerpo receptor como a la biota asociada al sector de descarga, por lo que los efectos sobre el medio marino son previsible cuando se trata de reacciones conocidas, o imprevisibles e inesperados si se trata de fenómenos complejos cuyo desarrollo a través de sinergismos y

de sensibilidades potenciadas es prácticamente desconocido, sobre todo en lo que se refiere a procesos de contaminación y sus efectos a largo plazo

En un contexto integral, debemos tener en cuenta que la diversidad de productos en forma de residuos que genera la actividad humana se acerca a los 100.000 y además crece continuamente en peso y volumen. La capacidad tóxica y contaminante de estos productos depende de factores múltiples, siendo los principales su tipo y quien es el receptor (Seoanez., 2000). Esta situación está reflejada íntegramente en los puertos, ya que además de las actividades propias de este sector, existen otras asociadas que aumentan el número y volumen de sustancias exógenas que ingresan a la matriz acuosa magnificando los niveles de contaminación relacionados al sector portuario. En este contexto, a continuación se revisarán las diversas fuentes de contaminación encontradas en los puertos y los impactos generales provocados por estos.

### 1.1 Fuentes de generación de contaminantes

El impacto ambiental de los puertos marítimos es por regla general considerable y tiene su origen, por una parte, en la construcción, reforma o ampliación de instalaciones del puerto o del terminal marítimo y, por otra parte, en el funcionamiento de todas las instalaciones portuarias, las industrias, los servicios y los sistemas de transporte asociados (tanto acuáticos como terrestres). El impacto será mayor en la medida que las actividades de carga y descarga de un puerto (medidas en toneladas/año) sean más intensas.

Las fuentes de generación de contaminación e impactos ambientales son: las actividades propiamente portuarias, tales como el tráfico naval, las operaciones de carga, descarga, almacenamiento, transporte, suministro, disposición de residuos, mantenimiento o reparaciones, y las actividades de transformación y mejora que se desarrollan en la zona industrial adyacente relacionada al puerto.

Uno de los temas de mayor relevancia se refiere a los derrames de sustancias peligrosas, ya que aunque se trate de cantidades pequeñas, éstas inciden de manera especial sobre el medio ambiente, según se establece en el Código IMDG (International Maritime Dangerous Goods-Code).

También inciden en la contaminación ambiental la descarga de productos a granel, los cuales por efectos de la transferencia del producto y del viento se dispersa al ambiente y al agua.

El impacto ambiental de los puertos marítimos puede afectar al agua, al suelo, al aire, a plantas y animales de toda especie (terrestres, acuáticos y al ser humano). Es posible resumir los principales impactos relacionados con la actividad portuaria de la siguiente forma:

- Impactos sobre la calidad del agua
- Impactos sobre la calidad del aire
- Impactos sobre la hidrología costera, oceanografía y procesos costeros
- Impactos sobre la ecología costera y marina
- Impactos sobre la calidad del paisaje
- Impactos de los desechos generados por la actividad portuaria

## 1.2 Impactos sobre la calidad del agua

Las principales fuentes de contaminación del agua se relacionan con los derrames accidentales durante las operaciones de carga y descarga de buques, así como el escurrimiento de materiales almacenados a granel y polvos fugitivos movilizados por acción del viento. A lo anterior debe agregarse el impacto generado por el drenaje de aguas lluvia y servidas del puerto.

Las sustancias tóxicas, incluidas en los derrames, corresponden generalmente a escorrentía de sulfuros, bauxita, abonos nitrogenados y fosfatados, carbón, minerales metálicos, chips de madera y otros materiales en bruto provenientes de los patios y bodegas, así como de otros lugares de almacenamiento en el puerto (se producen durante la limpieza o lavado de pisos y maquinaria realizados en esas áreas). Las descargas accidentales de sustancias peligrosas como aceites, residuos de pintura anticorrosiva, compuestos anti-incrustantes (adheridos a la superficie de las embarcaciones o derramados en procesos de mantenimiento) constituyen otra fuente de contaminación.

Si los derrames accidentales presentan materia orgánica (por ejemplo graneles de alimento animal), ésta se transforma en inorgánica disminuyendo el contenido de oxígeno disuelto del agua e incrementando el nivel de nutrientes. Si, sumado a lo anterior, los rompeolas cambian el patrón de las corrientes costeras, es probable que se produzca un estancamiento del agua detrás de estas estructuras, y con ello la calidad del agua estancada se deteriorará rápidamente a través de un incremento de nutrientes y de fitoplancton y una disminución de oxígeno disuelto. De esta manera, el agua del puerto

puede llegar a condiciones anaeróbicas, permitiendo la generación de sulfuros de hidrógeno, productor de malos olores. La pérdida de la calidad del agua se manifiesta sobre su turbidez, pH, color; y la aceleración de la sedimentación por escorrentía costera. Adicionalmente, la calidad del agua se puede ver alterada en otros parámetros como:

- Incremento de la salinidad y temperatura por descargas de efluentes térmicos
- Introducción de sustancias tóxicas y altamente nocivas al medio marino por derrames accidentales (combustibles, resinas, graneles) o por operaciones portuarias deficientes
- Contaminación microbiológica de las aguas y playas del puerto por aceites y grasas, metales pesados, materia orgánica e hidrocarburos (CONAMA,2000)

### 1.3 Principales compuestos químicos encontrados en puertos

Otros aspectos ambientales que deben ser considerados se refieren al manejo de sustancias peligrosas al interior de los terminales, a la recepción y manejo de desechos provenientes de buques extranjeros, a aspectos de salud y seguridad ocupacional y al impacto provocado sobre el entorno urbano (impacto vial, ruidos, aspectos paisajísticos, recreacionales, calidad del agua, etc.).

Todas estas actividades, ingresan lentamente y en forma crónica sustancias tóxicas a la columna de agua. De las miles de sustancias químicas ingresadas antropogénicamente a las zonas costeras por las industrias, arrastre por ríos, y tráfico y funcionamiento de las estructuras portuarias, se pueden resaltar los Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos por su importancia de ingreso debido al tráfico marítimo y los Metales Pesados provenientes de la actividad industrial no solamente de la zona, sino también de actividades realizadas en sector aledaños pero cuya influencia no debe ser ignorada.

#### 1.3.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)

La contaminación del medio ambiente marino por introducción HAP, se produce generalmente por acciones antropogénicas, principalmente por derrames producidos en el transporte del petróleo, a través del mundo, instalaciones fijas y otras fuentes como desechos municipales, desechos industriales, aportes de ríos, intercambio atmosférico y

dumping (Coronel, 2003). Otras fuentes importantes la constituyen las operaciones rutinarias de lavado de estanque y residuos de limpieza, achique de sentinas, deslastres, etc., que se efectúan durante la navegación (Bore et al, 1986). En el caso del petróleo, zonas de tráfico marítimo y de faenas portuarias, entre otras, son consideradas lugares potenciales de contaminación. Aquellas áreas con vertimiento crónico de petróleo, presentarán porciones de superficie con alto contenido de HAP dentro de un medio con concentraciones bajas y homogéneas (SHOA, 1991).

### 1.3.2 Metales Pesados

Uno de los contaminantes más estudiados en los ambientes marinos son los metales pesados debido a la toxicidad que presentan para los organismos que allí habitan. Se encuentran en forma natural en todos los ambientes (Tabla N°1), pero cuando las concentraciones naturales se ven alteradas significativamente por ingresos externos, el sistema pierde la capacidad de autodepuración y comienzan a surgir problemas de polución. Existen diversas rutas de ingreso de estos contaminantes al agua de mar, entre ellas, el ingreso a través de ríos, deposición atmosférica y actividades antropogénicas son las más comunes. Una gran cantidad de metales en las aguas de río se originan en forma natural, sin embargo, son aumentados por fuentes antropogénicas donde las aguas de los ríos fluyen por zonas urbanas o industriales. (Kennish, 1996). La tabla N° 2 señala las principales fuentes antropogénicas de metales a los ecosistemas.

Tabla 1: Concentración natural de metales traza en agua de mar.

Metal	Unidad	Pb	Hg	Cd	Sb	Cr	Se	As	Cu	Zn
Concentración	ug/l	0.002	0.007	0.1	0.3	0.3	0.5	2	2	3

Fuente: Gesamp, 1976.

La mayoría de los metales pesados son absorbidos por los sedimentos (puede encontrarse en ellos del orden de 3 a 5 veces la cantidad descrita para aguas superficiales), pero éstos son resuspendidos durante las tormentas y periodos de turbulencia. Además, los metales tienen la capacidad de interactuar con otras sustancias presentes en la matriz acuosa mediante diversos procesos, combinarse con la materia orgánica, aumentar su afinidad y biodisponibilidad, etc.

Tabla N° 2: Principales fuentes de metales hacia el ambiente acuático.

METAL	FUENTE
Mercurio	Minería, industria pulpa de papel, agricultura (fungicida, pesticidas), combustibles fósiles, emisiones volcánicas.
Plomo	Minería, industria de pigmentos, pinturas, metalúrgica, emisiones desde automóviles.
Estaño	Minería, industria metalúrgica, uso de pesticidas (antifouling marino).
Arsénico	Minería del oro, cobre y estaño, industria metalúrgica, agroquímicos (pesticidas, orgánicos), actividad geológica.
Selenio	Minería, industrias de semiconductores, pigmentos, vidrio, aditivos de alimentos, combustibles fósiles.
Cadmio	Manufactura relacionada al zinc, subproductos de la refinera del cobre y procesamiento del plomo, combustible fósiles, efluentes municipales, fertilizantes de fosfato, pigmentos, lubricantes, erupciones volcánicas, incendios forestales.
Cobre	Minería, reciclamiento de metales no ferrosos, aditivos alimenticios, fertilizantes, fungicidas, preservantes de la madera, pintura antifouling, erupciones volcánicas, actividad hidrotermal.

Fuente: Zúñiga, 1998.

Se han realizado numerosos estudios sobre la toxicidad de los metales pesados en todo el mundo, y actualmente la mayoría de ellos se encuentran regulados tanto para su vertimiento como para la carga que puede soportar el cuerpo de agua.

Existen diversos estudios que respaldan la toxicidad de los metales, entre los cuales a nivel nacional se pueden destacar los realizados por Ahumada (1995), Riveros *et al* (1996), Gaete *et al* (1996) y Zúñiga (1998), entre otros. En dichos estudios se ha evaluado tanto los niveles de base de metales que existen en bahía, como los efectos que estos provocan al ecosistema en los cuales encuentran inmersos. Además, se ha comprobado que muchas veces los niveles regulados actualmente no necesariamente involucran una inocuidad de las sustancias contaminantes disueltas ya que existen propiedades químicas como la aditividad, sinergia o interacción entre los contaminantes presentes que aumentan el efecto de los metales pesados. Esta situación genera un aumento del riesgo ecológico a la que se ven expuestas las especies que habitan los sectores problemáticos.

## 2. Regulaciones ambientales aplicables a los puertos

Actualmente, el tema ambiental ha comenzado a ser incorporado activamente como parte de la gestión de los puertos. Para ello han influido una serie de elementos, como son los aspectos legislativos, de mercado y financieros (por ejemplo, los préstamos de organismos financieros internacionales para inversiones exigen estudios de impacto ambiental). En efecto, actualmente existen en el país una serie de regulaciones ambientales que son aplicables a los puertos, aún cuando la mayoría de ellas no han sido diseñadas de manera específica para esa actividad. A lo anterior, se suma las demandas que ejercerán los compradores de productos nacionales en el extranjero, particularmente en países desarrollados, quienes exigen cada vez más la incorporación de la variable ambiental a la cadena de manufactura y transporte de sus productos. Están también los acuerdos internacionales que existen sobre la materia, los que agregan una presión extra para que los puertos nacionales incorporen el factor ambiental a sus actividades de gestión más tradicionales (CONAMA, 2000).

### 2.1 Ley 19.300 y propuesta de norma secundaria para aguas marinas

En Chile los efectos y las decisiones que se deben tomar respecto a los proyectos involucrados en temáticas ambientales están dadas por la Ley 19.300 sobre Bases Generales del Medio Ambiente y el Reglamento del Sistema de Evaluación de Impacto Ambiental (SEIA).

El Reglamento señala que, a objeto de evaluar los efectos adversos significativos, se considerará las normas secundarias de calidad ambiental y de emisión vigente o, ante la falta de dichas normas, las vigentes en diferentes Estados, dando prioridad a aquel que posea similitud con los componentes ambientales nacionales y/o locales. Estas normas solo establecen los límites máximos y mínimos de la concentración o permanencia de sustancias, elementos, energía o combinación de ellos, basándose principalmente en los niveles adoptados por normas extranjeras. Por tanto, estas normas no consideran la relación causal entre las concentraciones ambientales y los efectos a largo plazo sobre los ecosistemas locales amenazados, los cuales podrían presentar una composición específica y una estructura comunitaria particular. Diferencias en estas características generan distintas sensibilidades a la presencia de estas sustancias o elementos

contaminantes, así como variaciones en la capacidad de recuperación de un ecosistema, por lo que una generalización de la respuesta no resultaría adecuada. (Medina y Encina-Montoya, 2003).

Es por lo señalado anteriormente que es necesario considerar, primeramente parámetros normativos, las actividades que se desarrollan en el área de estudio, así como la influencia de factores externos al área de estudio, los cuales en conjunto determinarán la calidad actual del recurso a evaluar; y como segundo aspecto la forma en que esa calidad afecta al ecosistema asociado. De esta forma es que un estudio que integre dichos factores cobra importancia para determinar las condiciones actuales del sistema en cuestión, razón por la cual la presente investigación apunta en ese sentido.

En este marco es que la eventual aprobación de la norma secundaria de calidad de agua continentales y marinas cobra importancia, ya que considera como una herramienta válida los bioensayos, los cuales permiten evaluar el comportamiento de los organismos frente a tóxicos en el área de estudio (situación que se abordará en mayor profundidad en los siguientes capítulos), evitando así la generalización de una respuesta y evaluando correctamente los efectos provocados por la situación que posee el área en estudio.

A continuación se revisarán los aspectos más relevantes del texto de la norma secundaria de calidad ambiental para las aguas continentales y marinas que la Comisión Nacional de Medio Ambiente ha decretado para su aprobación (CONAMA 2004).

1. En dicho proceso se considerará la calidad natural del recurso y criterios sitio-específicos como la sensibilidad de las especies a las condiciones del medio natural en que habitan, las características físicas y químicas particulares del lugar que alteran la biodisponibilidad, la toxicidad y/o la existencia de recursos hídricos con características únicas escasas y representativas.
2. El cumplimiento de las normas secundarias deberá verificarse por compuesto o elemento, mediante mediciones en las áreas de vigilancia de las aguas continentales superficiales y marinas para las cuales se hayan dictado las normas de calidad.
3. Los bioensayos y los bioindicadores podrán ser utilizados en las normas secundarias como herramientas complementarias para determinar el impacto producido por situaciones relacionadas con la conservación de las comunidades acuáticas, los usos prioritarios o el estado trófico de los lagos, canales, fiordos y estuarios.

4. Para efectos de la elaboración de las normas secundarias de calidad ambiental para las aguas marinas y estuarinas aptas para la conservación de las comunidades acuáticas, y para los usos del agua marina, los valores máximos de concentración o unidad de los compuestos a considerar se muestran en la Tabla N°18 en anexo 2.
5. Las normas secundarias de calidad para la protección de las aguas marinas y estuarinas deberán considerar las clases de calidad que a continuación se indican:
  - Clase 1: Muy buena calidad. Indica agua apta para la conservación de comunidades acuáticas, para la desalinización de agua para consumo humano y demás usos definidos, cuyos requerimientos de calidad sean inferiores a esta clase.
  - Clase 2: Buena calidad. Indica un agua apta para el desarrollo de la acuicultura y actividades pesqueras extractivas y para los usos comprendidos en la Clase 3.
  - Clase 3: Regular calidad. Indica un agua apta para actividades portuarias, navegación u otros usos de menor requerimiento en calidad de agua.

En caso que un cuerpo de agua marino tenga como calidad natural una peor a la clase 3, deberá ser protegido hasta el valor de su calidad natural, con el objeto de que ésta no empeore.

En el marco de la futura aprobación de la norma secundaria de calidad de aguas marinas, es que los test de toxicidad aplicados a la respuesta de los organismos vivos frente a un contaminante específico o calidad de agua de un sector determinado, cobra importancia, ya que dicha norma valida la aplicación de los bioensayos como una herramienta de evaluación de criterios de emisión mucho más estrictos que los que están en vigencia. A continuación se revisarán en profundidad en que consisten dichas herramientas.

### 3. Test de toxicidad con equinodermos aplicados a los ecosistemas acuáticos

La ecotoxicología es la ciencia que se ocupa del estudio de las acciones y los efectos nocivos de agentes físicos y químicos presentes en el ambiente (contaminantes o pulutantes) sobre los constituyentes vivos de los ecosistemas, o sea, sobre los animales (incluidos el hombre), vegetales y microorganismos. Comprende el ciclo completo de la contaminación , incluyendo el estudio de las fuentes de emisión de contaminantes, su naturaleza (características espaciales y temporales), el seguimiento y las

transformaciones ambientales de las sustancias, la interacción entre ellas y los seres vivos y por tanto su impacto ambiental (Larraín, 1995).

### 3.1. Pruebas de toxicidad acuáticas

En los últimos años se han realizado esfuerzos significativos en el desarrollo de pruebas de toxicidad, debido a la creciente necesidad de evaluar la toxicidad producida por diferentes tipos de muestras durante cortos periodos de tiempo. Generalmente las pruebas de toxicidad son diseñadas para proporcionar una estimación de una concentración que no produce efectos adversos. En la ecotoxicología acuática, los bioensayos de toxicidad, que pueden ser de tipo agudo o crónico, son muy adecuados para establecer la toxicidad de efluentes, fijar o recomendar criterios de manejo, y establecer estándares y normas de calidad o monitoreo, (Larraín, 1995).

Los test de toxicidad se han convertido en una importante herramienta de control ambiental, proporcionando una evidencia directa y cuantificable de las consecuencias de la contaminación, y pudiendo ser usados para medir toxicidad de mezclas complejas de contaminantes tanto en el agua como en la interfase sedimento-agua (Cesar *et al.*, 2002).

Una consideración importante para desarrollar estos métodos de experimentación usando especies determinadas es saber la sensibilidad relativa de los organismos tanto para sustancias químicas individuales como para mezclas complejas. (Cesar *et al.*, 2002). En general, bivalvos, crustáceos decápodos, anfípodos y equinodermos son los animales más sensibles. Esto es particularmente peligroso para los organismos que viven en la franja intermareal o cerca de la capa superficial del agua (Carballeira , 2003).

En los últimos años, se ha puesto énfasis en el estudio de las comunidades macroinfaunales debido a diversas ventajas comparativas que presentan sobre otras comunidades marinas, basadas fundamentalmente en las características bioecológicas de las mismas. Además, desde un punto de vista metodológico y analítico, las técnicas en el estudio de la problemática ambiental han probado ser herramientas objetivas aplicables con mayor eficiencia a las comunidades macroinfaunales a nivel mundial, lo que permite la obtención de resultados y conclusiones comparables, requisito básico e indispensable para la cuantificación del cambio a mediano y largo plazo durante la etapa del monitoreo biológico (Andrade y Gutiérrez, 1980).

En la tabla N°3 se indican los valores relativos de bioensayos de toxicidad para algunos invertebrados utilizados en evaluaciones ambientales actualmente. En ella se

muestra que los equinodermos poseen valores relativos sucesivos de características excelentes, constituyéndose en la mejor herramienta, razón por la cual se ha seleccionado este Filum.

Tabla 3: Valor relativo de bioensayos de toxicidad con invertebrados en evaluaciones ambientales (1=pobre, 2=regular, 3= bueno, 4= excelente)

	DÁFNIDOS AGUDO	DÁFNIDOS CRÓNICOS	ARTEMIA	ROTÍFEROS	MOLUSCOS	EQUINODERMOS
Rapidez	3 (48-72hr)	2 (7-21 días)	3 (24-48 hr)	2	2 (96 hr)	4 (1 hr)
Simplicidad	3	2	3	2	2	4
Replicable	4	2	3	2	2	4
Precio	3	2	3	3	3	4
Estandarización	4	2	4	4	2	4
Sensibilidad a metal	3	3	2	3	2	4
Discrimina contaminación	2	2	2	2	2	2
Relevancia ecológica	3	4	2	2	3	3
Relación laboratorio/terreno	3	3	2	2	3	4
Relación con estándares	4	4	3	3	2	3

Fuente: Zuñiga, 1998.

### 3.2 Bioensayo de fertilización con erizos

Los experimentos de fertilización con equinodermos han sido ampliamente utilizados en la caracterización de una gran variedad de sustancias tóxicas y actualmente están incluidos en los protocolos para la determinación de contaminantes en la interfase sedimento-agua, principalmente para metales pesados. Un gran número de contaminantes pueden afectar a los erizos de mar (Leighton, 1980) por lo cual constituyen una herramienta ideal para los estudios ecotoxicológicos. En estudios de contaminación

marina, los experimentos relacionados con los efectos de los contaminantes en la fertilización de los erizos de mar son elegidos por su facilidad de aplicación, rapidez y principalmente por la sensibilidad que éstos organismos presentan, generando resultados de gran uniformidad y precisión (Riveros *et al*, 1996). En general, este grupo de organismos son aceptados internacionalmente para su utilización en test de toxicidad (Zúñiga *et al*, 1995), además han demostrado resultados más efectivos en otros aspectos como menores coeficientes de variación, respuestas más rápidas, menor coste y espacio, y resultan más efectivos en casos de baja a moderada toxicidad (Cesar *et al*, 2002). Además, diversas investigaciones realizadas con gametos de erizos han demostrado presentar una alta sensibilidad a varios tipos de contaminantes, incluyendo metales, por lo que las pruebas de toxicidad con estas especies han sido estandarizadas adecuadamente (Zúñiga, 1998).

De éste modo, y considerando todos los parámetros establecidos, se realizarán bioensayos de fertilización con *Tetrapygyus niger* (Figura N°1) para medir posibles efectos en la fertilización debido a contaminación en el puerto de San Antonio. Esta especie además de poseer todas las características anteriores, se encuentra ampliamente distribuido en nuestro país, no posee problemas ecológicos complejos ni presenta períodos de veda por lo cual su accesibilidad es muy superior a otros erizos de mar.

### 3.2.1 Características reproductivas y proceso de fertilización de *Tetrapygyus niger* (Molina, 1782)

El proceso de fertilización en erizos es ampliamente conocido y presenta numerosas ventajas debido a su amplia documentación. Debido a que el parámetro central de la técnica del bioensayo de fertilización con erizos es la visualización de la membrana de fertilización en los huevos, cobra importancia revisar el proceso involucrado en la formación de dicho parámetro.

Los erizos de mar poseen sexos separados pero sin dimorfismo sexual externo. Las gónadas ocupan gran parte del interior y son 5 suspendidas a lo largo de los interambulacros sobre el lado interno de la testa. Cada gónada está cubierta por su lado externo de peritoneo celómico y revestida en su interior con epitelio germinal. Entre estas dos capas destaca la presencia de células musculares y tejido conectivo. De cada gónada parte un gonoducto corto que se extiende aboralmente para abrirse por un gonoporo

localizado sobre una de las cinco placas genitales (Barnes, 1985). Existe coloración gonadal interna distintiva para cada uno de los sexos que permite su identificación; la gónada masculina es de tonalidad rojiza y la femenina de color crema.

La fertilización se lleva a cabo forma externa en el agua de mar y existe unión específica del espermatozoide de la especie con el óvulo. La atracción y activación del espermatozoide se produce quimiotácticamente por el óvulo, y es altamente específica gatillando la reacción acrosómica luego del contacto del espermatozoide con la capa gelatinosa del óvulo, y su adhesión sobre la superficie del óvulo a través una proteína específica denominada bindina. Todas las regiones de la membrana celular del óvulo son capaces de fusionarse con el espermatozoide, lo cual produce la polimerización de actina en el óvulo para formar un cono de fertilización a través del cual se produce la internalización del espermatozoide dentro del óvulo. Para prevenir la poliespermia, (la entrada de más de un espermatozoide), el óvulo del erizo de mar tiene dos mecanismos; una reacción rápida, llevada a cabo por un cambio de potencial eléctrico en la membrana celular que es pasajero, y una reacción lenta, causada por la exocitosis de los gránulos corticales que es permanente, debido a provocan una corriente de agua hacia el espacio entre la membrana celular y vitelina, haciendo que la membrana vitelina se expanda y llegue a ser la membrana de fertilización que se endurece con posterioridad. (Gilbert, 2005). Es precisamente la evidencia morfológica de formación de la membrana de fertilización, lo que se utiliza como uno de los criterios en este bioensayo.

Una vez producida la fecundación, el embrión comienza su división. Los huevos de erizos de mar son oligo e isolecitos (escaso vitelo equitativamente distribuido), por lo que el patrón de segmentación embrionaria es holoblástica (la segmentación es total y el primer surco de segmentación se extiende a través de todo el cigoto desde el polo animal al polo vegetativo). La primera y segunda segmentación son meridionales y se disponen perpendicularmente entre sí, llevando a la formación de las dos y cuatro blastómeras, respectivamente (Gilbert, 2005). La presencia de las dos primeras blastómeras es el segundo criterio morfológico empleado en este trabajo como diagnóstico de que la fertilización ha ocurrido.



Figura 1: *Tetrapygyus niger* (Molina, 1782)

#### 4. Antecedentes del Puerto de San Antonio.

Se ubica en la V región de Valparaíso y es uno de los principales puertos en transferencia de carga del país. Sus actividades de especialización se dividen en transferencia de carga y graneles líquidos y sólidos, acopio y almacenamiento de carga de contenedores, actividades industriales por empresas como Vopak, Terquim, EPSA, etc, y actividades de reparación de naves y servicios turísticos.

Actualmente, el puerto cuenta con un proyecto de expansión llamado Dársena para el año 2050 que planea ampliar las dependencias portuarias en 120 hectáreas, aumentando de este modo el nivel de transferencia de 10 millones a 29 millones de toneladas. (Empresa Portuaria de San Antonio, 2004)

##### 4.1 Contaminantes presentes en la columna de agua del puerto.

En la provincia de San Antonio, el mayor riesgo de contaminación lo constituyen los vertimientos voluntarios e involuntarios de las naves que recalán en el puerto de San Antonio, tanto por maniobras de lavado de estanques, tráfico de naves, etc. (SHOA, 1991). De un estudio desarrollado en el año 1991 por el Servicio Hidrográfico y Oceanográfico de la Armada, se estimaron los niveles base máximos para HAP dispersos disueltos en agua de mar superficial en el área de San Antonio en 1,5 ug/l. Además se

observó una alta dispersión de los datos, característica de áreas con ocurrencia de vertimientos antropogénicos de petróleo (Armada de Chile, 1994).

También, existen altas concentraciones de metales pesados en los alrededores del puerto, principalmente cobre, arsénico, plomo, cadmio y zinc. Dichos contaminantes no tienen directa relación con las actividades desarrolladas actualmente en el puerto, sino con la dinámica costera que el puerto posee.

#### 4.2 Factores que influyen la dinámica costera del Puerto de San Antonio

La dinámica costera de cada uno de los puertos del país varía sustancialmente dependiendo de la geografía del sector y las variables externas involucradas. Dentro de los factores que marcan el movimiento de las masas de agua en el puerto de San Antonio, los vientos y las corrientes son los que inciden significativamente en el movimiento de los contaminantes superficiales vertidos a la columna de agua. Es por ellos que deben ser introducidos en el análisis del desplazamiento de sustancias antrópicas presentes en el puerto.

Los vientos dominantes según la época del año son: los vientos del SW soplan con fuerza en primavera y verano, por lo general desde el medio día y calman a la puesta de sol. En invierno, los vientos dominantes son del NW, N y NE.

El sistema de corrientes se ajusta bien a un patrón típico de la costa central y norte de Chile, caracterizado por flujos en general débiles y orientados paralelos a la costa. La columna de agua presenta un flujo unidireccional desde los 5 a los 24m de profundidad y los flujos más probables son en dirección norte (NW)

La dinámica costera está dominada principalmente por la acción del viento, y dentro de éste se distingue a la brisa marina como el componente más importante en determinar la circulación. La marea es un factor menos importante en relación con el viento.

Tanto las corrientes como los vientos permiten demostrar la posible dispersión que van a tener los contaminantes vertidos en el medio ambiente acuático, pero ello también puede ser determinado a través estudios del comportamiento del trazador químico rodamina B (sustancia química no tóxica que disuelta en una solución de agua de mar y alcohol presenta un color luminoso anaranjado fácil de identificar y seguir). Los experimentos con rodamina muestran que al interior de la poza las bajas corrientes y la baja turbulencia mantienen la mancha sin desplazamiento neto significativo. En mar

abierto, la dispersión se manifiesta con una mancha en forma de huso que sigue un desplazamiento noroeste similar a la pluma de dispersión del río Maipo.

#### 4.2.1 Relación Puerto- Río Maipo

El puerto de San Antonio y la desembocadura del Río Maipo se encuentran ubicados administrativamente dentro de la V región, y a pesar del escaso distanciamiento geográfico de ambas localidades, ambas están afectadas por áreas de captación francamente diferentes. Mientras la zona del puerto está inserta en un sistema de cuenca costera (interfluvio Aconcagua –Maipo), el río Maipo recibe los efectos de una cuenca hidrográfica mucho mayor de origen andino y cuya distribución abarca predominantemente la región Metropolitana. Dicho río evacua las aguas de la cuenca hidrográfica de mayor densidad demográfica del país y su aporte de materiales originados de actividades humanas es el Mapocho. El Maipo atiende cerca del 70% de la demanda de agua potable del gran Santiago y casi el 90% del riego de la cuenca. El Maipo constituye un sistema fluvial de gran capacidad de arrastre, y su carga de sedimentos que arriban al mar es tomada por la corriente litoral de sur a norte siendo este un importante agente de dispersión de material.

La importancia del efecto del río sobre el área completa es evidente. Dada la circulación de sus aguas después de la desembocadura, el curso de la pluma hacia el norte, si bien puede no provocar ingresos importantes y frecuentes a la poza, esta puede corresponder a una vía de dispersión hacia el norte de los aportes provenientes desde el interior de la bahía portuaria. Respecto a los fenómenos de circulación marina existen antecedentes para pensar en al menos dos masas de agua diferentes en base a sus cualidades fisicoquímicas, las cuales según un régimen estacional pueden experimentar importantes procesos de mezcla (Alarcón, 1993)

El efecto del río es variable y dependiente de su caudal y de los vientos. Cuando el caudal es grande, la mancha de sólidos en suspensión es muy nítida y permite apreciar a simple vista el efecto del viento sobre las aguas que desembocan al mar. Cuando el viento predominante es SW, la mancha se dirige hacia el norte, si el caudal es pequeño bordea la costa de la comuna de San Antonio, si el caudal es grande puede llegar hasta la comuna de El Tabo. Cuando el viento es del NE, la mancha del río se dirige hacia el sur alcanzando las costas de Santo Domingo (Bodor, 1988). Dicha influencia puede verse en

la figura N° 2 que muestra el aporte y orientación del material aportado por el Río Maipo hacia el sector del Puerto de San Antonio.



Figura 2: Detalle de la influencia y orientación de la pluma del río Maipo sobre el Puerto de San Antonio.

Fuente: Servicio de Salud, DPA San Antonio.

Actualmente, el puerto de San Antonio controla la calidad del agua solamente mediante el estudio de la concentración de contaminantes presentes en la matriz acuosa. Los antecedentes del aumento del tráfico marítimo sugieren un incremento de la cantidad de contaminantes presentes en la columna de agua, y hasta el momento no se han estudiado los efectos de dicha calidad en los organismos que habitan el sector. La falta de antecedentes respecto de estudios ecotoxicológicos en el área del puerto de San Antonio demuestran la necesidad de determinar si sus aguas presentan características tóxicas para los organismos marinos, por lo cual esta investigación determinará la calidad ecotoxicológica del agua del puerto mediante bioensayos de fertilización con *Tetrapygnus niger*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Recopilación bibliográfica de información de Línea Base del puerto de San Antonio

Se realizó una amplia revisión bibliográfica para el análisis de datos sobre calidad de agua superficial a modo de establecer los niveles de contaminantes tanto en el puerto como los alrededores de éste. Se tomaron en consideración principalmente estudios realizados por el Servicio de Salud Valparaíso-San Antonio, Gobernación Provincial de San Antonio a través del POAL, Dirección General de Agua, publicaciones científicas y empresas instaladas en el lugar de estudio. Para este fin, también se consideraron otros aspectos relacionados a la calidad del puerto, como son la influencia de las empresas instaladas en el área de estudio, las corrientes y otros aspectos como la relación entre el puerto y el Río Maipo

### 2. Implementación técnica de bioensayo

#### 2.1. Extracción y mantención animales de prueba *Tetrapygyus niger*

Se obtuvo un stock de animales por buceo autónomo desde el sector Caleta El Membrillo para el estudio de toxicidad y bioensayo con aguas marinas del puerto. Los animales fueron mantenidos en estanques de 150 L con aireación constante, recambio del volumen total de agua y alimentación *ad limitum* con algas frescas *Lessonia nigrescens* cada 3 días en la Escuela de Ciencias del Mar, Facultad de Recursos Naturales de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. La figura N° 3 muestra los animales mantenidos como stock.



Figura 3: Stock de animales mantenidos en laboratorio.

## 2.2 Técnica de Bioensayo de Fertilización con *Tetrapygus niger*

Se realizó según lo descrito por Standard Methods Committee (Anexo N° 3).

Los gametos fueron obtenidos por inyección de 2 ml de KCl 0.57 M en la región oral (zona libre de espinas y con tejido blando) de cada animal. La Figura N° 4 muestra los animales en el proceso de evacuación de los gametos. El stock de gametos del macho fue mantenido en una cápsula de Petri a baja temperatura hasta su utilización en el bioensayo. Los gametos de la hembra fueron trasladados a un recipiente con agua de mar y se dejaron decantar. Se controlaron los tiempos de obtención de gametos de cada animal. Se seleccionaron los animales que poseían mejores condiciones de movilidad espermática y óvulos maduros para su uso en el bioensayo.

Se realizaron diluciones para llevar a una concentración de  $7 \cdot 10^7$  espermatozoides por ml y 2000 óvulos por ml. Para la preparación de espermatozoides se realizó una modificación a la técnica estandarizada ya que se trabajó con formalina en reemplazo de ácido acético. Se agregaron 0,1 ml de espermatozoides a 5 ml de agua de prueba (tóxico de referencia o agua obtenida en proceso de muestreo) contenidas en tubos de ensayo con 4 réplicas y se incubaron por 1 hora, periodo después del cual se agregó 1ml de la dilución de óvulos y se incubó por 20 minutos, tiempo después del cual se fijó cada tubo con 2ml de formalina.

El recuento se realizó a través de la visualización de la membrana de fertilización alrededor de los huevos. La Figura N° 5 indica los criterios de evaluación adoptados para el recuento. La imagen A muestra los huevos de *Tetrapygus niger* sin fertilizar, y B la aparición de la membrana de fertilización. La imagen C muestra la comparación de ambos

criterios, en donde se distingue con claridad la marcada diferencia entre ambas situaciones utilizada para la obtención de los datos de porcentaje de fertilización.

Otro de los parámetros utilizados fue la cantidad de espermatozoides muertos antes de la adición de los óvulos a cada tubo por efecto del tóxico o agua de prueba. La figura N° 5 F muestra la aglomeración de espermatozoides presentes en la muestra.

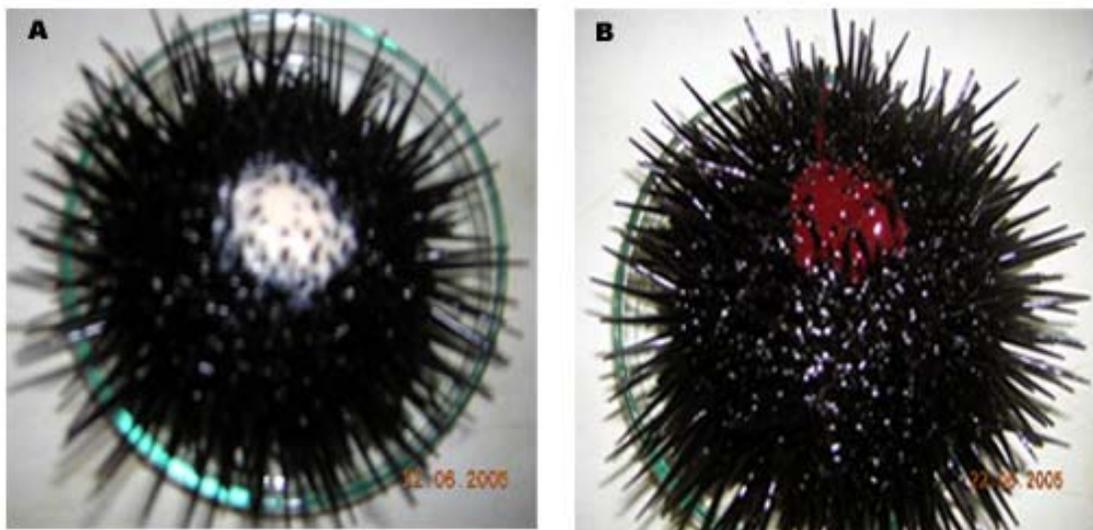
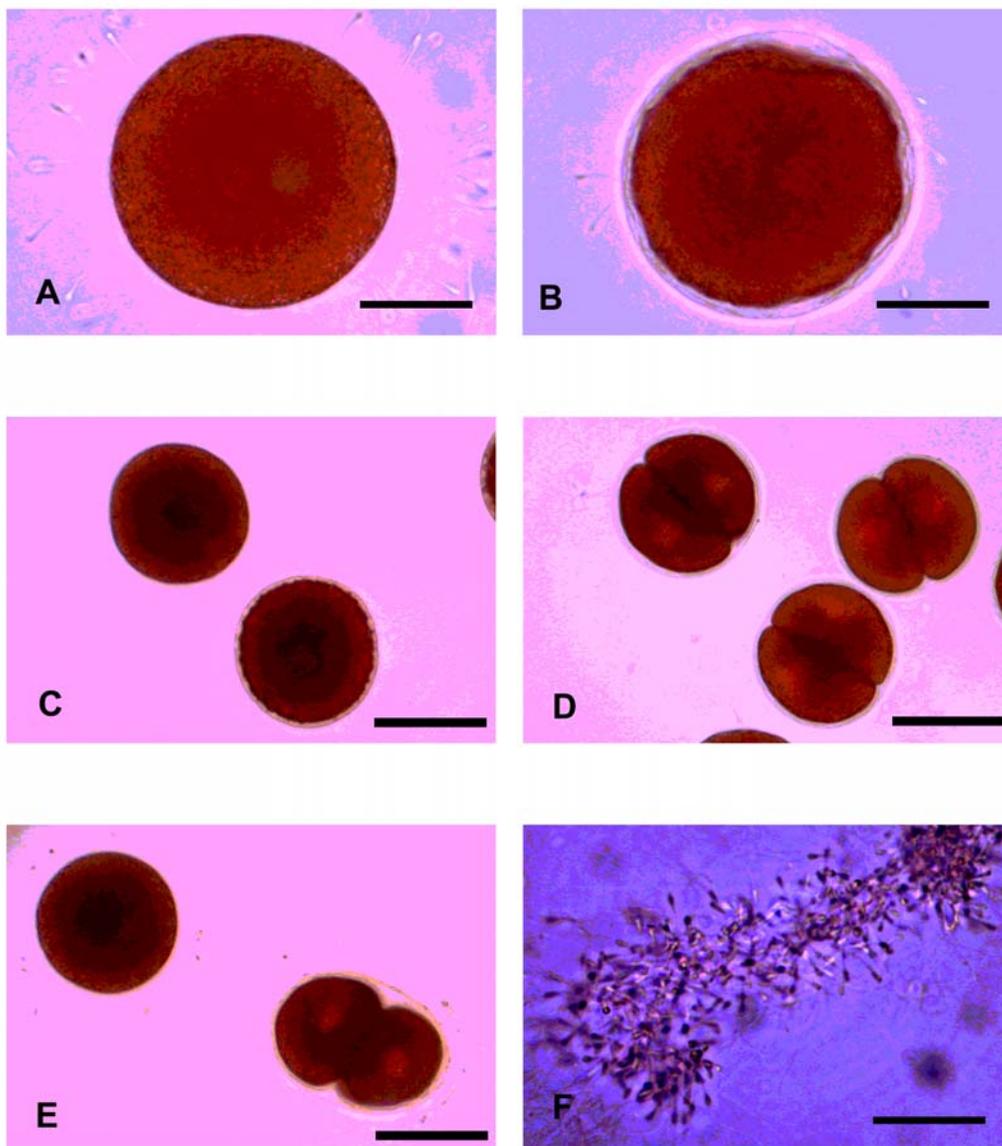


Figura 4: Erizos en proceso de evacuación de los gametos. A: erizo macho, B: erizo hembra.

### 2.2.1 Análisis confirmativo de Fertilización

Se trabajó con dos tubos extras, los cuales se expusieron por alrededor de 2 horas hasta alcanzar el primer estado de segmentación (dos blastómeros), tiempo después del cual fueron fijados con 2 ml de formalina para su posterior recuento. La figura N°5 D muestra la segmentación considerada para la confirmación de fertilización de los huevos. La imagen E en la misma figura, muestra la marcada diferencia entre ambas situaciones.



**Figura 5:** Criterios de evaluación de ecotoxicidad. Fotomicrografías que muestran distintos estados desde la fertilización y espermatozoides aglutinados de *Tetrapygyus niger*, A: Óvulo en contacto con espermatozoides sin fertilizar. B: Huevo fertilizado, se aprecia formación de la membrana de fecundación. C: Óvulo sin fertilizar y huevo fertilizado. D: Estado 1 de segmentación, se aprecian las dos primeras blastómeras. E: Huevo sin fertilizar y embrión al estado 1 de segmentación. F: Espermatozoides aglutinados por efecto del tóxico o agua de prueba.

### 2.3 Bioensayo de Fertilización con tóxicos de referencia

Se realizaron bioensayos de fertilización para determinar los efectos sobre la fertilización de la especie utilizada. Para ello se prepararon las siguientes concentraciones con sal pentahidratada de cobre: 50, 75, 100, 125, 150, 160, 175, 200, 210, 225 ug/l. El procedimiento de diluciones de los gametos y de recuento fue similar al descrito en Standard Methods Committee (Anexo N° 3). Como agua de dilución y control en este proceso fue utilizada agua de mar extraída de la sala de microalgas de la Universidad Católica de Valparaíso la cual estaba filtrada y esterilizada en cámara UV.

## 3. Determinación de la Calidad Ecotoxicológica del agua en la Bahía del Puerto

### 3.1. Metodología de Muestreo

Se tomaron muestras de agua superficial en diferentes sectores de la bahía del puerto de San Antonio señalados en la Figura N° 6. Las coordenadas de los puntos muestreados se describen en la Tabla N° 4. Los puntos de muestreo fueron seleccionados debido a los diferentes grados de contaminación que presentan las aguas, a modo de evaluar las incidencias y los puntos mas conflictivos en cuanto a contaminación a través del bioensayo de fertilización con *Tetrapygnus niger*. Para la selección además se consideraron estudios de similares características tanto en el puerto de San Antonio como otras bahías (Con-con, Valparaíso, San Vicente).

La figura N° 7 muestra las distancias del puerto a las que fueron tomadas las muestras. La imagen 1 detalla el sector trazado como punto 1 en el mapa de muestreo y corresponde a un sector al norte del Puerto. La imagen 2 indica al punto de muestreo 2 del mapa y corresponde a la boca o entrada del Puerto. La imagen 3 muestra el punto demarcado 3 en el mapa y corresponde a la entrada norte del puerto. La imagen 4 corresponde a la zona denominada puertecito o poza chica del puerto. La imagen 5 corresponde al punto marcado 5 en el mapa y se encuentra al interior de la poza de atraque de buques o poza grande. La imagen 6 corresponde a la punta externa del molo sur del puerto marcada con 6 en el mapa. La imagen 7 pertenece al punto 7 de muestreo y se encuentra al exterior del Puerto hacia el sector sur del mismo.

Se realizaron dos muestreos de agua superficial; en el mes de Julio y Octubre de 2005 a bordo de una embarcación de la Gobernación Marítima de San Antonio

perteneciente a la Armada de Chile. Se tomaron 4 L de agua en cada punto para la realización del bioensayo. Dichas muestras fueron trasladadas al laboratorio de Biología de la Reproducción y del Desarrollo de la Universidad de Valparaíso para la realización del experimento.

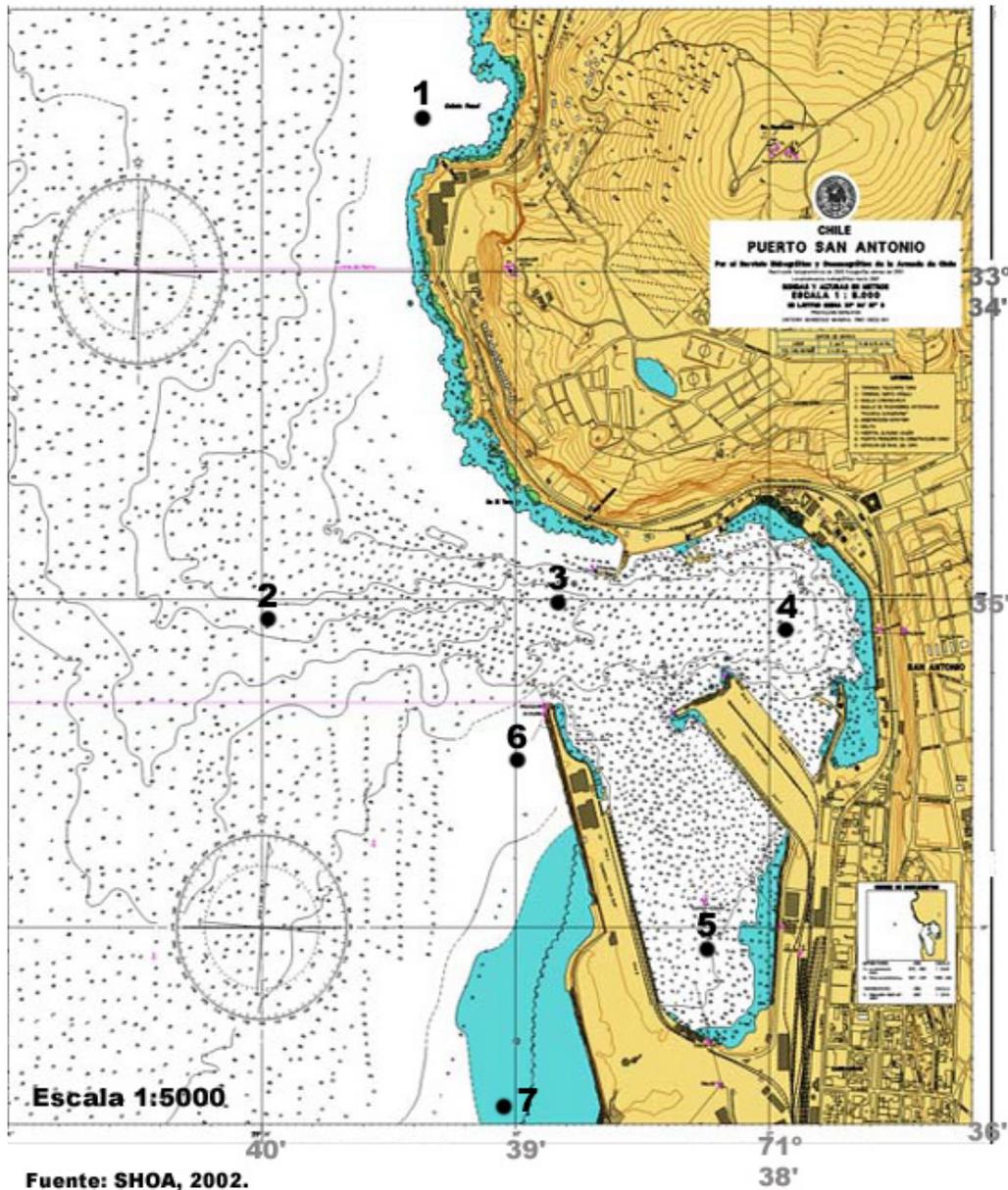


Figura 6: Ubicación puntos de muestreo bahía del Puerto San Antonio



Figura 7: Características y distancia de la costa a la que fueron tomadas las muestras superficiales de agua en cada punto de muestreo.

Tabla 4: Ubicación de las estaciones de muestreo monitoreadas en el Puerto de San Antonio

Estación de Muestreo	Ubicación
1	33° 33' 56.1" S 071° 37' 33.1" W
2	33° 35' 01.8" S 071° 37' 49.4" W
3	33° 34' 56.3" S 071° 37' 23.0" W
4	33° 35' 00.8" S 071° 36' 57" W
5	33° 35' 32.1" S 071° 37' 08.1" W
6	33° 35' 36.3" S 071° 37' 31.3" W
7	33° 35' 36.3" S 071° 37' 40.1" W

### 3.2 Bioensayo de fertilización con *Tetrapygyus niger* con agua del Puerto de San Antonio.

Se realizó según lo descrito por Standard Methods Committee (Anexo N° 3) y punto 2.2. Como agua de control y dilución se utilizó para el primer muestreo al sector caleta San Pedro en la comuna de Cartagena, y para el segundo muestreo agua de la sala de microalgas de la Escuela de Ciencias del Mar de la Universidad Católica de Valparaíso. Los criterios de evaluación fueron los detallados en el punto 2.2 y figura N° 5.

#### 4. Método análisis de resultados

##### 4.1 Método para análisis estadístico de los bioensayos con tóxicos de referencia.

Se estimó el LC50 a través de la interpolación gráfica de los resultados de cada bioensayo, y se calculó el coeficiente de variación.

##### 4.2 Método de análisis estadístico de bioensayo con agua del Puerto de San Antonio.

Se validaron los resultados mediante diferentes métodos estadísticos propuestos por Standard Methods (1998). Se estableció un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05 o 95 % de confianza en todos los análisis.

Se comparó la respuesta de *Tetrapygyus niger* frente a cada tratamiento o punto de muestreo en la bahía del Puerto de San Antonio con un grupo estándar denominado punto control para cada muestreo a través de la prueba de Dunnett, ANOVA, t-Student y Kruskal-Wallis (Montgomery, 2002).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Información de línea de base del Puerto de San Antonio: Calidad ambiental del sector del puerto de San Antonio

#### 1.1 Concentración de HAP en matriz superficial de agua marina.

La Tabla N° 12 (Ver Anexo N°1) presenta la evolución histórica de las fracciones más tóxicas de los hidrocarburos o HAP presentes en la matriz acuosa superficial. De ella se puede desprender un alarmante crecimiento de las concentraciones de estos contaminantes en los últimos años (periodo 2002-2003) para ambos puntos evaluados (sitio 5 al interior de la poza grande y Playa de Llo-lleo cercano a la desembocadura del río Maipo), incrementándose desde 0.01 a 10 ug/l en solamente un año.

#### 1.2 Concentración de metales en aguas marinas en desembocadura río Maipo.

La Tabla N° 5 muestra la situación de calidad del Río Maipo en relación a los metales pesados presentes en la capa superficial de agua marina. En las tablas detalladas en los anexos se muestra la situación para agua y sedimento, en los cuales se evidencia una clara sedimentación de metales.

Para el año 1993, las concentraciones en superficie de metales son las siguientes: cobre varía entre 0.007 y 0.009 mg/l, cadmio presenta un valor de 0.0007 mg/l, plomo 0.01 mg/l y mercurio varía entre 0.00018 y 0.00027 mg/l.

Los datos para el año 2001 indican un aumento de los niveles de metales pesados respecto al año 1993 en la capa superficial de agua. Para el caso de cadmio el valor varía entre <0.01 y 0.08 mg/l superior al año 1993; cobre se encuentra entre 2.0 y 4.3 mg/l también superior al año 1993; plomo entre 0.2 y 0.51 mg/l elevándose respecto al año 1993; zinc entre 1.7 y 9.3 mg/l; mercurio <0.01 mg/l; y arsénico entre 1.1 y 1.5 mg/l. Todos los datos referidos se encuentran sobrepasados al compararse con la concentración máxima para la elaboración de norma secundaria para aguas marinas (ver en detalles anexo 2). Además si se analizan los datos de sedimentos (ver anexos) se evidencian concentraciones muy altas que muestran un proceso de sedimentación de metales.

De esta forma la calidad ambiental en la capa superficial de agua en la desembocadura del río Maipo se encuentra alterada y con problemas de contaminación principalmente por metales, lo cual merece atención tomando en cuenta el proceso de movilización (pluma de dispersión orientada hacia el norte) desde el río hacia el puerto.

Tabla 5: Concentración de metales en distintos puntos de la desembocadura del Río Maipo

Concentración metal							
Año	Estacion	Cu mg/l	Pb mg/l	Cd mg/l	Hg mg/l	Zn mg/l	As mg/l
1993	R1	0,009	0,01	0,007	0,00018	-	-
	R2	0,007	0,01	0,007	0,00014	-	-
2001	E1	2	0,2	0,01	1	3,7	1,5
	E2	4,3	0,51	0,08	1	9,3	1,3
	E3	2,5	0,2	0,06	1	1,5	1,1
Concentración máxima para la elaboración de norma secundaria		0,05	0,05	0,01	0,0005	0,1	0,5

Fuente: CONAMA (2004), Proconsa (2001), Alarcón (1993).

### 1.3 Concentración de metales en aguas marinas en sector del Puerto de San Antonio.

La tabla N° 6 muestra datos de la calidad del agua del sector del puerto en el año 1998. Para arsénico varía entre 0.00375 y 0.00621 mg/l; mercurio varía entre 0.00567 y 0.00600 mg/l; y plomo entre 0.00413 y 0.00620 mg/l. Esta información muestra que no existen problemas de contaminación para el sector. De los datos asociados a la poza de atraque de buques se encuentra cobre en un valor de 0.03 mg/l para el año 2001, valor que estaría sobrepasado si se compara con la concentración máxima para la elaboración de norma secundaria para aguas marinas. Respecto a los datos asociados al sector norte del puerto (sector Panul), muestra que cobre tiene valores entre 0.04 y 0.07 mg/l; y zinc entre 0.04 y 0.07 mg/l. Ambos parámetros se encontrarían igualmente sobrepasados respecto de la propuesta de norma.

La falta de datos de calidad de agua del puerto no permite estimar una variación temporal de los contaminantes, pero se deben destacar dos situaciones respecto a los datos referidos al año 2001. La primera situación corresponde al análisis de las concentraciones de cobre en la poza de atraque de buques, que muestran un problema por la casi nula capacidad dispersiva del sector, que podría aumentar los efectos

relacionados a la presencia de este metal, y además provocaría sedimentación del mismo.

La segunda situación se relaciona con la cantidad de cobre y zinc en el sector Panul; este sector al encontrarse al norte de puerto es la vía de ingreso y salida de la masa de agua hacia la zona costera adyacente al puerto, por lo cual al mezclarse con la proveniente del sur (río Maipo) aumentaría la cantidad de contaminantes movilizados, generando de esta forma impactos en la calidad de la zona costera norte adyacente al puerto.

Tabla 6: Concentración de metales en diferentes puntos del puerto de San Antonio.

<b>Concentración metal</b>							
Año	Estacion	Cu mg/l	Pb mg/l	Cd mg/l	Hg mg/l	Zn mg/l	As mg/l
1993	M1	0,0014	0,01	0,007	0,00027	-	-
	M2	0,003	0,01	0,007	0,00026	-	-
	M3	0,004	0,01	0,007	0,00031	-	-
	M4	0,004	0,01	0,007	0,00036	-	-
	M5	0,003	0,01	0,007	0,00036	-	-
	M6	0,003	0,01	0,007	0,00035	-	-
1998	C1	-	0,00413	-	0,0058	-	0,00372
	C2	-	0,00719	-	0,006	-	0,00621
	C3	-	0,0062	-	0,00567	-	0,00445
2001	Ca1	0,03	0,005	0,005	0,001	0,13	0,001
	Ca2	-	-	0,005	0,001	-	0,001
	Ca3	-	-	0,005	0,001	0,03	0,001
	Ca4	0,07	0,005	0,001	0,001	0,07	0,001
	Ca5	0,06	0,005	0,001	0,001	0,04	0,001
	Ca6	0,04	0,005	0,001	0,001	0,05	0,001
2004	Poza grande	0,01	0,05	0,01	0,001	0,023	0,001
Concentración máxima para la elaboración de norma secundaria		0,05	0,05	0,01	0,0005	0,1	0,05

Fuente: CONAMA (2004), Proconsa (2001), Díaz (1998), Alarcón (1993).

2. Resultados de bioensayo con tóxicos de referencia sobre la fertilización de *Tetrapygnus niger*

Los resultados mostrados en la Tabla 7 y figura N° 8 exponen que existe una respuesta similar en los diversos bioensayos realizados sobre la fertilización de *T. niger*, con un bajo coeficiente de variación de los datos (6.1). Las concentraciones que provocan el 50% de disminución en la fertilización (LC50) se encuentran en el intervalo de 169.9 y 279.85 ug/l de solución de cobre. Sin embargo, al analizar la gráfica de puntos, se presenta un valor atípico en 279.85 ug/l que escapa al estrecho rango que presenta el resto de los datos. Los valores centrales, muestran una tendencia de 203 ug/l de solución de cobre como valor crítico promedio del LC50 para las pruebas realizadas.

Tabla 7: Concentración que provoca una disminución del 50% de fertilización en bioensayos con tóxico de referencia en *Tetrapygnus niger*

N° Bioensayo	LC 50 (ug/l)	Coef de Variación = 6,125010515
1	183,15	
2	202,54	
3	169,9	
4	188,17	
5	175,35	
6	279,85	
7	202,02	
8	223,21	

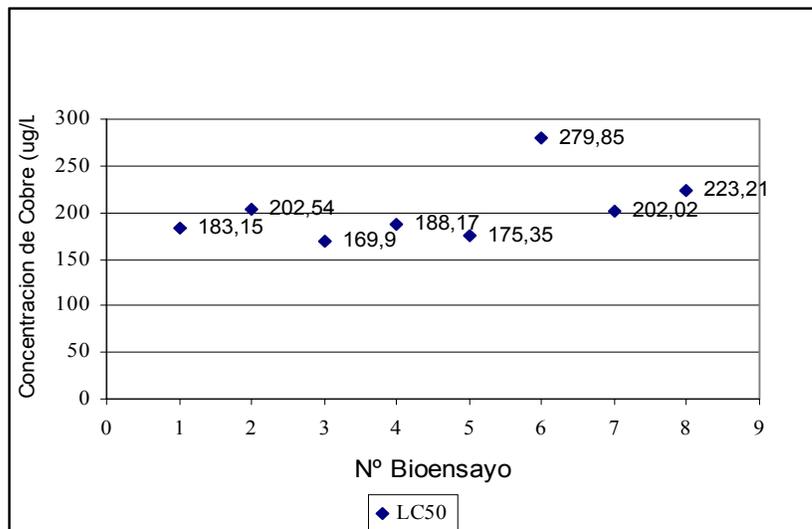


Figura 8: LC50 de *Tetrapygyus niger* en bioensayos de fertilización con tóxico de referencia

La sensibilidad encontrada para *Tetrapygyus niger* en el bioensayo de fertilización con toxico de referencia es similar a lo descrito para otras especies como *Arbacia spatuligera* (LC50 170 ug/l) en estudios de equivalentes características realizados por Zuñiga *et al* (1995); Riveros *et al* (1996) y Gaete *et al* (1996) en otras bahías del país. En relación a especies más sensibles como *Loxechinus albus* (10-20 µg/L) descritos por Zuñiga (1998) al mismo tóxico de referencia, los resultados de *T. niger* difieren significativamente.

### 3. Bioensayo de Fertilización con aguas del Puerto de San Antonio

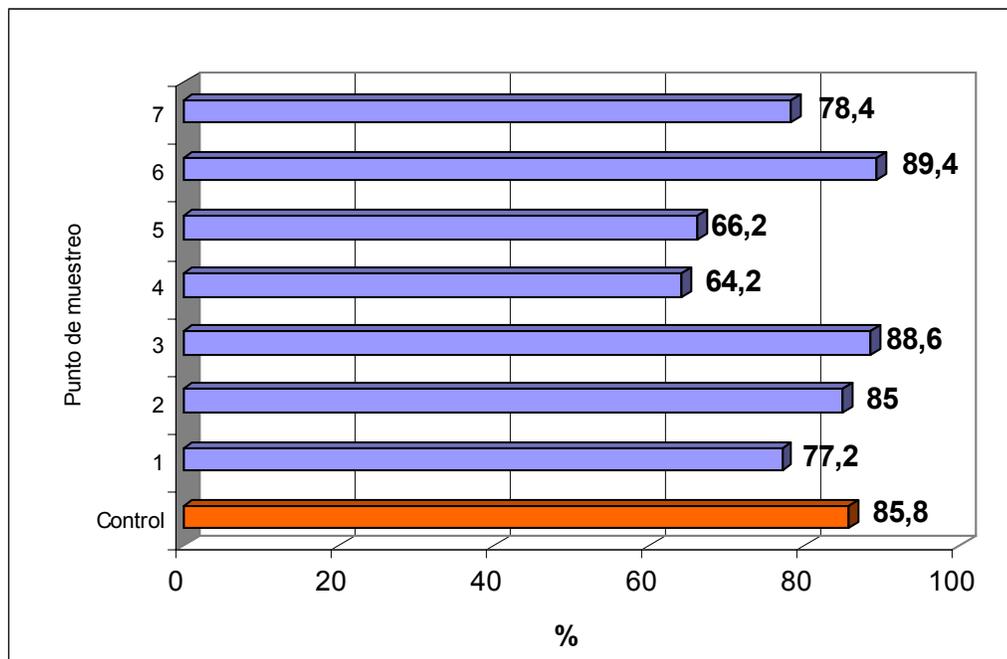
#### 3.1.1 Primer muestreo, Invierno 2005.

Las condiciones del agua de mar el día de muestreo fueron excelentes con ausencia de precipitaciones y viento con dirección NE. La transparencia del mar tuvo un máximo de 7 metros en el punto de muestreo más cercano al río Maipo (punto 7) ya que corresponde a un punto lejano a la costa. La temperatura del agua fue homogénea y normal para la época.

Los resultados se muestran en la Tabla 8 y Figura N° 9. Los mayores porcentajes de fertilización se encuentran en los puntos Control, 3 y 6, que representan respectivamente a la Caleta San Pedro, entrada norte del Puerto (frente a Vopak) y entrada externa al molo sur del Puerto. Los menores porcentajes de fertilización se encuentran en los puntos de muestreo ubicados al interior de las pozas de atraque; el sector denominado Puertecito (donde se encuentran atadas todas las embarcaciones menores); y la poza de atraque de buques que descargan y cargan en el Puerto.

Tabla 8: Condición del agua Puerto de San Antonio y respuesta de *Tetrapygyus niger* al bioensayo de fertilización, Invierno 2005.

Tratamiento	Condiciones de Terreno		Porcentaje de Huevos Fertilizados en bioensayo de fertilización con <i>T. niger</i>
	Disco Secchi (m)	T° (°C)	
Control	-	-	85.8
1	7	12	77.2
2	4.5	12	85
3	3.5	12.5	88.6
4	4.5	12.5	64.2
5	3.5	12	66.2
6	3.5	12	89.4
7	3	12	78.4



**Figura 9: Porcentaje de huevos fertilizados de *Tetrapygyus niger* en bioensayo de fertilización con agua del puerto de San Antonio, invierno 2005.**

### 3.1.2 Análisis estadístico de los resultados.

El conjunto de análisis estadístico de los resultados se muestra en la Tabla N° 9. En ellos no se aprecian diferencias significativas para ninguna de las comparaciones entre el Control y los puntos de muestreo, pero existen algunas situaciones que deben ser consideradas:

1. El Control del muestreo no presenta una respuesta satisfactoria a pesar de encontrarse ubicado a 7 Km del área del puerto. Además, presenta una varianza de 66.7 (test ANOVA) al interior del tratamiento; muy amplia para ser utilizada como punto Control. Esta varianza influye directamente en todos los análisis estadísticos afectando al estadístico de prueba y por tanto el resultado de la misma.
2. Existe una amplia varianza al interior de la mayoría de los tratamientos considerados con excepción de los puntos 3 y 6.
3. La varianza al interior del tratamiento 5 es muy amplia (1748.7 con ANOVA) lo cual influye en que no se manifiesten diferencias significativas en los test a pesar de los bajos porcentajes de fertilización del total respuesta de *T. niger* al bioensayo.

4. El punto 4 posee los valores más cercanos a la diferencia crítica de todos los análisis estadísticos a pesar de la alta varianza al interior del tratamiento (595.2) lo cual se debe a que presenta los menores porcentajes de fertilización de todos los puntos monitoreados. Similar situación sucede con el punto 1.
5. En el análisis de Dunnett, los puntos 4 y 5 poseen los valores más altos de la prueba (22 y 20 respectivamente) a pesar de no manifestar diferencias significativas. Ello muestra que las menores tasas de fertilización se ven reflejadas cuando se consideran los promedios para cada tratamiento y no las variaciones al interior de los tratamientos como sucede en el caso de los test ANOVA y t- Student.
6. El test no paramétrico de Kruskal-Wallis no presenta mejores resultados que el resto de los análisis estadísticos. Ello demuestra, que la inexistencia de diferencias significativas no se debe a la falta de cumplimiento de las premisas para dichas pruebas, por lo cual se verifica que aunque las tasas de fertilización son bajas, la alta varianza al interior de los tratamientos afecta directamente la respuesta del estadístico de prueba.



### 3.2.1 Segundo muestreo, Primavera 2005.

Las condiciones del agua de mar el día de muestreo presentaron escasa penetración de la luz en todos los puntos, llegando a un mínimo de 1 metro en el punto 7 (sector más cercano al río Maipo). La temperatura se presentó homogénea y normal para la época de muestreo. Las muestras extraídas para el bioensayo en los puntos 6 y 7 presentaron gran cantidad de sedimentos.

Los resultados se muestran en la Tabla y Figura N° 10. El Control de la prueba muestra excelentes resultados con casi un 99% de fertilización de los huevos de *Tetrapygyus niger*. Los sectores con menor porcentaje de fertilización se encuentran en los puntos de muestreo 2, 4 y 7, siendo 7 el que muestra un menor porcentaje de todos los puntos muestreados.

Tabla 10: Condición del agua Puerto de San Antonio y respuesta de *Tetrapygyus niger* al bioensayo de fertilización, Primavera 2005.

Tratamiento	Condiciones de Terreno		Porcentaje de Huevos Fertilizados en bioensayo de fertilización con <i>T. niger</i>
	Disco Secchi (m)	T° (°C)	
Control	-	-	98,98
1	2.5	11.5	93
2	1.5	12	88,2
3	2	11.5	89,47
4	2.5	12	83,7
5	3	12	93,04
6	1.5	12	92,2
7	1	12	74,9

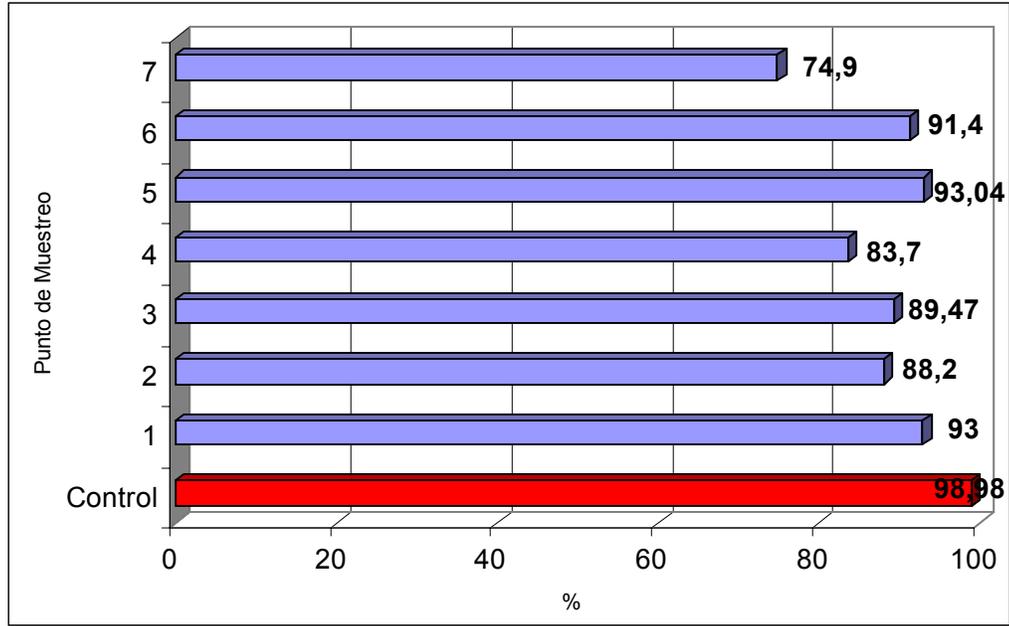


Figura 10: **Porcentaje de huevos fertilizados de *Tetrapygyus niger* en bioensayo de fertilización con agua del puerto de San Antonio, Primavera 2005.**

### 3.2.2 Análisis estadístico de los resultados.

El conjunto de los análisis estadísticos se muestra en la Tabla N°11. El Control muestra una escasa varianza (0.402 con ANOVA) por lo que presenta condiciones ideales para su utilización en el bioensayo. El análisis de Dunnett refleja diferencias significativas para los puntos 4 y 7, los cuales son los puntos con menor porcentaje de fertilización del bioensayo. Los test ANOVA y t-Student presentan resultados proporcionales ya que son matemáticamente equivalentes, dando resultados de significancia para todos los puntos a excepción del sector de muestreo N°2. El análisis de Kruskall-Wallis también presenta resultados similares a los test anteriores, a excepción del punto 1 que no se muestra significativo.

Para el caso de ANOVA y t-Student, el punto de muestreo N°2 no se muestra significativo. Ello se debe a que la variación dentro del tratamiento es muy alta (221.2), situación que no es equivalente a lo mostrado por los test de Dunnet en donde posee el valor de 11 que aunque no es significativo, está muy cerca del valor crítico para la prueba. En la prueba de Kruskall- Wallis en que al trabajar con intervalos de datos dado que las varianzas no son homogéneas, el punto se manifiesta significativo. Sin embargo, este test tampoco genera las condiciones ideales para el análisis de los datos.

Para la serie de datos analizada, el test que mejor se ajusta a los porcentajes totales de fertilización obtenido por tratamiento es el test de Dunnett. El test muestra diferencias significativas a los menores porcentajes de fertilización obtenidos en los puntos 4 y 7 con 83.7% (disminución de 16%) y 74.9% (disminución de 25%) respectivamente, y no solo a los que difieren en un leve porcentaje como los otros test (ANOVA y t-Student) que están influenciados directamente por las varianzas entre el Control y el punto en comparación, por lo cual no se muestra la significancia en la magnitud que debería.



### 3.3 Análisis conjunto de monitoreos del puerto de San Antonio

Los bioensayos de fertilización con *T. niger* para probar la toxicidad del agua del puerto de San Antonio, muestra similitudes en las respuestas obtenidas para ambos muestreos en algunos puntos de monitoreo. La Figura N° 11, muestra la gráfica conjunta para ambos muestreos. Se observan similares porcentajes de fertilización para los puntos de monitoreo N° 2, 3, 6 y 7. No obstante, el análisis estadístico de los datos no corrobora dicha relación ya que los índices de significancia no se corresponden, debido a que las condiciones ambientales para ambos muestreos son diferentes, tanto en la época del año que representan como las variables que influyen el comportamiento de la masa de agua del sector en estudio.

Las épocas de muestreo muestran además diferencias en el grado de influencia que posee el río Maipo hacia cada uno de los sectores. Para el primer monitoreo, existe alta transparencia del agua (Disco Secchi en Tabla N°8) en todos los puntos, porque corresponde a la época invernal en que el caudal del río se ve aumentado por las lluvias que aumentan su capacidad de dispersión de contaminantes presentes en la desembocadura. Para el segundo monitoreo, la diferencia en la transparencia es evidente (Disco Secchi en Tabla N°10) respecto al primer monitoreo, y se manifiesta en la presencia de sedimentos en las muestras de agua extraídas para el análisis. Ello se debe principalmente a que Primavera corresponde al inicio de la época de deshielo de la cuenca del Maipo que en consecuencia aumenta la cantidad de sedimento presente en todo el sector de estudio y por tanto la turbidez del agua.

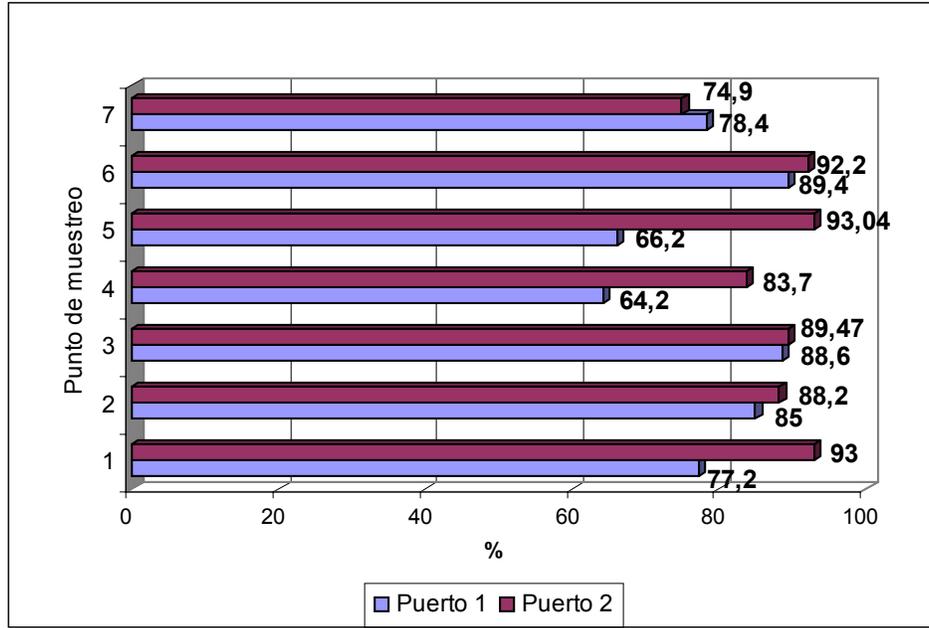


Figura 11: Respuesta conjunta de porcentaje de huevos fertilizados en bioensayo de fertilización con agua del puerto de San Antonio sobre *Tetrygus niger*, Invierno y Primavera 2005.

El punto Control para el primer monitoreo fue el sector de Caleta San Pedro ubicado a 7 Km del área de estudio. Dicha caleta corresponde a un área de manejo experimental y de acuerdo a los porcentajes de fertilización obtenidos (85.8%) presentaría condiciones que no se corresponden a un punto control ya que los porcentajes de fertilización son relativamente bajos, situación que provocó el cambio del control por un punto control más adecuado en el segundo monitoreo. Además, la varianza del Control (66.7) podría estar afectando directamente los grados de significancia del estadístico de prueba para la el test más adecuado definido por el análisis de Dunnett. Existen diversas razones para que este punto no pueda ser considerados como Control, entre ellas: al estar ubicado al norte del puerto, y por el régimen de dispersión de los contaminantes a nivel costero, podría estar influenciado por aguas que provienen del puerto y del río (a pesar que la caleta se encuentra un tanto protegida por la geografía costera). Esta situación crea un problema por el uso actual del sector, ya que los bajos porcentajes de fertilización y el propósito como área de manejo, reflejan una incompatibilidad de actividades.

Existe una clara relación entre la calidad de agua y la de fertilización sobre *T. niger*, lo que se confirma a través de los porcentajes de fertilización encontrados con agua control de buenas condiciones, y que muestran un 98.8% de éxito cuando la calidad es la adecuada (punto Control segundo monitoreo), situación que no se refleja en el punto Control correspondiente a la Caleta San Pedro en el primer monitoreo. Si además integramos los resultados de las pruebas de toxicidad sobre *T. niger* realizadas en este estudio y de otras especies de erizos como *Loxechinus albus*, se muestra una situación desfavorable para el área de manejo, pues la calidad del agua en la caleta no proporciona resultados similares a los descritos para *T. niger* en el control del segundo monitoreo, y menos deberían reflejar resultados favorables para especies más exigentes en calidad de agua como *L. albus* que actualmente se cultiva sin éxito en la caleta.

La evaluación en base a criterios ecotoxicológicos ha demostrado poseer la sensibilidad adecuada para medir los impactos asociados a la pérdida de calidad de agua por la actividad portuaria. Para el caso de San Antonio, existen diversos factores que alteran actualmente dicha calidad y no necesariamente están ligados a las operaciones del sector, sino también a factores asociados a la geografía del lugar (aporte del río Maipo) y las corrientes presentes que movilizan el material contaminante desde el río hacia el norte, y desde el interior del puerto hacia el norte; creando de esta forma un proceso de mezcla de ambas masas de agua que generan impactos en la zona costera desde la desembocadura del Maipo hasta sectores medianamente alejados como el punto Control del primer monitoreo.

Con la evaluación de distintos puntos distribuidos al interior y exterior del puerto, se observó una variación espacial de la calidad del agua superficial influenciada por las condiciones de cada uno de los puntos monitoreados, siendo el sector con peor calidad la poza de atraque (para el primer muestreo) y el sector del río Maipo (para el segundo muestreo). En el sector de la poza, los análisis estadísticos para el primer monitoreo no muestran resultados significativos principalmente por la alta varianza del punto control y los sectores de muestreo, sin embargo, poseen en la prueba de Dunnett los valores más cercanos al estadístico de prueba por lo cual los bajos porcentajes se ven reflejados en alguna medida. Para el segundo monitoreo, el sector de la poza chica o puertecito presenta bajos porcentajes de fertilización mostrándose significativo en el análisis estadístico de Dunnett. Las razones para dicha respuesta pueden estar definidas por la falta de oxigenación y escasa capacidad de dispersión de contaminantes que ingresan a

la columna de agua desde las embarcaciones, situación ya conocida y regular en la mayoría de los puertos del país.

Para sector de la desembocadura del río Maipo, los porcentajes de fertilización siguen una tendencia similar en los dos monitoreos (78.4 y 74.9% respectivamente), mostrándose significativo solamente en el segundo muestreo (24 en la prueba de Dunnett) siendo el punto con menor fertilización en dicho monitoreo. Existen indiscutibles razones para los bajos porcentajes de fertilización en este punto, ya que aunque el punto se encuentra alejado de la costa y existe alta capacidad de dispersión por el movimiento del oleaje, las mediciones con el disco Secchi en ambos monitoreos poseen la menor penetración de luz (3 y 1 metros, respectivamente) lo que muestra una cantidad importante de sedimento en suspensión y por tanto de contaminantes que provienen de la cuenca del Maipo.

En relación a los estudios de toxicidad con sales de cobre, la especie *Tetrapyrgus niger* presenta un bajo coeficiente de variación (6.1) por lo cual podría dicha especie podría ser utilizada en otros estudios de similares características. Además, si se relacionan las concentraciones del metal de prueba descritos para la línea de base en el puerto, podría provocar efectos sobre la fertilización de *T. niger* ya que se encuentran en algunos puntos por sobre el intervalo 169.9- 279.85 ug/l que se estimó para la disminución del 50% de fertilización de la especie en los distintos bioensayos y también del promedio de 203 ug/l. Es así como este y otros parámetros deben ser estudiados en mayor profundidad para determinar su grado de influencia en la calidad del del agua.

La zona del puerto de San Antonio tiene actualmente un plan de expansión que incluye dragado y ampliación de la infraestructura portuaria con el consiguiente aumento de naves que recalán en el puerto y de los impactos descritos para esta actividad. Para dicha expansión se han comenzado a realizar los estudios de impacto ambiental respectivos que incluyen solo la evaluación de los niveles de tóxicos regulados y no una relación causa-efecto entre los contaminantes presentes en la columna de agua y la respuesta de la biota asociada al sector del puerto. La presente investigación demostró que en especies medianamente sensibles como *T. niger* se manifiestan claros efectos en base a criterios ecotoxicológicos de fertilización, de modo que la actual calidad provee importante información para el establecimiento de programas de vigilancia ambiental que monitoreen la evolución de dicha característica a medida que se desarrollan las obras de

ampliación, ya que los sectores que presentaron la peor calidad de agua no necesariamente tenían los peores índices de material contaminante sobrepasado, única situación actualmente considerada para evaluar los impactos de una actividad.

Este estudio se convierte en una aproximación que evalúa los efectos descritos para un nivel trófico y válida la información obtenida sobre la especie utilizada al compararla con respuestas similares de otras especies. Sin embargo, para un programa de vigilancia ambiental, se deben incluir estudios que consideren varios niveles como los realizados por Riveros *et al* (1996), Gaete *et al* (1996) y Zúñiga (1998), de forma que se vean reflejadas las respuestas generales que podría tener el sistema biológico del puerto de San Antonio. Además, se deben incluir otros compartimientos ambientales como sedimento y profundidades medias para evaluar la toxicidad en el medio ambiente marino costero.

## CONCLUSIONES

La técnica de bioensayo de fertilización con *Tetrapygnus niger* muestra resultados sólidos y replicables frente a tóxicos de referencia, por lo cual puede ser utilizada con éxito en la evaluación de criterios toxicológicos en el laboratorio.

La calidad de agua del puerto de San Antonio presenta una moderada concentraciones de contaminantes, cuya presencia está determinada por la influencia del río Maipo a través del aporte de metales pesados, siendo esta la condición determinante para la realización de actividades complementarias en el borde costero.

Las aguas superficiales del puerto de San Antonio tienen características tóxicas sobre la fertilización de *T. niger*, siendo el sector del río Maipo y la poza de atraque de buques los sectores que presentan las mayores diferencias significativas en los bioensayos.

Finalmente, la evaluación ecotoxicológica de las aguas superficiales del puerto de San Antonio, indica que existe una variación espacial de las características tóxicas del cuerpo de agua, derivada de factores que influyen la dinámica costera y a la presencia de contaminantes en la columna de agua, siendo la técnica de bioensayo de fertilización con *T. niger* una forma innovadora de evaluar la toxicidad de aguas marinas superficiales.

### BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Ahumada R. 1995. Bahías: áreas de uso múltiple, un enfoque holístico del problema de la contaminación. Ciencia y Tecnología del mar, CONA (Nº especial): 59-68.
- Alarcón J. 1993. Proyecto: Determinación de los niveles de contaminantes en el Río Maipo y frente a la costa de San Antonio, estudio de aguas y sedimento, Informe final. Servicio de Salud Valparaíso San Antonio: 1-56.
- Alcázar F. López L. Ramorino L. 1986. Manchas de aceite y otros contaminantes e hidrocarburos disueltos en agua de mar. Programa de Investigación, vigilancia y control de la Contaminación Marina por Hidrocarburos de petróleo en el Pacífico Sudeste y su efecto en las comunidades y ecosistema marino. CONPACSE Fase I Informe de Avance Nº 3. Instituto de Oceanología. Universidad de Valparaíso. Chile. 80-82.
- Andrade H., Gutiérrez S. 1980. Estudio Ecológico sobre comunidades macroinfaunales del sector norte de la bahía de Valparaíso como línea de base ante posibles efectos de impacto ambiental. Programa de Investigación, vigilancia y control de la Contaminación Marina por Hidrocarburos de petróleo en el Pacífico Sudeste y su efecto en las comunidades y ecosistema marino. CONPACSE Fase I Informe de Avance Nº 3. Instituto de Oceanología. Universidad de Valparaíso. Chile. 157-159.
- Armada de Chile. 1994. Manual sobre la Contaminación ocasionada por Hidrocarburos. Dirección General del Territorio Marítimo y de Marina Mercante. 2ª Edición. Volumen IV.
- Barnes R. 1985. Zoología de Invertebrados. Editorial Interamericana, México. Capítulo 19.
- Bodor P. 1988. Estudio de Contaminación de las aguas costeras del litoral de la Provincia de San Antonio. Ministerio de Salud SSVSA.
- Bore D., Pizarro F., Cabrera N. 1986. Diagnóstico de la Contaminación Marina en Chile. CORFO e IFOP. Volumen I: 8-9
- Cairns J. 1990. Aquatic toxicology. Environmental Science and Technology. Vol 24. (Nº2): 154-160.

- Calow P., Forbes V. 2003. Does Ecotoxicology Inform Ecological Risk assessment?. Environmental Science and Technology. (Nº2): 146A-151A.
- Camaño A, Silva E. 1993. La gestión de minera escondida limitada en el sector de Coloso. En: Gestión de la zona costera y oceánica de la región del Bío Bío. Universidad de Concepción: 107-125.
- Carballeira A. 2003. Consideraciones para el diseño de un programa de monitorización de los efectos biológicos del vertido del Prestige, Grupo de Investigación en Ecotoxicología, Universidad de Santiago de Compostela, España: 2-3, 5, 10-11, 13-14.
- Cesar A., Marín-Guirao L., Vita R., Marín A. 2002. Sensibilidad de anfípodos y erizos del Mar Mediterráneo a sustancias tóxicas de referencia, Ciencias Marinas, 28(4): 407-417.
- Comisión Nacional del Medio Ambiente. 2000. Guía para el Control y Prevención de la Contaminación Industrial: Actividad Portuaria, CONAMA: 5-18.
- Comisión Nacional del Medio Ambiente. 2004. Instructivo presidencial para el establecimiento de las normas secundarias de calidad ambiental para aguas continentales superficiales y marinas. CONAMA: 5-19.
- Coronel M. 2003. Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (PAHs). [www.monografias.com](http://www.monografias.com). (Mayo 2004).
- DIRECTEMAR, 2004, [www.directemar.cl](http://www.directemar.cl) (Mayo 2004)
- Empresa Portuaria de San Antonio. 2004. Puerto de San Antonio, [www.saiport.cl](http://www.saiport.cl), (Mayo 2004).
- Escobar J. 2002. La contaminación de los ríos y sus efectos en las áreas costeras y el mar. División de recursos naturales e infraestructura, CEPAL: 5-34.
- Gaete H., Silva J., Riveros A., Soto E., Troncoso L., Bay-Schmith E., Larraín A. 1996. Efecto combinado y riesgo ecológico de las concentraciones de Zn, Cu y Cr presentes en el Puerto de San Vicente, Chile. Gayana Oceanol. 4(2): 99-107.
- GESAMP. 1976. Principles for developing coastal water quality criteria. Gesamp (5). Rome.
- Gilbert S., 2005. Biología del desarrollo. 7º edición, editorial médica panamericana: 199- 251.
- Instituto Nacional de Normalización (INN). 1996. Norma Chilena N° 411.
- Kennish M. 1997. Estuarine and marine pollution. Marine Science series. United States of America: 253

- Larraín A. 1975. Los equinoideos regulares fósiles y recientes de Chile. Gayana N°35. Ediciones de la Universidad de Concepción: 69-76.
- Larraín A. 1995. Criterios Ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: Importancia de los bioensayos de toxicidad. Ciencia y Tecnología del mar, CONA (N° especial):39-47.
- Leighton G.1980. Estudio de la Dinámica de las comunidades intermareales de Montemar como base para medición de impactos por hidrocarburos. Programa de Investigación, vigilancia y control de la Contaminación Marina por Hidrocarburos de petróleo en el Pacífico Sudeste y su efecto en las comunidades y ecosistema marino. CONPACSE Fase I Informe de Avance N° 3. Instituto de Oceanología. Universidad de Valparaíso. Chile: 96-98.
- Leighton G.1986. Evaluación experimental del efecto de la contaminación de petróleo sobre las comunidades marinas en áreas seleccionadas del litoral rocoso intermareal y supramareal. Programa de Investigación, vigilancia y control de la Contaminación Marina por Hidrocarburos de petróleo en el Pacífico Sudeste y su efecto en las comunidades y ecosistema marino. CONPACSE Fase I Informe de Avance N° 2. Instituto de Oceanología. Universidad de Valparaíso. Chile: 67-72.
- Medina M., Encina-Montoya F.2003. Incorporación de la Evaluación de Riesgo Ecológico en el Sistema de Evaluación de Impacto Ambiental para ecosistemas acuáticos en Chile, Ediciones de la Universidad Católica de Chile, vol XIX, N° 3 y 4:19-27.
- Montgomery D.2002. Diseño y análisis de experimentos .Segunda edición. Editorial Limusa Willey, México: 104 paginas
- Proconsa Ambiental.2001. Estudio de Impacto Ambiental proyecto Ampliación sitios Molo sur Puerto de San Antonio para San Antonio Terminal Internacional S.A. CONAMA V región.
- Riveros A., Troncoso L., Silva J., Soto E., Cifuentes A., Gaete H., Bay- Schmith E., Larraín A. 1996. Calidad ecotoxicológica de aguas receptoras de efluentes de industrias pesqueras. Un análisis sinóptico sobre varias especies, con aguas de Coronel, San Vicente y Rocuant (Región del Bío-Bío, Chile). Gayana Oceanol. 4(2): 77-91.
- Riveros A., Zuñiga M., Larraín A., Becerra J.1996. Relationships between fertilization of the Southeastern Pacific sea urchin *Arbacia spatuligera* and

environmental variables in polluted coastal waters. *Marine Ecology Progress Series*. Vol 134:159-169.

- Seoanez M. 2000. Manual de contaminación marina y restauración del litoral. Editorial Mundi-prensa. Capítulo 7.
- Servicio Hidrográfico y Oceanográfico de la Armada. 1991. Niveles Base de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos dispersos/disueltos en agua de mar superficial en el area de San Antonio. Estudios y proyectos; 4-9.
- Standard methods for the examination of water and wastewater. 1998. 20° edición.
- Zuñiga M. 1998. Ecotoxicología de metales en el ambiente acuático: Una revisión actualizada. En: D Arcos, (Ed), Minería del cobre, ecología y ambiente costero, Editorial Anibal Pinto S.A. Chile: 349-376.
- Zúñiga M., Roa R., Larraín A. 1995. Sperm cell bioassays with the sea Urchin *Arbacia spatuligera* from two polluted chilean coastal sites. *Marine Pollution Bulletin*. Vol 30 (N° 5): 313-319.

ANEXOS

Anexo N°1: Datos línea de base San Antonio

Tabla N° 12: Análisis de Calidad de Agua Programa de Observación del Ambiente Litoral, Armada de Chile. Situación Histórica 1997-2003 de Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos en el Puerto de San Antonio

Año	Estación	UTM_Este	UTM_Norte	Topónimo	HAP_ppb
1997	A3	256943,00	6280955,00	Sitio 5	0,350
1997	A3	256943,00	6280955,00	Sitio 5	0,174
1998	A3	256943,00	6280955,00	Sitio 5	0,160
1998	A3	256943,00	6280955,00	Sitio 5	0,013
1999	A3	256943,00	6280955,00	Sitio 5	0,026
1999	A3	256943,00	6280955,00	Sitio 5	0,043
2000	A3	256917,00	6280564,00	Sitio 5	0,100
2000	A3	6280851,9	257063,64	Sitio 5	0,100
2001	A3	256833	6280533	Sitio 5	0,08
2001	A3	256921	6280800	Sitio 5	0,0003
2002	A3	256921	6280800	Sitio 5	0,01
2002	A3	33°35'00"	71°37'08"	Sitio 5	10
2003	A3	33°35'00"	71°37'08"	Sitio 5	10
2003	A3	33°35'00"	71°37'08"	Sitio 5	10
1997	A5	256094,00	6279854,00	Playa Llolleo	1,370
1997	A5	256094,00	6279854,00	Playa Llolleo	0,171
1998	A5	256094,00	6279854,00	Playa Llolleo	0,202
1998	A5	256094,00	6279854,00	Playa Llolleo	0,015
1999	A5	256094,00	6279854,00	Playa Llolleo	0,041
1999	A5	256094,00	6279854,00	Playa Llolleo	0,036
2000	A5	255522,00	6278586,00	Playa Llolleo	0,100
2000	A5	6278843,38	255669,67	Playa Llolleo	0,100
2001	A5	256096	6279762	Playa Llolleo	0,076
2001	A5	256041	6279884	Playa Llolleo	0,02
2002	A5	256041	6279884	Playa Llolleo	0,01
2002	A5	33°35'35"	71°37'42"	Playa Llolleo	10
2003	A5	33°35'35"	71°37'42"	Playa Llolleo	10
2003	A5	33°35'35"	71°37'42"	Playa Llolleo	10

Fuente: DIRECTEMAR, 2004










Anexo N°2: Matrices asociadas a la legislación aplicable a los puertos

Tabla N°18: Valores máximos de concentración a considerar para la elaboración de las normas secundarias de calidad ambiental para las aguas marinas y estuarinas.

				clases de calidad		
GRUPO DE COMPUESTOS O ELEMENTOS	Unidad	Expresión		CLASE 1	CLASE 2	CLASE 3
<b>FISICOS Y QUIMICOS</b>						
1	Oxigeno disuelto	% sat	OD	> 90	70- 89	40 – 69
2	Temperatura <sup>1</sup>	°C	T°	D2	D3	D5
3	pH	Unidad	pH	7,5 – 8,5	6,5 – 9,5	6,0 – 9,5
4	Sólidos suspendidos	mg/l	SS	< 25	25 –80	80-400
5	Aceites y Grasas emulsificadas	mg/l	A y G	5	5	10
6	Hidrocarburos totales	mg/l	HCT	< 0,02	0,02 – 0,05	0,05 – 1
7	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	mg/l	HAP	< 0,0002	< 0,0002	0,0002-0,001
8	Detergentes	mg/l	SAAM	< 0,2	0,2 – 1	1- 10
<b>TÓXICOS NO ACUMULATIVOS</b>						
9	Amonio	µmol/L	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	< 5	5 – 10	10 – 15
10	Cianuro	mg/l	CN <sup>-</sup>	< 0,005	0,005-0,01	0,005 – 0,01
11	Cloro libre residual	mg/l		< 0,002	0,002- 0,01	0,01- 0,1
12	Fenoles	mg/l	Fenoles	< 0,001	0,001 - 0,01	0,01 – 1
13	Fluoruro <sup>2</sup>	mg/l	F <sup>-</sup>	< 0,0369×S	0,0369×S – 0,0443×S	0,0443×S – 2,3
14	Sulfuro	mg/l	S <sup>2-</sup>	< 0,002	0,002- 0,005	0,005- 0,01
<b>TÓXICOS ACUMULATIVOS Y PERSISTENTES</b>						
15	Bifenilos policlorados	µg/L	PCB's	<0,001	0,001	0,001
<b>PLAGUICIDAS</b>						
16	Aldrin	µg/L	Aldrin	< 0,01	< 0,01	< 0,01
17	Clordano	µg/L	Clordano	< 0,006	< 0,006	< 0,006
18	Malatión	µg/L	Malatión	< 0,01	< 0,01	< 0,01
19	Pentaclorofenol	µg/L	PCP	< 0,5	< 0,5	< 0,5
20	DDT	µg/L	DDT	< 0,001	< 0,001	< 0,001
21	Demetón	µg/L	Demetón	< 0,1	< 0,1	< 0,1
22	Dieldrin	µg/L	Dieldrin	< 0,002	< 0,002	< 0,002
23	Heptaclor	µg/L	Heptaclor	< 0,01	< 0,01	< 0,01
24	Lindano	µg/L	Lindano	< 0,003	< 0,003	< 0,003
25	Paratión	µg/L	Paratión	< 0,04	< 0,04	< 0,04
<b>METALES ESENCIALES (disueltos)</b>						
26	Cobre	µg/L	Cu	< 10	10- 50	50
27	Cromo total	µg/L	Cr total	< 10	10 – 50	50 – 100
28	Níquel	µg/L	Ni	< 2	2- 100	100
29	Selenio	µg/L	Se	< 5	5 – 10	10
30	Zinc	µg/L	Zn	< 30	30 – 100	100

Determinación de Calidad Ecotoxicológica de Aguas Marinas Superficiales  
en la Bahía del Puerto de San Antonio

METALES NO ESENCIALES (disueltos)						
31	Aluminio	µg/L	Al	< 200	200 – 1.500	1.500
32	Arsénico	µg/L	As	< 10	10 – 50	50
33	Cadmio	µg/L	Cd	< 5	5 –10	10
34	Cromo VI	µg/L	Cr VI	< 10	50	50
35	Estaño	µg/L	Sn	< 20	20 – 100	100
36	Mercurio	µg/L	Hg	< 0,2	0,2 – 0,5	0,5
37	Plomo	µg/L	Pb	< 3	3 – 50	50
MICROBIOLÓGICOS						
38	Coliformes fecales	NMP/ 100 ml	Coli.fec./ 100 ml	< 2	< 43	< 1.000
39	Coliformes totales	NMP/ 100 ml	Coli.tot./ 100 ml	< 70	70 – 1.000	< 1.000

Fuente: Comisión Nacional del medio Ambiente, 2004.

**Notas:**

1: La variación de temperatura respecto del rango natural presente en el área de medición no debe exceder los valores que se señalan a continuación:

D2: La variación no debe ser mayor a 2° C (temperatura promedio mensual  $\pm$  2° C)

D3: La variación no debe ser mayor a 3° C (temperatura promedio mensual  $\pm$  3° C)

D5: La variación no debe ser mayor a 5° C (temperatura promedio mensual  $\pm$  5° C)

2: El valor se establece en función de la salinidad del agua, medido como PSU°

### ANEXO N°3: Procedimiento bioensayos de fertilización con *Tetrapygyus niger* (Modificado de Standard Methods Committee, 1998 para *Arbacia spatuligera*)

#### Diseño Experimental

La selección de los tratamientos del bioensayo (concentración del compuesto o diluciones del efluente o cuerpo receptor) se basa en los objetivos del estudio. En general, para determinar la toxicidad de un compuesto específico, primero se realiza un test preliminar para establecer el rango de acción del compuesto, utilizando un factor de dilución de 0,1 para preparar las concentraciones (por ejemplo: 0,01; 0,1; 1; 10 y 100 ppm). Luego se realiza el test definitivo abarcando el rango de acción del compuesto, utilizando un factor de dilución mayor (por ejemplo 0,4; 0,5 o 0,6).

Debe incluir un tratamiento control, con agua de mar de buena calidad y además un tóxico de referencia, para controlar la sensibilidad de los organismos ( $K_2Cr_2O_7$  o  $CuSO_4$ ).

#### Preparación de las soluciones

En éste bioensayo se realizan cuatro réplicas por tratamiento, cada una consiste en un tubo de ensayo que contiene 5 ml del agua de prueba, que se mantiene a  $13 \pm 2$  °C hasta la adición de los espermatozoides.

Debe incluirse un tratamiento con el agua de mar control, la cual puede provenir de la zona de extracción de los erizos o de otra zona libre de contaminación, ésta agua también es utilizada como agua de dilución para los demás tratamientos del bioensayo.

Como tóxico de referencia puede utilizarse  $K_2Cr_2O_7$ , utilizando las siguientes concentraciones: 200; 100; 50; 25; 12,5; y 6,35 mg/l.

#### Obtención de los gametos para el bioensayo

Se seleccionan 4 hembras y 4 machos en condiciones saludables, procurando mantenerlos cubiertos con agua de mar. Luego, se induce la evacuación gamética, colocando los ejemplares individualmente en placas petri. Posteriormente, se toca la región aboral del test con dos electrodos conectados a un transformador de 12 V (durante intervalos de 1 minuto por ejemplar). Es recomendable comenzar con el desove de las hembras, con el fin de evitar que los óvulos se fertilicen a través de los electrodos y para disminuir el tiempo entre la recolección de los espermatozoides y su

utilización. Otra manera de obtener gametos es inyectando cada ejemplar con 2 ml de KCl (0,57 M) en la cavidad celómica. A diferencia de la inducción con electricidad, con éste tipo de inducción el desove es total y produce la muerte de los organismos.

Antes de coleccionar los óvulos para la suspensión stock, es necesario realizar fertilizaciones de prueba con óvulos de cada hembra, colocando una muestra de los óvulos en un portaobjetos y agregando una gota de una suspensión de espermatozoides diluidos en agua de mar. Teniendo identificados los óvulos en buenas condiciones, se utiliza una pipeta pasteur con la punta cortada para coleccionarlos y se transfieren a un recipiente con 300 ml de agua de mar. Los óvulos deben ser lavados dejándolos decantar y cambiándoles el agua tres veces, mientras se continúa con el procedimiento. Ésta suspensión de óvulos puede mantenerse a temperatura ambiente varias horas antes de usarla.

Es recomendable observar la movilidad de los espermatozoides, sacando una muestra de cada macho y diluyéndola en agua de mar. Seleccionando los ejemplares con espermatozoides con buena movilidad, se inducen y se coleccionan los gametos con pipeta pasteur, transfiriéndolos a un recipiente común. Esta muestra stock de espermatozoides debe mantenerse en seco y ser mantenida a baja temperatura (deben ser utilizados dentro de 1 hora después de su obtención, por lo tanto es importante registrar la hora de colección).

#### Preparación de la suspensión de espermatozoides

Se diluye la muestra de stock de espermatozoides a una concentración de  $7 \times 10^7$  espermatozoides por ml, usando agua de mar control. Para esto, se estima la concentración de la muestra stock de la siguiente manera:

Se hacen diluciones de la muestra stock de 1:50, 1:100 y 1:200, con agua de mar control:

Se agregan 200  $\mu$ L de la muestra stock de espermatozoides a un tubo de ensayo con 10 ml de agua de mar (tubo A). Se mezcla por inversión (la muestra stock debe ser mantenida a baja temperatura hasta su utilización en la preparación de la suspensión de espermatozoides para el bioensayo).

Se agregan 5 ml de la suspensión de espermatozoides del tubo A a un tubo de ensayo con 5 ml de agua de mar (tubo B) y se mezcla por inversión.

Se agregan 5 ml de la suspensión de espermatozoides del tubo B a un tubo de ensayo con 5 ml de agua de mar (tubo C). Se mezcla por inversión y se descartan 5 ml.

Se prepara una suspensión de espermatozoides muertos de 1:2000 y se determina el número de espermatozoides por ml de esa suspensión de la siguiente manera:

Se agregan 5 ml de ácido acético al 10% al tubo C. Se mezcla por inversión

Se agrega 1 ml del tubo C a 4 ml de agua de mar contenidos en un tubo de ensayo (tubo D) y se mezcla por inversión.

Se agrega una alícuota del tubo D a ambos lados de la cámara de Neubauer y se deja decantar por 15 minutos

Se cuenta el número de espermatozoides en los 400 cuadrados centrales de cada lado de la cámara, utilizando microscopio con aumento de 100X y luego se promedia ambos conteos.

Se calcula el número de espermatozoides por ml (NEM) en el tubo D:

NEM en el tubo D =  $10^4 \times$  promedio del conteo

Se calcula el NEM en la muestra stock:

NEM en la muestra stock =  $2000 \times$  NEM en el tubo D

Se calcula el volumen de la muestra stock de espermatozoides necesaria para preparar 20 ml de una suspensión de  $7 \times 10^7$ :

Volumen de la muestra stock =  $\frac{20 \text{ ml} \times 7 \times 10^7}{\text{NEM en la muestra stock}}$

NEM en la muestra stock

5: Se agrega el volumen calculado a un tubo y se completa con agua de mar a 20 ml. (Es importante preparar la suspensión de espermatozoides inmediatamente antes de utilizarla)

NOTA: Para realizar un bioensayo con 6 tratamientos (e.g. un control y 5 concentraciones de un compuesto) se requieren 2,4 ml de la suspensión de  $7 \times 10^7$  espermatozoides/ml.

Comienzo del bioensayo

Se agregan 100  $\mu$ L de la suspensión de espermatozoides (de  $7 \times 10^7$  esp/ml) a cada tubo del bioensayo y se incuban a  $13 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 1 hora.

Preparación de la Suspensión de óvulos para el Bioensayo

Una vez que los óvulos han sido lavados, a partir de ésta suspensión debe prepararse una de 2000 óvulos/ml de la siguiente manera:

A la suspensión de huevos se agrega agua control para llevar a un volumen de 200 ml(stock de óvulos)

Se hacen diluciones de 1:10 del stock de óvulos

Se utilizan dos tubos de ensayo para la dilución (Ov1 y Ov2) con 9 ml de agua de mar cada uno.

Se homogeniza el stock de óvulos agitando suavemente y se transfiere 1 ml a cada tubo, utilizando la punta de la pipeta automática con boca ancha.

Se determina la concentración de óvulos en los tubos, transfiriendo 1 ml de cada uno de ellos a un cámara Sedgwick-Rafter, para realizar el conteo de los óvulos utilizando un microscopio a 25X. Se promedia el conteo de los dos tubos, para determinar el número de óvulos por ml (NOM) en los tubos (NOM del stock= 10 x NOM de los tubos).

Se prepara la suspensión de óvulos para el bioensayo aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{NOM en los tubos} - 200 = \text{volumen (ml) de agua control que se agrega a la suspensión stock de huevos}$$

Si éste valor es negativo, corresponde al volumen de agua de mar que debe extraerse (procurando sacar de la superficie de la suspensión de óvulos, una vez decantados).

NOTA: Se requieren 24 ml de la suspensión de óvulos preparada para el bioensayo para un test con 6 tratamientos.

#### Adición de óvulos a los tratamientos del Bioensayo

Se homogeniza la suspensión de óvulos por agitación suave y se agrega 1 ml de la suspensión de óvulos (de 2000 ov/ml) a cada tubo, utilizando una punta de pipeta automática con boca ancha.

Luego, se extrae una muestra de uno de los tubos del tratamiento control, para monitorear la fertilización en el microscopio, registrando el número de huevos fertilizados.

#### Término del Bioensayo

Al cabo de veinte minutos, desde que se agregan los óvulos, deben encontrarse fecundados casi la totalidad de ellos en el control (mayor que 90%). Se termina el bioensayo, preservando el contenido de los tubos por adición de 2 ml de formalina al 10% en agua de mar.

Los tubos pueden ser analizados inmediatamente o pueden ser tapados con parafilm y guardados hasta una semana, antes de analizarlos.

Para determinar la fertilización, se transfiere una muestra del fondo de cada tubo a un portaobjeto y se observa al microscopio con un aumento de 100X. Contando 100 huevos, se registra el número de los óvulos (sin fertilizar). Los huevos (fertilizados) se distinguen por la presencia de una membrana de fertilización circundante.

Tabla 19: Tabla resumen de las condiciones experimentales y criterios de aceptación en bioensayos de fertilización en *Tetrapygyus niger*

Criterio	Condición experimental
Tipo de ensayo	Estático
Tiempo de exposición	1 h + 25 min
Temperatura	13 ± 2° C
Envases para el bioensayo	Tubos de ensayo de borosilicato desechables (de 10 ml capacidad)
Volumen de solución por unidad experimental	5 ml
Números de réplicas por tratamiento	4
Agua de control y dilución	Puede ser agua de mar natural, proveniente de un lugar libre de contaminación o agua de mar reconstituida
Número de erizos	4 individuos de cada sexo con gametos viables
Número de óvulos y espermatozoides por unidad experimental	2000 óvulos y 7.000.000 de espermatozoides
Aireación	El agua de dilución debe ser aireada antes del bioensayo, durante el experimento no es necesario
Respuesta variable	Fertilización de óvulos de <i>Tetrapygyus niger</i>
Criterio de aceptabilidad del bioensayo	Un máximo de 20% de óvulos sin fertilizar en los controles