

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES**



**“TOXICIDAD DEL SEDIMENTO MARINO DE DOS BAHÍAS  
PERUANAS EMPLEANDO LAS MICROALGAS MARINAS  
*Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica*”**

**Presentada por:**

**HAYDEÉ FELÍCITA LÓPEZ CABANILLAS**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAGISTER SCIENTIAE EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**Lima- Perú**

**2019**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO MAESTRÍA EN CIENCIAS  
AMBIENTALES**

**“TOXICIDAD DEL SEDIMENTO MARINO DE DOS  
BAHÍAS PERUANAS EMPLEANDO LAS MICROALGAS  
MARINAS *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica*”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAGISTER SCIENTIAE**

**Presentada por:**

**HAYDEÉ FELÍCITA LÓPEZ CABANILLAS**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**



---

Mg.Sc. Rosa María Miglio Toledo

**PRESIDENTE**

---

M.Eng. María Cristina Miglio Toledo

**PATROCINADOR**

---

Dra. Marta Williams León de Castro

**MIEMBRO**

---

Ph.D. Lizardo Visitación Figueroa

**MIEMBRO**

LIMA – PERÚ

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA  
ESCUELA DE POSGRADO



"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"

**ACTA DE SUSTENTACIÓN**

ASTM-EPG-UNALM: N° 73/2019

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos para evaluar la sustentación de tesis presentada por la alumna **HAYDEÉ FELÍCITA LÓPEZ CABANILLAS**, titulada: "TOXICIDAD DEL SEDIMENTO MARINO DE DOS BAHÍAS PERUANAS EMPLEANDO LAS MICROALGAS MARINAS *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica*", para cumplir con uno de los requisitos para optar el grado académico de Maestro denominado *Magister Scientiae* en **CIENCIAS AMBIENTALES**.

Teniendo en consideración los méritos del referido trabajo así como los conocimientos demostrados por la sustentante, el Jurado otorga el siguiente calificativo:

<u>JURADO</u>	<u>CALIFICATIVO*</u>	<u>FIRMA</u>
Mg.Sc. Rosa María Miglio Toledo PRESIDENTE	Sobresaliente	
Dra. Marta Williams León de Castro MIEMBRO	Muy bueno	
Ph.D. Lizardo Visitación Figueroa MIEMBRO	Sobresaliente	
M.Eng. María Cristina Miglio Toledo ASESOR	Muy bueno	
Siendo su calificativo final:	Muy bueno	

En consecuencia, queda en condición de ser considerada APTA por el Consejo Universitario y recibir el grado académico de Maestro denominado *Magister Scientiae*, de conformidad con lo estipulado en el Artículo 97°, inciso c) del Reglamento de la Escuela de Posgrado.

La Molina, 16 de agosto del 2019



(\*) De acuerdo con el Artículo 102° de la Escuela de Posgrado, el calificativo de la sustentación será nominal: bueno, muy bueno o sobresaliente. El calificativo de sobresaliente deberá aplicarse solo si existe unanimidad.

A mí muy amado compañero de vida, Hugo Augusto, que con sus consejos siempre me hace pisar tierra. Con su amor y paciencia logra que siempre entregue lo mejor de mí.



A mis dos amores, Andrea Lucía y Fabio Augusto, lindos ángeles, que Dios puso en mi vida para llenarme de felicidad. Ambos, desde mi vientre, desde sus primeros pasos, desde sus primeras palabras y así muchos logros más, han sido partícipes de cada etapa de la maestría y tesis de Grado. Ellos dos son mis grandes maestros de vida.

## AGRADECIMIENTOS

Empezaré agradeciendo a Dios, por darme fuerzas para luchar por mis metas.

A mi madre, hermana y madrina por su apoyo moral y ayuda incondicional que fueron precisas para que esta meta poco a poco se vaya concretando.

A María Cristina Miglio por la paciencia y enseñanzas brindadas en todas las etapas de esta tesis. A Christian Paredes por ser un mar de conocimientos, resolviendo todas mis dudas. A Aida Henostroza, Manuel Mendoza y Ricardo Dioses por su ayuda en la fase experimental de esta investigación.

Al personal del Area Funcional de Investigaciones Marino Costeras del Intituto del Mar del Perú por el apoyo brindado.



# ÍNDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
2.1 Sedimentos marinos .....	4
2.2 Características de las zonas de estudio.....	6
2.2.1 Bahías Tortugas - Casma.....	6
2.2.2 Bahía Paracas .....	9
2.3 Pruebas de toxicidad en sedimentos marinos .....	12
2.4 Pruebas de toxicidad con microalgas .....	16
2.4.1 Pruebas de toxicidad con <i>Isochrysis galbana</i> .....	18
2.4.2 Pruebas de toxicidad con <i>Nannochloropsis oceanica</i> .....	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1 Centro de ejecución experimental .....	22
3.2 Áreas de estudio.....	22
3.3 Obtención de muestras .....	27
3.3.1 Muestras de sedimento marino .....	27
3.3.2 Cultivo de microalgas marinas .....	27
3.3.3 Elutriado de sedimento marino.....	29
3.4 Pruebas de toxicidad .....	29
3.4.1 Pruebas de sensibilidad de microalgas .....	31
3.4.2. Pruebas de toxicidad con elutriado de sedimento marino.....	36
3.4.2.1 Pruebas preliminares.....	36
3.4.2.2 Pruebas definitivas o Multiconcentración .....	37
3.4.3 Conteo celular con cámara Neubauer .....	38
3.4.4 Diagrama de flujo para el procedimiento de los bioensayos .....	41
3.5 Análisis de los datos .....	41
3.5.1 Pruebas preliminares .....	41
3.5.2 Pruebas definitivas .....	41
3.5.3 Determinación de la concentración de inhibición media (CI <sub>50</sub> ) .....	43
3.5.4 Toxicidad del sedimento marino de las zonas de estudio .....	44

3.5.5 Condiciones básicas para pruebas de toxicidad con <i>Isochrysis galbana</i> y <i>Nannochloropsis oceanica</i> .....	44
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>45</b>
4.1 Pruebas de sensibilidad de las microalgas .....	45
4.1.1 Pruebas de sensibilidad con la microalga <i>Isochrysis galbana</i> .....	45
4.1.2 Pruebas de sensibilidad con la microalga <i>Nannochloropsis oceanica</i> .....	48
4.2 Pruebas preliminares de toxicidad con microalgas en elutriado de sedimentos marinos.....	51
4.2.1 Bahía Tortugas-Casma .....	51
4.2.1.1 Prueba con <i>Isochrysis galbana</i> .....	51
4.2.1.2 Prueba con <i>Nannochloropsis oceanica</i> .....	55
4.2.2 Bahía Paracas .....	59
4.2.2.1 Pruebas con <i>Isochrysis galbana</i> .....	59
4.2.2.2 Prueba con <i>Nannochloropsis oceanica</i> .....	63
4.3 Concentración de Inhibición Media (CI <sub>50</sub> ) del sedimento marino expuestos a las microalgas <i>Isochrysis galbana</i> y <i>Nannochloropsis oceanica</i> en las bahías Tortugas-Casma y Paracas .....	68
4.3.1 Bahía Tortugas-Casma .....	68
4.3.2 Bahía Paracas .....	75
4.4 Toxicidad del sedimento marino en las bahías Tortugas-Casma y Paracas .....	87
4.4.1 Bahías Tortugas-Casma.....	87
4.4.2 Bahías Paracas.....	94
4.5 Condiciones básicas para pruebas de toxicidad con cobre y elutriado de sedimento marino empleando <i>Isochrysis galbana</i> y <i>Nannochloropsis oceanica</i> ...	101
4.5.1 Tipo de prueba.....	106
4.5.2 Duración de la prueba .....	106
4.5.3 Parámetros Físicoquímicos .....	106
4.5.4 Intensidad lumínica.....	107
4.5.5 Recipiente de pruebas .....	108
4.5.6 Edad de cultivo de las microalgas.....	109
4.5.7 Densidad celular del inóculo .....	109
4.5.8 Criterio de aceptabilidad de la prueba de toxicidad.....	110
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	<b>113</b>

<b>VI. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>114</b>
<b>VII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>115</b>
<b>VIII. ANEXOS .....</b>	<b>132</b>





## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ubicación de la Bahía Tortugas-Casma.....	6
Figura 2. Circulación marina de fondo en la Bahía Tortugas-Casma.....	8
Figura 3. Ubicación de la Bahía Paracas.....	10
Figura 4. Circulación marina superficial en la Bahía Paracas.....	12
Figura 5. Preparación de elutriado para ensayos de toxicidad con microalgas marinas <i>Isochrysis galbana</i> y <i>Nannochloropsis oceanica</i> . ....	30
Figura 6. Diseño en Bloques Completamente Aleatorizado (DBCA) 6x4 para pruebas de toxicidad. ....	31
Figura 7. Preparación del control positivo con sulfato de cobre pentahidratado para ensayos de toxicidad con microalgas marinas <i>Isochrysis galbana</i> y <i>Nannochloropsis oceanica</i> .....	33
Figura 8. Diseño de la prueba de toxicidad con microalgas expuestas al 0 por ciento y 100 por ciento del elutriado marino de las zonas y estación de muestreo. ....	37
Figura 9. Diseño en Bloques Completamente Aleatorizado (DBCA) 6x4 de la prueba de toxicidad con microalgas expuestas a diferentes concentraciones de elutriado marino.....	38
Figura 10. Metodología de recuento celular con cámaras de Neubauer en microscopio compuesto. ....	40
Figura 11. Conteo en cámara de Neubauer.....	41
Figura 12. Diagrama de flujo de pruebas de toxicidad de sedimentos marinos empleando <i>Isochrysis galbana</i> y <i>Nannochloropsis oceanica</i> .....	42
Figura 13. Árbol de decisión para determinar si es necesario realizar multiconcentración. ....	43
Figura 14. Crecimiento celular promedio (células/mL) de <i>Isochrysis galbana</i> expuesta a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) a las 24, 48, 72 y 96 horas.....	47
Figura 15. Concentración de inhibición ( $\text{CI}_{50}$ ) <i>Isochrysis galbana</i> a las 24, 48, 72 y 96 horas de exposición al sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ).....	47
Figura 16. Porcentaje de inhibición de <i>Isochrysis galbana</i> , a las 96 horas, en función de la concentración de sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ).....	48

**Figura 17. Crecimiento celular promedio (células/mL) de *Nannochloropsis oceanica* expuesta a diferentes concentraciones de sulfato de cobre a las 24, 48, 72 y 96 horas.49**

**Figura 18. Concentración de inhibición (CI<sub>50</sub>) del sulfato de cobre pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) empleando *Nannochloropsis oceanica* a las 24, 48, 72 y 96 horas de exposición. .... 50**

**Figura 19. Porcentaje de inhibición de *Nannochloropsis oceanica* a las 96 horas, en función de la concentración de sulfato de cobre pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O)..... 50**

**Figura 20. Crecimiento celular promedio (células/mL) de *Isochrysis galbana* en el control negativo a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de exposición a las pruebas de toxicidad con sedimento marino de las estaciones de muestreo de la Bahía Tortugas-Casma muestreadas en marzo del 2016. Línea azul: Criterio de aceptabilidad  $\geq 1 \times 10^6$  cél/mL. .... 52**

**Figura 21. Crecimiento celular promedio (células/mL) de *Isochrysis galbana* en el control negativo a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de exposición a las pruebas de toxicidad con sedimento marino de las estaciones de muestreo de la Bahía Tortugas-Casma muestreadas en agosto del 2016. Línea azul: Criterio de aceptabilidad  $\geq 1 \times 10^6$  cél/mL. .... 53**

**Figura 22. Crecimiento celular promedio (células/mL) de *Nannochloropsis oceanica* en el control negativo a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de exposición a las pruebas de toxicidad con sedimento marino de las estaciones de muestreo de la Bahía Tortugas-Casma muestreadas en marzo del 2016. Línea azul: Criterio de aceptabilidad  $\geq 1 \times 10^6$  cél/mL. .... 56**

**Figura 23. Crecimiento celular promedio (células/mL) de *Nannochloropsis oceanica* en el control negativo a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de exposición a las pruebas de toxicidad con sedimento marino de las estaciones de muestreo de la Bahía Tortugas-Casma muestreadas en agosto del 2016. Línea azul: Criterio de aceptabilidad  $\geq 1 \times 10^6$  cél/mL. .... 57**

**Figura 24. Crecimiento celular promedio (células/mL) de *Isochrysis galbana* en el control negativo a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de exposición a las pruebas de toxicidad con sedimento marino de las estaciones de muestreo de la Bahía Paracas muestreadas en abril de l 2016. Línea azul: Criterio de aceptabilidad  $\geq 1 \times 10^6$  cél/mL. .... 60**

**Figura 25. Crecimiento celular promedio (células/mL) de *Isochrysis galbana* en la muestra del control negativo (C<sub>0</sub>) a las 24, 48, 72 y 96 horas de exposición a las pruebas de toxicidad con sedimento marino de las estaciones de muestreo de la Bahía Paracas muestreadas en setiembre del 2016. Línea azul: Criterio de aceptabilidad  $\geq 1 \times 10^6$  cél/mL ..... 61**

**Figura 26. Crecimiento celular promedio (células/mL) de *Nannochloropsis oceanica* en la muestra control negativo a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de exposición a las**

pruebas de toxicidad con sedimento marino de las estaciones de muestreo de la Bahía Paracas muestreadas en abril del 2016. Línea azul: Criterio de aceptabilidad  $\geq 1 \times 10^6$  cél/mL. .... 64

Figura 27. Crecimiento celular promedio (células/mL) de *Nannochloropsis oceanica* en la muestra del control negativo a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de exposición a las pruebas de toxicidad con sedimento marino de las estaciones de muestreo de la Bahía Paracas muestreadas en setiembre del 2016. Línea azul: Criterio de aceptabilidad  $\geq 1 \times 10^6$  cél/mL. .... 65

Figura 28. Porcentaje de inhibición en función del porcentaje de dilución de elutriado de sedimento marino y estimación de  $CI_{50-96h}$  para *Isochrysis galbana* de las estaciones en Bahía Tortugas-Casma: (A) E2, (B) E3, (C) E32 y (D) E33 en marzo 2016. .... 72

Figura 29. Porcentaje de inhibición en función del porcentaje de dilución de elutriado de sedimento marino y estimación de  $CI_{50-96h}$  para *Isochrysis galbana* en Bahía Tortugas-Casma de las estaciones: (A) E2, (B) E22 en agosto del 2016. .... 75

Figura 30. Porcentaje de inhibición en función del porcentaje de dilución de elutriado de sedimento marino y estimación de  $CI_{50-96h}$  para *Isochrysis galbana* de las estaciones (A) E20, (B) E27 y (C) E10A en abril del 2016. .... 79

Figura 31. Porcentaje de inhibición en función del porcentaje de dilución de elutriado de sedimento marino y estimación de  $CI_{50-96h}$  para *Isochrysis galbana* de las estaciones (A) E10, (B) E27 y (C) E28 en Setiembre del 2016. .... 83

Figura 32. Porcentaje de inhibición en función del porcentaje de dilución de elutriado de sedimento marino y estimación de  $CI_{50-96h}$  para *Isochrysis galbana* de la estación E10 en Setiembre del 2016. .... 85

Figura 33. Densidad promedio (células/mL) de *Isochrysis galbana* en control negativo y diluciones de elutriados de los sedimentos a las 96 horas de exposición. (A) Bahía Tortugas-Casma, marzo 2016, (B) Bahía Tortugas-Casma, agosto 2016, (C) Bahía Paracas, abril 2016 y (D) Bahía Paracas, setiembre 2016. .... 86

Figura 34. Densidad promedio (Células/mL) de *Nannochloropsis oceanica* en control negativo y diluciones de elutriados de los sedimentos a las 96 horas de exposición, estación E10, en Bahía Paracas, Setiembre del 2016. .... 87

Figura 35. Toxicidad del sedimento marino en las Bahías Tortugas-Casma empleando *Isochrysis galbana*, durante el año 2016. .... 89

Figura 36. Toxicidad del sedimento marino en las Bahías Paracas empleando *Isochrysis galbana*, durante el año 2016. .... 96

Figura 37. Porcentaje de estaciones tóxicas, en ambos muestreos, en el sedimento marino de las Bahías Tortugas-Casma y Paracas a las 96 horas de exposición empleando *Isochrysis galbana*, durante el año 2016. .... 100

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Efecto de la exposición de microalgas a cobre. ....	18
Tabla 2. Efecto de la exposición de <i>Isochrysis galbana</i> a diferentes soluciones químicas. ....	19
Tabla 3. Efecto de la exposición de especies de <i>Nannochloropsis</i> con cobre. ....	21
Tabla 4. Estaciones de muestreo de sedimento marino de la Bahía Tortugas - Casma, marzo y agosto del 2016. ....	23
Tabla 5. Estaciones de muestreo de sedimento marino de la Bahía Paracas, abril y setiembre del 2016. ....	25
Tabla 6. Formulación usada en el Laboratorio de Microalgas para la preparación del medio Guillar F/2 modificado. ....	28
Tabla 7. Condiciones usadas en las pruebas de toxicidad con <i>Isochrysis galbana</i> . ....	34
Tabla 8. Condiciones usadas en las pruebas de toxicidad con <i>Nannochloropsis oceanica</i> . ....	35
Tabla 9. Equipos usados y frecuencia de medición de parámetros físicoquímicos de las pruebas de toxicidad con microalgas. ....	36
Tabla 10. Rangos de clasificación de la respuesta a la toxicidad del sedimento marino. ....	44
Tabla 11. Valores de significancia del crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> en la muestra del control negativo a las 24 y 96 horas de las estaciones de muestreo de la Bahía Tortugas-Casma, muestreadas en marzo y agosto del 2016. ....	54
Tabla 12. Resultados de las pruebas preliminares con <i>Isochrysis galbana</i> para las estaciones de muestreo de la Bahía Tortugas-Casma, muestreadas en marzo y agosto del 2016. ....	55
Tabla 13. Resultados de las pruebas preliminares con <i>Isochrysis galbana</i> para las estaciones de muestreo de la Bahía Tortugas-Casma, muestreadas en marzo y agosto del 2016. ....	58
Tabla 14. Resultados de las pruebas preliminares con <i>Nannochloropsis oceanica</i> para las estaciones de muestreo de la Bahía Tortugas-Casma, muestreadas en marzo y agosto del 2016. ....	59

Tabla 15. Valores de significancia del crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> en la muestra del control negativo a las 24 y 96 horas de las estaciones de muestreo de la Bahía Paracas, muestreadas en abril y setiembre del 2016. ....	62
Tabla 16. Resultados de las pruebas preliminares con <i>Isochrysis galbana</i> para las estaciones de muestreo de la Bahía Paracas, muestreadas en abril y setiembre del 2016. ....	63
Tabla 17. Valores de significancia del crecimiento de <i>Nannochloropsis oceanica</i> en la muestra control (C <sub>0</sub> ) a las 24 y 96 horas de las estaciones de muestreo de la Bahía Paracas, muestreadas en abril y setiembre del 2016. ....	66
Tabla 18. Resultados de las pruebas preliminares con <i>Nannochloropsis oceanica</i> para las estaciones de muestreo de la Bahía Paracas, muestreadas en abril y setiembre del 2016. ....	67
Tabla 19. Concentración de Inhibición media (CI <sub>50</sub> ) del elutriado de sedimento marino, a las 96 horas, expuesto a <i>Isochrysis galbana</i> , Bahía Tortugas-Casma. ....	68
Tabla 20. Concentración de Inhibición media (CI <sub>50-96</sub> ) del elutriado de sedimento marino, a las 96 horas, expuesto a <i>Isochrysis galbana</i> , Bahía Paracas. ....	76
Tabla 21. Concentración de Inhibición media (CI <sub>50-96</sub> ) del elutriado de sedimento marino, a las 96 horas, expuesto a <i>Nannochloropsis oceanica</i> , Bahía Paracas. ....	76
Tabla 22. Toxicidad de sedimento marino al cabo de las 96 horas en la Bahía Tortugas – Casma empleando la microalga <i>Isochrysis galbana</i> y <i>Nannochloropsis oceanica</i> en los meses de marzo y agosto del 2016 .....	88
Tabla 23. Criterio de calidad de concentración de metales en sedimentos. ....	90
Tabla 24. Toxicidad de sedimento marino al cabo de las 96 horas en la Bahía Paracas empleando la microalga <i>Isochrysis galbana</i> y <i>Nannochloropsis oceanica</i> en los meses de abril y setiembre de 2016. ....	95
Tabla 25. Condiciones básicas para pruebas de toxicidad con sulfato de cobre pentahidratado (CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O,) a las 96 horas, empleando <i>Isochrysis galbana</i> .....	102
Tabla 26. Condiciones básicas para pruebas de toxicidad con sulfato de cobre pentahidratado (CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O) a las 96 horas, empleando <i>Nannochloropsis oceanica</i> . ....	103
Tabla 27. Condiciones básicas para pruebas de toxicidad con elutriado de sedimento marino a 96 horas empleando <i>Isochrysis galbana</i> .....	104
Tabla 28. Condiciones básicas para pruebas de toxicidad con elutriado de sedimento marino a 96 horas empleando <i>Nannochloropsis oceanica</i> .....	105

**Tabla 29. Inóculos de microalgas utilizados para bioensayos de toxicidad en otros estudios. .... 110**

**Tabla 30. Características adicionales de las pruebas de toxicidad aplicadas a las microalgas *Isoschrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica*. .... 112**



## ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
ANEXO 1. Curva de crecimiento celular promedio de (A) <i>Isochrysis galbana</i> y (B) <i>Nannochloropsis oceanica</i> a las 24, 48, 72 y 120 horas. ....	132
ANEXO 2. Concentración de Inhibición Media (CI50) de Sulfato de cobre pentahidratado (CUSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O) expuesta a <i>Isochrysis galbana</i> a las 96 horas. ....	133
ANEXO 3. Tasa de crecimiento y diferencias significativas de la densidad celular promedio con inóculo de 5mL, 10mL y 100mL de <i>Isochrysis galbana</i> y <i>Nannochloropsis oceanica</i> a las 24, 48, 72 y 120 horas. ....	133
ANEXO 4. Crecimiento celular promedio (células/mL) de <i>Isochrysis galbana</i> a las 24, 48, 72 y 96 horas expuestas a distintas concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado. ....	133
ANEXO 5. Crecimiento celular promedio (células/mL) de <i>Nannchloropsis oceanica</i> a las 24, 48, 72 y 96 horas expuestas a distintas concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado. ....	134
ANEXO 6. Crecimiento celular promedio (células/mL) y tasa de crecimiento (d <sup>-1</sup> ) de <i>Isochrysis galbana</i> de la muestra control a las 0, 24, 48, 72 y 96 de las estaciones muestreadas en Bahía Tortugas-Casma en el mes de marzo del 2016. ....	134
ANEXO 7. Crecimiento celular promedio (células/mL) y tasa de crecimiento (d <sup>-1</sup> ) de <i>Isochrysis galbana</i> de la muestra control a las 0, 24, 48, 72 y 96 de las estaciones muestreadas en Bahía Tortugas-Casma en el mes de agosto del 2016. ....	134
ANEXO 8. Crecimiento celular promedio (células/mL) y tasa de crecimiento (d <sup>-1</sup> ) de <i>Nannochloropsis oceanica</i> de la muestra control a las 0, 24, 48, 72 y 96 de las estaciones muestreadas en Bahía Tortugas-Casma en el mes de marzo del 2016. ....	135
ANEXO 9. Crecimiento celular promedio (células/mL) y tasa de crecimiento (d <sup>-1</sup> ) de <i>Nannochloropsis oceanica</i> de la muestra control a las 0, 24, 48, 72 y 96 de las estaciones muestreadas en Bahía Tortugas-Casma en el mes de agosto del 2016. ....	135
ANEXO 10. Crecimiento celular promedio (células/mL) y tasa de crecimiento (d <sup>-1</sup> ) de <i>Isochrysis galbana</i> de la muestra control a las 0, 24, 48, 72 y 96 de las estaciones muestreadas en Bahía Paracas en el mes de abril del 2016. ....	135
ANEXO 11. Crecimiento celular promedio (células/mL) y tasa de crecimiento (d <sup>-1</sup> ) de <i>Isochrysis galbana</i> de la muestra control a las 0, 24, 48, 72 y 96 de las estaciones muestreadas en Bahía Paracas en el mes de setiembre del 2016. ....	136



<b>ANEXO 12. Crecimiento celular promedio (células/mL) y tasa de crecimiento (<math>d^{-1}</math>) de <i>Nannochloropsis oceanica</i> de la muestra control a las 0, 24, 48, 72 y 96 de las estaciones muestreadas en Bahía Paracas en el mes de abril del 2016. ....</b>	<b>136</b>
<b>ANEXO 13. Crecimiento celular promedio (células/mL) y tasa de crecimiento (<math>d^{-1}</math>) de <i>Nannochloropsis oceanica</i> de la muestra control a las 0, 24, 48, 72 y 96 de las estaciones muestreadas en Bahía Paracas en el mes de Setiembre del 2016. ....</b>	<b>137</b>
<b>ANEXO 14. Relación entre el crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E2 en la Bahía Tortugas-Casma, marzo 2016. ....</b>	<b>138</b>
<b>ANEXO 15. Relación entre el crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E3 en la Bahía Tortugas-Casma, marzo 2016. ....</b>	<b>139</b>
<b>ANEXO 16. Relación entre el crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E32 en la Bahía Tortugas-Casma, marzo 2016. ....</b>	<b>140</b>
<b>ANEXO 17. Relación entre el crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E33 en la Bahía Tortugas-Casma, marzo 2016. ....</b>	<b>141</b>
<b>ANEXO 18. Valores de Parámetros físicoquímicos (t=0h y t=96h) para la prueba de toxicidad de la microalga <i>Isochrysis galbana</i> con porcentaje de dilución de elutriado de sedimento marino en la Bahía Tortugas-Casma de las estaciones de muestreo en marzo del 2016. ....</b>	<b>142</b>
<b>ANEXO 19. Valores de significancia de los parámetros físicoquímicos de las pruebas de toxicidad en dilución de elutriado de sedimento marino de la Bahía Tortugas-Casma empleando <i>Isochrysis galbana</i> (cero y 96 horas), muestreadas en marzo del 2016. ....</b>	<b>142</b>
<b>ANEXO 20. Valores de significancia del crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> en el control negativo a las 24 y 96 horas en la Bahía Tortugas-Casma, marzo del 2016..</b>	<b>143</b>
<b>ANEXO 21. Valores de significancia (<math>p&lt;0,05</math>) de la densidad microalgal media de <i>Isochrysis galbana</i> al finalizar la prueba de toxicidad (96 horas) con porcentaje del elutriado del sedimento marino en la Bahía Tortugas-Casma, en marzo del 2016..</b>	<b>143</b>
<b>ANEXO 22. Relación entre el crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E3 en la Bahía Tortugas-Casma, agosto del 2016. ....</b>	<b>144</b>
<b>ANEXO 23. Relación entre el crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E22 en la Bahía Tortugas-Casma, agosto del 2016. ....</b>	<b>145</b>



<b>ANEXO 24. Valores de Parámetros físicoquímicos (t=0h y t=96h) para la prueba de toxicidad de la microalga <i>Isochrysis galbana</i> con porcentaje de dilución de elutriado de sedimento marino en la Bahía Tortugas-Casma de las estaciones de muestreo en agosto del 2016. ....</b>	<b>146</b>
<b>ANEXO 25. Valores de significancia de los parámetros físicoquímicos de las pruebas de toxicidad en dilución de elutriado de sedimento marino de la Bahía Tortugas-Casma empleando <i>Isochrysis galbana</i> (cero y 96 horas), agosto del 2016. ....</b>	<b>146</b>
<b>ANEXO 26. Valores de significancia del crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> en el control negativo a las 24 y 96 horas en la Bahía Tortugas-Casma, agosto del 2016..</b>	<b>146</b>
<b>ANEXO 27. Valores de significancia (p&lt;0,05) de la densidad microalgal media de <i>Isochrysis galbana</i> al finalizar la prueba de toxicidad (96 horas) con porcentaje de dilución de elutriado del sedimento marino en Bahía Tortugas-Casma, agosto del 2016. ....</b>	<b>147</b>
<b>ANEXO 28. Relación entre el crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E20 en Bahía Paracas, abril del 2016. ....</b>	<b>148</b>
<b>ANEXO 29. Relación entre el crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E27 en Bahía Paracas, abril del 2016. ....</b>	<b>149</b>
<b>ANEXO 30. Relación entre el crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E10A en Bahía Paracas, abril del 2016. ....</b>	<b>150</b>
<b>ANEXO 31. Valores de Parámetros físicoquímicos (t=0h y t=96h) para la prueba de toxicidad de la microalga <i>Isochrysis galbana</i> con porcentaje de dilución de elutriado de sedimento marino en la Bahía Paracas, abril del 2016. ....</b>	<b>151</b>
<b>ANEXO 32. Valores de significancia de los parámetros físicoquímicos de las pruebas de toxicidad en dilución de elutriado de sedimento marino de la Bahía Paracas empleando <i>Isochrysis galbana</i> (cero y 96 horas), abril del 2016.....</b>	<b>151</b>
<b>ANEXO 33. Valores de significancia del crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> en el control negativo a las 24 y 96 horas en Bahía Paracas, abril del 2016. ....</b>	<b>151</b>
<b>ANEXO 34. Valores de significancia (p&lt;0,05) de la densidad microalgal media de <i>Isochrysis galbana</i> al finalizar la prueba de toxicidad (96 horas) con porcentaje de dilución de elutriado del sedimento marino en Bahía Paracas, abril del 2016. ....</b>	<b>152</b>
<b>ANEXO 35. Relación entre el crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E10 en la Bahía Paracas, setiembre del 2016.....</b>	<b>153</b>

<b>ANEXO 36. Relación entre el crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E27 en la Bahía Paracas, setiembre del 2016.....</b>	<b>154</b>
<b>ANEXO 37. Relación entre el crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E28 en la Bahía Paracas, setiembre del 2016.....</b>	<b>155</b>
<b>ANEXO 38. Valores de Parámetros físicoquímicos (t=0h y t=96h) para la prueba de toxicidad de la microalga <i>Isochrysis galbana</i> con porcentaje de dilución de elutriado de sedimento marino en la Bahía Paracas, setiembre del 2016. ....</b>	<b>156</b>
<b>ANEXO 39. Valores de significancia de los parámetros físicoquímicos de las pruebas de toxicidad en dilución de elutriado de sedimento marino de la Bahía Paracas empleando <i>Isochrysis galbana</i> (cero y 96 horas), setiembre del 2016. ....</b>	<b>156</b>
<b>ANEXO 40. Valores de significancia del crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> en el control negativo a las 24 y 96 horas en Bahía Paracas, setiembre del 2016. ....</b>	<b>156</b>
<b>ANEXO 41. Valores de significancia (p&lt;0,05) de la densidad microalgal media de <i>Isochrysis galbana</i> al finalizar la prueba de toxicidad (96 horas) con porcentaje de dilución de elutriado del sedimento marino en Bahía Paracas, setiembre del 2016..</b>	<b>157</b>
<b>ANEXO 42. Relación entre el crecimiento de <i>Nannochloropsis oceanica</i> (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E10 en la Bahía Paracas, setiembre del 2016.....</b>	<b>158</b>
<b>ANEXO 43. Valores de Parámetros físicoquímicos (t=0h y t=96h) para la prueba de toxicidad de la microalga <i>Nannochloropsis oceanica</i> con porcentaje de dilución de elutriado de sedimento marino en la estación E10A de la Bahía Paracas, setiembre del 2016. ....</b>	<b>159</b>
<b>ANEXO 44. Valores de significancia de los parámetros físicoquímicos de las pruebas de toxicidad en dilución de elutriado de sedimento marino de la Bahía Paracas empleando <i>Nannochloropsis oceanica</i> (cero y 96 horas), setiembre del 2016. ....</b>	<b>159</b>
<b>ANEXO 45. Valores de significancia del crecimiento de <i>Nannochloropsis oceanica</i> en el control negativo a las 24 y 96 horas en Bahía Paracas, setiembre del 2016. ....</b>	<b>159</b>
<b>ANEXO 46. Valores de significancia (p&lt;0,05) de la densidad microalgal media de <i>Nannochloropsis oceanica</i> al finalizar la prueba de toxicidad (96 horas) con porcentaje de dilución de elutriado del sedimento marino en Bahía Paracas, setiembre del 2016. ....</b>	<b>159</b>
<b>ANEXO 47. Contaminantes en sedimento de la Bahía Tortugas-Casma en marzo y agosto del 2016. ....</b>	<b>160</b>

<b>ANEXO 48. Contaminantes en sedimento de la Bahía Paracas en abril y setiembre del 2016. ....</b>	<b>161</b>
<b>ANEXO 49. Condiciones básicas para pruebas de toxicidad en sedimento marino empleando las microalga <i>Isochrysis galbana</i> y <i>Nannochloropsis oceanica</i> en condiciones controladas .....</b>	<b>162</b>
<b>ANEXO 50. Valores de Parámetros físicoquímicos (t=0h y t=96h) para la prueba de toxicidad de la microalga <i>Isochrysis galbana</i> con sulfato de cobre pentahidratado..</b>	<b>163</b>
<b>ANEXO 51. Valores de Parámetros físicoquímicos (t=0h y t=96h) para la prueba de toxicidad de la microalga <i>Nannochloropsis oceanica</i> con sulfato de cobre pentahidratado.....</b>	<b>163</b>
<b>ANEXO 52. Valores de intensidad lumínica (Lux) de las pruebas de toxicidad en sedimento marino de la Bahía Tortugas-Casma empleando <i>Isochrysis galbana</i>, muestreadas en marzo y agosto del 2016.....</b>	<b>163</b>
<b>ANEXO 53. Valores de intensidad lumínica (Lux) de las pruebas de toxicidad en sedimento marino de la Bahía Paracas empleando <i>Isochrysis galbana</i>, muestreadas en abril y setiembre del 2016. ....</b>	<b>164</b>
<b>ANEXO 54. Valores de intensidad lumínica (Lux) de las pruebas de toxicidad en sedimento marino de la Bahía Paracas empleando <i>Nannochloropsis oceanica</i>, muestreadas en setiembre del 2016.....</b>	<b>164</b>
<b>ANEXO 55. Valores de significancia de la densidad inicial de los controles de las pruebas de toxicidad con <i>Isochrysis galbana</i>.....</b>	<b>164</b>
<b>ANEXO 56. Valores de significancia de la densidad inicial de los controles de las pruebas de toxicidad con <i>Nannochloropsis oceanica</i>.....</b>	<b>164</b>
<b>ANEXO 57. Coeficiente de variación (porcentaje) del control a las 96 horas de las pruebas de toxicidad en sedimento marino a las 96 horas de la Bahía Tortugas-Casma empleando <i>Isochrysis galbana</i>, muestreadas en marzo y agosto del 2016. ....</b>	<b>165</b>
<b>ANEXO 58. ANEXO 58: Coeficiente de variación (porcentaje) del control a las 96 horas de las pruebas de toxicidad en sedimento marino de la Bahía Paracas empleando <i>Isochrysis galbana</i>, muestreadas en abril y setiembre del 2016. ....</b>	<b>165</b>
<b>ANEXO 59. Coeficiente de variación (porcentaje) del control a las 96 horas de las pruebas de toxicidad en sedimento marino a las 96 horas de la Bahía Paracas empleando <i>Nannochloropsis oceanica</i>, muestreadas en setiembre del 2016. ....</b>	<b>165</b>
<b>ANEXO 60. Presupuesto de instalación para pruebas de toxicidad con <i>Isochrysis galbana</i> y <i>Nannochloropsis oceanica</i>.....</b>	<b>166</b>

## ÍNDICE DE MAPA

	<b>Página</b>
<b>MAPA 1. Estaciones de muestreo de seimento marino en Bahía Tortugas-Casma en marzo y agosto del 2016 .....</b>	<b>24</b>
<b>MAPA 2. Estaciones de muestreo de sedimento marino de la Bahía Paracas en abril y setiembre del 2016 .....</b>	<b>26</b>
<b>MAPA 3. Toxicidad del sedimento marino de la Bahía Tortugas-Casma en marzo y agosto del 2016 .....</b>	<b>91</b>
<b>MAPA 4. Toxicidad del sedimento marino de la Bahía Paracas en abril y setiembre del 2016 .....</b>	<b>97</b>



## RESUMEN

Se analizó la toxicidad de muestras de sedimento marino provenientes de las Bahías Tortugas-Casma y Paracas, colectadas en dos periodos durante el año 2016, como una actividad del Proyecto por Presupuesto “Evaluación del estado, presión y respuesta ambiental en la Bahía Tortugas-Casma y Bahía Paracas” del Instituto del Mar del Perú. Para lo cual se empleó bioensayos con las microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica*. Inicialmente se determinó la sensibilidad de ambas cepas ante la sustancia tóxica sulfato de cobre, exponiéndoles a concentraciones de: 4mg/L, 2mg/L, 1mg/L, 0,5mg/L, 0,25mg/L y 0,125mg/L en condiciones controladas por 96 horas. Utilizando los protocolos descritos por la United States Environmental Protection Agency (USEPA, 1998, 2002) se llevaron a cabo pruebas estáticas con cinco concentraciones de sedimento marino (100%, 50%, 25%, 12,5% y 6,25%), en un diseño experimental en bloques completamente al azar (DBCA), más un control negativo y cuatro repeticiones por concentración. La concentración de Inhibición media ( $CI_{50}$ ) obtenida para la sustancia sulfato de cobre fue de 0,88 mg/L empleando *Isochrysis galbana* y 1,44 mg/L empleando *Nannochloropsis oceanica* al cabo de las 96 horas. Las pruebas de toxicidad con diferentes concentraciones de marino, permitieron definir que la microalga *I. galbana* es más sensible que *N. oceanica* al detectar diferentes niveles de toxicidad. En las condiciones de esta investigación, el sedimento de la Bahía Tortugas-Casma y Paracas presentaron niveles de toxicidad siendo en ambas bahías desde moderada toxicidad ( $CI_{50}$ = 59% - 81%) hasta alta toxicidad ( $CI_{50}$  < 59%). Finalmente, se establecieron criterios básicos en condiciones controladas para el uso de *I. galbana* y *N. oceanica* en pruebas de toxicidad con sulfato de cobre y elutriado de sedimento marino.

Palabras claves: *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis oceanica*, concentración de inhibición media, prueba de toxicidad, elutriado de sedimento marino, sulfato de cobre

## ABSTRACT

Toxicity of marine sediment was analyzed from samples of sediment collected by the IMARPE Environmental Project, during two periods in 2016 at Tortugas – Casma and Paracas Bays. Bioassays with *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oceanica* were used. Initially the sensibility of copper sulphate toxic solution was proved in both strains, exposing them to 4mg/L, 2mg/L, 1mg/L, 0,5mg/L, 0,25mg/L y 0,125mg/L in controlled conditions for 96 hours. United States Environmental Protection Agency (USEPA 1998,2002) protocols were used in a static test with five concentrations of marine sediment (100%, 50%, 25%, 12,5% y 6,25%), in a completely randomized experimental block design (DBCA) of five concentrations of elutriated marine sediment, plus a negative control and four replications per concentration. After 96 hours the average inhibition concentration ( $IC_{50}$ ) obtained for the copper sulfate substance was 0.88 mg/L for *I. galbana* and 1.44 mg/L for *N. oceanica*. Marine sediments from Tortugas – Casma and Paracas Bays selected for the present research, showed toxicity when exposed to *I. galbana*, meanwhile *N. oceanica* did not showed toxicity levels. The marine sediment from Tortugas-Casma and Paracas Bays showed toxicity from moderate ( $IC_{50} = 59\% - 81\%$ ) to high toxicity ( $IC_{50} < 59\%$ ), respectively. Finally, basic criteria were established under controlled conditions for the use of *I. galbana* and *N. oceanica* in toxicity tests with copper sulphate and elutriated from marine sediment.

Keywords: *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis oceanica*, average inhibition concentration, toxicity test, elutriated marine sediment, copper sulphate

## I. INTRODUCCIÓN

Las bahías de las costas peruanas generalmente tienen mucha actividad antropogénica que generan problemas ambientales que contribuyen al deterioro progresivo de la calidad del ambiente marino.

Los sedimentos constituyen el más grande y estable depósito de una amplia variedad de elementos orgánicos e inorgánicos en el ambiente marino; además concentran los contaminantes por períodos largos (Saravia, 2007). Así también, Valdés y Castillo (2014) mencionan que durante el transporte y dependiendo de la resistencia de las sustancias contaminantes a los factores ambientales, este sedimento puede sufrir diversos procesos de transformación modificando su estructura y composición original, para finalmente generar depósitos característicos en el fondo del océano. Por tal motivo Adams et al. (1992), Dornfeld et al. (2006) y Portela et al. (2006) consideran a los sedimentos marinos como un importante sumidero para sustancias tóxicas convirtiéndolos en fuentes de contaminación que pueden alterar a las comunidades biológicas naturales circundantes y las cadenas tróficas.

Según, el Instituto del Mar del Perú (IMARPE) (2008), en la Región Ancash, lugar donde se localiza la primera zona de estudio (Bahías Tortugas-Casma), la calidad ambiental acuática se encuentra alterada por los continuos vertimientos de aguas domésticas no tratadas, así como efluentes de la industria minero-metalúrgica ilegal, que generan un medio marino receptor inestable, afectando considerablemente la biota y el sedimento marino.

En Pisco, a partir del año 2004, se contaba con tratamientos para los vertimientos domésticos e industriales, antes de ese año esta zona era fuertemente impactada por los efluentes de la industria pesquera causando un impacto negativo al medio marino de la Bahía Paracas. Con el transcurso del tiempo, Jacinto (2014), señala que en los resultados

de los monitoreos realizados por IMARPE-PISCO se evidencia una mejora del estado de calidad del medio marino de esta zona que de categoría de contaminación grave cambio a contaminación moderada.

Ante este panorama de evidente contaminación marina en las bahías Tortugas-Casma y Paracas, es necesario una evaluación preliminar de la calidad ambiental empleando una herramienta biológica de diagnóstico rápido siendo uno de los indicados y recomendados por la USEPA (1998) las pruebas de toxicidad en sedimento marino debido a que los contaminantes perduran en el tiempo en ésta matriz ambiental. Así mismo, con el uso de este tipo de pruebas se podría ofrecer información útil para identificar una opción de gestión rentable en un marco de toma de decisiones (Alvarez-Guerra et al., 2007).

En estas pruebas de toxicidad comúnmente son usadas especies de la red trófica acuática como peces (Martinez-Jerónimo y Espinosa, 2008; Alcaraz et al., 2008), artrópodos (Idoniboye-Obu, 1997), microalgas (Silva y Jay, 1996; Vera et al., 2001 y Alayo et al., 2004) entre otros. De éstos, las microalgas son excelentes organismos para realizar ensayos de toxicidad, ya que su manejo en cultivo es simple. Además, éstos bioensayos son rápidos y de bajo costo en comparación con ensayos con peces e invertebrados (Wong y Dixon, 1995). La ventaja del uso de microalgas depende del crecimiento, manipulación y grado de sensibilidad (Lewis, 1993 y Gorbi et al., 2001).

En el país los estudios con microalgas marinas han sido básicamente para el uso de pruebas de toxicidad con sustancias tóxicas como Cadmio (Vera et al., 2001), Cromo (Alayo et al., 2004) y Bario (Paredes, 2016); pero para el uso de la evaluación de sedimento marino los estudios son nulos. Por consiguiente, se tiene como objetivo general, analizar la toxicidad del sedimento marino proveniente de las Bahías Tortugas-Casma y Paracas empleando las microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica* durante el año 2016. Cuyos objetivos específicos planteados son:

- Estimar la sensibilidad de las microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica* expuestas al tóxico de referencia, sulfato de cobre penta-hidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ).



- Estimar la concentración de inhibición media a las 96 horas ( $CI_{50-96}$ ) del sedimento marino de las Bahías Tortugas-Casma y Paracas, sobre el crecimiento poblacional de las microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica*.
  
- Comparar la toxicidad del sedimento marino de las Bahías Tortugas - Casma y Paracas.
  
- Establecer condiciones básicas de manejo de *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica* en condiciones controladas de laboratorio para el desarrollo de pruebas de toxicidad con sedimento marino.



## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Sedimentos marinos

Muchas sustancias peligrosas se asocian fácilmente a los sedimentos en aguas de ambiente marino, estuarino y continental. Es así, que los tóxicos que ingresan al medio acuático pueden permanecer suspendidos en la columna de agua, ser incorporados a la biota acuática o depositados sobre el fondo, incorporándose así en los sedimentos (Beg et al., 2001).

Según, Simpson et al. (2005), las fuentes principales por la que los contaminantes se acumulan en los sedimentos marinos se debe a zonas altamente urbanizadas, drenaje urbano y escorrentía de carreteras. También consideran las lluvias que pueden producir la lixiviación de tierras contaminadas, con los contaminantes que llegan las aguas superficiales y las aguas subterráneas, los cuales pueden contribuir a la contaminación de los sedimentos.

Diversos contaminantes son relativamente insolubles en el agua y son adsorbidos por la materia orgánica particulada, asentándose eventualmente en el fondo del sedimento. Así mismo, los contaminantes, son componentes de importancia ecológica que juegan un papel relevante en el intercambio de sustancias químicas entre las fases particuladas, disueltas y biológicas. De esta manera los sedimentos constituyen auténticos archivos históricos que pueden acumular antiguos y recientes pulsos de episodios de contaminación, actuando como uno de los mayores depósitos naturales de contaminantes persistentes incluso mayores que las existentes en el agua (DeValls y Conradi, 2000).

(Valdés y Castillo, 2014) mencionan que los sedimentos se vuelven depósitos finales de las sustancias producidas en las aguas superficiales y de aquellas introducidas al mar por procesos naturales y antrópicos. Entre estas sustancias se encuentran los compuestos orgánicos, nutrientes, combustibles, patógenos y metales pesados. Cuando éstas sustancias

llegan a las aguas costeras, los procesos sedimentarios actúan haciendo que el destino final sea el piso marino y dependiendo de las variaciones físicas y químicas del ambiente de depositación, los sedimentos pueden actuar como sumidero o fuente de una serie de sustancias que modifican las características naturales de la columna de agua y de la cadena trófica marina (Alagarsamy, 2006; Buccolieri et al., 2006).

Así también, Valdés et al. (2004), mencionan que las distribuciones de las diferentes sustancias en los sedimentos de fondo presentan gradientes horizontales (en la superficie de los sedimentos) y verticales (dentro de la capa sedimentaria) que son el resultado de las características químicas de las sustancias presentes en el ambiente marino, de las propiedades físicoquímicas de las aguas en contacto con los sedimentos de fondo y de la presencia de comunidades micro y macrobiológicas. También, existen una serie de procesos como la resuspensión física de partículas y procesos de flujo entre distintas sustancias químicas que se producen en la interfase agua-sedimento que puede convertir al sedimento marino en una fuente secundaria de contaminación del agua (DelValls y Conradi, 2000).

Carballo et al. (2010), mencionan que los procesos de sorción y desorción pueden determinar la biodisponibilidad de sustancias tóxicas en los sedimentos. Lo más resaltante es que la contaminación del sedimento marino puede ser extendida al ecosistema lejos de las fuentes de contaminación a través de la resuspensión y al transporte particulado (Luoma y Carter, 1990).

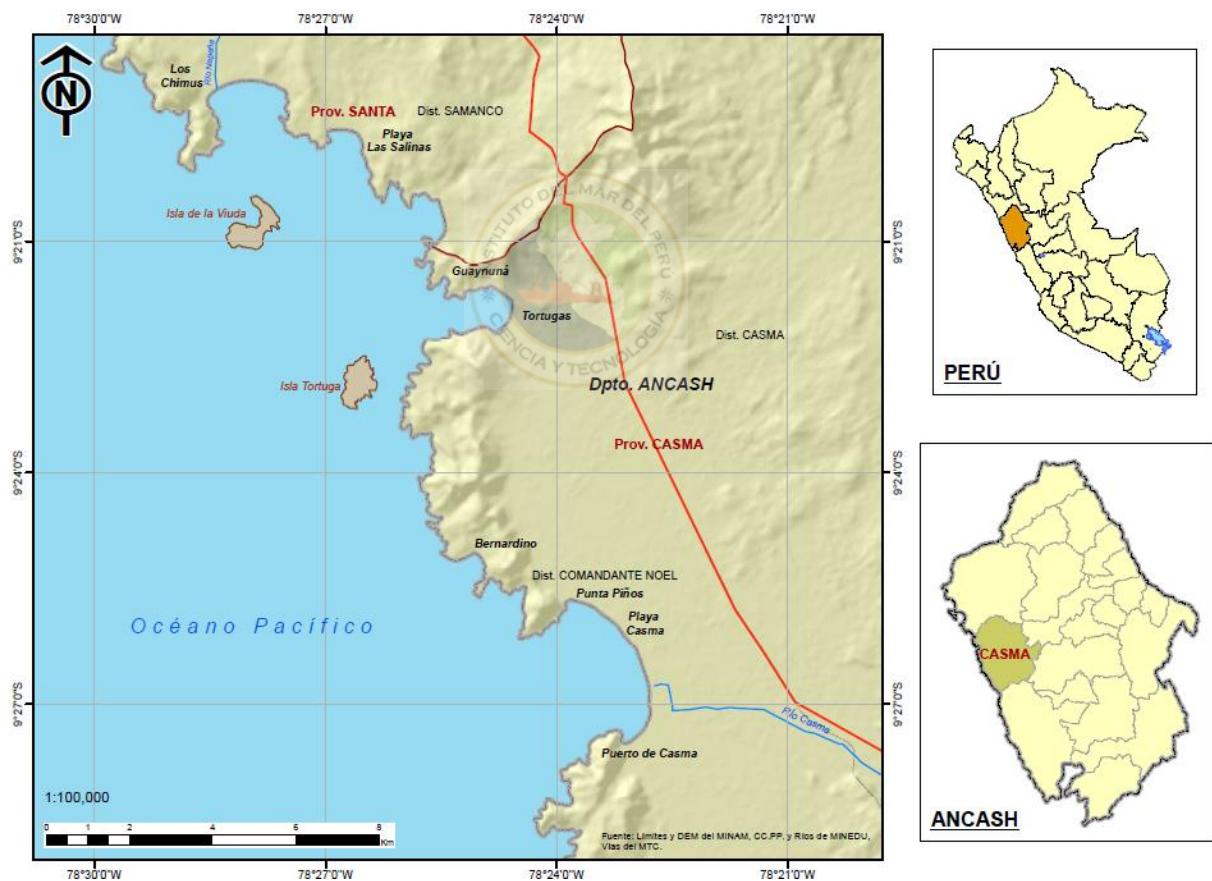
En cuanto a la evaluación de sedimentos marinos contaminados, países como Irlanda tienen estrategias de evaluación y algunas consideraciones en el desarrollo de directrices sobre la calidad numérica de los sedimentos (Cronin et al, 2006). Dentro de las directrices de calidad de sedimentos provisionales de Australia, la misma que son derivadas de los Estados Unidos, se recomienda que la evaluación de calidad de los sedimentos mediante pruebas químicas sea complementada con las pruebas de toxicidad (Simpson et al., 2005). Además, estos autores consideran que en estudios de evaluación de seguimiento de la toxicidad marina, la parte superior de 0-5 centímetros de sedimento es el horizonte de interés debido a que la tasa de sedimentación en los cuerpos de agua típicamente varían de milímetros a 1-2 cm / año.

Cabe recalcar que en el país no se cuentan con directrices, ni protocolos, ni guías u otro documento para la evaluación de calidad de sedimento marino.

## 2.2 Características de las zonas de estudio

### 2.2.1 Bahías Tortugas - Casma

La Bahía de Tortugas - Casma, se encuentra ubicada en el departamento de Ancash, Provincia de Casma entre 9° 28' 01" S - 78° 19' 01" O (Figura 1). Se caracteriza por ser una bahía de pescadores artesanales dedicados a la extracción de *Argopecten purpuratus* “concha de abanico” y a la pesca de oportunidad. La pesca artesanal es la segunda actividad generadora de trabajo después de la agricultura (IMARPE, 2007). Además, en esta zona existen bancos naturales de *Argopecten purpuratus* “concha de abanico” y *Cancer setosus* “cangrejo peludo”. También áreas de *Stramonita chocolata* “caracol negro”, áreas acuícolas y áreas propuestas para maricultura (IMARPE, 2006).



**Figura 1. Ubicación de la Bahía Tortugas-Casma.**

**FUENTE: Elaboración propia.**

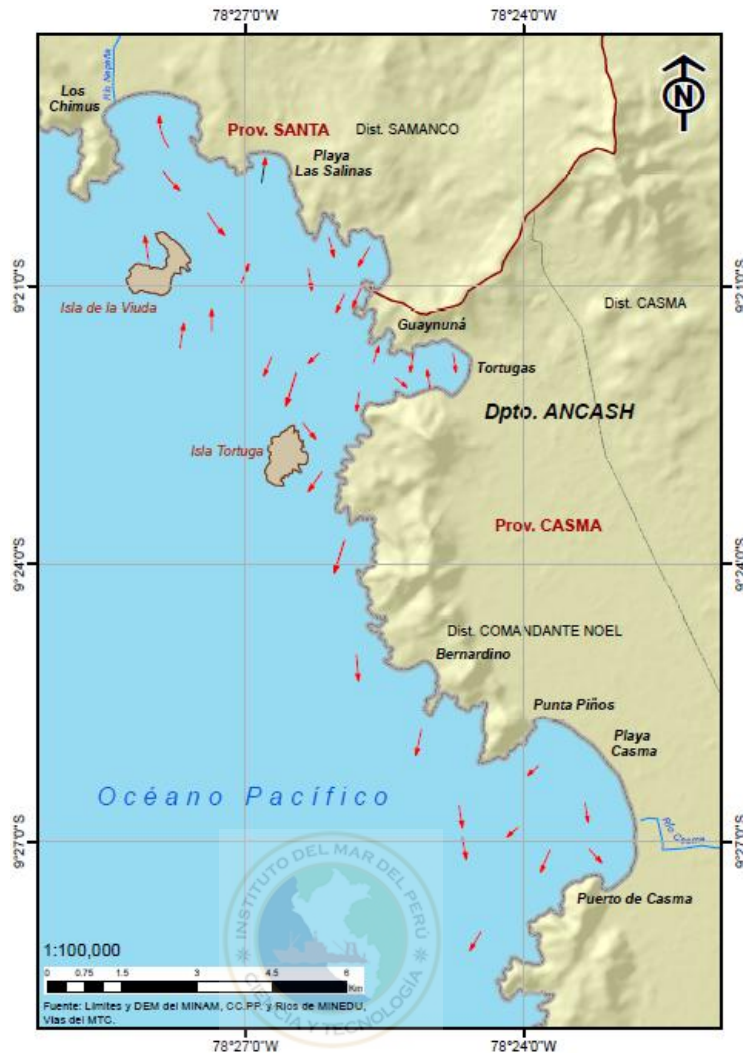
En las costas de esta zona se realizan actividades agrícolas ubicadas en los valles del río Casma y el río Nepeña siendo 4,587 y 4,545 hectáreas de cultivo en las zonas costeras de las desembocaduras de ambos ríos, respectivamente (Paredes, 2018). La cuenca del río

Casma que tiene categoría de ciudad, Villa, caserío y población dispersa, según el INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática) año 2007 tiene una población de 27 77 habitantes con 7 590 viviendas. En la cuenca del río Nepeña, distrito de Samanco, según INEI (2007), muestra que el caserío Huambacho Nueva (La Huaca) tiene una población de 832 habitantes con 204 viviendas y presenta categorías de caserío y población dispersa.

La bahía en estudio presenta una suave pendiente, teniendo como límite en la entrada a la bahía, la isóbata de 20 metros de profundidad. El fondo marino de la bahía se caracteriza por presentar sedimentos compuestos de arena y limo.

Berrú et al. (2005), manifestaron que en esta zona comprendida entre Tortugas y Casma la velocidad superficial de la circulación marina presentan valores entre 1,31 a 30,66 cm/s. Así también, Paredes (2018), menciona que la circulación marina de fondo de esta zona de estudio fluctúa entre 2,27 y 32,06 cm/s, cuyos movimientos característicos son de norte a sur (Figura 2). Además, Vásquez et al (2000) indican que la bahía de Tortugas presenta comportamientos locales propios que por presentar forma de media luna genera un comportamiento ciclónico al interior de la bahía, la cual no permite la rápida depuración de sus masas de agua, influyendo considerablemente en las variables oceanográficas. También, la forma de media luna, las puntas pequeñas islas y rocas protegen la línea de costa de las corrientes marinas y oleaje.

Asimismo, Berrú et al. (2005) mencionan que en el litoral de Casma se identificaron y delimitaron tres bancos naturales de “concha de abanico” (*Argopecten purpuratus*) y ocho bancos naturales de “concha navaja” (*Ensis macha*). También se identificaron bancos naturales de “caracol negro” (*Stramonita chocolata*), “lapa” (*Patella vulgata*) y “cangrejo peludo” (*Pilumnus vespertilio*). De igual forma se identificaron y delimitaron catorce zonas de pesca artesanal para pescadores embarcados y no embarcados. Además, Mendo et al. (2008) mencionan que en la zona de Casma se calcula la más alta producción de concha de abanico de América Latina.



**Figura 2. Circulación marina de fondo en la Bahía Tortugas-Casma.  
FUENTE: Elaboración propia.**

Información más actualizada (Paredes, 2018) menciona que en la comprensión de esta zona se ubican concesiones acuícolas desde la desembocadura del río Nepeña hasta la desembocadura del río Casma, sumando un total 31 concesiones, distribuido en 1 330 hectáreas, donde el 99 por ciento de los permisos para cultivo son para concha de abanico, el uno por ciento para almeja, camarón, lenguado entre otros.

Los niveles de captura registrados en puerto Casma durante el año 2004 fueron de 570 480 kg (Berrú et al., 2005). En el año 2013, se construyó un nuevo Desembarcadero Pesquero Artesanal (DPA) en la zona denominada Los Chimus (FONDEPES, 2013). En promedio el desembarque es de 10 toneladas métricas (TM) con pesca local conformado por *Scomber scombrus* “caballa”, *Sciaena deliciosa* “lorna”, *Isacia conceptionis* “cabinza”, *Mugil cephalus* “lisa”, *Loligo vulgaris* “calamar” y *Octopus vulgaris* “pulpo”, considerando pesca

foránea como son *Dosidicus gigas* “pota” y *Coryphaena hippurus* “perico” el desembarque promedio es de 18 TM (Pedro Arias, comunicación personal, 18 de agosto de 2016).

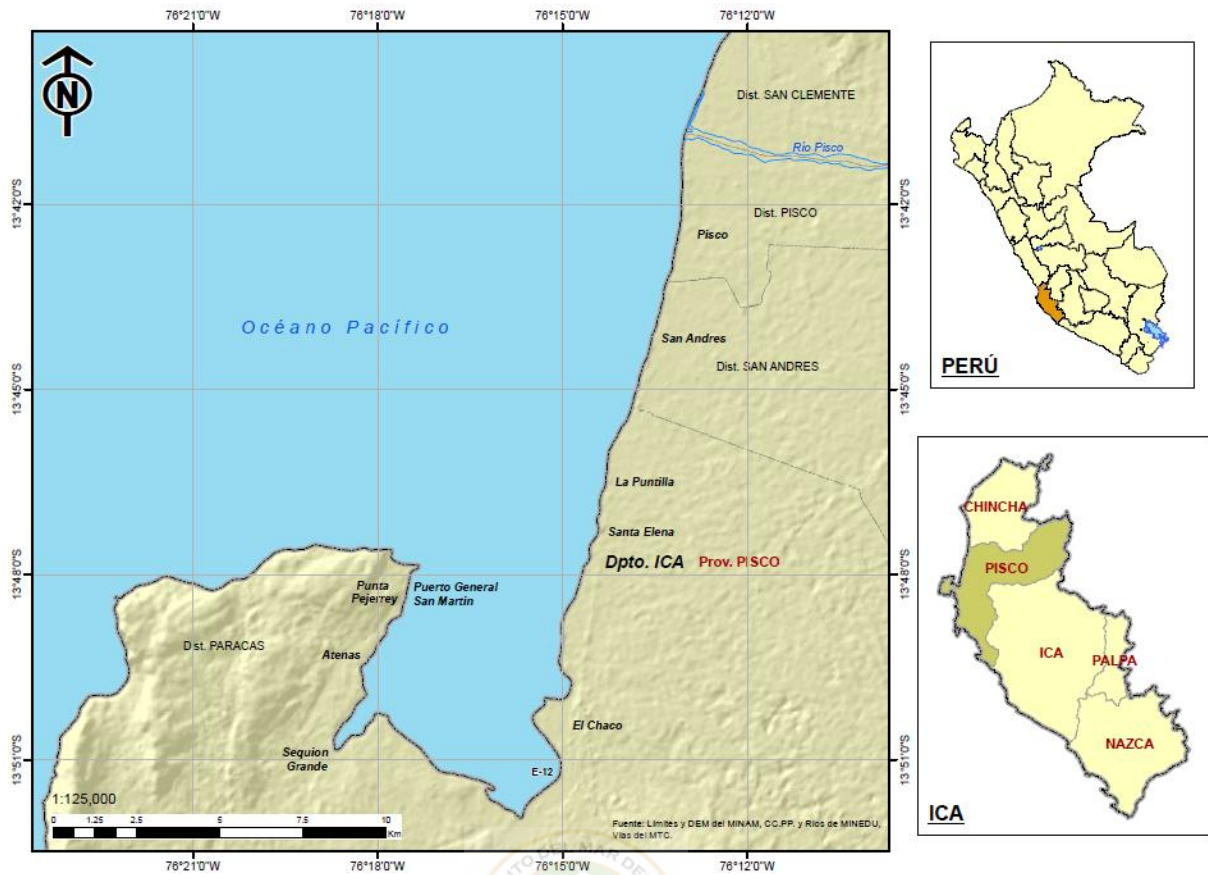
### 2.2.2 Bahía Paracas

Esta bahía se encuentra ubicada entre los 13° 45´S y 76°17´O en la provincia de Pisco, departamento de Ica (Figura 3). En esta zona se desarrollan actividades industriales, urbanas, turísticas, zonas de reserva y de pesca, además de zonas de cultivo de “concha de abanico”. También existe un Área Natural Protegida (ANP) por el Estado (SINAMPE) denominada La Reserva Nacional de Paracas con 337 500 Ha que ocupa el ámbito marino y continental. Además, el borde costero de la bahía se caracteriza, por la presencia de un humedal, el cual está protegido dentro de la Reserva de Paracas, esta área protegida resalta por sus características biológicas particulares, tanto por su flora como por su fauna silvestre (destacando las aves migratorias) (IMARPE, 2006). Ya en la zona litoral de la provincia de Pisco al Norte de la Bahía desemboca el río Pisco, que trae aguas de los vertimientos urbanos, agrícolas y mineros que se dan en la cuenca alta, media y baja.

La bahía es considerada un área de afloramiento (Strickland et al., 1969). Además, es semi cerrada, caracterizada por ser de poca profundidad. En promedio tiene tres metros en los márgenes costeros y diez metros en la zona central. También presenta una escasa circulación marina (Grados et al., 1994).

Según el Catastro Acuícola Nacional del Ministerio de la Producción (Produce, 2018), en la Bahía Paracas se tienen registradas 21 concesiones, todas de cultivo de Concha de Abanico, con un área total de 98,989 hectáreas, en las zonas de Atenas, La Puntilla y Punta Ripio. La actividad acuícola data del año 1986, donde fueron habilitadas y entregadas en concesión para el desarrollo de la maricultura (IMARPE, 2010). En el año 2014 se otorgaron 450,57 hectáreas en concesión en el departamento de Ica para el cultivo de *Argopecten purpuratus*.





**Figura 3. Ubicación de la Bahía Paracas.**

**FUENTE: Elaboración propia.**

En la zona de El Chaco hay un muelle para embarcaciones menores, en el que se realizan faenas de pesca, embarque y desembarque de productos y movimiento de turismo (MINCETUR, 2008). La abundancia de pesca ha hecho de la pesca extractiva una de las actividades principales, para ello existen dos centros de operaciones para el desembarque, acopio y comercialización de los productos marinos, éstos son San Andrés y El Chaco.

También, (IMARPE, 2006) mencionan que existe un importante sector industrial dedicado al procesamiento de harina de pescado es un área de 136,68 hectáreas. Así también se ubica la empresa Petro – Perú y Petro Pisco, ambas dedicadas al almacenamiento de hidrocarburos de petróleo en la zona. El Terminal Portuario General San Martín de Pisco, se encuentra localizado en la Bahía de Paracas, terminal multipropósito (naves de carga sólida a granel, cargas fraccionadas y pasajeros).

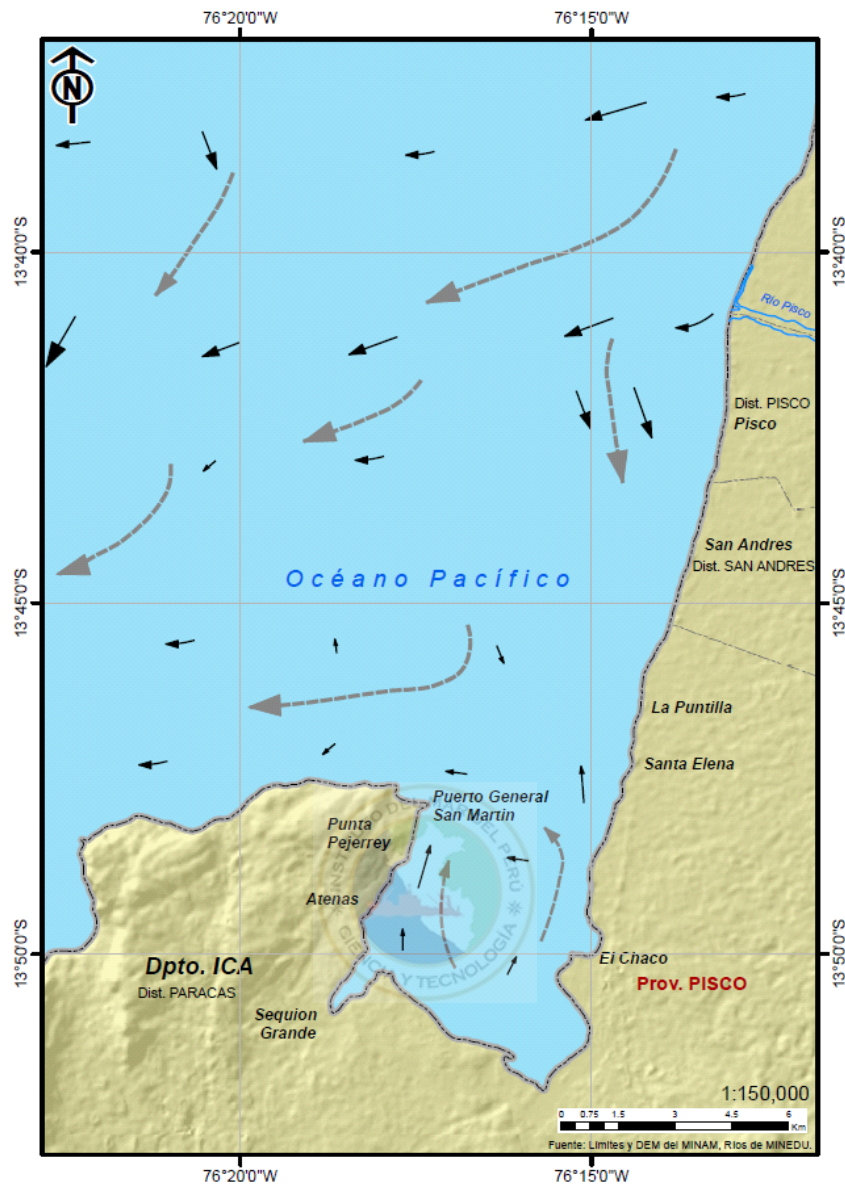
Desde 1980 hasta el 2004, se observaron en esta bahía vientos con velocidades entre 2 cm/s a 16 cm/s, con promedio mensual multianual de 8,4 cm/s (Flores et al., 2004), los cuales son vientos norte y circulación marina con dirección sur (Velazco y Solis, 2000).



Asimismo, en abril y setiembre del 2016, las corrientes marinas a 1 m de profundidad, presentaron velocidades entre 1,8 y 35,0 cm/s, con una velocidad promedio 16,6 cm/s. Las velocidades fueron más intensas al norte de la bahía (en general >20 cm/s) siendo la dirección predominante la Sur Oeste; frente a San Andrés se registraron flujos hacia el sur que se debilitaron a la altura de playa Lobería. La zona sur de la bahía de Paracas presentó velocidades menores (< 10 cm/s) con flujos hacia el norte con desvíos hacia el oeste a la altura de Punta Pejerrey y otro con sentido horario desde Santo Domingo hacia Atenas (Paredes, 2018) (Figura 4).

Estudios realizados por Delgado y Gomero (1995), muestran que las texturas sedimentarias predominantes son de tipo limo arcilloso en la zona de Pisco. Así también, Velazco y Solís (2000), mencionan que el sedimento marino en la bahía se caracteriza por texturas limosas, limo-arcilloso, arcilla y fango, siendo arena y arenas-limosas muy cerca de la costa. También se presentan mezclas de fango y arena en la zona costera (zona sur de la bahía y hacia La Puntilla). Frente a San Andrés se hallan los fondos rocosos y es en esta zona que se presenta la mayor energía hidrodinámica ocasionada por el oleaje.

En el año 2004, la Asociación de Productores de Pisco S.A.C (APROPISCO) instaló un emisor submarino de 13,8 km de extensión a una profundidad de 51 m en donde recaen los efluentes tratados de las siete empresas procesadoras de harina y aceite de pescado de la Bahía de Paracas, disminuyendo de esta manera el impacto negativo dentro de la bahía (IMARPE, 2010).



**Figura 4. Circulación marina superficial en la Bahía Paracas.**  
**FUENTE: Elaboración propia.**

### 2.3 Pruebas de toxicidad en sedimentos marinos

Las pruebas o bioensayos de toxicidad permiten evaluar el grado de toxicidad de una sustancia química, un efluente, cuerpo de agua entre otros, empleando organismos vivos. Estas pruebas pueden ser agudas o crónicas. Dentro de ellas encontramos las pruebas estáticas sin renovación y pruebas estáticas con renovación. La selección del tipo de prueba dependerá de los objetivos, recursos disponibles, requisitos de los organismos de prueba y las características de los efluentes (Zanuzi et al., 2005).

Dependiendo de los objetivos que se tengan en cada ensayo, la USEPA (1994) recomienda la forma en la cual estas pruebas pueden expresarse, ya sea en términos de concentración efectiva (CE), letal (CL) o de inhibición (CI), que causen un efecto en un porcentaje establecido de la población; por ejemplo, el  $CI_{50}$  es la concentración de una sustancia que podría causar la inhibición del 50 por ciento en el crecimiento de la población de prueba.

Ahora bien, es necesario contar con pruebas confiables y reproducibles para de esta manera asegurar la exactitud de los resultados (Díaz et al., 2014). Por tal motivo la USEPA (1994) recomienda compuestos tóxicos de referencia para estandarizar las pruebas de toxicidad, estos son: Cloruro de sodio (NaCl), Cloruro de potasio (KCl), cloruro de cadmio ( $CdCl_2$ ), sulfato de cobre ( $CuSO_4$ ), dodecil sulfato de sodio (SDS) y dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ).

USEPA (1994), considera al sulfato de cobre como un tóxico referencial. Tal es la importancia del cobre como nutriente traza en el metabolismo algal, que permite el transporte electrónico, además, es cofactor del componente de muchas enzimas (Visviki y Rachlin, 1992). Pero también hay evidencias de los efectos ecotoxicológicos del cobre sobre diferentes diatomeas marinas, así mismo Mandelli (1969) demostró la inhibición del crecimiento de *Nitzschia closterium* con sulfato de cobre.

Antes de la década de 1980, la evaluación de la calidad del agua y los sedimentos se limitaba mayormente a caracterizaciones físicas y químicas (Munawar, 2003; USEPA, 2009). A partir del año 1980 el interés respecto a la evaluación de la calidad de los sedimentos marinos, mediante pruebas de toxicidad por parte de las autoridades reguladoras de Norte América ha incrementado (Engler et al., 2005). Esto debido básicamente a que la contaminación de los sedimentos se incrementó, generando costosas y continuas evaluaciones para apoyar la gestión de sedimentos (Ireland y Ho, 2005). Estas evaluaciones consideraban esencialmente la química de los sedimentos, toxicidad de los sedimentos, estructura de la comunidad biológica bentónica, química tisular de la infauna residente y patología de organismos residentes o expuestos a sedimentos (Power y Chapman, 1992).

De igual manera (Liß y Ahlf, 1997) mencionan que la evaluación de contaminación de sedimento puede realizarse mediante pruebas o bioensayos de toxicidad con el agua intersticial, sedimento sólido y elutriado que en líneas prácticas es el extracto acuoso del sedimento. Así mismo, (Gagné et al, 1999) señalan que los bioensayos con elutriado

proporcionan datos útiles sobre el comportamiento del sedimento a partir de procesos naturales de descomposición acumulados que provocan un efecto tóxico una vez que se hacen biodisponibles a través del proceso de extracción.

Entonces, al ser estas evaluaciones costosas, muchas instituciones en el mundo como la USEPA de los Estados Unidos vienen desarrollando hace muchos años nuevas estrategias de monitoreo ambiental para determinar el grado de contaminación en el medio ambiente empleando organismos biológicos (Biesinger et al. 1987, Horning y Wenner, 1987). De igual manera, se han establecido centros de investigación en otras partes del mundo como Canadá, China, India, Japón y distintos países en Europa (Alemania, Irlanda, Reino Unido, Francia, Italia, España, Inglaterra), pero también se han desarrollado iniciativas en países latinoamericanos como en Brasil, Argentina, Chile y Venezuela, quienes cuentan con laboratorios especializados en líneas de ecotoxicología referenciales en anfibios, cladóceros, bivalvos, entre otros (Paredes, 2016).

De igual manera, organizaciones como la Sociedad de Gestión y Salud del Ecosistema Acuático con sus siglas en inglés (AEHMS) fomentan el intercambio de conocimiento científico a nivel mundial, sobre la medición de impactos ambientales a través de pruebas de toxicidad (Munawar, 2003). Así también, en España se cuentan con documentos de gestión, así como de Condiciones de calidad de sedimento marino empleados para apoyar las evaluaciones (Alvarez-Guerra et al., 2007)

Es así, que las pruebas de toxicidad son una herramienta muy útil en laboratorio, que permiten medir la calidad y posibles efectos ambientales en sedimentos, volviéndose parte de programas de monitoreo y evaluación marina es decir del sistema de gestión de la contaminación ambiental, empleándose ciertas especies específicas en ensayos de toxicidad entre las que se tiene *Microdeutopus gryllotalpa* (anfípodo adulto), *Crassostrea angulata* (Larva de bivalvo), *Ruditapes philippinarum* (bivalvo juvenil), *Brachionus plicatilis* (rotífero), *Sparus aurata* (larva de pez) y *Photobacterium phosphoreum* (bacteria) (DelValls y Condari, 2000).

Los factores que deben considerarse para la selección de especies para este tipo de pruebas de toxicidad son la sensibilidad relativa, el contacto con los sedimentos, la disponibilidad de organismos, la importancia ecológica, la distribución geográfica y la tolerancia fisicoquímica de los sedimentos (Bay et al., 2007). Además, (Greeinstein y Bay, 2011) mencionan otros factores como los costos, personal de laboratorio, experiencia,

disponibilidad de colaboradores, la replicación de la prueba por muchos laboratorios diferentes y en diferentes épocas del año.

Entre los ensayos empleados se tienen las pruebas con Microtox, básicamente con la bacteria marina luminiscente *Vibrio fischeri* (Casado et al., 2006a), ensayos con anfípodos desarrollado sobre la fase sólida, ensayos de desarrollo larvario con embriones de erizo de mar sobre el lavado de los sedimentos, ensayos con ostiones y almejas, ensayos con copépodos y ensayos con poliquetos (Carballo et al., 2010).

El ensayo sobre la fase sólida, denominado Microtox Solid Phase Test (SPT) fue desarrollado por AZUR Environmental (Carlsbad, CA, USA) y se ha empleado para evaluar toxicidad aguda (Stronkhorst, 2003; Riba et al., 2004; Campisi et al., 2005). El protocolo SPT mide la emisión de la luz de las bacterias después de su incubación en contacto directo con una mezcla de sedimento y disolvente.

Para pruebas en sedimentos con anfípodos, existen protocolos estandarizados (ASTM 1991, Environment Canada 1992; USEPA, 1994; RIKZ, 1999; Casado et al., 2006b) para distintas especies. En Florida se llevaron a cabo múltiples pruebas subletales conjuntamente con una prueba aguda de anfípodos en sedimentos (Long et al., 1999).

Entre las pruebas embrio-larvarios más utilizados se encuentran los realizados con ostras (*Crassostrea gigas*) y con erizo de mar (*Paracentrotus lividus*, *Sphaerechinus granularis*, y *Echinometra lucunter*), estos ensayos son considerados métodos rápidos y sensibles para la caracterización de la toxicidad de sedimentos marinos (Carballo et al., 2010).

Para el caso de pruebas con moluscos bivalvos, se ha desarrollado un protocolo para la especie *Ruditapes philippinarum* en laboratorios de España, en un estudio interlaboratorio (Casado et al., 2006c) con embriones de bivalvos (ASTM 2002, 1998; Carr y Nipper 2003).

Bioensayos de toxicidad en sedimentos con el uso de microalgas a nivel mundial es mínimo, sólo se tiene referencias del empleo de *Dunaliella tertiolecta*, *Dunaliella salina* e *Isochrysis galbana* (Rudolph et al., 2011). En Alemania y Países Bajos utilizaron la microalga *Phaeodactylum tricornutum* y *Desmodesmus subspicatus* (Manz et al., 2007 y Alvarez-Guerra et al., 2007).

## 2.4 Pruebas de toxicidad con microalgas

Para que los organismos biológicos sean considerados como herramientas ecotoxicológicas según Iannacone y Alvariño (1998) y Alayo y Iannacone (2002) recomiendan que las pruebas de toxicidad deben ser sencillas, prácticas, sensibles y repetibles.

Dentro de las especies que cumplen con los requisitos mencionados anteriormente para estas pruebas de toxicidad se encuentran las microalgas, que al constituir el primer eslabón de la cadena trófica tienen gran impacto debido que a cualquier daño que sufran puede repercutir sobre todo el equilibrio acuático (Mallick y Rai, 1989).

Además, otra ventaja importante es que se pueden emplear un gran número de células en las pruebas de laboratorio (Silva y Jay, 1996). Así también, se consideran costo-efectivos, debido a que son más fáciles de mantener en condiciones experimentales de laboratorio en comparación con animales (Huovinen y Gómez, 2017).

Asimismo, (Pinilla, 1998 y Biggs y Kilroy, 2000), mencionan que son de ciclos de vida cortos y sensibles al entorno convirtiéndolas en herramientas muy útiles como indicadores del cambio en la calidad del agua. Además, (Huovinen y Gómez, 2017) señalan que, debido a su rápido ciclo de división celular, las respuestas de toxicidad aguda pueden ocurrir dentro de pocas horas de exposición, y las respuestas subletales de toxicidad crónica se puede medir también dentro de un periodo bastante corto (días).

El uso de bioensayos con microalgas en estudios de contaminación acuática comenzó con las evaluaciones de eutroficación por nutrientes. Es así que en 1960 se sentaron las bases para el desarrollo de las técnicas de bioensayos de toxicidad con microalgas usando la microalga verde de agua dulce *Raphidocelis subcapitata* (anteriormente *Selenastrum capricornutum*) (Nyholm y Peterson 1997). Además, algunas instituciones internacionales como la Sociedad Americana para la Evaluación de Materiales (ASTM, 1990) y la Asociación Americana de Salud Pública (APHA, 1989) han estandarizado diversos métodos para el estudio de la toxicidad acuática (Janssen, 1998). Así también, Laboratorios como SEPRA (Servicios y Productos Ambientales) de Guatemala han normalizado el método (Algatoxkit F COGUANOR NTG/ ISO 8692 OCDE 201 ASTM E1218-91) para ambiente dulceacuícola empleando *Raphidocelis subcapitata*, cuyo ensayo mide la inhibición de crecimiento en un lapso de 72 horas.

Aparte de *Raphidocelis subcapitata* (Lewis, 1993) menciona que hay varias especies de microalgas de agua dulce que han sido recomendadas para estos ensayos, entre las que se encuentran *Scenedesmus acutus*, *S. subspicatus*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flosaquae* y la diatomea, *Navicula pelliculosa* entre otras. En agua salada, las especies más ampliamente utilizadas son: *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Dunaliella tertiolecta* y *Phaeodactylum tricornutum*.

En el Perú, las pruebas ecotoxicológicas realizadas para evaluar la toxicidad de los metales pesados sobre el crecimiento algal han sido realizados por Iannacone et al. (1999) evaluando la productividad primaria de la microalga de agua dulce *Chlorella vulgaris* ante mercurio, cobre, cadmio, arsénico y plomo. Asimismo, Vera et al. (2001) evaluaron el efecto del cadmio sobre el crecimiento poblacional de la diatomea *Chaetoceros gracilis*, siendo esta sensible a esta sustancia tóxica. De igual manera Alayo et al. (2004), mediante pruebas ecotoxicológicas con cromo, probaron la sensibilidad de las microalgas *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis* estimando la Concentración de Inhibición media (CI<sub>50</sub>) para cada especie, siendo esta 11,94 mg/L y 12,17 mg/L, respectivamente, ambas a las 96 horas de prueba, concluyendo así que ambas especies de microalgas son adecuadas para ser empleadas en pruebas ecotoxicológicas.

También se presentan en la Tabla 1 los diferentes efectos de las microalgas que han sido expuestas en soluciones de cobre, siendo en este estudio el sulfato de cobre pentahidratado  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  la solución empleada para el control positivo de las pruebas de toxicidad.



**Tabla 1. Efecto de la exposición de microalgas a cobre.**

Especie	Efecto	Cu (mg/mL)	Referencia bibliográfica
<i>Tetraselmis chuii</i>	CL <sub>50</sub>	6,44	Cordero et al. (2005)
<i>Chaetoceros sp.</i>	CE <sub>50</sub>	0,088	Debelius et al. (2009)
<i>Rhodomonas salina</i>	CE <sub>50</sub>	0,048	Debelius et al. (2009)
<i>Tetraselmis chuii</i>	CE <sub>50</sub>	0,33	Debelius et al. (2009)
<i>Aphanizomenon gracile</i>	CE <sub>50</sub>	64	Lüderitz y Nicklish (1989)
<i>Chaetoceros sp.</i>	CE <sub>50</sub>	0,007-0,016	Franklin et al. (2001, 2002)
<i>D. tertiolecta</i>	CE <sub>50</sub>	0,53	Levy et al. (2008)
<i>D. tertiolecta</i>	CE <sub>50</sub>	1	Franklin et al. (2001)
<i>Gonyaulax tamariensis</i>	CE <sub>50</sub>	1	Anderson y Morel (1978)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	CE <sub>50</sub>	100	Cid et al. (1995)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	CE <sub>50</sub>	0,008	Levy et al. (2008)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	CE <sub>50</sub>	0,02	Franklin et al. (2001)
<i>Rhodomonas salina</i>	CE <sub>50</sub>	0,03	Moreno-Garrido et al. (1999)
<i>Selenastrum capricornutum</i>	CE <sub>50</sub>	0,007–0,0017	Franklin et al. (2001, 2002)
<i>Tetraselmis sp.</i>	CE <sub>50</sub>	0,047	Levy et al. (2008)

**FUENTE:** Elaboración propia.

#### 2.4.1 Pruebas de toxicidad con *Isochrysis galbana*

La clasificación taxonómica de *Isochrysis galbana* (Parke, 1949) es la siguiente:

Reino: Chromalveolata

Phylum: Haptophyta

Clase: Prymnesiophyceae

Orden: Isochrysidales

Familia: Isochrysidaceae

Género: *Isochrysis*

Especie: *Isochrysis galbana*

Parke (1949), indica que *Isochrysis* tiene célula solitaria, elipsoide, la parte anterior trunca y la parte posterior redonda, tiene dos flagelos, cuya longitud: 5 – 6 µm, ancho: 2-4 µm y diámetro: 5-6 µm.



Esta microalga es utilizada como fuente de enriquecimiento del rotífero *Brachionus plicatilis* y *Artemia* sp. que a su vez es empleado como alimento de larvas de *Paralichthys adspersus*, mejorando así el rendimiento de supervivencia, crecimiento, desarrollo y calidad del cultivo de larvas de esta especie (Silva, 1999).

Trenfield et al. (2015), señalan que dentro de sus investigaciones han realizado pruebas de toxicidad con Aluminio (Al), Galio (Ga) y Molibdeno (Mo), metales clave de descarga de refinera de aluminio, empleando a la microalga *Isochrysis galbana* como organismo de prueba y cobre como sustancia tóxica de referencia. Estas pruebas demostraron que esta microalga era sensible a las 72 horas de expuestas al cobre, reduciendo la tasa de crecimiento de la microalga en el 50 por ciento, demostrando así su utilidad como especie de ensayo de toxicidad, mientras que con Al, Ga y Mo, la toxicidad fue baja.

Rudolph et al. (2010 y 2011) emplearon *Isochrysis galbana* en pruebas de toxicidad para determinar la calidad de los sedimentos en los Fiordos del Sur de Chile, cuyos resultados indicaron acumulación de sedimentos ricos en nutrientes dentro de la zona de estudio.

Asimismo, en la Tabla 2 se presentan los diferentes efectos de la exposición de *Isochrysis galbana* a diferentes soluciones químicas.

**Tabla 2. Efecto de la exposición de *Isochrysis galbana* a diferentes soluciones químicas.**

Especie	Efecto	mg/L									Referencia bibliográfica
		As	Ba	Pb	Cd	Cr	Cu	Mn	Sb	Zn	
<i>I. galbana</i>	CE <sub>50-72</sub>						1,58				Edding y Tala (1996)
<i>I. galbana</i>	CI <sub>50-96</sub>				0,06 - 5,7	33,9 - 319,3	0,04 - 0,37	7,2 - 21.4			Ismail et al (2002)
<i>I. galbana</i>	CI <sub>50-120</sub>					19,2					Alayo et al (2004)
<i>I. galbana</i>	CI <sub>50-96</sub>					11,9					Alayo et al (2004)
<i>I. galbana</i>	CI <sub>50-72</sub>					4,5					Alayo et al (2004)
<i>I. galbana</i>	CE <sub>50-120</sub>			1,40	0,74		0,91			0,60	Yap et al (2004)
<i>I. galbana</i>	CI <sub>50-96</sub>	1,6		2,5	2,9				7,9		Satoh et al (2005)
<i>I. galbana</i>	CE <sub>50-72</sub>						0,058				Debelius et al (2009)
<i>I. galbana</i>	CI <sub>50-96</sub>					40					Rudolph et al (2010)
<i>I. galbana</i>	CE <sub>50-96</sub>			2,4	4,25						Liu et al (2011)
<i>I. galbana</i>	CI <sub>50-96</sub>					40					Rudolph et al (2011)
<i>I. galbana</i>	CI <sub>50-96</sub>						58,15				Pinta (2014)
<i>I. galbana</i>	CI <sub>50-96</sub>					55					Rudolph et al. (2014)
<i>I. galbana</i>	CI <sub>50-97</sub>		0,107								Paredes (2016)

**FUENTE: Elaboración propia.**

#### 2.4.2 Pruebas de toxicidad con *Nannochloropsis oceanica*

La clasificación taxonómica de *Nannochloropsis oceanica* (Suda et al., 2002) es la siguiente:

Reino: Chromista

Phylum: Ochrophyta

Clase: Eustigmatophyceae

Orden: Eustigmatales

Familia: Monodopsidaceae

Género: *Nannochloropsis*

Especie: *Nannochloropsis oceanica*

Suda et al. (2002), mencionan que *Nannochloropsis oceanica*, es de célula solitaria, piriforme, globosa u ovoide, cuyas dimensiones celulares son: 2-4 x 3-5  $\mu\text{m}$ ., ampliamente distribuida en ambientes marinos. Esta especie fue referida anteriormente como *Nannochloropsis* sp. 1, por Andersen et al. (1998), mediante análisis moleculares y filogenéticos de cloroplastos y genes nucleares, RCBL y 18S rDNA, respectivamente, se caracterizó la especie de *Nannochloropsis*.

Bongiovani et al. (2014) mencionan que el género *Nannochloropsis*, comprende 6 especies: *N. oculata* (Droop, 1955) Hibberd (Hibberd, 1981), *N. Salina* Hibberd (Hibberd, 1981), *N. gaditana* Lubián (Lubian, 1982), *N. granulata* Karlson y Potter (Karlson et al., 1996), *N. limnetica* (Krienitz et al., 2000) y *N. oceanica* (Suda et al., 2002). También mencionan que algunas especies de *Nannochloropsis*, tales como *Nannochloropsis* sp. (Sukenik et al., 1989), *N. oculata* (Renaud et al., 1991) y *N. gaditana* (Ferreira et al., 2009) se utilizan en la acuicultura marina como una importante fuente de ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido araquidónico (ARA), docosaheptaenoico (DHA) que son de gran importancia en la nutrición de animales marinos, especialmente en el crecimiento y desarrollo de larvas de peces, moluscos y crustáceos (Otero et al., 1997; Brown et al., 1999). Por otra parte, diferentes especies de *Nannochloropsis* han sido recientemente considerados como materia prima para la producción de biodiesel debido a su capacidad para acumular grandes cantidades de lípidos (Ynga, 2011).

Ahora bien, Biondi (2013), menciona que *Nannochloropsis aceanica* tiene una alta tasa de crecimiento, alto contenido de lípidos y fuerte resistencia a la contaminación biótica. Es así, que hay ciertas investigaciones realizadas con esta especie entre las que se encuentran principalmente: reciclaje de medios de cultivo de *Nannochloropsis oceanica* y caracterización de inhibidores (Zhang et al, 2016); influencia combinada de la luz y la temperatura en las tasas de crecimiento de *Nannochloropsis oceanica*: vinculando respuestas celulares a la producción de biomasa a gran escala (Sandnes et al, 2005) y cultivo de biomasa de *Nannochloropsis oceanica* rica en ácido eicosapentaenoico utilizando aguas residuales como recurso de nutrientes (Mitra, 2016).

Hampel et al. (2001), realizaron ensayos de toxicidad con *Nannochloropsis gaditana*, empleando sulfonato de alquibenceno lineal (LAS) que es un producto químico orgánico sintético utilizado en detergentes, productos de limpieza, así como en la industria textiles, alimentos y minería. Además, demostraron que la biocumulación de cobre y plomo es mayor cuando se expone a esta especie a una mezcla de LAS y metales que cuando se expone sólo a los metales.

Para el caso de *Nannochloropsis oculata*, se realizaron bioensayos utilizando líquidos estabilizados del sistema de lagunas de tratamiento de aguas residuales domésticas de la ciudad de Trelew, Chubut, Argentina, en el que se observó que el líquido estabilizado fue apto para el crecimiento de la especie y a partir de la dilución del 71 por ciento la tasa de crecimiento superó al control negativo. De esta manera, Cravero et al. (2008) encontraron una alternativa viable para utilizar un efluente inadecuado para obtener biomasa algal a bajo costo para la obtención de lípidos.

A nivel mundial no hay estudios de pruebas de toxicidad con *Nannochloropsis oceanica* como tal, sino con otras especies del mismo género (Tabla 3), además de *Nannochloropsis gaditana* y *Nannochloropsis oculata*.

**Tabla 3. Efecto de la exposición de especies de *Nannochloropsis* con cobre.**

Espece	Efecto	Cu (mg/mL)	Referencia bibliográfica
<i>Nannochloropsis atomus</i>	CI <sub>50-72</sub>	4,62	Moreno-Garrido et al. (2000)
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	CI <sub>50-72</sub>	0,137	Debelius et al. (2009)

**FUENTE: Elaboración propia**

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Centro de ejecución experimental**

El presente trabajo de investigación se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Ecotoxicología Acuática del Área Funcional de Investigaciones Marino Costeras (AFIMC), de la Dirección General de Investigaciones en Acuicultura (DGIA), del Instituto del Mar del Perú (IMARPE), ubicado en Esquina Gamarra y General Valle s/n en Chucuito, Provincia Constitucional del Callao.

Es importante mencionar que este estudio está dentro del marco de los Proyectos por Resultado “Evaluación del estado, presión y respuesta ambiental en las Bahías Tortugas - Casma” y “Evaluación del estado, presión y respuesta ambiental en la Bahía Paracas”.

#### **3.2 Áreas de estudio**

Para la colecta de muestras de sedimento marino se determinaron dos áreas de estudio, la primera zona se ubicó entre las Bahías Tortugas y Casma cuyos muestreos se efectuaron en los meses de marzo y agosto estableciéndose en total 14 puntos de muestreo (Tabla 4, Mapa 1). La segunda zona se estableció en la Bahía Paracas en los meses de abril y setiembre donde se ubicaron en total 11 puntos de muestreo (Tabla 5, Mapa 2). El monitoreo de ambas zonas y épocas de estudio se realizó en el año 2016.

Las estaciones para este estudio fueron en su mayoría puntos costeros, con el fin de analizar el entorno ambiental donde se desarrollan actividades de acuicultura, además se consideraron estaciones cercanas a desembocaduras de ríos y otras zonas de actividades económicas (desembarcaderos, asentamientos humanos, agricultura, industrias pesqueras y minería no metálica).

Adicionalmente, se emplearon los siguientes métodos para la evaluación de los distintos parámetros de estudio establecidas en la presente investigación, realizadas por los

laboratorios de contaminación acuática y microbiología del IMARPE. Manuales y Guías N° 11/COI. UNESCO.1982: Determinación de los Hidrocarburos del Petróleo en los Sedimentos.

- La metodología analítica para la determinación de trazas de metales se basó en el método modificado de Eggman y Betzer (1976) y Johnson y Maxwell (1981), para el tratamiento químico para análisis de trazas de metales por espectrofotometría de absorción atómica
- Standard Methods for Examination of Water and Waste Water (APHA, 2005) 212T Edition: Cuantificación de bacterias del grupo coliformes siguiendo la metodología de tubos múltiples (Número Más Probable - NMP).

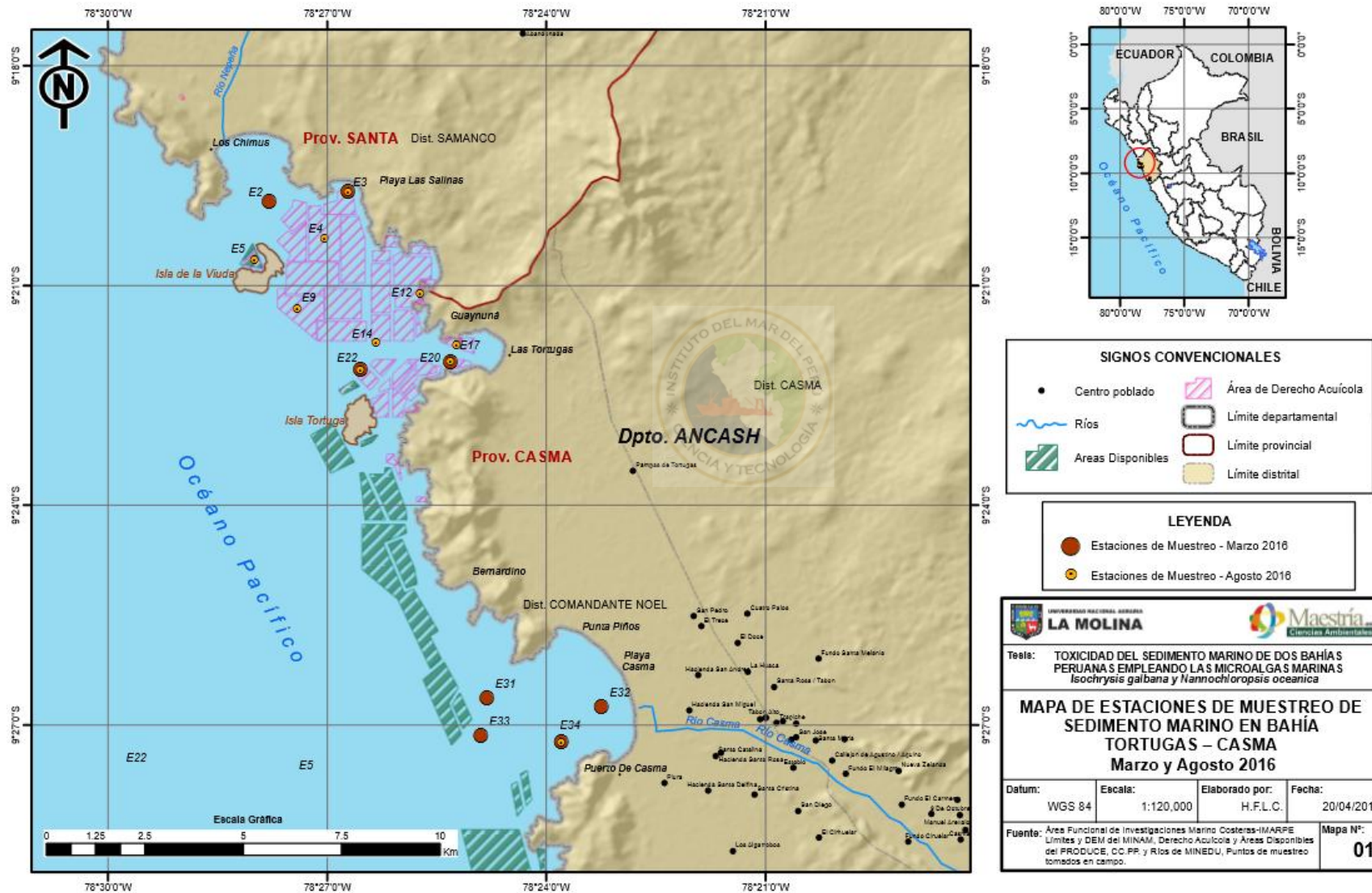
**Tabla 4. Estaciones de muestreo de sedimento marino de la Bahía Tortugas - Casma, marzo y agosto del 2016.**

Estación de muestreo	Marzo	Agosto	Latitud	Longitud	Características de la zona
E2	X		9° 19' 51.5" S	78° 27' 48.0" O	A 2Km de la desembocadura del Río Nepeña, margen del río es área de uso agrícola, a 3Km de una planta pesquera
E3	X	X	9° 19' 43.1" S	78° 26' 43.0" O	Concesión acuícola de <i>Argopecten purpuratus</i> y concesión minera no metálica
E4		X	9° 20' 21.6" S	78° 27' 2.50" O	Concesión acuícola de <i>Argopecten purpuratus</i> , a 2Km de concesión minera no metálica
E5		X	9° 20' 39.0" S	78° 28' 0.10" O	Concesión acuícola de <i>Argopecten purpuratus</i> , a 4Km de la desembocadura del Río Nepeña
E9		X	9° 21' 19.0" S	78° 27' 25.0" O	Concesión acuícola de <i>Argopecten purpuratus</i>
E12		X	9° 21' 6.44" S	78° 25' 44.0" O	Concesión acuícola de <i>Argopecten purpuratus</i>
E14		X	9° 21' 47.1" S	78° 26' 20.0" O	Concesión acuícola de <i>Argopecten purpuratus</i>
E17		X	9° 21' 49.1" S	78° 25' 14.0" O	Concesión acuícola de <i>Argopecten purpuratus</i> , a 1Km de casco urbano
E20	X	X	9° 22' 2.39" S	78° 25' 19.0" O	Concesión acuícola de <i>Argopecten purpuratus</i> , a 1Km de casco urbano
E22	X	X	9° 22' 9.01" S	78° 26' 33.0" O	Concesión acuícola de <i>Argopecten purpuratus</i> , a 1.5Km de concesión minera no metálica
E31	X		9° 26' 38.7" S	78° 24' 49.0" O	A 2,5 Km de concesión minera no metálica y 4Km de la desembocadura de río Casma
E32	X		9° 26' 45.6" S	78° 23' 15.0" O	A 1Km de la desembocadura del río Casma, al margen del río hay centros poblados y áreas de uso agrícola, A 5Km de una planta pesquera
E33	X		9° 27' 8.90" S	78° 24' 54.0" O	A 3,5Km de concesión minera no metálica y 4Km de la desembocadura de río Casma
E34	X	X	9° 27' 14.0" S	78° 23' 48.0" O	A 2Km de la desembocadura del río Casma, al margen del río hay centros poblados y áreas de uso agrícola

**FUENTE: Modificado de Área Funcional de Investigaciones Marino Costeras-IMARPE.**



MAPA 1. Estaciones de muestreo de seimento marino en Bahía Tortugas-Casma en marzo y agosto del 2016



**SIGNOS CONVENCIONALES**

- Centro poblado
- ▨ Área de Derecho Acuicola
- ~ Ríos
- ▨ Areas Disponibles
- ▭ Límite departamental
- ▭ Límite provincial
- ▭ Límite distrital

**LEYENDA**

- Estaciones de Muestreo - Marzo 2016
- Estaciones de Muestreo - Agosto 2016

UNIVERSIDAD NACIONAL AGROPECUARIA  
**LA MOLINA**

Maestría  
Ciencias Ambientales

**Tema:** TOXICIDAD DEL SEDIMENTO MARINO DE DOS BAHÍAS PERUANAS EMPLEANDO LAS MICROALGAS MARINAS *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica*

**MAPA DE ESTACIONES DE MUESTREO DE SEDIMENTO MARINO EN BAHÍA TORTUGAS – CASMA**  
Marzo y Agosto 2016

Datum: WGS 84	Escala: 1:120.000	Elaborado por: H.F.L.C.	Fecha: 20/04/2019
---------------	-------------------	-------------------------	-------------------

Fuente: Área Funcional de Investigaciones Marino Costeras-IMARPE Límites y DEM del MINAM, Derecho Acuicola y Areas Disponibles del PRODUCE, CC.PP. y Ríos de MINEDU, Puntos de muestreo tomados en campo.

Mapa N°: **01**

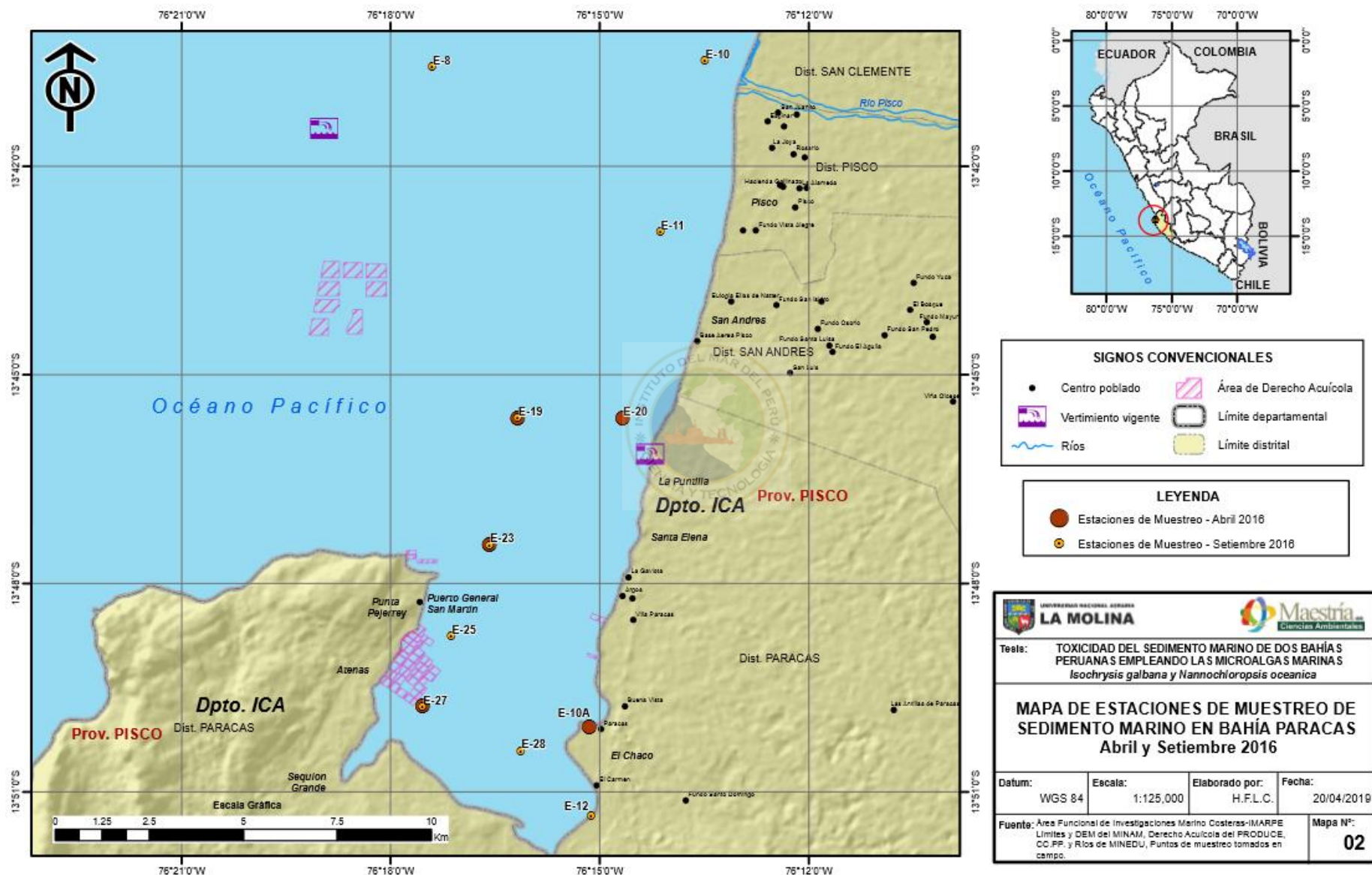
**Tabla 5. Estaciones de muestreo de sedimento marino de la Bahía Paracas, abril y setiembre del 2016.**

Estaciones de muestreo	Abril	Setiembre	Latitud	Longitud	Características de la zona
E8		X	13° 40' 34.304" S	76° 17' 24.645" O	A 8Km de la desembocadura del Río Pisco, al margen del río área poblada y de uso agrícola
E10		X	13° 40' 28.841" S	76° 13' 29.725" O	A 1Km de la desembocadura del Río Pisco, al margen del río área poblada y de uso agrícola
E11		X	13° 42' 56.349" S	76° 14' 07.968" O	A 1.5Km de plantas pesqueras, alrededor área poblada y de uso agrícola
E12		X	13° 42' 53.617" S	76° 15' 35.380" O	Línea costera dentro de la Bahía Paracas
E19	X	X	13° 45' 37.515" S	76° 16' 10.891" O	A 3Km del vertedero vigente de Pluspetrol y de concesión minera no metálica
E20	X		13° 45' 37.515" S	76° 14' 40.748" O	A 1Km del vertedero vigente Pluspetrol y de concesión minera no metálica
E23	X	X	13° 47' 26.780" S	76° 16' 35.476" O	A 3Km de Puerto San Martín
E25		X	13° 48' 45.997" S	76° 17' 08.255" O	A 1Km del Puerto San Martín
E27	X	X	13° 49' 46.093" S	76° 17' 32.840" O	Playa Atenas, al costado de área de concesión acuícola de <i>Argopecten purpuratus</i>
E28		X	13° 50' 24.335" S	76° 16' 08.160" O	A 4Km de concesión minera no metálica
E10A	X		13° 50' 04.400" S	76° 15' 09.300" O	Playa El Chaco, A 2Km de concesión minera no metálica

**FUENTE:** Modificado de Área Funcional de Investigaciones Marino Costeras-IMARPE.



MAPA 2. Estaciones de muestreo de sedimento marino de la Bahía Paracas en abril y setiembre del 2016



### **3.3 Obtención de muestras**

#### **3.3.1 Muestras de sedimento marino**

Se colectaron muestras de sedimentos utilizando una draga Van Venn de 0,05 m<sup>2</sup> en las estaciones de muestreo de las Bahías Tortugas - Casma y Paracas, durante los meses especificados anteriormente (Tabla 1 y 2). Los sedimentos marinos fueron recolectados a una profundidad entre 4 m a 30 m. Luego, las muestras debidamente etiquetadas, fueron transportadas, conservándolas, en cadena de frío a temperaturas alrededor de los 4°C al Laboratorio de Ecotoxicología Acuática del IMARPE-Callao, en donde se mantuvieron en una congeladora hasta el momento de realizar el ensayo de toxicidad con microalgas.

#### **3.3.2 Cultivo de microalgas marinas**

El cultivo de las microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica* se desarrolló en el Laboratorio de Microalgas del Área de Cultivos Marinos del IMARPE-Callao, en matraces de 1L a condiciones controladas para cada especie. La fase exponencial de los cultivos de microalgas se logró después de 3 a 6 días en medio Guillard f/2 modificado (Tabla 6).

La aclimatación de las microalgas se realizó por un lapso de 2-4 horas en el Laboratorio de Ecotoxicología Acuática dentro de la Cámara de iluminación LED, de 1,5m<sup>2</sup> de área, luego de ese tiempo se procedió a realizar las pruebas de toxicidad.

Además, se consideraron las siguientes características del cultivo:

- Alta densidad
- Crecimiento en fase exponencial
- No presentar espuma
- No presentar precipitado
- No estar contaminado por otras especies
- Células intactas, de tamaño homogéneo que no deben estar agrupadas

**Tabla 6. Formulación usada en el Laboratorio de Microalgas para la preparación del medio Guillar F/2 modificado**

<b>R1: MACRONUTRIENTES</b>	
	g/L
KNO <sub>3</sub>	75
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,65
<b>R2: MICRONUTRIENTES</b>	
	g/L
EDTA Na <sub>2</sub>	4,36
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	4,15
CUSO <sub>4</sub>	0,01
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,022
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,010
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,18
NaMoO <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,06
<b>R3: VITAMINAS</b>	
	g/L
Cianocobalamina	0,002
Tiamina HCl	0,1
Biotina	0,01
<b>R4: SILICATOS</b>	
	g/L
HCl	5 mL
Na <sub>2</sub> SIO <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	10

**FUENTE: Laboratorio de Microalgas-IMARPE**

Consideraciones de preparación:

- Preparar R1, R2 y R4 con agua destilada y autoclavar
- Para R3 autoclavar previamente con agua destilada y dejar enfriar, luego añadir vitamina según receta
- Mantener en refrigeración cada reactivo

### 3.3.3 Elutriado de sedimento marino

Las muestras para los ensayos de toxicidad con elutriado se conservaron almacenadas en refrigeración a 4 °C antes de su evaluación. Luego, se procedió a homogenizar el sedimento marino problema y luego se tomó 100g con una paleta.

Este procedimiento se realizó siguiendo la metodología descrita por la USEPA (1998, 2002). Posteriormente se mezcló el sedimento con agua de mar en una proporción de 1:4. Después de una hora de agitación de la solución, se dejó reposar entre 2-24 horas a 4 °C (Geffard et al., 2004). Luego se retiró cuidadosamente el sobrenadante sin perturbar el material sedimentado y se obtuvo el elutriado que se centrifugó a 2500 RPM por 3 minutos para que el sedimento restante se separe del agua.

Finalmente se filtró el elutriado con membranas de fibra de vidrio de una micra, con el objetivo de separar totalmente la fase líquida de los residuos de sedimentos y así, utilizarlo para preparar las diferentes concentraciones de elutriado de sedimento marino ya sea para realizar pruebas preliminares o pruebas definitivas (Figura 5).



### 3.4 Pruebas de toxicidad

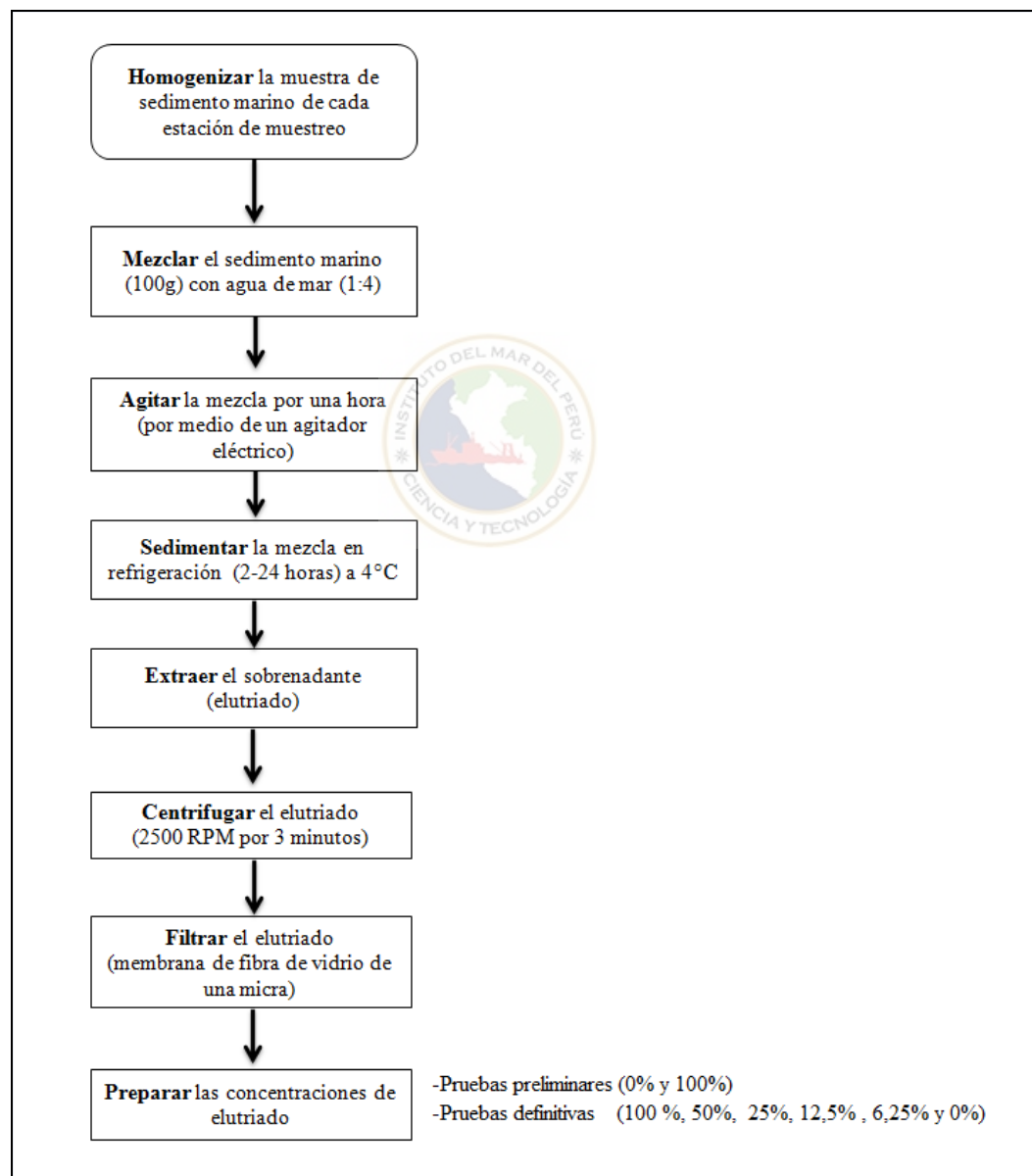
Antes de las pruebas de toxicidad se realizaron:

- Curvas de crecimiento de *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica* en Laboratorio de Ecotoxicología (Anexo 1)
- Pruebas de toxicidad de *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica* con sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) (Anexo 2)
- Pruebas con diferentes volúmenes (5, 10, 100 mL) de *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica* en cada sistema (matraz de 250 mL) para determinar con que volumen de microalgas se realizarán las pruebas de toxicidad (Anexo 3)

Estas pruebas se realizaron con la finalidad de definir las concentraciones a emplear en las pruebas de toxicidad con sulfato de cobre y elutriado de sedimento marino. Así como para determinar el volumen (mL) de microalgas a emplear en cada unidad de ensayo (matraz de 125 mL y 250 mL).

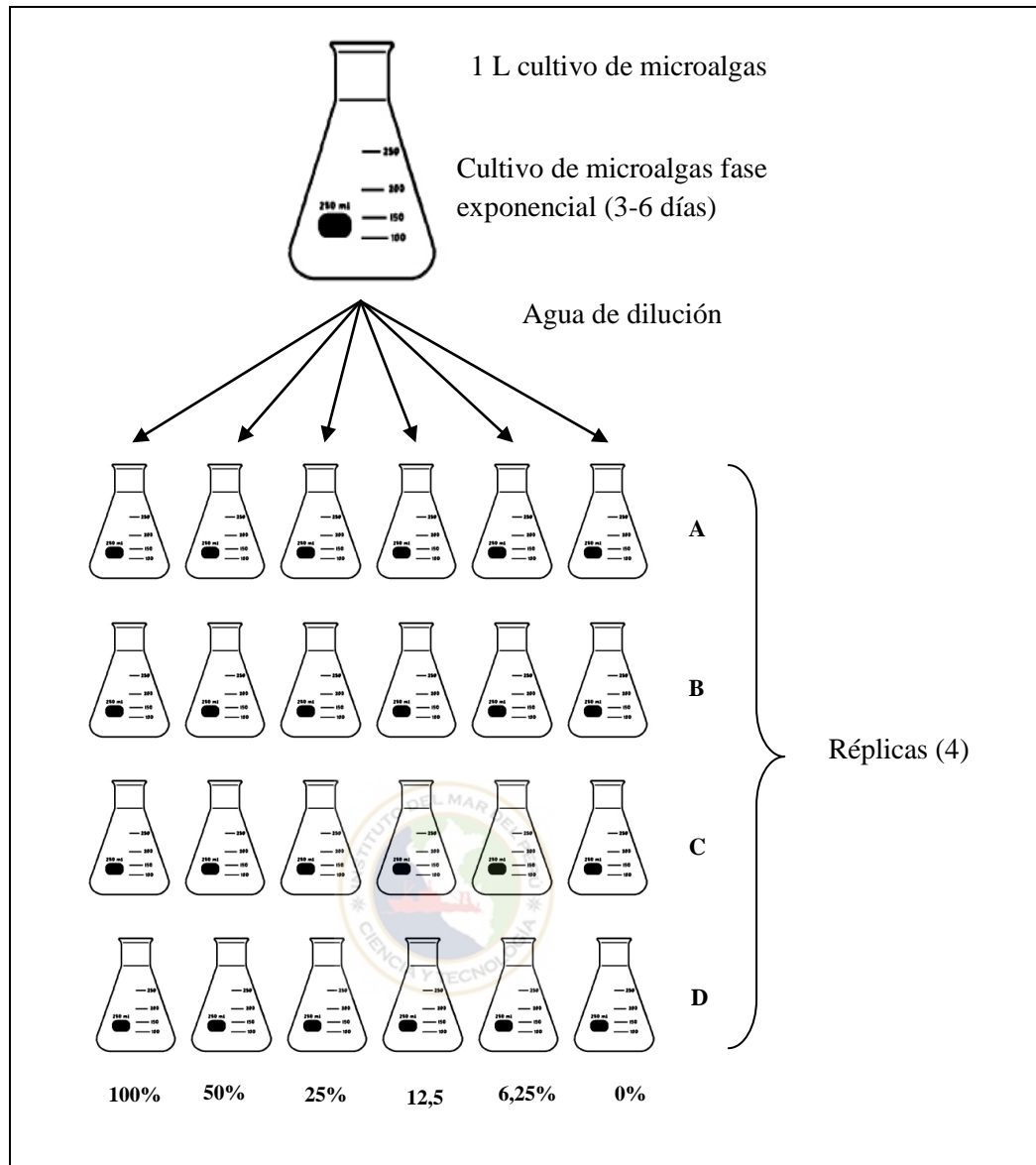
Las pruebas de toxicidad se basaron principalmente en la metodología propuesta por USEPA (2002). Para establecer el criterio de aceptabilidad de la prueba, se consideró que la densidad celular en el control negativo al finalizar la prueba (96h) debe ser  $\geq 1 \times 10^6$  cél/mL.

Se trabajó con un diseño experimental de bloques completamente aleatorizado (DBCA) de 6x4 para todas las pruebas de toxicidad realizadas, es decir, 5 concentraciones más un grupo control y cuatro repeticiones por tratamiento, las cuales se distribuyeron de manera aleatoria (Figura 6).



**Figura 5. Preparación de elutriado para ensayos de toxicidad con microalgas marinas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica*.**

**FUENTE: Elaboración propia.**



**Figura 6. Diseño en Bloques Completamente Aleatorizado (DBCA) 6x4 para pruebas de toxicidad.**  
**FUENTE:** Elaboración propia.

### 3.4.1 Pruebas de sensibilidad de microalgas

La USEPA (1994, 2002) recomienda emplear un tóxico de referencia para probar la sensibilidad de los organismos a usar y de esta manera garantizar la aceptabilidad del ensayo de toxicidad de la matriz en estudio en este caso sedimento marino.

En la figura 7, se detalla el proceso de preparación de pruebas de toxicidad con sulfato de cobre pentahidratado empleando cultivo de *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica* en medio Guillard F/2.

Esta prueba se realizó en matraces de 250 mL de capacidad. Las concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) a las que se expusieron las microalgas por 96 horas, fueron: 4,0 mg/L, 2mg/L, 1,0 mg/L, 0,5 mg/L, 0,25m/L, 0,125mg/L, con factor de dilución de 0,5, más un control negativo (sin tóxico), con 4 réplicas por concentración, con un diseño experimental de Diseño de Bloques Completamente Aleatorizado (DBCA) 7x4. Las condiciones iniciales empleadas en el laboratorio se observan en las Tablas 7 y 8. Los valores de las concentraciones del tóxico de referencia se basaron en referencia a los valores obtenidos por Edding y Tala (1996), quienes obtuvieron un  $\text{CI}_{50-72}$  de 1,58 mg/L para el caso de *Isochrysis gabana*.

La extracción de las microalgas para conteo se realizó cada 24 horas y se fijaron con formalina al 2 por ciento para su posterior conteo en cámara Neubauer. Además, se midieron los parámetros como: temperatura, oxígeno disuelto, pH, conductividad y salinidad (Tabla 9).

El criterio de aceptabilidad del control de las pruebas de toxicidad con tóxico de referencia ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) y elutriado se determinó con el Coeficiente de Variación expresado en porcentaje (CV), calculado a partir de:

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

Donde:

$\sigma$ =Desviación estándar

Según, USEPA (2002), el porcentaje de CV tiene que ser menor o igual al 20 por ciento entre las réplicas de densidad promedio de un mismo tratamiento.





**Figura 7. Preparación del control positivo con sulfato de cobre pentahidratado para ensayos de toxicidad con microalgas marinas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica*.**

**FUENTE:** Elaboración propia.

**Tabla 7. Condiciones usadas en las pruebas de toxicidad con *Isochrysis galbana*.**

PARÁMETROS	CONDICIONES
Tipo de prueba	Estática, sin renovación de la solución de prueba
Duración de la prueba	96 horas
Temperatura	21 - 23°C
Salinidad	34 – 36 ‰
Iluminación	Artificial, controlada con luces LED
Fotoperiodo	Iluminación continua (24 horas luz:0 horas oscuridad)
Aireación	Agitación manual periódica durante toda la prueba. Si el oxígeno es menor de 6 mg/L se suministra aireación continua
Recipientes de prueba	Matraces erlenmeyer de 250 mL
Volumen de prueba	50 mL
Edad del cultivo al inóculo	3 – 6 días (fase exponencial de crecimiento)
Agua de dilución	Agua de mar filtrada
Cantidad de nutrientes por matraz	52 µL de medio Guillard “f/2” modificado
Volumen de microalgas por matraz	2 mL
Densidad celular del inóculo por matraz	10 000 células.mL <sup>-1</sup>
Número de Concentraciones	Mínimo 6, más el control
Réplicas por concentración	Mínimo 4
Efecto medido	Inhibición de crecimiento poblacional, medida como densidad celular
Periodicidad de las observaciones	Cada 24 horas
Criterio de aceptabilidad de la prueba	La densidad celular en el control negativo al finalizar la prueba (96h) debe ser $\geq 1 \times 10^6$ cél./mL
Coefficiente de variación en los conteos de resultado final	$\leq 20$ por ciento entre réplicas de un mismo tratamiento CI <sub>50-96h</sub>
Control positivo	Cu (II), a partir de una solución de CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O

**FUENTE: Adaptado de USEPA (2002).**

**Tabla 8. Condiciones usadas en las pruebas de toxicidad con *Nannochloropsis oceanica*.**

PARÁMETROS	CONDICIONES
Tipo de prueba	Estática, sin renovación de la solución de prueba
Duración	96 horas
Temperatura	21 - 23°C
Salinidad	34 – 36 ‰
Iluminación	Artificial, controlada con luces LED
Fotoperiodo	Iluminación continua (24 horas luz:0 horas oscuridad)
Aireación	Agitación manual periódica durante toda la prueba. Si el oxígeno es menor de 6mg/L se suministra aireación continua
Recipientes de prueba	Matraces erlenmeyer de 250 mL
Volumen de prueba	50 mL
Edad del cultivo al inóculo	3 – 6 días (fase exponencial de crecimiento)
Agua de dilución	Agua de mar filtrada
Cantidad de nutrientes por matraz	52 µL de medio Guillard “f/2” modificado
Volumen de microalgas	2 mL
Número de Concentraciones	Mínimo 5, más el control
Réplicas por concentración	Mínimo 4
Efecto medido	Inhibición de crecimiento poblacional, medida como densidad celular.
Periodicidad de las observaciones	Cada 24 horas.
Criterio de aceptabilidad de la prueba	La densidad celular en el control negativo al finalizar la prueba (96h) debe ser $\geq 1 \times 10^6$ cél./mL
Coefficiente de variación en los conteos de resultado final	$\leq 20$ por ciento entre réplicas de un mismo tratamiento $CI_{50-96h}$
Control positivo	Cu (II), a partir de una solución de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$

**FUENTE: Adaptado de USEPA (2002).**

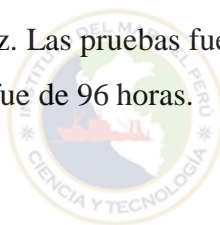
**Tabla 9. Equipos usados y frecuencia de medición de parámetros físicoquímicos de las pruebas de toxicidad con microalgas.**

PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS	EQUIPOS	MARCA	FRECUENCIA DE MEDICIÓN
Temperatura, Oxígeno disuelto y pH	Multiparámetro	HACH (HQ40d)	Cada 24 horas
Conductividad y salinidad	Conductímetro	WTW (Cond7110)	Al inicio y a las 96 horas

**FUENTE: Elaboración Propia.**

### 3.4.2. Pruebas de toxicidad con elutriado de sedimento marino

Las pruebas fueron realizadas en matraces de vidrio de 125 mL de capacidad. Se utilizó 50 mL del elutriado del sedimento, trabajando con cuatro repeticiones por cada estación de muestreo, se emplearon 2 mL de cultivo de microalgas y 52 µL de medio Guillard modificado F/2 para cada matraz. Las pruebas fueron de tipo estático, sin renovación de agua. El período de exposición fue de 96 horas.

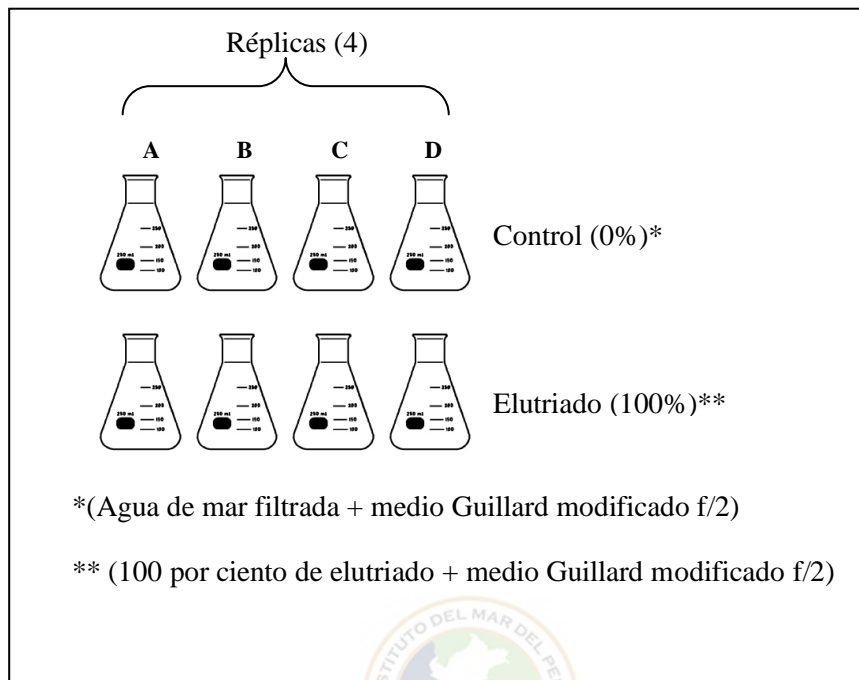


#### 3.4.2.1 Pruebas preliminares

Con el propósito de reducir el uso de muestras, se sometieron los elutriados de sedimento directamente al cultivo de microalga sin realizar diluciones, siendo comparada con un control, el cual contenía solo agua de mar filtrada y medio de Guillard modificado F/2.

Para estas pruebas se empleó la concentración del elutriado al 100 por ciento y el control negativo (0 por ciento del elutriado), trabajando con cuatro repeticiones para ambas concentraciones (Figura 8). Considerando en la Bahía Tortugas-Casma (8 y 10 estaciones en marzo y agosto, respectivamente) y en la Bahía Paracas (6 y 8 estaciones en abril y setiembre, respectivamente). Para los casos en los que se detectó por medio de una prueba estadística t-student diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con el control se sometió la muestra a una prueba definitiva o de multiconcentración. Las pruebas de toxicidad fueron válidas cuando el control negativo del crecimiento de microalgas no se

inhibió y cuando el cultivo del 100 por ciento del elutriado no tuvo sobrecrecimiento respecto al control. También, se registraron los parámetros fisicoquímicos como: temperatura, oxígeno disuelto, pH, conductividad y salinidad.

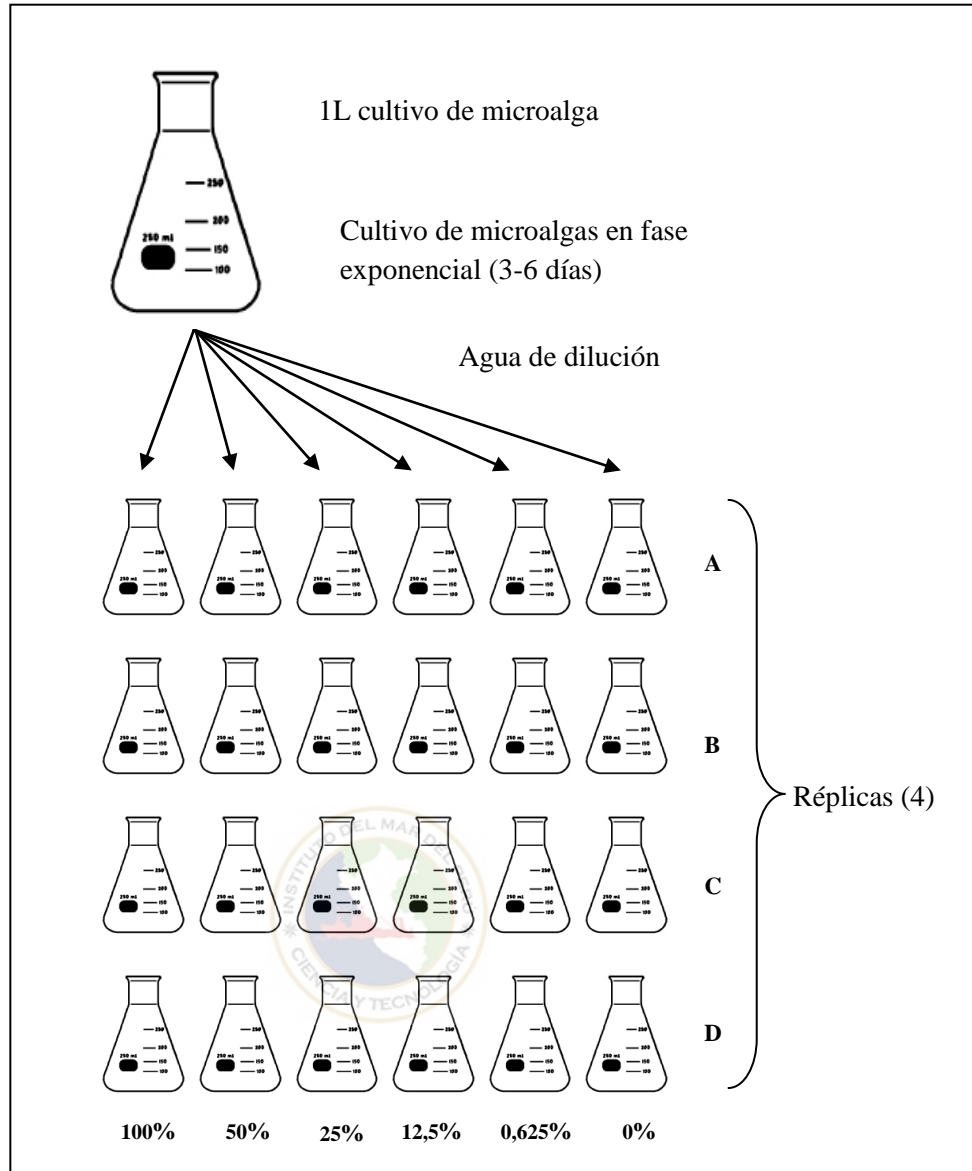


**Figura 8. Diseño de la prueba de toxicidad con microalgas expuestas al 0 por ciento y 100 por ciento del elutriado marino de las zonas y estación de muestreo.**

**FUENTE: Elaboración propia.**

### 3.4.2.2 Pruebas definitivas o Multiconcentración

Las pruebas definitivas se trabajaron con la finalidad de determinar la concentración de inhibición media porcentual ( $CI_{50}$ ), la cual indica la concentración que provoca la mortalidad del 50 por ciento de la densidad celular de las microalgas. Según, la metodología descrita por la USEPA (2002), se trabajó con cinco concentraciones de elutriado de sedimento marino: 6,25%; 12,5%; 25%; 50% y 100%, más un control negativo, en un diseño en Bloques Completamente Aleatorizado (DBCA) 6x4 (Figura 9). Las pruebas de toxicidad fueron válidas cuando el control negativo del crecimiento de microalgas no se inhibió. En la bahía Tortugas-Casma se realizaron en 4 y 2 estaciones de muestreo en marzo y agosto, respectivamente y en la bahía Paracas se realizaron en 3 estaciones de muestreo en abril y setiembre. Finalmente, se registraron los parámetros fisicoquímicos como: conductividad eléctrica, oxígeno disuelto, pH, salinidad y temperatura.



**Figura 9. Diseño en Bloques Completamente Aleatorizado (DBCA) 6x4 de la prueba de toxicidad con microalgas expuestas a diferentes concentraciones de elutriado marino.**

**FUENTE: Elaboración propia.**

### 3.4.3 Conteo celular con cámara Neubauer

El conteo se realizó en la cámara de Neubauer también, reportado en manuales para cultivos de microalgas como FAO (2006), el mismo que consta de un porta-objetos de cuarzo y un cubre-objetos de un grosor mayor a los de uso común (Figura 10). Se empleó este tipo de método de conteo porque es especialmente para cultivos y concentraciones extremadamente altas de células de organismos de pequeño tamaño (<30  $\mu\text{m}$ ) (Karlson et al., 2010).

Para el conteo se consideró lo siguiente:

-Se tomó una alícuota de 1mL del cultivo madre, de los controles positivos y de las diferentes concentraciones de elutriado de sedimento marino (Figura 10A y B).

-Las muestras se observaron al microscopio en aumento 10X, para verificar que se encuentran uniformemente distribuidas y sin burbujas, si esto ocurre es necesario repetir el proceso, limpiando y secando nuevamente la placa

-Se realizaron los conteos al microscopio marca Zeiss con un aumento total de 100X (*Nannochloropsis oceanica*) y 200X (*Isochrysis galbana*) (Figura 10C).

-Se definió el tipo de conteo, de acuerdo a la concentración celular como lo recomienda Aguilar et al., (2011), para células menores a 6 μm (Fórmula N° 1) y LeGresley y McDermott (2010) para células mayores a 6 μm (Fórmula N° 2) (Figura 10E).

**Células menores a 6 μm:**

$$Nb = \frac{\sum Cel. Cb \times 250\ 000}{5} \dots\dots\dots \text{Fórmula N° 1}$$

**Células mayores a 6 μm:**

$$Na = \frac{\sum Cel. Ca \times 10\ 000}{4} \dots\dots\dots \text{Fórmula N° 2}$$



Donde:

$Na$  y  $Nb$  = Número de células por mL (células/mL)

$\sum Cel. Ca$  = Suma de células en los cuadrados grandes de las esquinas de la cámara (10E)

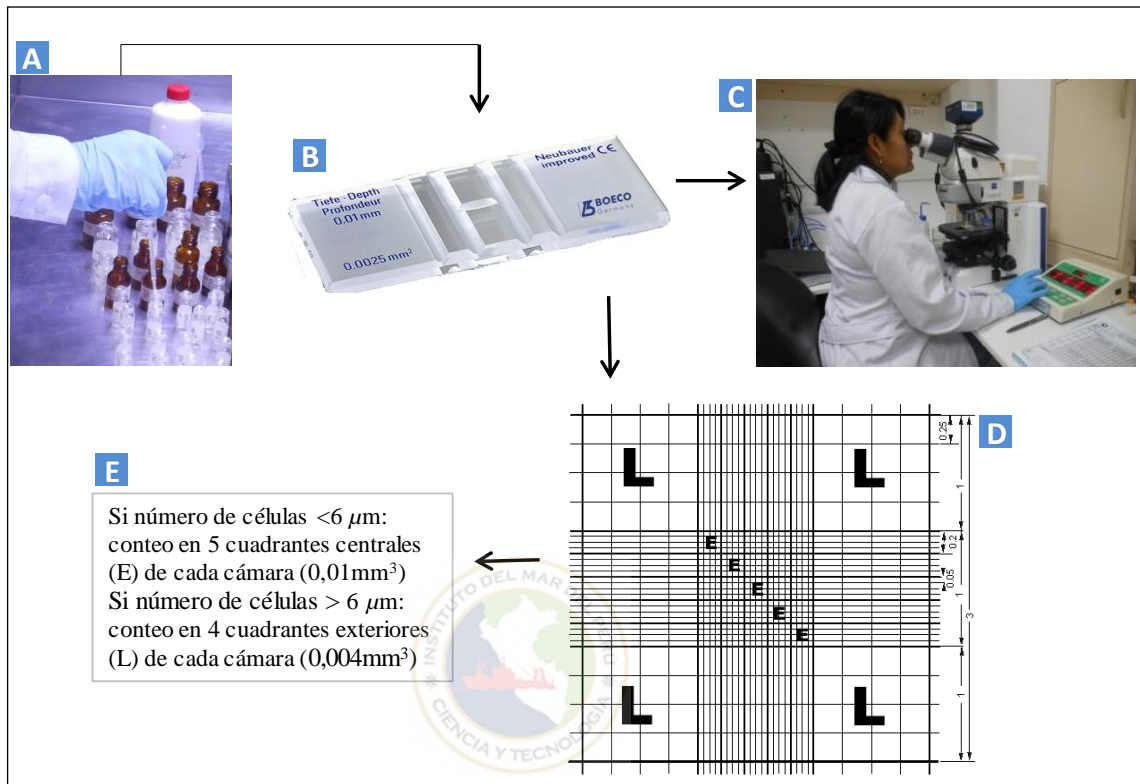
$\sum Cel. Cb$  = Suma de células en los cuadrados medianos de la cámara (Figura 10E)

Para el primer caso, el conteo se llevó a cabo en los cinco cuadrantes de la celda central de cada cámara señalados con una "E", el valor final resultó del promedio de los conteos realizados en los 10 cuadrantes leídos (cinco en cada cámara) en un volumen de 0,004mm (Figura 10D).

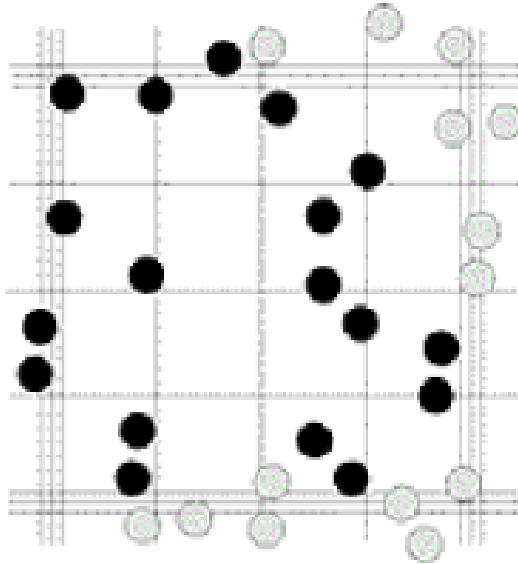
Para el segundo caso, el conteo se efectuó en los cuatro cuadrantes de los extremos de cada cámara señalados con un "L" están divididos en 16 cuadrados con aristas de 0,25 mm y el valor final correspondió al promedio de los conteos realizados en los ocho cuadrantes leídos (cuatro en cada cámara) en un volumen de 0,01mm<sup>3</sup> (Figura 10D).



-El recuento se realizó en el área delimitada por tres líneas. Las celdas que tocan los bordes superior e izquierdo se contabilizaron, mientras que las celdas que tocan los bordes derecho e inferior no se contabilizaron (Figura 11) (LeGresley y McDermott, 2010).



**Figura 10. Metodología de recuento celular con cámaras de Neubauer en microscopio compuesto.**  
**FUENTE: Elaboración propia.**



**Figura 11. Conteo en cámara de Neubauer.**  
**FUENTE: LeGresley y McDermott (2010).**

#### **3.4.4 Diagrama de flujo para el procedimiento de los bioensayos**

Los procedimientos para la determinación de la toxicidad de los sedimentos provenientes de las Bahías Tortugas-Casma y Paracas empleando las microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica*, se observa en la figura 12.

### **3.5 Análisis de los datos**

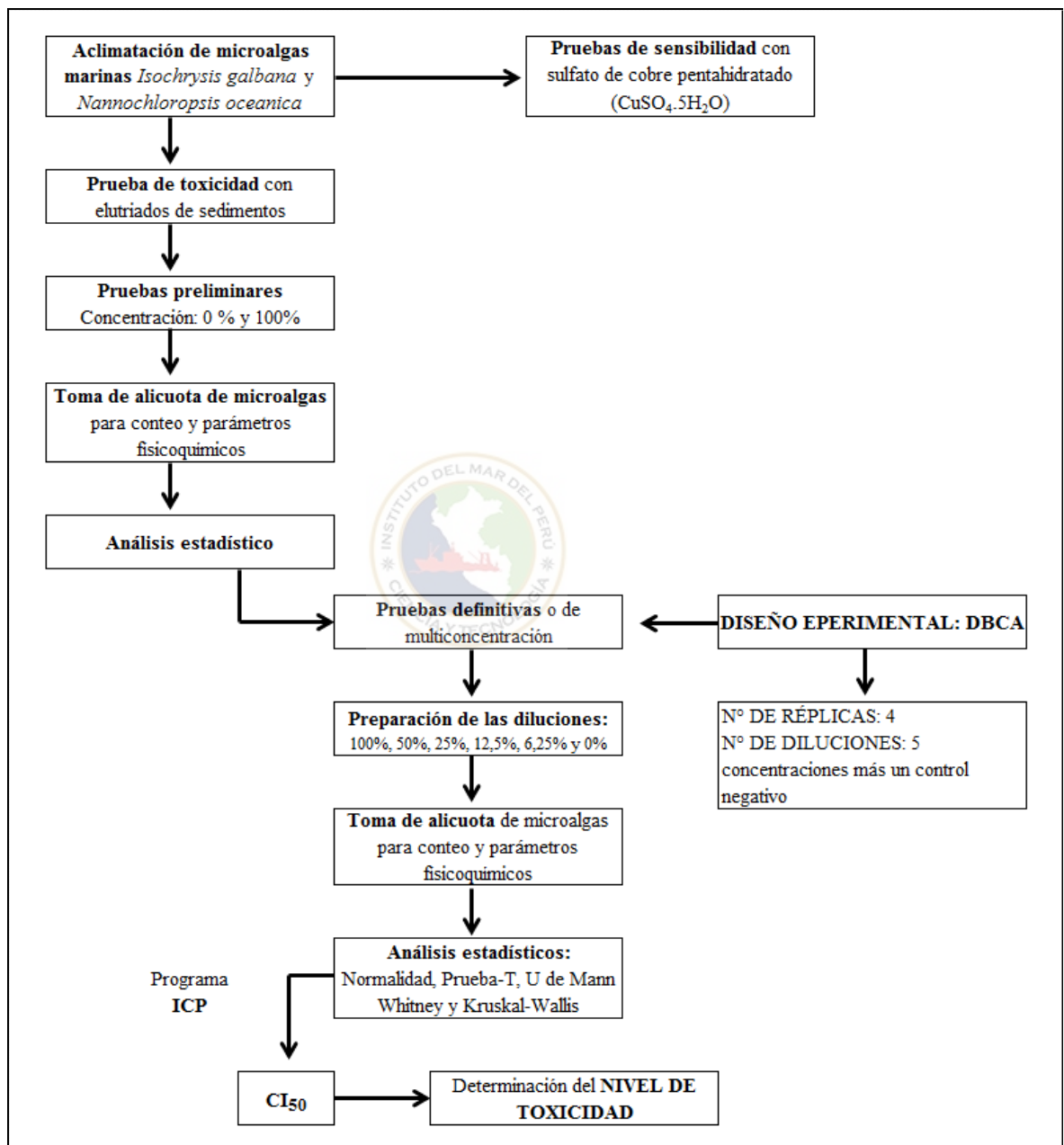
#### **3.5.1 Pruebas preliminares**

Con los resultados de las réplicas de crecimiento celular de microalgas del control negativo ( $C_0$ ) y del 100 por ciento del elutriado de sedimento ( $C_5$ ) se halló las diferencias significativas  $p < 0.05$  a las 96 horas empleando la prueba-T de Student para datos parámetros o la prueba U de Mann-Whitney para datos no parámetros, mediante el programa Minitab 15. De esta manera se determinó si era o no necesario realizar pruebas de multiconcentración (Figura 13).

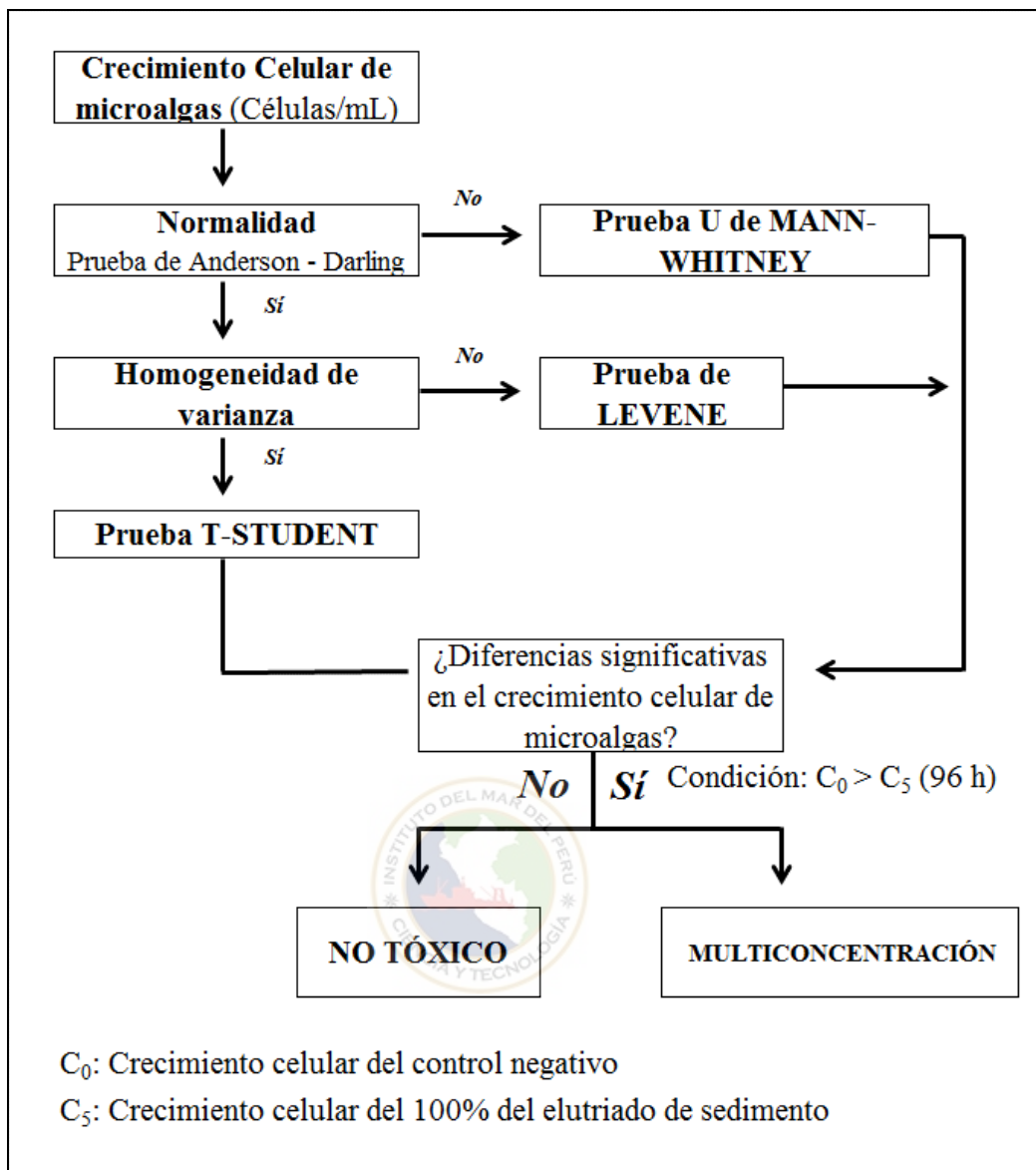
#### **3.5.2 Pruebas definitivas**

Los datos de las pruebas definitivas fueron sometidos a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk (S-W) y homogeneidad de varianzas de Levene's. Las diferencias entre cada tratamiento y réplicas a las 96 horas, así como por zonas de estudio se evaluaron en su mayoría de los casos a través la prueba de Kruskal-Wallis (K-W) por presentar

valores no paramétricos. Las diferencias significativas de los resultados fueron evaluadas con  $p < 0.05$  (Zar, 1996). Todos los cálculos estadísticos fueron analizados por el paquete SPSS ver. 21.



**Figura 12. Diagrama de flujo de pruebas de toxicidad de sedimentos marinos empleando *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica*. FUENTE: Elaboración propia.**



**Figura 13. Árbol de decisión para determinar si es necesario realizar multiconcentración.**

**FUENTE: Modificado de USEPA (2002).**

### 3.5.3 Determinación de la concentración de inhibición media ( $CI_{50}$ )

Para el cálculo del porcentaje de  $CI_{50}$  se procedió a realizar pruebas de multiconcentración exponiendo a las microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica* a diferentes concentraciones de sustancia de referencia sulfato de cobre pentahidratado ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) y de elutriado de sedimento marino que mediante el programa informático ICp recomendado por la USEPA (1992) se realiza una estimación usando el método de interpolación lineal, que compara el control negativo con el valor que reduce

el 50 por ciento de la densidad microalgal durante la prueba de inhibición de crecimiento.

### 3.5.4 Toxicidad del sedimento marino de las zonas de estudio

Luego de obtener los porcentajes de  $CI_{50}$  de las estaciones muestreadas, se determinó la toxicidad de sedimento marino siguiendo los rangos establecidos (Tabla 10) que se realizó en base a las pruebas de toxicidad realizadas con el anfípodo *Eohaustorius Survival*, lo importante en este caso es el efecto del 50 por ciento de la población.

**Tabla 10. Rangos de clasificación de la respuesta a la toxicidad del sedimento marino.**

$CI_{50}$ (%)	Nivel de toxicidad
	No probado
90 – 100	No tóxico
82 – 89	Baja toxicidad
59 – 81	Moderada toxicidad
< 59	Alta toxicidad

FUENTE: Modificado Bay et al. (2014).

### 3.5.5 Condiciones básicas para pruebas de toxicidad con *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica*

Los criterios básicos se determinaron en base a las condiciones iniciales que fueron tomados y modificados de la USEPA (2002), los mismos que se pueden observar en las Tablas 4 y 5. Los parámetros controlados durante las 96 horas de prueba, generaron condiciones diferentes para cada especie de microalga dentro del sistema establecido en el Laboratorio de Ecotoxicología.

Una vez obtenidos los valores de conductividad eléctrica, oxígeno disuelto, pH, salinidad, temperatura e intensidad luminica se hallaron los promedios y desviación estándar. Asimismo, se realizó una prueba-T Student ó prueba U de Mann-Whitney, dependiendo si fueron o no datos parámetros y de está manera se hallaron las diferencias significativas de los parámetros físico-químicos entre las cero y 96 horas de prueba.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Pruebas de sensibilidad de las microalgas

Con la finalidad de comprobar la sensibilidad de las microalgas *I. galbana* y *N. oceanica* a diferentes compuestos tóxicos, se realizaron bioensayos utilizando como tóxico de referencia al sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). La densidad celular del control negativo a las 96 horas cumplió con el criterio de aceptabilidad  $\geq 1 \times 10^6$  cél/mL (Anexos 4 y 5).

#### 4.1.1 Pruebas de sensibilidad con la microalga *Isochrysis galbana*

La tendencia de la densidad algal del control negativo fue en aumento, alcanzando el máximo valor de  $2,0 \times 10^6$  cél/mL a las 96 horas, con un incremento de 8 veces más de la densidad inicial (Anexo 4). De las concentraciones estipuladas, se tiene que a 0,125; 0,250 y 0,5 mg/L de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  se presentó un sobre crecimiento algal respecto al control desde las 24 horas hasta las 96 horas de exposición (Figura 14). El incremento algal se puede deber a casos de “hormesis”, que se refiere al crecimiento en respuesta al estrés tóxico (Brand et al., 1986). De igual forma es importante recalcar que el cobre, según Steemann y Bruun (1976) y Visviki y Rachlin (1992) es un micronutriente esencial para las microalgas, pero en cantidades ínfimas.

El efecto inhibitorio se empezó a notar a partir de las concentraciones 1,0; 2,0 y 4,0 mg/L de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Esta inhibición se debe a que los iones de cobre se adsorben en la membrana citoplasmática de algas deteniendo la división celular así como lo mencionan Steemann y Nielsen (1970) y Saifullah (1978).

Se estimó la concentración de inhibición media ( $\text{CI}_{50}$ ) diaria, mostrando valores a partir de las 48 horas de prueba (2,9208 mg/L de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ); luego se aprecia un incremento en el efecto inhibitorio de crecimiento a las 72 horas a 1,8558 mg/L de

CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, y así progresivamente hasta las 96 horas cuyo valor final de la prueba fue 0,8812 mg/L de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (Figura 15), siendo este valor de sulfato de cobre pentahidratado el que inhibió el 50 por ciento de la densidad microalgal a las 96 horas respecto al control negativo (Figura 16).

Yap et al. (2004), obtuvieron un valor de CI<sub>50</sub>=0,91 mg/L de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O al exponerlo a la misma especie de microalga después de 120 horas de exposición, siendo este valor cercano al hallado en el presente estudio a las 96 horas. Por otro lado, Rudolph et al. (2014) mencionan que en el análisis de sensibilidad de *Isochrysis galbana* con soluciones de dicromato de Potasio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) presentaron un CI<sub>50</sub> estimado de 55 mg/L al 95 por ciento de confianza siendo más sensible que *Dunaliella tertiolecta* (CI<sub>50</sub>=72 mg/L) y *Dunaliella salina* (CI<sub>50</sub>=65 mg/L). De esta manera los resultados obtenidos de la prueba de toxicidad confirman la alta sensibilidad del microalga *I. galbana* al sulfato de cobre pentahidratado.

Los parámetros fisicoquímicos fueron monitoreados durante las pruebas y mostraron que la calidad del agua fue adecuada para el crecimiento algal, (Temperatura: 21,60 - 22,70 °C; pH: 8,07 - 9,60). En los ensayos de crecimiento de esta microalga, Fernández (2016) menciona que la temperatura en un ambiente semicontrolado y no controlado varía de 22,3°C a 28 °C y 22,9°C a 29,1°C, respectivamente. Asimismo, Garibay et al. (2009), indica que las condiciones adecuadas de pH para el crecimiento microalgal en general puede estar entre 6,5 a 9,5. De esta manera los valores de temperatura y pH obtenidos no tendrían influencia en los resultados de crecimiento de *Isochrysis galbana*.



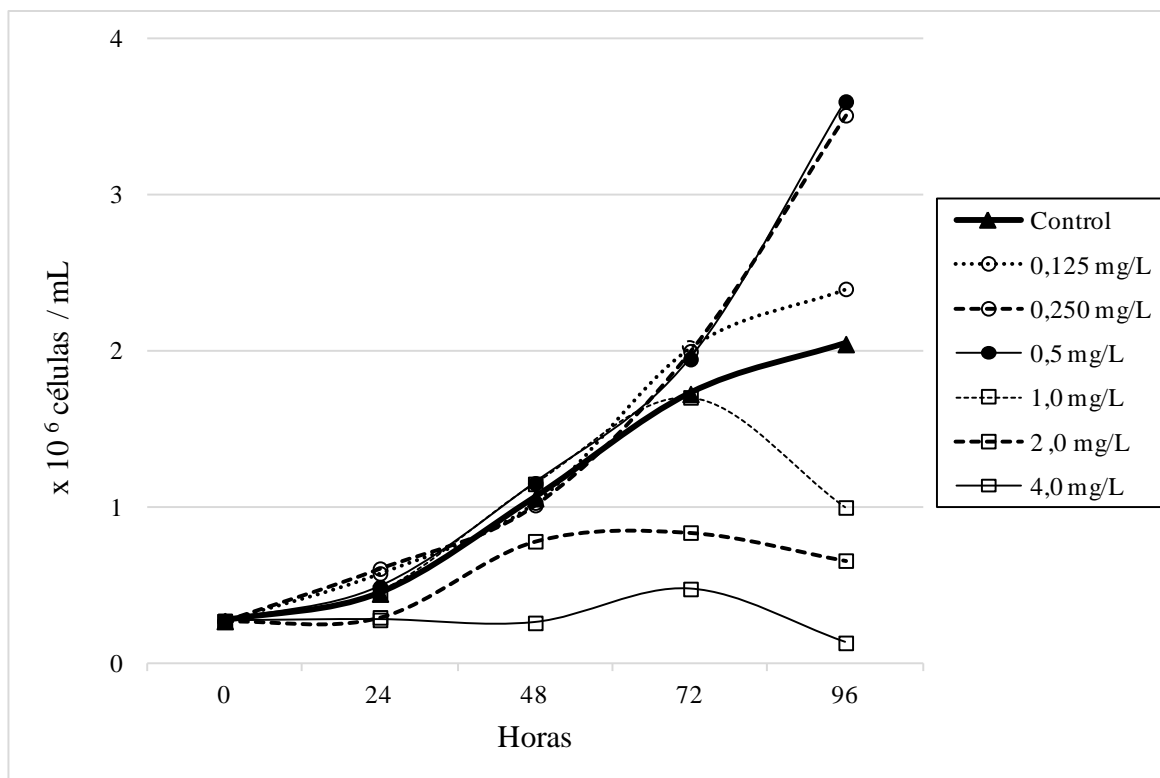


Figura 14. Crecimiento celular promedio (células/mL) de *Isochrysis galbana* expuesta a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) a las 24, 48, 72 y 96 horas.

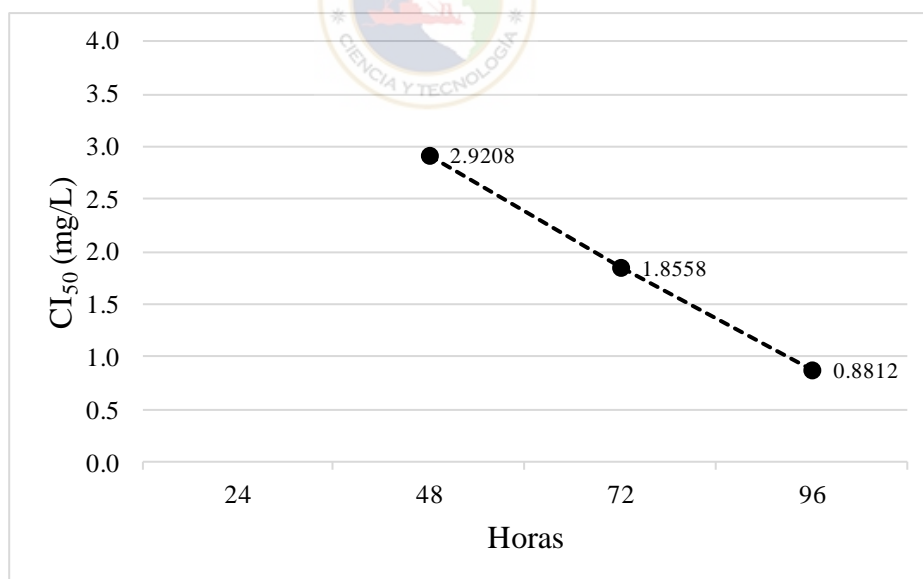
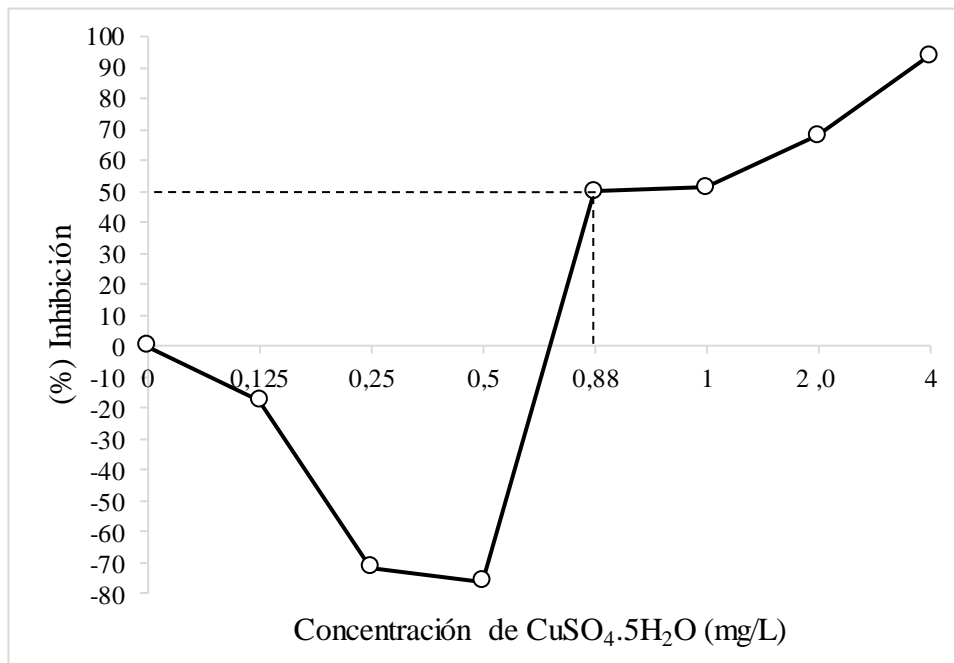


Figura 15. Concentración de inhibición ( $\text{CI}_{50}$ ) *Isochrysis galbana* a las 24, 48, 72 y 96 horas de exposición al sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ).



**Figura 16. Porcentaje de inhibición de *Isochrysis galbana*, a las 96 horas, en función de la concentración de sulfato de cobre pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O).**

#### 4.1.2 Pruebas de sensibilidad con la microalga *Nannochloropsis oceanica*

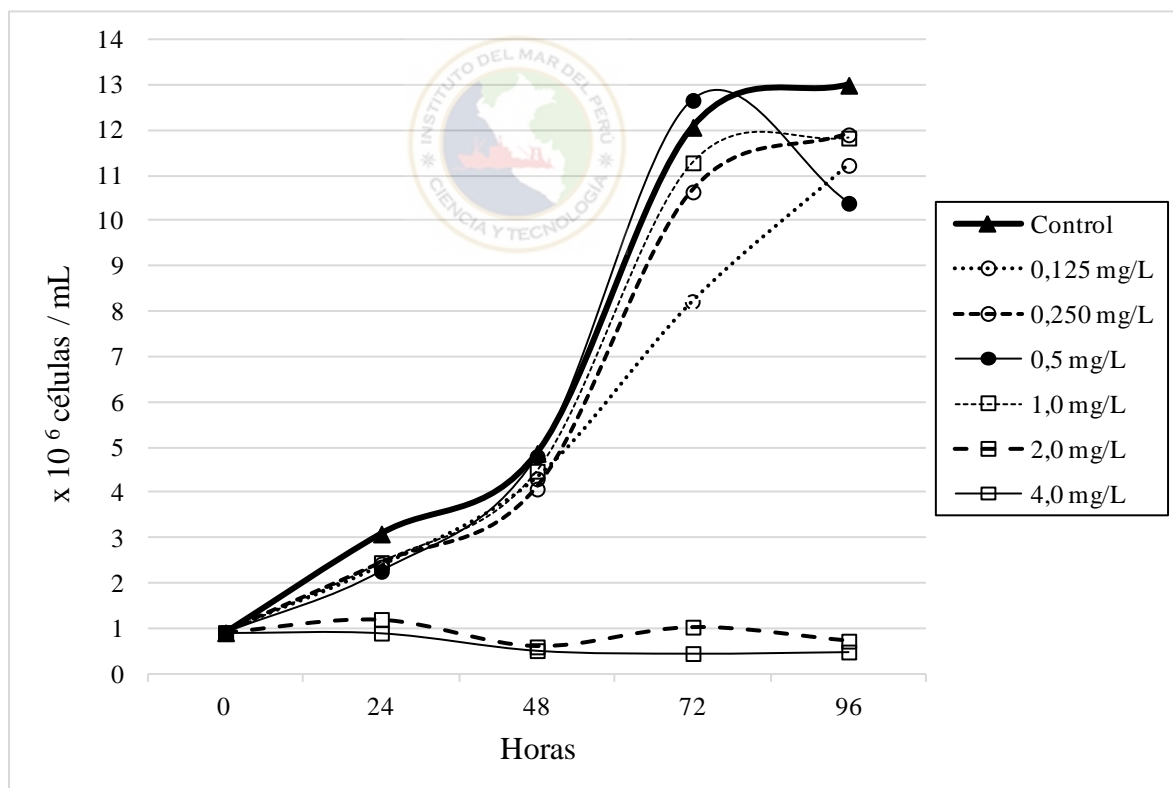
El control negativo incrementó la densidad de  $9,05 \times 10^5$  cél/mL hasta  $13 \times 10^6$  cél/mL a las 96 horas, cumpliendo así con el criterio de aceptabilidad (Anexo 5).

La tendencia de crecimiento microalgal en las concentraciones 0,125 mg/L y 0,250 mg/L de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O fue exponencial hasta las 96 horas. Mientras que en las concentraciones 0,5 mg/L y 1,0 mg/L de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O el crecimiento microalgal disminuyó respecto al control. Finalmente, en las concentraciones 2,0 mg/L y 4,0 mg/L de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O el crecimiento algal se inhibió respecto al control desde las 24 horas (Figura 17).

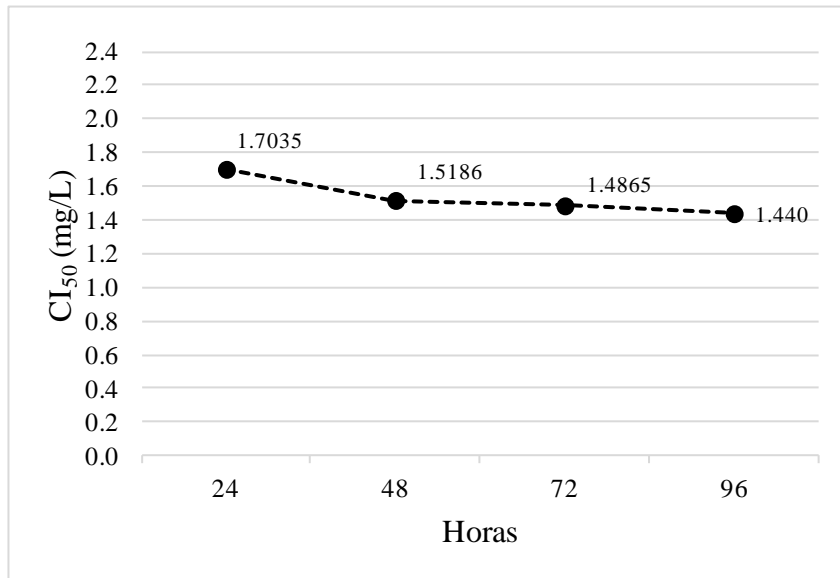
El valor de CI<sub>50</sub> obtenido a las 24 horas de exposición fue 1,7035 mg/L de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; luego se apreció un incremento en el efecto inhibitorio de crecimiento a las 48 horas (1,5186 mg/L CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O), y así progresivamente hasta las 72 y 96 horas (1,4865 y 1,440 mg/L de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, respectivamente) (Figura 18). Siendo así 1,440 mg/L de sulfato de cobre pentahidratado, la concentración, que inhibió el 50 por ciento de la densidad microalgal a las 96 horas respecto al control negativo (Figura 19).

Los parámetros fisicoquímicos fueron monitoreados durante las pruebas y mostraron que la calidad del agua fue adecuada para el crecimiento algal, (Temperatura: 21,60 - 22,40 °C; pH: 8,07 - 10,20), según Sandnes et al. (2005), mencionan que la temperatura promedio del cultivo de esta microalga es  $23,34 \pm 1,09$ . Asimismo, Zhang et al. (2016) indican que las condiciones de temperatura y pH en cultivo de 12 días fueron 23,0 – 28,0 °C y 7,6 – 8,2 respectivamente. Es así que la temperatura y pH obtenidos en la prueba de toxicidad están dentro de los parámetros establecidos por otros autores.

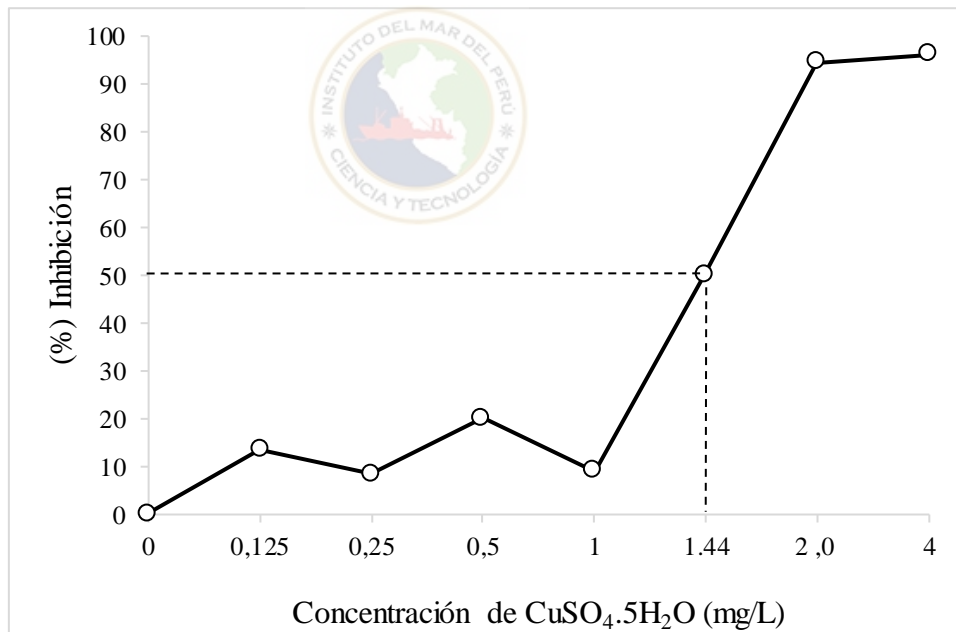
*I. galbana* es más sensible al cobre que *N. oceanica*, cuyos resultados son corroborados por Moreno et al. (2000) quienes mencionan valores de 0.0004 mg/L para la haptophyta mencionada y 0.0167 mg/L para *N. atomus*. Levy et al. (2007), indican que la sensibilidad está mejor relacionada con las tasas de consumo de cobre y procesos de desintoxicación intracelular de las diferentes especies de microalgas.



**Figura 17.** Crecimiento celular promedio (células/mL) de *Nannochloropsis oceanica* expuesta a diferentes concentraciones de sulfato de cobre a las 24, 48, 72 y 96 horas.



**Figura 18.** Concentración de inhibición (CI<sub>50</sub>) del sulfato de cobre pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) empleando *Nannochloropsis oceanica* a las 24, 48, 72 y 96 horas de exposición.



**Figura 19.** Porcentaje de inhibición de *Nannochloropsis oceanica* a las 96 horas, en función de la concentración de sulfato de cobre pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O).

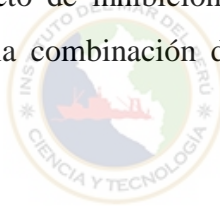
## **4.2 Pruebas preliminares de toxicidad con microalgas en elutriado de sedimentos marinos**

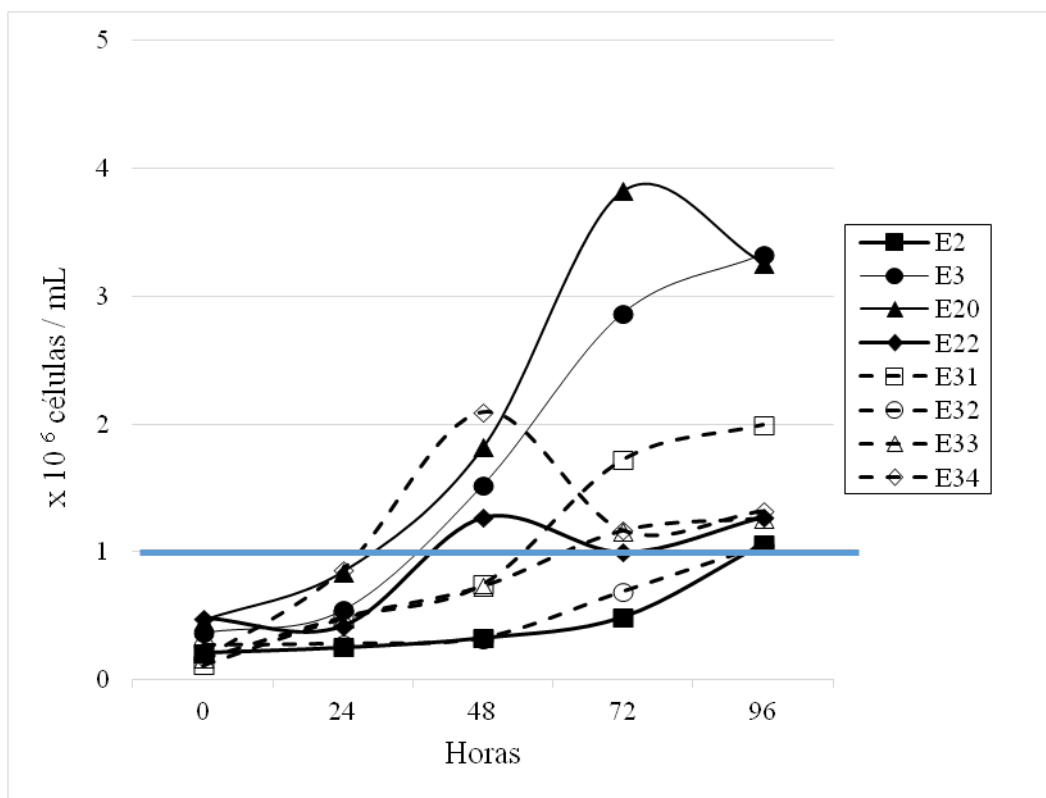
### **4.2.1 Bahía Tortugas-Casma**

#### **4.2.1.1 Prueba con *Isochrysis galbana***

En la figura 20, se puede observar que el crecimiento algal del control negativo de la mayoría de estaciones muestreadas en marzo fue exponencial, cumpliendo al cabo de las 96 horas con el criterio de aceptabilidad para pruebas de toxicidad con microalgas ( $\geq 1 \times 10^6$  cél/mL). Además, se aprecia que en la estación E20 la densidad algal empezó a disminuir a las 96 horas. Mientras que las estaciones E22 y E34 la densidad algal empezó a disminuir a partir de las 48 horas y se recuperó a las 96 horas. Además, en la tasa de crecimiento de esta microalga varió entre 0,24 y 0,71 d<sup>-1</sup> (Anexo 6).

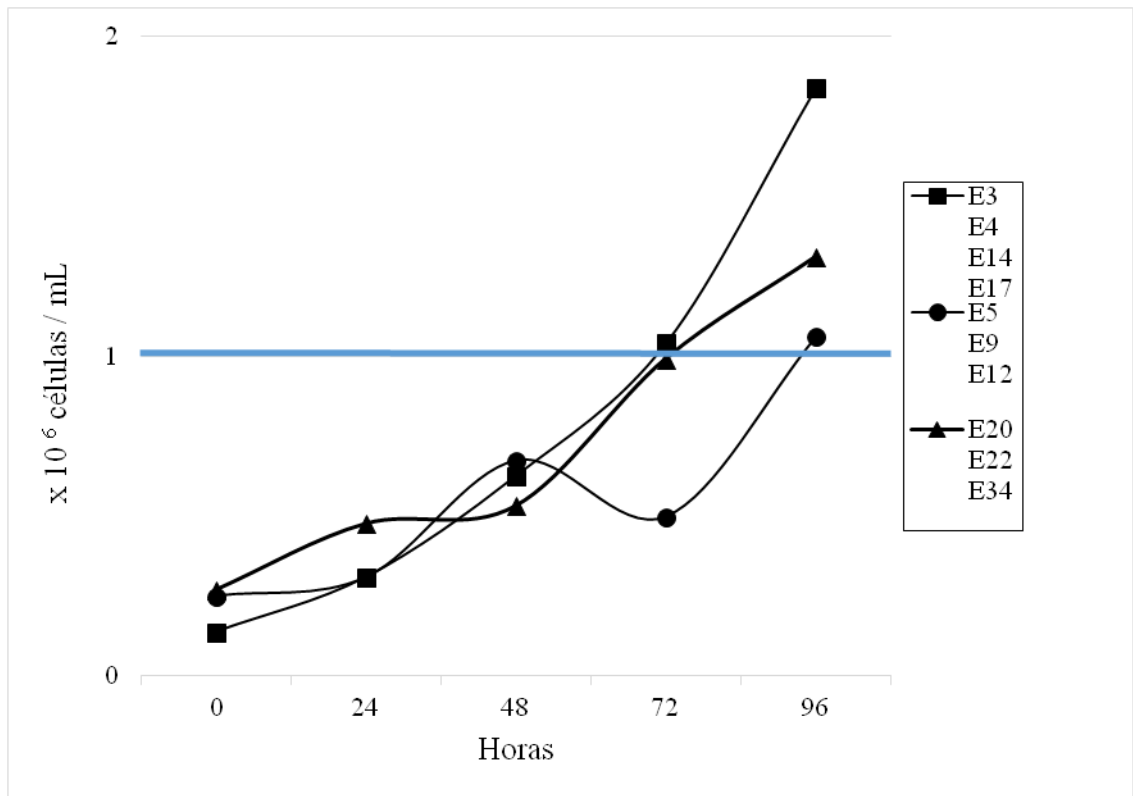
En la 3rd International Conference on Future BioMedical Information Engineering (2010) mencionaron que en la fase exponencial y estacionaria del crecimiento de *Isochrysis galbana*, se liberan sustancias antibacteriales, a su vez éstas se convierten en sustancias antialgales, este efecto de inhibición se le atribuye a la presencia de los ácidos oleico y esteárico y a la combinación de ambos, presentes en los productos extracelulares de la microalga.





**Figura 20.** Crecimiento celular promedio (células/mL) de *Isochrysis galbana* en el control negativo a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de exposición a las pruebas de toxicidad con sedimento marino de las estaciones de muestreo de la Bahía Tortugas-Casma muestreadas en marzo del 2016. Línea azul: Criterio de aceptabilidad  $\geq 1 \times 10^6$  cél/mL.

Para el mes de agosto en promedio el valor de la densidad de microalgas del control negativo al cabo de las 96 horas fue siete veces más al de la densidad inicial. Además, de las estaciones evaluadas en este período se observó que los controles negativos de E20, E22 y E34 presentaron decrecimiento a las 72 horas, pero al cabo de las 96 horas la densidad microalgal de estas estaciones superó el criterio de aceptabilidad (Figura 21). La tasa de crecimiento de esta microalga varió entre 0,36 y 0,65  $d^{-1}$  (Anexo 7).



**Figura 21.** Crecimiento celular promedio (células/mL) de *Isochrysis galbana* en el control negativo a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de exposición a las pruebas de toxicidad con sedimento marino de las estaciones de muestreo de la Bahía Tortugas-Casma muestreadas en agosto del 2016. Línea azul: Criterio de aceptabilidad  $\geq 1 \times 10^6$  cél/mL.

Como se puede observar en la tabla 11, el control negativo de E8 y E10, presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las 24 y 96 horas lo que confirma estadísticamente un crecimiento algal del control negativo y también cumplen con el criterio de aceptabilidad ( $\geq 1 \times 10^6$  cél/mL) que las pruebas de toxicidad con microalgas requiere, lo que sirve para aseverar que los valores obtenidos son válidos.



**Tabla 11. Valores de significancia del crecimiento de *Isochrysis galbana* en la muestra del control negativo a las 24 y 96 horas de las estaciones de muestreo de la Bahía Tortugas-Casma, muestreadas en marzo y agosto del 2016.**

Estaciones de muestreo	Marzo	Agosto	Criterio de aceptabilidad ( $\geq 1 \times 10^6$ cél/mL)
	<i>p</i> value	<i>p</i> value	
E2	0,000*	-	<i>Sí</i>
E3	0,023*	0,005*	<i>Sí</i>
E4	-	0,005*	<i>Sí</i>
E5	-	0,030**	<i>Sí</i>
E9	-	0,030**	<i>Sí</i>
E12	-	0,030**	<i>Sí</i>
E14	-	0,005*	<i>Sí</i>
E17	-	0,005*	<i>Sí</i>
E20	0,017*	0,002*	<i>Sí</i>
E22	0,001*	0,002*	<i>Sí</i>
E31	0,002*	-	<i>Sí</i>
E32	0,016*	-	<i>Sí</i>
E33	0,030**	-	<i>Sí</i>
E34	0,432*	0,002*	<i>Sí</i>

\*= Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), prueba-T de Student

\*\*= Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), Prueba U de Mann-Whitney

En la tabla 12, se muestran diferencias significativas entre el control negativo ( $C_0$ ) y el 100 por ciento del sedimento marino ( $C_5$ ). Presentando diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en las estaciones E2, E3, E32 y E33 en marzo, así como las estaciones E3 y E22 en agosto, presentando inhibición de  $C_5$  respecto a  $C_0$ . Mientras que en las estaciones E34 en marzo y las estaciones E5 y E34 en agosto presentaron efectos estimulatorios que se manifestaron con el sobrecrecimiento algal de la  $C_5$  respecto al control negativo. Para este caso Martínez (2008) menciona que éstos datos no se deben incluir en la determinación de la  $CI_{50}$  porque se lo que se busca es el efecto inhibitorio de las microalgas.

Biologicamente las microalgas regulan la disponibilidad de los nutrientes en los sedimentos marinos, lo que incrementa la densidad algal (Thain, 1992) por esta razón la densidad  $C_5$  es mayor que el control en el presente estudio. Además, posiblemente los

elutriados de estas estaciones de muestreo contenían mayor cantidad de nutrientes que el control ayudando así a proliferar el crecimiento algal de la concentración C<sub>5</sub>.

**Tabla 12. Resultados de las pruebas preliminares con *Isochrysis galbana* para las estaciones de muestreo de la Bahía Tortugas-Casma, muestreadas en marzo y agosto del 2016.**

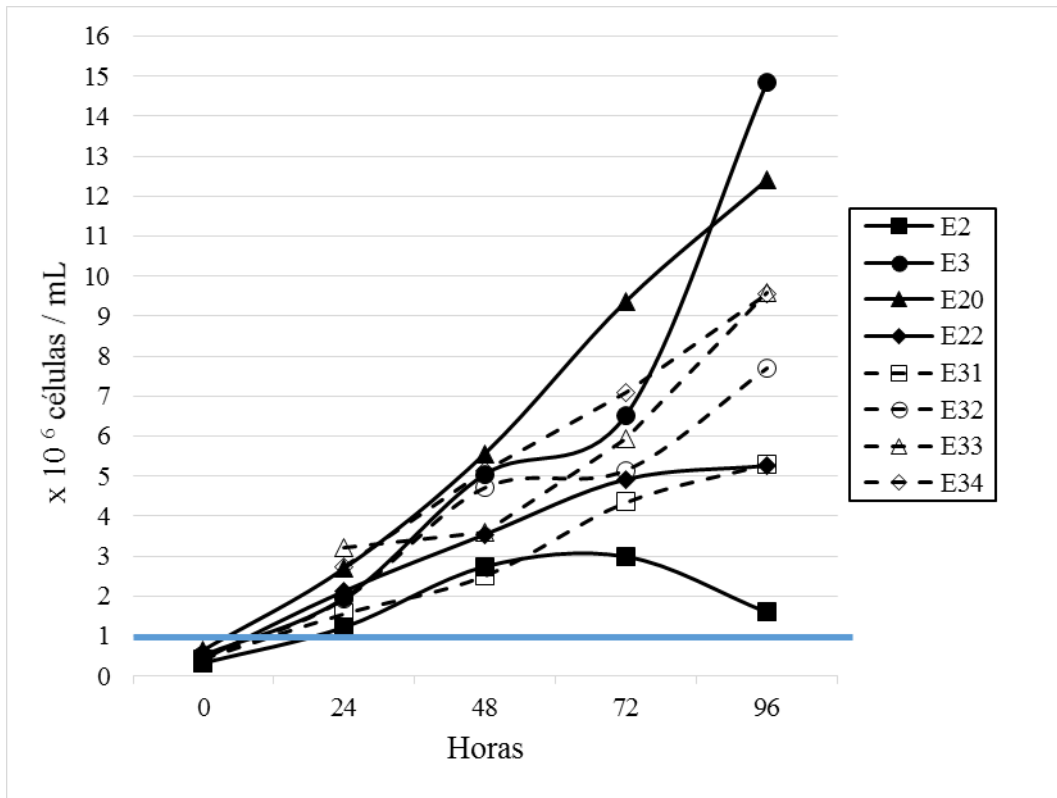
Estaciones de muestreo	Marzo	Agosto	Inhibición de C <sub>5</sub>	Resultado
	<i>p</i> value	<i>p</i> value		
E2	0,000*	-	<i>Sí</i>	<i>Multiconcentración / -</i>
E3	0,017*	0,005*	<i>Sí</i>	<i>Multiconcentración</i>
E4	-	0,924	<i>No</i>	<i>No tóxico</i>
E5	-	0,016*	<i>No</i>	<i>No tóxico</i>
E9	-	0,055	<i>No</i>	<i>No tóxico</i>
E12	-	0,054	<i>No</i>	<i>No tóxico</i>
E14	-	0,787	<i>No</i>	<i>No tóxico</i>
E17	-	0,874	<i>No</i>	<i>No tóxico</i>
E20	0,384	0,067	<i>No</i>	<i>No tóxico</i>
E22	0,071	0,002*	<i>No / Sí</i>	<i>- / Multiconcentración</i>
E31	0,112**	-	<i>No</i>	<i>No tóxico</i>
E32	0,011*	-	<i>Sí</i>	<i>Multiconcentración</i>
E33	0,015*	-	<i>Sí</i>	<i>Multiconcentración</i>
E34	0,025*	0,000*	<i>No / No</i>	<i>No tóxico</i>

\*= Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), prueba-T de Student

\*\*= Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), Test de U de Mann-Whitney

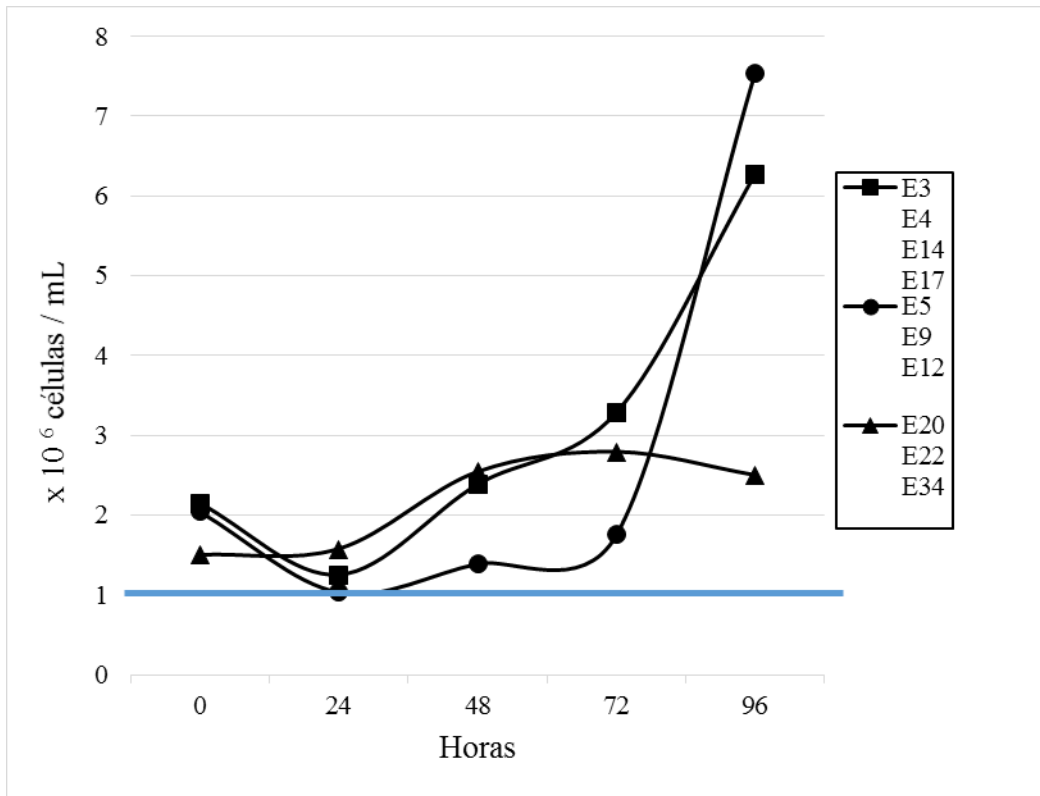
#### 4.2.1.2 Prueba con *Nannochloropsis oceanica*

Para el control negativo (0 por ciento de elutriado) en marzo, la tasa de crecimiento de esta microalga varió entre 0,39 y 0,84 d<sup>-1</sup> (Anexo 8). En promedio el crecimiento algal creció 16 veces al cabo de las 96 horas. Siendo el control negativo de la estación E2 la que presentó el menor crecimiento, 5 veces más, mientras que la estación E3 mostró el mayor crecimiento, 29 veces más, al cabo de 96 horas (Figura 22). La densidad microalgal de todos los controles negativos cumplieron con el criterio de aceptabilidad al cabo de las 96 horas ( $\geq 1 \times 10^6$  cél/mL).



**Figura 22.** Crecimiento celular promedio (células/mL) de *Nannochloropsis oceanica* en el control negativo a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de exposición a las pruebas de toxicidad con sedimento marino de las estaciones de muestreo de la Bahía Tortugas-Casma muestreadas en marzo del 2016. Línea azul: Criterio de aceptabilidad  $\geq 1 \times 10^6$  cél/mL.

La tasa de crecimiento de esta microalga, en el control negativo en agosto, fluctuó entre 0,13 y 0,33  $d^{-1}$ , (Anexo 9). Este crecimiento algal del control negativo en promedio se triplicó. Siendo los controles negativos de las estaciones E20, E22 y E24 las de menor crecimiento algal, 2 veces más, y el control negativo de las estaciones E5, E9 y E12 aquellas que cuadruplicaron el valor de la densidad inicial al cabo de las 96 horas. Además, todas las estaciones presentaron crecimiento exponencial a excepción de los controles negativos de E20, E22 y E34 que a las 96 horas empezaron a decrecer, pero aún así cumplieron con el criterio de aceptabilidad (Figura 23).



**Figura 23.** Crecimiento celular promedio (células/mL) de *Nannochloropsis oceanica* en el control negativo a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de exposición a las pruebas de toxicidad con sedimento marino de las estaciones de muestreo de la Bahía Tortugas-Casma muestreadas en agosto del 2016. Línea azul: Criterio de aceptabilidad  $\geq 1 \times 10^6$  cél/mL.

En la tabla 13, se muestran las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) del crecimiento de *Nannochloropsis oceanica* en las muestras del control negativo a las 24 y 96 horas. Siendo en marzo, las estaciones E2 y E33 y en agosto, las estaciones E20, E22 y E34 las que no presentaron diferencias significativas en el crecimiento microalgal, es decir que los controles negativos de estas estaciones no presentaron crecimiento significativo al cabo de las 96 horas, pero si cumplieron el criterio de aceptabilidad.

**Tabla 13. Resultados de las pruebas preliminares con *Isochrysis galbana* para las estaciones de muestreo de la Bahía Tortugas-Casma, muestreadas en marzo y agosto del 2016.**

Estaciones de muestreo	Marzo	Agosto	Criterio de aceptabilidad ( $\geq 1 \times 10^6$ cél/mL)
	<i>p</i> value	<i>p</i> value	
E2	0,136	-	Sí
E3	0,028*	0,008*	Sí
E4	-	0,008*	Sí
E5	-	0,030**	Sí
E9	-	0,030**	Sí
E12	-	0,030**	Sí
E14	-	0,008*	Sí
E17	-	0,008*	Sí
E20	0,009*	0,117	Sí
E22	0,030**	0,117	Sí
E31	0,008*	-	Sí
E32	0,034*	-	Sí
E33	0,518	-	Sí
E34	0,002*	0,117	Sí

\*= Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), prueba-T de Student

\*\*= Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), Prueba U de Mann-Whitney

En la Tabla 14, se presentan las estaciones de muestreo que presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el control negativo ( $C_0$ ) y el 100 por ciento de sedimento marino ( $C_5$ ) en marzo y agosto respecto a las pruebas realizadas con la microalga *Nannochloropsis oceanica*.

La estación 32 presentó diferencias significativas respecto al control negativo en marzo, en esta estación el crecimiento algal de  $C_5$  se inhibió respecto al control negativo, pero debido a falta de muestra de sedimento no se pudo realizar la prueba multiconcentración de este punto de muestreo. Mientras que en la estación E31 en el mes de marzo y las estaciones E20 y E22, en agosto, también hubo diferencias significativas pero el crecimiento algal de  $C_5$  fue mayor que  $C_0$ ; por lo tanto, no se considero para realizar multiconcentración (Tabla 14).

**Tabla 14. Resultados de las pruebas preliminares con *Nannochloropsis oceanica* para las estaciones de muestreo de la Bahía Tortugas-Casma, muestreadas en marzo y agosto del 2016.**

Estaciones de muestreo	Marzo	Agosto	Inhibición de C <sub>5</sub>	Resultado
	<i>p</i> value	<i>p</i> value		
E2	0,103	-	No	No tóxico
E3	0,915	0,746	No	No tóxico
E4	-	0,909	No	No tóxico
E5	-	0,213	No	No tóxico
E9	-	0,117	No	No tóxico
E12	-	0,249	No	No tóxico
E14	-	0,857	No	No tóxico
E17	-	0,763	No	No tóxico
E20	0,587	0,001*	- / No	No tóxico
E22	0,904	0,002*	- / No	Multiconcentración <sup>+</sup>
E31	0,025*	-	No / -	No tóxico
E32	0,035*	-	Sí	Multiconcentración <sup>+</sup>
E33	0,194	-	No	No tóxico
E34	0,646	0,199	No	No tóxico

\*= Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), prueba-T de Student

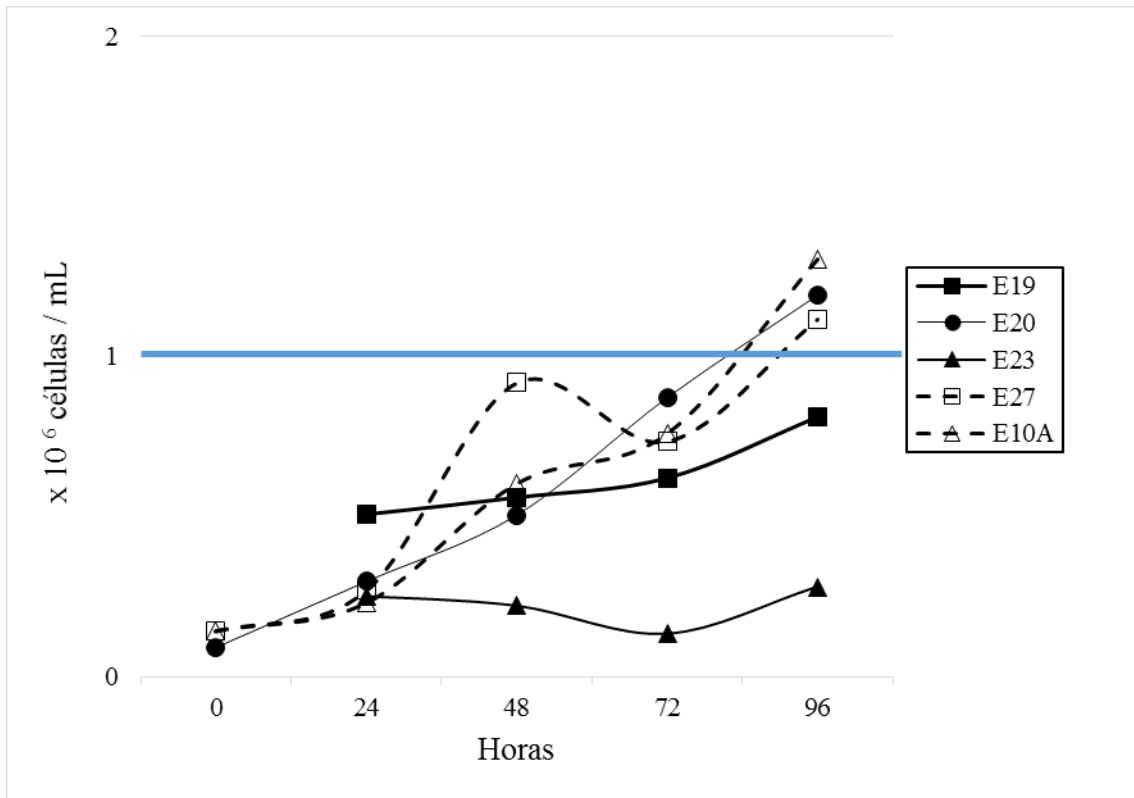
\*\*= Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), Test de U de Mann-Whitney

<sup>+</sup> = No se pudo realizar la prueba de multiconcentración por falta de muestra de sedimento

## 4.2.2 Bahía Paracas

### 4.2.2.1 Pruebas con *Isochrysis galbana*

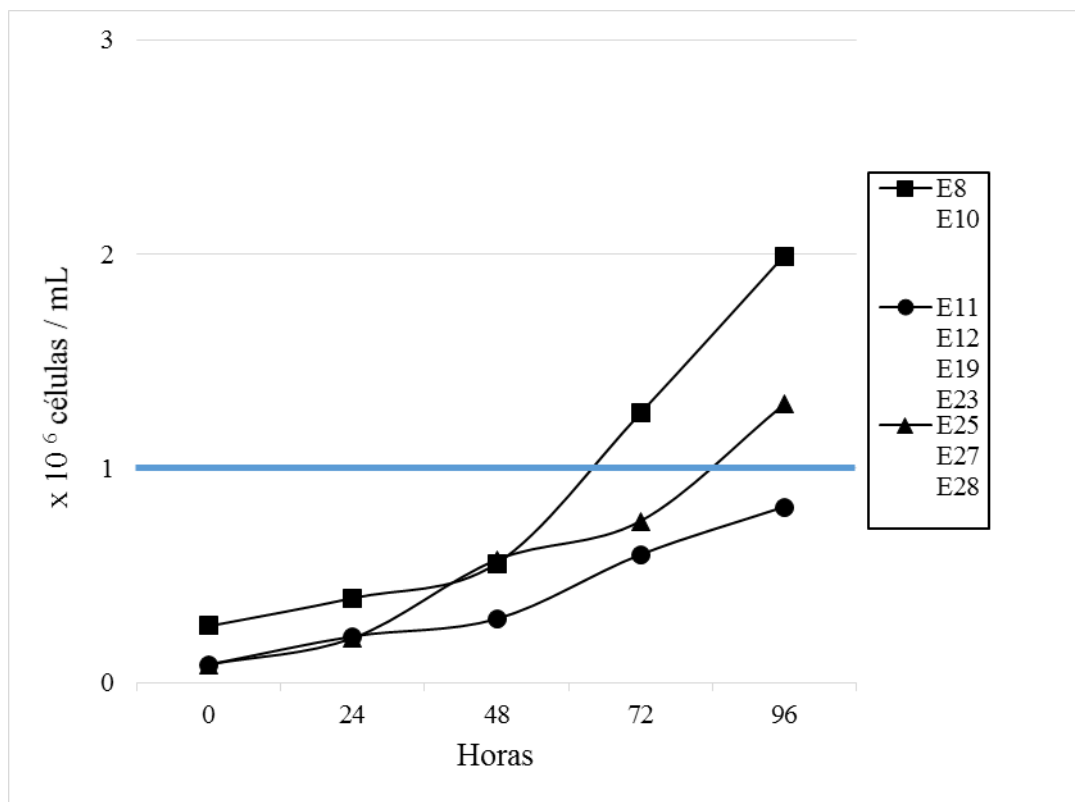
En abril, la tasa de crecimiento de esta microalga durante las pruebas de toxicidad preliminares realizadas fluctuó entre 0,23 y 0,64 d<sup>-1</sup> (Anexo 10). La densidad microalgal de los controles negativos al cabo de las 96 horas fue en su mayoría 8 veces más que la densidad inicial (Figura 24). Todas las estaciones de muestreo presentaron crecimiento continuo dentro de las 96 horas, pero la estación E27 presentó un decrecimiento a las 72 horas recuperándose nuevamente al cabo de las 96 horas. Las estaciones E19 y E23 no cumplieron con el criterio de aceptabilidad.



**Figura 24.** Crecimiento celular promedio (células/mL) de *Isochrysis galbana* en el control negativo a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de exposición a las pruebas de toxicidad con sedimento marino de las estaciones de muestreo de la Bahía Paracas muestreadas en abril de 1 2016. Línea azul: Criterio de aceptabilidad  $\geq 1 \times 10^6$  cél/mL.

En setiembre, la tasa de crecimiento de esta microalga durante las pruebas de toxicidad realizadas fluctuó entre 0,33 y 0,46  $d^{-1}$ , (Anexo 11). En la Figura 25, se puede observar que el crecimiento algal del control negativo de todas las estaciones muestreadas fue exponencial, cumpliendo al cabo de las 96 horas con el criterio de aceptabilidad para pruebas de toxicidad con microalgas ( $\geq 1 \times 10^6$  cél/mL).





**Figura 25.** Crecimiento celular promedio (células/mL) de *Isochrysis galbana* en la muestra del control negativo ( $C_0$ ) a las 24, 48, 72 y 96 horas de exposición a las pruebas de toxicidad con sedimento marino de las estaciones de muestreo de la Bahía Paracas muestreadas en setiembre del 2016. Línea azul: Criterio de aceptabilidad  $\geq 1 \times 10^6$  cél/mL

En la Tabla 15 se muestra que de la E5 y E9 estaciones muestreadas en abril y setiembre, respectivamente, los controles negativos presentaron en su mayoría diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las 24 y 96 horas a excepción del control negativo de la E23 que tampoco cumplió con el criterio de aceptabilidad ( $\geq 1 \times 10^6$  cél/mL) al igual que las estaciones E11, E12 y E19.

**Tabla 15. Valores de significancia del crecimiento de *Isochrysis galbana* en la muestra del control negativo a las 24 y 96 horas de las estaciones de muestreo de la Bahía Paracas, muestreadas en abril y setiembre del 2016.**

Estaciones de muestreo	Abril	Setiembre	Criterio de aceptabilidad ( $\geq 1 \times 10^6$ cél/mL)
	<i>p</i> value	<i>p</i> value	
E8	-	0,002*	<i>Sí</i>
E10	-	0,002*	<i>Sí</i>
E11	-	0,000*	<i>No</i>
E12	-	0,000*	<i>No</i>
E19	0,028*	0,000*	<i>No</i>
E20	0,000*	-	<i>Sí</i>
E23	0,669	0,000*	<i>No</i>
E25	-	0.017*	<i>Sí</i>
E27	0,030**	0.017*	<i>Sí</i>
E28	-	0.017*	<i>Sí</i>
E10A	0,002	-	<i>Sí</i>

\*= Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), prueba-T de Student

\*\*= Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), Prueba U de Mann-Whitney

En la tabla 16, se muestra que en abril las estaciones E20, E27 y E10A y en setiembre las estaciones E8, E10, E11, E27 y E28 manifestaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) al comparar el control negativo ( $C_0$ ) y el 100 por ciento de sedimento marino ( $C_5$ ), siendo así estas estaciones las que se realizaron multiconcentración a excepción de las estaciones E8 y E11 que por falta de muestra de sedimento no se pudieron procesar. De igual manera, las estaciones E12, E19 y E23 también presentaron diferencias significativas pero la densidad microalgal de  $C_5$  fue mayor que el control negativo; por lo tanto, estas estaciones no se consideraron para realizar multiconcentración por ser no tóxicas.

**Tabla 16. Resultados de las pruebas preliminares con *Isochrysis galbana* para las estaciones de muestreo de la Bahía Paracas, muestreadas en abril y setiembre del 2016.**

Estaciones de muestreo	Abril	Setiembre	Inhibición de C <sub>5</sub>	Resultado
	<i>p</i> value	<i>p</i> value		
E8	-	0,012*	Sí	<i>Multiconcentración</i> <sup>+</sup>
E10	-	0,001*	Sí	<i>Multiconcentración</i>
E11	-	0,00*	Sí	<i>Multiconcentración</i> <sup>+</sup>
E12	-	0,049*	No	<i>No tóxico</i>
E19	0,002*	0,028*	No	<i>No tóxico</i>
E20	0,000*	-	Sí	<i>Multiconcentración</i>
E23	0,000*	0,036*	No	<i>No tóxico</i>
E25	-	0,522	No	<i>No tóxico</i>
E27	0,0304**	0,012*	Sí	<i>Multiconcentración</i>
E28	-	0,011*	Sí	<i>Multiconcentración</i>
E10A	0,001*	-	Sí	<i>Multiconcentración</i>

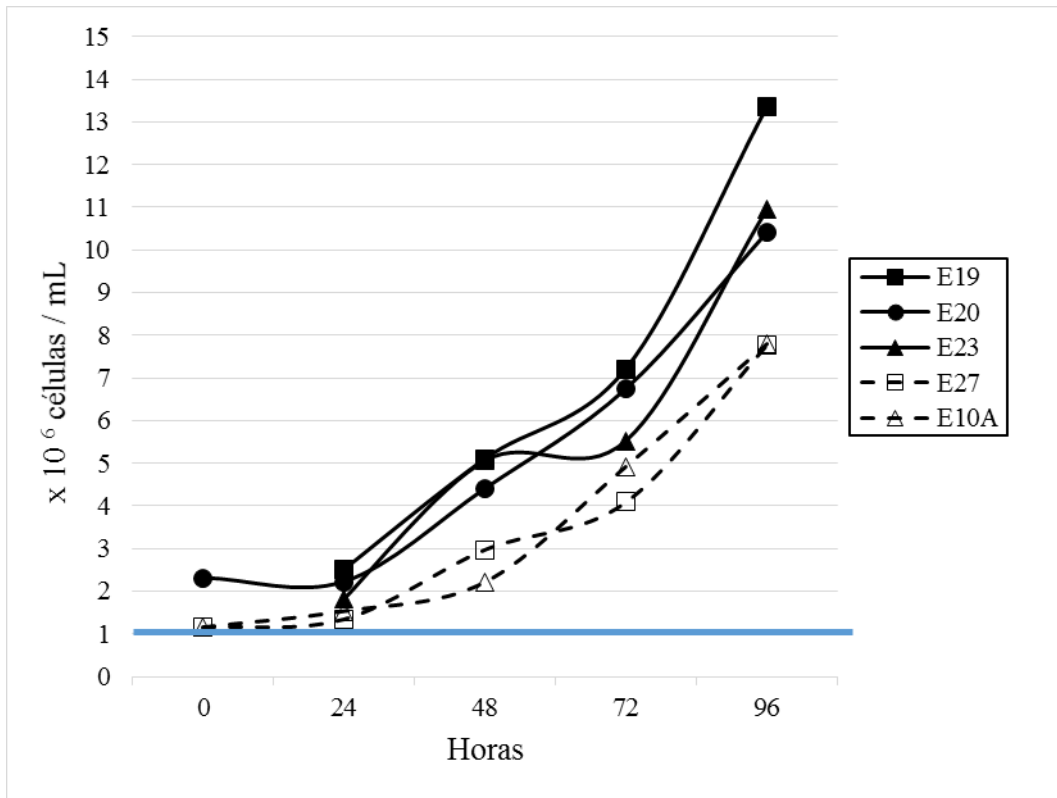
\*= Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), prueba-T de Student

\*\*= Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), Test de U de Mann-Whitney

<sup>+</sup> = No se pudo realizar la prueba de multiconcentración por falta de muestra de sedimento

#### 4.2.2.2 Prueba con *Nannochloropsis oceanica*

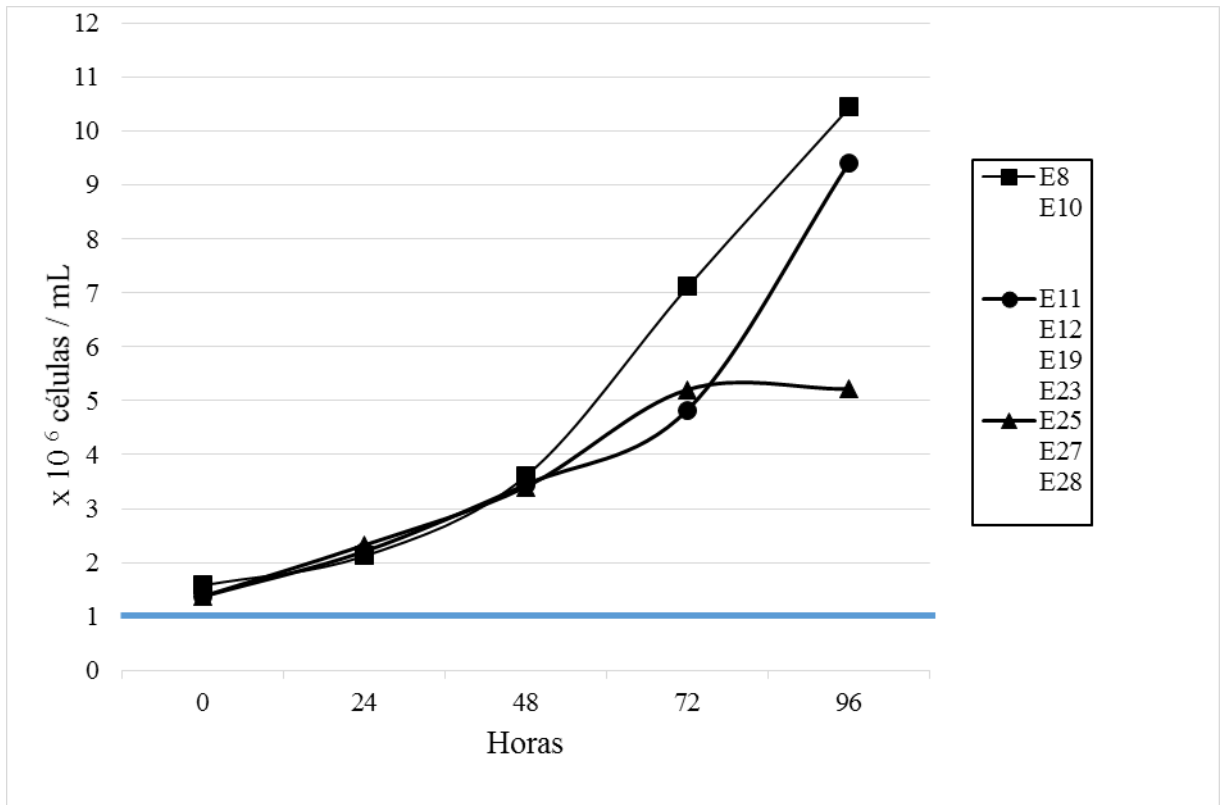
El crecimiento celular promedio de *Isochrysis galbana* de las estaciones muestreadas (E19, E20, E23, E27 y E10A) en abril tendió a ser exponencial y cumplieron con el criterio de aceptabilidad (Figura 26). La tasa de crecimiento de esta microalga durante las pruebas de toxicidad realizadas fluctuó entre 0,29 y 0,48 d<sup>-1</sup> (Anexo 12).



**Figura 26.** Crecimiento celular promedio (células/mL) de *Nannochloropsis oceanica* en la muestra control negativo a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de exposición a las pruebas de toxicidad con sedimento marino de las estaciones de muestreo de la Bahía Paracas muestreadas en abril del 2016. Línea azul: Criterio de aceptabilidad  $\geq 1 \times 10^6$  cél/mL.

Para las estaciones muestreadas en setiembre, la tasa de crecimiento de esta microalga durante las pruebas de toxicidad realizadas fluctuó entre 0,20 y 0,40  $d^{-1}$ , (Anexo 13).

Las estaciones E25, E27 y E28 mostraron fase estacionaria a partir de las 72 horas de exposición. Mientras que el resto de estaciones presentaron crecimiento exponencial durante las 96 horas. De igual manera la densidad microalgal de los controles muestreados cumplieron con el criterio de aceptabilidad (Figura 27).



**Figura 27.** Crecimiento celular promedio (células/mL) de *Nannochloropsis oceanica* en la muestra del control negativo a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de exposición a las pruebas de toxicidad con sedimento marino de las estaciones de muestreo de la Bahía Paracas muestreadas en setiembre del 2016. Línea azul: Criterio de aceptabilidad  $\geq 1 \times 10^6$  cél/mL.

El crecimiento de la microalga *Nannochloropsis oceanica* en los controles negativos del muestreo de abril y setiembre manifestaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en todas las estaciones muestreadas (Tabla 17).

**Tabla 17. Valores de significancia del crecimiento de *Nannochloropsis oceanica* en la muestra control (C<sub>0</sub>) a las 24 y 96 horas de las estaciones de muestreo de la Bahía Paracas, muestreadas en abril y setiembre del 2016.**

Estaciones de muestreo	Abril	Setiembre	Criterio de aceptabilidad ( $\geq 1 \times 10^6$ cél/mL)
	<i>p</i> value	<i>p</i> value	
E8	-	0.003*	Sí
E10	-	0.003*	Sí
E11	-	0.017*	Sí
E12	-	0.017*	Sí
E19	0.030**	0.017*	Sí
E20	0.001*	-	Sí
E23	0.001*	0.017*	Sí
E25	-	0,039*	Sí
E27	0.030**	0,039*	Sí
E28	-	0,039*	Sí
E10A	0,003*	-	Sí

\*= Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), Prueba-T de Student

\*\*= Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), Prueba U de Mann-Whitney

En la Tabla 18, se presentan las estaciones de muestreo que presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) al comparar el control (C<sub>0</sub>) y el 100 por ciento de sedimento marino (C<sub>5</sub>) de los muestreos de abril y setiembre respecto a las pruebas de toxicidad realizadas con la microalga *Nannochloropsis oceanica*.

La estación E10 muestreada en Setiembre fue la única que se consideró para realizar multiconcentración debido a que presentó inhibición de la C<sub>5</sub> en comparación con la C<sub>0</sub>. Mientras en las estaciones E19, E20, E23, E25 y E27 mostraron diferencias significativas pero la concentración C<sub>5</sub> presentó sobrecrecimiento respecto al control negativo (C<sub>0</sub>) por lo tanto resultaron no tóxicas.

**Tabla 18. Resultados de las pruebas preliminares con *Nannochloropsis oceanica* para las estaciones de muestreo de la Bahía Paracas, muestreadas en abril y setiembre del 2016.**

Estaciones de muestreo	Abril	Setiembre	Inhibición de C <sub>5</sub>	Resultado
	<i>p</i> value	<i>p</i> value		
E8	-	0,325	No	No tóxico
E10	-	0.006*	Sí	Multiconcentración
E11	-	0,483	No	No tóxico
E12	-	0,257	No	No tóxico
E19	0,665	0,006*	No	No tóxico
E20	0,057	-	No	No tóxico
E23	0,005*	0,048*	No	No tóxico
E25	-	0,021*	No	No tóxico
E27	0,194	0,026*	No	No tóxico
E28	-	0,028*	No	No tóxico
E10A	0,969	-	No	No tóxico

\*= Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), Prueba-T de Student

\*\*= Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), Test de U de Mann-Whitney

Culminando este acápite, se encontraron que los valores de la tasa de crecimiento algal halladas en las pruebas de toxicidad con *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica* están dentro de lo encontrado por Roleda et al. (2013) cuyos valores fueron  $0,451 \text{ día}^{-1}$  y  $0,481 \text{ día}^{-1}$ , respectivamente, siendo el último valor para el caso de *Nannochloropsis oculata*. Ahora bien, para el caso de tasa de crecimiento menores a los valores anteriores, Fabregas et al. (1985), mencionan que se debe a la deficiencia de nitrógeno en las células de las microalgas que no permite el crecimiento normal de las microalgas.



### 4.3 Concentración de Inhibición Media (CI<sub>50</sub>) del sedimento marino expuestos a las microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica* en las bahías Tortugas-Casma y Paracas

Se presentan la concentración de inhibición media (CI<sub>50</sub>) del elutriado de sedimento marino (expresado en porcentaje) expuesto a las microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica* de las estaciones que se realizaron multiconcentración de las zonas de estudio.

#### 4.3.1 Bahía Tortugas-Casma

En la Tabla 19 se muestran los valores de CI<sub>50</sub>, a las 96 horas, de las diferentes diluciones de concentración de sedimento marino expuestas a las microalga *Isochrysis galbana* de las estaciones de muestreo, en marzo y agosto del 2016.

**Tabla 19. Concentración de Inhibición media (CI<sub>50</sub>) del elutriado de sedimento marino, a las 96 horas, expuesto a *Isochrysis galbana*, Bahía Tortugas-Casma.**

Monitoreo	Estación de muestreo	Fecha de muestreo	CI <sub>50</sub> (%)	Límites de toxicidad	
				Límite inferior (%)	Límite superior (%)
Marzo 2016	E2	19/03/2016	4,30	3,96	4,72
	E3	20/03/2016	68,98	49,23	76,64
	E32	16/03/2016	7,97	5,24	9,98
	E33	17/03/2016	NC	NC	NC
Agosto 2016	E3	17/08/2016	75,31	NC	NC
	E22	18/08/2016	15,36	5,2	20,79

NC: No calculable

#### 4.3.1.1 Marzo del 2016

##### A.1 Estación de muestreo E2

##### a. Concentración de Inhibición media (CI<sub>50-96h</sub>)

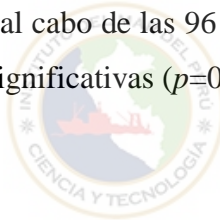
El valor medio de CI<sub>50-96h</sub> de *Isochrysis galbana* que se obtuvo fue 4,30 mg/L, siendo su límite de confianza inferior 3,96 mg/L y su límite de confianza superior 4,72 mg/L, con un intervalo de confianza del 95 por ciento (Tabla 19).

En la figura 28A se observa que el porcentaje de inhibición es mayor al incrementar la concentración de sedimento marino. Además, el porcentaje de inhibición se mantuvo mayormente por encima del 50 por ciento.

**b. CI<sub>50</sub> y parámetros físicoquímicos**

Mientras pasaron las horas de exposición de *Isochrysis galbana* al elutriado de sedimento marino, esta microalga empezó a inhibirse, desde las 24 horas, a la concentración de 6,25 mg/L de sedimento marino ( $0,08 \times 10^6$  cél/mL) respecto al control negativo ( $0,26 \times 10^6$  cél/mL). Al cabo de las 96 horas la inhibición que manifestó a la concentración 6,25 mg/L fue  $0,15 \times 10^6$  cél/mL y en el control negativo la densidad fue  $0,79 \times 10^6$  cél/mL (Anexo 14).

Asimismo, los parámetros físicoquímicos fueron monitoreados durante las pruebas y mostraron que la calidad del agua fue adecuada para el crecimiento algal, (Temperatura: 19,8 - 20,4 °C; pH: 8,05 - 8,53). De los parámetros físicoquímicos registrados al inicio y comparados con los registrados al cabo de las 96 horas (Anexo 18), la temperatura es el único que presentó diferencias significativas ( $p=0,031$ ) (Anexo 19).



**A.2 Estación de muestreo E3**

**a. Concentración de Inhibición media (CI<sub>50-96h</sub>)**

El valor medio del CI<sub>50-96h</sub> de *Isochrysis galbana* fue 68,98 mg/L, siendo su límite de confianza inferior 49,23 mg/L y su límite de confianza superior 76,64 mg/L, con un intervalo de confianza del 95 por ciento. Aparte, se observa que el valor de CI<sub>50</sub> no presenta disminución alguna durante el tiempo de exposición (Tabla 19).

Asimismo, en la figura 28B, se muestra que el porcentaje de inhibición en su mayoría se mantiene por debajo del 50 por ciento, incluso con valores negativos que estarían indicando que el crecimiento algal de la concentración 6,25 mg/L de sedimento marino fue mayor que el control negativo al cabo de las 96 horas.

**b. CI<sub>50</sub> y parámetros físicoquímicos**

Asimismo, conforme pasaron las horas de exposición de *Isochrysis galbana* al elutriado de sedimento marino, la inhibición de esta microalga empezó a las 24 horas a la concentración de 50 mg/L de sedimento marino ( $0,23 \times 10^6$  cél/mL) respecto al control negativo ( $0,54 \times 10^6$  cél/mL). De igual manera al cabo de las 96 horas el 50 por ciento de inhibición se manifestó en la concentración 100 mg/L de sedimento marino ( $0,2 \times 10^6$  cél/mL) respecto al control negativo ( $3,3 \times 10^6$  cél/mL) (Anexo 15).

Los parámetros físicoquímicos fueron monitoreados durante las pruebas y mostraron que la calidad del agua fue adecuada para el crecimiento algal, (Temperatura: 19,7 - 22,6 °C; pH: 8,04 - 8,8). Así también, de los parámetros físicoquímicos mostrados en el anexo 18, la temperatura y el pH son los que presentaron diferencias significativas ( $p=0,000$ ) y ( $p=0,001$ ), respectivamente (Anexo 19).

**A.3 Estación de muestreo E32**

**a. Concentración de Inhibición media (CI<sub>50-96h</sub>)**

Nótese en la tabla 15 que el valor medio del CI<sub>50-96h</sub> de *Isochrysis galbana* fue 7,97 mg/L, siendo su límite de confianza inferior 5,24 mg/L y su límite de confianza superior 9,98 mg/L, con un intervalo de confianza del 95 por ciento. También, se observa que el valor de CI<sub>50</sub> fue menor conforme transcurrió el tiempo de exposición (Tabla 19).

Ya en la figura 28C, se muestra que el porcentaje de inhibición en su mayoría se mantiene por encima del 50 por ciento a partir de la concentración 7,97 mg/L. Esta inhibición algal aumentó conforme la concentración de sedimento marino incrementaba.

**b. CI<sub>50</sub> y parámetros físicoquímicos**

La microalga empezó a inhibirse desde las 48 horas en la concentración de elutriado de sedimento marino de 50 mg/L ( $0,092 \times 10^6$  cél/mL) respecto al control negativo ( $0,33 \times 10^6$  cél/mL). De igual manera al cabo de las 96 horas el 50 por ciento de inhibición empieza en la concentración 12,5 mg/L ( $0,25 \times 10^6$  cél/mL) respecto del control negativo ( $1,1 \times 10^6$  cél/mL) (Anexo 16).

Los parámetros fisicoquímicos fueron monitoreados durante las pruebas y mostraron que la calidad del agua fue adecuada para el crecimiento algal, (Temperatura: 20,1 - 21,0 °C; pH: 8,1 - 9,1). De los parámetros registrados al inicio y comparados con los registrados al cabo de las 96 horas (Anexo 18), la temperatura es el único parámetro físico-químico que presentó diferencias significativas ( $p=0,006$ ) (Anexo 19).

#### **A.4 Estación de muestreo E33**

##### **a. Concentración de Inhibición media (CI<sub>50-96h</sub>)**

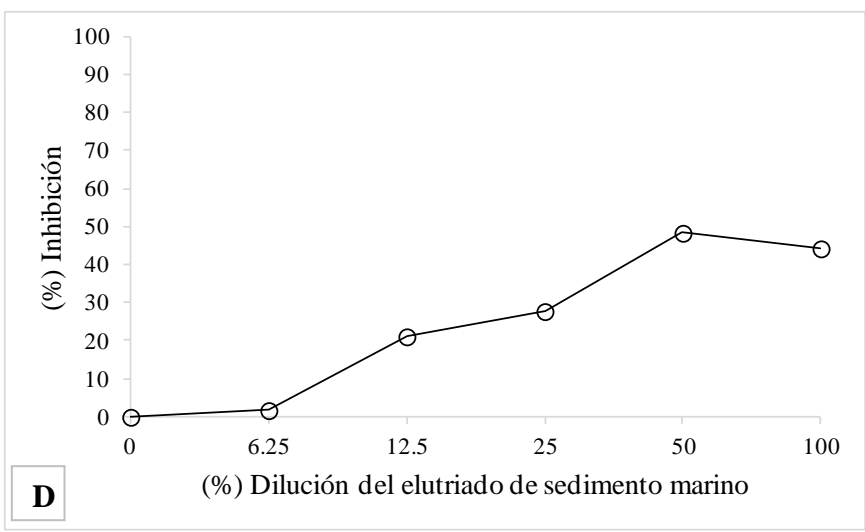
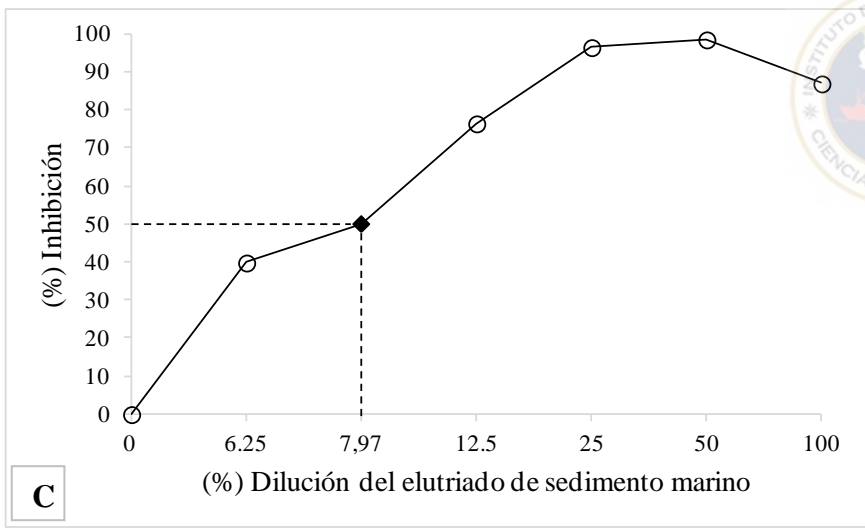
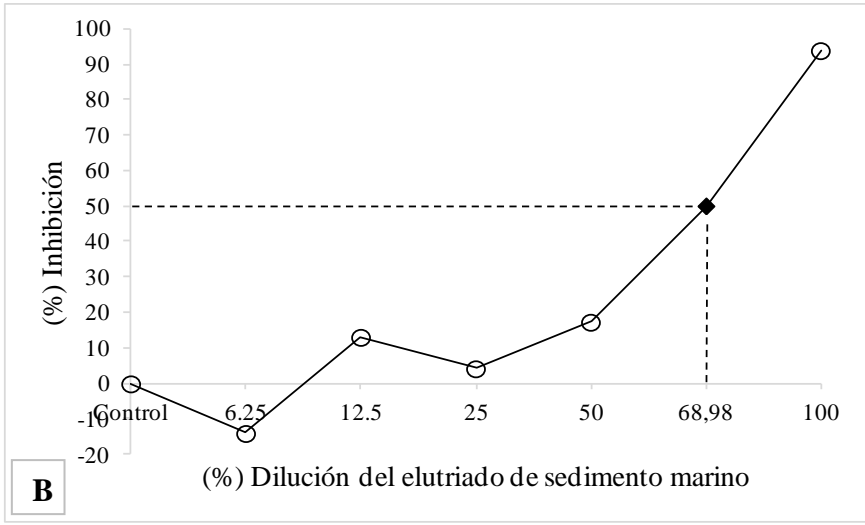
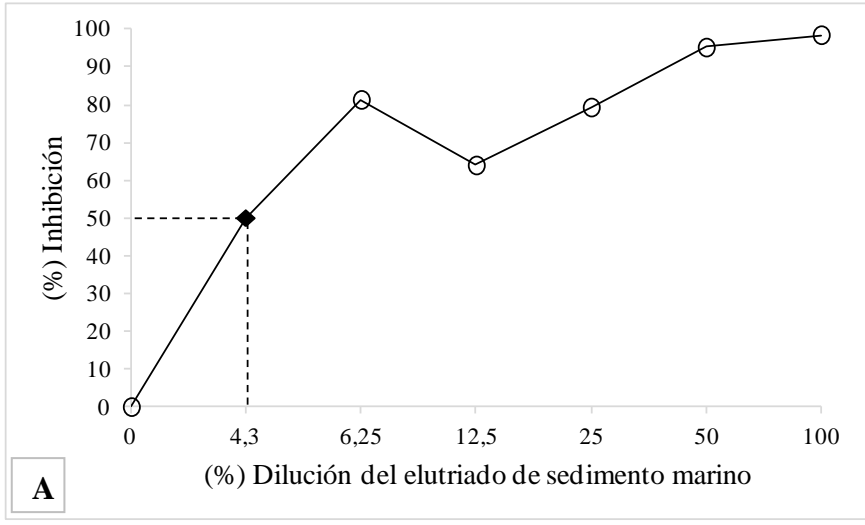
En la estación 33 no se obtuvo el valor medio del CI<sub>50-96h</sub> de *Isochrysis galbana*, este valor no es calculable (tabla 19), debido a que la inhibición no llegó al 50 por ciento sino solo al 48,5 por ciento tal como lo muestra la figura 28D.

##### **b. CI<sub>50</sub> y parámetros fisicoquímicos**

Conforme pasaron las horas de exposición de *Isochrysis galbana* al sedimento marino, no se observó inhibición más del 50 por ciento de la densidad algal de *Isochrysis galbana* respecto al control (Anexo 17).

Los parámetros fisicoquímicos fueron monitoreados durante las pruebas y mostraron que la calidad del agua fue adecuada para el crecimiento algal, (Temperatura: 19,2 - 20,5 °C; pH: 8,24 - 9,4). Así también, de los parámetros registrados al inicio y comparados con los registrados al cabo de las 96 horas (Anexo 18), la temperatura, oxígeno disuelto y pH, son los parámetros fisicoquímicos que presentaron diferencias significativas ( $p=0,001$ ), ( $p=0,051$ ), ( $p=0,002$ ), respectivamente (Anexo 19).

Estadísticamente, la densidad del control negativo ( $C_0$ ) y del 100 por ciento de dilución del elutriado de sedimento marino ( $C_5$ ) a las 96 horas de las estaciones E2, E3, E32 y E33 presentaron diferencias significativas ( $p =0,000$ ;  $p =0,017$ ;  $p =0,011$  y  $p =0,015$ , respectivamente). De igual manera existen diferencias significativas del control negativo a las 24 y 96 horas presentando valores de  $p<0,05$  (Anexo 20) lo que confirma un crecimiento exponencial de la microlaga *Isochrysis galbana* (Anexo 14, 15, 16 y 17). De la misma manera, a partir de los resultados se observa que existen diferencias significativas de las densidades medias a las 96 horas para cada tratamiento (concentraciones de sedimento marino) ( $p<0,05$ ) (Anexo 21).



**Figura 28. Porcentaje de inhibición en función del porcentaje de dilución de elutriado de sedimento marino y estimación de  $CI_{50-96h}$  para *Isochrysis galbana* de las estaciones en Bahía Tortugas-Casma: (A) E2, (B) E3, (C) E32 y (D) E33 en marzo 2016.**

#### **4.3.1.2 Agosto del 2016**

##### **A.1 Estación de muestreo E3**

###### **a. Concentración de Inhibición media (CI<sub>50-96h</sub>)**

El valor medio del CI<sub>50-96h</sub> de *Isochrysis galbana* fue 75,31 mg/L, los límites de confianza inferior y superior son no calculables con un intervalo de confianza del 95 por ciento (Tabla 19).

Asimismo, en la figura 29A, se muestra que el porcentaje de inhibición se mantiene mayormente debajo del 50 por ciento de inhibición, incluso con valores negativos que estarían indicando que el crecimiento algal de la concentración 6,25 mg/L de sedimento marino fue mayor que el control.

###### **b. CI50 y parámetros físicoquímicos**

La variación de la densidad diaria de la microalga muestra que a las 96 horas de la concentración 6,25 mg/L ( $4,4 \times 10^6$  cel/mL) es mayor que la obtenida en el control negativo ( $3,6 \times 10^6$  cel/mL). Además, la inhibición más marcada se da entre las concentraciones 50 mg/L ( $2,4 \times 10^6$  cel/mL) y 100 mg/L ( $1,6 \times 10^6$  cel/mL) al cabo de las 96 horas (Anexo 22).

Los parámetros físicoquímicos fueron monitoreados durante las pruebas y mostraron que la calidad del agua fue adecuada para el crecimiento algal, (Temperatura: 21,1 - 22,9 °C; pH: 8,1 - 9,3). De los parámetros registrados al inicio y comparados con los registrados al cabo de las 96 horas (Anexo 24), la temperatura, oxígeno disuelto, y pH son los parámetros físicoquímicos que presentaron diferencias significativas ( $p=0,005$ ), ( $p=0,000$ ), ( $p=0,000$ ), respectivamente (Anexo 25).

##### **A.2 Estación de muestreo E22**

###### **a. Concentración de Inhibición media (CI<sub>50-96h</sub>)**

El valor medio del CI<sub>50-96h</sub> de *Isochrysis galbana* fue 15,36 mg/L, con los límites de confianza inferior de 5,20 mg/L y superior de 20,79 mg/L con un intervalo de confianza del 95 por ciento (Tabla 19).

Asimismo, en la figura 29B, se muestra que el porcentaje de inhibición al cabo de las 96 horas se mantiene en promedio en 65 por ciento. Asimismo, se observa que partir de la concentración 15,36 mg/L el porcentaje de inhibición está por encima del 50 por ciento. En

todo momento la densidad algal del control fue mayor que la densidad algal de las demás concentraciones de sedimento marino.

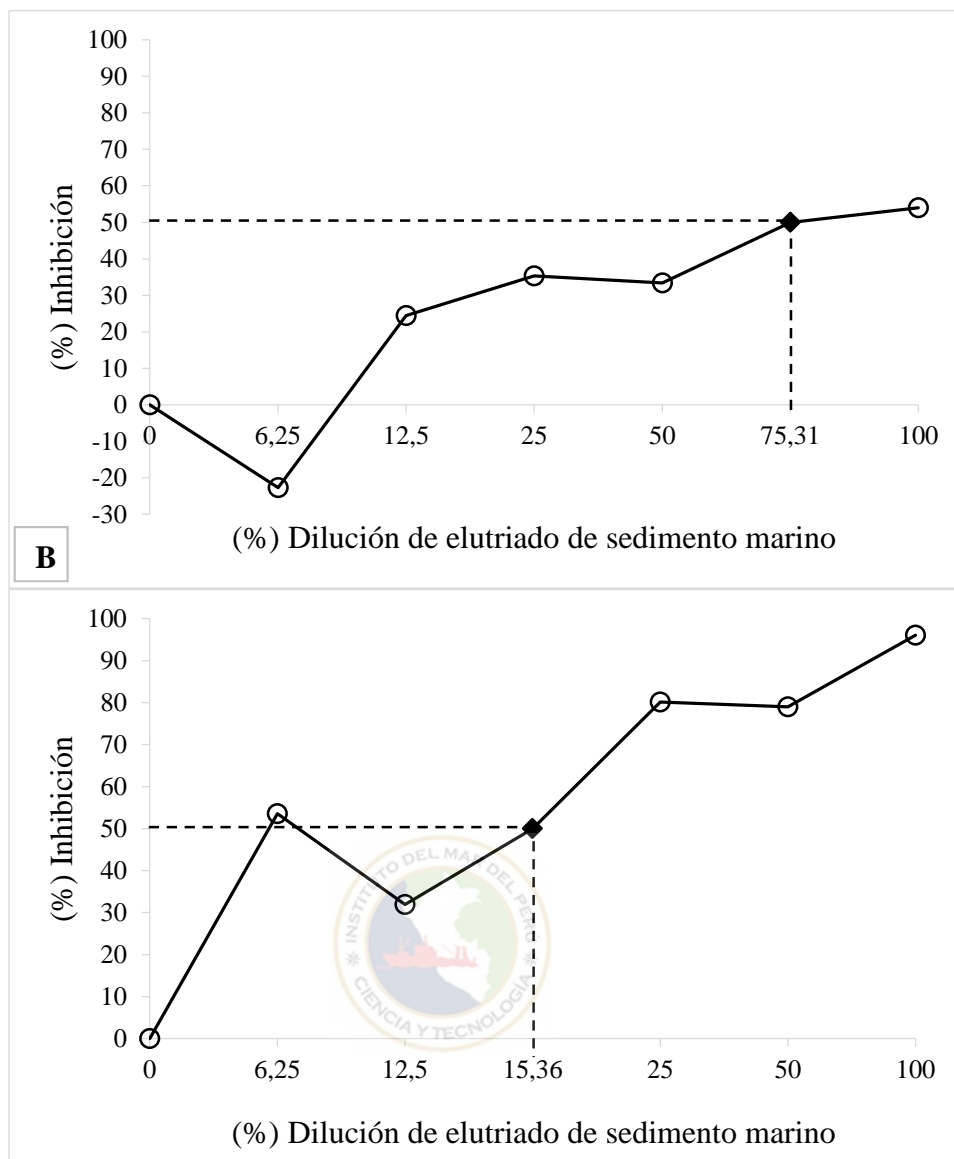
**b. CI<sub>50</sub> y parámetros fisicoquímicos**

En el anexo 23, se muestra que el 50 por ciento de la densidad de *Isochrysis galbana* se empieza a inhibir respecto del control ( $5,0 \times 10^5$  cel/mL) a partir de las 24 horas a la concentración de 100 mg/L ( $2,4 \times 10^5$  cel/mL) pero al cabo de las 96 horas entre 12,5 mg/L ( $4,0 \times 10^6$  cel/mL) y 25 mg/L ( $1,2 \times 10^6$  cel/mL) la inhibición se hace más notoria respecto al control negativo ( $5,9 \times 10^6$  cel/mL).

Los parámetros fisicoquímicos fueron monitoreados durante las pruebas y mostraron que la calidad del agua fue adecuada para el crecimiento algal, (Temperatura: 21,9 - 22,9 °C; pH: 7,94 - 9,3). De los parámetros registrados al inicio y comparados con los registrados al cabo de las 96 horas (Anexo 31), la temperatura, oxígeno disuelto, pH, conductividad y salinidad son los parámetros físicoquímicos que presentaron diferencias significativas ( $p=0,045$ ), ( $p=0,000$ ), ( $p=0,000$ ), ( $p=0,0080$ ) y ( $p=0,008$ ), respectivamente (Anexo 32).

Estadísticamente, la densidad del control negativo ( $C_0$ ) y del 100 por ciento de dilución del elutriado de sedimento marino ( $C_5$ ) a las 96 horas en las estaciones E3 y E22 presentaron diferencias significativas ( $p = 0,014$  y  $p = 0,016$ , respectivamente). De igual manera existen diferencias significativas del control a las 24 y 96 horas presentando valores de  $p < 0,05$  (Anexo 26) lo que confirma un crecimiento exponencial de la microlaga *Isochrysis galbana* (Anexo 22 y 23). De la misma manera, a partir de los resultados que se muestran en el anexo 27 se demuestra que existen diferencias significativas de las densidades medias a las 96 horas para cada tratamiento (concentraciones de sedimento marino) ( $p < 0,05$ ).





**Figura 29. Porcentaje de inhibición en función del porcentaje de dilución de elutriado de sedimento marino y estimación de  $CI_{50-96h}$  para *Isochrysis galbana* en Bahía Tortugas-Casma de las estaciones: (A) E2, (B) E22 en agosto del 2016.**

#### 4.3.2 Bahía Paracas

Las estaciones que se realizaron multiconcentración se muestran en la tabla 20 donde se observan los valores de  $CI_{50}$  con sus respectivos límites de confianza, obtenidos a las 96 horas de exposición de la microalga *Isochrysis galbana* a diferentes concentraciones de elutriado de sedimento marino y en la tabla 21 se muestra el  $CI_{50}$  en el muestreo con sus

respectivos límites de confianza, obtenidos a las 96 horas de exposición de la microalga *Nannochloropsis oceanica* muestreadas en abril y setiembre del 2016.

**Tabla 20. Concentración de Inhibición media (CI<sub>50-96</sub>) del elutriado de sedimento marino, a las 96 horas, expuesto a *Isochrysis galbana*, Bahía Paracas.**

Monitoreo	Estación de muestreo	Fecha de muestreo	CI <sub>50</sub> (%)	Límites de toxicidad	
				Límite inferior (%)	Límite superior (%)
Abril 2016	E20	21/04/2016	77,15	61,97	79,82
	E27	20/04/2016	4,76	NC	NC
	E10A	20/04/2016	5,37	4,63	23,61
Setiembre 2016	E10	26/09/2016	35,94	33,30	37,71
	E27	27/09/2016	22,15	11,67	25,10
	E28	27/09/2016	22,63	NC	NC

NC: No calculable

**Tabla 21. Concentración de Inhibición media (CI<sub>50-96</sub>) del elutriado de sedimento marino, a las 96 horas, expuesto a *Nannochloropsis oceanica*, Bahía Paracas.**

Monitoreo	Estación de muestreo	Fecha de muestreo	CI <sub>50</sub> (%)	Límites de toxicidad	
				Límite inferior (%)	Límite superior (%)
Setiembre 2016	E10	26/09/2016	NC	23,51	74,58

NC: No calculable

#### 4.3.2.1. Abril del 2016

##### A.1 Estación de muestreo 20

##### a. Concentración de Inhibición media (CI<sub>50-96h</sub>)

El valor medio del CI<sub>50-96h</sub> de *Isochrysis galbana* fue 77,15 mg/L, con los límites de confianza inferior de 61,97 mg/L y superior de 79,82 mg/L con un intervalo de confianza del 95 por ciento (Tabla 20).

Asimismo, en la figura 30A, se muestra que el porcentaje de inhibición en su mayoría se mantuvo por debajo del 50 por ciento y al cabo de las 96 horas en promedio fue 31 por ciento.

**b. CI<sub>50</sub> y parámetros físicoquímicos**

En el anexo 28, se muestra que el 50 por ciento de la densidad de *Isochrysis galbana* se empieza a inhibir respecto del control negativo ( $2,9 \times 10^5$  cel/mL) a partir de las 24 horas en la concentración 50 mg/L de sedimento marino ( $1,4 \times 10^5$  cel/mL) pero al cabo de las 96 horas a la concentración de 100 mg/L de sedimento marino ( $2,4 \times 10^5$  cel/mL) la inhibición se manifestó más respecto al control negativo ( $1,2 \times 10^6$  cel/mL).

Los parámetros físicoquímicos fueron monitoreados durante las pruebas y mostraron que la calidad del agua fue adecuada para el crecimiento algal, (Temperatura: 19,1 - 20,1 °C; pH: 8,2 - 9,9). Es así que de los parámetros registrados al inicio y comparados con los registrados al cabo de las 96 horas (Anexo 31), la temperatura y pH presentaron diferencias significativas ( $p=0,020$ ) y ( $p=0,417$ ) respectivamente (Anexo 32).

**A.2 Estación de muestreo E27**

**a. Concentración de Inhibición media (CI<sub>50-96h</sub>)**

El valor medio del CI<sub>50-96h</sub> de *Isochrysis galbana* fue 4,76 mg/L, los límites inferior y superior no se pudieron calcular en un intervalo de confianza del 95 por ciento debido a que salen fuera del margen de los porcentajes de inhibición (Tabla 20).

Asimismo, en la figura 30B, se muestra que el porcentaje de inhibición mayormente se mantuvo por encima del 50 por ciento de inhibición, exceptuando lo que se observa en la concentración de sedimento del 100 por ciento en la que la densidad algal es mayor que la obtenida en la muestra control.

**b. CI<sub>50</sub> y parámetros físicoquímicos**

En el anexo 29, se muestra que el 50 por ciento de la densidad de *Isochrysis galbana* se empezó a inhibir respecto del control negativo ( $9,2 \times 10^5$  cel/mL) a partir de las 48 horas en la concentración de 6,25 mg/L ( $1,2 \times 10^5$  cel/mL) pero al cabo de las 96 horas a la concentración de 100 mg/L de sedimento marino ( $1,7 \times 10^6$  cel/mL) se observó un mayor crecimiento respecto a la muestra control negativo ( $1,1 \times 10^6$  cel/mL).

Los parámetros físicoquímicos fueron monitoreados durante las pruebas y mostraron que la calidad del agua fue adecuada para el crecimiento algal, (Temperatura: 19,7 - 19,9 °C; pH: 8,15 - 8,8). De los parámetros registrados al inicio y comparados con los registrados al

cabo de las 96 horas (Anexo 31), solo el oxígeno disuelto ( $p=0,031$ ) presentó diferencias significativas (Anexo 32).

### **A.3 Estación de muestreo E10A**

#### **a. Concentración de Inhibición media (CI<sub>50-96h</sub>)**

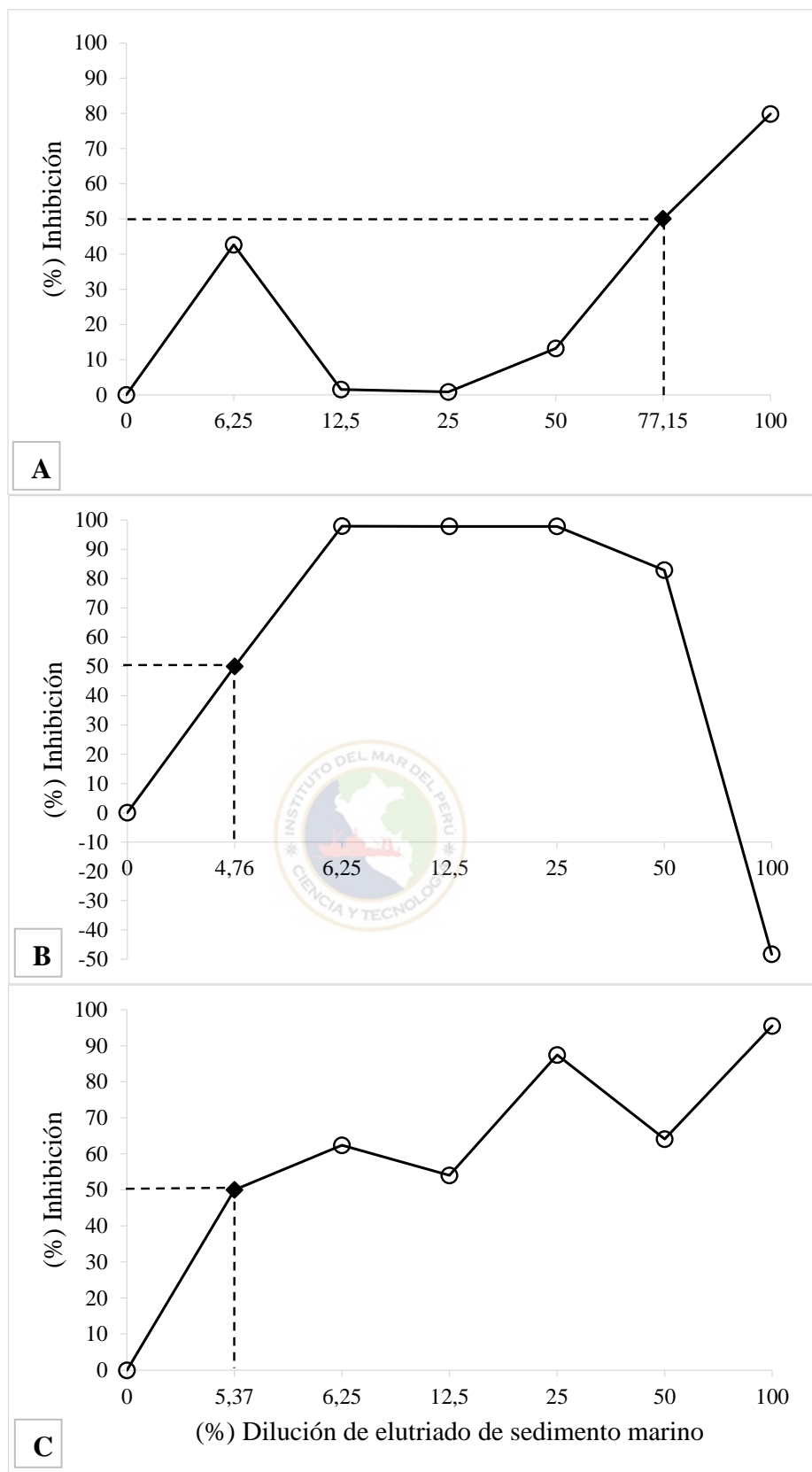
El valor medio del CI<sub>50-96h</sub> de *Isochrysis galbana* fue 5,37 mg/L, siendo el límite inferior 4,63 mg/L y el límite superior 23,61 mg/L con un intervalo de confianza del 95 por ciento (Tabla 20). Asimismo, en la figura 30C, se muestra que el porcentaje de inhibición mayormente se mantuvo por encima del 50 por ciento de inhibición, desde la concentración 5,4 mg/L.

#### **b. CI<sub>50</sub> y parámetros físicoquímicos**

En el anexo 30, se observa que a partir de la concentración 6,25 mg/L se nota que la densidad algal disminuye. Además, se muestra que la inhibición al 50 por ciento respecto al control empieza a partir de las 48 horas en la concentración de sedimento de 25 mg/L ( $1,7 \times 10^5$  cel/mL) y al cabo de las 96 horas esta inhibición se pronunció más desde la concentración 6,25 mg/L ( $0,13 \times 10^6$  cel/mL) respecto a la muestra control ( $1,77 \times 10^6$  cel/mL).

Los parámetros físicoquímicos fueron monitoreados durante las pruebas y mostraron que la calidad del agua fue adecuada para el crecimiento algal, (Temperatura: 18,8 - 19,8 °C; pH: 8,14 - 8,7). De los parámetros registrados al inicio y comparados con los registrados al cabo de las 96 horas (Anexo 31), el oxígeno disuelto ( $p=0,044$ ), pH ( $p=0,000$ ), conductividad ( $p=0,022$ ) y salinidad ( $p=0,005$ ) presentaron diferencias significativas (Anexo 32).

La densidad del control ( $C_0$ ) y del 100 por ciento de dilución del elutriado de sedimento marino ( $C_5$ ) a las 96 horas de las estaciones E20, E27 y 10A presentaron diferencias significativas ( $p=0,000$ ;  $p=0,03$  y  $p=0,002$ , respectivamente). De igual manera existen diferencias significativas del control a las 24 y 96 horas presentando valores de  $p < 0,05$  (Anexo 33) lo que confirma un crecimiento exponencial de la microlaga *Isochrysis galbana* (Anexo 28, 29 y 30). De la misma manera, a partir de los resultados que se muestran en el anexo 34 se demuestra que existen diferencias significativas de las densidades medias a las 96 horas para cada tratamiento (concentraciones de sedimento marino) ( $p < 0,05$ ).



**Figura 30. Porcentaje de inhibición en función del porcentaje de dilución de elutriado de sedimento marino y estimación de  $CI_{50-96h}$  para *Isochrysis galbana* de las estaciones (A) E20, (B) E27 y (C) E10A en abril del 2016.**

#### 4.3.2.2. Setiembre 2016

##### A.1 Estación de muestreo E10

###### a. Concentración de Inhibición media (CI<sub>50-96h</sub>)

El valor medio del CI<sub>50-96h</sub> de *Isochrysis galbana* fue 35,94 mg/L, siendo el límite de confianza inferior 33,3 mg/L y su límite de confianza superior 37,71 mg/L con un intervalo de confianza del 95 por ciento (Tabla 20).

En la figura E31A, se observa que el porcentaje de inhibición en su mayoría se mantuvo por debajo del 50 por ciento de inhibición y que mayormente este porcentaje de inhibición es mayor al incrementar la concentración de sedimento marino excepto en la concentración de 25 mg/L que la densidad algal fue mayor que el control negativo.

###### b. CI<sub>50</sub> y parámetros físicoquímicos

En el anexo 35, se observa que *Isochrysis galbana* tiene crecimiento exponencial en la muestra control. En la concentración 25 mg/L ( $2,5 \times 10^6$  cel/mL), se muestra que la densidad de *Isochrysis galbana* es mayor que la obtenida en el control ( $2,2 \times 10^6$  cel/mL). Además, en la concentración 50 mg/L ( $0,22 \times 10^6$  cel/mL) la densidad se inhibió más del 50 por ciento al cabo de las 96 horas.

Los parámetros físicoquímicos fueron monitoreados durante las pruebas y mostraron que la calidad del agua fue adecuada para el crecimiento algal, (Temperatura: 17,8 - 26,3 °C; pH: 7,78 - 8,9). De los parámetros físicoquímicos registrados al inicio y comparados con los registrados al cabo de las 96 horas (Anexo 41), la temperatura ( $p=0,005$ ), el oxígeno disuelto ( $p =0,003$ ), pH ( $p =0,002$ ) y conductividad ( $p =0,005$ ) son los que presentaron diferencias significativas (Anexo 42).

##### A.2 Estación de muestreo E27

###### a. Concentración de Inhibición media (CI<sub>50-96h</sub>)

El valor medio del CI<sub>50-96h</sub> de *Isochrysis galbana* fue 22,15 mg/L, siendo el límite de confianza inferior 11,67 mg/L y su límite de confianza superior 25,10 mg/L con un intervalo de confianza del 95 por ciento. De igual manera, se observa que el valor de CI<sub>50</sub> disminuyó al aumentar el tiempo de exposición (tabla 16).

En la figura 31B, se observa que el porcentaje de inhibición mayormente se mantuvo por encima del 50 por ciento de inhibición. En la concentración 6,25 mg/L el porcentaje de

inhibición es negativo debido a que la densidad de *Isochrysis galbana* es mayor ( $3,5 \times 10^6$  cel/L) que la muestra control ( $3,3 \times 10^6$  cel/L).

**b. CI<sub>50</sub> y parámetros físicoquímicos**

En el anexo 39, se muestra que el 50 por ciento de la densidad de *Isochrysis galbana* se empieza a inhibir respecto del control ( $1,2 \times 10^6$  cel/mL) a partir de las 24 horas a la concentración de 100 mg/L ( $0,12 \times 10^6$  cel/mL). El crecimiento de esta microalga es exponencial las 96 horas de exposición hasta la concentración 12,5 mg/L, ya a partir de la concentración de 25 mg/L ( $1,4 \times 10^6$  cel/mL) la densidad algal se inhibe al 50 por ciento de la densidad control ( $3,4 \times 10^6$  cel/mL).

Los parámetros físicoquímicos fueron monitoreados durante las pruebas y mostraron que la calidad del agua fue adecuada para el crecimiento algal, (Temperatura: 23,6 - 26,0 °C; pH: 7,69 - 9,5). De los parámetros registrados al inicio y comparados con los registrados al cabo de las 96 horas (anexo 38), la temperatura ( $p=0,005$ ), el oxígeno disuelto ( $p=0,005$ ) y salinidad ( $p=0,006$ ) presentaron diferencias significativas (Anexo 36).

**A.3 Estación de muestreo E28**

**a. Concentración de Inhibición media (CI<sub>50-96h</sub>)**

El valor medio del CI<sub>50-96h</sub> de *Isochrysis galbana* fue 22,63 mg/L, siendo los límites de confianza inferior y superior incalculables en un intervalo de confianza del 95 por ciento (Tabla 20).

En la figura 31C, se observa que el porcentaje en la concentración 6,25 mg/L y 12,5 mg/L la densidad de *Isochrysis galbana* es mayor que la densidad algal del control. Ya a partir de 50 mg/L el porcentaje de inhibición es mayor al 50 por ciento.

**b. CI<sub>50</sub> y parámetros físicoquímicos**

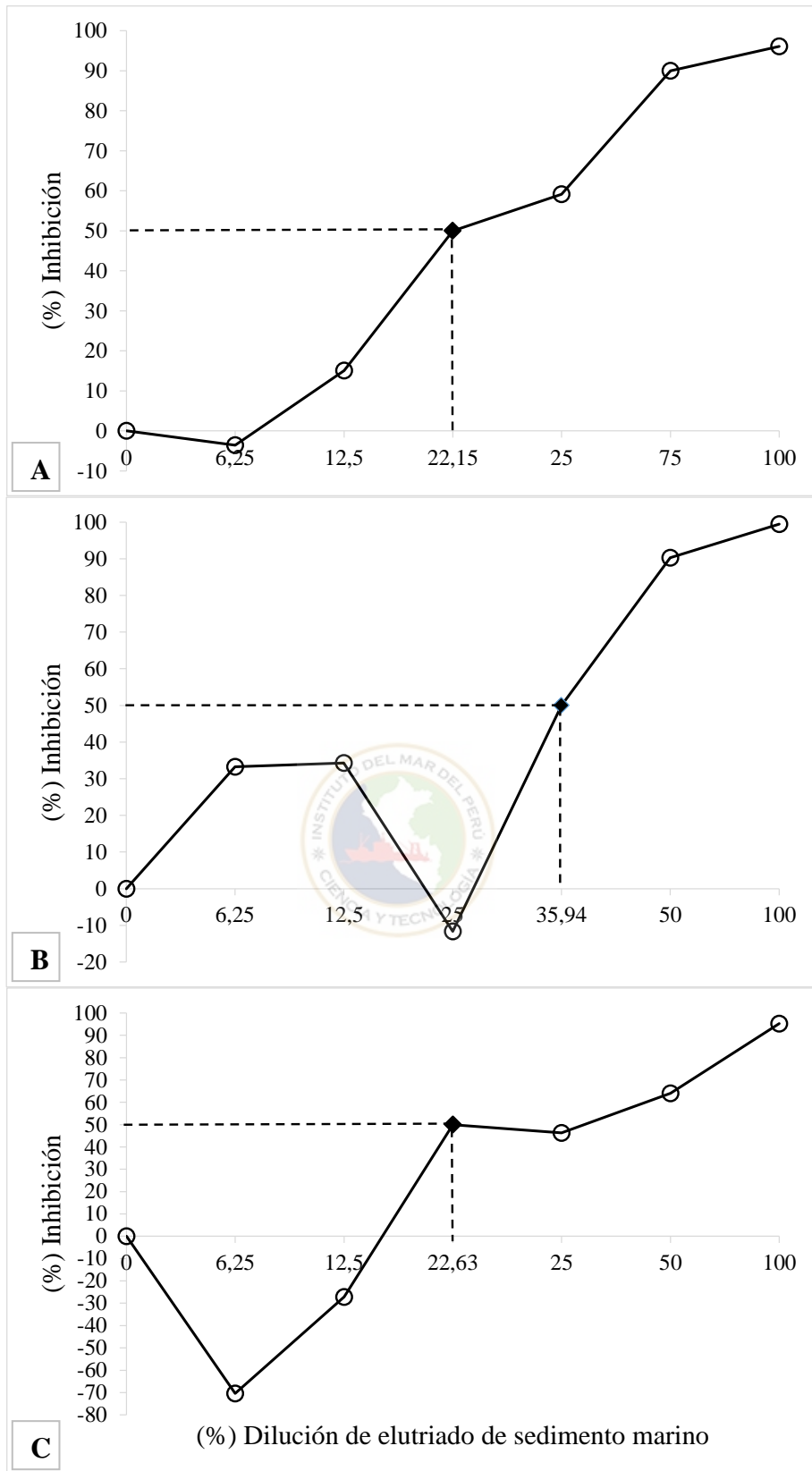
En el anexo 37, se muestra que el 50 por ciento de la densidad de *Isochrysis galbana* se empieza a inhibir respecto del control negativo ( $0,63 \times 10^6$  cél/mL) a partir de las 24 horas a la concentración de 100 mg/L ( $0,18 \times 10^6$  cél/mL). El crecimiento de esta microalga es exponencial las 96 horas de exposición hasta la concentración 12,5 mg/L, ya a partir de la concentración de 25 mg/L ( $2,16 \times 10^6$  cél/mL) la densidad algal se inhibe al 50 por ciento de la densidad control ( $4,0 \times 10^6$  cél/mL).

Los parámetros fisicoquímicos fueron monitoreados durante las pruebas y mostraron que la calidad del agua fue adecuada para el crecimiento algal, (Temperatura: 24,1 - 25,8 °C; pH: 7,7 - 9,6) (Anexo 38). De los parámetros registrados al inicio y comparados con los registrados al cabo de las 96 horas (Anexo 35), la temperatura ( $p=0,005$ ), el oxígeno disuelto ( $p=0,003$ ) y pH ( $p=0,005$ ) presentaron diferencias significativas (Anexo 39).

La densidad del control negativo ( $C_0$ ) y del 100 por ciento de dilución del elutriado de sedimento marino ( $C_5$ ) a las 96 horas de las estaciones E10, E27 y E28 presentaron diferencias significativas ( $p=0,007$ ;  $p =0,017$  y  $p =0,008$ , respectivamente). De igual manera existen diferencias significativas del control a las 24 y 96 horas presentando valores de  $p<0,05$  (Anexo 40) lo que confirma un crecimiento exponencial de la microalga *Isochrysis galbana* (Anexo 35, 36 y 37). A partir de los resultados que se muestran en el anexo 30 se demuestra que existen diferencias significativas de las densidades medias a las 96 horas para cada tratamiento (concentraciones de sedimento marino) ( $p<0,05$ ) (Anexo 41).







**Figura 31. Porcentaje de inhibición en función del porcentaje de dilución de elutriado de sedimento marino y estimación de  $CI_{50-96h}$  para *Isochrysis galbana* de las estaciones (A) E10, (B) E27 y (C) E28 en Setiembre del 2016.**

#### **A.4 Estación de muestreo E10**

##### **a. Concentración de Inhibición media (CI<sub>50-96</sub>) de la estación E10**

El valor medio del CI<sub>50-96h</sub> de *Nannochloropsis oceanica* no es calculable debido a que los límites de confianza inferior (23.51 mg/L) y superior (74.58 mg/L) en un intervalo de confianza del 95 por ciento son muy distantes (tabla 17).

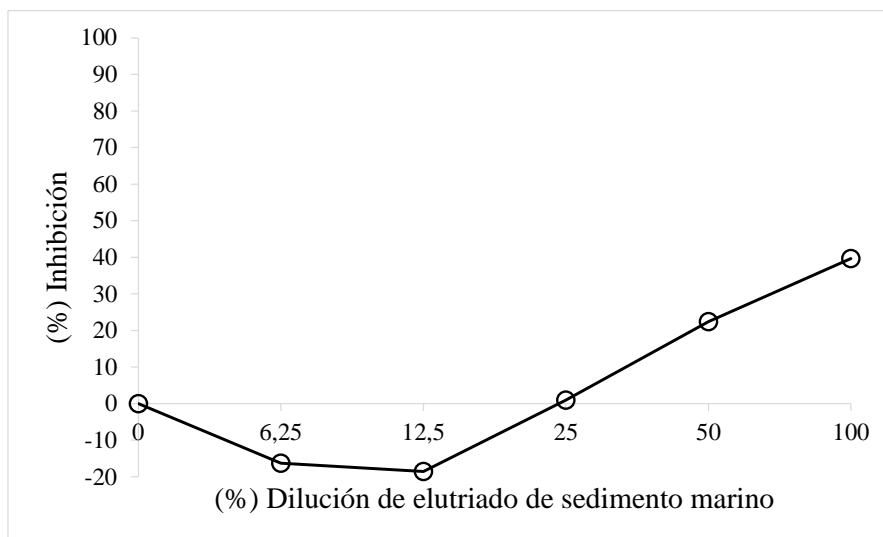
En la figura 32, se observa que el porcentaje en la concentración 6,25 mg/L y 12,5 mg/L la densidad de *Nannochloropsis oceanica* es mayor que la densidad algal del control. Ya a partir de 25 mg/L el porcentaje de inhibición incrementa, pero aún así no llega 50 por ciento.

##### **b. CI<sub>50</sub> y parámetros físicoquímicos**

En el anexo 42, se observa que a partir de la concentración 6,25 mg/L se nota que la densidad algal disminuye. Además, se muestra que la inhibición al 50 por ciento respecto al control empieza a partir de las 48 horas en la concentración de sedimento de 25 mg/L ( $1,7 \times 10^5$  cel/mL) y al cabo de las 96 horas está inhibición se pronunció más desde la concentración 6,25 mg/L ( $0,13 \times 10^6$  cel/mL) respecto a la muestra control negativo ( $1,77 \times 10^6$  cel/mL).

Los parámetros físicoquímicos fueron monitoreados durante las pruebas y mostraron que la calidad del agua fue adecuada para el crecimiento algal, (Temperatura: 18,8 - 19,8 °C; pH: 8,14 - 8,7). De los parámetros registrados al inicio y comparados con los registrados al cabo de las 96 horas (Anexo 43), la temperatura ( $p=0,005$ ), oxígeno disuelto ( $p=0,005$ ) y conductividad ( $p=0,005$ ) presentaron diferencias significativas (Anexo 44).

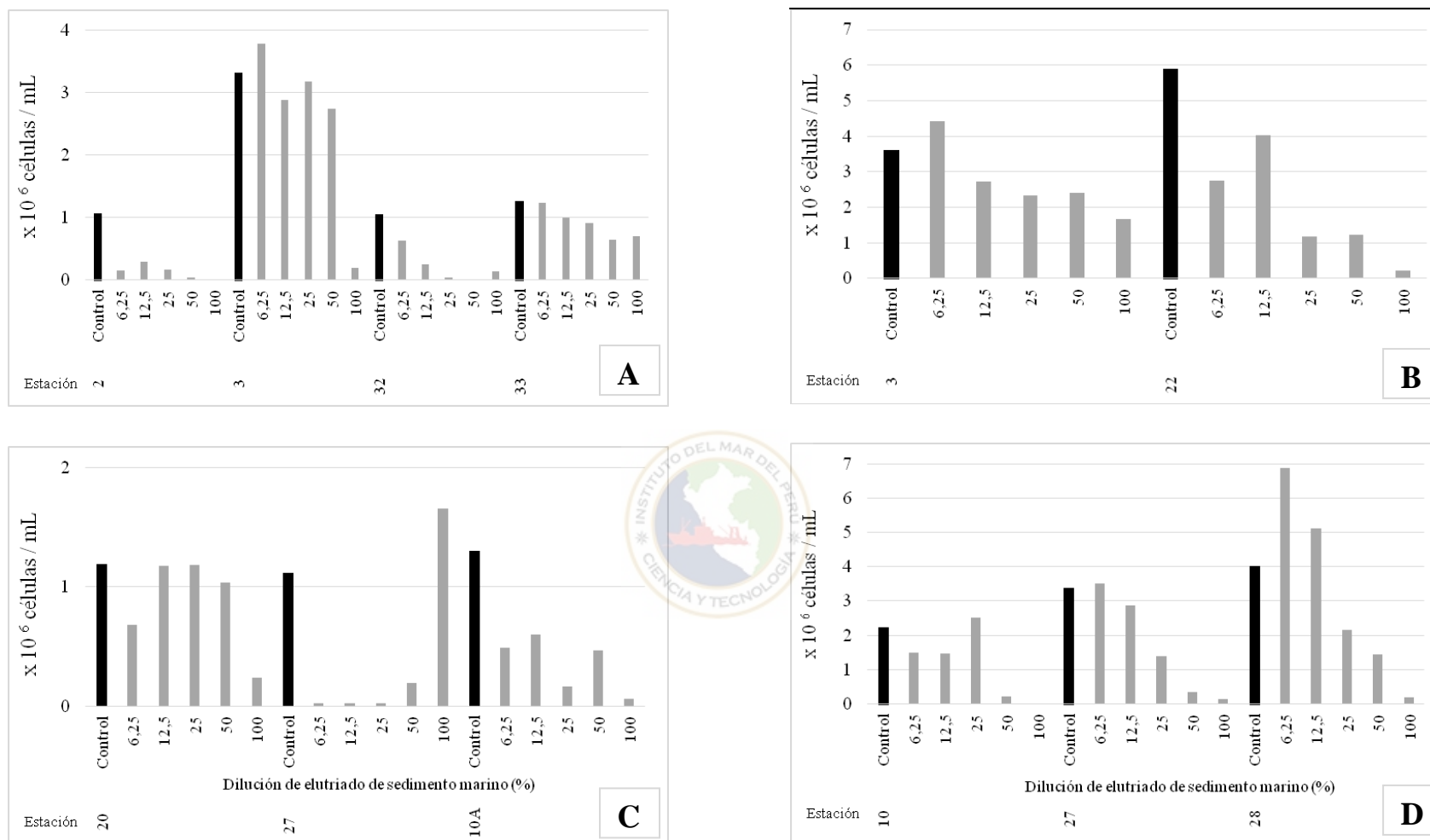
La densidad del control ( $C_0$ ) y del 100 por ciento de dilución del elutriado de sedimento marino a las 96 horas de la estación E10 presentó diferencia significativa ( $p=0,000$ ). De igual manera existen diferencias significativas del control a las 24 y 96 horas presentando valores de  $p < 0,05$  (Anexo 45) lo que confirma un crecimiento exponencial de la microlaga *Nannochloropsis oceanica* (Anexo 42), caso contrario sucede con los resultados que se muestran en el Anexo 46 en los que no existen diferencias significativas de las densidades medias a las 96 horas para cada tratamiento (concentraciones de sedimento marino) ( $p < 0,05$ ).



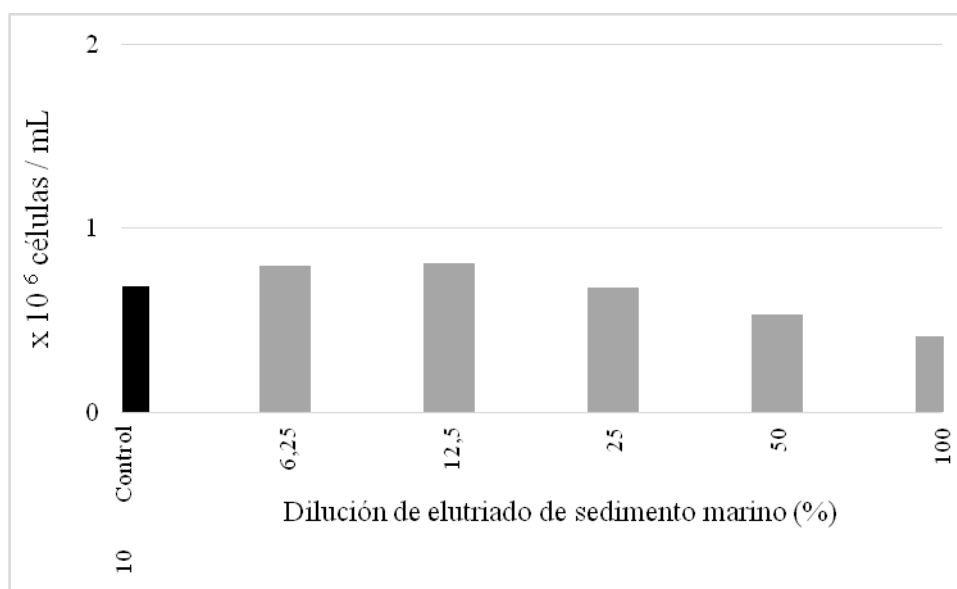
**Figura 32. Porcentaje de inhibición en función del porcentaje de dilución de elutriado de sedimento marino y estimación de  $CI_{50-96h}$  para *Isochrysis galbana* de la estación E10 en Setiembre del 2016.**

En la figura 33 se observa que el crecimiento microalgal del control negativo de *Isochrysis galbana* es mayor que la densidad microalgal obtenida en las multiconcentraciones de elutriado de sedimento marino, en su mayoría, a excepción de las estaciones E3 (Figura 33A), E32 (Figura 33B), E27 (Figura 33C) y E28 (Figura 33D). Sin embargo, todas las pruebas de multiconcentración cumplieron con el criterio de aceptabilidad del control negativo ( $\geq 1 \times 10^6$  células / mL). En la figura 34, el crecimiento microalgal del control negativo de *Nannochloropsis oceanica* de la estación E10 es menor que el que se presenta en las diluciones de elutriado de sedimento marino por tal motivo no se pudo calcular el porcentaje de toxicidad.

Ahora bien, respecto a la inhibición del crecimiento respecto al control negativo se puede deber a un menor porcentaje de materia orgánica (Rudolph et al., 2012) o a la presencia de algún agente tóxico en el sedimento marino que corroboraría una perturbación ambiental en el medio acuático. Mientras que el sobrecrecimiento de la microalga respecto a los controles puede ser explicado por la presencia de nutrientes liberados durante la preparación de los elutriados de los sedimentos sometidos a prueba (Rudolph et al., 2010). Además, se debe considerar que la acumulación de sedimentos ricos en nutrientes no es un problema menor; ya que podría conducir al desbalance del ecosistema (Rudolph et al., 2010). Otro aspecto es cuando el crecimiento microalgal fue semejante al del control negativo lo que podría ser atribuido a la ausencia de nutrientes y de tóxicos biodisponibles (Rudolph et al. 2009 y Rudolph et al. 2010).



**Figura 33. Densidad promedio (células/mL) de *Isochrysis galbana* en control negativo y diluciones de elutriados de los sedimentos a las 96 horas de exposición. (A) Bahía Tortugas-Casma, marzo 2016, (B) Bahía Tortugas-Casma, agosto 2016, (C) Bahía Paracas, abril 2016 y (D) Bahía Paracas, setiembre 2016.**



**Figura 34. Densidad promedio (Células/mL) de *Nannochloropsis oceanica* en control negativo y diluciones de elutriados de los sedimentos a las 96 horas de exposición, estación E10, en Bahía Paracas, Setiembre del 2016.**

Respecto a los parámetros, Albertosa et al. (1996) y Austin & Austin (1999), mencionan que la cepa de *Isochrysis galbana* crece adecuadamente a una temperatura de 18°C a 25°C, en un pH de 7 a 9,5, cuyos rangos de temperatura en las pruebas de toxicidad con esta microalga están entre 17,2 °C y 26,3°C y 7,6 y 10,1 de pH es decir están dentro o cercanos a los valores que los autores mencionan. Para el caso de *Nannochloropsis oceanica* los valores obtenidos en este estudio de investigación fluctúan entre 17,2 - 20,8 °C de temperatura cuyos valores están dentro de lo encontrado por el Departamento de pesca de FAO (2017) que menciona que los valores de cultivo de microalgas en condiciones controladas varían entre 15 - 22 °C. Además, Zhang et al. (2016) indican que las condiciones de pH para esta especie fluctuaron entre 7,6 - 8,2, rango en el que se encuentra los valores obtenidos en el presente estudio 7,8 - 10,1 de pH.

#### **4.4 Toxicidad del sedimento marino en las bahías Tortugas-Casma y Paracas**

##### **4.4.1 Bahías Tortugas-Casma**

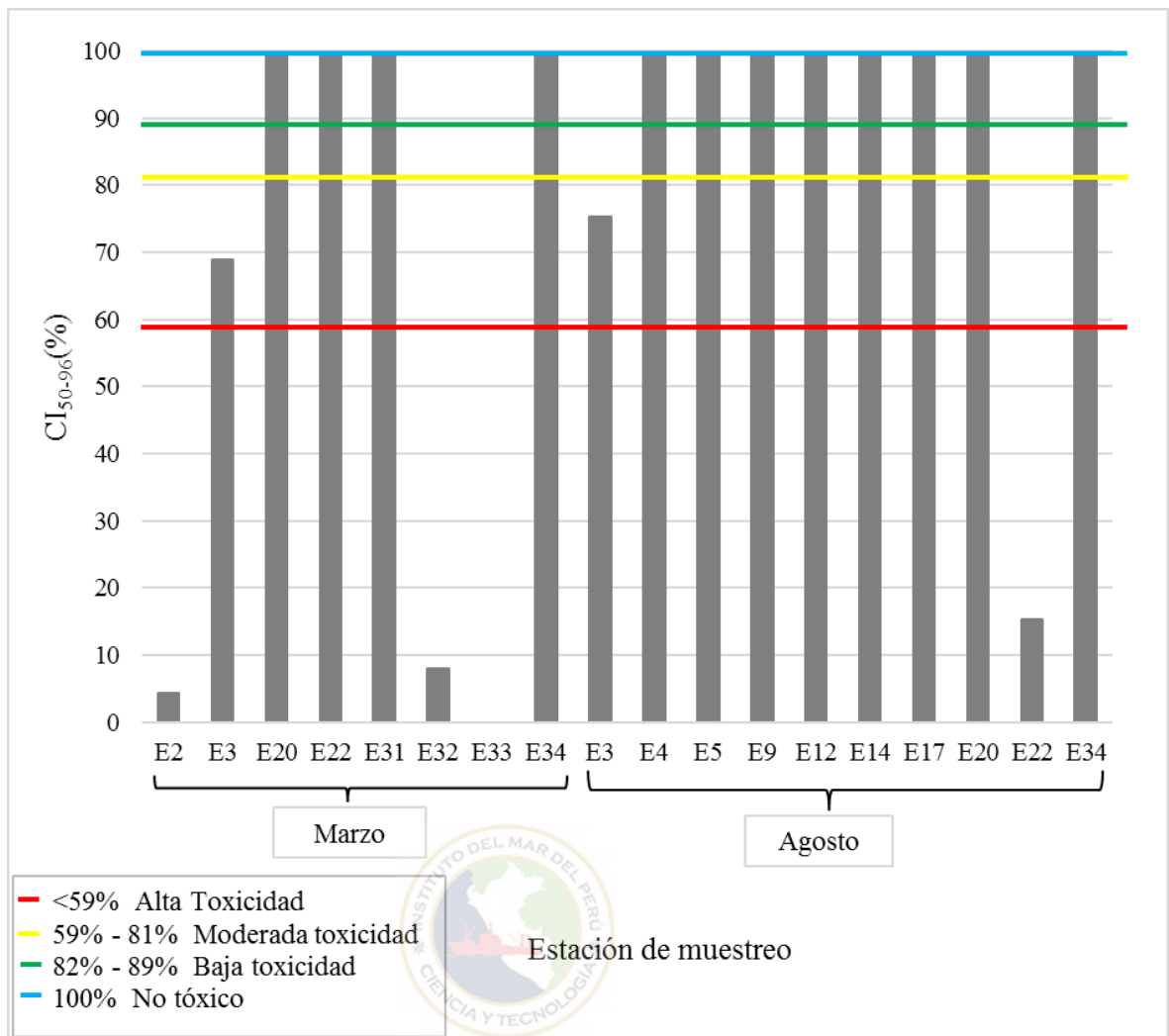
Siguiendo los valores propuestos por Bay et al. (2014) para estimar el nivel de toxicidad según la concentración letal media (CL<sub>50</sub> %), se observa en la tabla 22 que para el mes de marzo el nivel de toxicidad de las 4 estaciones que se realizaron multiconcentración con *Isochrysis galbana* fueron de alta toxicidad en las estaciones E2 (CI<sub>50</sub>= 4,3%) y E32 (CI<sub>50</sub>=

7,97%) y moderada toxicidad en la estación E3 (CI<sub>50</sub>= 68,98%), mientras que en la estación E33 no se pudo calcular el nivel de toxicidad. Además, en el mes de agosto de las 10 estaciones de muestreo, se realizaron “multiconcentración” empleando *Isochrysis galbana* en las estaciones E3 (CI<sub>50</sub>= 75,31%) y E22 (CI<sub>50</sub>= 15,36%), presentando moderada y alta toxicidad, respectivamente. De esta manera la estación E3 presenta moderada toxicidad en marzo y agosto (Tabla 22 y Figura 35).

**Tabla 22. Toxicidad de sedimento marino al cabo de las 96 horas en la Bahía Tortugas – Casma empleando la microalga *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica* en los meses de marzo y agosto del 2016**

Estación de muestreo	Marzo/Agosto	Multi-concentración Marzo/Agosto	Microalga para Multi-concentración	Toxicidad Marzo	Toxicidad Agosto
E2	X/-	X/-	<i>Isochrysis galbana</i>	<b>Alta Toxicidad</b>	No probado
E3	X/X	X/X	<i>Isochrysis galbana</i>	<b>Moderada Toxicidad</b>	<b>Moderada Toxicidad</b>
E4	-/X	-	-	No probado	No tóxico
E5	-/X	-	-	No probado	No tóxico
E9	-/X	-	-	No probado	No tóxico
E12	-/X	-	-	No probado	No tóxico
E14	-/X	-	-	No probado	No tóxico
E17	-/X	-	-	No probado	No tóxico
E20	X/X	-	-	No tóxico	No tóxico
E22	X/X	-/X	<i>Isochrysis galbana</i>	No tóxico	<b>Alta Toxicidad</b>
E31	X/-	-	-	No tóxico	No probado
E32	X/-	X/-	<i>Isochrysis galbana</i>	<b>Alta Toxicidad</b>	No probado
E33	X/-	X/-	<i>Isochrysis galbana</i>	NC	No probado
E34	X/X	-	-	No tóxico	No tóxico
<b>Número de estaciones</b>	8/10	4/2	NC: No calculable		

**FUENTE:** Elaboración propia



**Figura 35. Toxicidad del sedimento marino en las Bahías Tortugas-Casma empleando *Isochrysis galbana*, durante el año 2016.**

Así también, en el mapa 03, se muestran los niveles de toxicidad en el área de estudio, observándose en la zona frente a los Chimus, alta toxicidad (E2), en marzo, esta estación se ubica fuera de la concesión acuícola a 2 km de la desembocadura del río Nepeña y de áreas agrícolas, en agosto esta estación no se volvió a muestrear. En la estación E3, se presentó moderada toxicidad en marzo y agosto, este punto de muestreo se ubicó dentro de las concesiones de “concha de abanico” pero también está es próxima a un área de concesión minera en donde extraen sustancias no metálicas INGEMMET (2019). En la estación E22 en el mes de marzo no se presentó toxicidad, pero en agosto se observa que el nivel de toxicidad es alto, esta estación se ubicó a 4km de la línea costera de bahía Tortugas al costado de concesiones acuícolas, de “concha de abanico”. Finalmente, la estación E32, con alta toxicidad en marzo esta ubicada a 2km del Puerto de Casma y casi un kilómetro de

la desembocadura del río Casma, cabe recalcar que la margen del río es de uso agrícola y hay varios centros poblados.

Ahora bien, en el anexo 47 se observa, la cantidad de materia orgánica (porcentaje) en sedimento fluctuó entre 1,5 por ciento a 6,5 por ciento en marzo y 1,0 por ciento a 4,0 por ciento en agosto, obteniendo los valores más altos en la estación E22 en ambos meses. Y es que los bivalvos producen pseudoheces y heces que acumuladas estimulan la producción bacteriana, cambiando la composición química, la estructura y funciones del sedimento (Garro y Pardo, 2007).

Los valores de concentración de los hidrocarburos de petróleo fueron  $\leq 10 \mu\text{g/g}$  (Anexo 47), según Saravia (2007), estos valores indican que los sedimentos marinos no están contaminados por hidrocarburos.

**Tabla 23. Criterio de calidad de concentración de metales en sedimentos.**

METAL	Long et al., (1995)	
	ERB <sup>1</sup> ( $\mu\text{g/g}$ )	ERM <sup>2</sup> ( $\mu\text{g/g}$ )
Arsénico	8,2	70
Cadmio	1,2	9,6
Cobre	34,0	270
Plomo	46,9	218
Mercurio	0,15	0,71
Zinc	150	410
Níquel	20,9	51,6

<sup>1</sup>ERB: Efecto de Rango Bajo

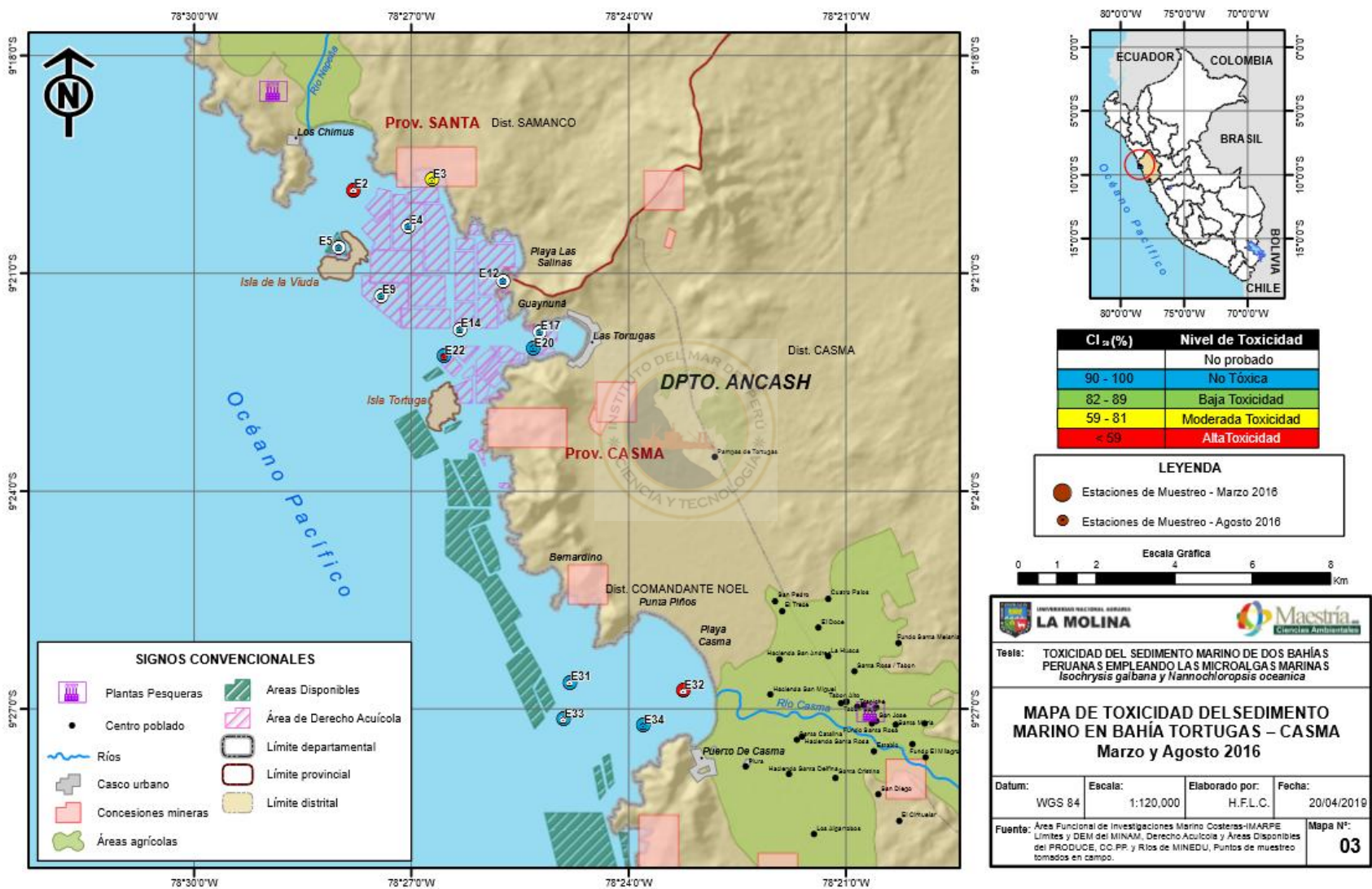
<sup>2</sup>ERM: Efecto de Rango Medio

**FUENTE: Protección Costera de los Estados Unidos.**

Además, la concentración de mercurio total en sedimento superficial en marzo varió de 0,05 a 0,036  $\mu\text{g/g}$  (Anexo 47), cuyos valores no superan los valores señalados por normativas internacionales de calidad de sedimentos, como en la tabla de Protección Costera de los Estados Unidos (Long et al, 1995) que indica 0,15  $\mu\text{g/g}$ , la norma canadiense señala 0,13  $\mu\text{g/g}$ , mientras que la norma holandesa propone 0,3  $\mu\text{g/g}$  (Marín et al., 2016).



**MAPA 3. Toxicidad del sedimento marino de la Bahía Tortugas-Casma en marzo y agosto del 2016**



A efectos comparativos, en la tabla 23 se incluyen los criterios de calidad para los sedimentos propuestos por Long et al. (1995), basado en el potencial de inducir efectos tóxicos en los organismos marinos, para lo que han definido dos valores: ERB (Efectos de Rango Bajo) y ERM (Efectos de Rango Medio). Los Valores de ERB indican concentraciones por debajo de las cuales rara vez se producen efectos adversos, y los valores de ERM representan concentraciones por encima de las que con frecuencia se producen efectos adversos.

Entonces, según el anexo 47 se observa que en la Bahía Tortugas-Casma no se superaron los valores de ERB de As, Cd, Pb, Hg y Zn en todas las estaciones muestreadas del mes de marzo. En la estación 32, el Cu superó el valor de ERB pero no de ERM, es decir no presentó riesgos de toxicidad (Long et al., 1995)

No se observó una relación entre la distribución de los metales analizados en los sedimentos con las actividades antrópicas como el cultivo de *Argopecten purpuratus* y lo que esto implica que es el uso de combustibles en las embarcaciones, uso de pinturas en los sistemas de cultivos, uso de estructuras metálicas entre otros, tal como lo menciona Laino et al., (2015). Lo encontrado por Sutherland et al. (2007) mencionan que un exceso de Cu y Zn en los sedimentos depositados debajo y alrededor de los cultivos marinos del Archipiélago Broughton, Canadá.

Los valores de coliformes totales (CT) y coliformes termotolerantes (CTT) en marzo y agosto fueron menores a 3,0 NMP/100 mL (Anexo 47). Estos valores no indican riesgo sanitario que se podría asociar a la posible resuspensión de las bacterias hacia la columna de agua (Barrera et al., 2013).

En marzo se presentó una floración algal del dinoflagelado *Prorocentrum minimum* en las estaciones E2 y E3 ( $2,4 \times 10^6$  cél/mL y  $15,5 \times 10^6$  cél/mL, respetivamente), cuya especie es formadora de florecimientos algales tóxicos, produciendo la toxina verupina afectando almejas y mariscos (Gárate-Lizárraga et al., 2014). Según, Muciño et al (2015), las especies de *Prorocentrum* pueden ser un indicador de contaminación ya que una de las condiciones necesarias para que estas especies formen florecimientos algales nocivos y tóxicos, es el proceso de eutrofización que podrían generar los desechos de la acuicultura al ecosistema.

Las concesiones acuícolas de cultivo de especies en la zona de estudio están ubicadas desde la desembocadura del río Nepeña hasta Isla Tortugas, donde el 99 por ciento de los permisos para cultivo son para Concha de abanico (Paredes, 2018).

El valle del río Nepeña prepresenta con 2545 hectáreas de cultivo. Además, en la cuenca del río Nepeña se encuentra el distrito de Samanco con una población de 832 habitantes con 204 viviendas, presentando según el INEI (2007) categorías de Caserío y Población Dispersa. De igual manera el valle de Casma con 4587 hectáreas de cultivo, en la cuenca de este río tiene una población de 27 77 habitantes con 7 590 viviendas, presentando categorías de ciudad, Villa, Caserío y Población Dispersa (INEI, 2007).

Entonces, al no haber indicios de contaminación orgánica (hidrocarburos de petróleo), inorgánica (traza de algunos metales), ni microbiológica (coliformes totales y termotolerantes) en los sedimentos de las estaciones que presentaron alta y moderada toxicidad, esta podría deberse a la agricultura, a la población urbana y a las actividades portuarias. A parte del desarrollo urbano por todo el litoral costero del área de estudio, principalmente traducido en balnearios quienes han modificado el territorio y el suelo modificando por ende los hábitats. De igual manera, se hallan las desembocaduras de los ríos que acarrear material natural propio del ciclo hidrológico del agua.

Además, por la propia actividad acuícola podría generar ciertos impactos negativos que podrían contribuir a la toxicidad del sedimento marino como, por ejemplo, la cantidad de desechos producidos que dependen de la densidad del cultivo, infraestructura de cultivo, hidrodinámica de la zona y absorción del sedimento (Rosenthal, 2002). Además, Stenton et al. (2001) reportan que el cultivo de *Mytilus galloprovincialis* en una bahía en Sudáfrica genera enriquecimiento orgánico y anoxia en el sedimento; encontrando que la materia orgánica particulada fue alta en las zonas de cultivo, especialmente en los primeros 10 cm del fondo. También la producción de pseudoheces y heces que es uno de los principales problemas de los cultivos de bivalvos por el impacto que genera en el medio, Disalvo (1988, en Lujan, 2003) indican que los ostiones producen una densidad de 28,8 g/m<sup>2</sup> en un año de cultivo.

Esta producción de heces y pseudoheces acumulada estimula la producción bacteriana, cambiando la composición química, la estructura y funciones del sedimento. Generando a su vez problemas de eutrofización en los sedimentos y causando anoxia en los sedimentos tal como ocurrió en los cultivos de peces y crustáceos en el Mar Interior de Chiloé, según

lo manifestado por Rudolph et al., (2009) y por ende de producción de ácido sulfhídrico que genera problemas de toxicidad para los organismos en cultivo. Y es que la materia orgánica puede cambiar la demanda de oxígeno disuelto, produciendo alteraciones en los sedimentos, cambiando la condiciones redox y / o toxicidad creciente.

Además, cabe mencionar que las estructuras de cultivo de bivalvos modifican la velocidad y dirección del movimiento de agua. Es así que, Grant y Bacher (2001) mencionan que los cultivos suspendidos reducen hasta un 20 por ciento la velocidad de la corriente en las zonas aledañas a la zona de cultivo y hasta un 54 por ciento en medio del área de cultivo debido al número de líneas de cultivo las mismas que perjudican el flujo normal de las corrientes internas en la bahía; debido a que las líneas de cultivo actúan como “cortinas” que impiden el flujo normal de la corriente.

#### 4.4.2 Bahías Paracas

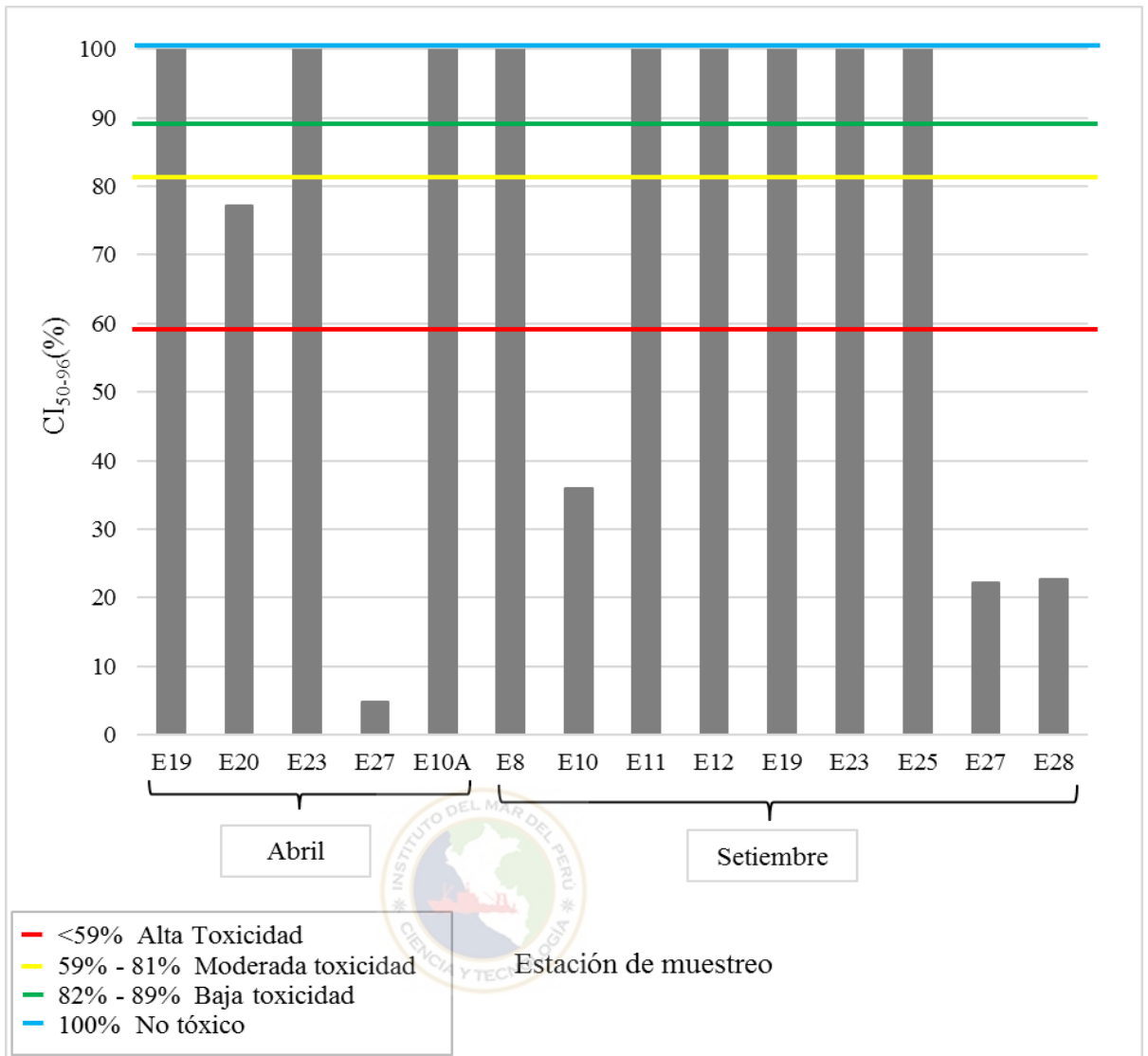
En la tabla 23, se muestra que en el mes de abril se realizaron pruebas de toxicidad con sedimento marino empleando *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica* en 6 estaciones de muestreo, de las cuales se realizaron “multiconcentración” empleando *Isochrysis galbana* en 2 estaciones, las mismas que fueron clasificadas con alta toxicidad las estaciones E27 (CI<sub>50</sub>= 4,76%) y 10A (CI<sub>50</sub>= 5,37%) y con moderada toxicidad en la estación E20 (CI<sub>50</sub>= 77,15%). De igual manera, en el mes de setiembre de las 10 estaciones de muestreo, se realizaron “multiconcentración” a 3 estaciones, empleando *Isochrysis galbana*, las mismas que fueron catalogadas como altamente tóxicas las estaciones E10 (CI<sub>50</sub>= 35,94%), E27 (CI<sub>50</sub>= 22,15%) y E28 (CI<sub>50</sub>= 22,63%). También, en la estación E10, se realizó “multiconcentración” con *Nannochloropsis oceanica*, pero el valor de toxicidad fue no calculable (NC).

De esta manera la estación E27 en ambos muestreos realizados en la Bahía Paracas fue catalogada como altamente tóxica (Tabla 23 y Figura 36).

**Tabla 24. Toxicidad de sedimento marino al cabo de las 96 horas en la Bahía Paracas empleando la microalga *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica* en los meses de abril y setiembre de 2016.**

Estación de muestreo	Abril/ Setiembre	Multi-concentración Abril/Setiembre	Microalga para Multi-concentración	Toxicidad Abril	Toxicidad Setiembre
E8	-/X			No probado	No tóxico
E10	-/X	-/X	<i>Isochrysis galbana</i> , <i>Nannochloropsis oceanica</i>	No probado	<b>Alta Toxicidad, NC</b>
E11	-/X			No probado	No tóxico
E12	-/X			No probado	No tóxico
E19	X/X			No tóxico	No tóxico
E20	X/-	X/-	<i>Isochrysis galbana</i>	<b>Moderada Toxicidad</b>	No probado
E23	X/X			No tóxico	No tóxico
E25	-/X			No probado	No tóxico
E27	X/X	X/X	<i>Isochrysis galbana</i>	<b>Alta Toxicidad</b>	<b>Alta Toxicidad</b>
E28	-/X	-/X	<i>Isochrysis galbana</i>	No probado	<b>Alta Toxicidad</b>
E10A	X/-	X/-	<i>Isochrysis galbana</i>	<b>Alta Toxicidad</b>	No probado
<b>Número de estaciones</b>	5/9	3/3			

NC: No calculable, empleando *Nannochloropsis oceanica*

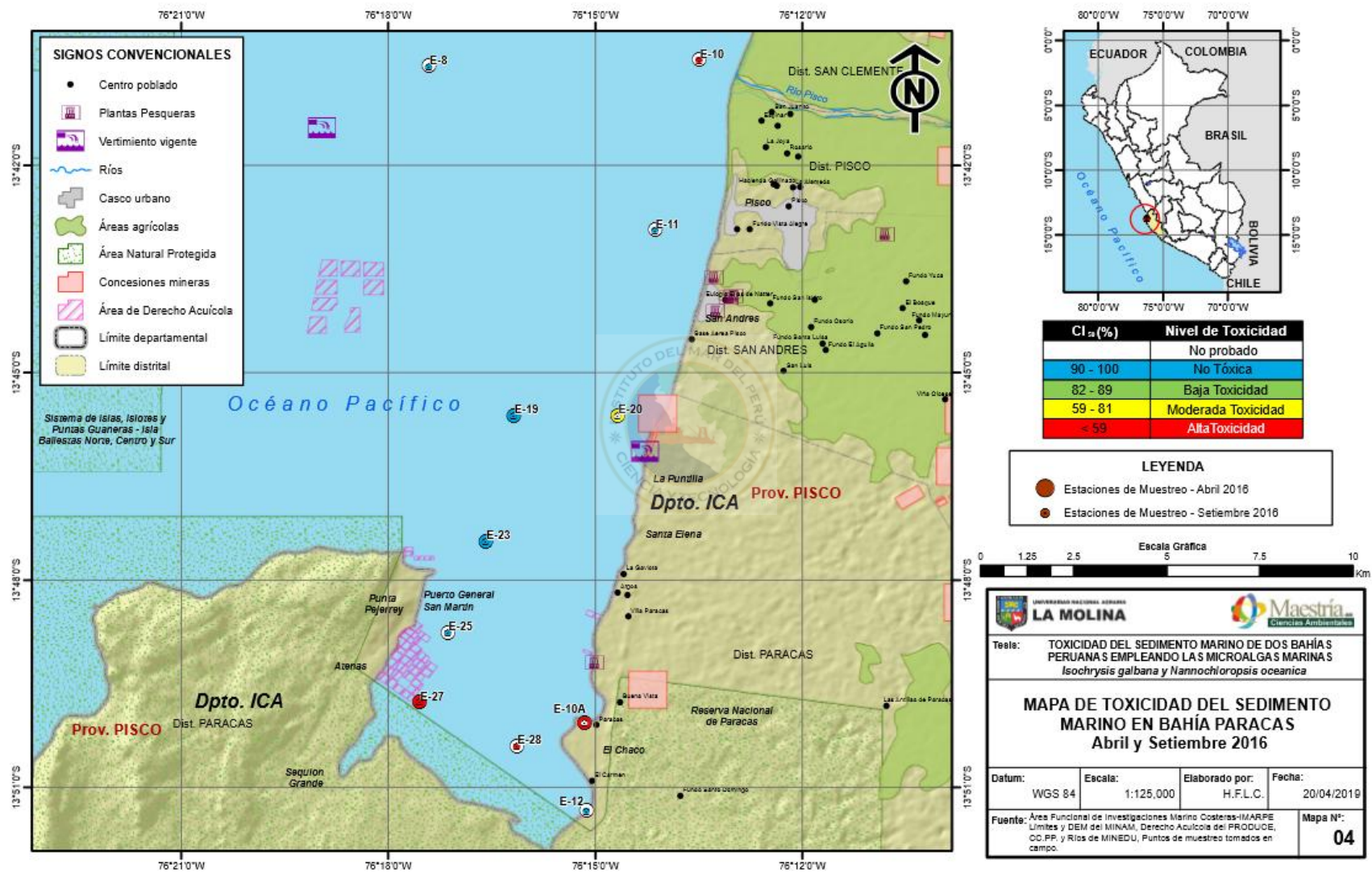


**Figura 36. Toxicidad del sedimento marino en las Bahías Paracas empleando *Isochrysis galbana*, durante el año 2016.**

Del mismo modo se observa en el mapa 04 la distribución de la toxicidad en la zona de estudio, presentando en el mes de abril alta toxicidad en estación E10A frente a Playa el Chaco y en la estación E27 ubicado en Playa Atenas al costado de la concesión acuícola para cultivo de “concha de abanico”. También se presenta en la E20 moderada toxicidad ubicada a 1km del vertimiento de efluentes vigente. Para el mes de setiembre en la E10 a 1Km de la desembocadura del Río Pisco, y en la E27 y E28 se mostro alta toxicidad.



MAPA 4. Toxicidad del sedimento marino de la Bahía Paracas en abril y setiembre del 2016



De acuerdo con Saravia (2007), el grado de contaminación en los sedimentos se puede establecer en función de la concentración de los hidrocarburos totales. Cuando la concentración es  $\leq 10 \mu\text{g/g}$  se considera sin contaminación, en el presente estudio los niveles de hidrocarburos totales en las estaciones de muestreo del Anexo 48 fueron menores al  $\leq 10 \mu\text{g/g}$ .

Según el anexo 48, se observa que en esta bahía se superaron los valores de ERB de As en todas las estaciones muestreadas incluidas la E10 y E28 (estaciones con alta toxicidad), pero no superaron los valores de ERM. Mientras que en abril los valores de Cd superaron los valores de ERM en la estación E23 y en setiembre en las estaciones E19 y E25. El Cu, Pb, Hg, Zn y Ni no superaron los valores ERM establecidos en la tabla de Protección Costera de los Estados Unidos (Long et al, 1995) (Tabla 23).

Las estaciones que superaron los valores ERM de cadmio, no presentaron toxicidad en el sedimento marino, pero según Lucho et al. (2005) la presencia de este metal se debe a las consecuencias del vertimiento masivo de toda clase de desechos de la industria química, manufactura de textil, papel, madera, siderúrgica, procesadora de alimentos, cervecera, del calzado; además de pesticidas y fertilizantes empleados en la industria agropecuaria tal como se sucedió en el Puerto de Veracruz, México.

Los valores de coliformes totales (CT) y coliformes termotolerantes (CTT) en abril fueron 1,5 NMP/100 mL y en agosto estos valores aumentaron a 3 NMP/100 mL (Anexo 48). Según, Barrera et al. (2013) mencionan que los valores de coliformes totales no indican riesgo sanitario que se podría asociar a la posible resuspensión de las bacterias hacia la columna de agua.

Ahora bien, de acuerdo a la toxicidad de sedimento encontrado en setiembre en la estación E10 se podría considerar que está influenciado por la descarga del río Pisco, que en sus márgenes tiene tierras de uso agrícola. Además, de aportes de sedimentos, restos de vegetales terrestres (Velazco y Solis 2000). También, la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales denominada “Boca del Río”, cuya operación corresponde a la empresa EPS EMAPISCO S.A., tratando aguas residuales domésticas e industriales de los distritos de Pisco y San Andrés no cuenta con el adecuado tratamiento ni con la autorización de vertimientos hacia el río Pisco (ANA, 2016), en las fechas de los monitoreos realizados para el presente estudio de investigación.



En la estación E20 que presentó moderada toxicidad en abril, posiblemente debido al vertimiento vigente, entonces éstos efluentes o aguas residuales industriales de las pesqueras (agua de bombeo, sanguaza, agua de proceso) que se caracterizan no solo por los grandes volúmenes de descarga, sino por su alto contenido de materia orgánica y compuestos grasos, podrían estar asociados a estados anóxicos y altas concentraciones de aceites y grasa, según mencionan Velazco y Solis (2000). Además del aporte de material terrígeno transportado por las corrientes y aportes de descargas urbanas.

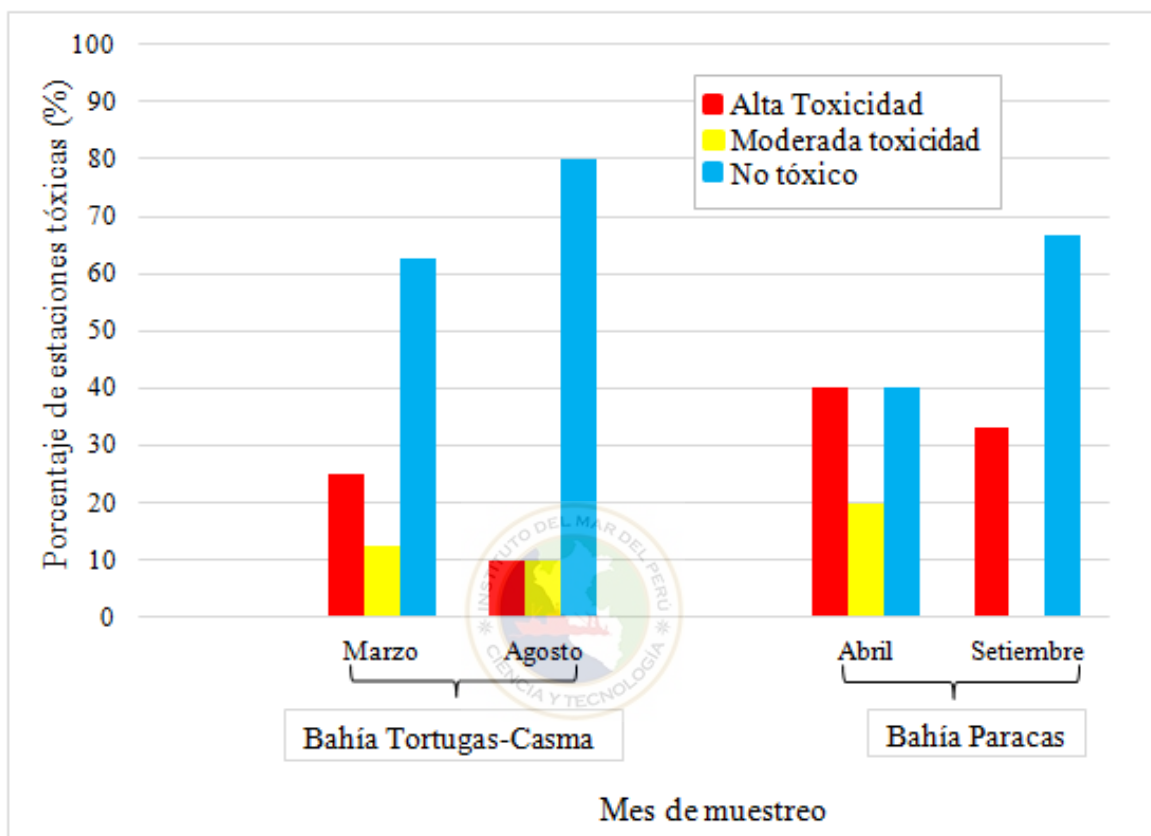
Ya para el caso de las estaciones que presentaron alta toxicidad que se ubicaron al interior de la bahía Paracas (E10A, E28 y E27) donde la fuerza de las corrientes es mucho menor, con poca profundidad, con topografía plana y ciertas depresiones, lo que hace que sea una zona de retención de materia orgánica. Entonces, la escasa circulación que existen en el fondo y a los procesos más lentos de su oxidación condiciona la textura del sedimento de grano muy fino (limos y arcillas) con altos contenidos de materia orgánica (Federico Velazco, comunicación personal, 28 de mayo del 2019)

Además, Jacinto et al. (2014) indican que la circulación es limitada por la configuración geomorfológica de la bahía, que favorece la protección de la línea de costa, condicionando un régimen hidrodinámico poco intenso en el fondo, limitando la acción de las corrientes y oleaje. También, la morfología del fondo favorece la acumulación de materia orgánica en zonas de mayor depresión, la misma que se oxida en la capa superficial del sedimento al igual que procesos de desnitrificación y sulfato reducción que ocurren en capas más profundas del sedimento. Además, la demanda de oxígeno influye en la calidad de la columna de agua, creando en algunos casos un ambiente anóxico que afecta la fauna béntica, según, Velazco y Solis (2000).

También, se ha incrementado el desarrollo de diversas actividades extractivas en la bahía de Paracas, lo cual ha incrementado el tráfico marítimo y posibles derrames o fugas de productos químicos durante el transporte, esto también puede estar asociado a la toxicidad presentada en dicha zona (Jacinto, 2014).

Ahora bien, en la la figura 33, se presenta la comparación de los niveles de toxicidad en las bahías Tortugas-Casma y Paracas presentando esta última más estaciones de muestreo con alta toxicidad. Lo niveles de toxicidad en ambas bahías fueron de moderada a alta toxicidad, siendo, en promedio, los sedimentos de la bahía Paracas 20 por ciento más tóxicos que en la bahía Tortugas-Casma.

Asimismo, las estaciones no tóxicas en la Bahía Tortugas-Casma fueron el 63 por ciento (marzo) y 80 por ciento (agosto) y en la Bahía Paracas las estaciones no tóxicas fue el 40 por ciento (abril) y 67 por ciento (setiembre). Estos resultados son en base a las pruebas de toxicidad con la microalga *Isochrysis galbana*. Las pruebas de toxicidad con *Nannochloropsis oceanica* no presentaron magnitudes de toxicidad considerables en el presente estudio de investigación.



**Figura 37. Porcentaje de estaciones tóxicas, en ambos muestreos, en el sedimento marino de las Bahías Tortugas-Casma y Paracas a las 96 horas de exposición empleando *Isochrysis galbana*, durante el año 2016.**

#### **4.5 Condiciones básicas para pruebas de toxicidad con cobre y elutriado de sedimento marino empleando *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica***

Debido a que no se cuenta con un reporte detallado del protocolo a seguir para evaluar ensayos de toxicidad para las microalgas en estudio, se establecieron los Condiciones básicos de los bioensayos realizados con las microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica* en base a las condiciones generales, a partir de las 32 pruebas de toxicidad realizados en esta investigación que en base de la metodología modificada por la USEPA (2002) se obtuvo un procedimiento detallado para réplicar estos bioensayos, el mismo que se observa en el diagrama de flujo del anexo 49.

A continuación, se presentan los parámetros físicoquímicos obtenidos de las pruebas de toxicidad con sulfato de cobre pentahidratado (Tabla 25 y 26) y elutriado de sedimento marino (Tabla 27 y 28).



**Tabla 25. Condiciones básicas para pruebas de toxicidad con sulfato de cobre pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O,) a las 96 horas, empleando *Isochrysis galbana*.**

PARÁMETROS	CONDICIONES
Tipo de prueba	Estática, sin renovación de la solución de prueba
Duración de la prueba	96 horas
Temperatura	22.3 ± 0.46°C
Oxígeno (mg/L)	10.9 ± 2.74
pH	8.7 ± 0.6
Salinidad (ppm)	34.9 ± 0.05
Conductividad (mS/cm)	53.1 ± 0.21
Intensidad lumínica (lux)	Artificial, controlada con luces LED 2135 ± 467 lux
Fotoperiodo	Iluminación continua (24 horas luz)
Aireación	Agitación manual periódica durante toda la prueba. Si el oxígeno es menor de 6 mg/L se suministra aireación continua
Recipientes de prueba	Matraces erlenmeyer de 125 mL
Volumen de prueba	50 mL
Edad del cultivo para el inóculo	3 – 6 días (fase exponencial de crecimiento)
Agua de dilución	Agua de mar filtrada (una micra)
Cantidad de nutrientes	52 µL de medio Guillard “f/2” modificado
Volumen de microalgas	2 mL
Densidad celular del inóculo	200000 a 300000 células/mL <sup>-1</sup>
Número de Concentraciones más control	6
Réplicas por concentración	4
Efecto medido	Disminución de la biomasa microalgal respecto al control o blanco
Periodicidad de las observaciones	Conteo en hemocitómetro cada 24 horas para el cálculo de N° de células/mL
Criterio de aceptabilidad de la prueba	La densidad celular en el control negativo al finalizar la prueba (96h) debe ser ≥1x10 <sup>6</sup> cél./mL
Coefficiente de variación en los conteos de resultado final	≤20 por ciento entre réplicas de un mismo tratamiento CI <sub>50-96h</sub>

**FUENTE: Elaboración propia**

**Tabla 26. Condiciones básicas para pruebas de toxicidad con sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) a las 96 horas, empleando *Nannochloropsis oceanica*.**

PARÁMETROS	CONDICIONES
Tipo de prueba	Estática, sin renovación de la solución de prueba
Duración de la prueba	96 horas
Temperatura	$22.2 \pm 0.38^\circ\text{C}$
Oxígeno (mg/L)	$10.6 \pm 2.86$
pH	$8.9 \pm 0.93$
Salinidad (ppm)	$34.9 \pm 0.04$
Conductividad (mS/cm)	$53.1 \pm 0.20$
Intensidad lumínica (lux)	Artificial, controlada con luces LED $2053 \pm 221$
Fotoperiodo	Iluminación continua (24 horas luz)
Aireación	Agitación manual periódica durante toda la prueba. Si el oxígeno es menor de 6 mg/L se suministra aireación continua
Recipientes de prueba	Matraces erlenmeyer de 125 mL
Volumen de prueba	50 mL
Edad del cultivo para el inóculo	3 – 6 días (fase exponencial de crecimiento)
Agua de dilución	Agua de mar filtrada (una micra)
Cantidad de nutrientes	52 $\mu\text{L}$ de medio Guillard “f/2” modificado
Volumen de microalgas	2 mL
Densidad celular del inóculo	$900000 \text{ células/mL}^{-1}$
Número de Concentraciones más control	6
Réplicas por concentración	4
Efecto medido	Disminución de la biomasa microalgal respecto al control o blanco
Periodicidad de las observaciones	Conteo en hemocitómetro cada 24 horas para el cálculo de $\text{N}^\circ$ de células/mL
Criterio de aceptabilidad de la prueba	La densidad celular en el control negativo al finalizar la prueba (96h) debe ser $\geq 1 \times 10^6 \text{ cél./mL}$
Coefficiente de variación en los conteos de resultado final	$\leq 20$ por ciento entre réplicas de un mismo tratamiento $\text{CI}_{50-96\text{h}}$

**FUENTE: Elaboración propia**

**Tabla 27. Condiciones básicas para pruebas de toxicidad con elutriado de sedimento marino a 96 horas empleando *Isochrysis galbana*.**

PARÁMETROS	CONDICIONES
Tipo de prueba	Estática, sin renovación de la solución de prueba
Duración de la prueba	96 horas
Temperatura	21.0 ± 2.1°C
Oxígeno (mg/L)	11.86 ± 2.15
pH	8.81 ± 0.43
Salinidad (ppm)	35.9 ± 1.9
Conductividad (mS/cm)	55.9 ± 4.9
Intensidad lumínica (lux)	Artificial, controlada con luces LED 1953 ± 355 lux
Fotoperiodo	Iluminación continua (24 horas luz)
Aireación	Agitación manual periódica durante toda la prueba. Si el oxígeno es menor de 6 mg/L se suministra aireación continua
Recipientes de prueba	Matraces erlenmeyer de 125 mL
Volumen de prueba	50 mL
Edad del cultivo al inóculo	3 – 6 días (fase exponencial de crecimiento)
Agua de dilución	Agua de mar filtrada (una micra)
Cantidad de nutrientes	52 µL de medio Guillard “f/2” modificado
Volumen de microalgas	2 mL
Densidad celular del inóculo	80000 a 500000 células/mL <sup>-1</sup>
Número de Concentraciones más control	6
Réplicas por concentración	4
Efecto medido	Disminución de la biomasa microalgal respecto al control o blanco
Periodicidad de las observaciones	Conteo en hemocitómetro cada 24 horas para el cálculo de N° de células/mL
Criterio de aceptabilidad de la prueba	La densidad celular en el control negativo al finalizar la prueba (96h) debe ser $\geq 1 \times 10^6$ cél./mL
Coeficiente de variación en los conteos resultado final	$\leq 20$ por ciento entre réplicas de densidad microalgal de un mismo tratamiento CI <sub>50-96h</sub>
Control positivo	Cu (II), a partir de una solución de CuSO <sub>4</sub> .

**FUENTE: Elaboración propia**

**Tabla 28. Condiciones básicas para pruebas de toxicidad con elutriado de sedimento marino a 96 horas empleando *Nannochloropsis oceanica*.**

PARÁMETROS	CONDICIONES
Tipo de prueba	Estática, sin renovación de la solución de prueba
Duración de la prueba	96 horas
Temperatura	21.0 ± 0.7°C
Oxígeno (mg/L)	12.1 ± 0.82
pH	9.11 ± 0.74
Salinidad (ppm)	35.9 ± 1.9
Conductividad (mS/cm)	53.2 ± 0.33
Iluminación (lx)	Artificial, controlada con luces LED 1923 ± 376 lux
Fotoperiodo	Iluminación continua (24 horas luz)
Aireación	Agitación manual periódica durante toda la prueba. Si el oxígeno es menor de 6 mg/L se suministra aireación continua
Recipientes de prueba	Matraces erlenmeyer de 125 mL
Volumen de prueba	50 mL
Edad del cultivo al inóculo	3 – 6 días (fase exponencial de crecimiento)
Agua de dilución	Agua de mar filtrada (una micra)
Cantidad de nutrientes	52 µL de medio guillard f/2 modificado
Volumen de microalgas	2 mL
Densidad celular del inóculo	300000 a 2000000 células/mL <sup>-1</sup>
Número de Concentraciones más control	6
Réplicas por concentración	4
Efecto medido	Disminución de la biomasa microalgal respecto al control o blanco
Periodicidad de las observaciones	Conteo en hemocitómetro cada 24 horas para el cálculo de N° de células/mL
Criterio de aceptabilidad de la prueba	La densidad celular en el control negativo al finalizar la prueba (96h) debe ser $\geq 1 \times 10^6$ cél./mL
Coeficiente de variación en los conteos Resultado final	$\leq 20$ por ciento entre réplicas de un mismo tratamiento CI <sub>50-96h</sub>
Control positivo	Cu (II), a partir de una solución de CuSO <sub>4</sub> .

**FUENTE: Elaboración propia**

#### **4.5.1 Tipo de prueba**

Las pruebas de toxicidad realizadas fueron del tipo estático sin renovación, de acuerdo con USEPA (2002), en estos ensayos los organismos se exponen a la misma solución durante un período de tiempo establecido, que con poco uso de recursos (espacio, mano de obra, equipos) resultan sencillas, baratas y rentables. Esto permitió llevar a cabo una mayor cantidad de bioensayos en la misma cantidad de tiempo, 48 matraces, considerando dos estaciones de muestreo en “multiconcentración”.

#### **4.5.2 Duración de la prueba**

De acuerdo con ASTM (1998), una prueba de 72h o 96h permite evaluar varias generaciones de microalgas en un corto periodo de tiempo como es el caso de *Isochrysis galbana*, cuyo ciclo de vida es 38 horas según Kaplan et al. (1986) y 53 horas para el caso de *Nannochloropsis oceanica* según Bongiovani (2014), por tanto, se denominan pruebas crónicas a corto plazo. Para la USEPA (2002), esto implica algunas ventajas ya que proporcionan una estimación más directa de las concentraciones de efluentes en aguas receptoras que es proporcionada por ensayos de toxicidad aguda, a un menor esfuerzo si se compara con los bioensayos crónicos que se hacen con otras especies en los que se evalúa la toxicidad en un ciclo de vida completo más largo. Es así que USEPA (2002) afirma que las sustancias tóxicas en las soluciones de ensayo se pueden degradar o volatilizar rápidamente y la inhibición en el crecimiento de las microalgas puede ser detectable sólo durante los primeros uno o dos días en el ensayo, por lo tanto, se consideró trabajar en un periodo no mayor a 96 horas.

#### **4.5.3 Parámetros Físicoquímicos**

En todos los bioensayos realizados con el tóxico de referencia, el oxígeno inicial estuvo por encima de los  $6\text{mg/L}^{-1}$ , reflejándose un aumento en todos los tratamientos al final de los experimentos y cumpliendo con los parámetros establecidos por la USEPA (2002). Los valores de temperatura oscilaron en promedio entre  $21,83 - 21,94\text{ }^{\circ}\text{C}$  con tendencia a aumentar a  $22,38 - 22,58\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El oxígeno en promedio fluctuó al inicio entre  $8,44 - 8,45\text{ mg/L}$  con tendencia a aumentar entre  $12,62 - 13,29\text{ mg/L}$ . Asimismo, el pH se encuentra dentro del rango establecido por la metodología entre  $8,18 - 9,67$ . La salinidad no alcanzó



variaciones mayores a 0,21 entre el inicio y el final de las pruebas, encontrándose entre 53,01 - 53,22 mS/cm. De igual manera la salinidad no tuvo variaciones mayores a 0,05 ppm (Anexo 50 y 51).

Ya en los bioensayos realizados con los porcentajes de elutriado de sedimento marino se presentaron temperaturas promedio de 21°C; oxígeno entre 11,86 - 12,1 mg/L; pH entre 8,81 - 9,11; salinidad de 35,9 sin variación alguna y conductividad con una variación de 0,7 ppm, parámetros dentro de lo establecido por la USEPA (2002) para otros ensayos con microalgas.

Para el caso de la Bahía Tortugas-Casma, en marzo, el oxígeno inicial en la estación E3 fue menor de 6mg/L, por tal motivo se oxigenó por 5 minutos el elutriado al 100 por ciento, tiempo en el que este parámetro se recuperó, pero a las 48 horas en la concentración del 100 por ciento de elutriado disminuyó hasta 2 mg/L por tal motivo se oxigenó permanente hasta las 96 horas. Además, en agosto el oxígeno inicial del elutriado de sedimento de las estaciones E3 y E22 fue de 5,25 y 3,64 mg/L, respectivamente, recuperándose este parámetro a 8,49 y 7,5 mg/L, respectivamente después de la oxigenación artificial.

En la Bahía Paracas, en abril, la estación E20 se presentó oxígeno de 5,25 mg/L al oxigenarlo el valor llegó 8,99 mg/L. En las concentraciones al 50 y 100 por ciento de elutriado de sedimento los valores de oxígeno llegaron a 0,01 mg/L por lo que se aireó continuamente llegando hasta valores de 9,5 mg/L. En la estación E27 el oxígeno inicial fue 3,28 mg/L que con aireación llegó a valores de 7,21 mg/L, a las 24 horas en la concentración de elutriado de 6,25 por ciento y 12,5 por ciento llegó a valores de 3,9 mg/L que con aireación continua el oxígeno fue de 9,5 mg/L.

En setiembre en la Bahía Paracas las estaciones E10, E20, E27 y E28 presentaron valores bajos de oxígeno inicial al 100 por ciento del elutriado de sedimento marino y en su mayoría en las concentraciones de elutriado de sedimento de estas estaciones a las 24 horas estos valores fueron <1 mg/L por lo que se mantuvo aireación continúa hasta las 96 horas de ensayo.

#### **4.5.4 Intensidad lumínica**

Se utilizó iluminación artificial con cámara de iluminación LED de 240W, considerando el criterio de Wishkerman y Wishkerman (2017) quienes afirman que es un sistema que

producen luz blanca y colores mezclados en tiras de LED, así como la capacidad de generar luz intermitente. Además, de ser de bajo costo y promover el cultivo de especies fotoautotrófas.

De acuerdo con Sipaúba y Rocha (2003), la condición óptima para el crecimiento del fitoplancton dependerá de la intensidad de luz, siendo la iluminación un factor primordial porque el crecimiento algal está ligado directamente al proceso fotosintético. Asimismo, Lavens y Sorgelos (1996) aseguran que la intensidad lumínica juega un papel importante, pero los requerimientos varían dependiendo de la profundidad y densidad del cultivo, pues, estos mismos autores dan a conocer que 1000 lux son suficientes para frascos erlenmeyer del mismo volumen. Además, el promedio de luminosidad trabajado en los bioensayos es cercano al manejado por Velasco et al. (2009) para cultivos de microalgas en condiciones de laboratorio, donde a 1024 lux obtuvieron buenos resultados de crecimiento para *Isochrysis galbana* e intensidades lumínicas de 2,500 lux para el caso de *Nannochloropsis* spp. (Ynga, 2011), siendo los valores de intensidad de luminica en el presente estudio entre 1551 – 2619 lux (Anexo 52, 53 y 54).

#### 4.5.5 Recipiente de pruebas



Para las pruebas de toxicidad se emplearon erlenmeyers en vidrio de borosilicato de 125mL ó 250mL que según Velasco et al. (2009) éstos recipientes cumplen con el requerimiento establecido debido a que para el cultivo de microalgas estos deben ser de materiales no tóxicos, preferiblemente lisos y de fondo plano para evitar la sedimentación de las microalgas. Es así que Rojièková et al. (1998), compararon los cultivos de *Raphidocelis subcapitata* utilizando tubos de polietileno de 15mL y erlenmeyers en vidrio de borosilicato de 50 ó 100mL, probando tres compuestos metálicos, un pesticida y ocho medicamentos farmacológicos siendo comparables ambos materiales ( $p < 0.05$ ). En la técnica con tubos, el área superficial y la cantidad de volumen total del bioensayo permite la adherencia de algunos químicos en las paredes del tubo de polietileno, de esta forma se obtenían valores superiores de  $CE_{50}$  comparado con los erlenmeyers, estableciendo que el ensayo con tubos es conveniente cuando se van a evaluar muestras que contienen sustancias volátiles y que la agitación en el ensayo con recipientes de fondo plano como los erlenmeyers es homogénea y garantiza el intercambio de gases ( $CO_2$  y  $O_2$ ), el cual es un punto crítico de control durante el bioensayo.

#### 4.5.6 Edad de cultivo de las microalgas

(Lewis, 1993), mencionan que para determinar el efecto tóxico en el crecimiento algal de manera más efectiva es empleando microalgas enriquecidas con nutrientes por 3 a 4 días, siendo esta la etapa de crecimiento. Mientras que entre 6 y 8 días se presenta el estado estacionario siendo no viable el uso de la microalga en esta etapa para este tipo de pruebas de toxicidad (Bougaran et al., 2003). Para el caso de nuestro estudio generalmente los días de inoculación de las microalgas varió entre 3 y 6 días.

#### 4.5.7 Densidad celular del inóculo

En las pruebas de toxicidad la densidad del inóculo inicial de *Isochrysis galbana* varió entre  $8,4 \times 10^4$  cél/mL y  $4,8 \times 10^5$  cél/mL y para el caso de *Nannochloropsis oceanica* varió entre  $3,4 \times 10^5$  cél/mL y  $2,3 \times 10^6$  cél/mL (Tabla 27 y 28). Además, las diferentes densidades iniciales empleadas para pruebas de toxicidad a lo largo del estudio de investigación no presentaron diferencias significativas ( $p=0,328$ ) para *I. galbana* (Anexo 55) y ( $p=0,392$ ) ni para *N. oceanica* (Anexo 56).

Hay evidencia que la sensibilidad en una prueba de toxicidad aumenta, si la densidad celular inicial disminuye (Moreno et al., 1997). De igual forma Moreno-Garrido et al. (2000) mencionan que dependiendo de la densidad microalgal que se emplee puede mejorar los resultados obtenidos en pruebas de toxicidad, entre las especies que emplearon en su estudio se tienen a *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis atumus* con densidades iniciales de  $10^3$  cél/mL,  $5 \times 10^3$  cél/mL y  $10^4$  células/mL. Además, Wong y Couture (1986) recomiendan un inóculo de algas de aproximadamente  $10^5$  cél/mL que en promedio es el mismo factor exponencial empleado en estudios de investigación para pruebas de toxicidad (con sulfato de cobre y sedimento marino) al igual que Bougaran et al. (2003) que emplearon una densidad celular inicial de  $5 \times 10^5$  cél/mL en pruebas de cultivo continuo de *Isochrysis galbana* afines *Tahiti*. Asimismo, de acuerdo con Vasseur et al (1988), Stratton y Giles (1990) y Moreno et al. (2000), las directrices estándar de inhibición del crecimiento de las algas también utilizan densidades altas, en su mayoría 10,000-1,000.000 cél/mL, así como la densidad empleada para *Nannochloropsis oceanica* en sedimento marino que estuvo entre  $3,4 \times 10^5$  y  $2,3 \times 10^6$  cél/mL (tabla 28).

También la ASTM (1998) menciona ciertas densidades de especies de microalgas que se emplearon para bioensayos (Tabla 29).

**Tabla 29. Inóculos de microalgas utilizados para bioensayos de toxicidad en otros estudios.**

<b>Especie</b>	<b>Densidad celular utilizada como inóculo (células/mL)</b>
<i>Selenastrum capricornatum</i> y otras algas verdes	1-2x10 <sup>4</sup>
<i>Navicula pelliculosa</i>	1-2x10 <sup>4</sup>
<i>Microcystis aeruginosa</i>	5x10 <sup>4</sup>
<i>Anabaenaflos-aquae</i>	1-2x10 <sup>4</sup>
Especies de agua salada	1-2x10 <sup>4</sup>

**FUENTE: American Society for Testing and Materials (1998)**

#### 4.5.8 Criterio de aceptabilidad de la prueba de toxicidad

Respecto a este punto, Vera et al. (2001) mencionan que la máxima inhibición del crecimiento poblacional del 20 por ciento respecto al control negativo, cumpliendo este requisito en todas las estaciones muestreadas menos en la estación E27 que presentó una inhibición del 29 por ciento.

Además, para que una prueba tenga validez según la USEPA (2002), la densidad celular al final de cada ensayo en el tratamiento control debe ser igual o superior a 200.000cél./mL, sin más del 20 por ciento de coeficiente de variación entre réplicas, de la misma manera que se estableció en este estudio, obteniendo al finalizar cada prueba definitiva una densidad  $\geq 1 \times 10^6$  cél./mL, excepto en la estación E2 del primer monitoreo de la Bahía Tortugas-Casma que obtuvo una densidad de *Isochrysis galbana* de  $0,7 \times 10^6$  cél./mL (Anexo 6) en el control negativo, con CV entre réplicas menores al 15 por ciento (Anexo 57 y 58) al igual que en la estación E10 que empleando *Nannochloropsis oceanica* presentó un porcentaje de CV de 23,2 por ciento (Anexo 59).

Las pruebas de toxicidad llevadas a cabo cumplen con los criterios de calidad establecidos por entidades encargadas de la estandarización de pruebas de toxicidad a nivel internacional como la OCDE, EPA, ASTM, quienes consideran inaceptable una prueba si se presentan en los bioensayos más de las siguientes situaciones: todos los recipientes de

ensayo y tapas no fueron idénticos, los tratamientos no fueron asignados al azar, un medio de crecimiento requerido o de control no fue incluido en cada uno de los bioensayos, trabajar con menos de tres réplicas por tratamiento (USEPA, 2002). Todas estas condiciones se cumplieron en las pruebas de toxicidad realizadas en esta investigación, es decir que los bioensayos se ajustaron a los criterios de calidad básicos establecidos internacionalmente.

De acuerdo con la Organización para la Cooperación Económica (OECD, 1984), en las últimas dos décadas se han desarrollado protocolos internacionales estandarizados que cubren las exigencias científicas y prácticas para realizar ensayos de toxicidad con diferentes tipos de organismos marinos como peces, erizos y microalgas. En cuanto a este último grupo, existen algunos protocolos utilizados rutinariamente por agencias de protección ambiental en países como Estados Unidos, Canadá, Francia y Alemania, que son requeridos legalmente por la Comunidad Europea; sin embargo, debido a que las especies propuestas en los protocolos internacionales no son las mismas que se cultivan en IMARPE es importante evaluar el efecto de los contaminantes sobre otras especies como la microalga *I. galbana* y *N. oceanica*.

Como parte de este acápite de condiciones básicas para pruebas de toxicidad con las microalgas en estudio se considera las características que Greenstein y Bay (2011) aplican para realizar prueba de toxicidad, las mismas que se aplicarán a cada especie de microalga para ver si cumple o no con las características estipuladas por los autores (Tabla 30).

**Tabla 30. Características adicionales de las pruebas de toxicidad aplicadas a las microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica*.**

<b>Características</b> Greenstein y Bay (2011)	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Nannochloropsis oceanica</i>
<b>1.</b> Disponibilidad de organismos	Sí	Sí
<b>2.</b> Descripción del método, protocolo publicado, con criterios de aceptabilidad y estándares de aseguramiento de calidad para parámetros	Artículos científicos y adaptación de protocolos	Esta especie no ha sido aún empleada en pruebas de toxicidad
<b>3.</b> Dificultad técnica	No	No
<b>4.</b> Sensibilidad de la prueba	Más sensible ( $CI_{50} = 0,88$ mg/L) respecto a <i>Argopecten purpuratus</i> $CL_{50}(\text{mg/L}) = 1,41$ con sulfato de cobre ( $\text{Cu}_2\text{SO}_4$ ) (Paredes, 2018)	Sensibilidad similar ( $CI_{50} = 1,44$ mg/L) a <i>Argopecten purpuratus</i> $CL_{50}(\text{mg/L}) = 1,41$ con sulfato de cobre ( $\text{Cu}_2\text{SO}_4$ ) (Paredes, 2018)
<b>5.</b> Variabilidad entre laboratorios	No ejecutado	No ejecutado
<b>6.</b> Variabilidad dentro de los laboratorios	No ejecutado	No ejecutado
<b>7.</b> Precisión	No ejecutado	No ejecutado
<b>8.</b> Documentación de factores de toxicidad sobre factores no contaminantes, como el tamaño de grano del sedimento, por ejemplo	No detectado	No detectado
<b>9.</b> Costo de instalación de prueba de toxicidad	S/. 112 980,00 (Anexo 60)	

**FUENTE: Elaboración propia**

## V. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales en que se realizó esta investigación se concluye que:

1. Los sedimentos marinos provenientes de las Bahías Tortugas-Casma y Paracas presentan toxicidad al exponerlos a la microalga *Isochrysis galbana*, mientras que la microalga *Nannochloropsis oceanica* no detectó ningún nivel de toxicidad frente a estos sedimentos.
2. Se demostró que la sensibilidad de la microalga *Isochrysis galbana* es mayor que la de *Nannochloropsis oceanica*, al cabo de las 96 horas de exposición al tóxico de referencia, sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), detectando valores de  $\text{CI}_{50} = 0,88\text{mg/L}$  y  $\text{CI}_{50} = 1,44\text{mg/L}$ , respectivamente.
3. La microalga *Isochrysis galbana* (96h) registró una concentración de inhibición media ( $\text{CI}_{50}$ ) entre 4,3 por ciento y 77,15 por ciento de sedimento marino de las bahías Tortugas-Casma y Paracas, cuyo nivel de toxicidad es alta ( $\text{CI}_{50-96} < 59$  por ciento) y moderada ( $\text{CI}_{50-96} = 59$  por ciento-81 por ciento).
4. La toxicidad de los sedimentos marinos, en la Bahía Paracas es más alta que la encontrada en la Bahía Tortugas-Casma, posiblemente debido a las actividades antropogénicas y condiciones oceanográficas que se presentan en la bahía.
5. Con los bioensayos realizados empleando las microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica* se obtuvieron los criterios básicos para su réplica en base a la metodología propuesta por la USEPA (2002).

## VI. RECOMENDACIONES

1. Continuar con las pruebas de toxicidad de los sedimentos marinos en las Bahías de Tortugas-Casma y Paracas, de preferencia en mayores períodos de tiempo que puedan reflejar los impactos en épocas de mayor influencia antropogénica o cambios estacionales que puedan evidenciar el tránsito dinámico de contaminantes potenciales estacionales; ya que, el sedimento es un componente dinámico que funciona como hábitats de distintos organismos marinos, pero también actúa como una fuente de contaminación a través de la liberación de compuestos en el agua.
2. Evaluar las estaciones donde se han presentado ciertos niveles significativos de toxicidad que muestra el presente estudio de investigación con antiguos y nuevos monitoreos para que estos resultados obtenidos en este estudio, contribuyen a la generación de una línea de base para incorporar a la microalga *Isochrysis galbana* como especie prueba de monitoreo de ambientes acuáticos marinos contaminados.
3. Ampliar estudios ecotoxicológicos con otras especies de microalgas que se cultivan en el IMARPE para determinar la sensibilidad a la matriz de estudio y de esta manera tener más opciones para determinar la toxicidad en sedimentos marinos, ya que no existe más bibliografía de pruebas ecotoxicológicas con esta matriz de estudio.



## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, W., Kimerle, R. y Barnett, J. 1992. Sediment quality and aquatic life assessment. *Environ Sci Technol* 1992; 26:1865–75.
- Aguilar, C., Chang, I., Tenorio, L., Ynga Huamán, G., Oscanoa, A., y Flores, L. 2011. Compendio metodológico para la extracción de lípidos totales a partir de Biomasa Algal.
- Alagarsamy, R. 2006. Distribution and seasonal variation of trace metals in surface sediments of the Mandovi estuary, west coast of India. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 67: 333-339.
- Alayo, M. y Iannacone, J. 2002. Ensayos ecotoxicológicos con petróleo crudo, Diesel 2 y Diesel 6 con dos subespecies de *Brachionus plicatilis* Müller 1786 (Rotifera: Monogononta). *Gayana*. 66:45-58.
- Alayo, M., Iannacone, J. y Arrascue, A. 2004. Sensibilidad al cromo: Microbiopruebas con las diatomeas marinas *Isochrysis galbana* Parke y *Chaetoceros gracilis* Schütt. *Ecología Aplicada* 3(1,2):154-161.
- Albentosa, M., Pérez, A., Labarta, U., Fernández, M. 1996. Evaluation of live algal diets for the seed culture of *Ruditapes decussatus* using physiological and biochemical parameters. *Aquaculture* Vol. 148, Issue 1, Págs. 11-23.
- Alcaraz, Z., Badillo, M. y Venegas, C. 2008. Ensayo de toxicidad aguda con el pez *Xiphophorus montezumae*. En: Ramírez, P. y Mendoza, A. 2008. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelos, la experiencia en México. Secretaría de medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Alvarez, M., Javier R, Viguri, M., Casado, C y DelValls, A. 2007. Sediment Quality Assessment and Dredged Material Management in Spain: Part II, Analysis of Action Levels for Dredged Material Management and Application to the Bay of Cádiz. *Integrated Environmental Assessment and Management*. Volume 3, Number 4—pp. 539–551.

- ANA (Autoridad Nacional del Agua). 2016. Resolución Directoral N° 2288-2016—ANA-AAA-CH.CH. 07 de diciembre del 2016. Disponible en: <http://www.ana.gob.pe/sites/default/files/normatividad/files/rd-02288-2016-06.pdf>
- Andersen, R., Brett, R., Potter, D. y Sexton, J. 1998. Protist Phylogeny of the Eustigmatophyceae Based upon 188r DNA, with Emphasis on *Nannochloropsis*. Protist. Vol. 149,61-74.
- APHA (American Public health association). 1989. Estándar methods for examination of wáter and wasterwater. 17th. Ed. American health Association Washington, D.C.
- ASTM (American Society for Testing and Materials). 1990. Standard guide for conducting static 96h toxicity tests with microalgae, E1218-90.
- ASTM. 1991. Standard guide for conducting 10 days static sediment toxicity test with marine and estuarine amphipods. In: Annual Book of ASTM Standard. Vol. 11.04, E 1367-90. Philadelphia, PA, pp. 1052-1076.
- ASTM. 1998. Standard guide for conducting static 96-h toxicity tests with microalgae. 97 ed. Philadelphia (PA). p 7.
- Austin, B., y Austin, D. 1999. Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish, 3rd ed. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany.
- Barrera, G, Fernández, C., Wong, I.y Ramírez, P. 2013. La sensibilidad del grupo coliforme como indicador de la presencia de enterobacterias patógenas en cuatro cuerpos acuáticos de México. Hidrobiológica 23(1):87-96.
- Bay, S., Greenstein D., Young, D. 2007. Evaluation of methods for measuring sediment toxicity in California bays and estuaries. Technical Report 503. Southern California Coastal Water Research Project, Costa Mesa, CA, USA.
- Bay, S., Greenstein D., Diehl D. y Fetscher, A. 2014. Sediment quality assessment technical support manual. Southern California Coastal wáter research Project. Technical report 777 – January 2014.
- Beg, M., Al-Muzani, S., Saeed, T., Jacob, P., Beg, K., Al-Bahloul, M., Al-Matrouk, K., Al-Obaid, T. y Kurian, A. 2001. Chemical contamination and toxicity of sediment from a coastal area receiving industrial effluents in Kuwait. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 41: 289 – 297.
- Berrú, P., Tresierra, A., García, V., Cervantes, C. y Domínguez, N. 2005. Prospección bioceanográfica en el litoral de la Provincia de Casma: delimitación de zonas de pesca artesanal, bancos naturales de invertebrados y áreas propuestas para maricultura (22, 23, 24, 30 de junio; 01, 05-14 de julio del 2005). Unidad de

- investigaciones de invertebrados marinos Laboratorio Costero de Chimbote del Instituto del Mar del Perú. Informe parcial.
- Biesinger, K., Williams L., Van der Schalie, J. 1987. Procedures for conducting *Daphnia magna* toxicity bioassays. EPA/600/8 - 87/011. Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati, OH. 57 pp.
- Biggs, B. y Kilroy, C. 2000. Stream periphyton monitoring Manual. Christchurch, New Zeland: NIWA for Ministry for the Environment. 131 p.
- Biondi, N., Bassi, G., Chini Zittelli, D. Faveri, A. Giovannini, L. Rodolfi, M. 2013. *Nannochloropsis* sp. F&M-M24: oil production, effect of mixing on productivity and growth in an industrial wastewater, Environ. Prog. Sustainable Energy 32 (3) (20) 846–853.
- Bongiovani, N., Sánchez-Puerta, V., Popovich, C. y Leonardi, P. 2014. Molecular and phylogenetic identification of *Nannochloropsis oceanica* (Eustigmatophyceae) isolated from the southwestern Atlantic coast (Argentina). Biología marina y oceanografía Vol. 49, N°3:615-623.
- Bougaran G., Le Déan L., Lukomska E., Kaas R., Baron R. 2003. Transient initial phase in continuous culture of *Isochrysis galbana* affinis *Tahiti*. Aquatic living resources 16, 389-394.
- Brand L., Sunda W.G., Guillard R.R.L. 1986. Reduction of marine phytoplankton reproduction rates by copper and cadmium. Journal of experimental marine biology and ecology 96:225-250.
- Brown, M., Mular, M., Miller, I., Farmer, C. y Trenerry, C. 1999. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. Journal of Applied Phycology, 11: 247-255.
- Buccolieri, A., Buccolieri, G., Cardellicchio, N., Dell'Atti, A., Di Leo, A. y Maci, A. 2006. Heavy metals in marine sediments of Taranto Gulf (Ionian Sea, Southern Italy). Mar. Chem., 99: 227-235.
- Campisi, T., Abbondanzi, F., Casado, C., DelValls, T.A., Guerra, R. y Iacondini, A. 2005. Effect of sediment turbidity and color on light output measurement for Microtox Basic Solid-Phase Test. Chemosphere 60, 9-15.
- Carr, R., Biedenbach, J., Nipper, M. 2006. Influence of Potentially Confounding Factors on Sea Urchin Porewater Toxicity Tests. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51, 573–579 (2006).

- Carballo, O., Arencibia, G., Concepción, J. e Isla, M. 2010. Los bioensayos de toxicidad en sedimentos marinos. Revista de Toxicología en línea. p. 33-69. <http://hdl.handle.net/1834/3670>. Habana-Cuba.
- Casado, M., Campisi, T., Días, A., Lo Re, R., Obispo, R., Postman, J., Riba, I., Sneekes, A., Buceta, J., DelValls, T. 2006a. Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. II. Bioluminescence inhibition test for rapid sediment toxicity assessment. Cien. Mar.; 32: 129–38.
- Casado, M., Beiras, R., Belzunce, M., González-Castromil, M., Marín-Guirao, L., Postma, J. 2006b. Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. IV. Whole sediment toxicity test using crustacean amphipods. Cienc Mar 32: 149–57.
- Casado, M., Blasco, J., González-Castromil, M., Riba, I., DelValls, T. 2006c. Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. V. Whole sediment toxicity test using juveniles of the bivalve *Ruditapes philippinarum*. Cienc Mar 32:159–66.
- Cid, A., Herrero, C., Torres, E., Abalde, J., 1995. Copper toxicity on the marine microalgae *Phaeodactylum tricorotum*—effects on photosynthesis and relate parameters. Aquat. Toxicol. 31, 165–174.
- Cordero, J., Guevara, M., Morales, E., y Lodeiros, C. 2005. Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae). Revista de Biología Tropical, 53(3-4), 325-330. Retrieved August 07, 2018, from [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-77442005000200002&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442005000200002&lng=en&tlng=es).
- Cravero, M., Albarracín, I., Salomón, R., Parra, A. y Malerba, M. 2008. Crecimiento de *Nannchloropsis oculata* en efluente urbano estabilizado de la ciudad de Trelew, Chubut, Argentina. En resumen, I Congreso Latinoamericano de biotecnología Ambiental, II Congreso Latinoamericano de biotecnología algal, V Symposium Internacional sobre bioprocesos más limpios y desarrollo sustentable. 5 al 10 de octubre de 2008 Xalapa, Veracruz, México.
- Cronin, M., McGovern, E., McMahon, T., Boelens, R. 2006. Guidelines for the assessment of dredged material for disposal in Irish waters. Mar Envir Health Ser 2006;24: 1–56.

- Debelius, B., Forja, J., DelValls, A., y Lubián, L. 2009. Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(5), 1503–1513. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.04.006
- Delgado, C. y Gomero, R. 1995. Atlas sedimentológico de la plataforma continental peruana. Instituto del Mar del Perú. Informe N° 110.
- DelValls, T. y Conradi, M. 2000. Advances in marine ecotoxicology: laboratory test versus field assessment data on sediment quality studies. *Ciencias marinas*, vol. 26, núm. 1. pp 34-64. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, México.
- Droop, M. 1955. Some new supra-littoral protista. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 34: 233-245
- Díaz, M., Bustos, M. y Espinosa, A. 2014. Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos. 123 p. Universidad Nacional de Colombia. Primera edición. Bogotá, Colombia.
- Dornfeld, E., Espíndola, E., Fracácio, R., Rodríguez, B. y Novelli, A. 2006. Comparação do bioensaios laboratoriais e “in situ” utilizando *Chironomus xanthus* na avaliação da toxicidade de sedimentos do rio Monjolinho (Sao Carlos, SP). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*.1: 161-166.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. Fisheries Technical Paper. p.184
- FAO. 2017. Cultivo de microalgas. En la producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. (págs. 1-10). Estados Unidos. Food and agricultura Organización of the United Nations. Acceso: 26-08-2018. Disponible en: [http// www.Fao.org/docrep/field/003/ab473s/AB473S02](http://www.Fao.org/docrep/field/003/ab473s/AB473S02).
- Edding, M. y Tala, F. 1996. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57:617-624 © 1996 Springer-Verlag New York Inc. Copper Transfer and Influence on a Marine Food Chain.
- Engler, R., Long, E., Swartz, R., Di Toro, D., Ingersoll, C., Burgess, R., Gries, T., Berry, W., Burton, G., O'Connor, T., Chapman, P., Field, L., Porebski, L. 2005. Chronology of the development of sediment quality assessment methods in North America. In Wenning, R.J., Batley, G.E., Ingersoll, C.G., Moore, D.W., eds, *Use of Sediment Quality Guidelines and Related Tools for the Assessment of Contaminated Sediments*. SETAC Press, Pensacola FL, USA, pp 311–344.
- Environment Canada. 1992. Biological test method: Acute test for sediment toxicity using marine and estuarine amphipods. Rep. EPS 1/RM/26. Environmental Protection, conservation and Protection. Ottawa, Ontario.

- Fabregas, J., Herrero, C., Cabezas, B. y Abalde, J. (1985). Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentrations. *Aquaculture*, 49, 231-44.
- Fernández E. 2016. Producción de *Isochrysis galbana* (Parke, 1949) y *Chaetoceros calcitrans* (Takano, 1968) en ambientes semicontrolado y no controlado. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Chiclayo-Perú. 55 pág.
- Ferreira, M., Coutinho, P., Seixas, P., Fábregas, J. y Otero, A. 2009. Enriching rotifers with 'premium' microalgae *Nannochloropsis gaditana*. *Marine Biotechnology* 11: 585-595.
- Flores, R., Tam, J., Gutierrez, D. y Cabello, R. 2004. Informe técnico sobre la dinámica de la Bahía de Paracas y recomendaciones para su manejo. Informe interno del IMARPE.
- FONDEPES (Fondo Nacional de Desarrollo Pequero). 2013. Desembarcadero pesquero artesanal Los Chimus en Ancash será moderno, seguro y eficiente. Disponible en: <http://www.fondepes.gob.pe/index.php/the-joomla-project-3/240-desembarcadero-pesquero-artesanal-los-chimus-en-ancash-sera-moderno-seguro-y-eficiente>.
- Franklin, N., Stauber, J., Lim, R., 2001. Development of flow cytometry-based alga bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 160–170.
- Franklin, N., Stauber, J., Apte, S., Lim, R., 2002. Effect of initial cell density of the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 742–751.
- Gagné, F., Pardos, M., Blaise, C., Turcotte, P., Quémerais, B., Fouquet A. 1999. Toxicity evaluation of organic sediment extracts resolved by size exclusion chromatography using rainbow trout hepatocytes. *Chemosphere* 1999;39(9):1545–70.
- Garáte-Lizárraga I, González-Armas R, Tiburcio-Pintos G, Sánchez-García C, Olvera-Guevara G, Montero Becerril P. 2014. Fish die-offs along the southern coast of Baja California. *Harmful Algae News*.48(1):8-9.
- Disponible en: URL: <http://unesdoc.unesco.org/images/0022/002275/227586e.pdf>.
- Garibay, A., Vázquez-Duhalt, R., Sánchez, M; Serrano, L. y Martínez, A. 2009. Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología*. 13(3):38-61.
- Garro, T y Prado, J. 2007. Impactos ambientales del cultivo de concha de abanico en la Bahía de Samanco – Perú. Disponible en: <https://www.aquahoy.com/informe/710->

impactos-ambientales-del-cultivo-de-concha-de-abanico-en-la-bahia-de-samanco-peru

- Geffard, O., Su, E., Budzinski, H., Chiffolleau, J., Coynel, A., y Etcheber, H. 2004. Efectos del método de almacenamiento y la duración sobre la toxicidad de los sedimentos marinos a los embriones de *Crassostrea gigas*. *Reinar. Pollut.*, 129, 457-465.
- Gorbi, G., Corradi, M., Invidia, M. y Bassi, M. 2001. Light intensity influences chromium bioaccumulation and toxicity in *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 48: 36-42.
- Grados, C., Jacinto, M. y Cárcamo, E. 1994. Informe Técnico varazón de peces-Pisco 06 de enero. Informe interno del IMARPE.
- Grant J. y C. Bacher. 2001. A numerical model of flow modification induced by suspended aquaculture in a Chinese bay. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58(5): 1003-1011.
- Greenstein, D. y Bay, S. 2011. Southern California Coastal Water Research, 3535 Harbor Boulevard, Suite 110, Costa Mesa, California 92626, USA. Selection of Methods for Assessing Sediment Toxicity in California Bays and Estuaries. Integrated Environmental Assessment and Management.
- Hampel, M., Moreno-Garrido, I., Sobrino, C., Lubián, L. y Blasco, J. 2001. Acute toxicity of LAS homologues in marine microalgae: Esterase activity and inhibition growth as endpoints of toxicity. *Ecotoxicology and Environmental* 48, 287-292. Environmental Research, Section B.
- Hibberd, D. 1981. Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes *Eustigmatophyceae* and *Tribophyceae* (synonym Xanthophyceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 82: 93-119. [http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/informes/imarpe\\_epoa08\\_eval\\_anual08.pdf](http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/informes/imarpe_epoa08_eval_anual08.pdf).
- Horning, W. y Weber, C. 1985. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. EPA/600/4-85/014. Environmental monitoring and support laboratory, Cincinnati, OH. 162 pp.
- Huovinen, P. y Gómez, I. 2017. Algas en Ecotoxicología: Hacia el desarrollo de microbioensayos. *Revista Versión Diferente*. Año 14 N° 27 2017. Págs. 42-44. Acceso: 10-07-2018. Disponible en: <http://www.centroideal.cl/wp-content/uploads/2017/11/Rev-VD27-IDEAL.pdf>
- Iannacone, J. y Alvariño, L. 1998. Ecotoxicidad aguda del insecticida organofosforado temephos sobre *Chironomus calligraphus* Goeldi (Diptera: Chironomidae). *Acta entomológica chilena*. 22:51-53.



- Iannacone, J., Alvariño, L. y Gutierrez, A. 1999. Cinco ensayos ecotoxicológicos para evaluar metales pesados en el agua dulce. Boletín de la Sociedad Química del Perú Vol. LXV, marzo.
- Idoniboye-Obu, B. 1997. Bioelectric action potentials of *Procambarus acutus* (Girrad) in serially diluted solutions of selected C6 hydrocarbons in water. Environ. Pollut. 14: 5-24.
- IMARPE (Instituto del Mar del Perú). 2006. Identificación y delimitación de bancos naturales de invertebrados marinos, zonas de pesca artesanal y áreas propuestas para la maricultura en el Litotal de la Región Ancash. Vol.33(4). Callao-Perú.
- IMARPE. 2007. Estudio de línea base bahía Tortugas, 24 junio – 13 junio 2007. Disponible en: <http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/ACUISUBMENU4/lbase-tortuga.pdf>.
- IMARPE. 2008. Informe de Evaluación del Plan Operativo Institucional Anual 2008. Disponible en: [http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/informes/imarpe\\_epoa08\\_eval\\_anual08.pdf](http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/informes/imarpe_epoa08_eval_anual08.pdf)
- IMARPE. 2010. Informe Nacional sobre el Estado del Ambiente marino del Perú. Informe de consultoría. Convenio IMARPE – CPPS.
- INEI (Instituto Nacional de Estadística e informática). 2007. Censos Nacionales 2007. XI de población y VI de vivienda.
- INGEMMET (Instituto Geológico Minero y Metalúrgico). 2019. Disponible en: <http://geocatmin.ingemmet.gob.pe/geocatmin/>
- Ireland, D. y Ho, K. 2005. Toxicity tests for sediment quality assessments. In den Besten, P.J., Munawar, M., eds, Ecotoxicological Testing of Marine and Freshwater Ecosystems: Emerging Techniques, Trends, and Strategies. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp 1–42.
- Ismail, M., Phang, S., Tong S., Brown, M. 2002. A Modified Toxicity Testing Method Using Tropical Marine Microalgae. Environmental Monitoring and Assessment. Volumen 75, pp 145-154.
- Jacinto, M. 2014. Propuesta de un sistema de indicadores ambientales y socio económicos en la zona marino costera de Pisco-Paracas. Tesis (Mg.). Universidad Nacional de Ingeniería. Facultad de Ingeniería Ambiental. 190 p.
- Janssen C. 1998. Alternative assays for routine toxicity assessments. A review. In: Ecotoxicology. G. Schuurman y B. Marker (Eds). John Wiley & Sons. pp 813-839.



- Kaplan, D., Zvi Cohen, Z. y Abeliovich, A. 1986. Optimal Growth Conditions for *Isochrysis galbana*. *Biomass* (9)37-48.
- Karlson, B., Cusack C. y and Bresnan, E. 2010. Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Manual y guía 55. Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC). UNESCO.
- Karlson, B., Potter, D., Kuylenstierna, M. y Andersen, R. 1996. Ultrastructure, pigment composition, and 18S rRNA gene sequence for *Nannochloropsis granulata* sp. nov. (Monodopsidaceae, Eustigmatophyceae), a marine ultraplankton isolated from the Skagerrak, northeast Atlantic Ocean. *Phycologia* 35: 253-260.
- Krienitz, L., Hepperle, D., Stich, H. B. y Weiler, W. 2000. *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae), a new species of picoplankton from freshwater. *Phycologia* 39:219-227.
- Laino, R., Bello, R., Gónzales, M., Ramírez, N., Jiménez, F y Musálem. K. 2015. Concentración de metales en agua y sedimentos de la cuenca alta del río Grijalva, frontera México-Guatemala. *Tecnología y Ciencias del Agua*, vol. VI, núm. 4, julio-agosto de 2015, pp. 61-74.
- Lavens, P y Sorgeloos, P. 1996. Manual of the production and use of live food for aquaculture. Food and agriculture organization on the United Nations. N° 361. Rome, Italy, FAO. Technical paper. 295 p.
- LeGresley, M., y McDermott, G. 2010. Counting chamber methods for quantitative phytoplankton analysis—haemocytometer, Palmer-Maloney cell and Sedgewick-Rafter cell. *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. UNESCO (IOC Manuals and Guides), 25-30.
- Levy, J., Angel, B., Stauber, J., Poon, W., Simpson, S., Cheng, S., Jolley, D. 2008. Uptake and internalisation of copper by three marine microalgae: comparison of copper sensitive and copper tolerant species. *Aquat. Toxicol.* 89, 82–93.
- Lewis, M. 1993. Freshwater primary producers. En: *Handbook of ecotoxicology*. Calow. P. (Ed.). Blackwell Scientific Publ. U.K. pp.28-51.
- Liß, W. y Ahlf, W. 1997. Evidence from Whole-Sediment, Porewater, and Elutriate Testing in Toxicity Assessment of Contaminated Sediments. *Ecotoxicology y Environmental safety* 36, 140–147.
- Liu G., Chai X., Shao Y., Hu L., Xie Q., Wu H. 2011. Toxicity of copper, lead, and cadmium on the motility of two marine microalgae *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis chui*. *Environmental Sciences* 2011, 23(2) 330–335.

- Long, E., DD McDonald, S., Smith y Calder, F. 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environmental Management* 19(1):81-97.
- Lubian, L. 1982. *Nannochloropsis gaditana* sp. nov. una nueva Eustigmatophyceae marina. *Lazaroa* 4: 287-293.
- Lucho, C., Álvarez, M., Beltrán, R., Prieto, F. y Poggi, H. 2005a. A multivariate analysis of the accumulation and fractionation of major and trace elements in agricultural soil in Hidalgo State, Mexico irrigated with raw wastewater. *Environmental internacional* 31(3):313-23.
- Lüderitz, V. y Nickilish A. 1989. The effects of cooper toxicity to blue green algae. *Int. Rev. Gesamten Hydrobiol.* 74, pp. 283-291.
- Lujan, M. 2003. Estrategia para la gestión y desarrollo sustentable de la bahía de Samanco – Región Ancash, Perú . II Seminario Virtual de Ciencias del Mar. OANNES.
- Luoma, S. y Carter, J. 1990. Effects of trace metals on aquatic benthos. En: *Metal Ecotoxicology: Concepts and Applications* (Eds. M. Newman & A. McIntosh) pp. 261-300.
- Mallick, N. y Rai, L. 1989. Response of *Anabaena doliolum* to bimetallic combinations of Cu, Ni and Fe with special reference to sequential addition. *Journal of applied phycology* 1:301-306.
- Mandelli, E. 1969. The inhibitory effects of copper on marine phytoplankton. *Contributions in Marine Science* N° 14: 47-57.
- Manz, W., Krebs, F., Scgipper, C. y Den Besten, P. 2007. Status of ecotoxicological assessment of sediment and dredged material in Germany and The Netherlands. *Federal Institute of Hydrology in Germany.* 104 p.
- Marín, A., Gonzalez, H., Lapo, B., Molina, E. y Lemus, M. 2016. Niveles de mercurio en sedimentos de la zona costera de El Oro, Ecuador. *Gayana* 80(2):147-153.
- Martínez-Jerónimo, F. 2008. Ensayo de toxicidad crónica con microalgas clorofíceas. En: Ramírez, P. y Mendoza, A. 2008. *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelos, la experiencia en México* p. 89-98. Secretaría de medio Ambiente y Recursos Naturales
- Martínez-Jerónimo, F. y Espinosa, F. 2008. Ensayo de toxicidad aguda con larvas y juveniles de los peces *Brachydanio rerio* y *Poecilia reticulata*. En: Ramírez, P. y Mendoza, A. 2008. *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias*

- químicas en agua y suelos, la experiencia en México. Secretaría de medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Mendo, J., Wolff, M., Carbajal, W., Gonzáles, I. y Badjeck, M. 2008. Manejo y explotación de los principales bancos naturales de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en la costa Peruana. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 101–114.
- MINCETUR (Ministerio de Comercio exterior y turismo). 2008. Diagnóstico socio ambiental de la Reserva Nacional de Paracas y zona de amortiguamiento. Informe final Rev.0. Lima, agosto, 2008.
- Mitra M., Shah F., Bharadwaj S., Patidar S. y Mishra S. 2016. Cultivation of *Nannochloropsis oceanica* biomass rich in eicosapentaenoic acid utilizing wastewater as nutrient resource. *Bioresour Technol.* Oct; 218:1178-86
- Moreno, I., Gonzalez-Delvalle, M., y Lubián, L. M. 1997. Acumulación de cobre en microalgas usadas en acuicultura," pp. 279-286. Actas del VII Seminario de Química Marina, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz.
- Moreno, I., Lubián, L.M., Soares, A.M.V.M., 1999. Oxygen production rate as a test for determining toxicity of copper for *Rhodomonas salina* Hill and *Wehterbee* (Cryptophyceae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 776–782.
- Moreno I., Lubián L. y Soares A. 2000. Influence of celular density on determination of EC50 in microalgal growth inhibition tests. *Ecotoxicology and environmental safety* 47, 112- 116.
- Muciño-Márquez, R., Gárate-Lizárraga I, López-Cortés D. 2015. Variación estacional del género *Prorocentrum* (Dinophyceae) en dos granjas atuneras en la Bahía de La Paz, México *Acta biol. Colomb.* 20(1): 195-206. Disponible en:  
doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v20n1.42442>
- Munawar, M. 2003. *Sediment Quality Assessment and Management: Insight and Progress.* Michigan State University Press. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/10.14321/j.ctt13x0p28>.
- Nyholm N, y Peterson H. 1997. Laboratory bioassays with microalgae. En: Wang W, Gorsuch JW, Hughes JS (Eds), *Plants for Environmental Studies.* CRC Press. pp. 225-276. ISBN: 978-1-56670- 028-3.

- OEDC (Organización para la Cooperación Económica). 1984. Alga growth inhibition test: Test Guideline. Guidelines for Testing of Chemicals. June N°. 201, p. 2-14.
- Otero, A., García, D. y Fabregas J. 1997. Factors controlling eico-sapentaenoic acid production in semicontinuous cultures of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 9: 465-469.
- Paredes, C. 2016. Riesgo ecológico del sulfato de bario. Tesis de posgrado de ciencias ambientales. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Paredes, C. 2018. Determinación de la presión, estado y respuesta ambiental de las bahías Tortugas-Casma durante el año 2016.
- Parke, M. 1949. Studies on marine flagellates. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 28: 255-288.
- Pinilla, G. 1998. Indicadores biológicos en ecosistemas acuáticos continentales de Colombia. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Centro de Investigaciones. Bogotá, Colombia. 67 pp.
- Pinta, A. 2014. Evaluación de la toxicidad crónica de la fase suspendida particulada de un lodo de exploración de hidrocarburos offshore con la microalga *Isochrysis galbana* en condiciones de laboratorio. Tesis de Grado para optar al título de Ingeniero en Producción Acuícola.
- Portela, C., Arenzon, A. y Raya-Rodriguez, M. 2006. Avaliação ecotoxicológica do sedimento do arroio Sapucaia, RS, Brasil, através de ensaios de toxicidade utilizando diferentes amostradores e organismos-teste. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*. 1: 119-122.
- Power, E.A., Chapman, P.M. 1992. Assessing sediment quality. In Burton GA, ed, *Contaminated Sediment Toxicity Assessment*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp 1-18.
- Proceedings of 2010 3rd International Conference on Future BioMedical Information Engineering. 2010, China. Antialgal Substances from *Isochrysis galbana* and Its Effects on The Growth of *Isochrysis galbana* and Six Species of Feed Microalgae (Vol. 2).
- PRODUCE (Ministerio de la Producción). 2018. Catastro acuicola, Disponible en: <http://catastroacuicola.produce.gob.pe/web/>. Acceso: 10 de febrero del 2019.
- Renaud, S., Parry, D., Thinh, L., Kuo, C., Padovan, A. y Sammy, N. 1991. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp.,

- and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *Journal of Applied Phycology* 3: 347-356.
- Riba, I., Casado, C., Forja, J., DelValls A. 2004. Sediment quality in the Atlantic coast of Spain. *Environ. Toxicol.Chem.*, 23: 271-282.
- RIKZ (National Institute for Coastal and Marine Management). 1999. The 10d marine amphipod *Corophium volutator* mortality sediment toxicity test. Standard Operating Procedure Nr: SPECIE-01. 17 pp.
- Rojiéková, R.; Dvooáková, D. y Marsalek. B. 1998. The use of miniaturized algal bioassays in comparison to the standard flask assay. *Environmental toxicology Water Quality*.N°. 13, p. 235 - 241.
- Roleda, M.; S. Slocombe; R. Leakey; J. Day; E. Bell y M. Stanley. 2013. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresource Technology*. 129:439-449.
- Rosenthal, H. 2002. Interactions between coastal resource users: aquaculture, shipping and coastal urban development and their influence on changes in biodiversity. pp: 52-62. M. Eleftheriou & A. Eleftheriou (eds). *Proceedings of the ASEM Workshop AQUACHALLENGE, Beijing, April 27-30, 2002*. ACP-EU Fish. Res. Rep. (14): 185 pp.
- Rudolph A, P Medina, C Urrutia & R Ahumada. 2009. Ecotoxicological sediment evaluations in marine aquaculture areas of Chile. *Environmental Monitoring and Assessment* 155: 419-429.
- Rudolph A., Medina, P., Novoa V. Ahumada R., Cortés I. 2010. Calidad ecotoxicológica de sedimentos en sectores del mar interior de Chiloé Campaña (CIMAR 12 Fjordos). *Ciencia y Tecnología del Mar*, vol. 33, núm. 1, pp. 17-29.
- Rudolph A., Medina, P., Novoa V. Ahumada R., Cortés I. 2011. Calidad ecotoxicológica de los sedimentos en fiordos del sur de Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* Vol. 46, N°1: 79-84, abril.
- Rudolph A., Novoa V. Ahumada R. 2012. Evaluación de la calidad de los sedimentos en la zona de Fjordos de campos de hielo sur (Bahía San Quintín-Canal Wide) (46° 50' - 49° 58' S). *Ciencia y Tecnología del Mar*, vol. 35, pp. 19-31.
- Rudolph1, A. Novoa, V., Ahumada R., Saez, K. y Silva, N. Calidad de los sedimentos marinos entre el Estrecho de Magallanes y el Cabo de Hornos (Patagonia chilena)

- en función de pruebas de toxicidad. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* Vol. 49, Nº1: 7-16, abril 2014.
- Saravia, A. Y. 2007. Adaptación de un Método Analítico para el Análisis de Hidrocarburos Antropogénicos y Biogénicos en Sedimentos. Estero de Puntarenas, Costa Rica. (Tesis de Licenciatura inédita) Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica
- Saifullah, S. 1978. Inhibitory Effects of Copper on Marine Dinoflagellates. *Biologische Anstalt Helgoland, Meeresstation; Helgoland, Germany (FRG). Marine Biology* 44, 299-308.
- Sandnes J., Källqvist T., Wenner D. y Gislerød H. 2005. Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: linking cellular responses to large-scale biomass production. *Journal of Applied Phycology* (2015) 17: 515–525.
- Satoha A., Qalokece L., Kuranoa N., Miyachi S. 2005. Evaluation of the sensitivity of marine microalgal strains to the heavy metals, Cu, As, Sb, Pb and Cd. *Environment International* 31 (2005) 713 – 722.
- Silva, A. 1999. Efecto de la microalga *Isochrysis galbana* en el cultivo temprano de larvas de *Paralichthys adspersus*. *Ciencias marinas*, vol. 25, núm 2, junio 1999, pp. 267-276. Ensenada, México.
- Silva, S. y Jay, J. 1996. Crecimiento de *Chaetoceros* sp. y *Nitzschia* sp. en cultivo uni y bialgal a diferentes concentraciones de cobre. *Ciencia* 4(3), 2007-218.
- Simpson, S., Batley, G., Chariton, A., Stauber, J., Rey, C., Chapman, J., Hyne, R., Gale, S., Roach, C, y Maher, W. 2005. Manual para la Evaluación de la Calidad de Sedimentos (CSIRO: Bangor, Nueva Gales del Sur).
- Sipaúba, L. y Rocha, O. 2003. Produção de Plâncton (Fitoplânctonezooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos, São Carlos, Brasil, RiMa. p.18.
- Steeman N. y Bruun L. 1976. Effect of CuSO<sub>4</sub> on the photosynthetic rate of phytoplankton in four Danish lakes. *Oikos* 27:239-242.
- Steemann N. y Kamp-Nielsen L. 1970. Influence of deleterious concentrations of copper on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *Physiologia PI.* 23, 828-840.
- Stenton J., Probyn, T y Busby, A. 2001. Impact of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) raft-culture on benthic macrofauna, in situ oxygen uptake, and nutrient fluxes in Saldanha Bay, South Africa. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58(5): 1021-1031.
- Stratton, G. y Giles, J. 1990. Importance of bioassay volumen in toxicity tests using algae and aquatic invertebrates. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 44, 420-427.



- Strickland, D., Epley, R. y Rojas de Mendiola, B. 1969. Poblaciones de fitoplancton, nutrientes y fotosíntesis en aguas costeras peruanas. Bol. Inst. mar Perú V. 2 N°1. Callao-Perú.
- Stronkhorst, J. 2003. Ecotoxicological effects of Dutch harbour sediments. The development of an effects-based assessment framework to regulate the disposal of dredged material in coastal waters of the Netherlands. PhD Thesis, Vrije universiteit.
- Suda, S., Atsumi, M. y Miyashita, H. 2002. Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N.oceanica* sp.nov.(Eustigmatophyceae). *Phycologia* 41:2 73-279.
- Sukenik, A., Carmeli, Y. y Berner, T. 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *Journal of Phycology* 25: 686-692.
- Sutherland, T., S. Petersen, C. Levings & A. Martin. 2007. Distinguishing between natural and aquaculture- derived sediment concentrations of heavy metals in the Broughton Archipelago, British Columbia. *Mar. Pollut. Bull.*, 54(9): 1451-1460.
- Thain, J. 1992. Growth of the algae *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis suecica* in water and sediment elutriate samples from the German Bight. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91:229-231.
- Trenfield, M., Van Dam, J., Harford, A., Parry, D., Streten, C., Gibb, K. y Van Dam, R. 2015. Aluminium, Gallium and molybdenum toxicity the tropical marine microalga *Isochrysis galbana*. *Environmental toxicology and chemistry*, Vol. 34, N° 8, pp. 1833-1840. Impreso en USA.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1992. Sediment classification methods compendium. EPA 823-R-92-006, Washington DC.
- USEPA. 1994. Methods for assessing the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine amphipods. EPA/600/R-94/025.
- USEPA and United States Army Corps of Engineers. 1998. Evaluation of Dredged Material Proposed for Discharge in Waters of the U.S. - Testing Manual. EPA-823-B-98-004. USEPA. Washington, DC. Department of the army US army corps of engineers.
- USEPA. 2002. Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms. Fourth edition. U.S.

- Environmental Protection Agency Office of Water (4303T) 1200 Pennsylvania Avenue, NW Washington, DC.
- USEPA, 2009. Sediment Evaluation Framework for the Pacific Northwest. Acceso 06-07-2018. Disponible [http://www.nwp.usace.army.mil/Portals/24/docs/environment/sediment/2009\\_SEF\\_Pacific\\_NW.pdf](http://www.nwp.usace.army.mil/Portals/24/docs/environment/sediment/2009_SEF_Pacific_NW.pdf)
- Valdés, J. y Castillo, A. 2014. Evaluación de la calidad ambiental de los sedimentos marinos en el sistema de bahías de Caldera (27°S), Chile. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 42(3):497-513. Antofagasta-Chile.
- Valdés, J., Sifeddine, A., Mariano, C. y Ortlieb, L. 2004. Partículas de carbón en sedimentos marinos de la bahía Mejillones del Sur (23° S). Implicancias ambientales en un contexto histórico. *Investigaciones Marinas*, 32 (1): 93-99.
- Vásquez L, Tenorio L, Crispin M, Velazco F, Solís Juana. 2000. Caracterización física, química y geológica en la bahía de Samanco, Chimbote. Julio 2000. Informe progresivo N° 131. Inst. Mar Perú.
- Velasco L., Barros-Gómez, J., Ospina-Salazar, G. y Trujillo, C. 2009. Efecto de la intensidad lumínica, temperatura y salinidad sobre el crecimiento de la microalga *Isochrysis galbana* (clon T-ISO). En: *Rev. Intrópica*. Mayo. Vol. 4. p. 93-99
- Velazco, F. y Solís, J. 2000. Estudio sedimentológico de la bahía de Paracas. Informe Progresivo N° 133, noviembre 2000.
- Vera, G., Tam, J., Pinto, E. y Angulo, J. 2001. Efecto del cadmio sobre el crecimiento poblacional de la Diatomea marina *Chaetoceros gracilis* Schutt. *Revista peruana de Biología* 8(1): 45-52.
- Vasseur, P., Pandard, D., Burnel D. 1988. Influence of some experimental factors on metal toxicity to *Selenastrum capricornotum*. *Toxicol. Assess.*, 3. pp. 331– 343.
- Wenner, AM. 1987. Crustaceans and other invertebrates as indicator of beach pollution. In: Soule and GS Kleppel (eds.) *Marine organisms as Indicators* 199-229. Springer-Verlag. New York.
- Visviki, I. y Rachlin, J.W. 1992. Ultrastructural changes in *Dunaliella minuta* following acute and chronic exposure to copper and cadmium. *Archives of environmental contamination and toxicology* 23:420-425.
- Wishkerman, A., y Wishkerman, E. (2017). Application note: A novel low-cost open-source LED system for microalgae cultivation. *Computers and Electronics in Agriculture*, 132, 56–62. doi:10.1016/j.compag.2016.11.015.

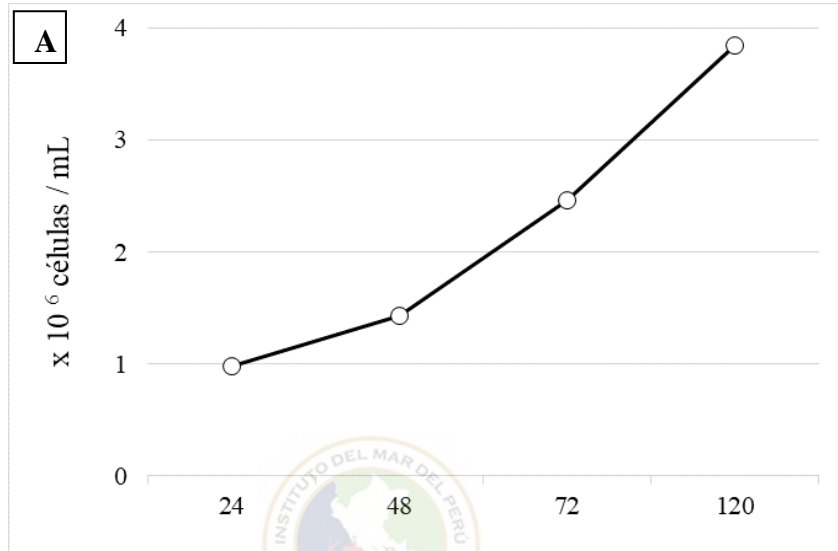


- Wong, P., y Couture, P. 1986. Toxicity screening using phytoplankton. In Toxicity Testing Using Microorganisms" Chap. 4, pp. 79-100. CRC press, Boca Raton, FL.
- Wong, P. y Dixon, D. 1995. Bioassessment of wáter Quality. Environ.Toxicol. Water Qual. 10:9-17.
- Yap, C., Ismail, A., Omar, H. y Tan, S. 2004. Toxicities and tolerances of Cd, Cu, Pb and Zn in a primary producer (*Isochrysis galbana*) and in a primary consumer (*perna viridis*). Environment international 29 (2004) 1097-1104.
- Ynga, G. 2011. Cultivo Masivo de Microalgas en Biorreactores Verticales. Tesis para optar el Título Profesional.Universidad Nacional de San Agustín Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias Escuela Profesional y Académica de Biología, Arequipa-Perú
- Zanuzzi, A.; Pierotto, M. y Prospero. 2005. Laboratorio de Hidrobiología. 2ed. Fac. CEF y N. Universidad Nacional de Córdoba, Colombia. p.219.
- Zhang, X., Lu, Z., Wang, Y., Wensel, P., Sommerfeld M., Hu Q. 2016. Recycling *Nannochloropsis oceanica* culture media and growth inhibitors characterization. Algal Research 20 (2016) 282–290.
- Zar, JH. 1996. Bioestatistical analysis. Prentice-Hall. 3ed. New York, USA. 718 p.

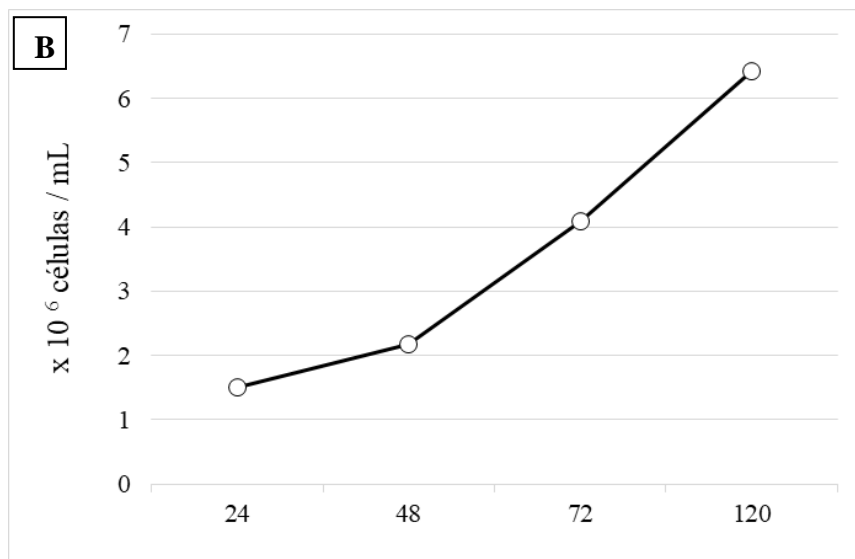


## VIII. ANEXOS

**ANEXO 1. Curva de crecimiento celular promedio de (A) *Isochrysis galbana* y (B) *Nannochloropsis oceanica* a las 24, 48, 72 y 120 horas.**



Tiempo (horas)	24	48	72	120
Densidad celular (Células/mL)	983333	1429167	2466667	3850000



Tiempo (horas)	24	48	72	120
Densidad celular (Células/mL)	1500000	2166667	4083333	6416667

**ANEXO 2. Concentración de Inhibición Media (CI50) de Sulfato de cobre pentahidratado (CUSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) expuesta a *Isochrysis galbana* a las 96 horas.**

<b>Sustancia tóxica</b>	Sulfato de cobre pentahidratado (CUSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O)
<b>Especie de microalga</b>	<i>Isochrysis galbana</i>
<b>Tiempo de exposición</b>	96 horas
<b>CI<sub>50-96</sub></b>	1.47 por ciento

**ANEXO 3. Tasa de crecimiento y diferencias significativas de la densidad celular promedio con inóculo de 5mL, 10mL y 100mL de *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica* a las 24, 48, 72 y 120 horas.**

Volumen de <i>Isochrysis galbana</i> (mL)	24	48	72	120	Tasa de crecimiento	Prueba -T
5	983333	1429167	2466667	3850000	0.34	0,000*
10	1795833	2345833	3329167	3354167	0.16	0,000*
100	5675000	9575000	10368750	15062500	0.24	0,000*

\* = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

Volumen de <i>Nannochloropsis oceanica</i> (mL)	24	48	72	120	Tasa de crecimiento	Prueba -T
5	1500000	2166667	4083333	6416667	0.36	0,010*
10	3833333	3333333	4250000	4500000	0.04	0,415
100	12000000	14000000	18916667	25833333	0.19	0,000*

\* = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

**ANEXO 4. Crecimiento celular promedio (células/mL) de *Isochrysis galbana* a las 24, 48, 72 y 96 horas expuestas a distintas concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado.**

	mg/L	24	48	72	96
Control	0	445000	1056875	1725000	2045000
C1	0,125	574375	1028750	2023125	2398750
C2	0,250	605313	1012500	1999063	3512083
C3	0,5	486875	1152500	1948438	3600000
C4	1	456250	1148750	1703333	997500
C5	2	293125	780938	836667	656875
C6	4	276563	257500	475000	129375

**ANEXO 5. Crecimiento celular promedio (células/mL) de *Nannchloropsis oceanica* a las 24, 48, 72 y 96 horas expuestas a distintas concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado.**

	mg/L	24	48	72	96
Control	0	3087500	4868750	12070313	13000000
C1	0,125	2358333	4306250	8206250	11231250
C2	0,250	2425000	4081250	10643750	11906250
C3	0,5	2262500	4800000	12666667	10393750
C4	1	2456250	4475000	11287500	11833333
C5	2	1200000	594306	1030556	721528
C6	4	898214	511285	446825	481250

**ANEXO 6. Crecimiento celular promedio (células/mL) y tasa de crecimiento ( $d^{-1}$ ) de *Isochrysis galbana* de la muestra control a las 0, 24, 48, 72 y 96 de las estaciones muestreadas en Bahía Tortugas-Casma en el mes de marzo del 2016.**

stación	0	24	48	72	96	Tasa de crecimiento
E2	216400	256719	331563	493906	797188	0.33
E3	370800	547500	1523333	2864167	3323125	0.55
E20	463500	844583	1819722	3823333	3256667	0.49
E22	484833	419500	1269167	998125	1273375	0.24
E31	116750	484542	751250	1723750	1994948	0.71
E32	270500	281875	326458	692396	1055833	0.34
E33	167000	492500	733542	1166250	1260833	0.51
E34	167000	867500	2097222	1172222	1324583	0.52

**ANEXO 7. Crecimiento celular promedio (células/mL) y tasa de crecimiento ( $d^{-1}$ ) de *Isochrysis galbana* de la muestra control a las 0, 24, 48, 72 y 96 de las estaciones muestreadas en Bahía Tortugas-Casma en el mes de agosto del 2016.**

Estación	0	24	48	72	96	Tasa de crecimiento
E3	138600	310156	626354	1040521	1838906	0.65
E4	138600	310156	626354	1040521	1838906	0.65
E5	250050	308750	674375	498438	1061563	0.36
E9	250050	308750	674375	498438	1061563	0.36
E12	312563	308750	674375	498438	1061563	0.31
E14	138600	310156	626354	1040521	1838906	0.65
E17	138600	310156	626354	1040521	1838906	0.65
E20	269667	476927	532240	992222	1311042	0.40
E22	269667	476927	532240	992222	1311042	0.40
E34	269667	476927	532240	992222	1311042	0.40

**ANEXO 8. Crecimiento celular promedio (células/mL) y tasa de crecimiento ( $d^{-1}$ ) de *Nannochloropsis oceanica* de la muestra control a las 0, 24, 48, 72 y 96 de las estaciones muestreadas en Bahía Tortugas-Casma en el mes de marzo del 2016.**

Estación	0	24	48	72	96	Tasa de crecimiento
E2	338400	1231469	2746875	2996875	1603125	0.39
E3	520000	1950000	5047917	6529167	14841667	0.84
E20	650000	2691667	5562500	9366667	12400000	0.74
E22	430500	2128125	3544444	4920833	5262500	0.63
E31	433750	1563487	2515625	4352083	5309375	0.63
E32	423000	1919792	4713542	5151042	7702083	0.73
E33	-	3216667	3595833	5941667	9579167	-
E34	-	2734375	5127778	7095833	9545833	-

**ANEXO 9. Crecimiento celular promedio (células/mL) y tasa de crecimiento ( $d^{-1}$ ) de *Nannochloropsis oceanica* de la muestra control a las 0, 24, 48, 72 y 96 de las estaciones muestreadas en Bahía Tortugas-Casma en el mes de agosto del 2016.**

Estación	0	24	48	72	96	Tasa de crecimiento
E3	2144000	1253125	2384375	3284375	6261458	0.27
E4	2144000	1253125	2384375	3284375	6261458	0.27
E5	2044000	1037500	1395139	1752778	7537500	0.33
E9	2044000	1037500	1395139	1752778	7537500	0.33
E12	2044000	1037500	1395139	1752778	7537500	0.33
E14	2144000	1253125	2384375	3284375	6258333	0.27
E17	2144000	1253125	2384375	3284375	6258333	0.27
E20	1499167	1573810	2538889	2787500	2496875	0.13
E22	1499167	1573810	2538889	2787500	2496875	0.13
E34	1499167	1573810	2538889	2787500	2496875	0.13

**ANEXO 10. Crecimiento celular promedio (células/mL) y tasa de crecimiento ( $d^{-1}$ ) de *Isochrysis galbana* de la muestra control a las 0, 24, 48, 72 y 96 de las estaciones muestreadas en Bahía Paracas en el mes de abril del 2016.**

Estación	0	24	48	72	96	Tasa de crecimiento
E19		507917	560556	621042	811111	
E20	92250	298125	504792	871458	1190833	0.64
E23		250625	221389	134375	279896	
E27	142200	269375	918056	735625	1117083	0.52
E29	213833	413542	474375	423542	530990	0.23
E10A	142200	229375	602188	758333	1303333	0.55

**ANEXO 11. Crecimiento celular promedio (células/mL) y tasa de crecimiento ( $d^{-1}$ ) de *Isochrysis galbana* de la muestra control a las 0, 24, 48, 72 y 96 de las estaciones muestreadas en Bahía Paracas en el mes de setiembre del 2016.**

Estación	0	24	48	72	96	Tasa de crecimiento
E8	264400	395000	556302	1256651	1990052	0,40
E10	264400	395000	556302	1256651	1990052	0,40
E11	84400	215469	296458	596042	818542	0,33
E12	84400	215469	296458	596042	818542	0,33
E19	84400	215469	296458	596042	818542	0,33
E23	84400	215469	296458	596042	818542	0,33
E25	84400	208073	573333	753906	1299167	0,46
E27	84400	208073	573333	753906	1299167	0,46
E28	84400	208073	573333	753906	1299167	0,46
E29	84400	208073	573333	753906	1299167	0,46

**ANEXO 12. Crecimiento celular promedio (células/mL) y tasa de crecimiento ( $d^{-1}$ ) de *Nannochloropsis oceanica* de la muestra control a las 0, 24, 48, 72 y 96 de las estaciones muestreadas en Bahía Paracas en el mes de abril del 2016.**

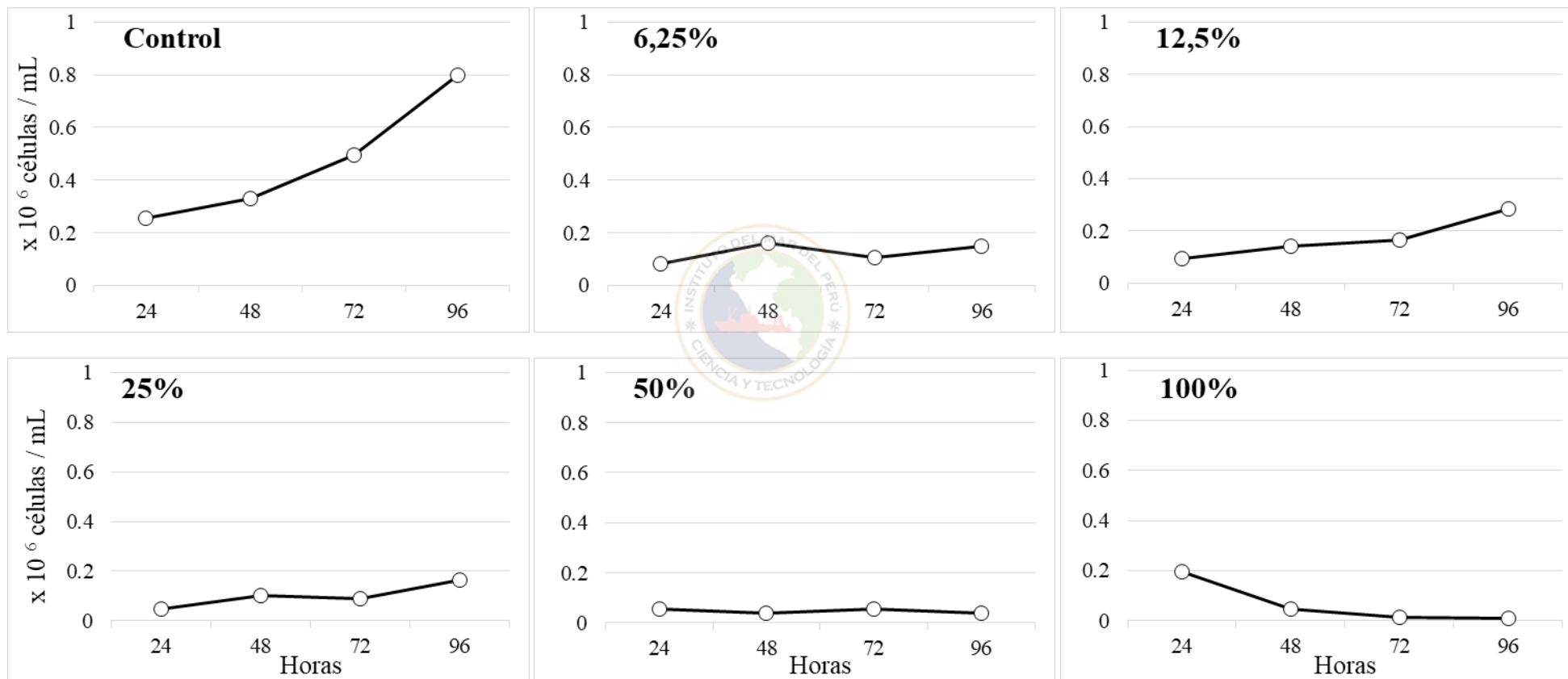
Estación	0	24	48	72	96	Tasa de crecimiento
E19		2504167	5100000	7212500	13345833	-
E20	2310000	2216667	4404167	6750000	10422222	0.38
E23		1812500	5058333	5525000	10954167	-
E27	1147200	1340774	2975000	4091667	7783333	0.48
E29	1060833	2041667	3772917	4033333	3404167	0.29
E10A	1147200	1521875	2204167	4912500	7787500	0.48

**ANEXO 13. Crecimiento celular promedio (células/mL) y tasa de crecimiento ( $d^{-1}$ ) de *Nannochloropsis oceanica* de la muestra control a las 0, 24, 48, 72 y 96 de las estaciones muestreadas en Bahía Paracas en el mes de Setiembre del 2016.**

<b>Estación</b>	<b>0</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>	<b>Tasa de crecimiento</b>
E8	1584000	2128125	3613542	7120833	10445833	0,40
E10	1584000	2128125	3613542	7120833	10445833	0,40
E11	1368000	2204167	3445833	4830208	9412500	0,36
E12	1368000	2204167	3445833	4830208	9412500	0,36
E19	1368000	2204167	3445833	4830208	9412500	0,36
E23	1368000	2204167	3445833	4830208	9412500	0,36
E25	1368000	2320833	3404167	5208333	5218750	0,20
E27	1368000	2320833	3404167	5208333	5218750	0,20
E28	1368000	2320833	3404167	5208333	5218750	0,20
E29	1368000	2320833	3404167	5208333	5218750	0,20

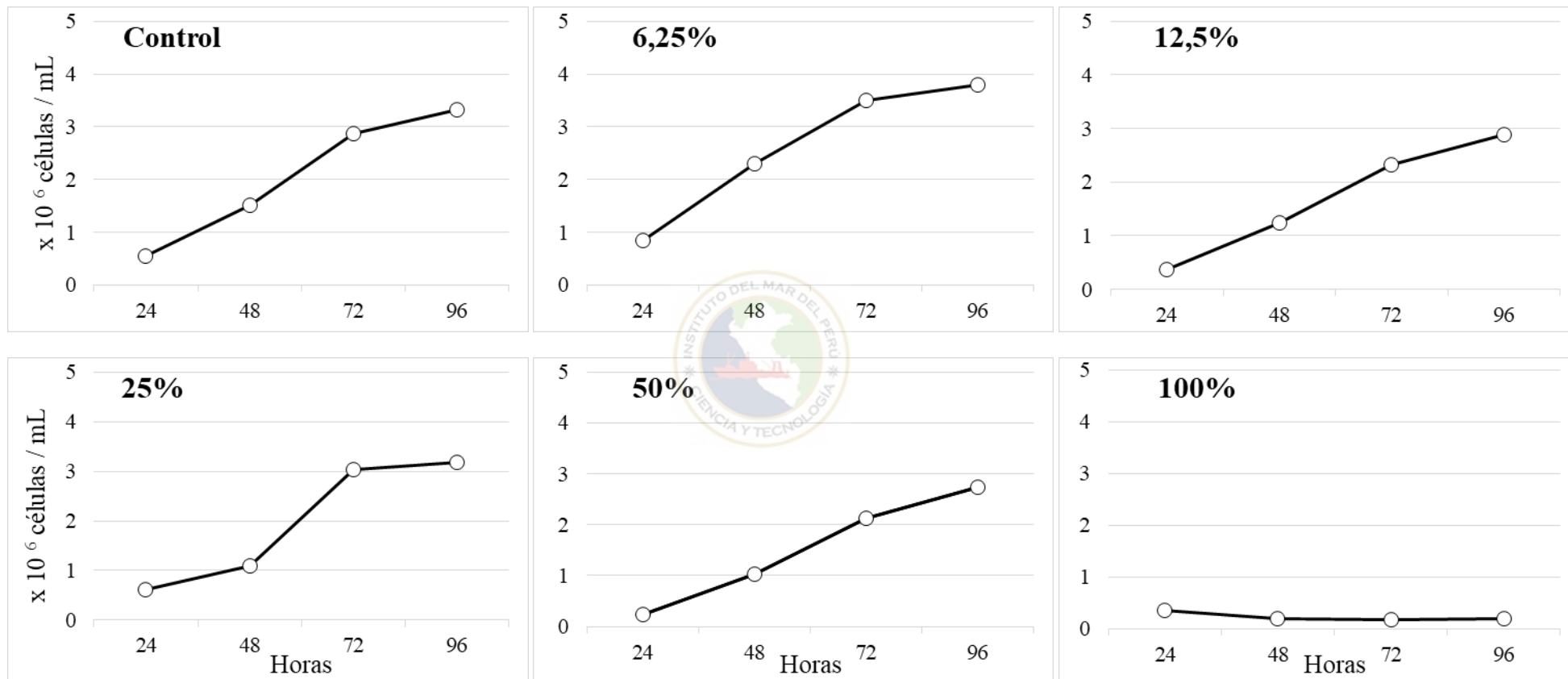


**ANEXO 14. Relación entre el crecimiento de *Isochrysis galbana* (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E2 en la Bahía Tortugas-Casma, marzo 2016.**

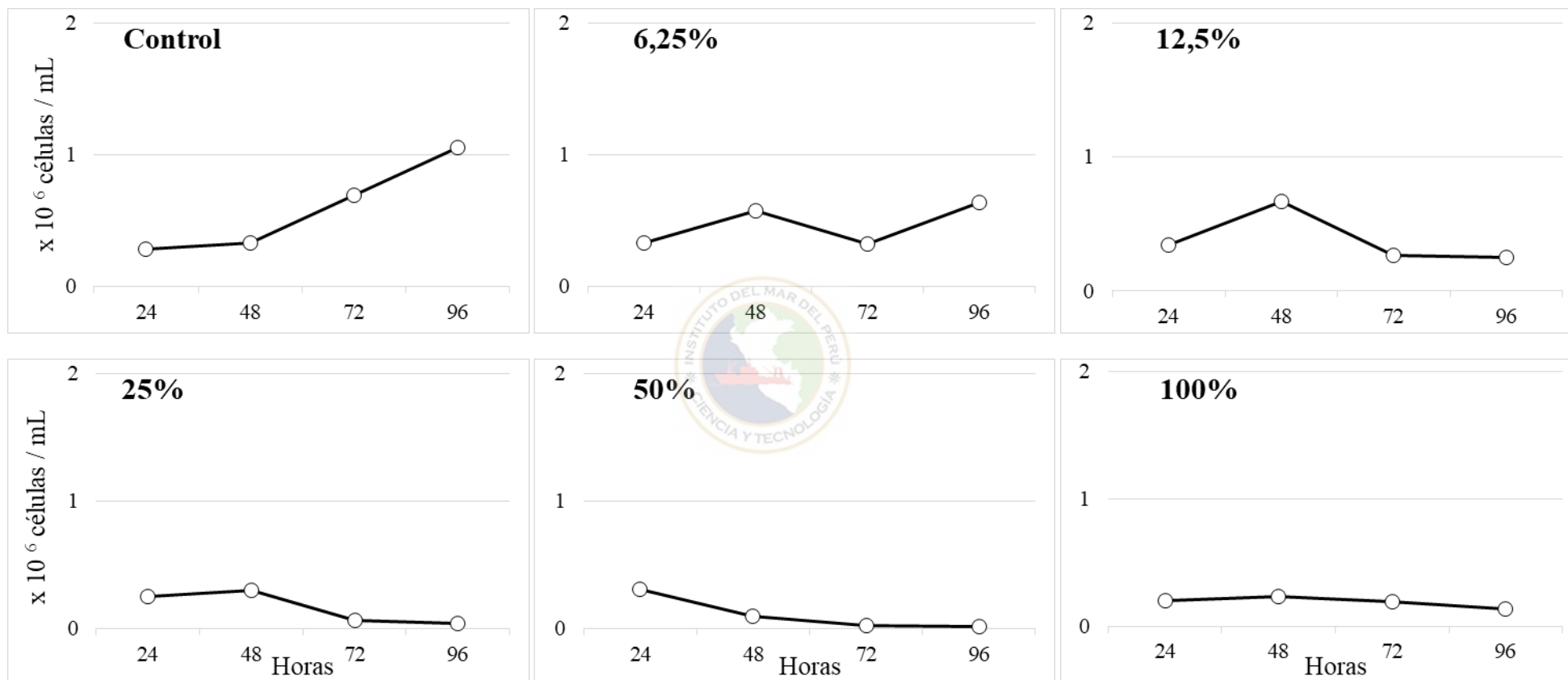




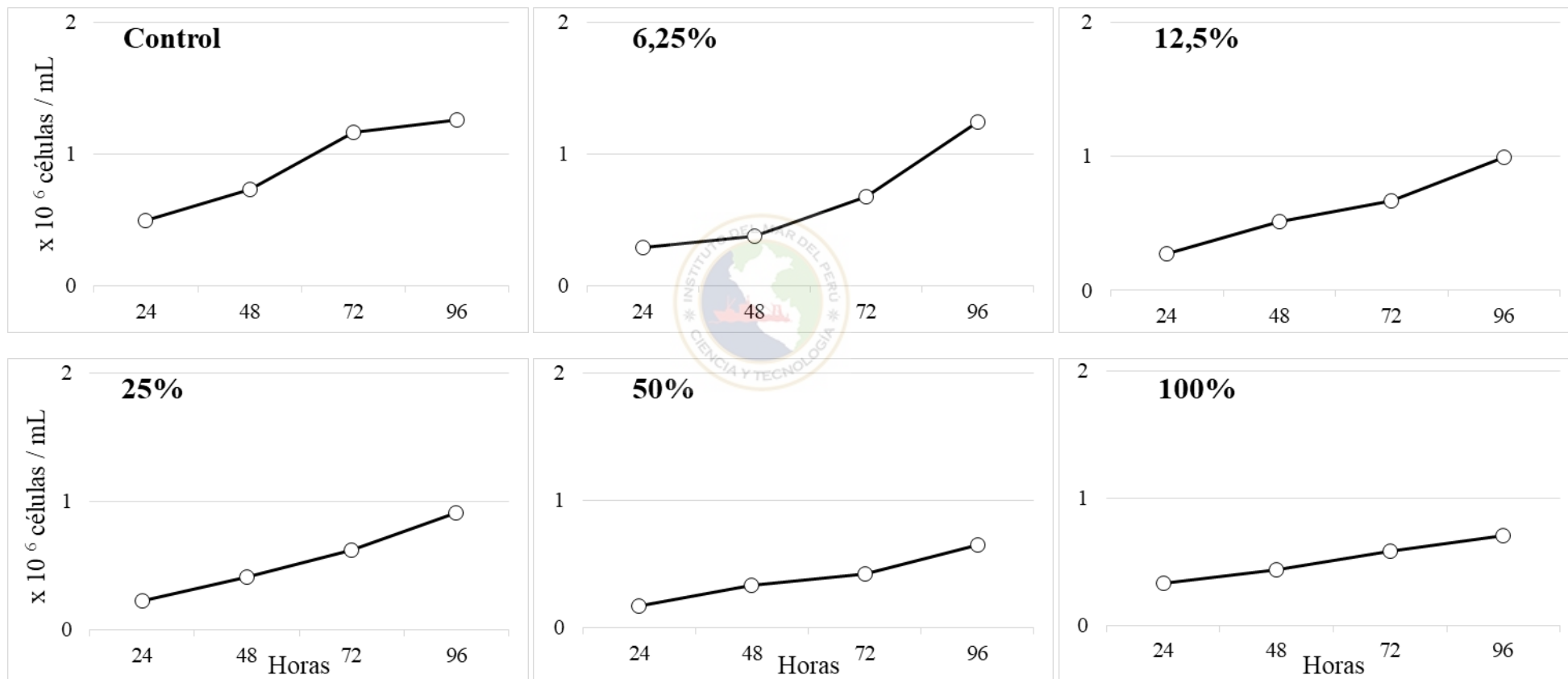
**ANEXO 15. Relación entre el crecimiento de *Isochrysis galbana* (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E3 en la Bahía Tortugas-Casma, marzo 2016.**



**ANEXO 16. Relación entre el crecimiento de *Isochrysis galbana* (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E32 en la Bahía Tortugas-Casma, marzo 2016.**



**ANEXO 17. Relación entre el crecimiento de *Isochrysis galbana* (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E33 en la Bahía Tortugas-Casma, marzo 2016.**



**ANEXO 18. Valores de Parámetros físicoquímicos (t=0h y t=96h) para la prueba de toxicidad de la microalga *Isochrysis galbana* con porcentaje de dilución de elutriado de sedimento marino en la Bahía Tortugas-Casma de las estaciones de muestreo en marzo del 2016.**

Estación de muestreo	Tiempo	Temperatura (°C)	Oxígeno (mg/L)	pH	Conductividad (mS/cm)	Salinidad (ppm)
E2	0 horas	20,02	9,30	8,25	52,87	34,62
	96 horas	20,28 ± 0,15	9,86 ± 1,19	8,19 ± 0,17	52,93 ± 0,6	34,65 ± 0,46
E3	0 horas	19,87	8,94	8,21	53,67	35,32
	96 horas	22,31 ± 0,27	14,18 ± 3,06	8,64 ± 0,20	53,57 ± 0,28	35,20 ± 0,23
E32	0 horas	20,30	8,91	8,24	53,43	35,03
	96 horas	20,74 ± 0,23	11,09 ± 2,45	8,39 ± 0,39	53,41 ± 0,11	35,04 ± 0,08
E33	0 horas	8,26	20,03	20,07	20,03	33,27
	96 horas	20,41 ± 0,08	13,44 ± 1,2	8,96 ± 0,32	51,22 ± 1,81	33,43 ± 1,34

**ANEXO 19. Valores de significancia de los parámetros físicoquímicos de las pruebas de toxicidad en dilución de elutriado de sedimento marino de la Bahía Tortugas-Casma empleando *Isochrysis galbana* (cero y 96 horas), muestreadas en marzo del 2016.**

Estación de muestreo	Fecha de muestreo	Parámetros Físicoquímicos				
		Temperatura (°C)	Oxígeno (mg/L)	pH	Conductividad (mS/cm)	Salinidad (ppm)
E2	19/03/2016	0,031**	0,333	0,460	0,689 <sup>+</sup>	0,936**
E3	20/03/2016	0,000*	0,066	0,001*	0,517	0,462
E32	16/03/2016	0,006*	0,097	0,425	0,630	0,851
E33	17/03/2016	0,001*	0,0051*	0,002*	0,812	0,755

\* = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), Prueba-T de Student

\*\* = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), Prueba U de Mann-Whitney

**ANEXO 20. Valores de significancia del crecimiento de *Isochrysis galbana* en el control negativo a las 24 y 96 horas en la Bahía Tortugas-Casma, marzo del 2016.**

Estaciones de muestreo	Marzo
	<i>p</i> value
E2	0,000*
E3	0,023*
E32	0,016*
E33	0,030**

\* = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), prueba-T de Student

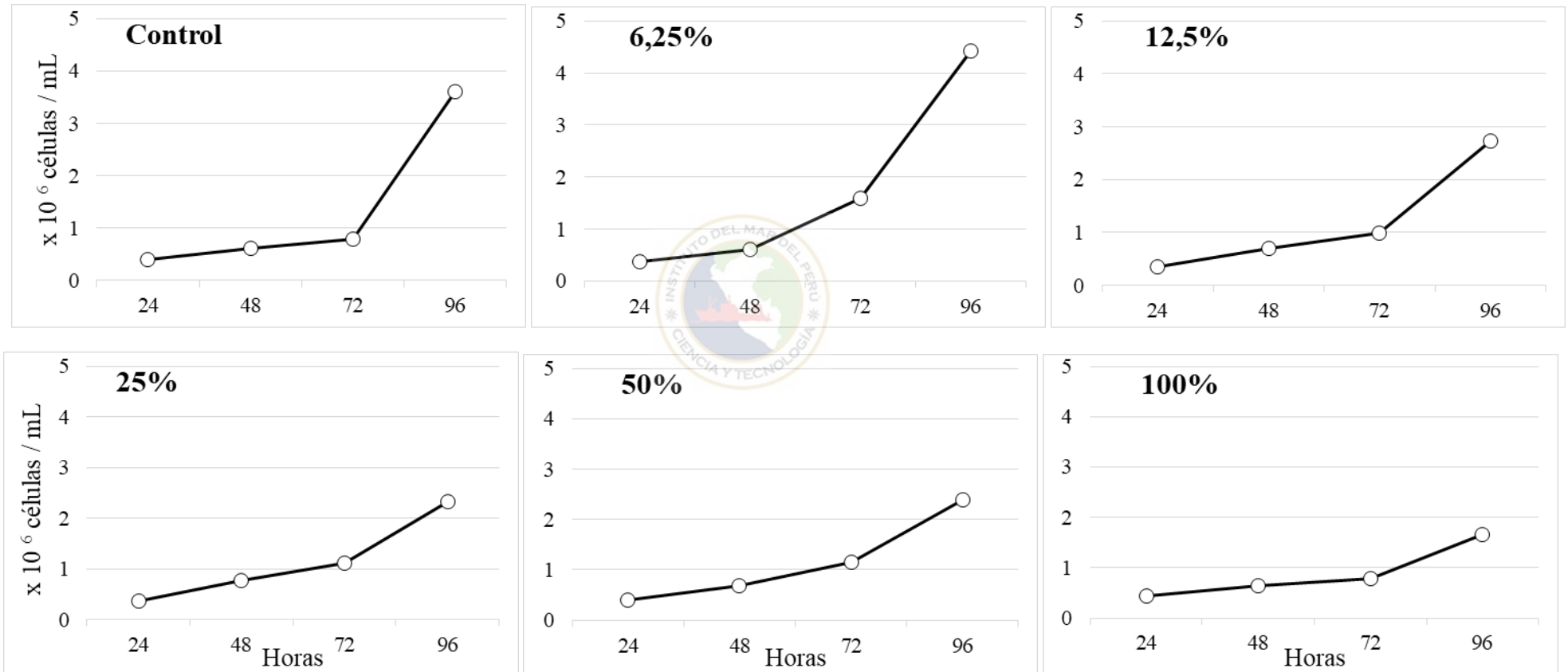
\*+ = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), prueba Mann-Whitney

**ANEXO 21. Valores de significancia ( $p < 0,05$ ) de la densidad microalgal media de *Isochrysis galbana* al finalizar la prueba de toxicidad (96 horas) con porcentaje del elutriado del sedimento marino en la Bahía Tortugas-Casma, en marzo del 2016.**

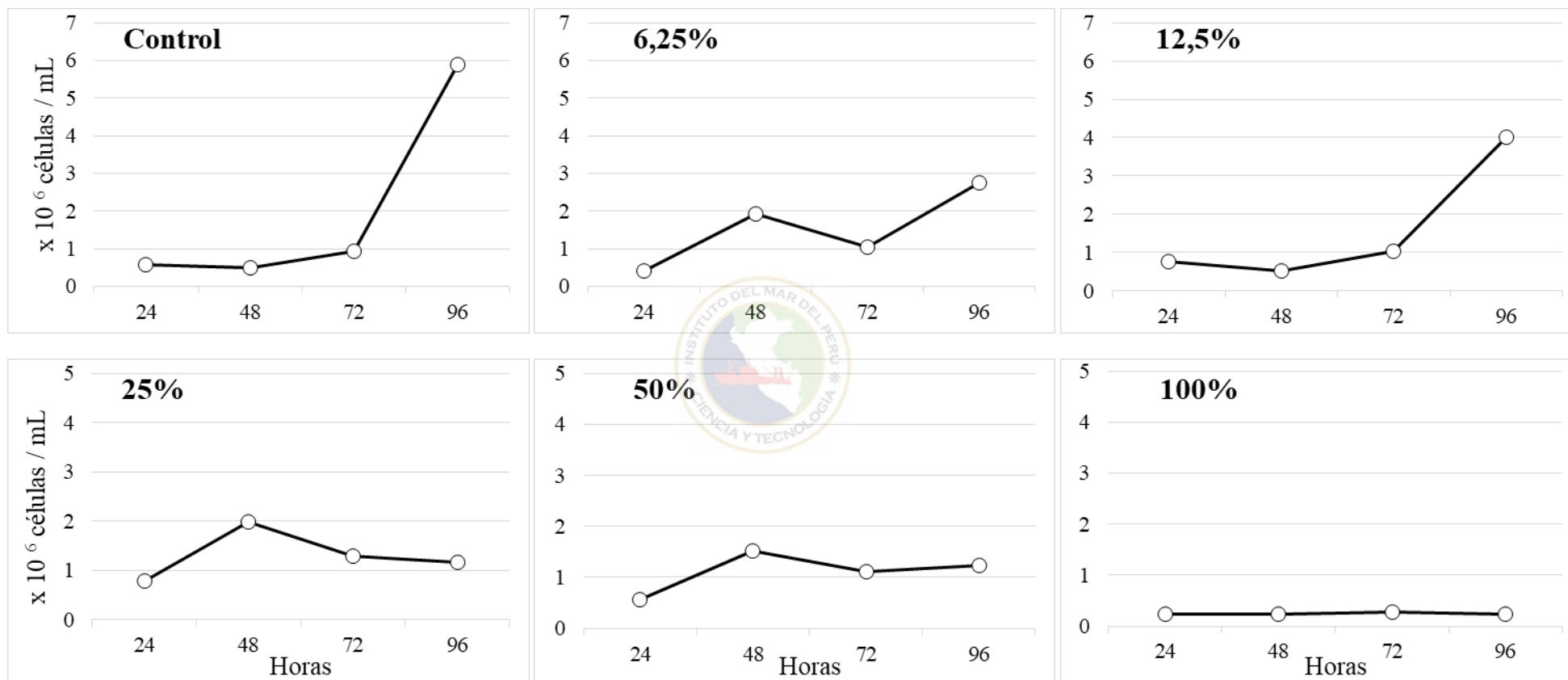
Estación de muestreo	Levene's	Shapiro Wilks	Kruskal Wallis
E2	0,038	0,000	0,001*
E3	0,000	0,043	0,001*
E32	0,000	0,000*	0,050*
E33	0,008	0,001	0,004*

\* = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

**ANEXO 22. Relación entre el crecimiento de *Isochrysis galbana* (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E3 en la Bahía Tortugas-Casma, agosto del 2016.**



**ANEXO 23. Relación entre el crecimiento de *Isochrysis galbana* (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E22 en la Bahía Tortugas-Casma, agosto del 2016.**



**ANEXO 24. Valores de Parámetros físicoquímicos (t=0h y t=96h) para la prueba de toxicidad de la microalga *Isochrysis galbana* con porcentaje de dilución de elutriado de sedimento marino en la Bahía Tortugas-Casma de las estaciones de muestreo en agosto del 2016.**

Estación de muestreo	Tiempo	Temperatura (°C)	Oxígeno (mg/L)	pH	Conductividad ( mS/cm )	Salinidad (ppm)
E3	0 horas	19,50	8,99	8,32	53,40	34,95
	96 horas	20,48 ± 0,28	10,56 ± 1,09	8,97 ± 0,38	53,23 ± 0,61	34,86 ± 0,44
E22	0 horas	20,20	8,45	8,05	52,90	34,60
	96 horas	19,3 ± 3,91	13,47 ± 3,16	9,01 ± 0,42	53,33 ± 0,1	34,97 ± 0,05

**ANEXO 25. Valores de significancia de los parámetros físicoquímicos de las pruebas de toxicidad en dilución de elutriado de sedimento marino de la Bahía Tortugas-Casma empleando *Isochrysis galbana* (cero y 96 horas), agosto del 2016.**

Estación de muestreo	Fecha de muestreo	Parámetros Físico-químicos				
		Temperatura (°C)	Oxígeno (mg/L)	pH	Conductividad (mS/cm)	Salinidad (ppm)
E3	17/08/2016	0,005**	0,000*	0,000*	0,298 <sup>+</sup>	0,769
E22	18/08/2016	0,045**	0,000*	0,000*	0,008**	0,008**

\* = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), prueba-T de Student

\*<sup>+</sup> = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), prueba Mann-Whitney

**ANEXO 26. Valores de significancia del crecimiento de *Isochrysis galbana* en el control negativo a las 24 y 96 horas en la Bahía Tortugas-Casma, agosto del 2016.**

Estaciones de muestreo	Agosto
	<i>p</i> value
E3	0,014*
E22	0,016*

\* = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), prueba-T de Student



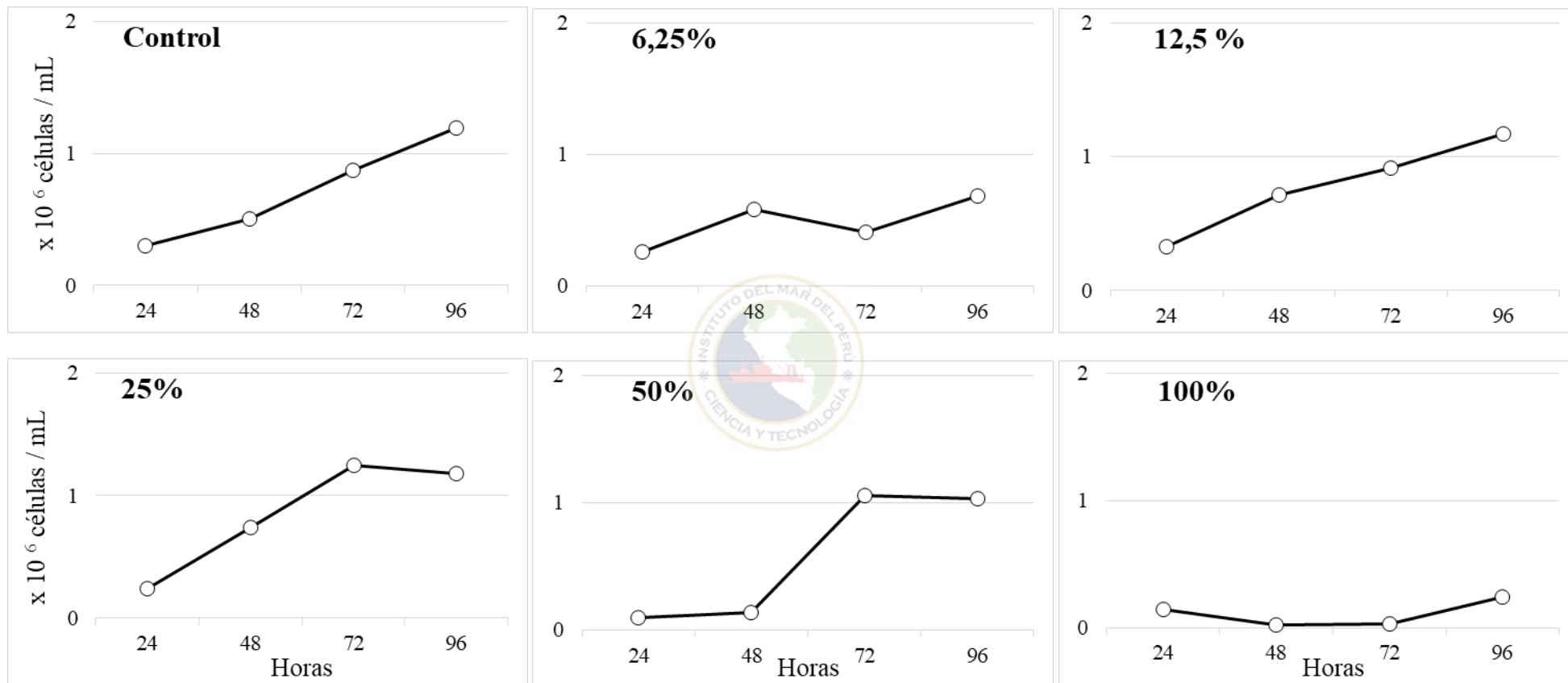
**ANEXO 27. Valores de significancia ( $p < 0,05$ ) de la densidad microalgal media de *Isochrysis galbana* al finalizar la prueba de toxicidad (96 horas) con porcentaje de dilución de elutriado del sedimento marino en Bahía Tortugas-Casma, agosto del 2016.**

<b>Estación de muestreo</b>	<b>Levene's</b>	<b>Shapiro Wilks</b>	<b>Kruskal Wallis</b>
E3	0,000	0,010	0,003*
E22	0,006	0,018	0,000*

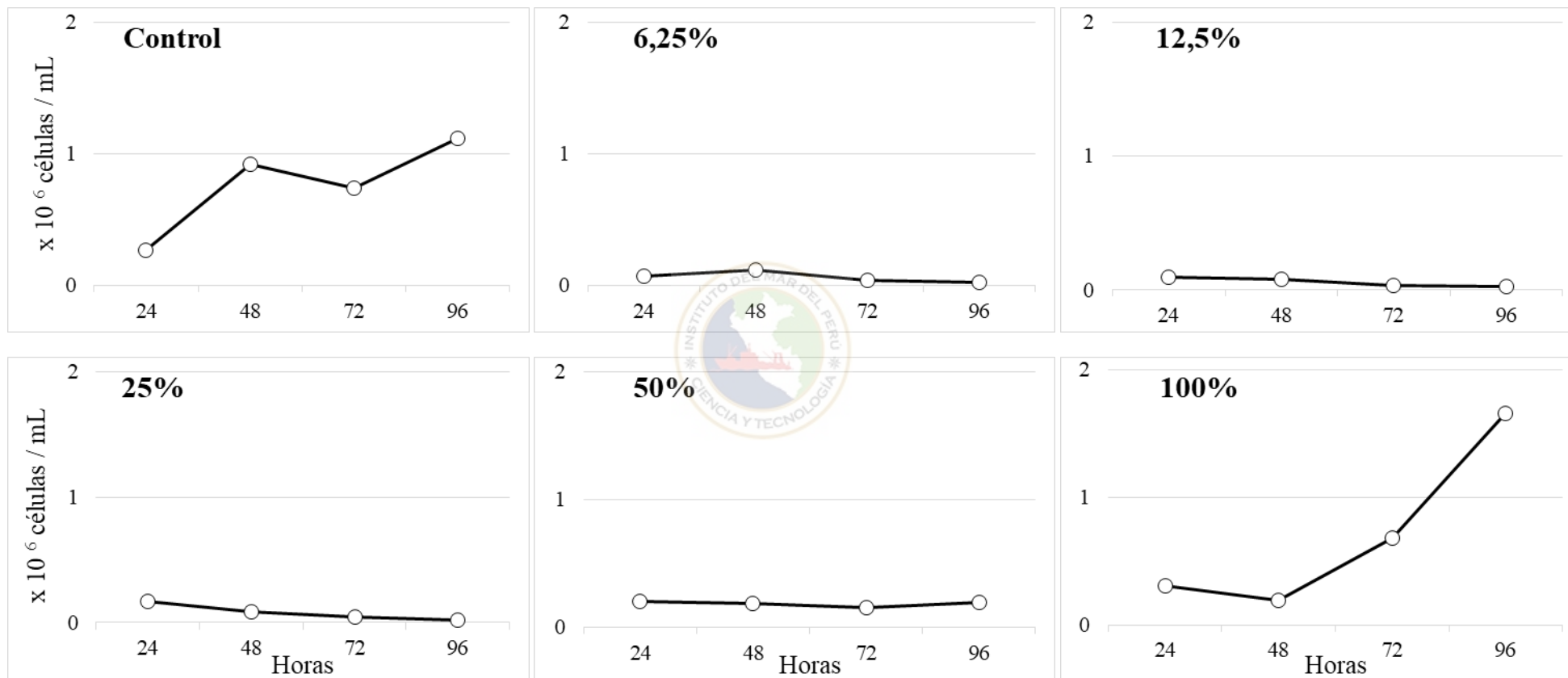
\* = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ )



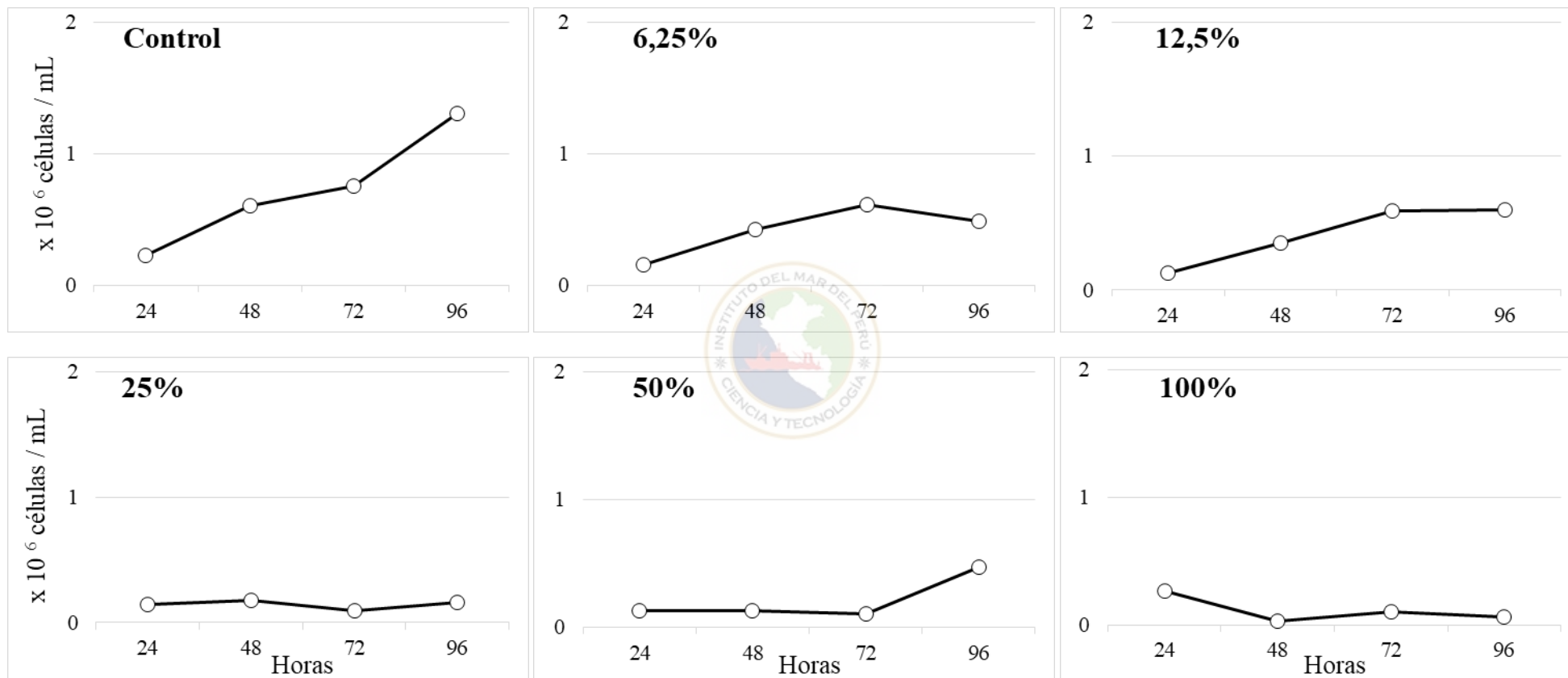
**ANEXO 28. Relación entre el crecimiento de *Isochrysis galbana* (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E20 en Bahía Paracas, abril del 2016.**



**ANEXO 29. Relación entre el crecimiento de *Isochrysis galbana* (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E27 en Bahía Paracas, abril del 2016.**



**ANEXO 30. Relación entre el crecimiento de *Isochrysis galbana* (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E10A en Bahía Paracas, abril del 2016.**



**ANEXO 31. Valores de Parámetros físicoquímicos (t=0h y t=96h) para la prueba de toxicidad de la microalga *Isochrysis galbana* con porcentaje de dilución de elutriado de sedimento marino en la Bahía Paracas, abril del 2016.**

Estación de muestreo	Tiempo	Temperatura (°C)	Oxígeno (mg/L)	pH	Conductividad ( mS/cm )	Salinidad (ppm)
E20	0 horas	19,95	9,16	8,26	48,60	31,45
	96 horas	19,15 ± 1,41	16,09 ± 4,91	9,17 ± 0,6	70,02 ± 83,47	34,75 ± 9,12
E27	0 horas	17,38	18,25	9,71	145,90	28,78
	96 horas	19,72 ± 0,91	9,57 ± 0,19	8,39 ± 10,97	58,43 ± 9,09	39,66 ± 31,13
E10A	0 horas	19,80	9,07	8,32	45,00	28,90
	96 horas	19,24 ± 0,41	10,26 ± 1,97	8,57 ± 0,15	59,99 ± 6,2	39,84 ± 4,74

**ANEXO 32. Valores de significancia de los parámetros físicoquímicos de las pruebas de toxicidad en dilución de elutriado de sedimento marino de la Bahía Paracas empleando *Isochrysis galbana* (cero y 96 horas), abril del 2016.**

Estación de muestreo	Fecha de muestreo	Parámetros Físico-químicos				
		Temperatura (°C)	Oxígeno (mg/L)	pH	Conductividad (mS/cm)	Salinidad (ppm)
E20	21/04/2016	0,020**	0,332	0,014*	0,417	0,575
E27	20/04/2016	0,276	0,0306**	0,230	0,171	0,078**
E10A	20/04/2016	0,376	0,044	0,000*	0,022*	0,005*

\* = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), prueba-T de Student

\*+ = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), prueba Mann-Whitney

**ANEXO 33. Valores de significancia del crecimiento de *Isochrysis galbana* en el control negativo a las 24 y 96 horas en Bahía Paracas, abril del 2016.**

Estaciones de muestreo	Abril
	<i>p value</i>
E20	0,000*
E27	0,030**
E10A	0,002

\* = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), prueba-T de Student

\*\* = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), prueba Mann-Whitney

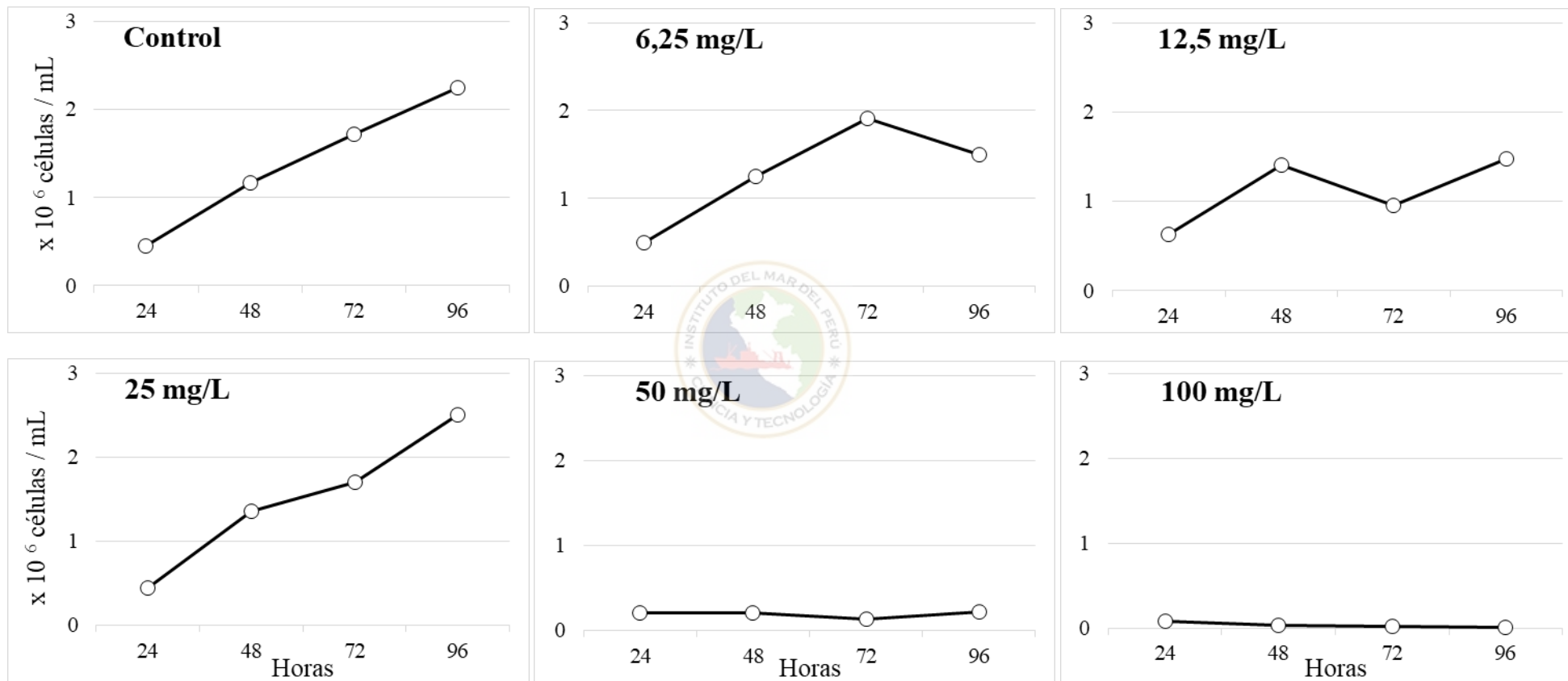
**ANEXO 34. Valores de significancia ( $p < 0,05$ ) de la densidad microalgal media de *Isochrysis galbana* al finalizar la prueba de toxicidad (96 horas) con porcentaje de dilución de elutriado del sedimento marino en Bahía Paracas, abril del 2016.**

<b>Estación de muestreo</b>	<b>Levene's</b>	<b>Shapiro Wilks</b>	<b>Kruskal Wallis</b>
E20	0,000	0,216	0,014*
E27	0,040	0,000	0,001*
E10A	0,151	0,013	0,001*

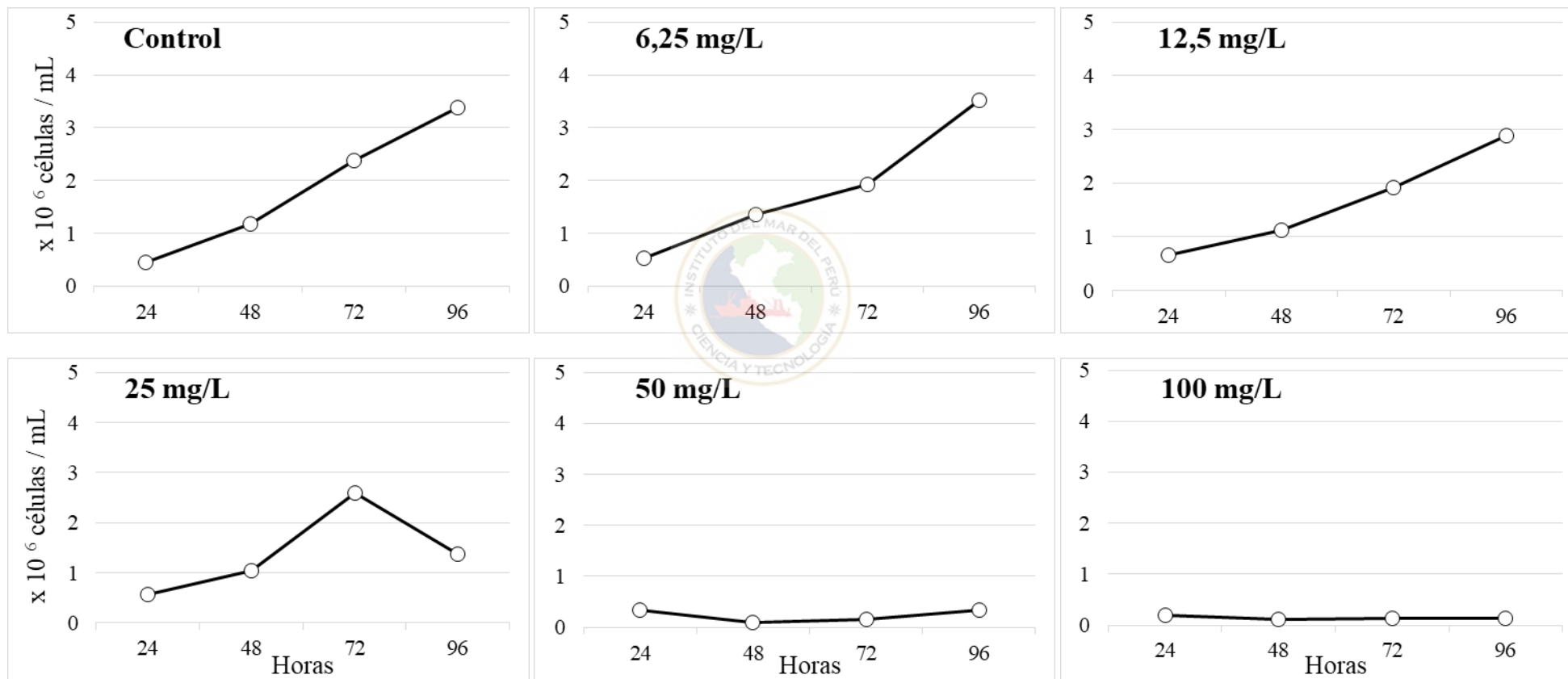
\* = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ )



**ANEXO 35. Relación entre el crecimiento de *Isochrysis galbana* (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E10 en la Bahía Paracas, setiembre del 2016.**

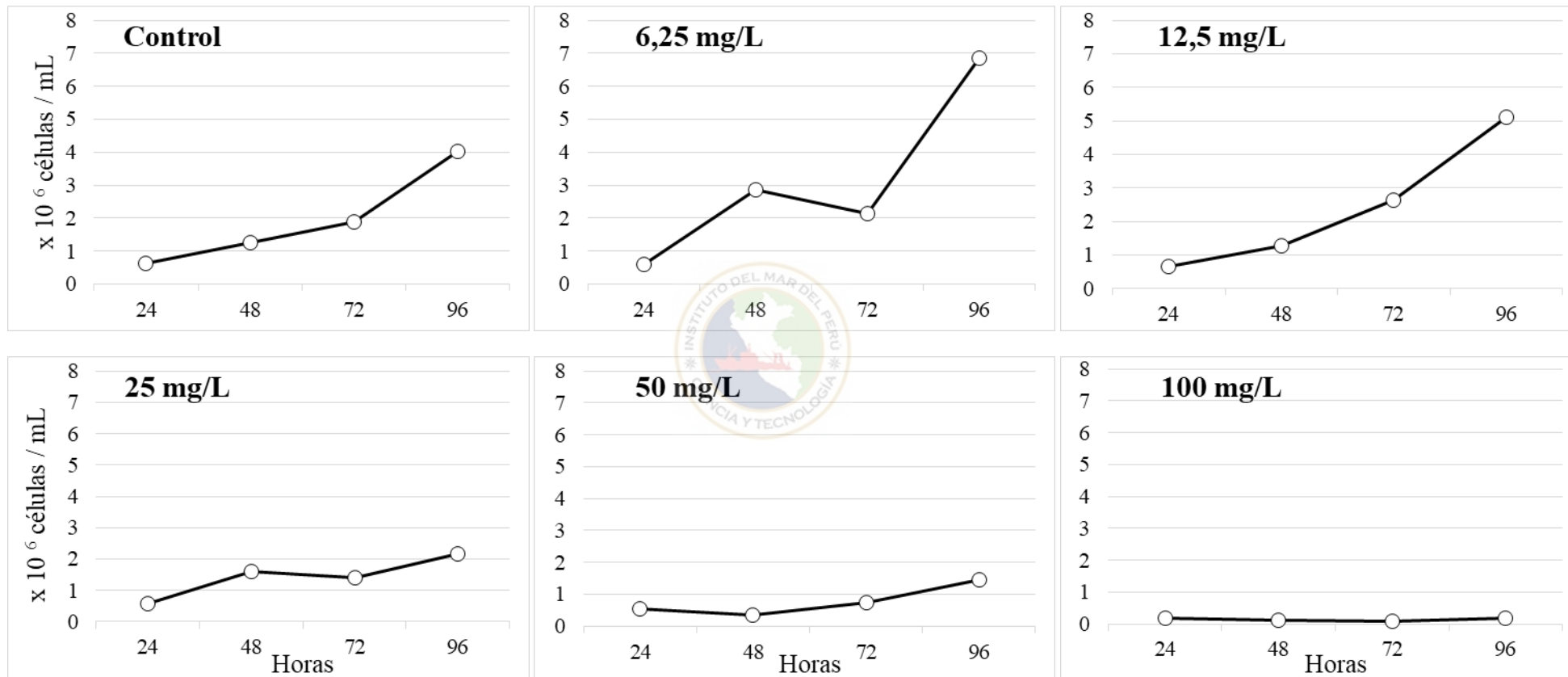


**ANEXO 36. Relación entre el crecimiento de *Isochrysis galbana* (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E27 en la Bahía Paracas, setiembre del 2016.**





**ANEXO 37. Relación entre el crecimiento de *Isochrysis galbana* (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E28 en la Bahía Paracas, setiembre del 2016.**



**ANEXO 38. Valores de Parámetros físicoquímicos (t=0h y t=96h) para la prueba de toxicidad de la microalga *Isochrysis galbana* con porcentaje de dilución de elutriado de sedimento marino en la Bahía Paracas, setiembre del 2016.**

Estación de muestreo	Tiempo	Temperatura (°C)	Oxígeno (mg/L)	pH	Conductividad ( mS/cm )	Salinidad (ppm)
E10	0 horas	25,98	8,04	8,21	53,27	35,23
	96 horas	9,78 ± 2,02	26,62 ± 0,34	9,11 ± 0,45	53,83 ± 2,64	35,69 ± 1,99
E27	0 horas	25,96	8,04	8,19	53,28	35,24
	96 horas	25,57 ± 0,21	11,41 ± 1,59	9,24 ± 0,43	54,22 ± 4,1	35,92 ± 3,13
E28	0 horas	25,90	8,04	8,17	53,30	35,25
	96 horas	25,54 ± 1,33	11,92 ± 0,27	9,39 ± 8,93	55,53 ± 7,25	37,01 ± 7,25

**ANEXO 39. Valores de significancia de los parámetros físicoquímicos de las pruebas de toxicidad en dilución de elutriado de sedimento marino de la Bahía Paracas empleando *Isochrysis galbana* (cero y 96 horas), setiembre del 2016.**

Estación de muestreo	Parámetros Físico-químicos				
	Temperatura (°C)	Oxígeno (mg/L)	pH	Conductividad (mS/cm)	Salinidad (ppm)
E10	0,005 <sup>*+</sup>	0,003 <sup>*</sup>	0,002 <sup>*</sup>	0,005 <sup>*+</sup>	0,810 <sup>+</sup>
E27	0,005 <sup>*+</sup>	0,005 <sup>*</sup>	0,045 <sup>*+</sup>	0,819	0,006
E28	0,005 <sup>*+</sup>	0,003 <sup>*</sup>	0,005 <sup>*+</sup>	0,689 <sup>+</sup>	0,575 <sup>+</sup>

\* = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), prueba-T de Student

<sup>+</sup> = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), prueba Mann-Whitney

**ANEXO 40. Valores de significancia del crecimiento de *Isochrysis galbana* en el control negativo a las 24 y 96 horas en Bahía Paracas, setiembre del 2016.**

Estaciones de muestreo	Setiembre
	p value
E10	0,007*
E27	0,017*
E28	0,008*

\* = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), prueba-T de Student

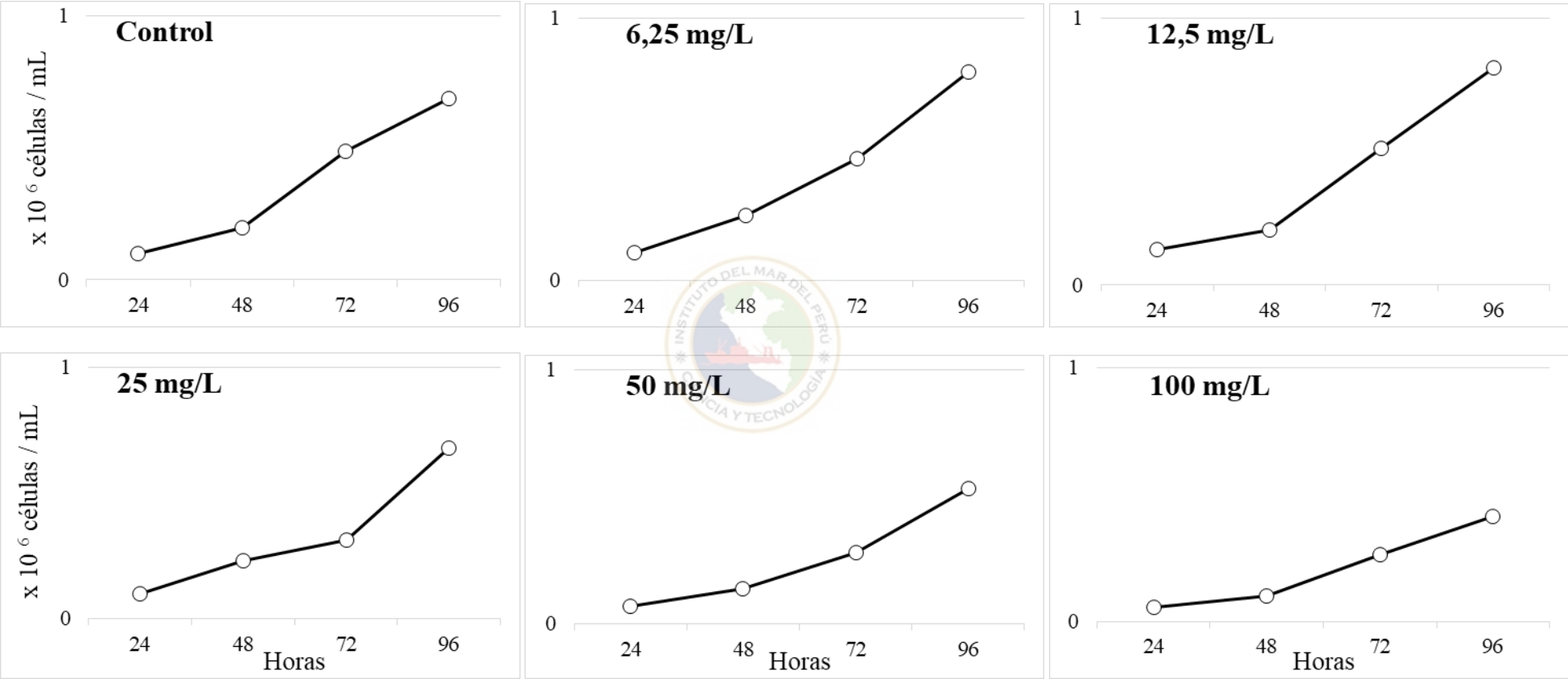
**ANEXO 41. Valores de significancia ( $p < 0,05$ ) de la densidad microalgal media de *Isochrysis galbana* al finalizar la prueba de toxicidad (96 horas) con porcentaje de dilución de elutriado del sedimento marino en Bahía Paracas, setiembre del 2016.**

<b>Estación de muestreo</b>	<b>Levene's</b>	<b>Shapiro Wilks</b>	<b>Kruskal Wallis</b>
E10	0,003	0,002	0,001*
E27	0,037	0,065	0,001*
E28	0,023	0,035	0,020*

\* = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ )



**ANEXO 42. Relación entre el crecimiento de *Nannochloropsis oceanica* (células/mL) y la dilución de elutriado del sedimento marino (porcentaje) de la estación E10 en la Bahía Paracas, setiembre del 2016.**



**ANEXO 43. Valores de Parámetros físico-químicos (t=0h y t=96h) para la prueba de toxicidad de la microalga *Nannochloropsis oceanica* con porcentaje de dilución de elutriado de sedimento marino en la estación E10A de la Bahía Paracas, setiembre del 2016.**

Estación de muestreo	Tiempo	Temperatura (°C)	Oxígeno (mg/L)	pH	Conductividad (mS/cm)	Salinidad (ppm)
E10	0 horas	25.97	5.94	8.18	52.52	34.67
	96 horas	21.48 ± 4.13	12.64 ± 1.58	9.63 ± 0.45	52.92 ± 0.58	34.76 ± 0.43

**ANEXO 44. Valores de significancia de los parámetros físico-químicos de las pruebas de toxicidad en dilución de elutriado de sedimento marino de la Bahía Paracas empleando *Nannochloropsis oceanica* (cero y 96 horas), setiembre del 2016.**

Estación de muestreo	Parámetros Físico-químicos				
	Temperatura (°C)	Oxígeno (mg/L)	pH	Conductividad (mS/cm)	Salinidad (ppm)
E10	0,005**	0,005**	0,000*	0,005**	0,689

\* = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), prueba-T de Student

\*+ = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), prueba Mann-Whitney

**ANEXO 45. Valores de significancia del crecimiento de *Nannochloropsis oceanica* en el control negativo a las 24 y 96 horas en Bahía Paracas, setiembre del 2016.**

Estaciones de muestreo	Setiembre
	p value
E10	0,000*

\* = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), prueba-T de Student

**ANEXO 46. Valores de significancia ( $p < 0,05$ ) de la densidad microalgal media de *Nannochloropsis oceanica* al finalizar la prueba de toxicidad (96 horas) con porcentaje de dilución de elutriado del sedimento marino en Bahía Paracas, setiembre del 2016.**

Estación de muestreo	Levene's	Shapiro Wilks	Kruskal Wallis
10A	0,042	0,055	0,063

\* = Diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

**ANEXO 47. Contaminantes en sedimento de la Bahía Tortugas-Casma en marzo y agosto del 2016.**

Muestreo	Estación	Nivel de toxicidad	Profundidad (m)	Materia orgánica (%)	Contaminantes químicos	Traza de metales						Contaminantes microbiológicos		Condición
					Hidrocarburos de Petróleo (µg/g)	Arsenico (µg/g)	Cadmio (µg/g)	Cobre (µg/g)	Plomo (µg/g)	Mercurio (µg/g)	Zinc (µg/g)	Colifomes Totales (NMP/10)	Coliformes Termotolerantes (NMP/100 mL)	
Marzo 2016	E2	Alta toxicidad	18,0	3,5	-	-	-	-	-	-	-	< 3	< 3	A 2Km de la desembocadura del Río Nepeña, al margen del río es área de uso agrícola, a 3Km de una planta pesquera
	E3	Moderada toxicidad	10,7	3,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Dentro de concesión acuícola de <i>Argopecten purpuratus</i> y concesión minera no metálica
	E20	No tóxico	12,5	3,5	0,11	14,05	3,31	18,83	11,88	0,036	66,62	4,0	-	
	E22	No tóxico	28,7	6,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	E31	No tóxico	23,2	1,5	0,10	12,67	0,67	17,36	15,97	0,018	87,21	< 3	< 3	
	E32	Alta toxicidad	9,0	2,5	0,06	23,65	0,37	28,99	22,89	0,005	135,96	< 3	< 3	A 1 Km de la desembocadura del río Casma, al margen del río hay centros poblados y áreas de uso agrícola, A 5Km de una planta pesquera
	E33	No calculable	23,2	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E34	No tóxico	15,0	2,5	0,06	23,63	0,48	37,85	26,93	0,013	129,87	< 3	< 3		
Agosto 2016	E3	Moderada toxicidad	10,7	1,0	-	-	-	-	-	-	-	< 3	< 3	Dentro de concesión acuícola de <i>Argopecten purpuratus</i> y concesión minera no metálica
	E4	No tóxico	18,4	2,0	0,09	-	-	-	-	-	-	< 3	< 3	
	E5	No tóxico	22,2	3,5	0,14	-	-	-	-	-	-	-	-	
	E9	No tóxico	29,8	4,0	0,10	-	-	-	-	-	-	< 3	< 3	
	E12	No tóxico	8,9	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	E14	No tóxico	29,5	3,5	-	-	-	-	-	-	-	< 3	< 3	
	E17	No tóxico	10,0	4,0	-	-	-	-	-	-	-	< 3	< 3	
	E20	No tóxico	12,5	4,0	0,16	-	-	-	-	-	-	< 3	< 3	
E22	Alta toxicidad	28,7	4,0	0,11	-	-	-	-	-	-	< 3	< 3	Dentro de concesión acuícola de <i>Argopecten purpuratus</i> , a 1.5Km de concesión minera no metálica	
E34	No tóxico	15,0	1,5	0,05	-	-	-	-	-	-	< 3	< 3		

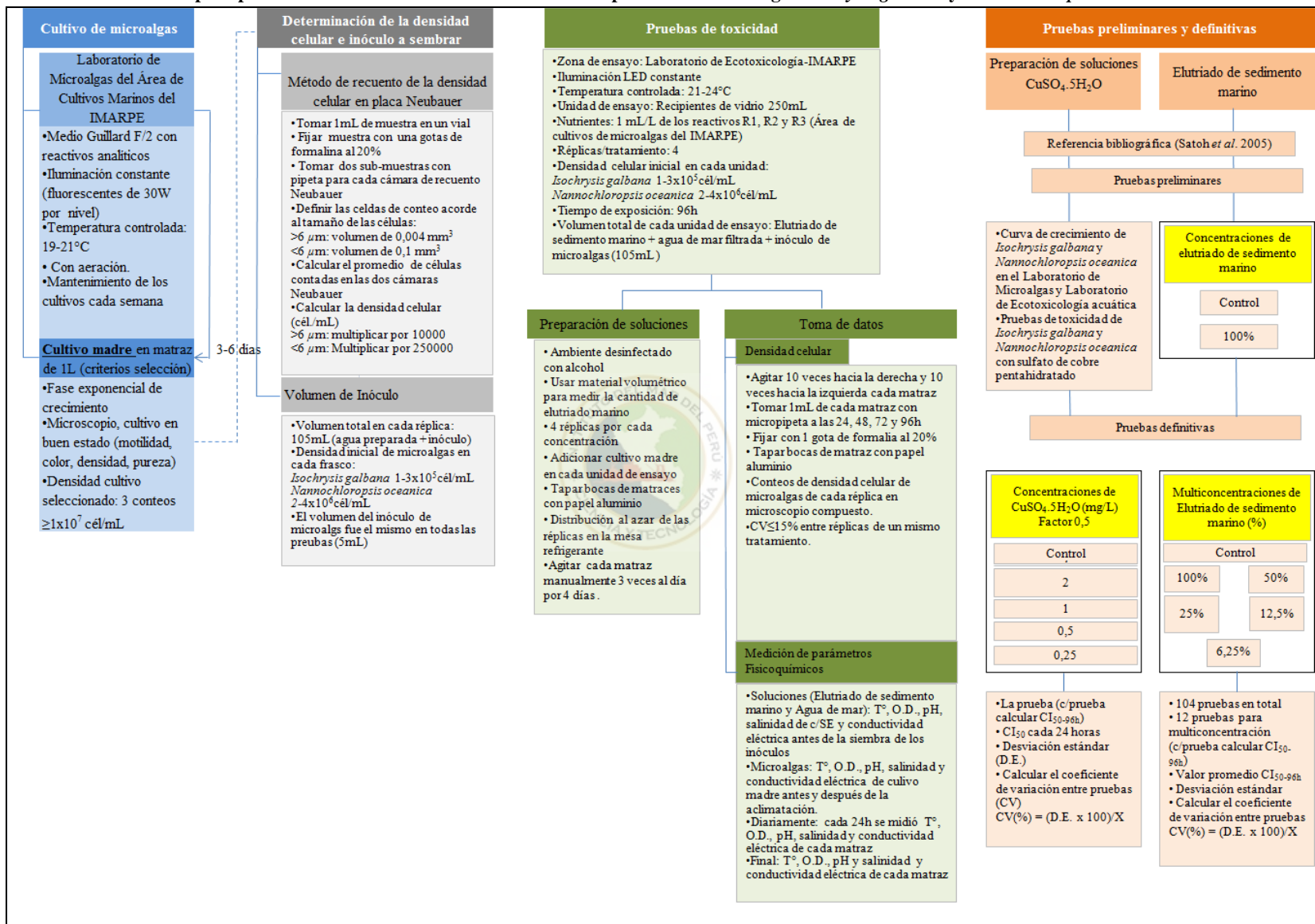
**FUENTE: Paredes, 2018**

**ANEXO 48. Contaminantes en sedimento de la Bahía Paracas en abril y setiembre del 2016.**

Muestreo	Estación	Prof. (m)	Nivel de Toxicidad	Contaminante químicos	Traza de metales							Contaminantes microbiológicos		Condición
				Hidrocarburos de Petróleo (µg/g)	Arsenico (µg/g)	Cadmio (µg/g)	Cobre (µg/g)	Plomo (µg/g)	Mercurio (µg/g)	Niquel (µg/g)	Zinc (µg/g)	Colifomes Totales (NMP/100 mL)	Coliformes Termotolerantes (NMP/100 mL)	
<b>Abril 2016</b>	E19	17,0	No tóxico	0,23	54,19	7,90	137,42	90,01	0,23	28,82	134,24	-	-	A 1Km del vertedero vigente Pluspetrol y de concesión minera no metálica
	E20	7,0	Moderada toxicidad	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	1,5	
	E23	17,0	No tóxico	0,34	54,64	17,29	139,56	96,55	0,22	30,14	158,96	1,5	1,5	
	E27	7,0	Alta toxicidad	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	1,5	Playa Atenas, al costado de área de concesión acuícola de <i>Argopecten purpuratus</i>
<b>Setiembre 2016</b>	E8	18,0	No tóxico	0,11	28,30	2,92	76,00	47,20	0,13	15,90	150,00	-	-	
	E10	4,0	Alta toxicidad	-	28,60	0,51	31,30	24,40	0,04	8,20	90,90	3	3	A 1Km de la desembocadura del Río Pisco, al margen del río área poblada y de uso agrícola
	E11	6,0	No tóxico	0,07	23,40	1,01	48,10	33,90	0,13	9,20	109,00	3	3	
	E12	9,0	No tóxico	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	
	E19	16,0	No tóxico	0,18	29,80	11,54	67,20	44,40	0,30	19,00	153,00	-	-	
	E23	16,5	No tóxico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	E25	11,0	No tóxico	0,19	34,80	10,17	65,20	43,00	0,15	19,00	156,00	3	3	
	E27	8,0	Alta toxicidad	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	Playa Atenas, al costado de área de concesión acuícola de <i>Argopecten purpuratus</i>
E28	5,0	Alta toxicidad	0,09	21,90	3,71	21,40	15,90	0,06	8,50	69,00	3	3	A 4Km de concesión minera no metálica	

**FUENTE: Área Funcional de Investigaciones marino coteras de IMARPE, 2018**

**ANEXO 49. Condiciones básicas para pruebas de toxicidad en sedimento marino empleando las microalga *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica* en condiciones controladas**





**ANEXO 50. Valores de Parámetros físicoquímicos (t=0h y t=96h) para la prueba de toxicidad de la microalga *Isochrysis galbana* con sulfato de cobre pentahidratado.**

Tiempo	Temperatura (°C)	Oxígeno (mg/L)	pH	Conductividad (mS/cm)	Salinidad (ppm)
0 horas	21.83	8.45	8.20	53.22	34.88
96 horas	22.58 ± 0.11	13.29 ± 1.62	9.28 ± 0.27	53.01 ± 0.07	34.83 ± 0.05

**ANEXO 51. Valores de Parámetros físicoquímicos (t=0h y t=96h) para la prueba de toxicidad de la microalga *Nannochloropsis oceanica* con sulfato de cobre pentahidratado.**

Tiempo	Temperatura (°C)	Oxígeno (mg/L)	pH	Conductividad ( mS/cm )	Salinidad (ppm)
0 horas	21.94	8.44	8.18	53.20	34.89
96 horas	22.38 ± 0.38	12.62 ± 2,86	9.67 ± 0.75	53.06 ± 0.05	34.87 ± 0.04

**ANEXO 52. Valores de intensidad lumínica (Lux) de las pruebas de toxicidad en sedimento marino de la Bahía Tortugas-Casma empleando *Isochrysis galbana*, muestreadas en marzo y agosto del 2016.**

Monitoreo	Estación de muestreo	Fecha de muestreo	Intensidad lumínica (Lux)
<b>Marzo 2016 Bahía Tortugas - Casma</b>	E2	19/03/2016	1551 ± 347
	E3	20/03/2016	1559 ± 608
	E32	16/03/2016	2136 ± 253
	E33	17/03/2016	2089 ± 249
<b>Agosto 2016 Bahía Tortugas - Casma</b>	E3	17/08/2016	2305 ± 347
	E22	18/08/2016	1580 ± 351

**ANEXO 53. Valores de intensidad lumínica (Lux) de las pruebas de toxicidad en sedimento marino de la Bahía Paracas empleando *Isochrysis galbana*, muestreadas en abril y setiembre del 2016.**

Monitoreo	Estación de muestreo	Fecha de muestreo	Intensidad lumínica (Lux)
<b>Abril 2016 Bahía Paracas</b>	E20	21/04/2016	2352 ± 445
	E27	20/04/2016	1958 ± 312
	E10A	20/04/2016	1804 ± 643
<b>Setiembre 2016 Bahía Paracas</b>	E10	26/09/2016	-
	E27	27/09/2016	2619 ± 808
	E28	27/09/2016	2227 ± 435

**ANEXO 54. Valores de intensidad lumínica (Lux) de las pruebas de toxicidad en sedimento marino de la Bahía Paracas empleando *Nannochloropsis oceanica*, muestreadas en setiembre del 2016.**

Monitoreo	Estación de muestreo	Fecha de muestreo	Intensidad lumínica (Lux)
<b>Setiembre 2016 Bahía Paracas</b>	E10	26/09/2016	-

**ANEXO 55. Valores de significancia de la densidad inicial de los controles de las pruebas de toxicidad con *Isochrysis galbana*.**

Test	Levene's	Shapiro Wilks	Kruskal Wallis
significancia ( $p < 0,05$ )	0,00	0,055	0,328

**ANEXO 56. Valores de significancia de la densidad inicial de los controles de las pruebas de toxicidad con *Nannochloropsis oceanica*.**

Test	Levene's	Shapiro Wilks	Kruskal Wallis
significancia ( $p < 0,05$ )	0,00	0,076	0,392

**ANEXO 57. Coeficiente de variación (porcentaje) del control a las 96 horas de las pruebas de toxicidad en sedimento marino a las 96 horas de la Bahía Tortugas-Casma empleando *Isochrysis galbana*, muestreadas en marzo y agosto del 2016.**

Monitoreo	Estación de muestreo	Fecha de muestreo	Coeficiente de variación (%)
<b>Marzo 2016 Bahía Tortugas - Casma</b>	E2	19/03/2016	12,5
	E3	20/03/2016	11,9
	E32	16/03/2016	11,2
	E33	17/03/2016	13,6
<b>Agosto 2016 Bahía Tortugas - Casma</b>	E3	17/08/2016	13,1
	E22	18/08/2016	14,5

**ANEXO 58. Coeficiente de variación (porcentaje) del control a las 96 horas de las pruebas de toxicidad en sedimento marino de la Bahía Paracas empleando *Isochrysis galbana*, muestreadas en abril y setiembre del 2016.**

Monitoreo	Estación de muestreo	Fecha de muestreo	Coeficiente de variación (%)
<b>Abril 2016 Bahía Paracas</b>	E20	21/04/2016	12,1
	E27	20/04/2016	12,7
	E10A	20/04/2016	14,4
<b>Setiembre 2016 Bahía Paracas</b>	E10	26/09/2016	10,9
	E27	27/09/2016	8,7
	E28	27/09/2016	13,8

**ANEXO 59. Coeficiente de variación (porcentaje) del control a las 96 horas de las pruebas de toxicidad en sedimento marino a las 96 horas de la Bahía Paracas empleando *Nannochloropsis oceanica*, muestreadas en setiembre del 2016.**

Monitoreo	Estación de muestreo	Fecha de muestreo	Coeficiente de variación (%)
<b>Bahía Paracas Setiembre 2016</b>	E10	26/09/2016	23,2

**ANEXO 60. Presupuesto de instalación para pruebas de toxicidad con *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica*.**

<b>Cantidad</b>	<b>Unidades</b>	<b>Materiales y equipos</b>	<b>Costo unitario (S/.)</b>	<b>Costo unitario (S/.)</b>
		<b>Material de vidrio</b>		
48	unidades	Matraces de 250 mL	15,00	720,00
48	unidades	Matraces de 125 mL	10,00	480,00
2	unidades	Probetas de 50 mL	20,00	40,00
8	unidades	Vasos precipitados de 1 L	40,00	320,00
2	unidades	Fuente de aluminio de 60 x 35 cm	80,00	160,00
2	unidades	Fuentes de aluminio de 20 x 20 cm	50,00	100,00
2	unidades	Pipetas de vidrio de 2 mL	15,00	30,00
2	unidades	Pipetas de vidrio de 2 mL	15,00	30,00
12	unidades	100 Viales de vidrio de 5 mL	70,00	840,00
1	unidad	Balde de 10 L	15,00	15,00
10	paquetes	Pipetas de plástico de 1 mL	20,00	200,00
1	unidad	Micropipeta graduable 10 – 100 µL	200,00	200,00
4	Cajas x 40	Filtros de fibra de vidrio	200,00	800,00
1	unidad	Mesa refrigerante	25 000,00	25 000,00
4	unidades	Agitadores	250,00	1000,00
4	unidades	Magnetos	30,00	120,00
2	unidades	Bombillas para pipetas	20,00	40,00
2	unidades	Espátulas	20,00	40,00
1	unidad	Bandeja de plástico para los sedimentos	10,00	10,00
1	unidad	Equipo completo de filtrado de agua (matraz Kitasato, bomba de vacío y matraz de 125 mL)	1 000,00	1 000,00
		<b>Equipos</b>		
1	unidad	Multipárametro	15 000,00	15 000,00
1	unidad	Conductímetro	6 000,00	6 000,00
1	unidad	Luxómetro		0
2	unidades	Cámara Neubauer BOECO	250,00	500,00
2	unidades	Cámaras de iluminación LED	30000,00	60 000,00
		<b>Material biológico</b>		
28	Litros	Litros de <i>Isochrysis galbana</i>		167,00
28	Litros	Litros de <i>Nannochloropsis oceanica</i>		167,00
100	Mililitros	Medio nutritivo Guillard modificado f/2		1,00
			<b>TOTAL</b>	<b>S/. 112,980.00</b>

**FUENTE: Elaboración propia.**