

**“*Harpacticus littoralis* COMO ORGANISMO POTENCIALMENTE APTO PARA
SER UTILIZADO EN BIOENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA”**

TESIS

Para optar al Título Profesional de:

BIOLOGO MARINO

UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
Y DE LOS RECURSOS NATURALES
CARRERA BIOLOGÍA MARINA

Ljubica Milenka Petric Segovia

2010

Ljubica Milenka Petric Segovia

Esta Tesis ha sido aprobada por el siguiente comité

Dr. Humberto Díaz Oviedo

Director de tesis

Dr. Roberto Prado Fiedler

Miembro del Comité

Dra. Marcela Zahr Tajmouch

Miembro del Comité

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Antecedentes previos	2
1.2 Marco normativo.....	7
1.2.1 Internacional.....	7
1.2.2 Nacional	8
1.3 Estudios nacionales.....	9
1.4 Establecimiento de la Especie objetivo a ensayar	10
1.4.1 Copépodos sus características y empleo en bioensayos.....	10
1.4.2 Harpacticus littoralis especie objetivo	11
1.4.3 Clasificación	12
1.5 Alcance del estudio.....	13
1.5.1 Temperatura	14
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo General.....	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1 Lugar de muestreo	16
3.2 Procedimiento experimental	17

3.2.1	Cultivo de mantención	17
3.2.2	Aclimatación.....	18
3.2.3	Ensayos preliminares toxicidad aguda.....	18
3.2.4	Ensayos finales toxicidad aguda	19
3.2.5	Análisis de datos	21
4.	RESULTADOS.....	23
4.1	Ensayos preliminares toxicidad aguda en <i>Harpacticus littoralis</i> a diferentes niveles de temperatura.	23
4.2	Ensayos finales toxicidad aguda en <i>Harpacticus littoralis</i> a diferentes niveles de temperatura.	26
4.3	Calculo de Cl ₅₀ 48 y 96 horas en <i>Harpacticus littoralis</i> a diferentes niveles de temperatura.	28
4.4	Validez de resultados	32
4.5	Calibración del método.....	33
4.6	Carta de vigilancia.	36
4.7	Influencia de la temperatura	38
4.8	Aplicación práctica	41
4.8.1	Resultados de los ensayos preliminares de la aplicación práctica	42
4.8.2	Resultados de los ensayos finales de la aplicación práctica.....	42
5.	DISCUSIÓN	46
6.	CONCLUSIONES	54
7.	LITERATURA CITADA.....	56
8.	ANEXOS	62

A mi querida Familia

AGRADECIMIENTOS

Comienzo agradeciendo a mi familia por apoyarme siempre en lo que quiero, estar siempre a mi lado, preguntándome siempre como estoy y hacia donde quiero ir, por acompañarme y apoyarme en todas mis decisiones sean buenas o malas. Sin su amor no sería la persona que soy; gracias papas por la perseverancia que cada día me han enseñado junto con el saber de que hay que luchar por lo que uno quiere sin dejarse vencer, son mi ejemplo de fortaleza; este logro se los dedico de todo corazón y no olviden que los amo mucho.

No Puedo dejar de agradecer a mi pololo, compañero fiel y amigo, José Miguel Alvarado, que siempre estuvo escuchándome hablar y hablar y hablar y hablar de mis sueños, alegrías y fracasos. Tú eres una de las personas que me ha ayudado a sacar delante uno de mis tantos sueños, gracias amor por soportarme y amarme tal cual como soy.

También tengo que mencionar a mi hermana Danica Petric y a su esposo Ignacio Saavedra, quienes eran los que pasaban largas horas junto a mi, ayudándome en lo que más me costaba (matemáticas), sino fuera por Ignacio y su paciencia enseñándome estadística con manzanas la historia sería otra.

A todos mis amigos, a los de la Universidad: Cindy, Oscar, Cristián, Jorge, Ricardo y Javier, quienes fueron parte fundamental en ese momento de mi vida, fuimos compañeros de trabajos, de laboratorio, de seminarios y de largas conversaciones tomando unas

cervezas y fumando unos cigarros para relajarnos después de muchas horas de estudio o simplemente matando el tiempo. A los de Gómez Carreño: Mauricio, Israel, Elizabeth Durán, Elizabeth Ponce, Rossana y Loreto quienes me escuchaban hablar de tantas especies y de todo lo que iba aprendiendo, les agradezco simplemente estar ahí. A los que llamo mis hermanos: Bernardo, Francisco, Romina, Stephanie, Mariela, Felipe y Miguel con quienes comparto mi vida y son un apoyo constante en ella.

Muy importante para mi, es agradecer a mis dos grandes amigas Alejandra Rivas y Marlene Díaz quienes han estado en mi vida por muchos años, son ellas las que me escuchan y aconsejan, con ellas compartí mis dudas y alegrías respecto de la carrera; gracias amigas por todos los consejos que me dieron cuando los necesitaba y por los espectaculares momentos que hemos tenido juntas.

Tengo que destacar a dos personas que estuvieron apoyándome directamente en desarrollo de la tesis, ellos son Felipe y Leonel Burgos, gracias a ellos pude llevar acabo el escrito y la presentación de mi Tesis, estaré eternamente agradecida por ello. También agradezco a Luis Rodríguez por permitirme realizar bioensayos de toxicidad junto a él en el laboratorio.

Por último y no menos importante agradezco al Dr. Humberto Díaz por haberme aceptado en primer lugar como su alumna de seminario y después como Tesista. Gracias profesor por haber tenido una gran disposición, mucha paciencia y soportar todos los correos electrónicos que le enviaba casi todos los días. Usted sin darse cuenta fue un gran apoyo en mi vida tanto en lo académico como en lo personal.

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Resultados de los ensayos preliminares de toxicidad aguda utilizando dicromato de potasio en <i>H. littoralis</i> a una temperatura de 15 °C. Los resultados se expresan como número de organismos inmovilizados y mortalidad (%), (n=20).	23
Tabla II. Resultados de los ensayos preliminares de toxicidad aguda utilizando dicromato de potasio en <i>H. littoralis</i> a una temperatura de 20 °C. Los resultados se expresan como número de organismos inmovilizados y mortalidad (%), (n=20).	24
Tabla III. Resultados de los ensayos preliminares de toxicidad aguda utilizando dicromato de potasio en <i>H. littoralis</i> a una temperatura de 25 °C. Los resultados se expresan como número de organismos inmovilizados y mortalidad (%), (n=20).	25
Tabla IV. Resultados de los ensayos finales de toxicidad aguda utilizando dicromato de potasio en <i>H. littoralis</i> a una temperatura de 15 °C. Los resultados se expresan como número de organismos inmovilizados y mortalidad (%), (n=20).	26
Tabla V. Resultados de los ensayos finales de toxicidad aguda utilizando dicromato de potasio en <i>H. littoralis</i> a una temperatura de 20 °C. Los resultados se expresan como número de organismos inmovilizados y mortalidad (%), (n=20).	27
Tabla VI. Resultados de los ensayos finales de toxicidad aguda utilizando dicromato de potasio en <i>H. littoralis</i> a una temperatura de 25 °C. Los resultados se expresan como número de organismos inmovilizados y mortalidad (%), (n=20).	28
Tabla VII. Resultados para el test de X^2 a las 48 y 96 horas obtenidos de los ensayos de toxicidad aguda utilizando dicromato de potasio en <i>H. littoralis</i> a diferentes niveles de temperatura (n=20).	29
Tabla VIII. Parámetros de la curva resultante obtenidos de los ensayos de toxicidad aguda utilizando dicromato de potasio en <i>H. littoralis</i> a 48 y 96 horas a diferentes niveles de temperatura (n=20).	30
Tabla IX. Concentraciones Letales (Cl) – 48 h y 96 h obtenidas de los ensayos de toxicidad aguda utilizando dicromato de potasio en <i>H. littoralis</i> a diferentes niveles de temperatura (n=20).	31
Tabla X. Concentraciones letales (Cl ₅₀ - 48 h y Cl ₅₀ – 96 h) del dicromato de potasio y sus límites de confianza para <i>H. littoralis</i> a diferentes niveles de temperatura (n = 10 bioensayos).	34
Tabla XI. Estadísticos descriptivos para las Cl ₅₀ - 48 h y Cl ₅₀ - 96 de dicromato de potasio como tóxico de referencia en bioensayos de toxicidad aguda con <i>H. littoralis</i> a diferentes niveles de temperatura (n =10 bioensayos).	35

Tabla XII. Resultados de los ensayos finales de toxicidad aguda en <i>H. littoralis</i> utilizando MAXAM 15 a una temperatura de 20 °C. Los resultados se expresan como número de organismos inmovilizados y mortalidad (%).	43
Tabla XIII. Resultados para el test de X^2 a las 24 y 48 horas obtenidos de los ensayos de toxicidad aguda para MAXAM 15 en <i>H. littoralis</i> a una temperatura de 20 °C.....	43
Tabla XIV. Parámetros de la curva resultante obtenidos de los ensayos de toxicidad aguda para MAXAM 15 en <i>H. littoralis</i> a las 24 y 48 horas a una temperatura de 20 °C.	44
Tabla XV. Concentraciones Letales (Cl) – 24 y 48 h obtenidas de los ensayos de toxicidad aguda para MAXAM 15 utilizando <i>H. littoralis</i> a una temperatura de 20 °C.....	45
Tabla XVI. Concentraciones Letales Media (Cl ₅₀) de dicromato de potasio utilizando <i>Harpacticus littoralis</i> y <i>Tisbe biminiensis</i>	48
Tabla XVII. Efecto del dicromato de potasio utilizando <i>Harpacticus littoralis</i> y <i>Tisbe longicornis</i>	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Copépodo ciclopoideo, <i>Macrocyclus albidus</i> (vista dorsal). (Ruppert & Barnes 1996).	11
Figura 2. Detalle de <i>Harpacticus littoralis</i> . Aumento 50x.	12
Figura 3. A Fotografía aérea del área de Montemar, Región de Valparaíso, Chile. B Poza muestreada.....	17
Figura 4. Carta de vigilancia para el bioensayo agudo de <i>H. littoralis</i> con el tóxico de referencia dicromato de potasio a diferentes niveles de temperatura (n =10 bioensayos)... ..	37
Figura 5. Efecto del dicromato de potasio, sobre la sobrevivencia del copépodo <i>H. littoralis</i> bajo tres regímenes de temperatura a las 48 y 96 h. Cada grupo representa los 10 bioensayos.	39
Figura 6. Cl ₅₀ - 96 horas y los intervalos de confianza para los 10 bioensayos utilizando dicromato de potasio en <i>H. littoralis</i> bajo tres regímenes de temperatura.	40
Figura 7. Variabilidad estadística de la Cl ₅₀ - 96 horas para los 10 bioensayos utilizando dicromato de potasio en <i>H. littoralis</i> bajo tres regímenes de temperatura.	40

RESUMEN

Una herramienta intensamente utilizada en países desarrollados para evaluar los efectos tóxicos de contaminantes sobre los organismos vivos la constituyen los bioensayos. El copépodo (crustácea) *Harpacticus littoralis* es un potencial organismo experimental para bioensayos de toxicidad, en base a su disponibilidad, fácil cultivo y amplia distribución geográfica. En el estudio que aquí se expone se evalúa la potencialidad de emplear *H. littoralis* como organismo de bioensayo agudo y su sensibilidad frente al tóxico de referencia dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$). Los experimentos fueron efectuados exponiendo a los organismos a una serie de concentraciones del tóxico de referencia durante un período de 96 horas bajo diferentes niveles de temperatura, que incluyeron variaciones térmicas en las comunidades naturales marinas chilenas. El efecto cuantificado fue la mortalidad de los organismos. Se estandarizó y calibró la metodología experimental con el fin de determinar la precisión y exactitud que deben alcanzar los resultados en la ejecución del bioensayo. La calibración de los ensayos de toxicidad aguda con *H. littoralis* fue realizada en base a 10 repeticiones del bioensayo. Las Cl_{50} promedio a las temperaturas de 15 °C, 20 °C y 25 °C fueron de **109,91 mg/L**, **57,24 mg/L** y **21,68 mg/L** a las 48 h. A las 96 h los respectivos límites para las mismas temperaturas fueron de **11,31 mg/L**, **7,50 mg/L** y **5,18 mg/L**. El rango de sensibilidad representado por los límites superior (LCS) e inferior (LCI) de confianza al 95 % a las 48 h fueron para temperaturas de 15 °C, 20 °C y 25 °C, respectivamente, de **160,95 y 58,87 mg/L**; **72,14 y 42,34 mg/L**; y **25,10 y 18,26 mg/L**. A su vez, los LCS y LCI al 95% para 96 h fueron, a las mismas temperaturas, de **13,19 y 9,43 mg/L**; **8,74 y 6,26 mg/L** y **6,32 y 4,04 mg/L**, respectivamente. Se determinó también la

precisión intralaboratorio del bioensayo con *H. littoralis* frente al tóxico de referencia dicromato de potasio mediante la estimación del coeficiente de variación (CV) de las Cl_{50} - 48 h y Cl_{50} - 96 a las temperaturas de 15 °C, 20 °C y 25 °C los cuales fueron de **23,22%, 13,01% y 7,90%** para las 48 h y de **8,35 %, 8,23% y 11,0%** para las 96 h. Se discute el efecto de la temperatura sobre la respuesta de *H. littoralis* al dicromato de potasio. Se concluye que es posible utilizar *H. littoralis* en evaluación de toxicidad aguda. Se entrega un ejemplo de aplicación práctica, para evaluar un producto comercial usando *H. littoralis* en el bioensayo agudo.

Palabras Claves: Toxicidad aguda, *Harpacticus littoralis*, tóxico de referencia, dicromato de potasio, Calibración de bioensayo.

ABSTRACT

Bioassays are tools used extensively in developed countries to assess the toxic effects of pollutants on living organisms. The copepod (crustacean) *Harpacticus littoralis* is a potential test organism suitable for toxicity bioassays, based on its availability, ease of cultivation and wide geographic distribution. The present study evaluates the potential of *H. littoralis* as acute toxicity test organism and its sensitivity to the reference toxicant potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$). The experiments were carried out by exposing the organisms to a series of concentrations of the reference toxicant for a period of 96 hours under different temperature levels, which included thermal variations in Chilean marine natural communities. The measured effect was the death of the organisms. The experimental methodology was standardized and calibrated to determine the precision and accuracy to be achieved with the results of the bioassay. The calibration of acute toxicity tests with *H. littoralis* was performed based on 10 repetitions of the bioassay. The average LC_{50} at temperatures of 15 °C, 20 °C and 25 °C were **109,91 mg/L, 57,24 mg/L and 21,68 mg/L** respectively at 48 h; at 96 h they were **11,31 mg/L, 7,50 mg/L and 5,18 mg/L** respectively. The sensitivity range represented by the upper 95% confidence limit (UCL) and lower 95% confidence limit (LCL) for temperatures of 15 °C, 20 °C and 25 °C respectively were at 48 h **160.95 and 58.87 mg/L, 72.14 and 42.34 mg/L, 25.10 and 18.26 mg/L**, while at 96 h the 95% UCL and LCL were **13,19 and 9,43 mg/L, 8,74 and 6,26 mg/L and 6,32 and 4,04 mg/L** for the same temperatures. The intralaboratory precision of the bioassay regarding the exposure of *H. littoralis* to the reference toxicant potassium

dichromate was also determined by means of the the coefficient of variation (CV) of 48 h LC₅₀ and 96 h LC₅₀ at temperatures of 15 °C, 20 °C and 25 °C. This was **23,22%**, **13,01%** and **7,90%** for the 48 hours, and **8,35%**, **8,23%** and **11,0%** for 96 hours. The effect of temperature on the response of *H. littoralis* to potassium dichromate is discussed, concluding that it is possible to use *H. Littoralis* as a marine species in the evaluation of acute toxicity. An example is given of practical application to evaluate a commercial product using *H. littoralis* in acute bioassay.

Keywords: Acute toxicity, *Harpacticus littoralis*, reference toxicant, potassium dichromate, coefficient of variation, Bioassay calibration.

Harpacticus littoralis como organismo potencialmente apto para ser utilizado en

Bioensayos de Toxicidad Aguda

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes previos

Los ecosistemas acuáticos son receptores de la liberación de sustancias tóxicas que producen una variedad de respuestas complejas en los organismos, las que precisan ser evaluadas. Los estudios toxicológicos constituyen uno de los elementos de juicio más adecuados para la evaluación del riesgo potencial producido por contaminantes presentes en el ambiente o por nuevas sustancias a ser vertidas en él. Para evaluar los efectos biológicos de sustancias tóxicas descargadas al ambiente acuático se han utilizado diferentes herramientas, siendo una de ellas los bioensayos de laboratorio.

En particular, los bioensayos de toxicidad son una herramienta intensamente utilizada en países desarrollados, con el objeto de evaluar en forma efectiva y eficiente los efectos tóxicos agudos y crónicos de la contaminación en los organismos vivos (EPS 1990, EC 1992, USEPA 2002, Ryo *et al.* 2003, Takigami *et al.* 2008). En la práctica, esta técnica cuantifica la relación concentración-efecto de compuestos químicos conocidos o mezclas complejas, por medio de respuestas biológicas medidas bajo condiciones controladas y estandarizadas. Los bioensayos resultan ser una herramienta útil para monitorear la calidad

del agua de mar y dar alerta temprana sobre la descarga de contaminantes potencialmente dañinos.

Un **bioensayo** puede ser definido como un experimento en el cual un tejido vivo, un organismo o grupo de ellos, es empleado para determinar el potencial tóxico de una sustancia cualquiera, de actividad desconocida. En forma más simple y general, la Norma Chilena NCh2083.Of1999 indica como bioensayo “a la medición del efecto de sustancia tóxicas sobre organismos vivos”. De lo anterior se desprende que, en definitiva, los bioensayos son técnicas de evaluación de los efectos tóxicos (agudos o crónicos) tanto de sustancias químicas conocidas como de muestras ambientales de composición incierta. Estas pruebas de toxicidad pueden tener más de un objetivo, uno de ellos es proporcionar un sistema de medición de efectos tóxicos en condiciones controladas de laboratorios que sea replicable y comparable entre laboratorios distintos, de lugares diferentes, controlando sus probables formas de presentación y que refleje las características fundamentales del ambiente natural de la especie a utilizar. Otro objetivo de un bioensayo es medir el efecto de uno o más contaminantes sobre las especies que son sometidas a la exposición de concentraciones crecientes de un agente tóxico, con el objetivo de determinar algún cambio en éstos en un cierto período de tiempo (Larraín 1995).

Las respuestas que entregan éstas pruebas de laboratorio pueden ser clasificadas en dos grupos mayores (Perkins 1976):

- Agudas (corto plazo): también denominados **ensayos de toxicidad aguda**; en este caso la respuesta tóxica se manifiesta sobre los organismos en un tiempo corto. La respuesta del organismo frente a la concentración del contaminante se expresa como

CL₅₀, concentración a la cual el 50% de los organismos expuestos muere o EC₅₀, si acaso manifiesta una respuesta predeterminada (inmovilización), o simplemente como porcentaje de sobrevivencia. La concentración es expresada usualmente en porcentaje de muestra o en mg/L y se consideran inmovilizados los organismos incapaces de desplazarse aunque éstos puedan mover sus antenas (NCh2083 1999).

- Crónicas (largo plazo): el objetivo de los bioensayos de **toxicidad crónica** es evidenciar respuestas que no implican la muerte del organismo ensayado (conducta, fecundidad, desarrollo y bioacumulación, entre otras), a través de una o varias generaciones de organismos, que están o han sido expuestas a sustancias tóxicas.

El uso de bioensayos para la evaluación de toxicidad de sustancias liberadas al medio a través de efluentes, ha llevado a la utilización de biomonitores propios de los ambientes evaluados, lo cual favorece indirectamente la preservación de la biodiversidad local. Sin embargo, la variabilidad en la aplicación de las técnicas experimentales para el mantenimiento de organismos silvestres afecta la interpretación y comparación de los resultados entre laboratorios, por lo que se hace necesario desarrollar *metodologías estandarizadas* para establecer condiciones controladas (Palacios & Pereira 1997). Utilizar organismos provenientes directamente del hábitat natural puede distorsionar los resultados obtenidos por fuentes de variabilidad no previstas, como nutrición, dinámica de la población, estrés por depredación, etc. (Sosnowski *et al.* 1979). Estas variables pueden ser controladas o eliminadas con las poblaciones de laboratorio; además, el entrecruzamiento

consanguíneo que ocurre a lo largo del tiempo en esas poblaciones, resulta en una considerable reducción de la variabilidad genética (Lewontin 1974).

Por otra parte, a causa de la complejidad del medio ambiente acuático y de las comunidades biológicas que lo integran, es difícil establecer el grado de deterioro que afecta a las especies o comunidades acuáticas. Por esta razón, es conveniente realizar los bioensayos utilizando organismos vivos en condiciones controladas de laboratorio.

La captación y utilización de zooplancton como biomonitor data desde comienzos del siglo XX. Hoy en día, gracias al desarrollo de técnicas para su cultivo en el laboratorio, representa una herramienta que gana cada vez más reconocimiento en la evaluación ecotoxicológica (Sosnowski *et al.* 1979; Maciorowski 1981). Según Reish & Oshida (1987), para la realización de bioensayos es conveniente el uso de zooplancton por su pequeña talla, requerimiento de poco espacio de laboratorio y poco volumen de agua, gran sensibilidad a sustancias tóxicas, ciclo de vida corto y requerimientos nutricionales generalmente conocidos, lo cual lo hace ideal para estudios de bioacumulación.

No obstante lo anterior, la sensibilidad de los organismos a la toxicidad de una sustancia puede variar considerablemente desde una especie a otra, dependiendo de las diferencias metabólicas y naturaleza de su hábitat.

Lo anterior, hace necesario que al implementar los bioensayos de toxicidad, se deba efectuar su **estandarización**, que consiste en establecer una metodología común en relación, tanto a los parámetros de cultivo (reclutamiento, mantención y cultivo masivo de los organismos) como a los experimentales, que aseguren la reproducibilidad del experimento permitiendo comparar los resultados generados. Diversas organizaciones internacionales como United States Environmental Protection Agency (USEPA),

Comunidad Económica Europea (CEE), American Section of the International Association for Testing Materials (ASTM), International Organization for Standardization (ISO), Servicio de Protección Ambiental de Canadá (EPS), Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), han estandarizado metodologías para la realización de bioensayos de toxicidad con distintas especies, en donde además se describen métodos de cultivo, condiciones de los experimentos, ámbito de aplicación y restricciones.

Una vez estandarizada la metodología experimental del bioensayo de toxicidad, se realiza la **calibración** del método, la cual tiene como objetivo determinar la precisión y exactitud que deben alcanzar los resultados generados por el bioensayo. Esto es útil para asegurarse que la respuesta de la población expuesta a un tóxico determinado se deba al efecto de éste y no a variaciones tanto en la sensibilidad del organismo expuesto como a fallas operacionales en la aplicación del método.

Algunos criterios a seguir y características que debe presentar un organismo óptimo para bioensayo son:

- De amplia distribución en el país o de importancia comercial (Esclapés 1999).
- Disponibilidad, ser fáciles de encontrar, en número suficiente y colectarse sin dificultad. Se debe tomar en cuenta problemas con el transporte (FAO 1981).
- Con un tamaño suficientemente pequeño, para poseer los necesarios para realizar el bioensayo y que sean representativos para los estudios estadísticos (FAO 1981).
- De fácil cultivo, lo que garantiza un adecuado suministro de organismos en los ensayos y el establecimiento con exactitud de la edad o estado de desarrollo. La edad es de suma importancia en los bioensayos, ya que la sensibilidad puede variar significativamente durante su desarrollo (Esclapés 1999).

- Especies con gran susceptibilidad a exposiciones con sustancias xenobióticas, garantizando cubrir el peor de los escenarios, y proporcionando resultados que ofrezcan una alta protección al resto de la cadena trófica (Esclapés 1999).
- Especies con presencia de individuos durante todo el año, lo que permite obtener los ejemplares necesarios para realizar el bioensayo en cualquier momento.
- Fácil de implementar, es decir, que en el momento de llevar a cabo el bioensayo con dicha especie, no se requiera de una gran cantidad de instrumentos.

De lo anterior se deduce que resulta de vital importancia estandarizar, calibrar y efectuar una selección efectiva de los organismos a utilizar en bioensayos de toxicidad, especialmente en el medio marino.

1.2 Marco normativo

1.2.1 Internacional

En el mundo existen diversas Organizaciones Internacionales como las mencionadas anteriormente, que elaboran documentos, normas y protocolos que tienen relación con los bioensayos. Destacan en el contexto de esta Tesis, los siguientes:

- Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (USEPA 2002).
- Guideline for Testing of Chemicals. Acute Inhalation Toxicity Testing. (OECD 2008).

- Standard Guide for Conducting Laboratory Toxicity Tests with Freshwater Mussels” (ASTM E 2455-05). Este protocolo se encuentra actualmente en revisión.
- Guidance Document on Control of Toxicity Test Precision Using Reference Toxicants” (EPS 1990).

1.2.2 Nacional

Actualmente en Chile existen sólo dos cuerpos normativos relacionados con bioensayos. En el primero de ellos, las especies *Daphnia magna* y *Daphnia pulex* (cladóceros) conforman la norma chilena para determinación de toxicidad aguda con este tipo de organismos (NCh 2083 1999). En específico la norma se denomina NCh2083.Of1999 “Aguas - Bioensayo de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* o *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladocera)”. Esta norma está dirigida a determinar el efecto de un efluente o una sustancia soluble en agua sobre *Daphnia magna* y/o *Daphnia pulex*. *Daphnia sp.* es un crustáceo de agua dulce, utilizado por muchos años en la evaluación de los efectos tóxicos de sustancias puras, mezclas complejas y todo tipo de muestras de agua. No obstante, su uso principal se aboca a aguas dulces.

La segunda norma corresponde a NCh2706.Of2002 “Calidad de agua - Bioensayo de inhibición de crecimiento de algas en agua dulce con *Senastrum capricornutum* (*Raphidocelis subcapitata*)” (NCh02706). Esta norma establece un método para la determinación de la toxicidad crónica de efluentes y aguas receptoras o efectos adversos de una sustancia, en el crecimiento de la microalga de agua dulce *Senastrum capricornutum*,

por un período de exposición de 72 h o 96 h en un sistema de cultivo estático (modo batch). Claramente se encuentra dirigida a efluentes de agua dulce.

Un tercer instrumento que se utiliza como consulta por la Autoridad Marítima (com. Personal), es el “Protocolo para la determinación gráfica de la toxicidad media letal para dispersantes químicos para combatir derrames de petróleo”, propuesto por la IX Sesión de OMI (Organización Marítima Internacional)/MEPC (Comité de Protección del Ambiente Marino) (Doc. MEPC IX/Inf.2), el cual aplica a la evaluación de todo tipo de dispersante en el medio marino (D.G.T.M.Y M.M 2007).

1.3 Estudios nacionales

En nuestro país se han utilizado varias especies autóctonas (dulceacuícolas y marinas) como organismos de ensayo en evaluaciones de toxicidad. La extensión de éstas sobrepasa el alcance de esta propuesta de Tesis. No obstante, a continuación se detallan los más importantes y atinentes a este proyecto:

➤ Especies dulceacuícolas:

- Bivalvo *Diplodon chilensis* (Silva *et al.* 2007).
- Cladóceros *Daphnia magna* (Núñez & Hurtado 2005) y *Daphnia Pulex* (Silva *et al.* 2003).

➤ Especies marinas:

- Erizo de mar *Arbacia spatuligera* (Larrain *et al.* 1999).
- Anfípodo *Ampelisca araucana* (Larrain *et al.* 1998a).
- Pejerrey *Odontesthes regia* (Silva *et al.* 2001).

- Copépodos *Tisbe longicornis* (Larrain *et al.* 1998b) y *Eucyclops neumani neumani* (Soto *et al.* 2003).
- Bivalvos como *Argopecten purpuratus* (Troncoso *et al.* 2000), *Aulacomya ater*, *Choromytilus chorus*, *Perumytilus purpuratus* y *Semimytilus algosus* (Zúñiga *et al.* 2003).

1.4 Establecimiento de la Especie objetivo a ensayar

1.4.1 Copépodos sus características y empleo en bioensayos

A nivel nacional, se han efectuado ensayos en dos especies principales: *Tisbe longicornis* (Larrain *et al.* 1998b) y *Eucyclops neumani neumani* (Soto *et al.* 2003). Copépoda es la clase más grande de pequeños crustáceos; se han descrito alrededor de 8500 especies, la mayoría son marinos pero hay muchas especies dulceacuícolas. Los copépodos marinos existen en números enormes y son, por lo general, el componente más abundante y conspicuo de una muestra de plancton. Dado que la mayoría de la especies planctónicas se alimentan de fitoplancton, son el principal nexo de unión entre el fitoplancton y los niveles tróficos superiores en muchas cadenas tróficas marinas. Desde el punto de vista ecológico tienen una enorme importancia, ya que con frecuencia dominan el nivel de consumidores primarios, iniciando la producción mediante la fijación y almacenamiento de energía procedente del exterior del ecosistema (Ruppert & Barnes 1996).

Morfológicamente los copépodos se caracterizan por poseer el cuerpo dividido en dos regiones, siendo la región anterior (cefalotórax) típicamente alargada, con un ojo naupliano y 5 pares de apéndices torácicos que le sirven para nadar (Figura 1). Se

reconocen tres órdenes principales: Calanoidea (fundamentalmente planctónicos), Harpacticoidea (generalmente litorales microbentónicos) y Cyclopoidea (litorales y sólo unos pocos son típicamente limnéticas), (CONAMA 2008). Los harpacticoídes tienen un alto valor ecológico ya que son el componente principal en la dieta de estadios juveniles de peces e invertebrados bentónicos (Gee 1987). Además, estos habitantes del fondo se alimentan de los microorganismos y los detritos que hay pegados en los granos de arena, las algas o las hierbas marinas (Ruppert & Barnes 1996).

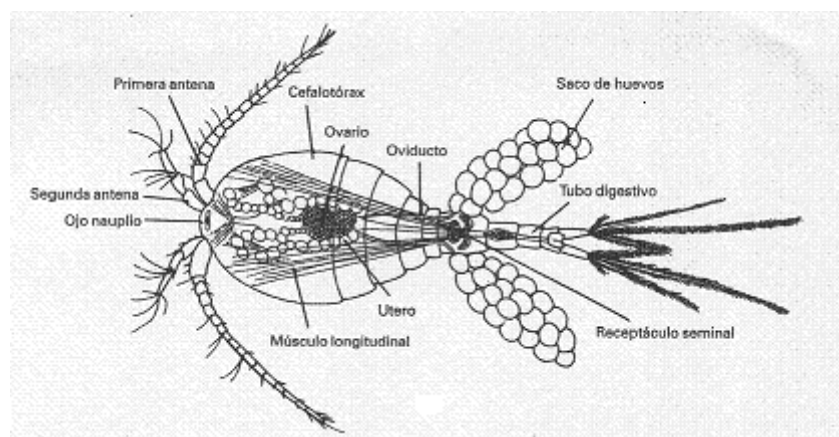


Figura 1. Copépodo ciclopoideo, *Macrocylops albidus* (vista dorsal). (Ruppert & Barnes 1996).

1.4.2 *Harpacticus littoralis* especie objetivo

Harpacticus littoralis es un copépodo (crustácea) que carece de caparazón y posee un cuerpo largo y estrecho, más ancho en el extremo anterior (Figura 2). Los adultos en esta especie conservan el ojo nauplio.

Tiene una amplia distribución geográfica, hallándose descrito en el océano Atlántico, en sectores como la costa sur y oeste de Noruega (Sars 1910), Helgoland, Mar del Norte (Klie 1927), Irlanda (Farrán 1913) y bahía Chesapeake (Wilson 1932); en el

océano Índico, lago Chilca, golfo de Bengala y en el océano Pacífico, isla de Pascua (Goddard 2003), isla San Félix y Archipiélago de Juan Fernández (Goddard 2006). No existen antecedentes de estudios toxicológicos en *Harpacticus littoralis*.

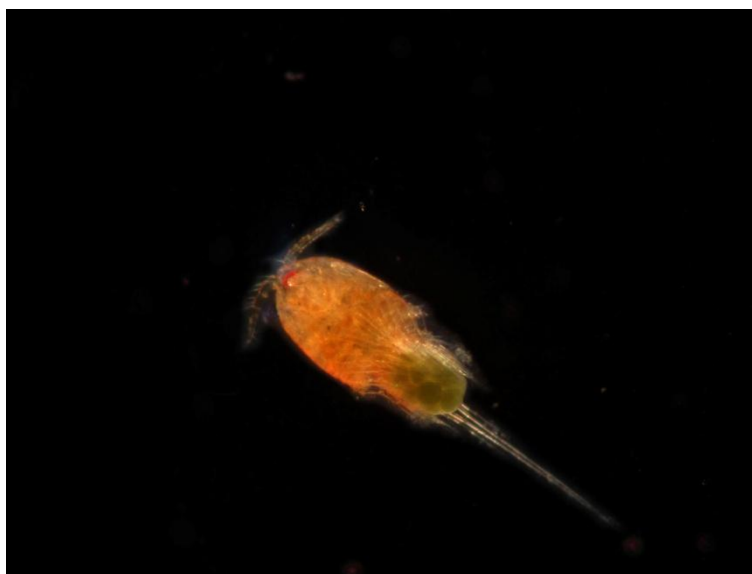


Figura 2. Detalle de *Harpacticus littoralis*. Aumento 50x.

1.4.3 Clasificación

La clasificación taxonómica sugerida por Walter & Huys (2010) para *Harpacticus littoralis* es la siguiente:

Phylum	Arthropoda
Subphylum	Crustácea
Clase	Maxillopoda
Subclase	Copepoda
Infraclase	Neocopepoda
Superorden	Podoplea
Orden	Harpacticoida
Familia	Harpacticidae
Genero	Harpacticus
Especie	<i>Harpacticus littoralis</i>

1.5 Alcance del estudio

En este trabajo se evaluará la potencialidad y sensibilidad de emplear *H. littoralis* como organismo de ensayo frente al tóxico de referencia dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), y definir el rango de variabilidad máximo aceptable en los resultados generados por el bioensayo con dicho tóxico. Este dicromato (cromo VI) es usado con frecuencia en las industrias como fuente de otros compuestos del cromo. En general, los efluentes industriales que contienen cromo se incorporan a las aguas y eventualmente llegan a los océanos. La forma química dependerá de la presencia de materia orgánica en las aguas (González & Gilling 2001).

En esta Tesis, se estandarizará la metodología experimental de los bioensayos de toxicidad aguda en la especie de agua de mar *H. littoralis* y se efectuará la calibración del método con el fin de determinar la precisión y exactitud que debe alcanzarse en los resultados generados por el bioensayo. Sin embargo, es preciso indicar que en el laboratorio, los factores experimentales pueden afectar la supervivencia de los harpacticoídes. Por ejemplo, Williams & Jones (1994) encontraron menor supervivencia en *battagliai* (copépodo del Orden Harpacticoida) criados a temperaturas altas y menores concentraciones de alimentos. Se estima que variaciones de las condiciones ambientales (pH, temperatura, salinidad) afectan la sensibilidad de los individuos a las sustancias tóxicas (Larrain *et al.* 1998b). Por lo tanto, al evaluar los posibles efectos de los contaminantes, es importante saber cómo los cambios de condiciones en la prueba pueden influir en la toxicidad.

1.5.1 Temperatura

Esta Tesis propone efectuar los bioensayos bajo diferentes regímenes de temperatura que incluyen las variaciones térmicas en las comunidades naturales. Es importante destacar que a lo largo de todo Chile, la temperatura del mar (Océano Pacífico) varía de acuerdo a la estación del año, el día y la noche y además está sujeto a factores regionales y locales, entre los que se encuentra la corriente de Humboldt y el fenómeno de El Niño y La Niña.

La temperatura superficial promedio mensual del mar de Chile para el año 2009 en el mes en que se efectuó el muestreo (noviembre) en la zona norte, Estación Ambiental Arica ($18^{\circ} 28' 26''\text{S}$; $070^{\circ} 19' 16''\text{O}$) fue de $17,4^{\circ}\text{C}$; mientras en la zona central, Estación Ambiental Valparaíso ($33^{\circ} 0,1' 38''\text{S}$; $071^{\circ} 37' 33''\text{O}$), fue de $12,8^{\circ}\text{C}$. En tanto en la zona sur del país, Estación Ambiental Puerto Montt ($41^{\circ} 29' 05''\text{S}$; $072^{\circ} 57' 39''\text{O}$), la temperatura superficial promedio mensual fue de $11,8^{\circ}\text{C}$. Estos datos fueron obtenidos a través del Servicio Hidrográfico y Oceanográfico de la Armada (SHOA) (SHOA 2009). De acuerdo a estos antecedentes se fijaron las temperaturas a utilizar en los ensayos; es de suma importancia mencionar que cuando se llevó a cabo el estudio, los datos de temperatura superficial del mar descritos anteriormente para la zona norte y centro-sur del país, aún reflejaban condiciones de neutralidad, no observándose hasta el momento ningún tipo de calentamiento de la superficie del mar relacionado con el evento ENOS (El Niño-Oscilación del Sur) (CPPS 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar sensibilidad del copépodo harpacticoide, *Harpacticus littoralis*, como organismo de ensayo agudo frente al tóxico de referencia dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), en condiciones de laboratorio y definir el rango de variabilidad máximo aceptable en los resultados generados.

2.2 Objetivos Específicos

1. Estandarizar la metodología experimental del bioensayo de toxicidad aguda en *Harpacticus littoralis* utilizando el tóxico de referencia dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$).
2. Calibrar la metodología experimental con el fin de determinar la precisión y exactitud que deben alcanzar los resultados generados en el bioensayo de toxicidad aguda.
3. Estimar la Cl_{50} de *Harpacticus littoralis* ensayado con $K_2Cr_2O_7$ en las distintas temperaturas y definir cómo afecta la variación de dichas temperaturas en la sensibilidad de los ejemplares ocupados.
4. Realizar una aplicación práctica, para evaluar un producto disponible en el mercado, usando *Harpacticus littoralis* en bioensayo agudo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de muestreo

Todos los organismos de ensayo provienen de reproductores adultos del copépodo *Harpacticus littoralis*, los cuales fueron capturados en el sector litoral intermareal de la Concesión Marítima de la Facultad de Ciencias del Mar y de Recursos Naturales de la Universidad de Valparaíso, región de Valparaíso, en la localidad de Montemar (32° 57' S, 77° 33' O) (Figura 3A). La poza que fue muestreada corresponde, de acuerdo a Alveal (1970), a una poza de grandes pleamares, ubicada a una mayor distancia de la zona de rompiente con flujo de agua bastante irregular y cuya renovación es posible sólo en las grandes pleamares (Figura 3B). Los parámetros ambientales promedios del sitio de muestreo son: Temperatura 23, 30 °C, Salinidad 41,19 ‰ y pH 9,11 (Goddard 1993). La temperatura promedio cuando se llevó a cabo el muestreo (noviembre 2009) en la poza fue de 22.96° C y pH_{NBS} promedio de 8.9.

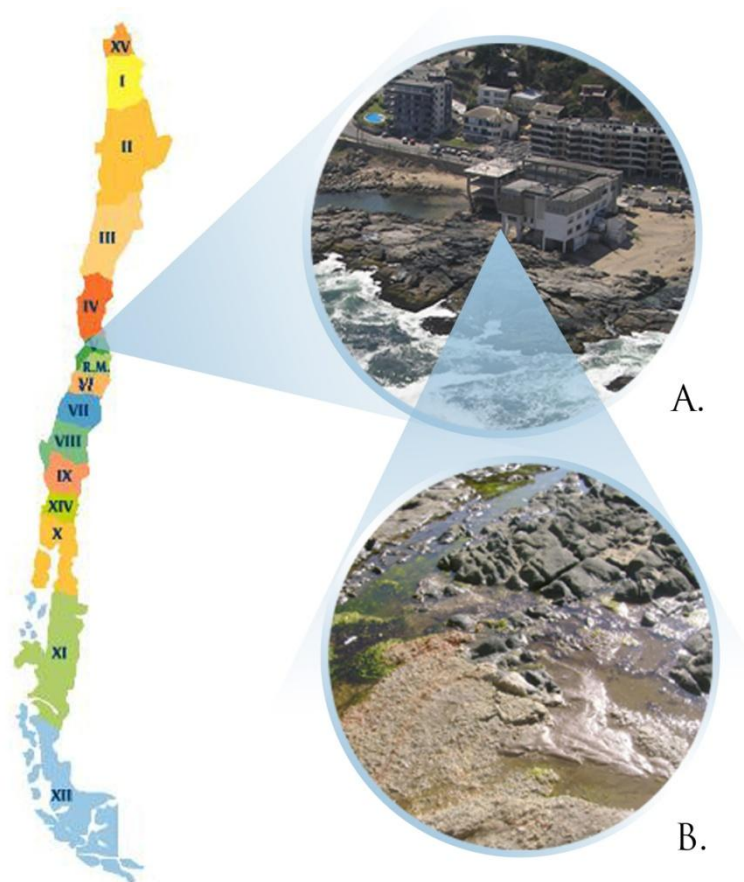


Figura 3. A Fotografía aérea del área de Montemar, Región de Valparaíso, Chile. B Poza muestreada.

3.2 Procedimiento experimental

3.2.1 Cultivo de mantención

Los organismos capturados fueron mantenidos en recipientes de 40 ml (20 individuos por recipiente). Al cabo de tres semanas, la población aumentó en más de un 50%, por lo tanto los individuos nacidos se depositaron en nuevos recipientes de 40 ml (20 individuos por recipiente). Durante esta etapa los organismos se alimentaron con microalgas dos veces a la

semana. El cultivo de mantención terminó cuando todos los individuos nacidos fueron utilizados para los posteriores ensayos.

3.2.2 Aclimatación

Antes de empezar las pruebas los organismos fueron aclimatados. Para llevar acabo este punto se siguió lo establecido en la norma chilena para determinación de toxicidad aguda (NCh2083 1999).

Para establecer el cultivo de aclimatación se comenzó un nuevo cultivo con una densidad máxima de 20 neonatos en recipientes de 40 ml (primera generación) del cultivo de mantención; entre 15 a 20 días todos los individuos se reprodujeron. Los individuos iniciales se eliminaron y se inició un nuevo cultivo con sus neonatos (segunda generación). Después de 15 días la segunda generación se reprodujo, y sus neonatos (tercera generación) se utilizaron para las pruebas de toxicidad. Estos organismos fueron separados de sus correspondientes cultivos madres manualmente dentro de las 24 horas de nacidos. Durante la aclimatación los organismos se alimentaron con microalgas dos veces a la semana.

3.2.3 Ensayos preliminares toxicidad aguda

Previo al bioensayo definitivo, se realizaron los ensayos preliminares para determinar el rango de concentraciones en que se debe efectuar el ensayo definitivo. Para esto se prepararon una serie de diluciones del tóxico de referencia dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$, en recipientes de 40 ml (placas de Petri) comenzando por 0,0% hasta 100%. En total se

utilizaron 5 concentraciones geométricas preliminares (0,0 – 100%), más un control negativo.

La preparación de las concentraciones y el control se realizó utilizando agua de dilución (agua de mar filtrada) e inoculando en cada placa 20 organismos, divididos en tres réplicas. Después de 24, 48 y 96 horas de incubación a distintas temperaturas (ver más adelante), se registró el intervalo de concentración en que se obtiene el 0% y el 100% de inmovilización; se incubó hasta las 96 horas siguiendo lo propuesto por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA 2002). Finalmente se registró la concentración de oxígeno disuelto en el recipiente de menor concentración de muestra, en el que todos los organismos resultaron inmovilizados.

Los ensayos preliminares se realizaron bajo tres niveles de temperatura: 25 °C como temperatura máxima, 20 °C como temperatura intermedia y 15 °C como temperatura mínima. Para llevar a cabo estos ensayos en los distintos niveles de temperatura se utilizaron incubadoras (VELP Scientifica Modelo FOC 225E). Estas temperaturas se definieron considerando el promedio de la temperatura del mar en la zona Norte, Centro y Sur de Chile (Punto 1.5.1). Durante estos bioensayos los organismos no se alimentaron y se mantuvieron sin aireación y en oscuridad.

3.2.4 Ensayos finales toxicidad aguda

Los ensayos definitivos se efectuaron para determinar el porcentaje de organismos inmovilizados para las diferentes concentraciones de la muestra en los diferentes niveles de

temperatura y su correspondiente Concentración Letal Media (Cl_{50}) a las 48 y 96 h. Ésta corresponde a la estimación de la concentración del dicromato de potasio que inmoviliza al 50% de los organismos en 48 y 96 h expresada en porcentaje de muestra o en ppm. Las pruebas definitivas fueron preparadas utilizando agua de dilución (agua de mar filtrada) e inoculando en cada placa 20 organismos, divididos en tres réplicas a las tres temperaturas seleccionadas. A las 48 y 96 h de incubación en las distintas temperaturas se contabilizaron los organismos inmovilizados. Por último, se registró la concentración de oxígeno disuelto en la placa de Petri de menor concentración de muestra, en el que todos los organismos resultaran inmovilizados. Durante estas pruebas los organismos no se alimentaron y se mantuvieron sin aireación y en oscuridad

El gradiente de concentración se preparó a partir de una solución madre de dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$ de 1.000 mg L^{-1} , la que fue diluida para obtener distintas concentraciones en progresión geométrica con un volumen final de 40 ml por unidad experimental para los ensayos preliminares y finales. La exposición al tóxico fue por 96 horas. El bioensayo se mantuvo en tres niveles de temperatura: 25°C como temperatura máxima, 20°C como temperatura intermedia y 15°C como temperatura mínima, para llevar a cabo esta aparte del bioensayo se usaron las incubadoras antes mencionadas.

3.2.5 Análisis de datos

Con los datos de mortalidad se estimó la Concentración Letal Media (CL₅₀) mediante el programa Probit (USEPA 1993), para los diferentes niveles de temperatura antes mencionados.

La calibración del bioensayo con *Harpacticus littoralis* se realizó con un total de 10 repeticiones. La precisión fue determinada mediante el cálculo (USEPA 1993) del coeficiente de variación CV (%) usando la siguiente expresión:

$$CV(\%) = \left(\frac{d.e}{\bar{X}} \right) * 100$$

Donde:

$\bar{X}$ = promedio correspondiente a los n valores de CL₅₀ 48 y 96 h generados a partir de los n bioensayos considerados en la calibración.

$d.e$ = desviación estándar.

Mientras más cercano de cero (“0”) se encuentre el valor para el CV, mayor será la precisión.

La carta de vigilancia, definida como el registro que indica la exactitud alcanzada en los valores de CL₅₀ – 24 h para el tóxico de referencia a partir de un número de 10 bioensayos consecutivos (NCh2083 1999), será la herramienta de registro que brindará los elementos de juicio para establecer los intervalos aceptables de variación de la respuesta de los organismos de ensayo a un tóxico de referencia, en este caso dicromato de potasio, con un margen de confianza de un 95%. Los valores de las CL₅₀ se dispondrán en la carta de vigilancia, para evidenciar el control de la sensibilidad de la especie empleada, de la

estabilidad de la respuesta biológica y de la repetitividad (exactitud) de los resultados obtenidos, siempre y cuando la variabilidad (CV) sea menor o igual al 30 % (Castillo 2004).

4. RESULTADOS

4.1 Ensayos preliminares toxicidad aguda en *Harpacticus littoralis* a diferentes niveles de temperatura.

Los resultados de los ensayos preliminares en *H. littoralis* se detallan en las Tablas I, II y III, en total se utilizaron 5 concentraciones geométricas (0,0 – 100%) más un control negativo divididas en 3 réplicas a 24, 48 y 96 horas de incubación para temperaturas de 15 °C, 20 °C y 25 °C.

Tabla I. Resultados de los ensayos preliminares de toxicidad aguda utilizando dicromato de potasio en *H. littoralis* a una temperatura de 15 °C. Los resultados se expresan como número de organismos inmovilizados y mortalidad (%), (n=20).

Concentración (mg/L)	5,0	17,2	59,2	203,5	700,0	0,0
Réplica 1 - 24 h.	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	2 (10%)	5 (25%)	0 (0%)
Réplica 2 - 24 h.	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (10%)	7 (35%)	0 (0%)
Réplica 3 - 24 h.	0 (0%)	0 (0%)	2 (10%)	2 (10%)	5 (25%)	0 (0%)
Mortalidad Promedio	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	2 (10%)	5,7 (28,3%)	0 (0%)
Concentración (mg/L)	5,0	17,2	59,2	203,5	700,0	0,0
Réplica 1 - 48 h.	0 (0%)	1 (5%)	2 (10%)	5 (25%)	10 (50%)	0 (0%)
Réplica 2 -48 h.	0 (0%)	0 (0%)	2 (10%)	5 (25%)	15 (75%)	0 (0%)
Réplica 3 - 48 h.	0 (0%)	0 (0%)	4 (20%)	6 (30%)	12 (60%)	0 (0%)
Mortalidad Promedio	0 (0%)	0,3 (1,7%)	2,7 (13,3%)	5,3 (26,7%)	12,3 (61,7%)	0 (0%)
Concentración (mg/L)	5,0	17,2	59,2	203,5	700,0	0,0
Réplica 1 - 96 h.	0 (0%)	3 (15%)	8 (40%)	14 (70%)	20 (100%)	0 (0%)
Réplica 2 - 96 h.	0 (0%)	4 (20%)	7 (35%)	12 (60%)	20 (100%)	0 (0%)
Réplica 3 - 96 h.	0 (0%)	5 (25%)	9 (45%)	15 (75%)	20 (100%)	0 (0%)
Mortalidad Promedio	0 (0%)	4 (20%)	8 (40%)	13,7 (68,3%)	20 (100%)	0 (0%)

Tabla II. Resultados de los ensayos preliminares de toxicidad aguda utilizando dicromato de potasio en *H. littoralis* a una temperatura de 20 °C. Los resultados se expresan como número de organismos inmovilizados y mortalidad (%), (n=20).

Concentración (mg/L)	5,0	17,2	59,2	203,5	700,0	0,0
Réplica 1 - 24 h.	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	4 (20%)	0 (0%)
Réplica 2 - 24 h.	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (10%)	6 (30%)	0 (0%)
Réplica 3 - 24 h.	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	1 (5%)	5 (25%)	0 (0%)
Mortalidad Promedio	0 (0%)	0 (0%)	0,3 (1,7%)	1,3 (6,7%)	5 (25%)	0 (0%)
Concentración (mg/L)	5,0	17,2	59,2	203,5	700,0	0,0
Réplica 1 - 48 h.	0 (0%)	0 (0%)	2 (10%)	6 (30%)	11 (55%)	0 (0%)
Réplica 2 - 48 h.	0 (0%)	0 (0%)	2 (10%)	7 (35%)	16 (80%)	0 (0%)
Réplica 3 - 48 h.	0 (0%)	1 (5%)	3 (15%)	5 (25%)	11 (55%)	0 (0%)
Mortalidad Promedio	0 (0%)	0,3 (1,7%)	2,3 (11,7%)	6 (30%)	12,7 (63,3%)	0 (0%)
Concentración (mg/L)	5,0	17,2	59,2	203,5	700,0	0,0
Réplica 1 - 96 h.	1 (5%)	3 (15%)	7 (35%)	15 (75%)	20 (100%)	0 (0%)
Réplica 2 - 96 h.	0 (0%)	3 (15%)	8 (40%)	16 (80%)	20 (100%)	0 (0%)
Réplica 3 - 96 h.	0 (0%)	4 (20%)	7 (35%)	13 (65%)	20 (100%)	0 (0%)
Mortalidad Promedio	0,3 (1,7%)	3,3 (16,7%)	7,3 (36,7%)	14,7 (73,3%)	20 (100%)	0 (0%)

Tabla III. Resultados de los ensayos preliminares de toxicidad aguda utilizando dicromato de potasio en *H. littoralis* a una temperatura de 25 °C. Los resultados se expresan como número de organismos inmovilizados y mortalidad (%), (n=20).

Concentración (mg/L)	5,0	17,2	59,2	203,5	700,0	0,0
Réplica 1 - 24 h.	0 (0%)	2 (10%)	3 (15%)	5 (25%)	8 (40%)	0 (0%)
Réplica 2 - 24 h.	0 (0%)	1 (5%)	3 (15%)	4 (20%)	9 (45%)	0 (0%)
Réplica 3 - 24 h.	0 (0%)	0 (0%)	2 (10%)	5 (25%)	9 (45%)	0 (0%)
Mortalidad Promedio	0 (0%)	1 (5%)	2,6 (13,3%)	4,6 (23,3%)	8,6 (43,3%)	0 (0%)
Concentración (mg/L)	5,0	17,2	59,2	203,5	700,0	0,0
Réplica 1 - 48 h.	0 (0%)	5 (25%)	9 (45%)	11 (55%)	18 (90%)	0 (0%)
Réplica 2 - 48 h.	1 (5%)	3 (15%)	7 (35%)	9 (45%)	17 (85%)	0 (0%)
Réplica 3 - 48 h.	0 (0%)	2 (10%)	7 (35%)	12 (60%)	19 (95%)	0 (0%)
Mortalidad Promedio	0,3 (1,7%)	3,3 (16,7%)	7,7 (38,3%)	10,7 (53,3%)	18 (90%)	0 (0%)
Concentración (mg/L)	5,0	17,2	59,2	203,5	700,0	0,0
Réplica 1 - 96 h.	1 (5%)	7 (35%)	12 (60%)	19 (95%)	20 (100%)	0 (0%)
Réplica 2 - 96 h.	2 (10%)	6 (30%)	13 (65%)	18 (90%)	20 (100%)	0 (0%)
Réplica 3 - 96 h.	1 (5%)	5 (25%)	11 (55%)	20 (100%)	20 (100%)	0 (0%)
Mortalidad Promedio	1,3 (6,7%)	6 (30%)	12 (60%)	19 (95%)	20 (100%)	0 (0%)

4.2 Ensayos finales toxicidad aguda en *Harpacticus littoralis* a diferentes niveles de temperatura.

Los resultados de los ensayos finales en *H. littoralis* se detallan en las Tablas IV, V y VI. En los ensayos definitivos se utilizaron las concentraciones que en el ensayo preliminar presentaron entre 0% (o cercano a este porcentaje) y 100% de inmovilización, dado que el 0% de inmovilización se halló en el control y que desde los 700,0 mg/L en adelante a las 96 horas incubación hubo 100% de mortalidad, se ensayaron diferentes concentraciones entre 0,0 y 700,0 mg/L; en total se utilizaron 5 concentraciones geométricas más un control negativo divididas en 3 réplicas a 24, 48 y 96 horas de incubación para los diferentes niveles de temperaturas.

Tabla IV. Resultados de los ensayos finales de toxicidad aguda utilizando dicromato de potasio en *H. littoralis* a una temperatura de 15 °C. Los resultados se expresan como número de organismos inmovilizados y mortalidad (%), (n=20).

Concentración (mg/L)	1,0	2,7	7,1	18,8	50,0	0,0
Réplica 1 - 24 h.	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	0 (0%)
Réplica 2 - 24 h.	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	2 (10%)	4 (20%)	0 (0%)
Réplica 3 - 24 h.	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	2 (10%)	3 (15%)	0 (0%)
Mortalidad Promedio	0 (0%)	0 (0%)	0,7 (3,3%)	1,3 (6,7%)	2,7 (13,3%)	0 (0%)
Concentración (mg/L)	1,0	2,7	7,1	18,8	50,0	0,0
Réplica 1 - 48 h.	0 (0%)	1 (5%)	1 (5%)	3 (15%)	6 (30%)	0 (0%)
Réplica 2 - 48 h.	0 (0%)	0 (0%)	2 (10%)	3 (15%)	9 (45%)	0 (0%)
Réplica 3 - 48 h.	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	5 (25%)	10 (50%)	0 (0%)
Mortalidad Promedio	0 (0%)	0,3 (1,7%)	1,3 (6,7%)	3,7 (18,3%)	8,3 (41,7%)	0 (0%)
Concentración (mg/L)	1,0	2,7	7,1	18,8	50,0	0,0
Réplica 1 - 96 h.	0 (0%)	3 (15%)	5 (25%)	12 (60%)	20 (100%)	0 (0%)
Réplica 2 - 96 h.	0 (0%)	4 (20%)	6 (30%)	10 (50%)	20 (100%)	0 (0%)
Réplica 3 - 96 h.	0 (0%)	5 (25%)	4 (20%)	11 (55%)	20 (100%)	0 (0%)
Mortalidad Promedio	0 (0%)	4 (20%)	5 (25%)	11 (55%)	20 (100%)	0 (0%)

Tabla V. Resultados de los ensayos finales de toxicidad aguda utilizando dicromato de potasio en *H. littoralis* a una temperatura de 20 °C. Los resultados se expresan como número de organismos inmovilizados y mortalidad (%), (n=20).

Concentración (mg/L)	1,0	2,7	7,1	18,8	50,0	0,0
Réplica 1 - 24 h.	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	3 (15%)	0 (0%)
Réplica 2 - 24 h.	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	2 (10%)	3 (15%)	0 (0%)
Réplica 3 - 24 h.	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	2 (10%)	3 (15%)	0 (0%)
Mortalidad Promedio	0 (0%)	0 (0%)	0,7 (3,3%)	1,7 (8,3%)	3 (15%)	0 (0%)
Concentración (mg/L)	1,0	2,7	7,1	18,8	50,0	0,0
Réplica 1 - 48 h.	0 (0%)	0 (0%)	2 (10%)	5 (25%)	8 (40%)	0 (0%)
Réplica 2 - 48 h.	0 (0%)	0 (0%)	2 (10%)	4 (20%)	11 (55%)	0 (0%)
Réplica 3 - 48 h.	0 (0%)	1 (5%)	1 (5%)	3 (15%)	9 (45%)	0 (0%)
Mortalidad Promedio	0 (0%)	0,3 (1,7%)	1,7 (8,3%)	4 (20%)	9,3 (46,7%)	0 (0%)
Concentración (mg/L)	1,0	2,7	7,1	18,8	50,0	0,0
Réplica 1 - 96 h.	2 (10%)	5 (25%)	8 (40%)	15 (75%)	20 (100%)	0 (0%)
Réplica 2 - 96 h.	0 (0%)	4 (20%)	5 (25%)	15 (75%)	20 (100%)	0 (0%)
Réplica 3 - 96 h.	0 (0%)	4 (20%)	6 (30%)	15 (75%)	20 (100%)	0 (0%)
Mortalidad Promedio	0,7 (3,3%)	4,3 (21,7)	6,3 (31,7%)	15 (75%)	20 (100%)	0 (0%)

Tabla VI. Resultados de los ensayos finales de toxicidad aguda utilizando dicromato de potasio en *H. littoralis* a una temperatura de 25 °C. Los resultados se expresan como número de organismos inmovilizados y mortalidad (%), (n=20).

Concentración (mg/L)	1,0	2,7	7,1	18,8	50,0	0,0
Réplica 1 - 24 h.	0 (0%)	0 (0%)	2 (10%)	3 (15%)	5 (25%)	0 (0%)
Réplica 2 - 24 h.	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	2 (10%)	4 (20%)	0 (0%)
Réplica 3 - 24 h.	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	2 (10%)	5 (25%)	0 (0%)
Mortalidad Promedio	0 (0%)	0 (0%)	1,3 (6,7%)	2,3 (11,7%)	4,7 (23,3%)	0 (0%)
Concentración (mg/L)	1,0	2,7	7,1	18,8	50,0	0,0
Réplica 1 - 48 h.	0 (0%)	1 (5%)	3 (15%)	9 (45%)	13 (65%)	0 (0%)
Réplica 2 - 48 h.	0 (0%)	1 (5%)	3 (15%)	9 (45%)	12 (60%)	0 (0%)
Réplica 3 - 48 h.	0 (0%)	1 (5%)	3 (15%)	10 (50%)	15 (75%)	0 (0%)
Mortalidad Promedio	0 (0%)	1 (5%)	3 (15%)	9,3 (46,7%)	13,3 (66,7%)	0 (0%)
Concentración (mg/L)	1,0	2,7	7,1	18,8	50,0	0,0
Réplica 1 - 96 h.	3 (15%)	3 (15%)	10 (50%)	18 (90%)	20 (100%)	0 (0%)
Réplica 2 - 96 h.	2 (10%)	4 (20%)	9 (45%)	19 (95%)	20 (100%)	0 (0%)
Réplica 3 - 96 h.	2 (10%)	3 (15%)	10 (50%)	17 (85%)	20 (100%)	0 (0%)
Mortalidad Promedio	2,3 (11,7%)	3,3 (16,7%)	9,7 (48,3%)	18 (90%)	20 (100%)	0 (0%)

4.3 Cálculo de Cl_{50} 48 y 96 horas en *Harpacticus littoralis* a diferentes niveles de temperatura.

El cálculo de la Cl_{50} según lo establecido en la norma chilena para determinación de toxicidad aguda (NCh2083 1999), es a las 24 y 48 horas, en cambio la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA 2002) dice que el cálculo debe realizarse hasta las 96 h, por lo tanto se realizó el cálculo de la Cl_{50} a las 48 y 96 h para evidenciar diferencias entre las 48 y 96 h. Para la utilizar el programa Probit en el cálculo de la Cl_{50} se requiere que los datos no sean significativamente heterogéneos lo cual fue verificado usando el test de chi-cuadrado (X^2). En la Tabla VII se muestran los resultados

del test de X^2 a las 48 y 96 horas utilizando *H. littoralis* a diferentes niveles de temperatura.

Tabla VII. Resultados para el test de X^2 a las 48 y 96 horas obtenidos de los ensayos de toxicidad aguda utilizando dicromato de potasio en *H. littoralis* a diferentes niveles de temperatura (n=20).

	Temperaturas					
	48 horas			96 horas		
	15 °C	20 °C	25 °C	15 °C	20 °C	25 °C
X^2 para Homogeneidad (calculado)	0,050	0,139	0,548	6,927	3,167	3,732
x^2 para Homogeneidad (tabulado)	7,815	7,815	7,815	7,815	7,815	7,815
(nivel de significación del 5%)						

De la Tabla VII se desprende que como el X^2 calculado es menor en todos los casos y a todas las temperaturas que el X^2 tabulado, por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula, que en este caso era que los datos provenían de una distribución normal con un nivel de significación del 5%, es decir, se utilizará el programa Probit en el cálculo de la Cl_{50} .

Los parámetros de la curva resultante a las 48 y 96 horas utilizando *H. littoralis* a diferentes niveles de temperaturas se detallan en la Tabla VIII.

Tabla VIII. Parámetros de la curva dosis-respuesta obtenidos de los ensayos de toxicidad aguda utilizando dicromato de potasio en *H. littoralis* a 48 y 96 horas a diferentes niveles de temperatura (n=20).

Temperatura 15 °C						
48 horas			96 horas			
	Estimado	Error Estándar	LC (95%)	Estimado	Error Estándar	LC (95%)
b	2,10708	0,614939	(0,901800; 3,312361)	2,775919	0,389118	(2,013248; 3,538590)
m	1,57731	0,446284	(0,702596; 2,452028)	2,108490	0,350771	(1,420979; 2,796000)
μ		1,834082			1,054822	
σ		0,633990			0,474273	
Temperatura 20 °C						
48 horas			96 horas			
	Estimado	Error Estándar	LC (95%)	Estimado	Error Estándar	LC (95%)
b	2,147137	0,588580	(0,993514; 3,300748)	3,042033	0,351242	(2,353599; 3,730467)
m	1,621910	0,430963	(0,777223; 2,466597)	2,131220	0,344817	(1,455378; 2,807061)
μ		1,758957			0,918707	
σ		0,616557			0,469215	
Temperatura 25 °C						
48 horas			96 horas			
	Estimado	Error Estándar	LC (95%)	Estimado	Error Estándar	LC (95%)
b	2,528555	0,447894	(1,650682; 3,406427)	3,343789	0,31876	(2,719018; 3,968559)
m	1,761252	0,354649	(1,066140; 2,456365)	2,164815	0,35067	(1,477505; 2,852126)
μ		1,403232			0,765059	
σ		0,567778			0,461933	
b	: Intercepto					
m	: Pendiente					
μ	: Media					
σ	: Desviación Estándar					
LC	: Límites de Confianza.					

En la Tabla VIII el parámetro pendiente (m) en todos los casos es significativamente distinto de cero (“0”), por lo que es posible calcular las Cl_{50} con la confianza establecida en los LC (95%).

A continuación en la Tabla IX se detallan los resultados de los cálculos de las Cl_{50} 48 y 96 horas en *H. littoralis*, para los diferentes niveles de temperatura.

Tabla IX. Concentraciones Letales (Cl) – 48 h y 96 h obtenidas de los ensayos de toxicidad aguda utilizando dicromato de potasio en *H. littoralis* a diferentes niveles de temperatura (n=20).

Temperatura 15 °C			
	Concentración Expuesta (mg/L)	L.C (95%)	
		Inferior	Superior
Cl ₅₀ - 48 h	68,247	36,774	366,736
Cl ₅₀ - 96 h	11,345	7,955	16,589
Temperatura 20 °C			
	Concentración Expuesta (mg/L)	L.C (95%)	
		Inferior	Superior
Cl ₅₀ - 48 h	57,406	32,686	221,325
Cl ₅₀ - 96 h	8,293	5,809	11,919
Temperatura 25 °C			
	Concentración Expuesta (mg/L)	L.C (95%)	
		Inferior	Superior
Cl ₅₀ - 48 h	25,306	16,678	46,517
Cl ₅₀ - 96 h	5,822	4,057	8,277

LC : Límites de Confianza.

De lo anterior se desprende que la Cl₅₀ - 48 h utilizando dicromato de potasio determinada a través de los bioensayos de toxicidad aguda con *H. littoralis* fue de **68, 247 mg/L**, **57,406 mg/L** y **25,306 mg/L** para temperaturas de 15 °C, 20 °C y 25 °C, respectivamente. Y la Cl₅₀ - 96 h para dicromato de potasio determinada también a través de los mismos bioensayos fue de **11,345 mg/L**, **8,293 mg/L** y **5,822 mg/L** para temperaturas de 15 °C, 20 °C y 25 °C, respectivamente.

4.4 Validez de resultados.

La validez de los resultados se ha considerado en función de lo expuesto por la normativa actual (NCh2083 1999) y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA 2002). Ambos documentos hacen referencia que los resultados se considerarán válidos siempre y cuando se cumplan las siguientes condiciones durante el ensayo.

- La concentración de oxígeno disuelto en el recipiente de menor concentración de muestra, en el que todos los organismos resulten inmovilizados debe ser mayor o igual a 2,0 mg/L (NCh2083 1999).
- La concentración de oxígeno disuelto no debe estar por debajo de 4,0 mg/L en especies de agua fría y de 6,0 mg/L en especies de aguas calientes (USEPA 2002).
- El porcentaje de inmovilización en el control debe ser menor o igual al 10 %. (NCh2083 1999).
- Las supervivencias en los controles deben ser al menos del 90% (USEPA 2002).
- Las concentraciones no deben variar en más de un 20% durante se realicen las pruebas en ningún nivel de tratamiento durante el período de exposición (USEPA 2002).

En esta Tesis la concentración de oxígeno disuelto en el recipiente de menor concentración de muestra (50,0 mg/L) en los ensayos con *H. littoralis* a las 96 h fue de 5,8; 5,9 y 6,0 mg/L a las temperaturas de 15 °C, 20 °C y 25 °C respectivamente. Por otro lado a las 24 y 48 h no se midió la concentración de oxígeno disuelto en ninguno de los casos, debido a que en los recipientes de menor concentración de muestra no todos los organismos resultaron inmovilizados. El porcentaje de inmovilización en los controles fue menor al

10% (0% a las 24, 48 y 96 h). La concentración del tóxico de referencia dicromato de potasio no varió más de un 20% en ninguna de las 5 concentraciones geométricas utilizadas en los ensayos con *H. littoralis*.

4.5 Calibración del método.

La calibración del bioensayo con *Harpacticus littoralis* se realizó con un total de 10 repeticiones. Los datos de las Cl_{50} - 48 h y Cl_{50} - 96 h y sus límites de confianza inferior (LCI) y superior (LCS) estimados de los bioensayos de toxicidad aguda de *H. littoralis* utilizando dicromato de potasio para los diferentes niveles de temperatura se presentan en la Tabla X.

Tabla X. Concentraciones letales (Cl_{50} - 48 h y Cl_{50} - 96 h) del dicromato de potasio y sus límites de confianza para *H. littoralis* a diferentes niveles de temperatura (n = 10 bioensayos).

Temperatura 15 °C							
Nº	Cl_{50} - 48 h	LCI	LCS	Nº	Cl_{50} - 96 h	LCI	LCS
1	108,152	46,616	2366,431	1	11,349	7,982	16,520
2	88,266	39,622	1034,097	2	10,378	7,216	15,261
3	68,681	34,723	417,901	3	9,137	6,343	13,349
4	118,201	46,850	3680,611	4	11,467	8,177	16,370
5	108,889	44,941	2463,460	5	11,897	8,434	17,166
6	101,445	46,495	1820,097	6	12,513	8,827	18,251
7	98,734	43,581	1546,516	7	11,307	8,031	16,223
8	125,333	46,265	5413,345	8	11,297	8,069	16,081
9	115,320	46,883	3223,729	9	11,735	8,200	17,290
10	166,113	52,539	30328,611	10	11,972	8,390	17,584
Temperatura 20 °C							
Nº	Cl_{50} - 48 h	LCI	LCS	Nº	Cl_{50} - 96 h	LCI	LCS
1	58,119	33,647	220,823	1	8,075	5,686	11,523
2	50,129	28,366	173,995	2	6,783	4,822	9,523
3	61,535	34,165	270,021	3	7,435	5,141	10,774
4	60,107	31,191	298,887	4	7,577	5,387	10,677
5	45,621	24,988	163,813	5	8,047	5,581	11,678
6	70,104	31,625	626,177	6	8,446	5,754	12,551
7	49,357	28,161	166,177	7	6,725	4,749	9,500
8	53,852	29,070	221,396	8	6,668	4,758	9,326
9	63,429	31,148	387,535	9	7,795	5,470	11,147
10	60,167	29,935	339,354	10	7,454	5,297	10,502
Temperatura 25 °C							
Nº	Cl_{50} - 48 h	LCI	LCS	Nº	Cl_{50} - 96 h	LCI	LCS
1	23,023	15,204	41,294	1	6,130	4,211	8,844
2	19,222	12,646	33,603	2	6,092	4,259	8,655
3	22,833	14,357	45,632	3	5,451	3,684	7,921
4	22,129	13,814	44,670	4	5,133	3,462	7,447
5	22,108	13,865	44,136	5	5,136	3,475	7,432
6	25,198	14,916	59,885	6	4,728	3,237	6,755
7	20,189	12,998	37,294	7	5,052	3,372	7,378
8	20,395	12,947	38,936	8	4,996	3,435	7,132
9	20,527	12,851	40,488	9	4,530	3,021	6,575
10	21,335	13,397	42,143	10	4,525	3,057	6,511

LCI : Límite de Confianza Inferior.

LCS : Límite de Confianza Superior.

Los valores de los estadísticos descriptivos, promedio, desviación estándar (d.e), coeficiente de variación, cuartiles superior e inferior, curtosis y rango intermedio para las 10 repeticiones de las Cl₅₀ - 48 h y Cl₅₀ - 96 h a los diferentes niveles de temperatura, se señalan en la Tabla XI.

Tabla XI. Estadísticos descriptivos para las Cl₅₀ - 48 h y Cl₅₀ - 96 de dicromato de potasio como tóxico de referencia en bioensayos de toxicidad aguda con *H. littoralis* a diferentes niveles de temperatura (n =10 bioensayos).

	48 horas		
	Temperatura 15 °C	Temperatura 20 °C	Temperatura 25 °C
Promedio (mg/L)	109,91	57,24	21,68
Desviación estándar (d.e)	25,52	7,45	1,71
Valor mínimo	68,68	50,13	19,22
Valor máximo	171,89	70,10	25,20
Cuartil inferior	99,41	51,06	20,43
Cuartil superior	117,48	61,19	22,66
Rango intercuartil	18,07	10,13	2,23
Curtosis	2,43	-0,50	0,32
Coeficiente de Variación (%)	23,22	13,01	7,90

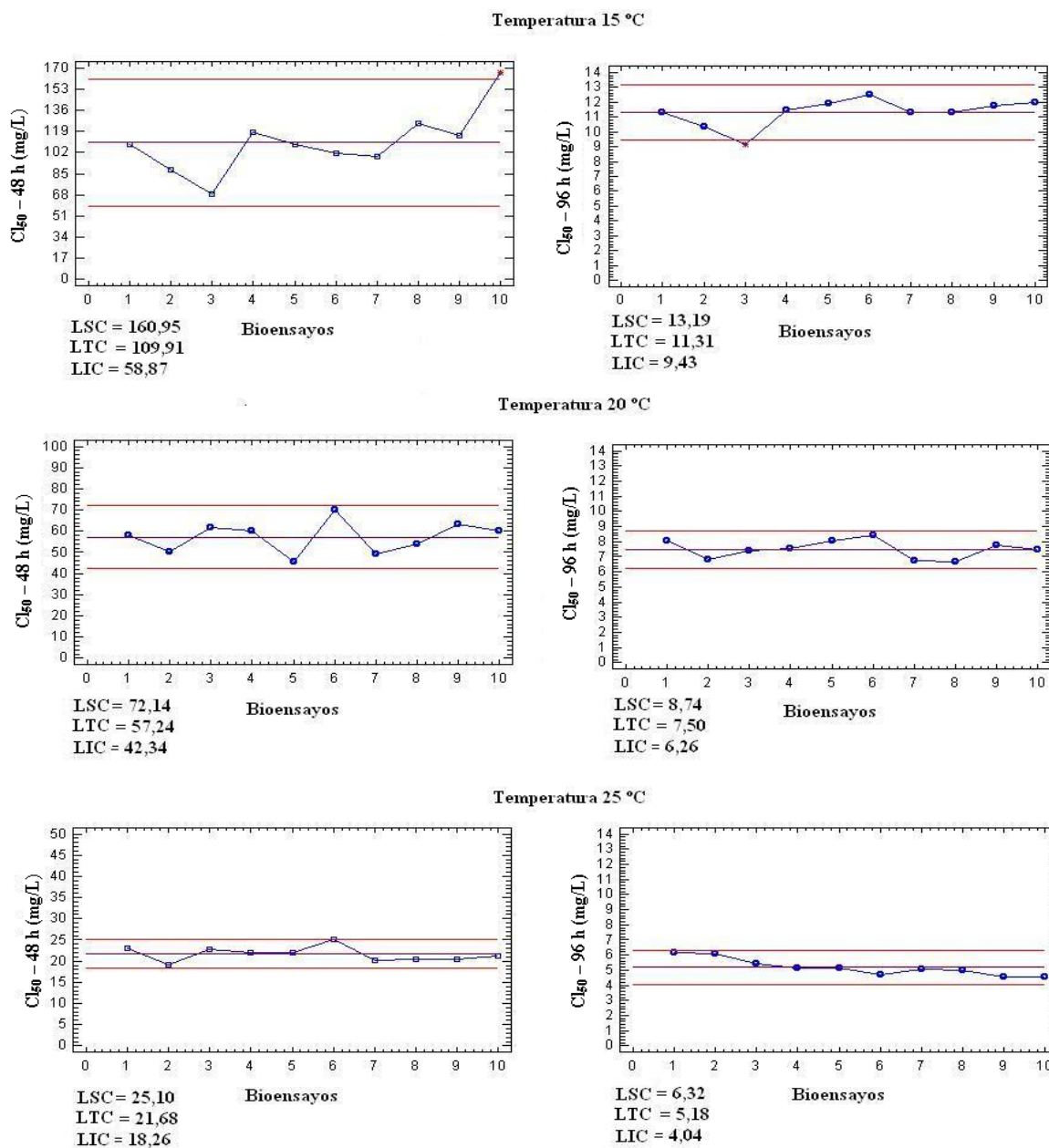
	96 horas		
	Temperatura 15 °C	Temperatura 20 °C	Temperatura 25 °C
Promedio (mg/L)	11,31	7,50	5,18
Desviación estándar (d.e)	0,94	0,62	0,57
Valor mínimo	9,14	6,67	4,53
Valor máximo	12,51	8,45	5,45
Cuartil inferior	11,30	6,95	4,80
Cuartil superior	11,86	7,98	5,37
Rango intercuartil	0,56	1,04	0,58
Curtosis	2,61	-1,17	-0,34
Coeficiente de Variación (%)	8,35	8,23	11,00

Las Cl_{50} - 48 h y Cl_{50} - 96 h promediadas de los 10 bioensayos a las temperaturas de 15 °C, 20 °C y 25 °C fueron de **109,91 mg/L**, **57,24 mg/L** y **21,68 mg/L** para las 48 h y para las 96 h fueron de **11,31 mg/L**, **7,50 mg/L** y **5,18 mg/L**, respectivamente. Los coeficientes de variación (CV) de las Cl_{50} - 48 h y Cl_{50} - 96 a las temperaturas de 15 °C, 20 °C y 25 °C fueron de **23,22%**, **13,01%** y **7,90%** para las 48 h y de **8,35 %**, **8,23%** y **11,0%** para las 96 h; lo cual indica una variabilidad inferior al máximo permitido ($CV \leq 30\%$) (NCh2083 1999).

4.6 Carta de vigilancia.

Se confeccionó una carta de vigilancia para cada una de las temperaturas antes mencionadas con los datos ($n = 10$ bioensayos) obtenidos de la estandarización del bioensayo de *H. littoralis* con dicromato de potasio (Figura 4). La línea de tendencia central (LTC) representa la Cl_{50} - 48 h (LTC_{48h}) y Cl_{50} - 96 h (LTC_{96h}) promedio.

La LTC_{48h} fue de **109,91 mg/L** cuyos límites superior (LSC) e inferior (LIC) de confianza al 95% fueron de **160,95** y **58,87 mg/L**, respectivamente y la LTC_{96h} fue de **11,31 mg/L** cuyos LSC y LIC al 95% fueron de **13,19** y **9,43 mg/L** respectivamente para una temperatura de 15 °C. La LTC_{48h} fue de **57,24 mg/L** cuyos LSC y LIC al 95% fueron de **72,14** y **42,34 mg/L** respectivamente y la LTC_{96h} fue de **7,50 mg/L** cuyos LSC y LIC al 95% fueron de **8,74** y **6,26 mg/L**, para una temperatura de 20 °C. Por último, para una temperatura de 25 °C, la LTC_{48h} fue de **21,68 mg/L** cuyos LSC y LIC al 95% fueron de **25,10** y **18,26 mg/L** respectivamente; y la LTC_{96h} fue de **5,18 mg/L** cuyos LSC y LIC al 95% fueron de **6,32** y **4,04 mg/L** respectivamente.



LSC : Límite Superior de Confianza.
LIC : Límite Inferior de Confianza.
LTC : Límite de Tendencia Central

Figura 4. Carta de vigilancia para el bioensayo agudo de *H. littoralis* con el tóxico de referencia dicromato de potasio a diferentes niveles de temperatura (n =10 bioensayos).

4.7 Influencia de la temperatura

Se realizaron bioensayos en *H. littoralis* con dicromato de potasio bajo diferentes regímenes de temperatura que incluyen las variaciones térmicas en las comunidades naturales. En la Figura 5 se detalla el efecto del dicromato de potasio sobre la sobrevivencia del copépodo a temperaturas de 15 °C, 20 °C y 25 °C a 48 y 96 h en los 10 bioensayos consecutivos. La figura muestra que para las temperaturas de 15 °C, 20 °C y 25 °C a las 48 h no hubo 100% de mortalidad en *H. littoralis* a 50 mg/L de dicromato de potasio, en cambio a las 96 h para las mismas temperaturas el 100% de la mortalidad del copépodo se observó en 50 mg/L de dicromato de potasio.

La sensibilidad de *H. littoralis* frente al dicromato de potasio expresada como el promedio de las Cl_{50} - 48 h y Cl_{50} - 96 h es mayor al aumentar la temperatura; por ejemplo para una temperatura de 15 °C a las 48 h la Cl_{50} promedio fue de 109,91 mg/L, y al aumentar la temperatura hasta 25 °C la Cl_{50} promedio fue de 21,68 mg/L a las 48 h (Tabla XI). El rango de los intervalos de confianza al 95% para la Cl_{50} - 96 h sugiere que existen diferencias en los 10 bioensayos realizados en *H. littoralis* con dicromato de potasio en las tres temperaturas 15 °C, 20 °C y 25 °C (Figura 6). La variabilidad medida como la amplitud de los intervalos de confianza al 95% de los 10 bioensayos realizados en *H. littoralis* utilizando dicromato de potasio difiere en las tres temperaturas consideradas y disminuye con el aumento de la temperatura a las 96 h (Figura 7). Cabe destacar que no se pudo graficar la Cl_{50} - 48 horas y sus intervalos de confianza, ni tampoco la variabilidad estadística de la Cl_{50} - 48 horas para los 10 bioensayos, debido a que existe un valor muy alejado de los límites de control en las 48 horas para una temperatura de 15 °C (Figura 4).

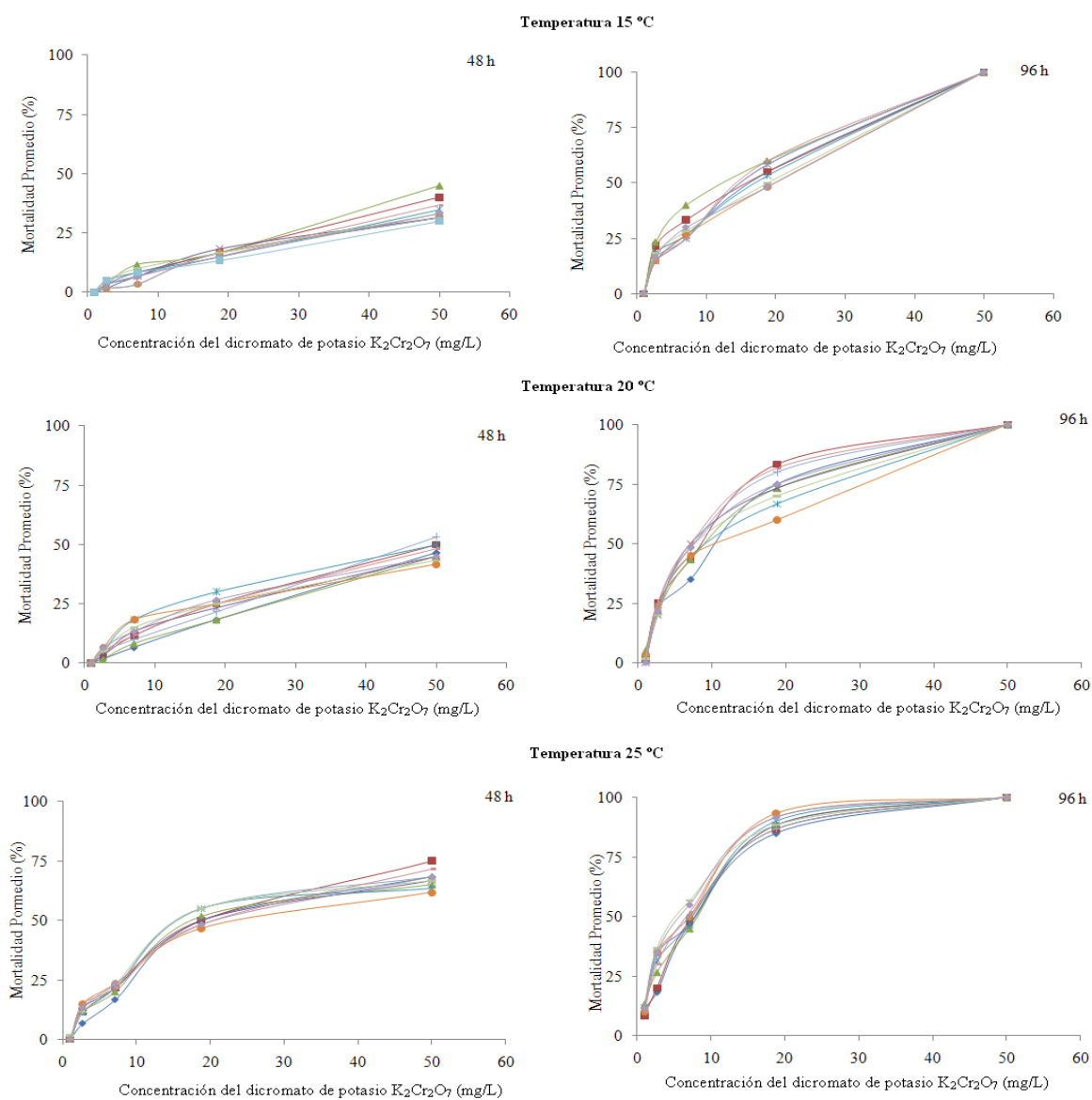
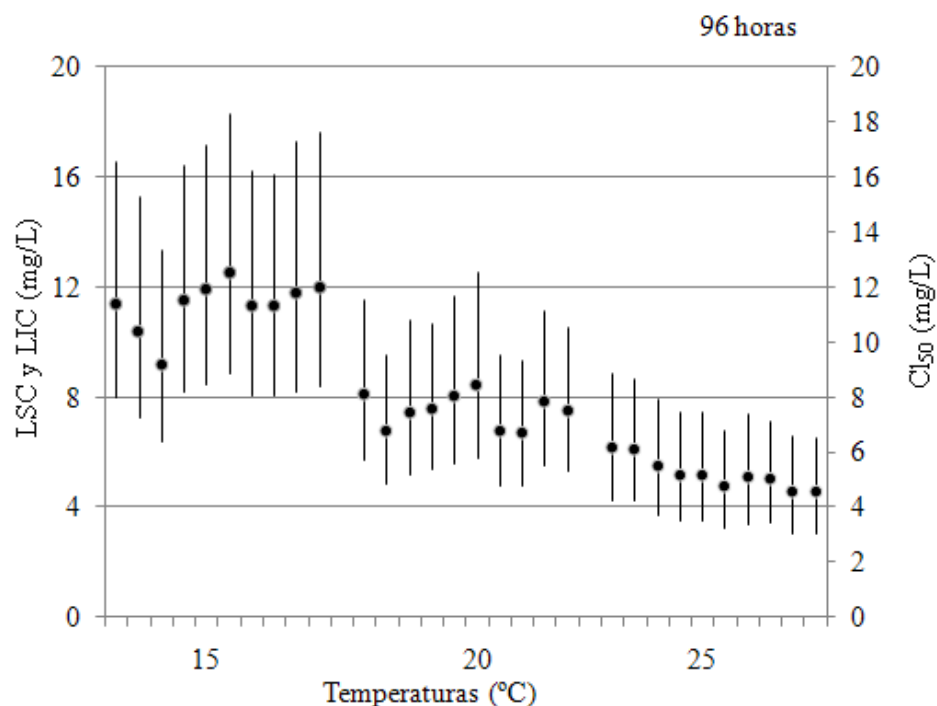


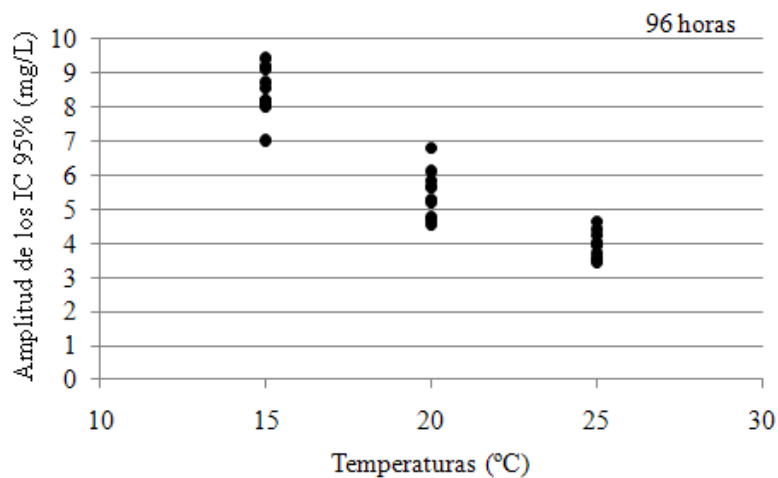
Figura 5. Efecto del dicromato de potasio, sobre la sobrevivencia del copépodo

H. littoralis bajo tres regímenes de temperatura a las 48 y 96 h. Cada grupo representa los 10 bioensayos.



LSC : Límite Superior de Confianza.
 LIC : Límite Inferior de Confianza.

Figura 6. Cl_{50} - 96 horas y los intervalos de confianza para los 10 bioensayos utilizando dicromato de potasio en *H. littoralis* bajo tres regímenes de temperatura.



IC : Intervalo de Confianza.

Figura 7. Variabilidad estadística de la Cl_{50} - 96 horas para los 10 bioensayos utilizando dicromato de potasio en *H. littoralis* bajo tres regímenes de temperatura.

4.8 Aplicación práctica

En este trabajo se realizó una aplicación práctica utilizando el copépodo *Harpacticus littoralis* en bioensayo agudo, para evaluar la toxicidad del producto desinfectante **BIOCIDA MAXAM 15**.

Este producto, es un biocida de rápida acción y con cualidades desinfectantes de gérmenes, esporas y virus patógenos. De acuerdo a su fabricante y distribuidor, **DifemPharma, MAXAM 15** reduce la formación de algas en instalaciones y embarcaciones y remueve las escamas producidas por el agua dura en todos los tipos de equipos de permutación térmica. Dentro de sus usos es recomendado para el control de olores, reduce la formación de algas y ayuda a detener la corrosión producida por las bacterias.

MAXAM 15 se presenta como un líquido amarillo, inodoro e insípido, con una densidad de 1,4 g/cc y un pH de entre 10,0 – 14,0. Es soluble en alcoholes alifáticos y su ingrediente activo es el dióxido de cloro 150.000 ppm. De acuerdo al fabricante este producto contiene ingredientes que pueden producir irritabilidad en los ojos y piel, por lo que debe evitarse su contacto con estos órganos. Evitar asimismo su inhalación e ingestión y contacto con sustancias ácidas. Por último MAXAM 15 se presenta en bidones de 5 y 20 kg y tambores de 200 kg, se adjunta Hoja de seguridad propuesta por el fabricante en Anexo 1.

4.8.1 Resultados de los ensayos preliminares de la aplicación práctica

En los ensayos preliminares en *H. littoralis* utilizando MAXAM 15, realizados para determinar el intervalo de concentración de la muestra en la que se debía efectuar el ensayo definitivo, se utilizaron 20 ejemplares por placa y se prepararon 5 diluciones del producto (1,0 - 10,0 - 100 - 1.000 - 10.000 mg/L) más un control negativo divididas en 3 réplicas. Después de 24 y 48 horas de incubación se registró el intervalo de concentración en el que se obtuvo el 0% y el 100% de inmovilización. De los resultados anteriores se ajustaron las concentraciones a un rango de entre 10,0 y 100 ppm. Estas fueron las concentraciones ensayadas en las pruebas definitivas. Durante los bioensayos dejaron de alimentarse y se mantuvieron sin aireación y en oscuridad a una temperatura de 20 °C.

4.8.2 Resultados de los ensayos finales de la aplicación práctica

Los resultados de los ensayos finales en *H. littoralis* utilizando MAXAM 15 se detallan en la Tabla XII. En total se ensayaron 5 concentraciones en progresión geométrica (10,0 - 17,8 - 31,6 - 56,2 - 100 mg/L) más un control negativo divididas en 3 réplicas, se inocularon 20 organismos y luego de las 24 y 48 horas de incubación se contabilizaron los organismos sobrevivientes. También se registró la concentración de oxígeno disuelto en la placa de menor concentración de muestra, en el que todos los organismos resultaron inmovilizados. Los resultados del test de X^2 para las Cl_{50} 24 y 48 h se muestran en la Tabla XIII para este desinfectante. Los parámetros de la curva resultante, en tanto, se detallan en la Tabla XIV.

Por último, los resultados de los cálculos de las Cl_{50} - 24 horas y Cl_{50} - 48 horas en *H. littoralis* para el producto MAXAM 15 se muestran en la Tabla XV.

Tabla XII. Resultados de los ensayos finales de toxicidad aguda en *H. littoralis* utilizando MAXAM 15 a una temperatura de 20 °C. Los resultados se expresan como número de organismos inmovilizados y mortalidad (%).

Concentración (mg/L)	10,0	17,8	31,6	56,2	100,0	0,0
Réplica 1 - 24 h.	4 (20%)	8 (40%)	13 (65%)	15 (75%)	19 (95%)	0 (0%)
Réplica 2 - 24 h.	6 (30%)	9 (45%)	12 (60%)	14 (70%)	20 (100%)	0 (0%)
Réplica 3 - 24 h.	7 (35%)	9 (45%)	13 (65%)	13 (65%)	19 (95%)	0 (0%)
Mortalidad Promedio (%)	28,3	43,3	63,3	70,0	96,7	0
Concentración (mg/L)	10,0	17,8	31,6	56,2	100,0	0,0
Réplica 1 - 48 h.	7 (35%)	10 (50%)	14 (70%)	17 (75%)	20 (100%)	0 (0%)
Réplica 2 - 48 h.	8 (40%)	9 (45%)	16 (80%)	16 (85%)	20 (100%)	0 (0%)
Réplica 3 - 48 h.	8 (40%)	11 (55%)	15 (75%)	16 (80%)	20 (100%)	0 (0%)
Mortalidad Promedio (%)	38,3	50,0	75,0	81,7	100	0

Tabla XIII. Resultados para el test de X^2 a las 24 y 48 horas obtenidos de los ensayos de toxicidad aguda para MAXAM 15 en *H. littoralis* a una temperatura de 20 °C.

	24 horas	48 horas
X^2 para Homogeneidad (calculado)	1,985	2,065
X^2 para Homogeneidad (tabulado)	7,815	7,815
(nivel de significación del 5%)		

De la Tabla XIII se desprende que como el X^2 calculado es menor que el X^2 tabulado, no se rechaza la hipótesis nula, que en este caso era que los datos provenían de una distribución

normal con un nivel de significación del 5%, es decir, se utilizará el programa Probit en el cálculo de la Cl_{50} .

Tabla XIV. Parámetros de la curva dosis-respuesta obtenidos de los ensayos de toxicidad aguda para MAXAM 15 en *H. littoralis* a las 24 y 48 horas a una temperatura de 20 °C.

24 horas				48 horas			
	Estimado	Error Estándar	LC (95%)	Estimado	Error Estándar	LC (95%)	
b	2,411035	0,623375	(1,189219; 3,632851)	2,473231	0,655496	(1,188460; 3,758002)	
m	1,947382	0,420251	(1,123690; 2,771073)	2,111703	0,459437	(1,211208; 3,012199)	
μ		1,329459			1,196555		
σ		0,513510			0,473551		
b	: Intercepto						
m	: Pendiente						
μ	: Media						
σ	: Desviación Estándar						
LC	: Límites de Confianza.						

En la Tabla XIV el parámetro pendiente (m) en todos los caso es significativamente distinto de cero (“0”), por lo que es posible calcular las Cl_{50} con la confianza establecida en los LC (95%).

Tabla XV. Concentraciones Letales (Cl) – 24 y 48 h obtenidas de los ensayos de toxicidad aguda para MAXAM 15 utilizando *H. littoralis* a una temperatura de 20 °C.

Punto	24 horas	48 horas
	Concentración Expuesta (mg/L)	Concentración Expuesta (mg/L)
Cl 1.00	1,364	1,244
Cl 5.00	3,053	2,616
Cl 10.00	4,692	3,887
Cl 15.00	6,270	5,079
Cl 50.00	21,353	15,724
Cl 85.00	72,721	48,679
Cl 90.00	97,179	63,600
Cl 95.00	149,325	94,515
Cl 99.00	334,224	198,691

La Cl₅₀ - 24 h y Cl₅₀ - 48 h para **MAXAM 15** determinada a través de los bioensayos de toxicidad aguda con *H. littoralis* fue de **21.353 mg/L** (con un rango de 13,776 – 29,430 mg/L) y **15.724 mg/L** (con un rango de 9,396 – 21,558 mg/L) respectivamente. La concentración de oxígeno disuelto en las placas de menor concentración de muestra en el que todos los organismos resultaron inmovilizados a las 24 y 48 horas, fue de 8,86 y 8,54 mg/L (>2 mg/L), respectivamente, para *H littoralis*. El porcentaje de inmovilización de los controles para dicha especie fue menor al 10% (0% a las 24 y 48 h).

5. DISCUSIÓN

Los bioensayos de toxicidad con agentes contaminantes en organismos vivos bajo condiciones de laboratorio, se han incrementado en estos últimos tiempos debido a la brevedad con que se obtiene la información sobre la dosis letal, expresada como Cl_{50} , concentración a la cual el 50% de los organismos expuestos muere (Villamar 1996). Un aspecto trascendental en el desarrollo de los bioensayos de toxicidad aguda es la reproducibilidad de estas pruebas, consistente básicamente en obtener resultados similares con la misma sustancia química. Para llevar a cabo estas pruebas, se las debe estandarizar de acuerdo a protocolos muy definidos, estableciendo una metodología común en relación a parámetros de cultivo y experimentales, de manera de asegurar dicha reproducibilidad y permitiendo así comparar resultados (Silva *et al.* 2003). Dentro de la realización de los bioensayos es importante destacar que al implementar un bioensayo, posteriormente a la estandarización de éste, se realiza la calibración del método para determinar la precisión y exactitud de los resultados generados, con el fin de asegurarse que la respuesta de la población expuesta a un tóxico determinado se deba al efecto de éste y no a variaciones tanto en la sensibilidad del organismo expuesto como a fallas operacionales en la aplicación del método.

Es sabido que variaciones ambientales afectan la sensibilidad de los individuos a las sustancias tóxicas (Larrain *et al.* 1998b). La respuesta de los organismos para bioensayos a la sustancia tóxica esta influenciada por factores tales como la edad (los organismos jóvenes son usualmente más sensibles), dieta (los individuos bien alimentados brindan respuestas más consistentes), estrés (los organismos alterados o presionados son más

sensibles) y condiciones físicas como temperatura, luz y el nivel de oxígeno disuelto en el agua (CEPIS 1994).

Para la especie en estudio *Harpacticus littoralis* no hay información disponible en literatura con respecto a estudios ecotoxicológicos. Es importante destacar que esta especie es de amplia distribución geográfica, de fácil cultivo, con tamaño suficientemente pequeño para poseer los necesario para realizar un bioensayo, con presencia de individuos durante todo el año y de alto valor ecológico, es decir, son el alimento de estadios juveniles de peces e invertebrados bentónicos (Gee, 1987); características y criterios que debe presentar un organismo óptimo para bioensayo; sin embargo, es poco lo que se conoce sobre su biología y ciclo de vida, lo que llama la atención debido a la importancia mencionada anteriormente.

La Norma ISO 6341 (1996) recomienda la evaluación de la sensibilidad de los individuos ante soluciones de referencia como 2,4,5-triclorofenoxiacetato y dicromato de potasio; en este trabajo se utilizó dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) para evaluar la sensibilidad de *H. littoralis*. Los valores de las Cl_{50} - 48 h y Cl_{50} - 96 h para los diferentes niveles de temperatura se observan en la Tabla IX. Estos datos podrían indicar que esta especie (debido a su alta sensibilidad) sería útil para evaluar muestras de efluentes con potenciales contaminantes. Cabe mencionar que no fue posible comparar estos resultados con otros bioensayos de toxicidad debido a que no existen trabajos ecotoxicológicos realizados con esta especie. Sin embargo, estos resultados se encuentran cercanos a otro estudio de toxicidad realizado para la especie *Tisbe biminiensis* (copépodo del mismo Orden que *Harpacticus littoralis*), (Tabla XVI) en donde se observa que a concentraciones similares del mismo tóxico de referencia para una temperatura de 25 °C, *H. littoralis* parece

ser más sensible al dicromato de potasio a las 96 h que *T. biminiensis*, sin embargo es más resistente a las 48 h, esto se podría deber a que la especie *T. biminiensis* es un copépodo bentónico tropical por lo que toleraría temperaturas más elevadas que *H. littoralis*. Por lo tanto, distintos organismos pueden responder de manera diferente a la misma sustancia tóxica (Araújo-Castro *et al.* 2009).

Tabla XVI. Concentraciones Letales Media (Cl_{50}) de dicromato de potasio utilizando *Harpacticus littoralis* y *Tisbe biminiensis*.

Especies	Concentración dicromato de potasio (mg/L)	Condiciones	Duración	Cl_{50} (mg/L)	Referencia
<i>Tisbe biminiensis</i>	5,0; 10,0; 15,0; 20,0 y 25,0	25 °C	48 h	21,610	Araújo-Castro <i>et al.</i> (2009)
			96 h	10,770	
<i>Harpacticus littoralis</i>	1,0; 2,7; 7,1; 18,8 y 50,0	25 °C	48 h	25,306	Este estudio
			96 h	5,822	

Por otro lado los resultados arrojados en este estudio se encuentran por debajo de la dosis letal de este tóxico para seres humanos (26 mg/kg); se adjunta hoja de seguridad del dicromato de potasio en Anexo 2.

Al comparar los resultados de los ensayos preliminares y finales entre sí, se puede observar que existen algunas diferencias en las mortalidades promedio tanto a las 48 h como a las 96 h de exposición al tóxico de referencia. Esto puede ocurrir por dos razones: la primera, que los organismos utilizados en los ensayos preliminares no son los mismos utilizados en los ensayos finales (individuos pertenecientes a distintas cohortes de la población) por lo tanto pueden reaccionar de manera distinta frente al tóxico y a las

temperaturas expuestas. La otra razón podría ser que la especie en estudio, frente a cambios en la temperatura, es capaz de enfrentar dicha situación realizando un proceso de aclimatación. Este proceso tiene como resultado la adaptación del índice metabólico dentro de una amplia gama de variaciones térmicas, lo que permite al organismo, por una parte, disminuir el coste metabólico de vivir en aguas más cálidas, y por otra, regular el aumento del metabolismo en aguas más frías, para así poder ser activo incluso a bajas temperaturas (Cognetti *et al.* 2001).

Los bioensayos como toda herramienta de medición, deben tener cierta precisión y exactitud en sus resultados. La precisión alcanzada con los resultados de las Cl_{50} - 48 h y Cl_{50} - 96 h a las temperaturas de 15 °C, 20 °C y 25 °C en el laboratorio fue determinada mediante el cálculo del coeficiente de variación (CV), los cuales fueron de **23,22%**, **13,01%** y **7,90%** para las 48 h y de **8,35 %**, **8,23%** y **11,0%** para las 96 h; lo que se encuentra dentro de los límites permitidos ($CV \leq 30\%$) (NCh2083 1999). Mientras más cercano de cero (“0”) se encuentre el valor de CV, mayor será la precisión. Según Silva *et al.* (2003) este procedimiento se realiza para asegurar que se cumpla que los índices de toxicidad para las muestras ambientales son realmente efecto de su toxicidad y no el reflejo de alguna fuente de variabilidad introducida al sistema como variaciones en la edad de los organismos, errores en los procedimientos operativos, etc.

Considerando lo anterior, el registro que indica la exactitud alcanzada en los valores de las Cl_{50} - 48 h y Cl_{50} - 96 h para el tóxico de referencia a partir de un número de 10 bioensayos consecutivos es la **carta de vigilancia**. Esta carta evidencia el control de la sensibilidad de la especie empleada, de la estabilidad de la respuesta biológica y de la

repetitividad (exactitud) de los resultados obtenidos, siempre y cuando la variabilidad (CV) sea menor o igual al 30 % (Castillo 2004). El rango de sensibilidad representado por los límites inferior (LCI) y superior (LCS) de confianza al 95% estimados de los bioensayos de toxicidad aguda con *H. littoralis* utilizando dicromato de potasio fueron a las 48 h de: **160,95 y 58,87 mg/L** para 15 °C, **72,14 y 42,34 mg/L** para 20 °C y **25,10 y 18,26 mg/L** a 25 °C. A su vez, a las 96 h, los LCS y LCI al 95% fueron a temperaturas de 15 °C, 20 °C y 25 °C respectivamente de: **13,19 y 9,43 mg/L; 8,74 y 6,26 mg/L; y 6,32 y 4,04 mg/L.**

Las Cl_{50} - 48 h y Cl_{50} - 96 h promediadas de los 10 bioensayos a las temperaturas de 15 °C, 20 °C y 25 °C fueron de **109,91 mg/L, 57,24 mg/L y 21,68 mg/L** para las 48 h y para las 96 h fueron de **11,31 mg/L, 7,50 mg/L y 5,18 mg/L**, respectivamente.

Con la carta de vigilancia se pudo observar que para las temperaturas de 20 °C y 25 °C tanto para las 48 h como para las 96 h, no se registraron puntos fuera de los intervalos de confianza establecidos; mientras que para una temperatura de 15 °C tanto a las 48 h como a las 96 h existen puntos fuera del intervalo de confianza establecido (Figura 4). Esto se podría deber a que, con una probabilidad asociada de 5% se espera que uno de cada 20 ensayos caiga fuera de los límites de control por pura casualidad (USEPA 2002), o bien exista algún cambio en la consistencia metodológica o alteración en la sensibilidad del organismo. En todo caso, el comportamiento de la carta de vigilancia puede cambiar en el tiempo reduciendo los intervalos de confianza en la medida que se adquiere un mayor manejo en el procedimiento, con el fin de que cada laboratorio pueda demostrar la capacidad de obtener resultados confiables (USEPA 2002). Con relación a lo mencionado, el número de resultados consecutivos contemplados se ajusta a lo establecido en la norma

chilena para determinación de toxicidad aguda (NCh2083) y a lo recomendado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA 2002).

En cuanto a la influencia de la temperatura, resulta importante señalar que las diversas actividades de los organismos se desarrollan dentro de determinados límites térmicos (Cognetti *et al.* 2001). El efecto del dicromato de potasio en los 10 bioensayos realizados indica que para temperaturas de 15 °C, 20 °C y 25 °C a las 96 h hubo 100% de mortalidad en *H. littoralis* a 50 mg/L de dicromato de potasio; estos resultados se acercan a los de un estudio de toxicidad realizado con el copépodo marino *Tisbe longicornis* (copépodo del mismo Orden que *Harpacticus littoralis*), en donde los bioensayos fueron realizados dentro de un rango de temperaturas que incluyen variaciones térmicas en las comunidades naturales de dicha especie, con el fin de evaluar el uso de *T. longicornis* como un indicador de la contaminación en la meiofauna de las comunidades costeras fuera de la zona central de Chile (Tabla XVII). Las diferencias en ambos bioensayos pueden ser consecuencia de que *T. longicornis* es un copépodo bentónico que habita aguas más frías que *H. littoralis* (Larrain *et al.* 1998b).

Tabla XVII. Efecto del dicromato de potasio utilizando *Harpacticus littoralis* y *Tisbe longicornis*.

Especies	Concentración dicromato de potasio (mg/L)	Condiciones	Duración	Mortalidad (%)	Referencia
<i>Tisbe longicornis</i>	100	13 °C			Larrain <i>et al.</i> (1998b)
	50	16,5 °C	48 h	100	
	22	20 °C			
<i>Harpacticus littoralis</i>	50	15 °C			Este estudio
	50	20 °C	96 h	100	
	50	25 °C			

Otro aspecto destacable de la influencia de la temperatura sobre la sensibilidad del organismo de ensayo empleado ha sido que al aumentar la temperatura se produce un aumento en la sensibilidad de la especie, expresada como el promedio de las Cl_{50} tanto a las 48 h como a las 96 h para los diferentes niveles de temperatura (15 °C, 20 °C y 25 °C) (Tabla XI) y la variabilidad medida como la amplitud de los intervalos de confianza al 95%, es distinta en las tres temperaturas consideradas y disminuye con el aumento de la temperatura (Figura 7). Una razón para explicar este suceso sería que cualquier aumento de la temperatura tenderá a aumentar el ritmo metabólico del individuo utilizado en el bioensayo y ocurrirá así una disminución más rápida de las reservas almacenadas en el organismo (Lockwood 1968).

Se utilizó *H. littoralis* en bioensayo agudo para evaluar la toxicidad de un producto disponible en el mercado, el desinfectante **MAXAM 15**. Los resultados de este bioensayo indican que esta especie puede ser utilizada en bioensayos de toxicidad aguda permitiendo así evaluar la toxicidad de dicho producto. Cabe mencionar que se realizó esta aplicación

práctica siguiendo lo establecido en la norma chilena para determinación de toxicidad aguda (NCh2083).

Finalmente tomando en consideración la amplia distribución de *H. littoralis*, su fácil identificación taxonómica, simple manejo y adecuada aclimatación a las condiciones de laboratorio, sumado a una apreciable sensibilidad al tóxico de referencia dicromato de potasio con respuestas reproducibles y la utilización de esta especie en un bioensayo agudo para evaluar la toxicidad del desinfectante MAXAM 15, se puede recomendar a esta especie como un organismo apto para ser utilizado en bioensayos de toxicidad aguda.

6. CONCLUSIONES

De este estudio se desprenden las siguientes conclusiones:

1. Fue posible evaluar la sensibilidad de la especie *Harpacticus littoralis* como organismo de ensayo agudo frente al tóxico de referencia (dicromato de potasio). La sensibilidad fue expresada como Cl_{50} - 48 h y Cl_{50} - 96 h para temperaturas de 15 °C, 20 °C y 25 °C.
2. Se logró realizar la estandarización y calibración de la metodología experimental con un total de 10 repeticiones del bioensayo agudo con *H. littoralis* utilizando un toxico de referencia, determinándose así la precisión y exactitud que se alcanzó con los resultados.
3. La exactitud en los resultados determinada a través de la carta de vigilancia a partir de los 10 bioensayos de toxicidad aguda con *H. littoralis* utilizando dicromato de potasio evidencia el control de la sensibilidad de la especie, la cual esta representada por los límites inferior (LCI) y superior (LCS) de confianza al 95%.
4. La precisión del bioensayo de toxicidad aguda con el harpacticoide de agua de mar, medida como el coeficiente de variación (CV) de las Cl_{50} - 48 h y Cl_{50} - 96 h para temperaturas de 15 °C, 20 °C y 25 °C, se encontró en todos los casos dentro del rango permitido ($CV \leq 30\%$) (NCh2083 1999).

5. En los 10 bioensayos agudos consecutivos con *Harpacticus littoralis* a temperaturas de 15 °C, 20 °C y 25 °C y a las mismas concentraciones de sustancia tóxica (dicromato de potasio) se observó que la variabilidad medida como la amplitud de los intervalos de confianza al 95% difiere en las tres temperaturas consideradas y disminuye con el aumento de la temperatura para las 48 h y 96 h. La sensibilidad de la especie frente al dicromato de potasio aumenta al aumentar la temperatura tanto en las 48 h como en las 96 h.

6. La utilización de *Harpacticus littoralis* como organismo de ensayo para evaluar la toxicidad de un producto disponible en el mercado permitió establecer adecuadamente su toxicidad aguda, mediante una experiencia reproducible en términos de sus resultados. En consecuencia, el conjunto de resultados obtenidos experimentalmente para el crustáceo copépodo *Harpacticus littoralis* permiten recomendar el uso de esta especie como organismo idóneo para ser empleado en bioensayos de toxicidad aguda sobre animales invertebrados marinos.

7. LITERATURA CITADA

Alveal K. 1970. Estudios ficoecológicos en la región costera de la Bahía de Valparaíso. Revista de Biología Marina 14(1):42-44.

Araújo-Castro C, L Souza-Santo, A Torreiro & K Garcia. 2009. Sensitivity of the marine benthic copepod *Tisbe biminiensis* (copepoda, harpacticoida) to potassium dichomate and sediment particle size. Brazilian Journal of Oceanography. 57(1):33-41.

ASTM E 2455-05. Standard Guide for Conducting Laboratory Toxicity Tests with Freshwater Mussels (actualmente en revisión).

Castillo G. 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. (Ed) México: IMTA. 188 pp.

CEPIS. 1994. Manual de evaluación y manejo de sustancias tóxicas en aguas superficiales. Sección 5: Orientación para muestreo, monitoreo y análisis de datos, 23 pp.

Cognetti G, M Sarà & G Magazzú. 2001. Biología Marina. Editorial Ariel Ciencia. Barcelona, 117-188 pp.

CONAMA. 2008. Biodiversidad de Chile, patrimonio y desafíos. Ocho Libros Editores (Santiago de Chile). 206 pp.

CPPS. 2009. Boletín de Alerta Climático (BAC N°230), versión técnica completa, 5 pp. Comisión Permanente del Pacífico Sur (CPPS).

D.G.T.M.Y M.M. 2007. Protocolo para la determinación gráfica de la toxicidad media letal para dispersantes químicos para combatir derrames de petróleo. Ordinario/permanente circular a 53/001, D.G.T.M.Y M.M Ordinario N° 12600/184 VRS. Dirección General del Territorio Marítimo y de la Marina Mercante.

EC (European Community). 1992. Method for the determination of ecotoxicity, part C.2: Acute toxicity for *Daphnia* (Directive 92/69/EEC) Off. J. Eur. Comm. N°1 383:172-178.

EPS. 1990. Guidance Document on Control of Toxicity Test Precision Using Reference Toxicants. Environment Canada. Report EPS 1/RM/12.

Esclapés M. 1999. Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas y terrestres. Versión 2.0. PDVSA. INTEVEP. 213pp.

FAO. 1981. Manual de métodos de investigación del medio ambiente acuático. Parte 4^a. Bases para la elección de ensayos biológicos para evaluar la contaminación marina. FAO, Doc. Tec. Pesca. (164): 34pp.

Farrán G. 1913. Marine entomostraca. Proc. Roy. Irish Acad., sect 2, 31 (45): 1-20.

Gee J.M. 1987. Impact of epibentic predation on estuarine intertidal harpacticoid copepods populations. Mar . Biol., 963:497-510.

Goddard M. 1993. Poblaciones Planctónicas de pozas de marea sometidas a perturbaciones térmicas y salinas. Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas con Mención en Ecología y Sistemática. Universidad Católica de Valparaíso, 37 pp.

Goddard M. 2003. Copépodos de pozas intermareales de isla de Pascua. Revista Ciencia y Tecnología del Mar, 26 (1): 45-72.

Goddard M. 2006. Copépodos de pozas intermareales de isla San Félix y del Archipiélago de Juan Fernández. Revista Ciencia y Tecnología del Mar, 29 (1): 115-122.

González Y & P Gilling. 2001. Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. Anuario Toxicología 1(1).

ISO 6341 1996. Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Crustacea, Cladocera) – Acute toxicity test.

Klie W. 1927. Die Copepoda Harpacticoida von. Hergoland. Wiss. Meeresuntersush, Abt. Helgoland, new ser 16 (9): 1-20.

Larrain A. 1995. Criterios ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: Importancia de los Bioensayos de Toxicidad. Revista Ciencia y Tecnología del Mar. Cona (Nº Especial):39-47.

Larrain A, E Soto & E Bay-schmith. 1998a. Assessment of sediment toxicity in San Vicente Bay, Central Chile, using the amphipod *Ampelisca araucana*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 61:363-369.

Larrain A, E Soto, J Silva & E Bay-schmith. 1998b. Sensitivity of the meiofaunal Copepod *Tisbe longicornis* to $K_2Cr_2O_7$ under varying temperature regimes. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 61:391-396.

Larrain, A., A. Riveros, J. Silva & E. Bay-Schmith. 1999. Toxicity of Metals and Pesticides Using the Sperm Cell Bioassay with the Sea Urchin *Arbacia spatuligera* Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 62:749-757.

Lewontin R. 1974. The genetic basic of evolutionary change. En: Palacios, M. y Pereira, G. 1997. Estudio sobre el cultivo de *Metacyclops mendocinus* (Crustacea, Copepoda) y su utilización en ensayos toxicológicos acuáticos. Acta Cient. Venez. 48: 58-61.

Lockwood A .1968. Aspects of the Physiology of Crustacea. Oliver & Boyd Edinburgh and London , 135-137 pp.

Maciorowski A. 1981. Bioassays-procedures and results. Water Pollut. Control Federation. 53(6): 974-993.

NCh 2083 Of.1999. Aguas - Bioensayo de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* o *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladocera). Norma Chilena Oficial NCh 2083. Of1999. Instituto Nacional de Normalización, INN Chile. (Decreto Nº 152).

NCh 2706. Of.2002. Calidad de agua - Bioensayo de inhibición de crecimiento de algas en agua dulce con *Selenastrum capricornutum* (Raphidocelis subcapitata).

Núñez M & J Hurtado. 2005. Bioensayos de toxicidad aguda utilizando *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Daphniidae) desarrollada en medio de cultivo modificado. Rev. Perú. Biol. 12(1): 165-170.

OECD. 2008. Draft Proposal for a revised Guideline 403. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute Inhalation Toxicity Testing. 19 pp.

Palacios M & G Pereira. 1997. Estudio sobre el cultivo de *Metacyclops mendocinus* (Crustacea, Copepoda) y su utilización en ensayos toxicológicos acuáticos. Acta Cient. Venez. 48: 58-61.

Perkins EJ. 1976. The evaluation of biological response by toxicity and water quality assessments. In: Marine Pollution. R. Johnston, Ed. Academic Press, London, pp. 524-543.

Reish D & P Oshida. 1987. Manual of Methods in Aquatic Environment Research. Part 10 – Short-Term Static Bioassays. FAO. Roma – Italia. 62 pp.

Ruppert E & R Barnes.1996. Zoología de Invertebrados. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Sexta edición. México, 765-769 pp.

Ryo S, S Yasuyuki, S Akiyoshi, Y Masato, M Shino, Y Akio & I Yuza. 2003. Bioassay-based Investigation of Toxicity-Controlling Chemicals in Waste Landfill Leachate. Journal of Japan Society on Water Environment, 26(10): 643-648.

Sars GO. 1910. Copepoda Harpacticoida. An account of the Crustacea of Norway with short descriptions and figures of all species, 5: 337-368.

SHOA. 2009. Temperatura Superficial del Mar (TSM) y Nivel del Mar (NM). [en línea] <www.shoa.cl/cendhoc_php/index.htm>.

Silva J, L Troncoso, E Bay-Schmith & A Larrain. 2001. Utilization of *Odonthestes regia* (Atherinidae), from the South Eastern Pacific as a test organism for bioassays; study of its sensitivity to six chemicals. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 66: 570-575.

Silva J, G Torrejón, E Bay-Schmith & A Larrain. 2003. Calibración del Bioensayo de Toxicidad aguda con *Daphnia pulex* usando un tóxico de referencia. Gayana 67 (1): 87-96.

Silva J, C Fuentealba, E Bay-Schmith & A Larrain. 2007. Estandarización del bioensayo de toxicidad aguda con *Diplodon chilensis* usando un tóxico de referencia. Gayana 71 (2): 135-141.

Sosnowski S, D Germond & J Gentile. 1979. The effect of nutrition on the response of field populations of the calanoid copepod *Acartia tonsa* to copper. Water Res.13(5): 449-452.

Soto E, G Oyarce, B Inzunza & E Bay-Schmith. 2003. Acute toxicity of organic and inorganic compounds on the freshwater cyclopoid copepod *Eucyclops neumani neumani* (Pesta 1927). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 70:1017-1021.

Takigami H, G Suzuki & S Sakai. 2008. Application of Bioassays for the Detection of Dioxins and Dioxin-like Compounds in Wastes and the Environment. In: Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry - Biological Responses to Chemical Pollutants. Murakami, Y, Nakayama, K, Kitamura, S-I, Iwata, H & Tanabe, S (Eds.) Terrapub, pp. 87-94.

Troncoso L, R Galleguillos & A Larrain. 2000. Effects of copper on the fitness of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Mollusca: Bivalvia). Hydrobiologia 420: 185-189.

USEPA. 1993. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and marine organisms. Weber, C.I. (ed.). Environmental Monitoring Systems Laboratory, U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH 45268. EPA/600/4-90/027F.

USEPA. 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Fifth edition Office of Water, U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC 20460.EPA-821-R-02-012

Villamar F. 1996. Bioensayo de toxicidad (CL50) del dispersante de petróleo BP 1100 WD, con fitoplancton marino (*Tetraselmis* sp). Acta Oceanográfica del Pacífico. INDOCAR, Ecuador, 8(1): 67-73.

Walter T C & R Huys. 2010. *Harpacticus littoralis* Sars G.O. 1911. En: Walter T C, G Boxshal (eds) (2010). World Copepoda database. Accessed through: World Register of Marine Species. [en línea] <www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=116171>.

Williams TD, Jones MB. 1994. Effects of temperature and food quantity on postembryonic development of *Tisbe battagliai* (Copepoda: Harpacticoidea). J Exp Mar Biol Ecol 183: 283-29.

Wilson CB. 1932. The copepod crustaceans of Chesapeake Bay. Proc. U. S. Nat. Mus. 80(15):1-54.

Zúñiga M, P Vallejos, A Larrain & E Bay-Schmith. 2003. Toxicity of copper on four Chilean marine mussels. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 71:1167-1174.

8. ANEXOS

Anexo 1.



DESCRIPCION

DP 11081 - MAXAM 15, Dióxido de Cloro 15% es un poderoso Biocida de rápida acción y con cualidades desinfectantes de gérmenes, esporas y virus patógenos de gran estabilidad. No deja residuos de olor. Reduce la formación de algas en instalaciones y embarcaciones. Remueve las escamas producidas por el agua dura en todos los tipos de equipos de permutación térmica.

FUNCION Y EFECTIVIDAD

Controla olores, reduce la formación de algas y ayuda a detener la corrosión producida por las bacterias.

APLICACION

Debido a sus cualidades es apropiado para superficies y equipos en general. Su dosificación puede ser manual o automática, por inmersión o pulverización.

Desinfección de superficies	Dilución
Dilución recomendada	1 a 3 mL MAXAM 15 por Lt agua

Tabla de uso MAXAM

Superficie a tratar	Proporción Recomendada	Volumen de MAXAM 15	Volumen de Solución
50 m ²	1:375	40 mL	15 L
100 m ²	1:375	80 mL	30 L
150 m ²	1:375	120 mL	45 L
200 m ²	1:375	160 mL	60 L

ALMACENAMIENTO

Almacenar en lugar fresco y seco.
Mantener alejado del alcance de los niños.

PRECAUCIONES

En caso de contacto con los ojos: Lavar inmediatamente con agua durante 15 minutos, con los párpados abiertos. Consulte con un médico.

En caso de contacto con la piel: Lavar con abundante agua durante 10 minutos, si se irrita consulte con el médico.

En caso de ingestión: Tomar abundante agua, estando la persona consciente, dar atención médica. Puede haber severo daño en órganos internos.

En caso de inhalación: Suministrar aire fresco.

Recomendaciones: Evitar el contacto con Acidos.

Las instrucciones de seguridad y uso contenidos en esta ficha, se presentan en forma detallada, para su seguridad.

La errónea manipulación del producto es de exclusiva responsabilidad de quien lo utilice.



DIVISION INDUSTRIAL
Ficha Técnica

PROPIEDADES FISICO QUIMICAS

Ingrediente activo	Dióxido de Cloro 150.000 ppm.
PH	10.0 - 14.0
Apariencia	Líquido amarillo
Olor	Inodoro e insípido
Densidad	1,4 g/ml aprox.
Solubilidad	Alcoholes alifáticos

PRESENTACION COMERCIAL

DP 11081 - MAXAM 15, Dióxido de Cloro 15% está disponible en bidones de 5 y 20 Kg y tambores de 200 Kg.

Anexo 2.

HOJA DE SEGURIDAD XIV DICROMATO DE POTASIO

FORMULA: $K_2Cr_2O_7$

COMPOSICION: Cr: 35.36 %; K: 26.58 % y O: 38.07 %.

PESO MOLECULAR: 294.21 g/mol

GENERALIDADES:

El dicromato de potasio es un sólido cristalino naranja-rojizo, soluble en agua. A diferencia del dicromato de sodio, no es higroscópico. Sus cristales son triclinicos pinacoidales.

Es utilizado en la producción de productos pirotécnicos, explosivos, colorantes, productos para impresión, para curtido de pieles, para telas repelentes al agua, en baterías eléctricas, como oxidante en la elaboración de otros productos químicos orgánicos, en la elaboración de cerillos de seguridad, en el blanqueo de aceite de palma, ceras y esponjas, como inhibidor de corrosión, como reactivo analítico, en la industria cerámica y en la obtención de pigmentos, entre otros.

Se obtiene mediante cloruro de potasio y dicromato de sodio y por tostado de cromito y carbonato de potasio a una temperatura entre 900 y 1000 °C.

NUMEROS DE IDENTIFICACION:

CAS: 7778-50-9

NA: 1479

NIOSH: HX 7680000

NOAA: 4305

STCC: 4941160

RTECS: HX7680000

El producto está incluido en: CERCLA.

MARCAJE: OXIDANTE

-NA: North America. Números de identificación utilizados solo en E.U. y Canadá, para sustancias que no tienen números de ONU.

SINONIMOS:

BICROMATO DE POTASIO

SAL DIPOTASICA DEL ACIDO CROMICO

En alemáa:

KALIUMDICHROMAT

En inglés:

BICHROMATE OF POTASH

CHROMIUM POTASSIUM OXIDE

DICHROMIC ACID DIPOTASSIUM SALT

DIPOTASSIUM BICHROMATE

DIPOTASSIUM DICHROMATE

POTASSIUM DICHROMATE(VI)

IOPEZITE

PROPIEDADES FISICAS:

Punto de Ebullición: Se descompone a 500 °C

Punto de fusión: 398 °C

Densidad (a 25 °C respecto al agua a 4 °C): 2.676

Calor de fusión: 29.8 cal/g

Calor de disolución: -62.5 cal/g

Solubilidad: soluble en agua : una disolución saturada a 0 °C, contiene 4.3 %; a 20 °C, 11.7 %; a 40 °C, 20.9 %; a 60 °C, 31.3 %; a 80 °C, 42 % y a 100 °C, 50.2 %.

Una disolución acuosa al 1% tiene un pH de 4.04 y una al 10 % de 3.57.

PROPIEDADES QUIMICAS:

El dicromato de potasio reacciona violentamente con ácido sulfúrico y acetona o hidracida. Con hidroxilamina, reacciona explosivamente y con etilenglicol a 100 °C, la reacción es exotérmica.

Las mezclas de este compuesto con hierro metálico, tungsteno metálico y boro son pirotécnicas.

En general, es incompatible con agentes reductores, materiales orgánicos y con materiales combustibles que se encuentren como partículas pequeñas, pues puede haber ignición.

NIVELES DE TOXICIDAD:

RQ:10

LDLo (oral en humanos): 26 mg/Kg

LD₅₀: (oral en ratones): 190 mg/Kg

México:
CPT: 0.5 mg/m³
Estados Unidos:
TLV TWA: 0.05 mg/m³ (como Cr)
Reino Unido:
Periodos largos: 0.05 mg/m³ (como Cr)
Francia:
VME: 0.05 mg/m³ (como Cr)
Suecia:
Nivel límite: 0.02 mg/m³ (como Cr)

MANEJO:

Equipo de protección personal:

Para el manejo de este producto debe utilizarse bata, lentes de seguridad y guantes, en un área bien ventilada. No usar lentes de contacto al trabajar con este producto.

Al trasvasar disoluciones de este compuesto, usar propipeta, NUNCA ASPIRAR CON LA BOCA.

RIESGOS:

Riesgos de fuego y explosión:

Este producto no es inflamable, pero puede causar fuego al entrar en contacto con materiales combustibles. Se descompone generando oxígeno

Riesgos a la salud:

El principal problema de este producto es su capacidad para corroer e irritar piel, ojos, membranas mucosas y tracto respiratorio, así como hígado y riñones, por lo que es peligroso inhalado, ingerido o por contacto con la piel.

Se ha informado de efectos tóxicos de este producto sobre los sistemas circulatorio y nervioso central, pulmones, corazón, riñones y tracto gastrointestinal de conejos expuestos a concentraciones crónicas.

En general, los síntomas de intoxicación por exposición a este compuesto son: sensación de quemadura, tos, respiraciones cortas, dolor de cabeza, náusea, vómito. Además, puede presentarse erosión y decoloración de los dientes, nefritis e inflamación y ulceración del tracto gastrointestinal.

Inhalación: Inicialmente, provoca ulceración de la nariz, después espasmos, inflamación y edema de laringe y bronquios, generando neumonitis química y edema pulmonar lo que, finalmente, provoca la muerte.

Contacto con ojos: Causa quemaduras serias.

Contacto con la piel: Un uso constante de este producto sin la debida protección, causa irritación, inflamación, ulceraciones y, finalmente, dermatitis. Se ha informado que el contacto de la piel con concentraciones grandes de cromatos provoca trastornos en los riñones, sin que se hayan encontrado casos de cáncer.

Ingestión: Los efectos de una intoxicación aguda son: decoloración dental, náusea, vómito, diarrea y choque cardiovascular debido a pérdida de sangre por el tracto gastrointestinal. Por otra parte, en el caso de dosis muy altas (1.5-10 g), se presenta gastroenteritis aguda, hematopoesis, edema cerebral y de pulmones y daño al hígado y riñones, lo que provoca la muerte, finalmente.

También se han presentado casos de intoxicación por ingestión de pequeñas dosis (25 ppm) de cromatos provenientes de agua contaminada.

Carcinogenicidad: Se ha relacionado a este producto con cáncer de pulmón y en diversos documentos, se considera como carcinógeno. Sin embargo, en estudios con animales de laboratorio no se ha demostrado la carcinogenicidad del cromato de calcio y otros compuestos insolubles relacionados.

Mutagenicidad: Provoca aberraciones cromosomales e incrementa la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en cultivos de células de mamíferos. También se obtuvieron resultados positivos en ensayos con *Bacillus Subtilis*.

Peligros reproductivos: Se ha informado de una alta incidencia de complicaciones en mujeres embarazadas involucradas con el manejo de dicromato de potasio y se ha encontrado este producto dentro de la placenta y en la leche materna.

Se han encontrado efectos teratogénicos en animales a cuyos padres se ha inyectado dosis altas de cromatos, sin embargo no se han reportado este tipo de efectos en humanos.

ACCIONES DE EMERGENCIA:**Primeros auxilios:**

Inhalación: Trasladar a la víctima a un área bien ventilada. Si no respira, proporcionar respiración artificial y si lo hace con dificultad, dar oxígeno.

Ojos: Lavarlos inmediatamente con agua en abundancia, asegurándose de abrir perfectamente los párpados.

Piel: Lavar con agua en abundancia y, si es necesario, eliminar la ropa contaminada. Tratar como quemaduras producidas por ácidos. Las lesiones externas pueden neutralizarse con una disolución al 2 % de tiosulfato de sodio, después de lavar con agua.

Ingestión: Lavar la boca con agua. Dar a la víctima a beber agua o leche y no inducir el vómito.

EN TODOS LOS CASOS DE EXPOSICION, EL PACIENTE DEBE SER TRANSPORTADO AL HOSPITAL TAN PRONTO COMO SEA POSIBLE.

Control de fuego:

Este producto no es inflamable, por lo que el extinguidor a utilizarse en un incendio donde se encuentre involucrado, dependerá del material que se esté incendiando.

Fugas y derrames:

Utilizar el equipo de seguridad necesario como bata, lentes de seguridad y guantes químicamente resistentes

Mantenga el material alejado de drenajes y fuentes de agua mediante diques, los cuales pueden contruirse con arena.

Si el producto derramado es sólido, cubrirlo para evitar que se moje.

Almacenar el material derramado sólido o líquido, absorbido en arena, en lugares seguros para ser tratados posteriormente de manera adecuada.

Desechos:

Acidular la disolución o suspensión que contiene a este compuesto con ácido sulfúrico diluido hasta pH 2. Agregar lentamente una disolución al 50 % de bisulfito de sodio, un aumento de temperatura indica que la reacción de reducción se está llevando a cabo. Si esto no sucediera, agregar mas ácido cuidadosamente. Posteriormente, ajustar el pH a 7 y agregar una disolución de sulfuros para precipitar el sulfuro de cromo, el cual se mandará a confinamiento. A la disolución resultante se le elimina el exceso de sulfuros (con disolución de NaOCl), se filtra, se neutraliza y se desecha al drenaje.

ALMACENAMIENTO:

Mantener los recipientes bien tapados, alejados de materiales combustibles y protegidos de calor, daño físico y flamas y en lugares secos.