



11

Protocolo del test de toxicidad de sedimentos marinos con larvas del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)



Joxe Mikel Garmendia
Iratxe Menchaca
María Jesús Belzunce
Marta Revilla

Garmendia, J.M., I. Menchaca, M.J. Belzunce, M. Revilla, 2009. Protocolo del test de toxicidad de sedimentos marinos con larvas del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). '*Revista de Investigación Marina*'. 11: 25 pp.

La serie '*Revista de Investigación Marina*', editada por la Unidad de Investigación Marina de Tecnalia, cuenta con el siguiente Comité Editorial:

Editor: Dr. Ángel Borja

Adjunta al Editor: Dña. Mercedes Fernández Monge e Irantzu Zubiaur (coordinación de las publicaciones)

Comité Editorial: Dr. Lorenzo Motos
Dr. Adolfo Uriarte
Dr. Michael Collins
Dr. Javier Franco
D. Julien Mader
Dña. Marina Santurtun
D. Victoriano Valencia
Dr. Xabier Irigoien
Dra. Arantza Murillas

La '*Revista de Investigación Marina*' de Tecnalia edita y publica investigaciones y datos originales resultado de la Unidad de Investigación Marina de Tecnalia. Las propuestas de publicación deben ser enviadas al siguiente correo electrónico aborja@azti.es. Un comité de selección revisará las propuestas y sugerirá los cambios pertinentes antes de su aceptación definitiva.



Edición: 1.^a Abril 2009

© AZTI-Tecnalia

ISSN: 1988-818X

Unidad de Investigación Marina

Internet: www.azti.es

Edita: Unidad de Investigación Marina de Tecnalia

Herrera Kaia, Portualdea

20010 Pasaia

Foto portada: © Pedro J. Pacheco

Protocolo del test de toxicidad de sedimentos marinos con larvas del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

Joxe Mikel Garmendia^{*a}, Iratxe Menchaca^a, María Jesús Belzunce^a, Marta Revilla^a

Resumen

En este trabajo se describe paso a paso el procedimiento para llevar a cabo el bioensayo para evaluar la toxicidad de sedimentos marinos mediante la utilización de larvas del erizo de mar *Paracentrotus lividus*, distribuyéndose la información en los siguientes apartados: introducción, aplicación, términos y definiciones, principio del método, material y equipos necesarios, preparación de la muestra a analizar, obtención de larvas, test de toxicidad con muestras, resultados finales, otras variantes del test, test de toxicidad con tóxicos de referencia, cálculo de la EC₅₀, limpieza del material. Al final se aporta una serie de anexos con tablas resumen, modelos de estadillos, fotografías y figuras, que servirán de ayuda para aclarar las posibles dudas que pudieran surgir.

Abstract

This article describes the protocol to carry out *Paracentrotus lividus* embryo-larval bioassays for evaluating marine sediment toxicity. The information is distributed in the following sections: introduction, application, terminology and definitions, basics of methodology, needed material and equipment, sediment treatment, larvae obtaining, toxicity test with samples, final results, other variants of the test, toxicity test with reference substances, EC₅₀ calculation, and material cleaning. At the end of the manuscript, annexes with summary tables, working tables, pictures and figures are attached in order to solve the doubts that could arise.

Introducción

Los bioensayos con fases embrionarias y larvarias de invertebrados marinos son ampliamente utilizados para evaluar la calidad del medio marino. Por las numerosas ventajas que presenta, el erizo de mar es uno de los organismos utilizados con más frecuencia, tanto para evaluar la toxicidad de las muestras como en pruebas de toxicidad con contaminantes particulares (Fernández, 2002).

El erizo de mar presenta una amplia distribución geográfica, es abundante, de fácil recolección y puede mantenerse en el laboratorio sin grandes dificultades. Además, la obtención de gametos y su fecundación *in vitro* son sencillas y su desarrollo embrionario es breve, pudiéndose obtener larvas viables en laboratorio en un corto período de tiempo.

El área de distribución del erizo de mar *Paracentrotus lividus* abarca la casi totalidad del Atlántico Norte, desde las costas de Escocia hasta las de Marruecos, adentrándose en el Mediterráneo hasta el mar Adriático. Esta especie es bastante abundante y pueden encontrarse grandes poblaciones en las proximidades de

las costas ibéricas. Está adaptado a vivir sobre rocas y otros tipos de fondos duros, así como en extensas praderas de algas (Bayed *et al.*, 2005). Coloniza preferentemente superficies horizontales o de suaves pendientes en la zona infralitoral superior. Tiende a buscar la sombra de las grietas en las rocas, cubriéndose incluso con fragmentos de algas, pequeñas piedras y conchas que mantiene adheridas a su caparazón (Crook *et al.*, 1999; Barnes y Crook, 2001). Su coloración externa puede ser verde, marrón o violeta. Perfora las rocas para formar las oquedades donde se instala. Alcanza un diámetro corporal (sin púas) de hasta 7 cm (Böttger *et al.*, 2004).

Los erizos de mar se alimentan de todo tipo de materia orgánica, animales o vegetales, vivos o muertos, aunque muestran preferencia por diferentes tipos de algas, considerándose como verdaderos herbívoros reguladores de la biomasa de las algas marinas, pudiendo devastar amplias zonas (Alves *et al.*, 2001; Gago *et al.*, 2003; Sellem y Guillou, 2007).

Son dioicos, aunque no presentan dimorfismo sexual externo. Presentan cinco gónadas. El desarrollo gonadal es un proceso controlado hormonalmente y de ciclo anual. En cautividad, la manipulación de las condiciones ambientales como la alimentación, la temperatura y el fotoperíodo puede provocar la gametogénesis fuera de su período natural (Spirlet *et al.*, 2000; Shpigel *et al.*, 2004).

En Galicia y Bretaña, el desove de *Paracentrotus lividus* se produce principalmente en primavera y principios de verano

^{a*} AZTI-Tecnalia, Itsas Ikerketa Saila - Departamento de Investigación Marina. Herrera Kaia s/n, 20110 Pasaia. Tel: +34 943004800; Fax: +34 946572555; Correo electrónico: jgarmendia@azti.es

(Spirlet *et al.*, 1998; Fernández, 2002). Los oocitos y espermatozoos son depositados en el agua del mar y la fecundación se produce en el medio marino. A partir del cigoto se da una segmentación igual hasta la etapa de ocho células. Luego aparece una blástula típica, seguida de una gástrula que adquiere forma cónica y que posteriormente se convierte en una larva planctónica llamada equinoplúteus (Fernández, 2002). Esta fase inicial del desarrollo embrionario es la que interesa en este test de toxicidad. La larva planctónica se alimenta en las aguas superficiales, donde las algas unicelulares son más abundantes, y completa su desarrollo aproximadamente en un mes. Cuando comienza a formarse el esqueleto adulto migra hasta el fondo. La metamorfosis es rápida y dura en torno a una hora (Wray *et al.*, 2004).

Este protocolo describe el procedimiento para realizar el bioensayo de toxicidad de un sedimento marino utilizando larvas de erizo de mar de la especie *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). El principal contenido de este protocolo ha sido elaborado fundamentalmente a partir de Environment Canada (1992), Fernández (2002) y USEPA (2002).

Aplicación

El test de toxicidad de larvas de erizo de mar puede emplearse para analizar tanto muestras de agua marina como de sedimentos marinos (arenas y fangos). Ya que las larvas utilizadas viven en medio acuático, en el caso de los sedimentos se trabaja con elutriados.

Términos y definiciones

Control: tratamiento en una investigación o estudio que **reproduce todas las condiciones y factores** que podrían afectar a los resultados de la investigación, excepto la condición específica que se está analizando. En un test de toxicidad, el control debe reproducir exactamente todas las condiciones de la exposición, pero sin contener la sustancia a analizar. El control se utiliza para comprobar la ausencia de efectos debidos a condiciones básicas de la prueba (p.ej., calidad del agua de dilución, salud de los organismos utilizados, o efectos debidos a su manipulación). Normalmente, los resultados de los tests se refieren al control.

EC₅₀: Concentración Efectiva del tóxico, corresponde a aquella concentración que provoca un efecto (generalmente adverso) sobre el 50% de la población del organismo utilizado. En función del tipo de efecto, puede ser sinónimo de LC₅₀ (Concentración Letal) e IC₅₀ (Concentración de Inhibición).

Elutriado: solución acuosa obtenida tras la adición de agua a una sustancia sólida (p.ej., sedimento) y agitación. Posteriormente la mezcla obtenida se centrifuga, se filtra o se decanta el sobrenadante (para separar el sólido propiamente dicho del líquido).

Endpoint (variable objetivo): variable o criterio preestablecido para determinar el resultado del bioensayo y que indica la **finalización de un test**; o las medidas o valores derivados que caracterizan los resultados de un test (mortalidad, crecimiento, EC₅₀...).

Exposición: contacto de los organismos (larvas de erizo en este caso) con las muestras de estudio.

Muestra: sustancia (disolución o sedimento) **objetivo del análisis.**

Test de toxicidad: determinación del efecto de una(s) sustancia(s) sobre un grupo de organismos, tejidos celulares u otro material vivo, bajo condiciones definidas. Un test de toxicidad en fase líquida mide bien las proporciones de organismos afectados o bien el grado del efecto observado tras la exposición de estos organismos a concentraciones específicas de sustancias químicas, a vertidos, efluentes, elutriados o agua intersticial derivada de un sedimento o sustancia sólida similar.

Toxicidad: propiedad inherente de una sustancia o combinación de sustancias de **provocar efectos adversos** a organismos vivos. El efecto puede ser letal o subletal.

Tóxico de referencia: sustancia utilizada **para evaluar la sensibilidad** de los organismos utilizados en los tests. Se establece un rango para cada población de organismo utilizado, que informa sobre las condiciones de dicho organismo.

Principio del método

El test al que se refiere este protocolo se basa en la exposición de huevos de erizo recién fecundados a un elutriado durante sus primeras 48 horas de vida. En función del grado de desarrollo alcanzado por las larvas a las 48 horas de la fecundación, se determina el grado de toxicidad de la muestra analizada, mediante la comparación de los porcentajes de larvas desarrolladas encontradas en la muestra y del porcentaje encontrado en el control.

Material y equipos necesarios

Muestreo de erizos

- Nevera o recipiente similar para transporte de erizos vivos (con agua de mar) desde la zona de muestreo al laboratorio.
- Espátulas de madera para ayudar a despegar los erizos de la roca.
- Regla o medida de referencia para recoger ejemplares superiores a un tamaño mínimo (> 40 mm de diámetro).
- Ejemplares adultos de erizo con capacidad de desove. Éstos servirán para el suministro de gametos en el laboratorio.
- Mochila para transporte del material al punto de muestreo.
- Botas de goma/escarpines.
- Guantes de neopreno para protección frente a las púas.
- Gafas de buceo para poder ver dentro del agua.
- Bañador o traje de agua (según las condiciones).
- Sensor de campo (para medir la salinidad y temperatura del agua *in situ*).

Laboratorio

- Paleta de madera (para recoger el sedimento a analizar del recipiente de muestreo).
- Rueda de volteo-rotación (para mezclar el sedimento con

agua marina filtrada y obtener el elutriado).

- Botes de boca ancha de polietileno con tapa y obturador de 500 ml (para realizar la mezcla del sedimento y agua; envase que se coloca en la rueda de rotación).
- Agua de mar (35 ± 1 psu) filtrada (con un filtro de poliestersulfona con poro de $0,2 \mu\text{m}$): se utilizará en la fecundación, en la obtención del elutriado, en el control y en las diluciones de los tóxicos de referencia.
- Tóxico de referencia. Los más usados son: cloruro de amonio (NH_4Cl); sodio-dodecil-sulfato o SDS; cloruro de cadmio (CdCl_2).
- Tubos de goma finos para extracción del elutriado por succión.
- Vasos de precipitado de 1000 ml (para trasvase inicial del elutriado).
- Aireador (para airear las muestras a analizar).
- Vasos de precipitado de 150 ml para trasvase del elutriado.
- Oxímetro, salinómetro, pHmetro, termómetro, medidor de ión selectivo o kit para medir el amonio.
- Cuchillo de sierra o bisturí (para diseccionar los erizos adultos).
- Tabla de cortar (para apoyar los erizos).
- Jeringuilla y aguja para inyectar 1 ml de KCl para inducción al desove (opcional).
- Cloruro de potasio (KCl) (para inducción al desove) (opcional).
- Pipeta Pasteur y tubos capilares (para extraer los gametos de los erizos).
- Probeta 100 ml (para realizar la fecundación).
- Émbolo de metacrilato o pyrex (para la mezcla de gametos).
- Porta cuadrículado (para estimar la densidad del material fecundado y el tamaño de los oocitos).
- Pipetas automáticas de 10 -1000 μl y de 1-5 ml (para recoger el material fecundado, para realizar las diluciones de los tóxicos de referencia).
- Vasos de polipropileno (25 ml) con tapa para la incubación de las larvas.
- Microscopio invertido (para la comprobación de la calidad de los gametos y lectura del éxito de fecundación y embriogénesis).
- Cámara climatizada con temperatura y luz controlada (para el cultivo de las larvas, para el reposo del elutriado).
- Cámara refrigeradora (para mantener las muestras de sedimento y las muestras de elutriado).
- Formol (40%) para fijar las larvas.

Preparación de la muestra a analizar: elutriado

Se recomienda trabajar con las muestras de sedimento en el tiempo más breve posible. Dichas muestras pueden almacenarse refrigeradas a 4°C durante un tiempo máximo de 1 mes.

Se toman 100 g de sedimento problema con una paleta o cuchara de madera y se depositan en un bote de 500 ml (previamente bien aclarado con agua de mar filtrada). Se añade agua de mar filtrada

(33-36 psu) hasta rebosar (± 400 ml). No debe quedar aire entre el agua y la tapa. Se voltea o se agita en un rotador (volteador) durante 30 minutos a 60 rpm. Se deja decantar durante 12 h a 20°C en total oscuridad (Beiras, 2002). Al finalizar la rotación hay que asegurarse de que no queden restos de sedimento en la parte interior de la tapa; si quedan restos, éstos pueden “resuspenderse” y ensuciar el agua en el momento de abrir la tapa para proceder a la extracción del elutriado una vez transcurrido el periodo de reposo.

Con la ayuda de tubos de goma finos, se pasa el sobrenadante a un vaso de precipitado de 1000 ml (con lo primero que pasa por el tubo de goma, se limpia el vaso y se desecha). Importante: hay que tener cuidado de no remover o resuspender el sedimento del fondo del bote. Una vez obtenido el elutriado, se recomienda hacer el bioensayo en menos de una semana, debiéndose mantener el elutriado en oscuridad y siempre a una temperatura de 4°C .

Se airea suavemente el contenido del vaso durante 10 minutos, y se trasvasan directamente 20 ml de elutriado muestra a cada uno de los vasos preparados al efecto.

Para cada punto (o muestra) se preparan **6 réplicas** y para el control (solamente agua de mar filtrada por $0,2 \mu\text{m}$) se hacen **11 réplicas** de 20 ml. Para el bioensayo con larvas propiamente dicho se utilizarán 5 y 10 réplicas respectivamente, y las restantes (sin formular) servirán para medir el oxígeno y amonio a las 48 h (al finalizar el bioensayo).

Con la muestra restante que queda en el vaso, se llevan a cabo las medidas de las variables control del inicio del bioensayo: temperatura, oxígeno, salinidad, pH y amonio.

De esta manera tenemos preparadas las muestras y los controles que se utilizarán en la prueba de toxicidad.

Obtención de larvas: obtención de gametos y fecundación

Obtención de gametos

En primer lugar, hay que disponer de un número suficiente de erizos que aseguren la disponibilidad de, al menos, un individuo macho y otro hembra con gametos de buena calidad.

Las poblaciones de estos erizos suelen encontrarse en la zona intermareal y, sobre todo, en la zona submareal, sobre sustrato rocoso, hasta los 20 m de profundidad. Aprovechando las bajamares, también pueden recogerse en las charcas que quedan en la zona intermareal. El tamaño mínimo aconsejado para asegurar la madurez de los erizos es de 40 mm de diámetro. Para la extracción de los ejemplares, se aconseja proteger las manos con guantes de neopreno y utilizar una espátula de madera (para dañar lo menos posible a los animales), que se utilizará como palanca para separar los erizos de las rocas. Una vez separados, se recogen con la mano y se introducen en neveras o recipientes con agua de la zona para su transporte al laboratorio. Se debe evitar un aumento de la temperatura del agua durante el transporte, ya que puede provocar el desove de los erizos y la pérdida de los gametos.

Una vez en el laboratorio, los erizos adultos pueden mantenerse durante varios días en acuarios o recipientes con abundante

agua marina y condiciones de temperatura, aireación y limpieza adecuadas hasta su disección o inducción al desove.

La obtención de los gametos puede realizarse de dos maneras:

a.- Inducción mediante la inyección de 1 ml de KCl 0,5M: a cada erizo se le inyecta 1 ml de KCl a través del peristoma (zona blanda que rodea la boca), se realizan unos suaves movimientos al erizo para repartir el líquido en su interior y se deja reposar sobre la mesa apoyado sobre su cara oral. A los pocos minutos (3-5) los erizos inyectados comenzarán a expulsar material gonadal por su cara aboral (superior): los machos producen un líquido blanco y las hembras naranja. En dicho material se encuentran los gametos.

b.- Con un cuchillo lo más limpio posible se disecciona un individuo por el eje ecuatorial. Con este procedimiento, las gónadas habrán sido cortadas. Nada más abrirlo, se debe observar el color del material que rezuma de las gónadas (blanco o naranja; macho o hembra, respectivamente). **Importante:** no se deben estrujar o presionar las gónadas para extraer los gametos, sólo se debe recoger el líquido que se exterioriza por sí solo.

A continuación se toma, mediante una pipeta Pasteur, una gotita bien del material que se expulsa y queda sobre la parte superior del cuerpo, o bien del material que sale directamente de las gónadas, se deposita sobre un porta y se observa a través del microscopio para verificar la **calidad de los gametos**. Para que los gametos sean considerados de buena calidad y poder seguir adelante con el procedimiento, los oocitos deben presentar un diámetro cercano a 100 µm y deben ser esféricos, mientras que los espermatozoides deben presentar una elevada movilidad.

Se pueden emplear varios individuos y, finalmente, seleccionar aquellos que posean gametos de mayor calidad. Algunos autores aconsejan utilizar solamente un individuo por cada sexo, mientras que otros aconsejan la mezcla de gametos de varios ejemplares, por ejemplo, tres machos por un lado y tres hembras por otro (Environment Canada, 1992; Volpi Ghirardini *et al.*, 2005; Marin *et al.*, 2007).

En algunas épocas del año, la mayor dificultad suele ser encontrar oocitos adecuados. En este caso, y a la espera de conseguir una hembra en condiciones, el esperma puede mantenerse en seco (sin diluir) durante 2 horas, a 4 °C, en un tubo eppendorf.

Fecundación

Una vez que se dispone de gametos de ambos sexos, primero se toman los oocitos y se llevan a una probeta de aproximadamente 100 ml con agua de mar filtrada (0,2 µm) a 20 °C. Se añaden oocitos hasta que, a simple vista y a trasluz, pueda observarse una concentración homogénea y bastante densa de oocitos pero sin llegar a que el agua tome una coloración naranja (normalmente suelen ser 4 o 5 gotas de pipeta; pero siempre dependerá del tamaño de la gota y de la densidad del material gonadal). Conviene aclarar con agua filtrada varias veces este material, agitando ligeramente, dejando reposar unos 5 minutos y decantándolo para eliminar los restos de gónada y oocitos defectuosos, ya que éstos flotan.

Después, con una pipeta Pasteur o un capilar de vidrio, se deposita una gotita (muy pequeña) de esperma en la probeta que contiene los oocitos, y se agita **muy suavemente** de arriba a abajo con un émbolo (lavado con agua de grifo y aclarado con agua de mar filtrada). **Importante:** no tocar el fondo de la probeta con el émbolo.

Si no se dispone de émbolo, la alternativa para la mezcla es el volteo suave y continuo de la probeta, taponando la boca con parafilm.

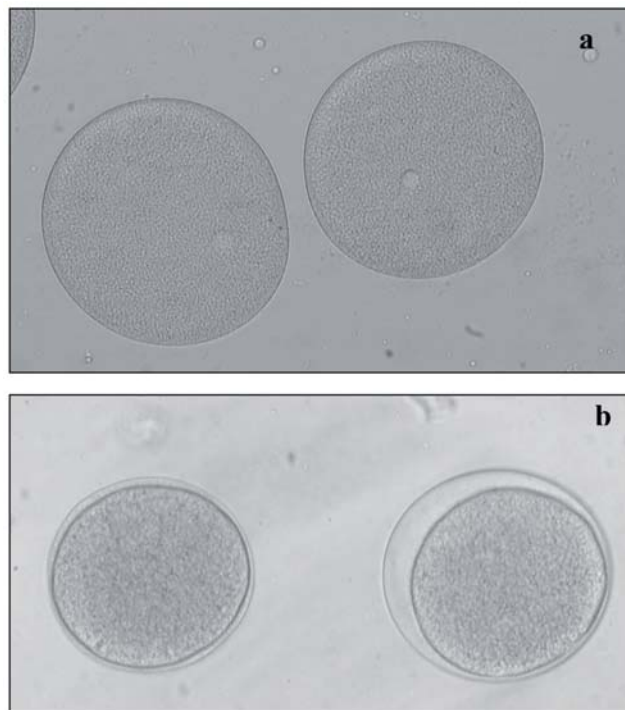


Figura 1 Oocitos sin fecundar (a) y oocitos fecundados (b) donde se puede observar la membrana de fertilización. Los oocitos suelen presentar un diámetro cercano a 100 µm.

En este caso no se utilizan ratios concretos de gametos, ya que se utiliza casi todo el material de una hembra y una gotita del macho. No obstante, algunos autores aconsejan utilizar unos ratios concretos para evitar una posible polispermia que impida la viabilidad de los huevos. En este sentido, no se ofrecen relaciones fijas y cada laboratorio debe hallar la adecuada para su población de erizos y época del año. En la bibliografía aparecen relaciones de espermatozoide/oocito de 2000-20000 como las más usadas. Para ello, se debe estimar la densidad de espermatozoides y de oocitos del material gonadal empleado, mediante su observación al microscopio sobre un porta cuadrículado.

Cálculo de la densidad y éxito de fecundación

Tras 5-10 minutos de espera agitando el contenido de la probeta suavemente, se toman 4 réplicas de 20 µl cada una y se depositan separadamente sobre un porta cuadrículado. De esta manera, se calcula primero el % de éxito de fecundación (número de huevos que presentan la membrana de fertilización frente al total de

huevos observado), y segundo la densidad de los oocitos (número de huevos en los 20 µl), por este orden.

Para calcular el éxito de fecundación se cuenta el número de oocitos fecundados (aquellas que presentan la membrana de fertilización, no siendo necesario que esté completamente separada) (Fig. 1) frente al total de oocitos en cada réplica. Con los cuatro valores obtenidos de las réplicas se halla un valor promedio. Para dar por válido el material y poder seguir con el procedimiento, este valor (que se considera como éxito de fecundación) ha de ser **igual o superior al 90%**.

A partir de las medidas de densidad, se descartan las dos réplicas extremas y se halla el promedio de las dos restantes. Con este promedio se calcula el volumen del material de la probeta que contiene **500 larvas**; o dicho de otro modo, el volumen de dicho material que, trasvasado a un vaso y una vez enrasado a 20 ml con agua de mar filtrada, presente una densidad de **25 huevos ml⁻¹**.

Todo este paso ha de llevarse a cabo con cierta celeridad y no debe durar más de **30 minutos**, ya que a una hora de la fecundación comienzan a producirse las primeras divisiones mitóticas, y es cuando los embriones son más sensibles.

Test de toxicidad con muestras

Llegados a esta fase, por un lado, se tienen los elutriados (de las muestras) y los controles, y por otro, el cultivo de huevos recién fecundados.

Exposición e Incubación

Una vez cumplido el requisito de éxito de fecundación **igual o superior al 90%**, y haber hallado el volumen de la solución con huevos fecundados que se debe añadir a cada uno de los vasos de polipropileno para obtener una densidad de **25 huevos ml⁻¹**, se

trasvasa dicho volumen a los citados vasos (6 réplicas por muestra y 11 réplicas por control) que contienen 20 ml de elutriado (muestra) o agua marina filtrada (control). Estos vasos se tapan y se introducen en la cámara incubadora donde permanecerán durante 48 horas a 20 °C y en completa oscuridad.

Embriogénesis

Tras las 48 horas, se retiran los vasos de la cámara y se utiliza una réplica de cada muestra y del control para las medidas de oxígeno y amonio. En el resto de las réplicas (5 por muestra y 10 por control) se añaden unas tres-cinco gotas de formol al 40% para detener el desarrollo de las larvas.

Con la ayuda de un microscopio invertido se observa cada vaso y se estima el éxito de la embriogénesis. Para ello se contabiliza el número de larvas plúteus normales entre las 100 primeras larvas observadas (de esta manera se halla el porcentaje de larvas plúteus normales). Se denomina larva normal a aquella con los cuatro brazos bien separados (Fig. 2).

Resultados finales

Para considerar el bioensayo como **válido**, en el control debe darse un éxito de embriogénesis igual o superior al 90%.

Una vez confirmada la validez de la prueba, el **criterio** para clasificar la **muestra como tóxica** es doble, y deben cumplirse ambas:

- **reducción de más de un 20%**, respecto al control, de **larvas plúteus normales** (Del Valls *et al.*, 2003; en Casado-Martínez *et al.*, 2006).
- **diferencias significativas (p<0,05) con respecto al control**. Si se cumplen las condiciones de normalidad y homocedasticidad, previa normalización de los resultados

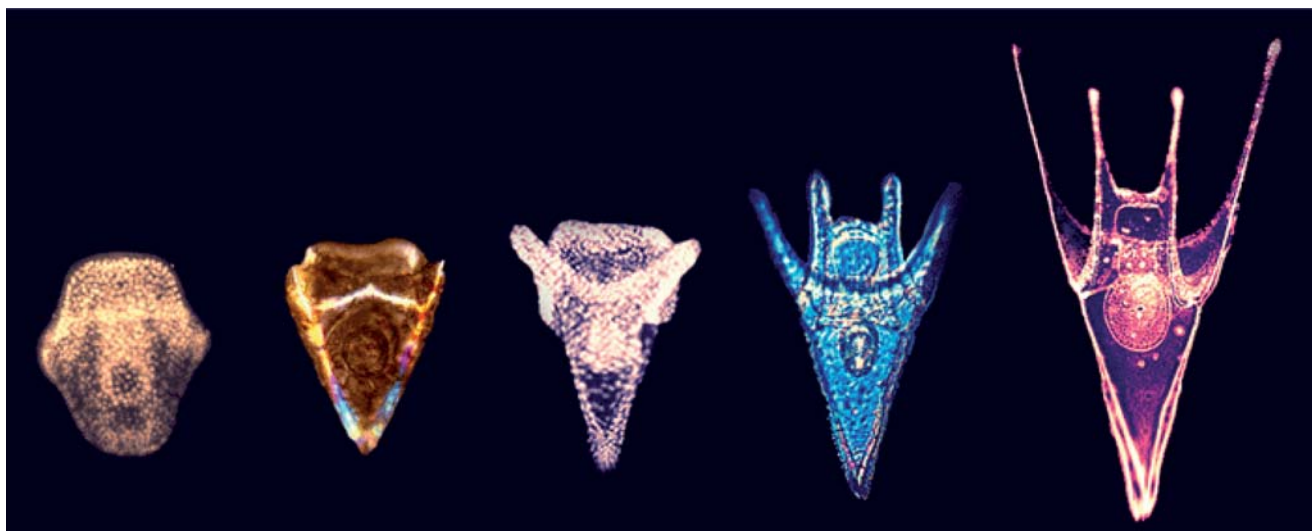


Figura 2 Distintos estadios larvarios. Larva Plúteus con 4 brazos bien desarrollados (aproximadamente 400 µm de longitud) a la derecha. Las tres de la izquierda NO se consideran bien desarrolladas y las dos de la derecha Sí. Tomado de Delarue, M. Développement des échinodermes. La phase larvaire. <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/oursinMDC/coursours3/p5larve.html>.

mediante la transformación angular **arc seno** \sqrt{p} (siendo p el porcentaje de éxito en la embriogénesis en tanto por uno), se realiza un ANOVA (test de Bonferroni). En caso de no cumplir dichas condiciones se opta por la alternativa no paramétrica: un test-exacto de Fisher (His *et al.*, 1999; Fernández, 2002; Marín Guirao *et al.*, 2005).

NOTA (USEPA, 2002)

Para llevar a cabo el test de normalidad se utiliza el Test de Shapiro-Wilk, y para la homogeneidad de la varianza el Test de Bartlett.

Si el objetivo es comparar las muestras entre sí, lo adecuado es utilizar el test de Tukey.

Pero si la comparación se realiza frente a un control:

- para el mismo número de réplicas en las muestras y en el control, se debe usar un test paramétrico (p.ej. ANOVA-test Dunnett) o un no paramétrico (en este caso sin transformación previa).
- en el caso de que el número de réplicas de las muestras y el control sea diferente, la alternativa paramétrica es el Test t con un ajuste de Bonferroni y la no paramétrica el Test de Wilcoxon Rank Sum con el ajuste de Bonferroni.

Otras variantes del test

El presente protocolo está orientado a determinar si una muestra es tóxica o no, a través de submuestras de 20 ml y contabilizando el desarrollo de 100 larvas. No obstante, incorporando ligeras modificaciones en alguna de las fases descritas, se pueden deducir diferencias en el grado de toxicidad de las muestras analizadas. A continuación se muestran tres ejemplos:

EC₅₀

Cálculo de la EC₅₀ del sedimento (Fernández, 2002) o éxito de la embriogénesis.

En este caso, a la hora de preparar las muestras a analizar, se realizan **3 diluciones** (1:1, 1:4, 1:10) a partir del elutriado:

- + 1:1; 20 ml de elutriado.
- + 1:4; 5 ml de elutriado + 15 ml de agua de mar filtrada (0,2 μ m).
- + 1:10; 2 ml de elutriado + 18 ml de agua de mar filtrada (0,2 μ m).

El resto del bioensayo se hace de igual manera: 5 réplicas para cada dilución, adición del material recién fecundado, incubación, fijación y lectura de resultados. Con las lecturas obtenidas para cada concentración se calcula la EC₅₀ para cada muestra. Una vez conocidas las EC₅₀ se pueden comparar las muestras entre ellas y ordenarlas según su grado de toxicidad o nivel de efecto producido sobre el desarrollo de las larvas.

Longitud de las larvas

Medidas de longitud de las larvas al final del bioensayo (Fernández, 2002).

Al finalizar el bioensayo, el criterio empleado es la medida de

la longitud de la larva: distancia desde el ápice hasta el extremo del brazo postoral siguiendo la línea lateral del cuerpo. En cada vaso se mide la longitud de 25 larvas, se calculan los valores promedios y se comparan las del control con las del resto de las muestras. A partir de los datos de longitud se pueden calcular: la concentración mínima con efectos observables o LOEC (concentración experimental más baja que reduce significativamente la longitud media de las larvas), la concentración máxima sin efectos observables o NOEC (concentración experimental más alta que no reduce significativamente la longitud media de las larvas) y la EC₅₀ u otra (concentración teórica que reduce el 50% u otro porcentaje la longitud media de las larvas con respecto al control).

Grado de desarrollo

Estado de desarrollo alcanzado por los embriones al final del bioensayo (Fernández, 2002).

Se asume que mayores niveles de toxicidad interrumpen el desarrollo embrionario en estados más tempranos, por lo que una muestra clasificada como tóxica podría clasificarse como muy tóxica si los embriones han alcanzado sólo el estado de blástula, o moderadamente tóxica si se han desarrollado hasta alcanzar el estado de pre-plúteus.

Test de toxicidad con tóxicos de referencia

La utilización de tóxicos de referencia o controles positivos a título comparativo, permiten tanto validar protocolos de ensayos de toxicidad como comparar la sensibilidad del material biológico utilizado en distintos experimentos. Hay casi 300 sustancias propuestas como tóxicos de referencia por la Agencia de Protección Ambiental de los EEUU (www.epa.gov/enviro/html/emci/chemref/complete_index.html) (Fernández, 2002).

La condición o calidad del organismo utilizado (en este caso las larvas plúteus) debe evaluarse y confirmarse antes de realizarse la prueba de toxicidad (el bioensayo propiamente dicho) de los sedimentos mediante la utilización de un tóxico de referencia.

Para ello, entre las sustancias más utilizadas se encuentran: el cloruro de amonio (NH₄Cl), el cloruro de cadmio (CdCl₂) y el Sodio-Dodecil-Sulfato (SDS).

En términos generales se trata de preparar una serie de diluciones (por ejemplo concentraciones de 0, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 mg l⁻¹ del ión tóxico utilizado) a las que se añadirán los huevos fecundados y se estimará la EC₅₀, es decir, la concentración del tóxico de referencia que provoca una respuesta adversa en el 50% de la población utilizada. Estas concentraciones sirven de referencia para las pruebas iniciales. Una vez que se conozca el valor aproximado de la EC₅₀ (mediante la realización de varias pruebas), estas concentraciones se deberán reajustar para cada tóxico, reduciendo el rango, concentrándolas cerca del valor de la EC₅₀ y respetando siempre la existencia de, al menos, dos concentraciones superiores y dos inferiores al valor de la EC₅₀.

Para facilitar la realización de las diluciones y no generar una cantidad excesiva de patrón tóxico, lo más adecuado es preparar una disolución madre con una concentración nominal no muy elevada, por ejemplo entre 0,1 y 1 g l⁻¹ (de Cd²⁺ o de NH₄⁺), a

partir del cual se realizarán las posteriores diluciones hasta obtener las mencionadas concentraciones de 0, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 mg l⁻¹ del ión tóxico en cuestión. Si bien para la fabricación del patrón inicial lo adecuado sería utilizar agua destilada ultrapura (Milli-Q), en este caso se utilizará agua de mar filtrada (0,2 µm) para no generar muestras con salinidades diferentes que puedan repercutir en el resultado final.

A modo de ejemplo, he aquí el caso del cadmio, uno de los tóxicos de referencia mencionados anteriormente:

Si se dispone de CdCl₂ en estado sólido, cuyo peso molecular es de 228,34 (CdCl₂ • 2,5 H₂O), y teniendo en cuenta que se trata de: (a) obtener una disolución madre de 0,4 g l⁻¹ de Cd²⁺; y (b) preparar una cantidad de 1 l, que es suficiente para realizar unas cuantas pruebas, se realiza el siguiente cálculo (donde 112,4 es el peso molecular del Cd):

$$1 \text{ l} \times 0,4 \text{ g l}^{-1} \times (228,34 \text{ g de CdCl}_2 / 112,4 \text{ g de Cd}^{2+}) = 0,813 \text{ g}$$

Por tanto, se deben diluir 0,813 g de CdCl₂ x 2,5 H₂O en 1 l de agua de mar filtrada, para lo cual se empleará un matraz aforado de 1 l. Lo adecuado es no preparar el tóxico con mucha antelación a su utilización y no almacenarlo durante mucho tiempo (máximo una semana).

A la hora de preparar las disoluciones iniciales, se aconseja tener en cuenta los siguientes aspectos: intentar no generar una cantidad excesiva de patrón tóxico (ya que, al final va a sobrar mucha cantidad de patrón y se tendrá que desechar), y no trabajar con cantidades o concentraciones extremadamente bajas (debido a que los errores en que se puede incurrir en las pesadas, trasvases o pipeteos pueden llegar a ser significativos). Además, para garantizar que el agua de mar no interfiera de manera importante en los resultados al añadir una cantidad extra de la sustancia analizada, su contenido (Cd en nuestro ejemplo) no debe superar el 1% de la concentración más diluida considerada en el test (excluido el control).

Una vez preparada la disolución madre (sea de SDS, CdCl₂, NH₄Cl u otra sustancia), se realizan los correspondientes cálculos para obtener las concentraciones deseadas. Siguiendo con el ejemplo anterior, partiendo de la disolución madre de 0,4 g l⁻¹, las concentraciones seleccionadas se consiguen como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1 Proporciones de cada componente para conseguir las concentraciones deseadas de tóxico de referencia.

mg l ⁻¹	ml agua filtrada	ml disolución madre	ml vaso	Nº réplicas (vasos)
0	20	0	20	10
1	19,95	0,05	20	5
2	19,9	0,1	20	5
4	19,8	0,2	20	5
8	19,6	0,4	20	5
16	19,2	0,8	20	5
32	18,4	1,6	20	5

Tras preparar las réplicas de todas las disoluciones en vasos de 25 ml, el procedimiento es el mismo que con una muestra de elutriado o control: en cada vaso se añaden 500 larvas, se incuban durante 48 h a 20 °C en total oscuridad, después se fijan con formol al 40% y se registra el porcentaje de larvas plúteus normales (éxito de embriogénesis).

A partir de los datos obtenidos, se calcula la concentración efectiva mediana (EC₅₀), es decir, aquella concentración teórica que reduce en un 50% el porcentaje de éxito en la embriogénesis. Para ello, los pares de datos (% de supervivencia, concentración) se deben ajustar a una curva de regresión mediante un análisis probit (Fernández, 2002; Bellas *et al.*, 2005b).

Antes de comenzar una prueba de toxicidad es conveniente hallar el rango en el cual debe situarse la EC₅₀ de la población de organismos utilizada. Para ello, se procede a la realización inicial de, al menos, 5 pruebas con tóxicos de referencia (USEPA, 2002), con los cuales se calcula la concentración efectiva mediana (EC₅₀) para la población de erizos utilizada y para cada tóxico de referencia. Este valor nos validará la calidad de las larvas utilizadas y nos indicará la posibilidad de continuar con la prueba y con dicha generación de larvas. Por otro lado, la sensibilidad interpoblacional (reflejada con la EC₅₀) puede ser diferente; e incluso, la sensibilidad intrapoblacional puede variar con el tiempo. Por ello, cada laboratorio debe configurar su propia base de datos que irá actualizando a medida que se van realizando más test de toxicidad y obteniéndose nuevos resultados. Lo adecuado es realizar un test con tóxicos de referencia cada vez que se realiza un test de toxicidad con muestras, e ir ajustando las concentraciones del tóxico de referencia de tal forma que la EC₅₀ esté situada más o menos en la mitad de las concentraciones consideradas.

Cálculo de la EC₅₀

En primer lugar, para el establecimiento de una EC₅₀ para una población dada se van a utilizar valores de EC₅₀ obtenidos con diferentes bioensayos y, por tanto, diferentes controles. Para poder comparar pruebas de toxicidad realizadas con fecundaciones diferentes, los porcentajes de respuesta (P) registrados en cada tratamiento son corregidos con respecto al control. De esta manera, se minimizan las variaciones debidas al material biológico y al agua de mar utilizada. Para ello, se emplea la fórmula de Abbott, (Emmens, 1948; en Fernández, 2002), que no es más que una relativización de los resultados frente al control de cada caso.

$$P' = (P - P_c / 100 - P_c) \times 100$$

donde:

P' = porcentaje de respuesta negativa corregido (% de embriones).

P = porcentaje de respuesta negativa sin corregir.

P_c = porcentaje de respuesta negativa en el control (promedio).

Tabla 2 Valores hallados en la bibliografía para *Paracentrotus lividus*: EC_{50} con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. Los valores de “Estudios propios” se refieren a los resultados obtenidos con bioensayos realizados en AZTI-Tecnalia hasta diciembre de 2008 con una población de erizos localizada en Donostia-San Sebastián.

Fuente	Lugar	Tóxico referencia	EC_{50} (\pm 95%)
Arizzi Novelli <i>et al.</i> (2003b)	Adriático (Italia)	NH4+ total ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5700 (5300 - 6100) pH 7,7 4200 (3900 - 4600) pH 8,0 3100 (2900 - 3300) pH 8,3
Estudios propios	País Vasco	NH4+ total ($\mu\text{g L}^{-1}$)	4980 (4760 - 5300)
Fernández y Beiras (2001)	Galicia	Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)	9240
Fernández (2002)	Galicia	Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)	8628 (8456 - 9135)
Arizzi Novelli <i>et al.</i> (2003a)	Venecia (Italia)	Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2300 (1900 - 2700)
Estudios propios	País Vasco	Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)	7520 (7310 - 7740)
Rolland <i>et al.</i> (1999)	Aveiro (Portugal)	SDS ($\mu\text{g L}^{-1}$)	4150 - 4170
Fernández (2002)	Galicia	SDS ($\mu\text{g L}^{-1}$)	4100 (3750 - 4580)
Marín Guirao <i>et al.</i> (2005)	Mar Menor	SDS ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1710 (1430 - 1990)
Bellas <i>et al.</i> (2005a)	Galicia	SDS ($\mu\text{g L}^{-1}$)	4277
Estudios propios	País Vasco	SDS ($\mu\text{g L}^{-1}$)	4235 (4094 - 4378)

Pasos a dar:

- Transformar las respuestas positivas obtenidas en el test de toxicidad a respuestas negativas (resp. negativa = 100 - resp. positiva).
- Hallar el valor promedio de los controles (Pc).
- Corrección de Abbott: aplicar la fórmula a todos los valores (P), excepto a los controles.

Diferentes programas estadísticos ofrecen la opción de realizar análisis probit para el cálculo de la EC_{50} .

Todas las EC_{50} calculadas para una misma población y el mismo tóxico de referencia se irán añadiendo a una base de datos para definir e ir ajustando la sensibilidad de los organismos de dicha población respecto al tóxico de referencia considerado. Una vez que se disponga de suficientes datos, se preparará y actualizará una tabla de aviso para cada tóxico de referencia utilizado (Tabla 2). En esta tabla se seguirán añadiendo sucesivas EC_{50} para determinar si los resultados se encuentran dentro de la media \pm 2 d.t. (desviación típica) de los valores obtenidos en tests previos. Se irá recalculando el promedio geométrico junto con sus límites superior e inferior (\pm 2 d.t., calculado sobre una base logarítmica) hasta que se establezcan los estadísticos (Environment Canada, 1992). Si una EC_{50} se encuentra fuera de los límites mencionados, la sensibilidad de los gametos y el test deben considerarse con precaución. Puesto que esto puede ocurrir en el 5% de los casos, un valor externo al rango de seguridad no debe significar necesariamente la invalidación de los gametos o de los datos obtenidos: debe considerarse como un aviso y, en estas circunstancias, se deben revisar todas las condiciones en las que se ha llevado a cabo el test para comprobar si todo ha sido realizado correctamente.

Limpieza de material

Todo el material que haya estado en contacto con el sedimento o elutriado a analizar, y vaya a reutilizarse (los recipientes de plástico donde se han agitado las muestras, recipientes de vidrio donde se ha trasvasado el elutriado...), debe lavarse con agua y jabón, aclarado con abundante agua, mantenido en baño de ácido nítrico al 10% (al menos 12 horas), nuevamente aclarado con abundante agua, enjuagado con acetona y finalmente enjuagado con agua destilada (USEPA, 2002).

Los vasos de cultivo, puntas de pipeta, pipetas Pasteur, etc. de plástico no se reutilizan y se desechan.

El material de vidrio que se utiliza en la obtención y mantenimiento de los gametos y larvas (vasos de precipitado, probeta de fecundación, émbolo...), así como en la elaboración de las diluciones de tóxicos de referencia (matraces, vasos), se lava con agua, se deja una noche en ácido clorhídrico al 10%, se aclara con abundante agua y se enjuaga con agua destilada (Volpi Ghirardini *et al.*, 2005).

Agradecimientos

El presente trabajo es resultado de los proyectos FIT-310100-2006-7 (Profit - Ministerio de Industria, Turismo y Comercio) y S-PE05AT05 (Saiotek - Dpto. Industria, Comercio y Turismo; Gobierno Vasco), del contrato PTQ04-3-0597 (Programa Torres Quevedo - Ministerio de Educación) a J.M. Garmendia, y de la beca predoctoral de la Fundación Centros Tecnológicos-Iñaki Goenaga a I. Menchaca.

Queremos agradecer a M. Delarue, R. Beiras y N. Fernández por permitir la reproducción de las Figuras 2 del texto y 32-36 del anexo IV, y a Javier Franco por su revisión y enriquecedores comentarios que han mejorado el presente trabajo.

Esta es la contribución nº 452 de la Unidad de Investigación Marina de AZTI Tecnalia.

Referencias

- Alves, F.M.A., L.M. Chicharo, E. Serrao, A.D. Abreu, 2001. Algal cover and sea urchin spatial distribution at Madeira Island (NE Atlantic). *Scientia Marina*, 65(4): 383-392.
- Arizzi Novelli, A., C. Losso, P.F. Ghetti, A. Volpi Ghirardini, 2003a. Toxicity of heavy metals using sperm cell and embryo toxicity bioassays with *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea): comparisons with exposure concentrations in the Lagoon of Venice, Italy. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(6): 1295-1301.
- Arizzi Novelli, A., M. Picone, C. Losso, A. Volpi Ghirardini, 2003b. Ammonia as confounding factor in toxicity tests with the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lmk). *Toxicological and Environmental Chemistry*, 85(4-6): 183-191.
- Barnes, D.K.A., A.C. Crook, 2001. Quantifying behavioural determinants of the coastal European sea-urchin *Paracentrotus lividus*. *Marine Biology*, 138: 1205-1212.
- Bayed, A., F. Quiniou, A. Benrha, M. Guillou, 2005. The *Paracentrotus lividus* populations from the northern Moroccan Atlantic coast: growth, reproduction and health condition. *Journal of the Marine Biological Association of the U.K.*, 87: 763-767.
- Beiras, R., 2002. Comparison of methods to obtain a liquid phase in marine sediment toxicity bioassays with *Paracentrotus lividus* sea urchin embryos. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42: 23-28.
- Bellas, J., R. Beiras, J.C. Mariño-Balsa, N. Fernández, 2005a. Toxicity of organic compounds to marine invertebrate embryos and larvae: a comparison between the sea urchin embryogenesis bioassay and alternative test species. *Ecotoxicology*, 14: 337-353.
- Bellas, J., A. Granmo, R. Beiras, 2005b. Embryotoxicity of the antifouling biocide zinc pyrithione to sea urchin (*Paracentrotus lividus*) and mussel (*Mytilus edulis*). *Marine Pollution Bulletin*, 50: 1382-1385.
- Böttger, S.A., C.W. Walker, T. Unuma, 2004. Care and maintenance of adult echinoderms. *Methods in Cell Biology*, 74: 17-38.
- Wray, G.A., C. Kitazawa, B. Miner, 2004. Culture of echinoderm larvae through metamorphosis. *Methods in Cell Biology*, 74: 75-86.
- Gago, J., Range, P., Luis, O., 2003. Growth, reproductive biology and habitat selection of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the coastal of Cascais, Portugal. In: Féral, J.P., David, B. (Eds.), *Echinoderm Research 2001*, Balkema, Lisse, pp. 269-276.
- Casado-Martínez, M.C., N. Fernández, J. Lloret, A. Marín, C. Martínez-Gómez, I. Riba, R. Beiras, L. Saco-Álvarez, T.A. Del Valls, 2006. Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. III. Bioassay using embryos of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Ciencias Marinas*, 32(1B): 139-147.
- Crook, A.C., E. Verling, D.K.A. Barnes, 1999. Comparative study of the covering reaction of the purple sea urchin, *Paracentrotus lividus*, under laboratory and field conditions. *Journal of the Marine Biological Association of the U.K.*, 79: 1117-1121.
- Del Valls, T.A., M.C. Casado-Martínez, I. Riba, M.L. Martín-Díaz, J.M. Forja, E. García-Luque, A. Gómez-Parra, 2003. *Investigación conjunta sobre la viabilidad de utilizar ensayos ecotoxicológicos para la evaluación de la calidad ambiental del material de dragado*. Rep. Téc. CEDEX, noviembre 2003, Puerto Real, Cádiz.
- Environment Canada, 1992. *Biological test method. Assay using echinoids (sea urchins and sand dollars)*. Environmental Protection Series. Report: EPS 1/RM/27. Canada. 99 pp.
- Fernández, N., R. Beiras, 2001. Combined toxicity of dissolved mercury with copper, lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of the *Paracentrotus lividus* sea-urchin. *Ecotoxicology*, 10: 263-271.
- Fernández, N., 2002. *Evaluación biológica de la contaminación marina costera mediante bioensayos con embriones del erizo de mar Paracentrotus lividus*. Tesis doctoral. Universidad de Vigo. España. 211 pp.
- His, E., I. Heyvang, O. Geffard, X. de Montadoun, 1999. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for ecotoxicological studies. *Water Research*, 33(7): 1706-1718.
- Marín, A., S. Montoya, R. Vita, L. Marín-Guirao, J. Lloret, F. Aguado, 2007. Utility of sea urchin embryo-larval bioassays for assessing the environmental impact of marine fishcage farming. *Aquaculture*, 271: 286-297.
- Marín Guirao, L., A. Cesar, A. Marín, R. Vita, 2005. Assessment of sediment metal contamination in the Mar Menor coastal lagoon (SE Spain): metal distribution, toxicity, bioaccumulation and benthic community structure. *Ciencias Marinas*, 31(2): 413-428.
- Rolland, G., L. Guedes, V. Quintino, 1999. Comparative toxicity of experimental effluent from eucalyptus pulp kraft bleaching. *Ecotoxicology and Environmental Restoration*, 2(1): 19-25.
- Sellem, F., M. Guillou, 2007. Reproductive biology of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats of northern Tunisia (south-east Mediterranean). *Journal of the Marine Biological Association of the U.K.*, 87: 763-767.
- Shpigel, M., S.C. McBride, S. Marciano, I. Lupatsch, 2004. The effect of photoperiod and temperature on the reproduction of European sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*, 232: 343-355.
- Spirlet, C., P. Grosjean, M. Jangoux, 1998. Reproductive cycle of the echinoid *Paracentrotus lividus*: analysis by means of the maturity index. *Invertebrate Reproduction and Development*, 34(1): 69-81.
- Spirlet, C., P. Grosjean, M. Jangoux, 2000. Optimization of gonad growth by manipulation of temperature and photoperiod in cultivated sea urchins, *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata). *Aquaculture*, 185: 85-99.
- USEPA, 2002. *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms*. Third Edition. U.S. Environmental Protection Agency. Washington. 464 pp.
- Volpi Ghirardini, A., A. Arizzi Novelli, C. Losso, P.F. Ghetti, 2005. Sperm cell and embryo toxicity tests using the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lmk). In: G. Ostrander (Ed.), *Techniques in aquatic toxicology*, CRC press, vol. II, cap. 8, pp: 147-168.

Anexo I. RESUMEN Y ORDEN CRONOLÓGICO DE LAS TAREAS

Muestreo

- 1.- Muestreo de los sedimentos a analizar. Día -X (almacenamiento máximo de la muestra: 1 mes, a 4 °C. En caso de ser más tiempo, se debe congelar a -20 °C).

Laboratorio

- 2.- Obtención del elutriado (inicio). Día -1 (almacenamiento máximo del elutriado: 1 semana, a 4 °C).

- 3.- Preparación de diluciones del tóxico de referencia. Día 0

Muestreo

- 4.- Muestreo de los erizos adultos. Día 0

Laboratorio

- 5.- Medidas de parámetros físico-químicos y preparación de los elutriados. Día 0

- 6.- Obtención de las larvas de erizo. Día 0

- 7.- Prueba de toxicidad con el tóxico de referencia. Día 0

- 8.- Prueba de toxicidad de los sedimentos (elutriado). Día 0

- 9.- Fin del bioensayo (formolado de vasos). Día 2

- 10.- Medidas de parámetros (oxígeno, amonio) en elutriados. Día 2

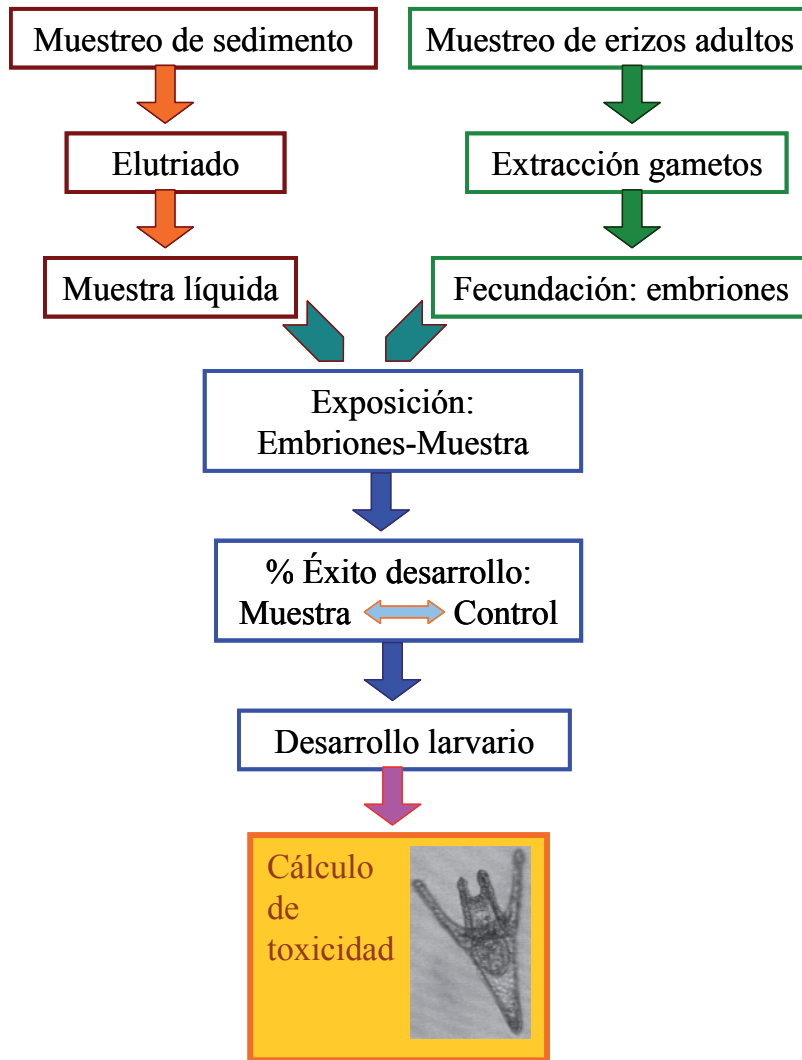
- 11.- Lectura de resultados del tóxico de referencia. Día 3

- 12.- Lectura de resultados de la prueba de toxicidad. Día 3

Informática

- 13.- Análisis estadísticos, interpretación de resultados y conclusiones. Día 4

Bioensayo con larvas de erizo



Anexo II. CUADROS RESUMEN

A. Cuadro resumen de la Prueba de Toxicidad de una muestra

Parámetro	Condiciones
Tipo de test	Test de toxicidad de sedimento
Temperatura	20 °C
Salinidad	33-36 psu
Fotoperiodo	Completa oscuridad
Vasos	25 ml
Organismos por vaso	500
Réplicas	10 para control; 5 para cada muestra
Tratamientos	Muestra + Control
Aireación	Ninguna
Calidad del agua	Medidas de temperatura, pH, oxígeno, salinidad y amonio
Duración del test	48 horas
Indicador	Éxito en la embriogénesis
Aceptabilidad del test	Al menos, 90% de larvas plúteus bien desarrolladas en el control
Toxicidad de la muestra	Si el éxito de desarrollo larvario en la muestra es significativamente diferente al del control y, además, la muestra presenta una inhibición del éxito superior en 20% o más a la del control.
Objetivo	Evaluar la toxicidad de un sedimento

B. Cuadro resumen de la Prueba de Toxicidad con CdCl₂ como sustancia de referencia

Parámetro	Condiciones
Tipo de test	Test de toxicidad con CdCl ₂
Temperatura	20 °C
Salinidad	33-36 psu
Fotoperiodo	Completa oscuridad
Vasos	25 ml
Organismos por vaso	500
Réplicas	10 para control; 5 para cada concentración
Tratamientos	5 diluciones (2, 4, 8, 16, 32 mg l ⁻¹) + control (0 mg l ⁻¹) (estas concentraciones se irán ajustando a medida que se vaya obteniendo más información)
Aireación	Ninguna
Duración del test	48 horas
Indicador	Éxito en la embriogénesis
Aceptabilidad del test	Al menos, 90% de larvas plúteus en control
Objetivo	Hallar la EC ₅₀ para el tóxico de referencia (CdCl ₂)

Anexo III. ESTADILLOS

- 1- Tratamiento inicial de las muestras para pruebas de toxicidad con larvas de erizos (*Paracentrotus lividus*).
- 2- Parámetros físico-químicos medidos en los elutriados a analizar.
- 3- Muestreo de erizos (*Paracentrotus lividus*) para obtención de larvas.
- 4- Densidad y éxito de fecundación de larvas de erizo (*Paracentrotus lividus*).
- 5- Prueba de toxicidad con muestra problema.
- 6- Prueba de toxicidad con tóxico de referencia.

1. TRATAMIENTO INICIAL DE LAS MUESTRAS PARA PRUEBAS DE TOXICIDAD CON LARVAS DE ERIZO
(Paracentrotus lividus)

PROYECTO:

Estación muestra	SEDIMENTO			ELUTRIADO					
	Fecha muestreo	Almacenamiento a 4°C (máximo 1 mes)		Rotación 30 minutos		Decantación 12 h, 20°C, oscuridad		Almacenamiento a 4°C (máximo 1 semana)	
		Entrada en refrigerador	Salida de refrigerador	Inicio	Fin	Inicio	Fin	Entrada en refrigerador	Salida de refrigerador

2. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS MEDIDOS EN LOS ELUTRIADOS A ANALIZAR

PROYECTO:

Muestra	Fecha/hora medida	Temp (°C)	Salinidad (psu)	Oxígeno		pH	Amonio (mg/l)		Observaciones
				t=0	t=48h		t=0	t=48h	

3. MUESTREO DE ERIZOS (*Paracentrotus lividus*) PARA OBTENCIÓN DE LARVAS

PROYECTO:

Fecha	Población	Hora bajamar (altura marea)	Hora registro	Temp (°C)	Salin. (psu)	Ejemplares recogidos	Código del material larvario	Observaciones

4. DENSIDAD Y ÉXITO DE FECUNDACIÓN DE LARVAS DE ERIZO (*Paracentrotus lividus*)

PROYECTO:

Fecha	Código de material larvario	Obtención de gametos		DENSIDAD			FERTILIZACIÓN		
		Inducción (I) Disección (D)		Lectura de densidad (20 µl)		Lectura de fertilización		% Fecund	Fecund. >90%? (Sí/No)
		Macho	Hembra	Óvulos contados	Volumen (µl) con 500 huevos	Óvulos contados	Óvulos fertilizados		
					Med	Vol			
							Promedio		
					Med	Vol			
							Promedio		
					Med	Vol			
							Promedio		

5. PRUEBA DE TOXICIDAD CON MUESTRA PROBLEMA.
ÉXITO DE EMBRIOGÉNESIS DE LARVAS DE ERIZO (*Paracentrotus lividus*)

PROYECTO:

Fecha	Muestra	Código del material larvario	% fecundación	EMBRIOGÉNESIS				
				Réplica	Nº larvas contadas	Nº larvas bien desarrolladas	% éxito desarrollo	Promedio Desv. Típica
				1				
				2				
				3				
				4				
				5				
				1				
				2				
				3				
				4				
				5				
				1				
				2				
				3				
				4				
				5				

**6. PRUEBA DE TOXICIDAD CON TÓXICO DE REFERENCIA.
ÉXITO DE EMBRIOGÉNESIS DE LARVAS DE ERIZO (*Paracentrotus lividus*).**

PROYECTO: Tóxico de referencia:
Código del material larvario: Fecha prueba:
% éxito de fecundación:

Concentración (mg/L)	Réplica	Nº larvas contadas	Nº larvas bien desarrolladas	% éxito desarrollo	Promedio Desv. típica
0	1				
0	2				
0	3				
0	4				
0	5				
0	6				
0	7				
0	8				
0	9				
0	10				
	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
	1				
	2				
	3				
	4				
	5				

Anexo IV. FOTOGRAFÍAS Y FIGURAS

I.-Muestreo de erizos

- 1 Erizos bajo el agua.
- 2 y 3 Recogida de erizos.
- 4 Erizos extraídos y espátula con referencia de tamaño (40 mm).

II.- Trabajo en laboratorio:

II.a.- Obtención de la muestra

- 5 Rueda giratoria para mezcla y obtención de elutriado de la muestra.
- 6 Extracción del elutriado de la muestra.

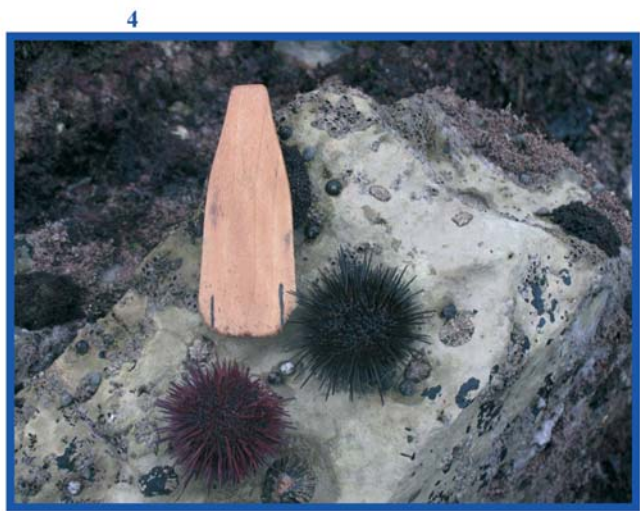
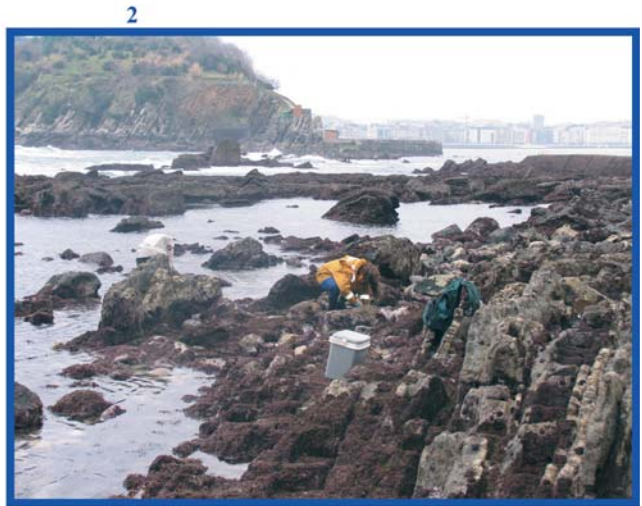
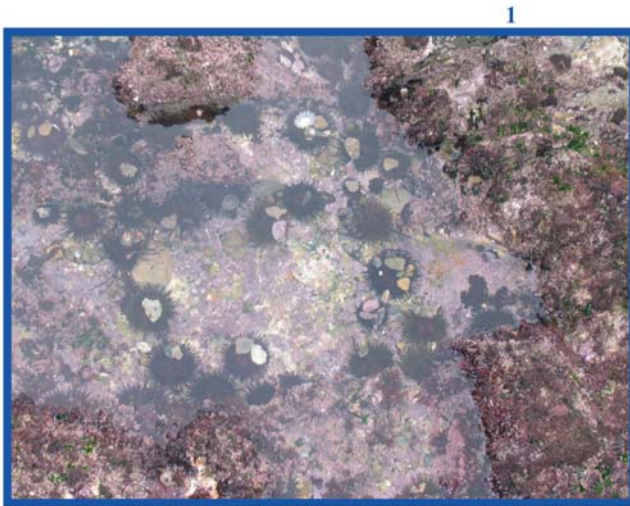
II.b.- Manipulación de erizos

- 7 y 8 Extracción de los erizos del recipiente de transporte y escurrido sobre papel.
- 9 Mantenimiento de erizos en cámara, en recipientes con agua marina, con aireación y temperatura controlada (en el caso de que la manipulación de erizos se lleve a cabo unas horas o un día más tarde al muestreo).
- 10, 11 y 12 Corte ecuatorial de los erizos con un bisturí.
- 13 Erizo abierto por su eje ecuatorial.
- 14 Extracción de gametos de la gónada con pipeta Pasteur.
- 15 Oocitos en vaso.
- 16 Observación al microscopio.
- 17 Adición de gametos a probeta con agua de mar filtrada.
- 18 Mezcla de gametos con émbolo.
- 19 Distribución de larvas en los vasos de desarrollo.
- 20 Mantenimiento de los vasos dentro de cámara de incubación.
- 21 Inducción al desove mediante inyección de KCl.
- 22 Material para la fecundación de gametos.

II.c.- Larvas

- 23 Oocitos maduros.
- 24 Oocitos fecundados: puede verse la membrana de fertilización en ambos oocitos con distinto grado de desarrollo o separación.
- 25 Oocito fecundado, pueden apreciarse espermatozoides fuera de la membrana.
- 26 2 oocitos: uno (derecho) fecundado y el otro (izquierdo) aún inmaduro.
- 27 Desarrollo de la larva: primera división mitótica y mórulas.
- 28 y 29 Desarrollo de la larva: gástrula (28) y pre-plúteus (29).
- 30 y 31 Larva plúteus bien desarrollada.
- 32 y 33 Larvas plúteus correctamente desarrolladas en vista frontal (32) y lateral (33) (tomado de Delarue, M. *Développement des échinodermes. La phase larvaire*. <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/oursinMDC/coursours3/p51larve.html>)).
- 34 y 35 Resultado de exposición de larvas a distintas muestras: (34) larvas poco desarrolladas ⇒ muestra tóxica; (35) larvas correctamente desarrolladas ⇒ muestra no tóxica (tomado de Beiras y Fernández, Universidade de Vigo. <http://webs.uvigo.es/rbeiras/>).
- 36 Distintos estados embrionarios en los que se detiene el desarrollo en función de la concentración de un tóxico (modificado de Fernández, 2002).

I.-Muestreo de erizos



II.- Trabajo en laboratorio:

II.a.- Obtención de la muestra



II.b.- Manipulación de erizos

7



8



9



10



11



12



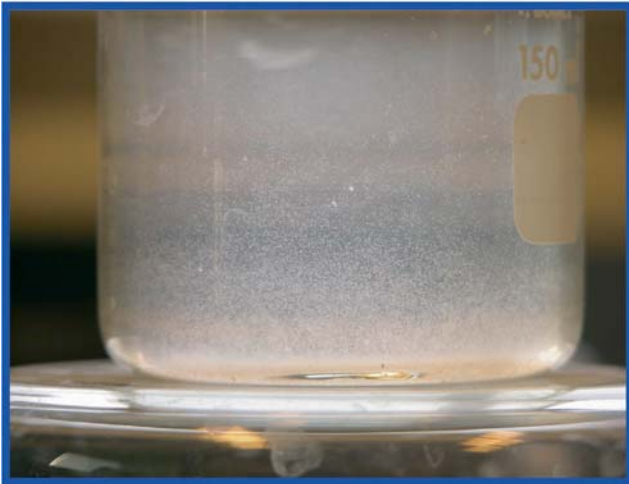
13



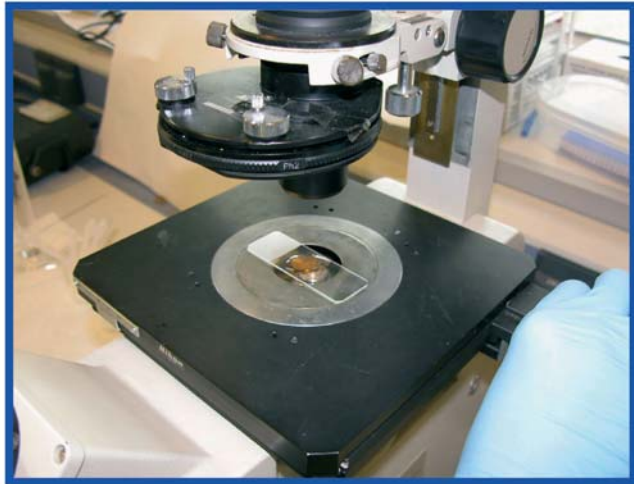
14



15



16



17



18



19



20



21

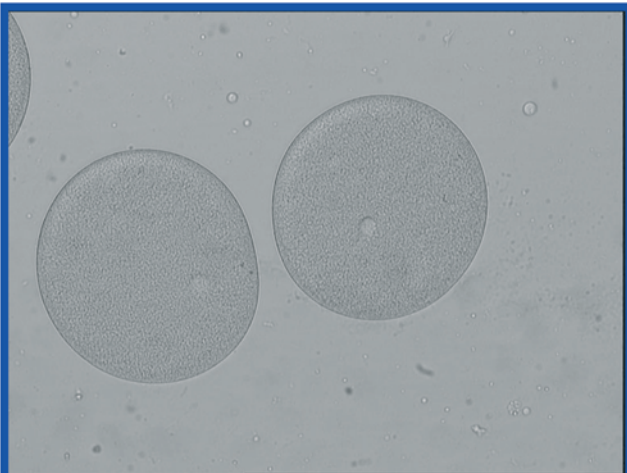


22

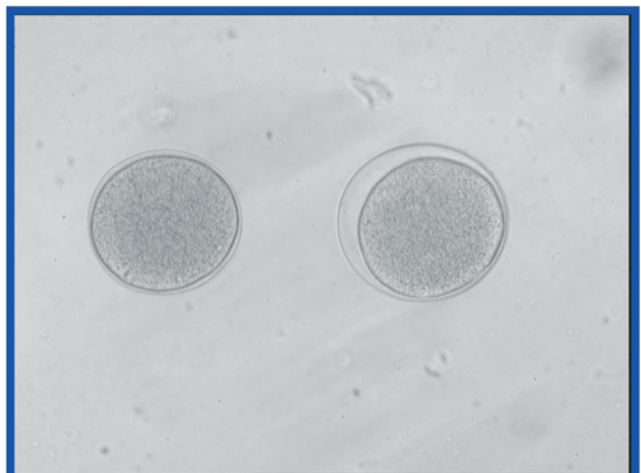


II.c.- Larvas

23



24



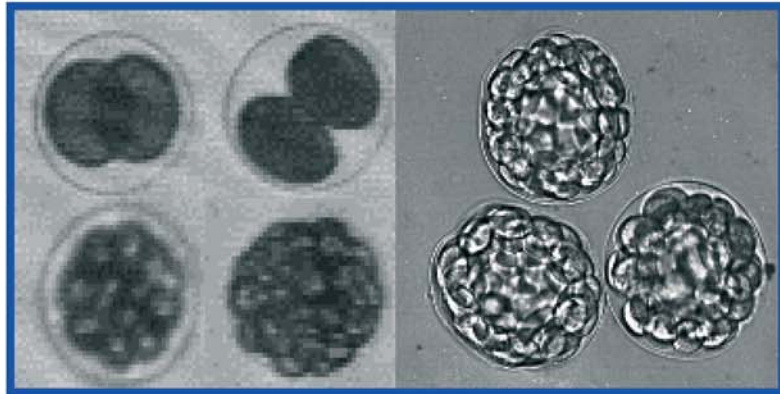
25



26



27



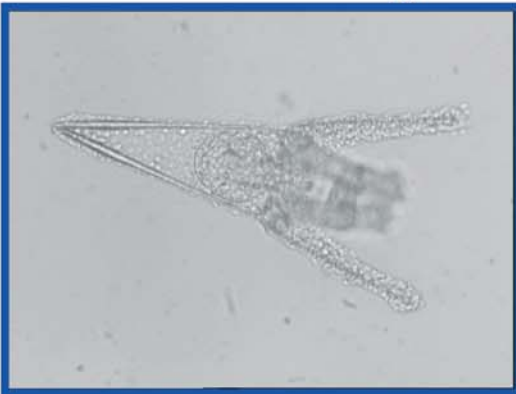
28



29



30



31

