

**CENTRO DE INVESTIGACIONES MARINAS
UNIVERSIDAD DE LA HABANA
MINISTERIO DE LA INDUSTRIA PESQUERA
CENTRO DE INVESTIGACIONES PESQUERAS
DIRECCION DE FOMENTO PESQUERO**

**METODOLOGIA DE BIOENSAYOS Y EFECTOS
TOXICOS DE ALGUNOS CONTAMINANTES SOBRE
ORGANISMOS DE INTERES ECOLOGICO PESQUERO**

**Tesis presentada en opción al grado científico de
Master en Ciencias Biológicas
Mención Biología Marina**

Autor: Lic. Gerardo Suárez Álvarez

**La Habana
1996**

DEDICATORIA

**A mis hijos
María Elena, Emith y Ayane**

1996

CONTENIDO

RESUMEN	5
AGRADECIMIENTOS	6
1.0 INTRODUCCION	7
2.0 ANTECEDENTES	11
2.1 Bioensayos como evaluación de la contaminación	11
2.2 Objetivos de los bioensayos	13
2.3 Finalidad de los bioensayos	14
2.3.1 Ensayos de Clasificación	14
2.3.2 Ensayos de Regulación	15
2.3.3 Criterios de Calidad De Agua	15
2.3.4 Vigilancia de Los Efluentes	16
2.3.5 Vigilancia de Área De Descarga	16
2.3.6 Protección De Niveles Tróficos Superiores	16
2.3.7 Organolépticos	17
2.3.8 Bioestimulación	17
2.4 PROCEDIMIENTOS DE BIOENSAYOS	18
2.4.1 Bioensayos de Respuesta Directa	18
2.4.1.1 Bioensayos de toxicidad	18
2.4.1.2 Bioensayos de bioestimulación	20
2.4.1.3 Bioensayos de comportamiento	21
2.4.1.4 Bioensayos de acumulación trófica	23
2.4.1.5 Reconocimientos ecológicos	25
2.4.2 Bioensayos de Respuesta Indirecta	25
2.4.2.1 Bioensayos organolépticos	25
2.4.2.2 Bioensayos de reconocimiento ecológico	26
2.4.2.3 Bioensayos de estimulación	26
2.5 Procedimientos de bioensayos según su finalidad	27
2.5.1 Bioensayos de tanteo o barrido	27
2.5.2 Bioensayos de establecer criterios de calidad	29
2.5.3 Bioensayos para vigilancia de efluentes	30
2.5.4 Bioensayos legales	31
2.5.5 Bioensayos de vigilancia de ríos	32
2.6 Selección y manipulación de organismos de ensayo	33
2.6.1 Manipulación de los animales de prueba	34
2.6.1.1 Colección y transporte	34
2.6.1.1 Aclimatación	34
2.6.2 Selección de los animales de prueba	36
2.6.3 Requerimientos fisiológicos y de prueba	36
2.7 Metodologías para la evaluación de la toxicidad	38
2.8 Curva de toxicidad	42

3.0	MATERIALES Y METODOS	46
3.1	Generalidades	46
3.2	Metodología para bioensayos	56
3.2.1	Método rutinario de bioensayo	56
3.2.2	Método probabilístico de Bliss	60
3.2.3	Modificación de Litchfield y Wilcoxon	65
4.0	RESULTADOS Y DISCUSION	69
4.1	Efectos Del DDT	69
4.2	Efectos Del Cromo	75
4.2.1	Pruebas de toxicidad aguda	77
4.2.2	Acumulación	82
4.2.3	Respirometría	84
4.2.4	Comportamiento	89
4.3	Efectos Del Cobre	91
4.4	Efectos Del Plomo	98
5.0	CONCLUSIONES	102
5.1	DDT	102
5.2	Cromo	103
5.3	Cobre	105
5.4	Plomo	106
6.0	RECOMENDACIONES	107
6.1	DDT	107
6.2	Cromo	107
6.3	Cobre	108
6.4	Plomo	108
7.0	REFERENCIAS	110

ANEXO I

TABLAS	118
--------	-----

ANEXO II

FIGURAS	135
---------	-----

RESUMEN

Este trabajo trata de presentar los efectos tóxicos de cuatro posibles contaminantes de la plataforma cubana, un plaguicida órgano clorado el DDT y 3 metales, el cromo, el cobre y el plomo, sobre postlarvas de langosta *P. argus* y el camarón *P. notialis*. Persiguiendo un triple propósito en sus objetivos, presentar de una forma cómoda, con fines didácticos la resolución de los tres métodos de trabajo adoptados internacionalmente para evaluar la toxicidad, el método gráfico semi logarítmico, rutinario o estándar, el método de los Probits de Bliss y la modificación de Lichthfield y wilcoxon, así como analizar de dichas metodologías cual es la más adecuada para la evaluación de los efectos de cualquier contaminante con mayor precisión estadística y conocer los efectos letales y sub letales de los contaminantes señalados anteriormente sobre las dos especies marinas de mayor importancia económica para Cuba. Las metodologías utilizadas para la evaluación de los bioensayos, son la estándar y las que emplean los probits como punto de análisis. Entre los resultados se presentan los LC50, LT50 y límites de confianza de cada constante. Para el DDT se halló que una concentración sub letal de 1 $\mu\text{g}/\text{l}$ es capaz de inhibir la muda y el crecimiento de los post larvales de langosta, no así su respuesta a estímulos externos y a la alimentación; calculándose una concentración presumiblemente no dañina como 0.47 $\mu\text{g}/\text{l}$.

Para el cromo se calculo la concentración presumiblemente no dañina como 6.2 mg/l. Los experimentos de acumulación dieron por resultado que su tasa fue de 60.6 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ y la de desacumulación de 41.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, acumulando más rápido que lo que desacumula. Respecto a la tasa metabólica el cromo actúo como un acelerador metabólico a concentraciones no letales y como depresor a concentraciones cercanas a las letales.

Se presentan las ecuaciones para calcular la tasa metabólica y se estimó que los camarones tienen un umbral de preferencia a concentraciones cercanas a la dañina, lo que evidencia que a estas concentraciones los ejemplares son atraídos.

Se planteó la concentración normal de cobre en el tejido, la cuál fue de 56 \pm 36 mg/kg y una concentración de 2.1 $\mu\text{g}/\text{l}$ es capaz de inhibir la muda en los ejemplares sometidos a ella y poseen un factor de acumulación de 155 a concentraciones sub letales.

Respecto al plomo, una concentración 560 $\mu\text{g}/\text{l}$ es capaz de provocar la pérdida de actividad a las 120 horas de exposición y la perdida de equilibrio a las 240 horas, muriendo a las 300 horas. La concentración de seguridad se calculó en 50 $\mu\text{g}/\text{l}$.

Después de su análisis, la metodología de los probits de Bliss se recomienda como la más precisa, pues permite establecer los

límites de confianza de las concentraciones letales y ofrece los parámetros necesarios para realizar el análisis estadístico de los resultados.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no se hubiera podido realizar sin la ayuda de los compañeros de los Combinados Pesqueros de Cienfuegos, Batabanó, Casilda y Manzanillo, los cuales ofrecieron una gran ayuda para la captura de los ejemplares utilizados en los experimentos.

Agradezco la labor realizada por los compañeros del laboratorio de química del Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP), lugar donde se efectuaron las determinaciones de cobre y proteínas de todos los bioensayos, así como la preparación de todos los reactivos utilizados. No puedo dejar de agradecer la valiosa ayuda prestada por mi compañera la M. Cs. Teresita Romero que en todo momento ha sabido alentarme para que llevara a su término este trabajo además de haber revisado los manuscritos y discutido diferentes aspectos del mismo; así como al Lic. Eusebio Perigó que revisó y discutió también diferentes aspectos de este trabajo. Estoy agradecido del trabajo realizado por el técnico Fabián Casanova del CIP, que pacientemente ayudó a coleccionar los ejemplares y participó en el desarrollo de los experimentos.

1.0 INTRODUCCIÓN

Debido a la condición actual de nuestra nación como país en vías de desarrollo, es necesario considerar las grandes inversiones que se ejecutan en las diferentes ramas de la economía, trayendo como consecuencia natural un incremento en los niveles cuantitativo y cualitativo de las descargas de desechos que a la larga contaminan el medio receptor. También, en su lucha contra las plagas el hombre ha desarrollado productos capaces de eliminarlas, pero el uso indiscriminado y continuado de estos, ha provocado adaptaciones en dichas plagas que las han vuelto mas resistentes, siendo necesario aumentar las dosis de aplicación, con el resultado indeseable de incrementar sus niveles en el medio natural e inducir la muerte migración u otros trastornos a animales útiles al hombre. Uno de los productos mas usados es el DDT, un plaguicida órganoclorado que se acumula en los diferentes niveles de la cadena trófica, depositándose en los tejidos grasos que actúan como un amplificador biológico. Los ejemplos de destrucción y muerte provocados por el DDT están bien documentados por Carson, (1984) y Worthing y Hince (1991). En nuestro país; se ha utilizado ampliamente este producto en la lucha contra las plagas, por lo que se estudia su efecto sobre la supervivencia y el crecimiento de postlarvales de langostas ***Panulirus argus*** especie de mayor importancia en las pesquerías de la plataforma cubana.

Considerando que entre las sustancias múltiples que pueden llegar al mar (GESAMP, 1990), los metales pesados pueden tener una resonancia ecológica considerable a causa de su permanencia en la misma y en los organismos, transfiriéndose y acumulándose en los diferentes niveles de la trama alimentaria se decidió evaluar los efectos del cromo, cobre y plomo, por constituir un elemento de riesgo en los ecosistemas marinos.

En Cuba existen varias tenerías, razones por las cuales se hace necesaria la evaluación del licor cromo que se utiliza en ellas para la tecnología del curtido de pieles y es portador de este metal pesado, cuya concentración al final del proceso resulta de 5 g/l. Considerando esto y el número de industrias y talleres dedicados a esta actividad a lo largo del territorio nacional, el volumen de sus descargas anuales y el hecho de ser vertidos directamente a nuestra plataforma sin ningún tipo de tratamiento hace necesario su estudio como contaminante. Se debe señalar que también existen otras fuentes que aportan cromo al ambiente marino, como son industrias de acabados de metales, fábricas de colorantes, pinturas, pigmentos contra la corrosión y zonas de su extracción, (Lewis, 1992).

Otro metal pesado, importante para la contaminación del mar, es el plomo, el cuál se emplea en fábricas de acumuladores, como agente antidetonante para el combustible, en la construcción de tipos para la imprenta, elaboración de pinturas, recubrimiento de cables y en amortiguadores de la vibración en la construcción

pesada entre otros. En Cuba una fuente importante de este metal pesado es la fábrica de acumuladores de Manzanillo, provincia Granma, que aunque tiene una planta de tratamiento existe la posibilidad de su vertimiento por alguna falla o por emisiones a la atmósfera en el proceso de fundición del metal, motivos que conllevan a conocer los efectos que este podría provocar a su llegada a una zona pesquera de camarones.

El cuarto contaminante que aquí se evalúa es el cobre, otro elemento acumulativo que puede presentarse en los residuales de diferentes industrias o en aguas procedentes de minas, procesadoras de minerales o escurrimientos de la agricultura, donde se emplea como fungicida y herbicida.

Las hipótesis de trabajo para esta tesis fueron tres:

- 1) Primeramente tratar de ofrecer una visión de las diferentes metodologías que se emplean para la realización de bioensayos de toxicidad y que la misma sirva como una guía didáctica para los que deseen introducirse en este campo.
- 2) Analizar las metodologías que actualmente se presentan en la bibliografía y determinar entre ellas cuál es la más adecuada para el análisis de los efectos de cualquier contaminante sobre organismos acuáticos y cuál de ellos permite la evaluación estadística de los resultados con mayor precisión.
- 3) Conocer si los efectos letales y subletales de algunos contaminantes, un plaguicida órganoclorado y tres metales

sobre dos especies marinas de interés ecológico pesquero para Cuba.

Las tareas trazadas para resolver estas hipótesis son:

- 1) Realizar una revisión bibliográfica sobre las metodologías de evaluación de la toxicidad mediante bioensayos y agrupando las referencias existentes, ofrecer un relato detallado de cada metodología para que todo aquel que desee conducir y realizar un bioensayo lo pueda realizar.
- 2) Comparar las metodologías fundamentales para los análisis de los resultados obtenidos mediante bioensayos de toxicidad y proponer la que ofrece mayores garantías para su reproducibilidad y confiabilidad estadística. Las metodologías que se evaluarán comprenden el rutinario de bioensayos; el probabilístico de Bliss y la modificación de Litchfield y Wilcoxon al probabilístico.
- 3) Analizar el efecto letal del DDT sobre postlarvas de langostas y el crecimiento de estos ante concentraciones subletales. Realizar pruebas de toxicidad aguda, acumulación, respiración y comportamiento de camarones ante el cromo. Realizar experimentos de letalidad y acumulación de cobre sobre camarones, pérdida de actividad y de equilibrio. Evaluar los resultados de pruebas de toxicidad letal, analizando su pérdida de equilibrio y letalidad del plomo sobre camarones.

2.0 ANTECEDENTES

2.1 BIOENSAYOS COMO EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN

Para la protección de la vida acuática se necesita de cierta información general, pero dentro de ella se requiere de la comprensión general de las respuestas biológicas de los organismos respecto a la toxicidad que sobre ellos provocan determinados contaminantes o sustancias. La medición de esta respuesta se lleva a cabo por medio de los bioensayos y fueron los toxicólogos los que primero incursionaron en estos métodos (Sprague, 1969); desarrollando procedimientos de análisis que muchos investigadores pasan por alto, pero que en sí son los que permiten el análisis estadístico de las respuestas. La finalidad de todo bioensayo es establecer los límites permisibles para diferentes sustancias o productos que se descargan a las aguas, porque los análisis físicos y químicos de estas no son suficientes para comprender la toxicidad de cualquier producto, ni para evaluar el potencial contaminador de cualquiera de ellos sobre la biota. Los resultados obtenidos de los bioensayos, facilitan el establecimiento de criterios de calidad diferentes usos del agua, y en algunos casos estos son adoptados como normas sociales en diferentes países.

Según FAO (1981), citado por Reish y Oshida (1987), se entiende por bioensayo **"una prueba en, que un tejido, organismo o grupo de organismos vivos se usan como reactivo para determinar la**

potencia de cualquier sustancia fisiológicamente activa, cuya actividad se desconoce".

La toxicidad de cualquier desecho puede afectarse por las inter-reacciones entre sus componentes individuales y los productos minerales disueltos en las aguas receptoras. Los organismos vivos no son igualmente susceptibles y debe tenerse en cuenta este aspecto a la hora de escoger la especie de prueba, para cada contaminante específico.

2.2 OBJETIVOS DE LOS BIOENSAYOS

El objetivo de un bioensayo de toxicidad es determinar las concentraciones a las que una sustancia, material o efluente es capaz de provocar una respuesta medible, que normalmente es letal, para una población sometida a condiciones controladas en un laboratorio. El método de respuesta cuantitativa es el mejor para el análisis experimental o sea, medir la supervivencia numérica porcentual, y determinar la relación entre la concentración y el efecto. Los datos cuantitativos permiten la evaluación estadística de los resultados de la curva de concentración mortalidad para cada uno de los períodos de tiempo y expresan el error del mismo.

Los períodos de exposición se determinan, antes de comenzar el bioensayo y generalmente son de 24 a 96 horas; pero algunos materiales en este tiempo no ofrecen el valor umbral a partir del cual no ocurre un incremento significativo de la mortalidad y por tanto requieren de un período mayor de experimentación. Como alternativa es bueno, que los períodos de observación no sean limitados al tiempo de exposición de los ejemplares al contaminante, sino que se prolonguen a 5 ó 10 días más para incluir los efectos colaterales y tratar de comprender qué pasaría realmente en la naturaleza; si estos son capaces de recuperarse o no, después de haber estado sometidos a los efectos de la contaminación. Para esto también podrían incluirse

experimentos fisiológicos que completarían el análisis global de un contaminante dado sobre la población estudiada.

2.3 FINALIDAD DE LOS BIOENSAYOS

Según la finalidad de los bioensayos, (FAO, 1981), estos pueden subdividirse en:

- 1-) Clasificación
- 2-) Regulación
- 3-) Criterios de calidad del agua
- 4-) Vigilancia de los efluentes
- 5-) Vigilancia de áreas de descarga
- 6-) Niveles tróficos
- 7-) Organolépticos
- 8-) Bioestimulación

2.3.1 Ensayos de clasificación

Estas pruebas se realizan para obtener un indicador aproximado de cuales son las concentraciones que aisladas o mezcladas son peligrosas para los organismos vivos y establecer un orden de prioridad o peligrosidad para cada residual. Sus resultados permiten tener una idea del riesgo que se corre al descargar al medio receptor cualquier sustancia, de forma continua o por impacto (golpe).

Para los bioensayos de clasificación, se recomienda el empleo de especies tipo que permitan comparar un rango amplio de

residuales o contaminantes. Este tipo de prueba aunque da una aproximación de los efectos ecológicos que se derivan de la descarga de una sustancia contaminadora; proporciona una información valiosísima para evaluar el grado de riesgo que hay al descargar el contaminante al medio.

2.3.2 Ensayos de regulación

Este tipo de ensayo tiene validez legal y se realiza para comprobar si un agua residual o contaminante cumple o no con los requisitos legales de descarga, y está avalado por un reglamento decreto o ley que establece los límites legales.

2.3.3 Criterios de calidad del agua

Permiten establecer los criterios de calidad del agua para la vida o comportamiento normal de un organismo o comunidad en un acuatorio. Con ellos se determinan las concentraciones seguras, o que no permiten riesgo alguno a las poblaciones que habitan en cada zona, contemplando una gran variedad de métodos de investigación con muchas especies y pueden medir tanto los efectos letales como los subletales. Se recomienda que estos resultados deben ser comprobados con estudios ecológicos, pero se llama la atención de que los mismos no son fáciles de realizar, puesto que en la naturaleza no hay el control que se tiene en un laboratorio sobre las concentraciones o los factores

ambientales, y el trabajo con ecosistemas controlados o "microcosmos" tampoco es fácil de realizar o interpretar.

2.3.4 Vigilancia de los efluentes

Diseñados para vigilar si se cumplen las normas de descarga y encontrar los máximos que fortuitamente o intencionalmente son producidos. Estos son de gran utilidad para estudiar el efecto de mezclas complejas, como en su mayoría son los residuales industriales. Generalmente se combinan con un sistema de alarma que alerta sobre cualquier violación en la calidad de los efluentes industriales. Las pruebas pueden ser directas para determinar los efectos letales o subletales e indirectas como aviso.

2.3.5 Vigilancia de áreas de descarga

Son pruebas que permiten inspeccionar continuamente un área donde se descargan residuales. Este se realiza con ejemplares enjaulados y colocados con una distribución lógica respecto al punto de vertimiento real. Se realiza combinado con inspecciones ecológicas con las que se pueden detectar cambios a largo plazo.

2.3.6 Protección de niveles tróficos superiores

La finalidad de estas pruebas es hallar las sustancias que después de acumularse en los tejidos de un organismo, dañan a

otro por traspaso biológico, al ser devorados por su predador. De esta forma, conociendo las sustancias que tienen propiedades acumulativas y pasan de uno a otro, se pueden proteger las especies que están en peligro y en última instancia al hombre.

2.3.7 Organolépticos

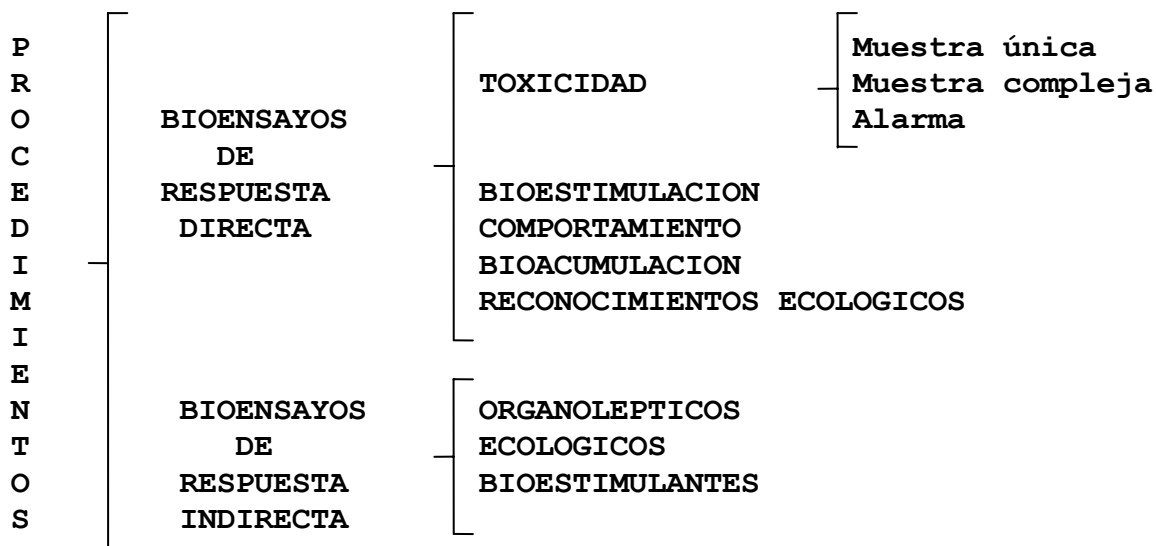
Son pruebas que miden la aceptabilidad de un recurso sobre el gusto de las personas; miden el color, olor, sabor y textura entre otros en aquellas especies que están en contacto con zonas de vertimiento. Son muy importantes desde el punto de vista de la comercialización, pues aunque las concentraciones no sean dañinas, ni para la especie contaminada, ni para el hombre, al alterarse su calidad organoléptica esta pierde su valor comercial.

2.3.8 Bioestimulación

Su objetivo es determinar los problemas que provoca la eutrofización acelerada, por la descarga de residuales nutrientes. Estos evalúan su poder a estimular el desarrollo y crecimiento explosivo de las algas. Pueden ser desarrollados lo mismo a nivel de laboratorio que a nivel de medio receptor.

2.4 PROCEDIMIENTOS DE BIOENSAYOS

Según la definición de bioensayo se pueden subdividir en:



2.4.1 Bioensayos de respuesta directa

2.4.1.1 Bioensayos de toxicidad

Los bioensayos de toxicidad de respuesta directa son los que se realizan para determinar, en un efluente de toxicidad constante o variable, la concentración capaz de producir un patrón de respuesta en un tiempo determinado. Las respuestas pueden ser la muerte, inmovilidad, pérdida de equilibrio y actividad natatoria irregular entre otros. El agua de prueba se toma directamente del punto de descarga o de una toma a este, de forma tal que las diluciones se reemplacen continuamente con concentraciones del efluente análogas a los que se descargan. Estas tienen que permanecer inalteradas, pero la toxicidad de

cada una de las examinadas fluctúa a lo largo del ensayo, paralelamente a las variaciones que se producen en el efluente, respecto a su calidad. Este tipo de prueba puede clasificarse en:

a-) Bioensayos de toxicidad con muestra única: son aquellos experimentos que se realizan con una muestra tipo **batch**, o sea, con una sustancia química única de un agua residual compleja. Con esta se prepara una serie de diluciones que se examinan en el procedimiento del bioensayo. Su objetivo es determinar la concentración capaz de producir cierta respuesta en un tiempo dado, a corto, largo o prácticamente indefinido, pudiendo prolongarse hasta el fin deseado. La respuesta indicadora de la toxicidad puede ser la muerte o supervivencia, pérdida de equilibrio, perturbaciones metabólicas en la respiración, osmorregulación, reproducción, natación, y cambios histológicos entre otros. El tiempo de duración de un experimento con muestra única no puede ser largo, porque la muestra se descompone y no se puede garantizar que la respuesta sea correcta. Estas pruebas pueden realizarse de forma estática, flujo semicontínuo y continuo.

b-) Bioensayos de toxicidad con muestra compleja: son aquellos que se realizan con residuales que pueden variar a lo largo de su ejecución y se realizan de forma semicontínua o continua, por lo que es imposible no considerar las variaciones propias del proceso industrial o productivo. Este tipo de prueba es

buena pues facilitan que los residuos metabólicos se eliminen con el flujo de agua, además, se garantiza la concentración a investigar.

c-) Bioensayos de alarma tóxica de los efluentes: estos bioensayos se realizan en el propio lugar, o punto generador de residuales y se determina si las aguas receptoras de efluentes u otros contaminantes dan una respuesta que puede cuantificarse, aunque generalmente la medición que se efectúa es la ocurrencia o no de muerte en los organismos de prueba. Estos se colocan en jaulas, recipientes o peceras (Fig. 1), a las que se le bombea el agua contaminada. Generalmente para su realización, se diseña una red de estaciones donde a cada una de ellas se le asigna una jaula con cierto número de ejemplares dentro; es necesario que a cada estación se le mida la concentración o concentraciones de sustancias tóxicas presentes, para de esta forma correlacionar las respuestas de toxicidad que presentan los organismos a cada concentración en el medio ambiente o a diferentes distancias del punto de vertimiento.

2.4.1.2 Bioensayos de bioestimulación

Generalmente estos bioensayos se realizan con microalgas y son semejantes a los anteriores en cuanto a la metodología general de diseño con muestra única; pero la finalidad es diferente, pues ellos se realizan para medir la posibilidad de algunos tipos de aguas residuales o sustancias para estimular el

crecimiento en número de las algas. Las aguas residuales cargadas de nutrientes son las que producen un efecto más marcado de este fenómeno que generalmente se conoce como eutrofización, pero también se realizan con sustancias tóxicas que lo que provocan es la inhibición de la estimulación; aunque el efecto más empleado es la medición de la proliferación excesiva de las algas, (Gray et al; 1991), que tiene consecuencias adversas en los usos que el hombre puede realizar de los acuatorios.

Los patrones de crecimiento en número se comparan y se estiman las concentraciones perniciosas, conociéndose que una explosión violenta en la biomasa de las algas, en horas de la noche, pueden provocar la anoxia en dichas aguas y matar a los otros organismos que se encuentran en ellas por falta de oxígeno.

2.4.1.3 Bioensayos de comportamiento

Estos sirven para medir, en condiciones de laboratorio, las reacciones de rechazo o aceptación de un organismo de prueba a diferentes residuales o sustancias presumiblemente tóxicas. Al ejemplar de prueba, que por supuesto, tiene que ser un organismo que se pueda mover como peces o crustáceos, pues los fijos no pueden utilizarse en este tipo de bioensayo, se les da la posibilidad de elegir entre el agua limpia o la contaminada, en un recipiente que generalmente toma el nombre de "**fluviario**" (Hoglund, 1953). En este tipo de prueba se observa el

comportamiento de atracción o rechazo, y generalmente todas las especies responden a cada uno de estos aspectos, permitiendo conocer un estimado de la población que puede perecer por contacto directo o a la que le puedan presentar efectos perniciosos por permanencia continuada en zonas de concentraciones subletales, pero que a la larga inciden sobre la supervivencia y desarrollo de la especie. También se conocería la proporción de la población que por rechazo abandonaría la zona de contacto, que aunque no mueren inciden en la actividad pesquera, pues hay que incrementar el esfuerzo para poder realizar su captura, en el caso de recursos de importancia comercial.

Para las especies móviles, el escape puede ser en algunos casos la respuesta subletal clave. Pero también de cierta manera es difícil predecir lo que en verdad ocurrirá en el medio receptor, porque en algunos casos los ejemplares pueden escapar y en otras no, y en otros por problemas de mezcla, difusión o corrientes se pueden producir cambios de gradiente brusco y la respuesta no es igual a la lograda a nivel de laboratorio. Este aspecto se incluye en una clase diferente de bioensayos de toxicidad directa, porque la respuesta puede o no estar asociada directamente con la toxicidad del contaminante, ya que entran a jugar otros factores de relaciones ecológicas o geográficas que pueden influir en el patrón de respuesta.

2.4.1.4 Bioensayos de acumulación trófica o bioacumulación

Estos bioensayos son necesarios para evaluar las sustancias que se acumulan en los organismos vivos. Cuando las concentraciones alcanzan valores altos pueden causar la muerte de los ejemplares, o bien el ejemplar va acumulando poco a poco dicho contaminante y puede transmitirlo al hombre cuando se alimente de ellos o actuar fisiológicamente sobre sus predadores. En este caso, el nuevo predador puede llegar a acumular concentraciones altas que a su vez serán tomadas por el predador del nivel trófico superior, recomendándose que los patrones de respuesta no sólo sean relacionados con las concentraciones en el agua, sino también con las del tejido animal. Esto es importante, porque después de conocido este traspaso, es más fácil vigilar las concentraciones en un organismo dado que vigilarlos en el medio ambiente. Los metales pesados y los plaguicidas son buenos ejemplos de contaminantes acumulativos que se pueden transmitir por medio del paso de un nivel trófico a otro. Estos bioensayos pueden realizarse en el propio medio o a escala de laboratorio.

2.4.1.5 Reconocimientos ecológicos

Estos estudios dan generalmente una clara evaluación de lo que ocurre en la naturaleza y es el último procedimiento que debe realizarse para poder evaluar en conjunto todos los resultados obtenidos, permitiendo vigilar la eficacia del control o

tratamiento que se le aplique a las aguas residuales. Como las comunidades naturales son vigilantes constantes del grado de contaminación, generalmente este tipo de evaluación es más concluyente que el de reconocimiento químico, pero en sí todos los procedimientos lo que hacen es completarse, porque uno complementa al otro, permitiendo realizar correlaciones de los efectos con las concentraciones halladas en puntos específicos. Especial importancia se presenta cuando la evaluación es a zonas donde los contaminantes no proceden de una misma fuente, sino que existen más de uno actuando en conjunto. Aquí se requiere de un análisis detallado de la comunidad epibentónica y bentónica, referente al número de especies, cantidad de ejemplares por especie, diversidad, comportamiento de una comunidad respecto a otra que habita en zonas alejadas o fuera del efecto del contaminante. Es muy importante establecer que un contaminante dado, puede causar un cambio en la composición de la comunidad o diversidad de especies, pero el cambio puede que no afecte la densidad de la población. Un cambio definido o inesperado en la comunidad, puede ser síntoma de un factor de deterioro que actúa sobre ella, y justifica la planificación de una investigación más detallada de la posible llegada de sustancias contaminadoras. A nivel experimental, la evaluación global de los efectos de los contaminantes se puede llevar a cabo por medio de ecosistemas artificiales pequeños (microcosmos) o estudiando ecosistemas naturales reducidos, que

constituyen métodos útiles de bioevaluación, pero complejos y prolongados respecto al tiempo, por lo que cualquier problema que se presente en ellos puede provocar la pérdida de todo el experimento.

2.4.2 Bioensayos de respuesta indirecta

2.4.2.1 Bioensayos organolépticos

El contaminante que entra en contacto con una especie u organismo dado, puede presentarse en concentraciones no letales, sin embargo, producir alteraciones en las características de las especies, disminuyendo el valor económico del recurso.

Esto sucede así porque algunas sustancias pueden producir olores, sabores o coloraciones desagradables en los ejemplares objeto de pesca, como peces, crustáceos y moluscos, que aunque no los mate, producen pérdidas económicas a la pesquería, al no poder comercializarse los mismos.

Esta evaluación se realiza por medio de paneles organolépticos, los cuales actúan como organismos del bioensayo. La evaluación es compleja y difícil, y no debe realizarse nunca por personal no entrenado, porque los resultados no serían comparables y carecerían de significación.

2.4.2.2 Reconocimiento ecológico

Los principios generales que se presentaron en los bioensayos de reconocimiento ecológico como respuesta directa son los mismos que se aplican aquí. Entre los efectos indirectos que se deben medir están los que provocan los sólidos en suspensión y sedimentables o los de aquellos efluentes carentes de oxígeno que no tienen efecto tóxico directo sobre los organismos acuáticos pero si actúan indirectamente. Los sólidos al sedimentarse, cubren el sustrato afectando el hábitat, o al crearse condiciones anóxicas en el agua, el medio se torna impropio para algunos representantes del ecosistema; en algunos casos son las especies valiosas, bien desde el punto de vista ecológico o comercial las que disminuyen por la existencia de un hábitat inadecuado o por falta de nutrientes, en otros casos los cambios no provocan pérdidas en la producción, aunque si en la estructura de la población.

2.4.2.3 Bioensayos de bioestimulación

Los nutrientes adicionados al medio receptor, fundamentalmente por medio de un efluente, pueden provocar efectos adicionales como la producción de sustancias tóxicas a partir de los crecimientos explosivos de la biomasa algal, conocidos como "marea roja" o la desoxigenación que producen al consumir el oxígeno del agua en horas de oscuridad. El procedimiento en sí, es el mismo del empleado para los bioensayos de respuesta

directa, pero se necesita casi siempre de una vigilancia secundaria para probar la toxicidad sobre la flora y fauna que conviven asociadas con ellos o para el hombre, el receptor final de sus propios desechos.

2.5 TIPOS DE PROCEDIMIENTOS DE BIOENSAYO SEGÚN SU FINALIDAD

Para definir el procedimiento de ensayo que se empleará, primeramente hay que establecer su finalidad, pues según este criterio variará la metodología que se debe utilizar.

Estos procedimientos son:

- 1-) Bioensayo de tanteo o barrido
- 2-) Bioensayos para establecer criterios de calidad
- 3-) Bioensayos para vigilancia de efluentes
- 4-) Bioensayos legales
- 5-) Bioensayos de vigilancia de ríos

2.5.1 Bioensayo de tanteo o barrido

Si no se conoce previamente la toxicidad de la sustancia a investigar, es conveniente realizar un bioensayo de tanteo que permita determinar las concentraciones del material que se emplearán en el ensayo definitivo.

Esta prueba se realiza para determinar el rango probable de concentraciones necesarias para dar un barrido a los tiempos de supervivencia sobre la escala requerida de tiempo.

Este es un procedimiento inicial simple donde se utilizan grupos de cinco ejemplares en serie que contemplan de tres a cinco concentraciones de la sustancia o residual a investigar, espaciadas ampliamente y realizadas con un control estricto.

El objetivo de esta prueba es tener un aproximado de la concentración de una sustancia que presumiblemente es dañina. Los resultados representan sólo un aproximado de las implicaciones ecológicas que se producirían al aparecer esta sustancia en el ambiente y no pueden ser usadas como una guía segura del riesgo que estas presentan.

Las concentraciones a investigar se desarrollan según una progresión logarítmica, que pueden ser 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 y 8,0 ó cualquier múltiplo de ellos y las unidades dependerán del producto estudiado.

Las concentraciones deben ser arregladas de forma tal, que la mortalidad total ocurra dentro del primer día de observaciones en la concentración más alta empleada y que a la concentración más baja no ocurra ninguna mortalidad.

Una vez establecido el rango principal, se diseña una prueba con el objetivo de estrechar el rango de observaciones, aumentando el número de concentraciones, pero con diferencias menores entre ellas, utilizando siempre el método de concentraciones logarítmicas progresivas recomendado por APHA (1985). El tiempo de observación deberá ser de 3; 6; 12; 24; 48; 72; 96 y 120 horas, aunque podría prolongarse según los

requerimientos específicos de cada bioensayo. En toda esta serie debe determinarse la LC50 o concentración letal para el 50% de los ejemplares a las 48 y 96 horas como mínimo.

2.5.2 Bioensayos para establecer criterios de calidad

Si en un área dada, producto de un muestreo, se encuentra un contaminante potencial en concentraciones mayores a 10^{-4} veces el valor de la LC50 para las 48 ó 96 horas, determinados mediante pruebas de barrido, se hace completamente necesario realizar un bioensayo con mayor grado de precisión y este es el que se aplicará como válido para establecer los criterios de descarga.

Esta prueba se realiza en diferentes laboratorios, a solicitud de consultas para determinar a qué concentración se puede permitir una descarga de un contaminante dado en un residual específico, así como para conocer hasta qué nivel de concentración se puede permitir en un acuatorio.

Este bioensayo puede realizarse mediante pruebas que determinen:

- a-) toxicidad letal
- b-) toxicidad subletal

Dentro de las pruebas de toxicidad letal están aquellas que se utilizan para definir la concentración a la cual un material de ensayo puede provocar determinado patrón de respuesta letal en una población experimental y se extrapola a una natural.

También se emplean para estimar la toxicidad combinada de dos o más sustancias y examinar los efectos de factores modificadores de la toxicidad y el examen de efectos secundarios. En líneas generales estos pueden ser estáticos, interactivos, de flujo continuo y dependiente o independiente del tiempo.

Los de efectos subletales son aquellos que generalmente se realizan en períodos de tiempo prolongados y miden respuestas fisiológicas como metabolismo, osmorregulación, crecimiento, posibilidad de tomar el alimento, aceptación o rechazo del contaminante, reproducción y actividad entre otros y se realizan con concentraciones que no provocan mortalidad en períodos de hasta 96 horas.

2.5.3 Bioensayos para vigilancia de efluentes

Estos son los procedimientos que se realizan colocando varios ejemplares en peceras o estanques por donde pasa el efluente final de una industria o instalación dada y se mide la supervivencia de los ejemplares ante estas condiciones.

En sí es un bioensayo que realiza un trabajo de vigilar los residuales que se descargan y permite avisar cuando no se cumplen las normas, facilitando tomar las medidas necesarias de inmediato.

Existen dos formas de llevarlo a cabo:

a-) haciendo pasar por peceras el agua residual cruda de la instalación o por diluciones que se preparan con agua limpia.

Esto puede ser útil para conocer hasta cuánto debe ser purificado un residual para no contaminar.

b- tomando muestras del agua residual de la instalación y preparando series de diluciones a las cuales se someten los ejemplares de prueba. Esta forma tiene la desventaja que no se utiliza el residual fresco, pero como una alternativa es posible su utilización.

2.5.4 Bioensayos legales

Todos los efluentes descargados al medio, deben ser objetos de análisis respecto a la calidad y cantidad según las normas de descarga por una autoridad reguladora para prevenir la contaminación. Estos análisis deben comprender estudios físico químicos y bioensayos.

Generalmente se realizan para conocer sí:

- a-) Una instalación cumple con las normas de vertimiento.
- b-) Los residuales de una instalación dada son los responsables de la mortalidad ocurrida en un lugar dado.

Estas pruebas esencialmente se realizan con los métodos estáticos, aunque pueden realizarse dinámicamente y con especies comerciales.

Los bioensayos legales permiten resolver la cuestión de quién es el responsable de una mortalidad ocurrida en cierto lugar o si el residual descargado no producirá daños a los recursos económicos del lugar. Este es un procedimiento empírico y no

debe realizarse para los estudios normales de toxicidad, ya que los otros se realizan con mayor precisión.

2.5.5 Bioensayos de vigilancia de ríos

El objetivo de esta prueba es establecer una vigilancia continua de la calidad de un río que según sea su estado puede influir en poblaciones naturales que habitan en él y pueden determinar sobre el comportamiento de un recurso.

Básicamente esta prueba se realiza colocando jaulas con ejemplares vivos en diferentes puntos del río, en sus porciones dulceacuícolas y estuarinas, así como fuera de este en la región costera, y de esta forma se comprenderá mejor el efecto de las descargas que llegan al río y afectan a la zona integralmente.

También puede realizarse, bombeando el agua del río hacia un laboratorio de campo, donde se realizan las pruebas con el agua entera o diluida. Las dos formas son buenas, pero se complementan pues las jaulas colocadas en su medio natural sólo indican si sobreviven o no los ejemplares y como la dispersión de la sustancia contaminante afecta la supervivencia, pero no contemplan la medición de las concentraciones o los factores ambientales, sin embargo, con el agua bombeada se pueden establecer mejores controles sobre los cambios que ocurren en el agua.

2.6 SELECCIÓN Y MANIPULACIÓN DE LOS ORGANISMOS DE ENSAYO

Desde los primeros trabajos experimentales en estudios toxicológicos, se conoció de una gran variabilidad en los patrones de respuesta tales como anomalías en las tasas de mortalidad aun en experiencias de control, por lo que un factor importantísimo para la realización de un bioensayo es que los animales experimentales estén en un estado fisiológicamente normal, en algunos casos difícil de lograr, pero como premisa hay que tratar de alcanzar esta meta. Esto puede darse si se siguen ciertas reglas en la colecta de los ejemplares, ya que siempre no se dispone de organismos de cultivo, que al proceder de una misma población poseen un estado fisiológico estándar con relación al grupo.

Según Larsstuvold (1975), existen procedimientos comunes para la manipulación, selección y aclimatación de los organismos de prueba; llegándose a un acuerdo general de que los ejemplares malamente aclimatados y de un comportamiento inusual no deben emplearse para los bioensayos.

Para iniciar las biopruebas, la elección de los animales es una cuestión importante; un criterio estable debe estar de acuerdo a las necesidades y propósitos esperados. Swedmark (1974) propone para un bioensayo que:

a-) se representen los diferentes grupos taxonómicos, con modo de vida y actividad desigual, así como patrones de alimentación y locomoción conocidos

- b-) se incluyan especies de importancia comercial
- c-) se incluyan especies de diferentes niveles tróficos
- d-) que sus funciones biológicas estén conocidas y sean fáciles de definir y observar

2.6.1 Manipulación de los animales de prueba

2.6.1.1 Colección y transporte

La manipulación durante la colección y el transporte de los ejemplares debe ser cuidadosa y esta es esencial para el mantenimiento de una supervivencia alta. Los procesos de captura, especialmente con arrastres, perturban el patrón fisiológico de respuesta, incrementando la mortalidad por daños al sistema nervioso.

La captura provoca un estímulo que generalmente induce el canibalismo y la muda repetitiva de los crustáceos. La captura debe realizarse con cuidado, si se quiere lograr una respuesta estable y evitar así las implicaciones del "**stress**" fisiológico que provoca.

2.6.1.2 Aclimatación

Uno de los cambios más severos que los animales pueden encontrar es el que sufren al ser aclimatados a las condiciones de laboratorio. La transferencia de estos del medio de transporte al agua del laboratorio debe realizarse tratando de controlar la temperatura y la salinidad del medio. Según Perkins (1972),

si la temperatura en el laboratorio no es controlada los animales deben ser mantenidos y aclimatados no menos de dos semanas antes de iniciar los experimentos.

Como premisa fundamental es que para una serie experimental, todos los ejemplares tienen que proceder de la misma captura, tratando que pertenezcan a una misma población y presenten un mismo estado fisiológico.

2.6.2 Selección de los animales de prueba

Los animales de prueba deben ser seleccionados, lo más uniformemente posible, preferiblemente deben contemplar a representantes de etapas juveniles y en una fase de crecimiento activa. La razón de preferir ejemplares pequeños o juveniles, es que son más susceptibles de ser contaminados, además de ser más vulnerables a los efectos de intoxicación y que por tener su hábitat cercano a las costas, son los primeros en percibir los efectos del deterioro ambiental.

La selección de los ejemplares (Sprague, 1969) al momento de ser ubicados en los tanques o peceras de prueba debe ser aleatoria y el procedimiento a seguir es no colocarlos todos a la vez en un mismo recipiente, sino uno a uno.

2.6.3 Requerimientos fisiológicos y de prueba

Lo deseable para cualquier experimento es que exista la mayor uniformidad posible para las condiciones fisiológicas en cualquier grupo de animales de prueba. Factores como talla, crecimiento o estadio de desarrollo, pueden ser fácilmente definidos para los ejemplares experimentales, por lo que estos deben ser incluidos.

Los requerimientos para los organismos de agua dulce y los marinos, son diferentes, y tienen que considerarse al momento de prepararse las condiciones para llevar a cabo un bioensayo; por estos motivos un grupo de ejemplares recién capturados no pueden descargarse en un estanque de aclimatación sin conocerse las condiciones de vida de estos; hay que considerar si poseen hábitos diurnos o nocturnos para simular los períodos de iluminación, lo más cercano a las condiciones de cada especie de prueba.

Para evitar problemas que dificulten la interpretación de los resultados, una temperatura de prueba, debe ser escogida donde la estructura del agua sea estable y los ejemplares mantengan una tasa respiratoria estándar. El rango de temperatura, no debe variar ± 5 °C del valor medio.

Los ejemplares deben mantenerse con una adecuada concentración de oxígeno, cuyos valores no desciendan más allá de 4,0 mg/l ó del 70% de saturación. En el caso de que el bioensayo sea de tipo continuo, la aireación puede no emplearse, para evitar la

volatilización del contaminante hacia la atmósfera. Esto podría resolverse aireando el agua de dilución antes de su mezclado con el contaminante.

Otra cuestión a tomar en cuenta y de gran importancia es el volumen de agua que deben contener los recipientes de ensayo. Una regla que el APHA (1985) recomienda como guía básica es que en experimentos estáticos, al menos deben emplearse 2 litros de agua por cada gramo de pez por día; pero este volumen en algunos casos es excesivo y si se tienen 10 ejemplares en una prueba de 5 g cada uno, se necesitan 100 litros al día para estos, y desde luego, esto es prácticamente imposible de lograr en un experimento estático, no así en uno con recambio de agua que permite disminuir los volúmenes de los recipientes. Por estos motivos, Sprague (1969) había establecido que el volumen de agua debe ser tomado en cuenta según la tasa respiratoria de los ejemplares de bioensayo, evitando el hacinamiento de los ejemplares que rompería con los patrones de respuesta estándar de cada especie.

2.7 METODOLOGIAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD.

La determinación de la toxicidad de un contaminante ofrece un rango de respuesta amplio, no obstante, es posible evaluar la homogeneidad de la población que se somete a prueba y establecer un valor preciso de la concentración letal y sus límites de confiabilidad. Respecto al tiempo, de respuesta de un animal sometido a un contaminante, Marchetti (1960) propuso la denominación:

a-) agua letal o tóxica muy elevada: la que provoca la muerte en un tiempo medio inferior a 5 minutos en las condiciones normales de experimentación.

b-) agua tóxica elevada: la que provoca la muerte dentro de las primeras 6 horas.

c-) agua tóxica media: es la que induce la muerte entre las 6 y 12 horas.

d-) agua de baja toxicidad: la que provoca la muerte dentro de 24 horas.

e-) agua de toxicidad baja extrema: la que provoca la muerte entre las 24 horas y 7 días.

f-) agua no tóxica, pero inaceptable: cuando se obtiene una supervivencia a los 7 días, pero las condiciones del organismo al cabo de este tiempo es inaceptable.

g-) agua inocua: cuando los animales no manifiestan ninguna señal de incomodidad durante la prueba.

Igualmente Daugherty (1951) y Liebman (1960) clasifican a un compuesto con:

a-) elevadísima toxicidad: cuando permanece activo hasta 1 ppm.

b-) alta toxicidad: cuando permanece activo entre 1 y 10 ppm.

c-) baja toxicidad: permanece activo entre 10 y 100 ppm.

d-) escasa toxicidad: esta activo entre 100 y 1 000 ppm.

e-) atóxico: la actividad ocurre por encima de 1 000 ppm.

Respecto a la concentración, Jones (1938) en bioensayos con períodos de observación hasta de 20 días, definió como concentración límite letal, a aquella en la cual el tiempo medio de supervivencia para los ejemplares de ensayo tratados con el contaminante es igual al de los animales tomados como control. Actualmente EIFAC (1975) lo define como aquella concentración umbral que produce la muerte de los animales de prueba, o sea que por debajo de esta no se produce mortalidad alguna.

También EIFAC (1975) define como concentración de seguridad aquella a la cual una sustancia química es inocua a la mayor parte de la población aún en períodos prolongados. El APHA (1992) presenta dos definiciones nuevas y son la concentración donde no se observan efectos estadísticamente significativos (NOEC) y que es prácticamente la antiguamente denominada como concentración de seguridad y la concentración menor (LOEC) a la cuál no hay diferencias con el control.

Los elementos con los cuales se expresa el fenómeno de intoxicación son: la concentración de la sustancia tóxica (C), el tiempo que demora el organismo de ensayo en reaccionar a dicha concentración (T) y la cantidad de ejemplares que sobrevive por un período determinado o por una concentración dada. La concentración C, representa la cantidad de materia o sustancia contaminadora agregada al agua de ensayo o medio receptor, expresada generalmente en forma volumétrica o de peso (ml/l o mg/l). No se debe confundir dosis con concentración; la primera es cuando una cantidad dada de sustancia contaminante o de prueba es introducida en el animal bien por vía oral o inyectada; y concentración es la que presenta el agua a la cual es sometido el organismo, por lo que para los bioensayos con animales acuáticos sólo debe emplearse el término concentración porque es la que en realidad se presentará en el medio e influirá sobre la biota. Cuando un ejemplar entra en contacto con un contaminante, la primera reacción del organismo generalmente es la de bloquear o cerrar el medio interior para impedir su penetración, pero como existe un daño a nivel celular, los mecanismos homeostáticos se bloquean y el contaminante continúa penetrando a mayor velocidad. Por tanto existirá una fase inicial de evolución proporcional al tiempo y una fase contraria, en que la velocidad de penetración será más que proporcional. En esas condiciones es imposible aplicar el término concentración letal mínima.

El tiempo de reacción (T), considerado como una medida de la toxicidad, es aquel en que los diferentes organismos de una población presentan un comportamiento de rechazo cuando son introducidos en una solución tóxica. Cada especie tiene un patrón de respuesta diferente en consecuencia con las condiciones ambientales. El tiempo de reacción, a diferencia de la concentración, presenta mayores dificultades para su determinación, ya que es prácticamente imposible deducir cuál es el momento en que el fenómeno de envenenamiento puede tomarse como que ha finalizado.

Muchos autores según Marchetti (1960), estiman que la aparición de la primera señal de incomodidad o de su persistencia es una señal más útil. Este estado de excitación y de viraje ha sido denominado como "**overturning**". Powers (1917) por el contrario había estimado que la muerte efectiva representa un criterio más exacto. Solamente un efecto de excitación podría afectar el comportamiento de escape ante un predador, por lo que sólo este caso indica que realmente los síntomas que alteran el comportamiento normal de los ejemplares son muy importantes y deben contemplarse en cualquier estudio de bioensayos.

Tarzwel y Henderson (1957), pudieron probar (Fig. 2), en experimentos con Dieldrín, que para una sustancia tóxica, la concentración influía sobre el momento de aparición de diversos fenómenos, dado que para las concentraciones mayores, los fenómenos eran bastante próximos o coincidían, mientras que a

través de los valores iniciales estas se diferenciaban completamente.

El tiempo de reacción o de duración de la resistencia, puede ser expresado en minutos o múltiplos de ellos, en sus logaritmos o recíprocos. El uso de los recíprocos del tiempo ($1/T$) está difundido, porque el numerador puede multiplicarse por 10; 100; 1 000 ó más, normalizando la unidad.

Cuando una población de individuos es sometida a una sustancia tóxica y en cada ejemplar que reacciona se valora el tiempo en que se produce un efecto, puede decirse que las diferencias observadas entre los diferentes individuos dan una medida indirecta de la susceptibilidad individual a dicha sustancia.

Según la cantidad de animales que reaccionan a diferentes concentraciones de un contaminante, se pueden valorar tres posibilidades:

a-) Una curva de toxicidad, relacionando la concentración contra el tiempo de reacción o muerte. (Fig. 3)

b-) Una curva de contacto-porcentaje de mortalidad, donde se relaciona el tiempo de muerte o manifestación de efecto y su respuesta porcentual. (Fig. 4)

c-) Una curva de concentración-respuesta porcentual, donde se relaciona la concentración del contaminante con la respuesta porcentual en un tiempo único dado. (Fig. 5)

En el caso de los crustáceos el fenómeno de intoxicación provoca reacciones que se pueden diferenciar en varias etapas:

a-) Fase I o de Intranquilidad: Las especies presentan saltos bruscos, van a la superficie y bajan repentinamente, aparecen movimientos erráticos.

b-) Fase II o de Tranquilidad aparente: Los ejemplares recuperan la tranquilidad, pero momentáneamente incrementan la actividad, llegando a manifestar movimientos circulares y erráticos con períodos de calma.

c-) Fase III o de Irritabilidad: Los ejemplares se vuelven irritables, ante cualquier estímulo reaccionan dando saltos, pero caen al fondo en una actitud paralítica que mantienen por cierto período, posteriormente se recuperan y vuelven a reiterar estos movimientos. La repetición de estos tiende a hacerse más cercana en el tiempo.

d-) Fase IV o de Pérdida de equilibrio: Se observan ejemplares que asumen una posición dorsal o ventral, algunos con las patas para arriba, produciéndose parálisis parcial. Los movimientos se tornan lentos y se produce cierto achantamiento del cuerpo al fondo con las patas estiradas. Comienzan los síntomas de agonía.

e-) Fase V o de Muerte: En algunos casos después de un período sin equilibrio y de reposo total, se incrementa la actividad y se producen saltos erráticos para caer al fondo en cualquier posición, cesan los movimientos respiratorios, permaneciendo así, hasta su muerte.

2.8 CURVA DE TOXICIDAD

La relación entre la concentración de una sustancia contaminante y el tiempo de reacción de los ejemplares a ella, puede expresarse según una línea teórica constante que responde a la ecuación:

$$K = C * T$$

Donde:

K = constante de la hipérbola equilátera que describe la susceptibilidad de la especie

C = concentración de la sustancia estudiada

T = tiempo de reacción ante la sustancia por los ejemplares

Esta ecuación puede ser interpretada como si en un fenómeno determinado, dos variantes diferentes son inversamente proporcionales entre sí, la expresión gráfica del fenómeno responde al trazo de una hipérbola equilátera, la cual es asintótica a los ejes de las ordenadas y las abscisas. Esta expresión es válida, cuando la rapidez de acumulación del contaminante es proporcional a su concentración en el ambiente. Si el contaminante está libremente diseminado en el organismo, y el tiempo de reacción del organismo a la sustancia tóxica es suficientemente prolongado para garantizar el equilibrio de esta difusión, la actividad límite del contaminante en el medio externo corresponde a la alcanzada en el interior del organismo.

Contrariamente, por parte del ejemplar existe la posibilidad de resistir en una primera etapa, reaccionar posteriormente y eliminar el tóxico en una segunda etapa de rechazo en forma no muy proporcional a la concentración del mismo, ya que el daño percibido en la primera etapa facilita una penetración más rápida de este. Luego la ecuación quedaría representada como:

$$K = C^n * T$$

Donde:

n = representa la suma de las reacciones de desintoxicación y de daño progresivo del ejemplar

C = concentración del contaminante

T = tiempo de reacción por parte de los ejemplares frente al contaminante

Si se relaciona el logaritmo del LT50 o período medio de letalidad contra el logaritmo de la concentración, se encuentra una relación lineal completa y la ecuación resultaría:

$$\log T = K - \log C$$

Donde **K** y **N** toman valores específicos para cada contaminante según la especie estudiada.

3.0 MATERIALES Y METODOS.

3.1 GENERALIDADES

Los postlarvales de langosta *Panulirus argus* (Latreille, 1804), utilizados en el trabajo experimental con DDT fueron colectados en Cayo Guayo (plataforma sur oriental de Cuba) y transportados al laboratorio por carretera durante un período de 6-8 horas, en recipientes plásticos, con 60 litros de agua de mar, a razón de 1 ejemplar por litro de agua. Durante el período de transportación se mantuvo la concentración de oxígeno del agua por encima de 5.0 mg/l con ayuda de un aereador de batería. En el laboratorio los ejemplares se aclimataron y observaron por 4 días como mínimo antes de iniciar los bioensayos. Durante este período los postlarvales, (exceptuando los del estadio I), fueron alimentados con fragmentos de 8-27 mm³ de carne de moluscos (quitones o calamares), hasta el día anterior a iniciarse los experimentos de toxicidad aguda. Las biopruebas se comenzaron siempre que la mortalidad fuera menor al 10 %.

El agua empleada como diluyente o de control fue bombeada desde un punto a unos 80 metros de la costa, en la región noroeste de la Ciudad de la Habana. Las soluciones experimentales se prepararon, según Reish (1986), a partir de una solución madre de DDT (Dicloro Difeníl Tricloroetano) a razón de 1.0 g del producto puro diluido en 100 ml de acetona (P.A); 1 ml de esta solución contiene 10 mg de DDT.

Los parámetros físico químicos determinados al agua fueron: oxígeno, temperatura, pH y salinidad. Los valores medios para cada bioensayo se presentan en la tabla 1.

El oxígeno fue determinado según el método de Winkler al nitruro (APHA, 1985); la temperatura con un termómetro de inmersión graduado en décimas de grados Celsius, el pH en un equipo eléctrico de 0.5 unidades de precisión y la salinidad por el método argentométrico que propone la FAO (1975).

Para los ensayos de toxicidad con DDT se emplearon recipientes de 20 litros a razón de 10 ejemplares en cada uno, y para las de crecimiento, frascos de 2 litros con una postlarva. La tabla 2 presenta un resumen de la morfometría de los animales empleados donde el largo representa la longitud desde la base de las anténulas hasta el final del telson.

El procedimiento experimental para escoger las concentraciones de prueba fueron escogidas según la serie logarítmica que recomienda el APHA (1985), con recambio del agua cada 48 horas. Para cada concentración experimental se utilizaron 10 ejemplares distribuidos aleatoriamente. Un animal se consideró muerto cuando entró en la fase V del fenómeno de intoxicación que se evidencia al observarse el cese de todos los movimientos respiratorios o la inmovilidad general. Al observarse esto, los cuerpos se retiran para evitar la descomposición del agua.

Para las pruebas de toxicidad aguda se empleó la aireación controlada a razón de 2-3 litros de aire por minuto.

El cálculo de las concentraciones letales se efectuó por los métodos gráficos (aritmético y semi-logarítmico) del APHA (1985), y por el de los Probits de Bliss (1941) según un programa computacional, el MSTAT de la Universidad de Michigan. Los límites de confianza y los niveles de toxicidad para los probits 84 y 16 se calcularon utilizando el paquete de programas "Probits" elaborado en Turbo Pascal (Suárez et al, 1994).

Para la evaluación de concentraciones subletales se estudió el efecto de una concentración inferior a la presumiblemente no dañina sobre el crecimiento de los ejemplares.

Conociéndose que el crecimiento en largo para los crustáceos no es un proceso continuo, sino que ocurre con la muda de los ejemplares, se empleó el método gráfico de Hiatt (1948) utilizado por Kurata (1962) para estudiar el incremento en talla producto de la muda. Este procedimiento utiliza la relación entre el largo de la exuvia nueva (L_{n+1}) contra la anterior (L_n) como variable independiente y la expresión que representa la línea recta es:

$$(L_{n+1}) - L_n = a [(L_n - (L_{n-1}))]$$

En esta ecuación la pendiente o constante "a" denota la tasa a la cual la talla se incrementa a mudas sucesivas y recibe el nombre de coeficiente de crecimiento.

Para los experimentos con cromo se utilizaron camarones acanalados *Penaeus notialis* (Pérez Farfante, 1967). Esta especie que fue escogida por su relativa abundancia en las aguas

de nuestra plataforma, su importancia económica y su fácil adaptabilidad a las condiciones de laboratorio.

Los camarones fueron capturados mediante arrastres de 30 a 60 minutos en el lóbulo inferior de la Bahía de Cienfuegos. después de su captura los camarones fueron escogidos por su tamaño y colocados en bandejas de recuperación, durante un periodo de una hora aproximadamente, pasándose a tanques plásticos de 110 litros a razón de 250 ejemplares por recipiente. El traslado al laboratorio se realizó por carretera durante unas 6 horas, en los mismos tanques a los cuales se les suministró aire difundido para mantener un nivel de oxígeno disuelto en el agua, mayor a 3.0 mg/l; La temperatura del agua se disminuyó por medio de hielo colocado en bolsas de polietileno hasta mantener un nivel cercano a 24° C, para así provocar un descenso del metabolismo respiratorio y garantizar que su actividad no agote el oxígeno disponible en el agua de traslado. Una vez en el laboratorio los camarones se mantienen entre 7 y 10 días en tanques de aclimatación antes de comenzar cualquier experimento con ellos. En estos tanques se mantuvo circulación constante de agua, aireación continúa y alimentación diaria, la cuál se suspendió un día antes de iniciar los bioensayos. El procedimiento de realización de los bioensayos de toxicidad fue el mismo que se utilizó para los de langostas con DDT.

Para investigar las capacidades acumulativas del camarón se preparó una serie experimental con la concentración encontrada

como presumiblemente no dañina, en cada recipiente de ensayo se colocaron aleatoriamente. Durante esta experiencia se mantuvo la aireación y se registro la temperatura y el contenido de cromo. El agua fue cambiada cada 48 horas. Durante el recambio los animales fueron alimentados y no así mientras permanecían en la solución de prueba.

Para las determinaciones de cromo en el tejido, fueron escogidas al azar de las diferentes bandejas dos ejemplares diarios durante los días que duró la experiencia. Al ser extraídos eran lavados con agua destilada, tratando de eliminar las partículas del metal precipitadas sobre el exoesqueleto, y guardados en congelación hasta el momento de su análisis. Las determinaciones de cromo en tejido se realizaron según el método colorimétrico de la difenil carbazida descrito en el APHA (1985). Posteriormente, para realizar las experiencias de desacumulación, al finalizar el séptimo día de la prueba los ejemplares fueron trasladados a bandejas con agua circulante exenta de cromo, aireación constante y alimentación periódica. Al cabo del séptimo día, se determinó la concentración de Cr en los ejemplares, con la finalidad de determinar la tasa de desacumulación. Se calculó el factor de concentración para esta especie, para lo cual se consideró la relación de concentración entre el medio 2 (organismos) y el medio 1 (concentración de exposición a los animales).

Las determinaciones respirométricas, se llevaron a cabo, para determinar las posibles afectaciones metabólicas que podría inducir el cromo sobre el metabolismo respiratorio de los camarones. Para ello se empleó un respirómetro de circuito abierto según propone Pora (1955), pero modificado para lograr el paso del contaminante a la concentración deseada dentro del propio respirómetro. La modificación consistió en acoplar a dicho respirómetro una botella Mariotte, (Suárez, 1975), para obtener concentraciones diferentes dentro de cada una de las 4 cámaras respirométricas, que son cilíndricas y con una capacidad de 0.35 litros. Estas estaban conectadas a un recipiente de 35 litros, donde se mantuvo siempre el volumen constante para evitar las variaciones del flujo. Diariamente se midió la salinidad y el gasto del agua.

En el respirómetro los animales fueron sometidos al efecto del agua de dilución, iniciándose las determinaciones entre 1.5 y 2.0 horas después de ser introducidos en las cámaras. El consumo de oxígeno se determinó durante las 3 primeras horas, posteriormente se acopló al respirómetro la botella Mariotte deliberarandose el cromo a las cámaras por un período comprendido entre 1.5 y 2.0 horas y de forma similar al paso del agua de dilución se hicieron las determinaciones de oxígeno cada hora.

El cálculo de la tasa metabólica se llevó a cabo, según la metodología propuesta por Pora (1955) realizándose la corrección

a 27.0 °C por medio de los coeficientes de la curva de Krog (Winberg, 1956). La ecuación que permite relacionar el consumo de oxígeno con el peso de los ejemplares se determinó con ayuda del paquete de programas Excel Ver. 7.

Para las pruebas de conducta se utilizó un fluvionario, modificado de una propuesta de Hoglund (1961), construido de material plástico. La parte inferior del mismo poseía múltiples subdivisiones numeradas que permitían conocer la ubicación de cada camarón al instante de observación (Fig. 6). A dicho fluvionario le era suministrado por un extremo agua de dilución y por el otro el contaminante a una concentración conocida, la salida del agua era cambiada de posición, de manera que fuera posible establecer un gradiente de concentraciones al cual poder exponer los ejemplares y analizar el comportamiento de aceptación o rechazo a la sustancia de prueba.

Se realizaron observaciones continuas durante un período de 4 horas, cada 2 minutos, anotándose en un gráfico la posición de cada ejemplar. El procesamiento estadístico se realizó según la metodología que propone Hoglund (1961) y Clarke y Green (1988). Con estos datos se construyó el gráfico de comportamiento por gradiente de concentración establecido.

El procedimiento experimental que se siguió fue el estándar del APHA (1985), con las modificaciones propuestas por Berg y Granmo (1976) para las pruebas de larga duración. Las soluciones experimentales fueron preparadas con plomo como nitrato de plomo

[Pb(NO₃)₂], diluido en agua desionizada, a la que se le agregó 0.5 ml de ácido clorhídrico concentrado, por cada 5 litros de solución patrón para garantizar la constancia de la disolución. En el agua experimental, se determinó la temperatura, la salinidad, el oxígeno y el pH. El agua de dilución experimental fue colectada de igual forma a la utilizada para las pruebas con los postlarvales de langosta y se siguió la misma metodología para todas las pruebas.

En los experimentos se cambió la solución de prueba cada 48 horas, alimentándose por igual todos los ejemplares, ya que en una prueba de larga duración se debe garantizar que la muerte no ocurra por inedia.

Todos los recipientes de ensayo recibieron aireación controlada a razón de 3 litros por minuto. Para evitar el efecto desfavorable que provoca la manipulación, los ejemplares se pesan y se determina su sexo al morir o después de terminar el ensayo. En la tabla 3 se presentan los resúmenes de todos los experimentos respecto al peso y sexo de los ejemplares utilizados en los ensayos de toxicidad con plomo. Para cada concentración se emplearon 10 camarones con los cuales se determinó el LC50, LC94 y el LC16 que son los valores representativos de la concentración letal para el 50 % de los casos y los umbrales de mortalidad y supervivencia respectivamente; así como el LT50 o tiempo letal medio; el PA50 o concentración a la cual el 50 % de los ejemplares muestran

perdida de actividad y el PE50 o concentración a la cual la mitad de los ejemplares perdieron el equilibrio.

Las concentraciones letales fueron calculadas siguiendo el procedimiento de Bliss (1935) que recomienda Pascua (1974) y el LT50 según la metodología de Litchfield y Wilcoxon (1949): ambos métodos incluyen pruebas de Chi^2 para comprobar su ajuste. Durante los 10 días de observación, los recipientes de ensayo fueron inspeccionados con regularidad para retirar los ejemplares muertos.

Para los experimentos de camarones con cobre, se empleó sulfato cúprico penta hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) que se diluyó con agua destilada.

Las determinaciones físico químicas llevadas a cabo fueron: pH, salinidad, oxígeno, temperatura y cobre en las muestras de agua; en los tejidos se determinó cobre y proteínas.

En tejido el cobre se determinó según FAO (1975) y las proteínas totales según el método de Korzhova (1966).

Todos los experimentos de toxicidad fueron del tipo de flujo semi continuo, con un recambio de 300 ml de agua por minuto. El agua de dilución se unía con la contaminada, según se observa en la figura 7, en un embudo de mezcla después de ser impelida por una bomba preristáltica y caía en un tanque de plástico de 35 litros de capacidad útil. Los experimentos fueron del tipo semi continuo porque durante 8 horas del día se circuló la concentración del contaminante, sin ningún tipo de aireación y

durante el resto del día se inyectó aire al agua a razón de 3 litros por minuto. Todos los componentes del sistema en contacto con el contaminante fueron de PVC, silicona y cristal.

La concentración del cobre en el agua experimental fue determinada entre 3 a 4 veces durante el período experimental y los resultados fueron promediados y usados como los valores de las pruebas. Los ejemplares se colocaron aleatoriamente en cada tanque de experimentación. El peso de los ejemplares, (Tabla 4) fue determinado después de muerto o al final de los bioensayos. Para cada concentración experimental se emplearon 10 camarones determinándose los LC50; LC84 y LC16 (concentraciones letales para el 50; 84 y 16 % de los ejemplares) y LT50; PA50 y PE50 (tiempo letal, en perder la actividad y el equilibrio del 50 % de los ejemplares). Las concentraciones y tiempos letales fueron determinadas siguiendo el método de Litchfield y Wilcoxon (1949). Durante todo el tiempo de observación (10 días) los ejemplares no se alimentaron y los tanques de ensayo fueron inspeccionados varias veces al día. Con los valores de toxicidad determinados, se llevaron a cabo las pruebas de acumulación y experimentos subletales en ejemplares juveniles capturados en áreas de hasta 0.7 metros de profundidad en la costa centro oriental de la Bahía de Cienfuegos, los cuales tenían una talla entre 20 y 35 cm de largo total.

3.2 METODOLOGÍAS PARA BIOENSAYOS

Para la evaluación de la toxicidad de todos los productos utilizados sobre los organismos de prueba, fundamentalmente se emplearon tres métodos; comprendiendo procedimientos simples y complejos

3.2.1 Método rutinario de bioensayos

Este método según el APHA (1985), constituye el procedimiento más simple de evaluación de cualquier sustancia contaminante sobre un grupo de ejemplares de una misma especie. Con el se calcula el LC50, que es la concentración que resulta letal para el 50% de los ejemplares sometidos a experimentación o mediana del límite de tolerancia al cabo de un período de exposición específico. Este período generalmente es de 24, 48 y 96 horas; aunque en este trabajo se utilizaron observaciones desde 0 a 240 horas.

Las concentraciones (FAO, 1981), de las diluciones para los residuales industriales se expresan como por ciento en volumen y el de las sustancias tóxicas individuales en partes por millón (ppm o mg/l) o en partes por billón (ppb o $\mu\text{g/l}$).

Para evaluar la toxicidad de cada contaminante se probaron diferentes concentraciones de forma tal que la LC50 se estima por interpolación gráfica.

Antes de cada prueba, se realizaron ensayos exploratorios a pequeña escala para determinar sobre que concentraciones se debe precisar la investigación. El rango empleado fue de 100; 10; 1; 0,1 ó 100; 32; 10 y 3,2 unidades (%; ppm o ppb) del residual industrial o de la sustancia probada. El rango de concentraciones seleccionada para el trabajo de precisión se establece entre la concentración mayor en la que hayan sobrevivido todos los ejemplares al cabo de 24 horas y la concentración menor en la que todos o casi todos perecieron en el mismo período.

Para los experimentos se utilizaron series de concentraciones logarítmicas, tal como se muestra en la tabla 5, que recomiendan Reish y O`Shida (1986). Estos valores pueden representar concentraciones en por ciento en volumen, en mg/l o en $\mu\text{g}/\text{l}$, y en caso de necesitarse cada una de estas, puede multiplicarse o dividirse por cualquier potencia de 10. De dicha tabla generalmente solo cinco valores de ellos son suficientes para evaluar la toxicidad, (FAO, 1981).

Un mayor número de concentraciones no tiene justificación, pues el fundamento de este método es lograr la mayor y más precisa información con el menor número de pruebas.

Una vez preparadas todas las soluciones de prueba, los animales se colocan en los acuarios ensayo lo más pronto posible, toda la operación debe ser ejecutada en menos de 30 minutos, desde el momento de colocar el primer ejemplar hasta el último.

Cualquier animal que durante esta operación se caiga o presente síntomas de intranquilidad es retirado y sustituido pues no debe emplearse experimento.

En cada recipiente, se realizan todas las observaciones que sean posibles, fundamentalmente la cantidad de ejemplares muertos después de 24; 48 y 96 horas, aunque las que se realizan en las primeras 4 a 8 horas resultan importantes para identificar la naturaleza de la sustancia empleada y sirve de guía para los ensayos posteriores. Anotándose cualquier síntoma de anormalidad que pudiera ayudar a la interpretación de los resultados.

Cada vez que se detectó un ejemplar muerto, este fue retirado para evitar la descomposición del agua.

Las determinaciones físico-químicas fueron verificadas antes de colocar a los ejemplares en los recipientes de bioensayo, cada 24 horas, después de ocurrir la mortalidad en cualquier concentración, y a la culminación del bioensayo, en dependencia de que sea estático, semi continuo o continuo.

La estimación de la LC50 se realizó por interpolación en un gráfico que se desarrolla en papel semi-logarítmico, donde el porcentaje de supervivencia representa a la variable independiente y se ubica en el eje de las X o aritmético, y la concentración de la sustancia de prueba como variable dependiente en el eje de las Y o logarítmico.

Con el ploteo de los puntos observados se trazo una línea recta entre los dos puntos que representan las proporciones de supervivencia de dos concentraciones sucesivas de la serie experimental que hallan sido letales para más y menos de la mitad de los ejemplares de prueba.

Partiendo del valor de la mediana (50%) del eje de supervivencia, se eleva una perpendicular que intercepta a la línea trazada y este a su vez se prolonga desde dicha línea hasta el eje de las Y o concentración, hallándose así la LC50. Esto se realiza para cada período de exposición por lo que deben obtenerse varios valores de LC50 relacionados posteriormente entre ellos, según su período. (Fig. 8).

No obstante, la facilidad del método gráfico, para este trabajo se utilizó todos los puntos experimentales y se ajustaron a la ecuación de la recta para ganar en la potencia del estimador. La precisión de este método depende del grado de uniformidad de los animales utilizados con respecto a su respuesta de resistencia o supervivencia a cada substancia de prueba en particular y a la variación biológica de los animales utilizados y generalmente es del 10%.

3.2.2 Método probabilístico de Bliss (Probits)

Bellan (1981), y APHA (1992), recomiendan el método de Bliss (1935) y su modificación, (Bliss, 1938) que Stora (1972) comprobó para experimentos con organismos marinos. Este método se basa en la relación concentración-efecto, donde los efectos encontrados son proporcionales al logaritmo de la concentración del contaminante y responden a una distribución normal. Si el porcentaje de animales muertos se relaciona contra el logaritmo de la concentración del contaminante ensayado, se obtiene una curva sigmoidea que tiene una distribución de frecuencia normal acumulativa. (Fig. 9).

Bliss efectuó una transformación a la escala de las ordenadas, a la cual llamó "transformación probit". Con unidades probit, la curva sigmoidea se convierte en una línea recta. El método de cálculo consiste en determinar la ecuación de una línea de regresión entre los probit de mortalidad y el logaritmo de las concentraciones empleadas y responde a la ecuación:

$$y = \bar{Y} + b (x - \bar{X})$$

Los pasos para su cálculo fueron los siguientes:

1-) Se construye una tabla con todas las concentraciones del contaminante empleado para los bioensayos como componente de la primera columna. (Tabla 6).

Se anotan los porcentajes de mortalidad que se corresponden a cada concentración. Si en los ejemplares de control ocurren

muerres, siempre que esta no sea mayor del 20%, se corrigen todos los valores observados con la fórmula de Abbot (1925), que FAO (1981) y APHA (1992) recomiendan:

$$Mc (\%) = \frac{Mo - Mt}{100 - Mt}$$

Donde:

Mc = mortalidad corregida (%)

Mo = mortalidad observada (%)

Mt = mortalidad en control (%)

3-) Las concentraciones empleadas se transforman a logaritmos y se denominaron "X"

4-) Los valores de X se elevan al cuadrado (X^2)

5-) Se establece según el % de mortalidad de la tabla 7 ; los probits empíricos (P).

6-) Se introduce una columna con el número de ejemplares empleados para cada concentración experimental (N).

7-) Se traza en el papel logarítmico aritmético la curva provisional, ploteandose los probits de mortalidad empírica (P) contra el logaritmo de la concentración y con estos puntos se ajusta una recta. (Fig. 10)

8-) Con la recta obtenida se determinan los probits esperados.

9-) Mediante los probits esperados (Pe) de la tabla 8; se obtienen los probits corregidos (Y).

Los probits corregidos se calculan según el probit esperado, sea este igual o mayor a 5 según las ecuaciones siguientes :

$$\text{Si } Pe \geq 5 \quad Y = (Y + Q/Z) - q (1/Z)$$

$$\text{Si } Pe < 5 \quad Y = (Y - P/Q) + p (1/Z)$$

donde:

$(Y + Q/Z)$; $(Y - P/Z)$ y $1/Z$ se determinan según la tabla 8.

p = mortalidad porcentual expresada en fracción decimal

q = supervivencia porcentual expresada en fracción decimal

10-) Se obtuvo Z^2/PQ para cada Pe de la tabla de probits de trabajo. (Tabla 8).

11-) Los valores de Z^2/PQ se multiplican por N y representan el peso total de respuesta (W)

12-) Se procede a efectuar W por el logaritmo de la concentración (X), obteniéndose WX .

13-) Se efectúa W por Y

14-) Se efectúa WX por Y , obteniéndose WXY

15-) Los probits corregidos (Y) se elevan al cuadrado, obteniéndose los valores Y^2

16-) Se multiplica el cuadrado de los logaritmos de las concentraciones (X^2) por el peso total de respuesta (W) lográndose WX^2

17-) El cuadrado de los probits corregidos (Y^2) se multiplica por el peso total de respuesta (W) y se obtiene WY^2

18-) Se calcula la curva de mortalidad con los logaritmos de las concentraciones (X) y los probits corregidos con la ponderación del peso total de respuesta (W).

La ecuación de la curva de mortalidad se resuelve según:

$$Y = \bar{Y} = b (X - \bar{X})$$

donde:

$$\bar{Y} = \frac{\Sigma(WY)}{\Sigma W} \qquad \bar{X} = \frac{\Sigma(WX)}{\Sigma W}$$

$$b = \frac{\Sigma(WXY) - \bar{Y}\Sigma(WX)}{\Sigma(WX^2) - \bar{X}\Sigma(WX)}$$

19-) De la ecuación de la curva de mortalidad se calculan los valores de X según:

$$X = \bar{X} + 1/b (Y - \bar{Y})$$

20-) Se calcula el logaritmo de LC50 utilizando 5 como valor de Y que se correspondiente al 50% de mortalidad que se presentó en la tabla 7, donde:

$$\log LC50 = \bar{X} + 1/b (5 - \bar{Y})$$

21-) Con el antilogaritmo del valor encontrado se obtiene la LC50 para cada período de horas requerido.

22-) Para calcular los valores de LC84 y LC16 se sustituye en la ecuación el valor de 5 por 6.018 y 3.982 respectivamente.

23-) Con una prueba de Chi² se determina la concordancia entre los valores observados y la curva de mortalidad determinada. La ecuación de cálculo será:

$$\text{Chi}^2 = \{ [\Sigma(WY^2) - Y\Sigma(WY)] - b[\Sigma(WXY) - Y\Sigma(WX)] \}$$

con n-2 grados de libertad, donde:

n = cantidad de concentraciones utilizadas en el experimento.

Si Chi² de la tabla 9 es mayor que el calculado para un límite de confiabilidad del 95%, es significativa la linealidad de la curva, la población experimental se puede considerar homogénea, y los datos son consistentes con la línea de regresión calculada.

24-) Si la prueba de Chi² ofrece linealidad, se calcula la varianza de la LC50 según:

$$\sigma = V(\log LC50) = \left\{ \frac{1}{b^2} \left[\frac{1}{b} - \frac{(\bar{Y} - Y)^2}{\Sigma(WXY) - X\Sigma(WX)} + \frac{1}{\Sigma W} \right] \right\}$$

25-) La desviación estándar del LC50 en logaritmos se calcula según:

$$D S = \sqrt{v} (\log LC50)$$

26-) Los logaritmos de los límites de confianza de la LC50 se calculan así:

$$\log(\text{límite superior}) = \log(LC50) + 2DS$$

$$\log(\text{límite inferior}) = \log(LC50) - 2DS$$

27-) Se construye en papel semi-logarítmico la curva de toxicidad, ploteando los valores de los LC50 para cada período

de tiempo con sus límites de confianza y las bandas de LC16 y LC84. (Fig. 11)

3.2.3 Modificación de Litchfield y Wilcoxon

Las curvas de efecto contra el tiempo de reacción desarrollada en papel logarítmico probabilístico por Bliss (1938), pero requieren de un procedimiento muy laborioso, aunque tienen la ventaja de que, además de calcular la LC50 o LT50, se obtienen los errores estándar con sus límites de confianza.

Litchfield y Wilcoxon (1949) propusieron una metodología rápida, donde sustituyen los cálculos por tres nomogramas que permiten estimar los parámetros de toxicidad y los límites de confianza de las curvas completas o truncadas.

El procedimiento para el cálculo de los parámetros de toxicidad fue el siguiente:

- 1-) Se prepara una lista ascendente o descendente de las concentraciones empleadas para los bioensayos. (Tabla 10).
- 2-) Se agrega una columna donde se especifica el número total de ejemplares utilizados para cada concentración.
- 3-) Se expresan los valores de la columna anterior en mortalidad o supervivencia porcentual.
- 4-) Se plotean las concentraciones en la escala de las "X", contra el porciento de mortalidad ("Y"), en papel log-prob. La escala probabilística en las ordenadas y la logarítmica en las

abscisas. No es necesario plotear los valores comprendidos por debajo de 16% y por encima de 84% (Fig. 12).

5-) Se traza una línea recta, a través de los puntos ploteados. esta puede ajustarse por medio de un análisis de regresión.

6-) Se lee de la línea de ajuste, o de la ecuación de regresión los valores de mortalidad esperados, para cada concentración empleada.

7-) Se listan las diferencias existentes entre los valores observados y los calculados, para cada concentración. Si el valor esperado para cualquier concentración es menor que 0,1 o mayor que 99,99, se elimina, empleando el efecto esperado y ploteando de la tabla 11 el valor corregido para 100 y 0% de mortalidad. El procedimiento a seguir es anotar el valor de mortalidad esperada que se corresponde a la recta teórica trazada y este se busca en la tabla mencionada y se anota la supervivencia corregida que es la que se tomará en cuenta para los cálculos.

8-) Del nomograma 1 (Fig. 13), se obtiene el valor de χ^2 para cada concentración.

9-) Se multiplican los valores de χ^2 obtenidos por el número de ejemplares de ensayo y se suman.

10-) Se compara el valor calculado en el inciso 9 con $K-2$ grados de libertad, donde K es la cantidad de concentraciones utilizadas, con el valor de χ^2 de la tabla 9. Si la

homogeneidad es significativa, el valor de la suma de Chi^2 debe ser menor que el valor obtenido de la tabla.

11-) Por medio de una proyección de los puntos que representan al 16; 50 y 84% sobre la línea recta, se obtienen los valores de LC16; LC50 y LC84 sobre el eje de las X o de las concentraciones. (Fig. 11).

12-) Se calcula la función de la pendiente "S" mediante la ecuación:

$$S = \frac{(LC84/LC50) + (LC50/LC16)}{2}$$

13-) Se determina "N" que es el número total de animales de que se corresponden a las concentraciones que tuvieron un efecto entre 16 y 84%.

14-) Se determina el factor de los límites de confianza (f LC50) como:

$$f_{LC50} = S^{2.77 / \sqrt{N'}} = (2.77 / \sqrt{N'}) \log S$$

Este factor se obtiene del nomograma 2 (Fig. 14).

15-) Los límites de confianza con una probabilidad del 95% de certeza se determinan de la siguiente forma:

a- para el límite superior se multiplica el valor de LC50 por el f LC50 obtenido.

b-) para el límite inferior se divide el LC50 entre el f LC50.

16-) Los límites de confianza de la función "S" de la pendiente se calculan dividiendo la concentración mayor ploteada entre la menor.

17-) Con el nomograma 3 (Fig. 15), se determina "S".

18-) El factor f_s se halla por medio del medio del nomograma 2 (Fig. 14) o por la ecuación:

$$f_s = A^{10(K-1)/K} \sqrt{N}$$

19-) Los límites de confianza para la función de la pendiente, se obtienen :

a) Para el límite superior se multiplica S por f_s .

b) Para el límite inferior se divide S entre f_s .

20-) Se obtiene la curva de toxicidad ploteando los valores del LC50 con sus límites de confianza en las ordenadas, (escala logarítmica), contra el tiempo en horas en el eje aritmético.

4.0 RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de los análisis físico químicos del agua utilizada como dilución para todos los experimentos se muestran en la tabla 1, notándose que ninguno de los mismos son limitantes para los organismos marinos, ya que están dentro de los rangos recomendados por Sprague (1973) y el APHA (1992) para los bioensayos; además estos factores son semejantes a las concentraciones medias reportadas por Lluís (1983), para el agua de la plataforma cubana.

Los valores de toxicidad letal calculada por los métodos aritméticos gráficos, logarítmicos y de probits, para los postlarvales de langosta sometidos al efecto del DDT, están en la tabla 12; en el caso de las LC16 y LC84 solo se presentan para los probits, que es el único método que permite su determinación.

4.1 EFECTOS DEL DDT

Según Daugherty (1951) el DDT es un elemento de elevada toxicidad ya que actúa con valores por debajo de 1 ppm. Los valores de toxicidad letal calculada por los métodos aritmético gráfico, logarítmico y de probits, se muestran en la tabla 12; en el caso de las LC16 y LC84 sólo se presentan para los probits, que es el único método que permite su determinación. En la figura 16, se muestran las curvas de toxicidad, para los postlarvales de *P. argus* sometidos al efecto del DDT, resueltos

por el método aritmético gráfico; en la 17 las que corresponden al método logarítmico y en la 18, la curva de toxicidad resultante del análisis probit de los datos de mortalidad. Según un criterio conservador, los resultados del análisis probit son los más adecuados, pues al adoptar sus valores, que son los menores, se permitirá una mayor protección a la especie. Con un análisis de varianza bifactorial se determinó que había diferencias estadísticas significativas entre los resultados de los métodos utilizados. Una matriz de coeficientes de similitud según Bayne et al. (1988), fue empleada para realizar un análisis de cluster, según las estrategias de la similitud de Sanders y la distancia Euclidiana, separándose los resultados en dos grupos bien definidos, uno que representa los datos calculados por el método de los probits y el otro por los aritmético gráfico y el logarítmico, por lo que se estimó adoptar los resultados de los probits, presentándose para **P. argus** una LC50 para 24; 48; 72 y 96 horas de 28.1; 10.7; 8.6 y 7.2 µg/l respectivamente. Valores muy por debajo del propuesto como definitorio de sustancias de elevada toxicidad, por lo que se estima que el DDT para las postlarvas de langosta debe ser considerado como un producto de gran toxicidad (1 ppm). La ecuación de la recta que permite explicar la toxicidad para los postlarvales puede expresarse como:

$$\log LC50 = \frac{\text{Probit} - A}{b}$$

Donde:

Probit = 5.000; 6.018; 3.718 para LC50; LC84 y LC16

A = Intercepto

b = Pendiente

En la tabla 13, se presentan los valores que toman "A" y "b", para cada tiempo de reacción y una prueba Chi², donde todos los valores calculados fueron mayores a los de tabla, indicó que el ajuste de los datos a una línea recta es significativo y la ecuación representa al comportamiento del fenómeno de intoxicación. De acuerdo a los patrones de respuesta descritos por Wilson (1972), este tipo de curva de toxicidad (Fig. 18), es característica del comportamiento de supervivencia o mortalidad frente a contaminantes como metales pesados y plaguicidas y de ella pudiera estimarse, según los criterios de Powers (1917), ratificados por Reish y Oshida (1987), por simple observación de la curva, que el umbral de toxicidad está por debajo de 5 µg/l. Según Portman (1972) el LC50 a las 48 horas para camarones **Crangon crangon** en DDT se presenta entre 3.3 y 10.0 µg/l, valores semejantes a los reportados para los postlarvales de langosta; pero Butler (1965) citado por Portman (1972) presenta un LC50 a las 48 horas para el camarón café **Penaeus aztecus** de 1 µg/l, por lo que al parecer el camarón es más sensible al DDT

que las postlarvas de langosta. Eisler (1969) indicó que los valores de LC50 para 96 horas del DDT con organismos marinos están entre 0.6 y 6.0 µg/l por lo que, comparativamente, se pudiera considerar que los postlarvales de langosta están entre los grupos más resistentes a este contaminante.

El crecimiento de las postlarvas de langosta en los ejemplares de control se presenta en la figura 19. La ecuación de crecimiento para los ejemplares de control, utilizando el procedimiento de Kurata (1962), se determinó como:

$$\ln+1 = 1.130385 + 1.031371*(\ln)$$

El coeficiente "r", estadísticamente significativo según una prueba de **t**, para una probabilidad del 95 % fue calculado como 0.9891. La ecuación de la recta mediante una prueba **F** también fue significativa al 95 % de probabilidad.

Con estos valores se explica que para los estadios estudiados el crecimiento se representa como geométrico progresivo, donde las cantidades sucesivas del incremento de la talla de las postexuvias, aumenta con el incremento de la talla preexuvial. Kurata (1962) utilizando los datos de Sutcliffe (1957), reporta como generales, para los postlarvales de langosta **P. argus**, un valor de 1.0732 como coeficiente "A" y para "b" como 1.8074. Buesa (1972) también empleando el mismo procedimiento plantea valores de 1.359 para "A" y de - 6.5 para "b".

Las constantes de crecimiento medio para los diferentes instar o estadios de postlarvales de langosta con sus desviaciones

estándar, se muestran en la tabla 14, determinándose un coeficiente medio de 0.2022 ± 0.1495 . El valor de la pendiente determinada por una regresión entre los instar como variable independiente y las constantes de crecimiento medio para cada uno de ellos fue de -0.0242 (Fig. 20), con un coeficiente de correlación de 0.863 significativo para un 95% de certeza, denotando que las constantes "k" mas altas corresponden a los primeros estadios, porque la velocidad de crecimiento se hace más lenta a medida que se incrementa la talla.

En la tabla 15 se muestran las ecuaciones de crecimiento de Kurata, presentados por varios autores para *P. argus*, así como los valores del coeficiente "K".

Los largos medios de cada instar se ajustaron a las ecuaciones de crecimiento de Bertalanffy (1938), Logística (Pascua, 1974) y de Gompertz (Yamane, 1970), su representación se muestra en la figura 21.

Mediante un análisis de varianza bifactorial, se determinó que había diferencias estadísticas entre los resultados obtenidos para las ecuaciones de cálculo y los valores observados, con un F calculado de 3.11 significativo para una $p < 0.05$; así como entre los estadios con un F calculado de 224.77 altamente significativo.

Un análisis de covarianza entre los datos obtenidos para cada una de las ecuaciones y los datos observados para cada estadio postlarval ofreció, que había diferencias estadísticas

significativas entre ellos y mediante una prueba de los residuos (Tabla 16) con 13.17 contra 0.3 y - 0.4; demostró que solamente la ecuación de Bertalanffy es la que no puede explicar el crecimiento de los postlarvales. También según el coeficiente de determinación " R^2 " se estimó que las ecuaciones Logística y de Gompertz son las más adecuadas para explicar la regresión, ya que ambas eliminan el 100 % del error total, no así la de Bertalanffy que solamente elimina un 89 % del error. Una vez conocido que la concentración de 1 ppb inferior al umbral de toxicidad, provocó efectos subletales que inhibieron la muda y por ende el crecimiento de los ejemplares, pero no su patrón de respuesta a estímulos externos y a la alimentación, se procedió a sustituir todos los valores determinados experimentalmente en la ecuación que Van Horn (1949) recomienda para obtener, una concentración (C) que presumiblemente no es dañina para la supervivencia y esta se representa como:

$$C = \frac{LC50 (48 h) * FA}{S''}$$

donde:

$$S'' = \frac{LC50 (24 h)}{LC50 (48 h)}$$

$$FA = \text{factor de aplicación} = 0.3$$

Resolviendo la ecuación dada, la concentración presumiblemente no dañina o de seguridad fue calculada como 0.47 $\mu\text{g/l}$, que está

por debajo de todos los valores donde experimentalmente se determinó alguna mortalidad.

Al parecer la inhibición de la muda en los postlarvales sometidos a una concentración de 1 ppb, se debe a que el DDT según Engel et. al (1972), actúa sobre las enzimas glucolíticas y gluconeogénicas, al producir alteraciones enzimáticas que revelan un aumento del índice de degradación glucolítica de la glucosa y la desaparición de la gluconeogénesis.

4.2 EFECTOS DEL CROMO

El cromo (Lewis, 1992) es un metal pesado, con un peso atómico de 52.01 ubicado en el grupo IV de la tabla periódica y se presenta en la naturaleza como químicamente inactivo y combinado con otros elementos, fundamentalmente como cromato y dicromatos, los cuales tienen múltiples usos industriales. Entre ellos las curtidoras de pieles son una de sus principales consumidores. Se caracteriza por poseer valencias desde 0 a 6, siendo las más frecuentes 6 y 3. Su toxicidad está en función del estado de valencia, pH, Temperatura y dureza del agua, siendo las sales cromadas 6 las de mayor toxicidad por sus características de oxidante energético.

La contaminación del mar por cromo, (GESAMP, 1990), no es la misma en todas las regiones del mundo y depende de las características oceanológicas del lugar, así como del grado de desarrollo industrial del área, por lo que las concentraciones

en zonas abiertas son menores que en zonas costeras. Bittel (1973) reporta 0.5 ppb como contenido normal de cromo para las aguas oceánicas y Walichuk (1974) una concentración de 0.02 ppb de cromo, las cuales difieren grandemente, por lo que no pueden considerarse como definitivas, sino como una guía.

El licor cromo es uno de los que se emplean para la tecnología del curtido de pieles y su constitución es la de una mezcla crómica azucarada, formada por dicromato de Na y K, sacarosa y ácido sulfúrico. Es preparado a concentraciones que oscilan entre 145 y 155 g de dicromato por litro. Durante el proceso gran parte del cromo es retenido, estimándose que al final del mismo su concentración media es de 5.0 g/l. Este es empleado en los procesos de curtido y recurtido, caracterizándose sus descargas por ser discontinuas a diferentes horas del día. Aunque debe señalarse que este no es vertido de manera independiente sino combinado con otras sustancias que complementan el proceso industrial, mezclándose en las aguas receptoras con el resto de los residuales de la fábrica.

El licor cromo presenta un comportamiento característico al contacto con las aguas receptoras ya que es de naturaleza ácida y el agua puede tener un pH que oscila entre 7.5 y 8.4 (Guilcher, 1966), provocando que por medio de reacciones de neutralización una parte del Cr precipite formando flóculos de hidróxidos complejos e insolubles. Es de suponer que en zonas de descarga, los sedimentos queden cubiertos por dicho precipitado,

resultando fatal para los organismos sesiles y en general para los bentónicos.

En Cuba no existen plantas de tratamiento para residuales de este tipo de industrias, que aunque no obstante resulten complejos afectan constantemente las aguas de la plataforma.

4.2.1 Pruebas de toxicidad aguda

Los valores correspondientes a los análisis del agua de dilución se muestran en la tabla 1, apreciándose que para los límites de detección del método colorimétrico del APHA (1985) no se reportó la presencia de cromo, en alrededor de treinta determinaciones. Por lo que consideramos las concentraciones de Cr como normales, así como el resto de los factores.

En la tabla 17, se presentan los valores del chequeo sistemático de la temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y pH, en los recipientes de ensayo y en los controles, apreciándose que estos nunca fueron limitantes para la supervivencia, según los rangos de aceptabilidad propuesto por Sprague (1973) y APHA (1985), asumiéndose que el único responsable de las mortalidades ocurridas en las aguas experimentales es el residual de cromo.

Se observó que los animales antes de morir mostraban primeramente pérdida de equilibrio y con posterioridad pérdida de actividad, lo que indica afectaciones al sistema nervioso.

Se determinaron las LT50 para las concentraciones de 123.6 mg/l; 97.2 mg/l y 74 mg/l, resultando estos como 24.48 y 96 horas

respectivamente, con los cuales se construyó la curva de toxicidad característica que se muestra en la figura 22, que resultó ser una línea recta, con un coeficiente de correlación de 0.992; el coeficiente "A" fue determinado como 6.6943 y "b" como -2.5247.

De acuerdo a lo descrito por Wilson (1972) y corroborado por FAO (1992), esta curva es característica del comportamiento de los metales pesados, delimitando perfectamente el efecto contaminador del cromo, el cual a pesar de estar en un licor mixto, provoca los efectos tóxicos típicos de un metal pesado.

Se determinaron los valores de LC50, LC84 y LC16, para las 24; 48; 72; 96 y 120 horas así como las ecuaciones de mortalidad, que se muestran en la tabla 18, en la cual todos los valores se expresan tanto en porcentaje

del residual como en concentración (mg/l) de cromo en el agua.

La presentación de las curvas de toxicidad utilizando el procedimiento gráfico, se muestra en la figura 23, la cual contrasta con la que representa al procedimiento logarítmico (Fig. 24) y con la determinada con el método de los probits (Fig. 25) donde se representan las LC50; LC84 y LC16, ofreciendo una información más amplia sobre el rango de respuesta que presentan estos organismos. De todas las evaluaciones se reportan las concentraciones letales para las 24; 48; 72; 96 y 120 horas como 198; 95; 74; 73 y 52 mg/l; (0.32; 0.15; 0.12; 0.11 y 0.8 %). Estos valores se comparan con los obtenidos por

diferentes autores para esta misma especie con otros metales pesados. En la tabla 19, según reportaron Suárez y Sotolongo (1977) se aprecia un LC50 a las 96 horas para el cobre de 5.5 mg/l, indicando que estos organismos son más sensibles al cobre que al cromo, siendo la potencia del cobre sobre el cromo de 13.3, asimismo Suárez (1978) encuentra un LC50 de 20.2 mg/l para animales expuestos a Pb siendo por tanto también más sensibles a este metal, la potencia del mismo sobre el cromo resultó ser de 3.61. González (1978) reportó un LC50 a las 48 horas de 0.29 mg/l para el mercurio, denotándose una mayor sensibilidad al mercurio que al cromo, con una potencia de 327.6. Para el arsénico, Suárez y Perigó (1975) reportaron una LC50 a las 96 horas de 5 mg/l siendo menos que el encontrado para el cromo en nuestro trabajo que resultó de 72 mg/l y la potencia del mismo es de 14.6

Estos datos nos indican que el cromo presenta efectos tóxicos para esta especie en menor grado que el Cu, Pb, Hg y As siendo menos nocivo para el ambiente, pero no por ello deja de ser valorado como de gran peligrosidad dada sus características acumulativas y las implicaciones de su presencia en el ecosistema.

Portman (1972) reporta para **Crangon crangon** un LC50 a las 48 horas de 100 mg/l, muy similar al nivel reportado por este trabajo, que fue de 95 mg/l. Este camarón, aunque pertenece a

otro género muestra un comportamiento tóxico similar ante este metal.

Con los valores encontrados de LC50, LC84 y LC16 para un período de observación entre 24 y 240 horas; se construyó la curva de toxicidad de la figura 25, notándose que en las primeras 48 horas, el efecto de envenenamiento es más rápido tornándose más lento a medida que disminuye la concentración y aumenta el tiempo de exposición al mismo. La pendiente de la curva es de -2.4 para las primeras 48 horas y de -0.4 posteriormente. La figura 26 es una composición donde se superponen las curvas de toxicidad determinadas por las tres metodologías, observándose que prácticamente son las mismas. Un análisis de varianza bifactorial, demostró que no había diferencias estadísticas significativas entre los métodos, con un valor de "F" calculado como $2.33 < 3.55$ de tabla para un 95% de probabilidad.

Con los valores de toxicidad aguda se determinó la concentración presumiblemente no dañina para esta especie, según el método gráfico de Powers (1917), fue de 31 mg/l y de 6.2 mg/l según lo propuesto por Van Horn (1949). Para nuestras pruebas se escogió el valor de 6.2 mg/l como umbral de toxicidad ya que este valor coincide con una de las concentraciones empleadas en las series experimentales donde se obtuvo un 100% de supervivencia, además, según el propio Powers (1917), la valoración experimental lleva

siempre a valores inferiores que los obtenidos por extrapolación.

Como se puede apreciar en la tabla 19 se reflejan los valores de concentraciones presumiblemente no dañinas halladas para este camarón con algunos metales, pudiendo apreciarse que **P. notialis** tolera mayores concentraciones de cromo que el resto de los metales, manifestándose los efectos sub letales del mismo a partir de 6.2 mg/l.

Para comparar los efectos de toxicidad frente al residual de acuerdo a su fuente de obtención, ya que esta varió (Bahía de Cienfuegos y Ensenada de la Broa) se realizó una serie de concentraciones con ejemplares de ambos lugares, durante la cual los parámetros físico-químicos no interfirieron en la supervivencia. Con los resultados obtenidos en este experimento (LC50 72 horas) se realizó una prueba "**student**", (Word y Parrich, 1982), obteniéndose una "**t**" calculada de 2.63, menor que la de tabla que es 12.7, concluyéndose que no hay diferencias estadísticas significativas para un 95% de probabilidad entre los patrones de respuestas de los camarones de ambas zonas.

Johnson (1974), citado por Couch (1978) en su estudio sobre parasitología, sugiere que el dicromato de potasio sea usado como un agente antibiótico, porque no resulta tóxico para camarones a concentraciones menores de 5 ppm, lo que se

corresponde perfectamente con el valor de concentración umbral encontrado.

4.2.2 Acumulación

La mayoría de los estudios de contaminación a escala regional o global incluyen alguna información sobre acumulación, para conocer cuanto un elemento puede ser concentrado por los organismos de interés en relación con las concentraciones presentes en las aguas contaminadas.

La bioacumulación es un fenómeno tal que sin razones de relación o mecanismos definidos por un organismo marino o tejido en particular provoca la acumulación de altas concentraciones de un contaminante que esté en el mar (FAO, 1976).

Como producto de la acumulación es posible que ocurra una toxicidad inducida, o sea, por transmisión. Siempre que aparezcan contaminantes en el medio con posibilidad de ser acumulados o transferidos, es necesario medir estos efectos. Para ello, realizamos pruebas de acumulación exponiendo los animales a una concentración de 4.5 µg/l; 1.5 unidades por debajo de la encontrada como no dañina. Estos resultados se muestran en la figura 24, apreciándose un incremento diario de las concentraciones de cromo en los tejidos del animal expuestos al mismo. En los análisis realizados a los ejemplares controles la concentración encontrada fue de 1 µg/kg; así a las 24 horas de exposición habían acumulado 96 µg/kg, manteniendo un

incremento diario relativamente estable, siendo la concentración encontrada al cabo del séptimo día, fue de 424 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La tasa de acumulación media fue de 60.52 $\mu\text{g}/\text{kg día}^{-1}$. A partir del séptimo día los ejemplares fueron colocados en agua limpia circulante, determinándose una tasa de desacumulación calculada como 41. $\mu\text{g}/\text{kg día}^{-1}$, ya que al cabo de una semana se reportó una concentración en los tejidos de 133.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Haciendo un análisis comparativo entre la tasa de acumulación y la de desacumulación se nota que el cromo es acumulado con mayor rapidez, a un ritmo de 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ diarios, que lo que es desacumulado. Este hecho no es favorable para las poblaciones naturales que estén sometidas a este contaminante, porque la recuperación sería más lenta. La pendiente para la regresión de acumulación fue de 1.08 y la de desacumulación de -0.83.

Como el valor de la pendiente en el proceso de acumulación es mayor que 1 y la tasa se mantiene en incremento durante el período de experimentación, en el cual no se observa ninguna tendencia al asintotismo, podemos estimar que continuará en aumento antes de llegar a la concentración máxima, alcanzando quizás valores que se corresponderían al factor de acumulación de 100 que reporta Deyhlefsen (1977) para camarones café o al factor de traspaso calculado en este trabajo para **P. notialis** que fue de 20, en relación al agua normal donde ellos se encontraban.

Bittel (1993) sugiere que los órganos encargados de la regulación (branquias, órganos digestivos y riñones) alcanzan concentraciones mayores de los elementos con capacidades acumulativas, aumentando estos en función de las cantidades presentes en el medio. Esto al parecer ocurre en los camarones de experimentación, aunque no se evaluó la concentración de cromo en las branquias, se apreció cualitativamente la presencia de mayores concentraciones, comprobado esto por la coloración azul verdoso que estas presentaban.

La prueba de acumulación demostró que los camarones **P. notialis** pueden concentrar el cromo del agua de mar disuelta en su tejido, explicando como se inicia el proceso del fenómeno de intoxicación que provoca la muerte de los ejemplares por un flujo de entrada de cromo del agua del medio circundante a sus tejidos u órganos, los cuales son degradados provocando la muerte del animal, si las condiciones contaminadoras se mantienen.

4.2.3 Respirimetría

Para evaluar las afectaciones metabólicas que provoca este contaminante, se realizaron pruebas respirométricas.

El consumo de oxígeno se expresó según la ecuación:

$$Q = aP^b$$

Donde **a** es un coeficiente numéricamente igual a la velocidad de respiración con peso igual a la unidad y **b** el coeficiente que caracteriza la proporcionalidad de respiración con el aumento del peso.

El coeficiente **a** fue de 548.75 para un peso medio de 13.7 g y es característico para la especie ***P. notialis***, no observándose grandes diferencias con el encontrado por Suárez y Ramiro (1980) que fue de 584.54, para un peso medio de 6.12 g. Explicándose la diferencia según el segmento de la ecuación general de la curva teórica, determinada por las ecuaciones calculadas para cada rango de peso, con que cada uno de los autores trabajó y resultado por los valores que tomó la pendiente **b**, como 0.40 para los ejemplares pequeños y 0.77 para los mayores, lo cuál se corresponde a los propuestos por Waterman (1960) para los crustáceos en general.

De esta forma la ecuación determinada para el consumo de oxígeno en función del peso, para una temperatura media de 27 °C fue:

$$Q_{27}^{\circ C} = 548.75 P^{0.77}$$

La tasa metabólica o consumo de oxígeno en función de peso puede ser expresada por la ecuación:

$$Q_{27}^{\circ C} = QO_2 = Q/P = aP^{b-1}$$

determinándose que:

$QO_2 = 548.73 P^{-0.23}$ resulta para 27 °C y para agua normal de mar, exentas de contaminante (Curva A, fig. 28).

Esta ecuación permite estimar que los ejemplares menores poseen una tasa metabólica mayor, la cual disminuye al aumentar el peso con una pendiente de -0.23 para 27 °C.

Se determinó el coeficiente de Van Hoff (Q_{10}) que nos permite relacionar la tasa metabólica con la temperatura del agua. El mismo se calcula según la ecuación:

$$Q_{10} = [(K1/K2)10/t1-t2]$$

Donde **K1** y **K2**, según Warren (1971) son las tasas metabólicas correspondientes a las temperaturas **t1** y **t2** y este valor según Waterman (1960) alcanza valores entre 2.0 y 3.0 significando el incremento que toma la tasa por un incremento de 10 °C.

El coeficiente Q_{10} medio para *P. notialis* fue de 2.23 con un error estándar de 0.009 que se corresponde al de 2.22 ± 0.02 que presentan Suárez y Ramiro (1980).

Para conocer el efecto del cromo sobre la tasa metabólica se efectuaron pruebas respirométricas con el contaminante, empleándose concentraciones que oscilaban entre las reportadas para el LC50 a las 96 y 48 horas, es decir, 115 mg/l, una concentración cercana a la presumiblemente no dañina de 7.5 mg/l y otra muy por debajo a ella con un valor de 1.36 mg/l, la primera letal y las dos siguientes sub letales. Las ecuaciones que relacionan la tasa metabólica con el peso, según las concentraciones señaladas y a 27 °C fueron:

$Q_{27}^{\circ C} = 405.15 P^{0.12}$ para un peso medio de 13.82 g y una Q media de 553.96 $\mu\text{g O}_2/\text{g/h}$, con 115.0 mg Cr/l. (Curva C de la figura 28).

$Q_{27}^{\circ C} = 111.42 P^{0.52}$ para un peso medio de 11.60 g y una Q media de 397.03 $\mu\text{g O}_2/\text{g/h}$, con 7.5 mg Cr/l. (Curva B de la figura 28).

$Q_{27}^{\circ C} = 5584.61 P^{-1.07}$ para un peso medio de 13.31 g y una Q media de 350.46 $\mu\text{g O}_2/\text{g/h}$, con 1.36 mg Cr/l. (Curva D de la figura 28).

Estas ecuaciones y los valores para los diferentes pasos aparecen representados en la figura 28, donde mediante un análisis comparativo del comportamiento metabólico puede observarse que las rectas de correlación van elevándose con un movimiento de rotación sobre su eje en sentido horario, demostrándose que el cromo afecta la tasa metabólica desde concentraciones tan bajas como 1.36 mg/l, donde la Q media toma valores de 8.22 veces la normal, pero se mantiene la pendiente negativa. Para 7.5 mg/l el coeficiente de velocidad de respiración se hace positivo indicando un giro de 120 grados en relación a la recta sin cromo y la Q media toma valores 1.3 veces la normal.

Con 115.0 mg/l el coeficiente **b** continúa positivo, pero el giro en relación a la recta normal es de 150 grados y la Q media alcanza valores de 1.8 veces la normal.

Estas variaciones de la tasa metabólica indican que el cromo actúa como acelerador metabólico, haciendo variar no sólo la Q media, sino la velocidad de respiración (b) tomando valores de negativos a positivos, tendiendo a cero cuando el nivel de cromo se incrementa, lo que significa que los ejemplares estén muy cerca de la muerte. Estos resultados indican que la respirometría es un método de ensayo valioso para identificar los procesos que pueden ser afectados por una sustancia tóxica. El efecto del cromo sobre la respiración encontró para los camarones acaramelados, parece confirmar lo sugerido por Clarke y Clarke (1985) que lo identifica como un acelerador metabólico, además de presentarlo como ulcerante del tracto digestivo y carcinógeno.

La tasa metabólica para *P. notialis* fue calculada en función del peso, temperatura y concentración de cromo por medio de análisis multivariables, (Zameton y Papathanassious, 1989) y las ecuaciones que se encontraron son las siguientes:

$$QO_2 = 142.830000 - 17.25p - 27.72T \quad \text{para } 0.0 \text{ mg Cr/l}$$

$$QO_2 = 293.433063 - 21.676099 - 18.530964T \quad \text{para } 1.3 \text{ mg Cr/l}$$

$$QO_2 = 487.223337 - 9.208816p - 30.083962T \quad \text{para } 7.5 \text{ mg Cr/l}$$

$$QO_2 = 682.994549 - 1.269671p - 50.083235T \quad \text{para } 115 \text{ mg Cr/l}$$

En la tabla 20 se presentan los valores de QO_2 calculados para temperaturas entre 20 y 30 °C y el peso de los animales utilizados para las concentraciones de cromo investigadas. Se observa, que la misma interpreta el comportamiento de la tasa

metabólica en función de dichas variables y resulta una herramienta útil para estimar la respuesta esperada para situaciones similares a las presentadas.

4.2.4 Comportamiento

Los efectos directos de diferencias en la calidad del agua sobre el comportamiento de los organismos acuáticos ha sido estudiado experimentalmente desde diferentes puntos de vista. El método del gradiente fue introducido originalmente por primera vez por Shelford y Alle (1913). Para crear el gradiente de concentraciones utilizó un tanque alargado con un drenaje central y entrada de agua por cada extremo, uno contaminado y otro limpio, creando así diferentes concentraciones a lo largo del tanque. Este método ha sido usado en muchas investigaciones como las de Wells (1915, a,b, 1918), Powers y Clark (1943) y Jones (1947) entre otros. La técnica del fluvionario para estudiar las reacciones de los organismos acuáticos a un gradiente de concentración de agentes químicos fue descrita por primera vez por Hoglund (1953). Este sistema de gradientes permite que los quimorreceptores o los receptores de clones biológicos de los ejemplares ofrezcan una respuesta de atracción por las sustancias tóxicas del medio. Esto es importante porque permite evaluar el mecanismo de posible orientación hacia los gradientes de concentración de un contaminante, el cual pudiera ser fatal para la supervivencia de los mismos o para las pesquerías en

general, en caso de que una buena parte de la población fuera atraída por el contaminante o los rechazara migrando hacia otra zona.

Hoglund (1961) diseñó la metodología de los fluviarium para estudiar el efecto de los gradientes de concentración sobre la posición de los ejemplares a diferentes unidades de tiempo y en diferentes concentraciones creadas en un equipo diseñado por él. Sutterling (1974) presentó una revisión sobre los sentidos químicos de los animales acuáticos y su respuesta a los contaminantes, basado en los estudios de reacción a gradientes, señalando que la mayoría de los metales pesados provocan reacciones de rechazo, aunque en algunos casos para concentraciones letales no se observan respuestas de rechazo. Camarones acaramelados *P. notialis* expuestos a un gradiente entre 1.4 y 17.1 mg Cr/l (Fig. 29) mostraron un patrón de respuesta característico de rechazo. El valor de la posición media ("m.p.v.") fue de 3.3, esto quiere decir que la posición media que ocuparon los camarones dentro del fluviarium (Fig. 6) se correspondió con la zona 3 donde existe un gradiente de concentración cercano al valor presumiblemente no dañino encontrado en este trabajo. Este "m.p.v." se corresponde a un valor de 1.2 (r.v.) o desplazamiento lateral de la distribución media a la línea divisoria central del fluviarium que está entre las posiciones 4 y 5.

Como se aprecia en la figura 30, el 75 % de las observaciones del comportamiento fueron de rechazo, pero se observó un 25% de atracción entre 133.3 y 17.1 mg Cr/l. esto quiere decir que en caso de ser vertido un residual con cromo en una zona pesquera habitada por una población de camarones siempre que se creen concentraciones entre 11.0 y 13.0 (frontera de reacción) el 75% de los camarones se dispersará buscando nuevas áreas para sobrevivir y el 25% mostrará reacciones de atracción que lo conducirán a la intoxicación o muerte. Esto trae consecuencias fatales para la economía pesquera, ya que este tipo de contaminante provoca una pérdida por mortalidad inducida o intoxicación igual al 25% de la biomasa que será traída por el contaminante hacia la muerte. Pero como el resto se dispersará buscando otras áreas será necesario intensificar el esfuerzo pesquero, si se quiere obtener el mismo volumen de captura, de cuando la población no estaba sometida a los efectos del cromo.

4.3 EFECTOS DEL COBRE

Los resultados del análisis físico químico, para los experimentos de letalidad y de acumulación se muestran en las tablas 21 y 22.

Los LC50 para los camarones *P. notialis*, se presentan en la tabla 23; y se emplearon para construir la curva de toxicidad de la figura 31. El LC50 para 24,48,72 y 96 horas fue de 18.0;

11.0; 9.0 y 5.5 mg/l; respectivamente. Comprobándose según un análisis de χ^2 , que el ajuste de las curvas fue bueno.

Con los valores de toxicidad se determinó un valor de 1.2 mg/l como presumiblemente no dañina y permitió experimentar con juveniles de camarón en un período de 120 horas con una concentración de 0.18 mg/l. Esta concentración aunque por debajo de la presumiblemente no dañina para los adultos, ofreció un LT50 de 72 horas, (Fig. 32); indicando que estos son mas susceptibles que los adultos y representa un hecho desfavorable para la supervivencia de la especie en un medio natural que fuera contaminado con este elemento.

El experimento de acumulación duró 20 días y permitió estimar el factor de acumulación del cobre, para camarones adultos bajo el efecto de una concentración de 0.26 mg/l. El factor de acumulación fue calculado como 156 para 20 días. Sin embargo si tomamos en consideración los ejemplares de control en aguas con 9.9 μg Cu/l, el factor de acumulación será de 2600 que podría ser considerado como el normal para los camarones.

Para un experimento de letalidad con un periodo de contacto del orden de los 10 días, en una concentración de 2.1 mg/l también se obtuvo un factor de 157, semejante al determinado (156), para el experimento de acumulación. Todos los factores calculados se presentan en la tabla 24.

La concentración de cobre en los camarones sin someter al contaminante fue de 56 mg/kg, con un 16.2 % de proteínas

totales, sobre la base de peso húmedo para ambos. Las variaciones de las concentraciones de cobre y proteínas en el tejido de los camarones, en dependencia de la concentración del medio acuático, se presentan en la figura 32. De la misma se comprende que existe una relación inversa entre el contenido de cobre en tejido y las proteínas totales; al parecer el cobre ejerce un efecto degradativo de las proteínas corporales.

Los tiempos de letalidad medio de los ejemplares fueron de 160; 138; 96; 110; 48 y 32 horas, para concentraciones de 2.1; 4.9; 6.5; 9.0; 13.4 y 15.4 mg/l respectivamente. Contrastando con el tiempo en que pierden su actividad y el equilibrio, como se muestra en la figura 34; observándose que la pérdida de actividad y equilibrio son fenómenos que se presentan uno después del otro en un período de tiempo breve, para después ocurrir la muerte.

El efecto que provoca el cobre del agua, puede comprobarse indirectamente con las observaciones de las mudas, las cuales ocurrieron solamente en los experimentos de control, fenómeno ausente en los camarones sometidos a cualquier concentración de cobre por encima de 2.0 mg/l.

Los factores físico químicos de todos los experimentos indican, que ninguno de ellos, a excepción del cobre, fue responsable de las muertes ocurridas entre los camarones ya que los valores coinciden dentro de los rangos que el A.P.H.A. (1985) y Sprague (1973) proponen como buenos para la supervivencia de los

organismos vivos. Las variaciones dentro de los factores empleados, fueron mínimas. El pH del agua de control de un valor máximo de 8.1; disminuyó solo hasta 7.7 en la concentración de 15.4 mg/l; el oxígeno para ese mismo rango varió de 7.22 mg/l hasta 7.02 mg/l y la salinidad de 36.05 g/l disminuyó hasta 35.79 g/l, los cuales no pueden responsabilizarse con la mortalidad ocurrida en las pruebas. Solo el cobre disuelto en el agua es el único responsable de las mortalidades reportadas en cada experimento, ya que este elemento es capaz de provocar convulsiones y expulsión de heces con exceso de mucosa colorada de verde (Garner, 1975) hecho que se observó en los experimentos de toxicidad llevados a cabo, además según Hubschmann (1967b), el cobre provoca la coagulación de las proteínas y en concentraciones por encima de 1 mg/l las enzimas respiratorias se inhiben con bastante rapidez, aunque por debajo de esta, solo es capaz de provocar la degradación celular de los tejidos en periodos largos de exposición.

En los experimentos relatados aquí y como se señalan en la figura 33, se presenta cierta desnaturalización de las proteínas como indicaron Corner y Sparrow (1956). Esto se refleja en un incremento del orden de 7 a 16 % en la disminución de los valores de proteína en aquellos camarones sometidos al efecto del cobre desde 2.1 a 12.0 mg/l. Aunque se nota que en concentraciones de 15.0 mg/l, prácticamente no ocurre desnaturalización y esto se debe a la rápida mortalidad que

provoca la intoxicación cúprica que conduce a la coagulación de las proteínas y se refleja en el mantenimiento del valor al no darle tiempo a actuar. Una regresión entre el contenido proteico, según la concentración de cobre acumulado en el tejido vivo, dio un coeficiente de correlación de 0.73, significativo para un 95 % de confianza. Los coeficientes b_0 y b_1 hallados fueron de 16.0629 y -0.5296 respectivamente. Con un ajuste a una ecuación de orden 3, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.88. El coeficiente b_0 fue de 15.7682; b_1 de 0.0138; b_2 de -0.0001 y b_3 de $1.2660E^{-7}$. Otro de los mecanismos de intoxicación por este elemento es la disminución de los procesos respiratorios, según los trabajos de Jones (1942).

Los LC50 determinados nos permiten comparar los valores del camarón con los de otras especies y sitúan a *P. notialis* en una toxicidad intermedia entre el camarón *C. crangon* que según Portman (1970) tiene un LC50 a las 48 horas de 19 mg/l y el cangrejo *Orconutes rusticus* con un LC50 de 5 mg/l para 48 horas según Hubschmann (1967a). Aunque Portman (1970) señala que el LC50 para el camarón *Pandalus montagui* es de 0.14 mg/l, con un patrón de respuesta de mayor susceptibilidad que *P. notialis*, además conocemos por Clarke (1947) que los escaramujos tienen un LC50 para 48 horas de 0.35 mg/l, por lo que estos organismos son muy sensibles al cobre soluble. Entre las especies marinas sensibles, se encuentra el salmón *Salmo salar* con un LC50 para

48 horas de 0.3 mg/l (Grande, 1967) y los juveniles de camarón que mueren el 50 % de los ejemplares en 72 horas con una concentración de cobre de 0.18 mg/l. Se reporta por Sprague y Ramsay (1965) que los salmones juveniles comienzan a morir por encima de 0.032 mg/l, suponiéndose que los juveniles son mas susceptibles a las concentraciones bajas de cobre.

Como se observa en la figura 34, los primeros efectos de intoxicación con cobre se presentan como una perdida de actividad y equilibrio en los camarones, provocando que no puedan escapar de sus predadores y mueran comidos o por intoxicación crónica al no poder escapar de la zona de afectación.

Esto ocurre porque la acción del cobre sobre los organismos acuáticos es la que ocurre a nivel de las mucosas de las branquias, provocando la sofocación o el daño directo de las mismas. Los lamelos tienden a colapsarse lo que provoca la hipertrofia e hiperplasia; ahora bien a nivel metabólico, según Alabaster y Lloyd (1984), se presenta una reducción de la capacidad branquial para oxidar el lactato y como efecto secundario ocurren desordenes hepáticos y renales, los cuales en caso de persistir la contaminación, terminan pereciendo.

Estos primeros efectos ocurren a concentraciones más bajas que las letales y después de las 48 horas a una concentración (letal) de 11.0 mg/l. Si analizamos la pérdida de equilibrio y actividad, notaremos que a 6.5 mg/l estos se presentan,

indicando que desde concentraciones tan bajas como 1.2 mg/l en 120 horas ya pierden el equilibrio, concluyéndose que concentraciones mayores que 1.2 mg/l son peligrosas para el camarón aunque según la ecuación de van Horn (1949), recomendada por FAO (1982), esta concentración no debía ser dañina, hecho que llama la atención sobre el uso de este cálculo teórico, sin un trabajo experimental más amplió que permita conocer realmente cuando no ocurren efectos secundarios de intoxicación y un indicativo a recomendar pudiera ser la habilidad o capacidad de mudar y crecer.

La figura 34, representa al patrón de respuesta teórico que Wilson (1972) presentó y explicó para los metales pesados, el cuál se cumple para el cobre con los camarones cubanos.

El experimento de acumulación demostró que los camarones son capaces de concentrar el cobre disuelto del agua en sus tejidos y explica como ocurre la muerte de los ejemplares por una entrada de este metal a sus tejidos; penetración que conlleva a una intoxicación del animal por este elemento, comprobándose que el factor de acumulación es semejante para ejemplares sometidos a concentraciones entre 2.0 y 12.0 mg/l.

4.4 EFECTOS DEL PLOMO

El peso medio de los ejemplares experimentales (5.7 g), así como el máximo (10.9 g) y el mínimo (2.9 g) de la totalidad del grupo experimental, así como los de cada concentración de prueba se presentan en la tabla 25. Según una prueba "t" no existieron diferencias estadísticas significativas entre los ejemplares de cada serie con un α de 0.05. Con los pesos individuales por camarón se estimaron los largos, según la ecuación de Nikolic y García (1967), pudiéndose comprobar que para cada prueba el largo mayor no superaba en dos veces al menor, que es uno de los requisitos indispensables, según el APHA (1992), para considerar las respuestas de bioensayo como válidas.

El resultado de las determinaciones físico-químicas, para el agua de cada prueba de toxicidad se presenta en la tabla 26; y todas son consideradas como normales para un comportamiento estándar.

Con los datos de las LC50, LC84 y LC16 se construyó la figura 35, donde aparecen las curvas de toxicidad para los diferentes períodos de tiempo. El LC50 para el menor número de horas que se pudo obtener fue el de 96 horas, ya que no se reportaron mortalidades cercanas o mayores al 50% en las concentraciones ensayadas, ya que después de los 10 mg/l de plomo (10 000 $\mu\text{g/l}$) parte de este precipitaba en el agua salada por lo que las mortalidades descendían.

Los tiempos de letalidad (LT50) para la mitad de los camarones fue de 300; 216; 140; 120; 115 y 96 horas para concentraciones de 560; 900; 1800; 5600; 6000 y 8700 $\mu\text{g}/\text{l}$ respectivamente. Estos resultados se comparan con el tiempo que pierden la actividad (PA50) y el equilibrio (PE50) la mitad de los ejemplares según se observa en la figura 36. No se observó ninguna relación entre la muda y la concentración de plomo, ya que en los camarones de todas las series experimentales ocurrieron mudas durante los diez días de experimentación.

La concentración umbral fue determinada según el método de Powers (1917) recomendado por Jones (1964) como la mejor estimación. Esta alcanzó el valor de 50 $\mu\text{g}/\text{l}$, indicándose que para que los camarones no sufran ningún daño subletal con plomo, las aguas receptoras no deben alcanzar concentraciones por encima de esta concentración.

Todos los valores de los análisis físico-químicos del agua experimental empleadas en las pruebas de toxicidad, se reportan en las tablas 1 y 26. Excluyendo los de plomo, el resto de los factores no se consideran como limitantes para la supervivencia de los camarones si se comparan con los rangos recomendados en el APHA (1985) y por Sprague (1973), por lo cual se considera que el único factor responsable de la mortalidad de los ejemplares estudiados fue el plomo, provocando este muy pocas variaciones en las características

ambientales, temperaturas, salinidad, oxígeno y pH como se comprueba del análisis de las tablas señaladas.

El plomo indujo la mortalidad de los camarones por dos vías, una que conduce al bloqueo del funcionamiento del sistema circulatorio por coagulación de la sangre (Marchetti, 1962) y Vibrenzo et al. (1988) y otra por medio de un mucus que aparece cubriendo las branquias y que al coagularse provoca la anoxia de los ejemplares (Carpenter, 1925) o bien por ambas vías combinadas; aunque se hace evidente que existe daño al sistema nervioso, (Moore y Llowe, 1985), ya que los camarones antes de morir perdían el equilibrio y mostraban una posición vertical o nadaban dando oscilaciones circulares continuas para luego caer en el fondo de los recipientes de ensayo, adoptando una posición dorsal.

Los LC50 determinados para el *P. notialis* permiten compararlos con el *P. montaquí* que Portman (1970) presenta con una toxicidad (LC50) de 375 mg/l en 48 horas. Esto denotaría que nuestro camarón es más sensible, ya que a 20 mg/l en 96 horas fue observado el LC50. Al parecer, la sensibilidad de esta especie no es general para otros metales pesados, ya que Suárez et al (1977) demostraron que para el cobre era más resistente que el *P. montaquí* según resultados de Portman (1970).

El fenómeno de intoxicación con plomo en los camarones estudiados, se presenta en un inicio como una pérdida de su

actividad motriz, posteriormente aparece la pérdida del equilibrio y finalmente ocurre la muerte, como se representa gráficamente en la figura 36. Los primeros síntomas de pérdida de actividad, aun sin llegar a la pérdida del equilibrio o a la muerte, provocan que los camarones sean una presa fácil a su predador y mueran devorados, o por la intoxicación crónica que se produce en ellos al no poder escapar de la zona afectada con este agente contaminante. Los síntomas de intoxicación ocurren desde concentraciones de 560 $\mu\text{g}/\text{l}$ a las 120 horas de exposición, antes de las 300 horas, que es cuando se presenta para esa concentración la mortalidad.

Si observamos la curva de la figura 36 notaremos que por debajo de 1000 $\mu\text{g Pb}/\text{l}$ las líneas tienden a hacerse asintóticas, por eso entendemos que la concentración umbral que reportamos como de 50 $\mu\text{g}/\text{l}$ es suficiente para considerarla como concentración de seguridad que permita la supervivencia de los ejemplares, sin daño aparente, hecho que debe ser corroborado con experimentos subletales de larga duración.

5.0 CONCLUSIONES

5.1 DDT

1- Entre los métodos utilizados para medir la toxicidad letal del DDT sobre las postlarvas de langosta, el de los probits fue el más representativo del fenómeno de intoxicación y esto fue corroborado mediante análisis de covarianza, coeficientes de determinación y pruebas de residuos.

2- Las LC50 (Probits) para 24; 48; 72 y 96 horas fueron determinadas como de 28.1; 10.7; 8.6 y 7.2 ppb.

3- La ecuación para la toxicidad letal media (96 horas) fue:

$$\log LC50 (96h) = (5.0000 - 2.6635) - 2.730934$$

y según una prueba Chi² se demostró su ajuste a una línea recta es significativo con una probabilidad de 0.05

4- El umbral de toxicidad fue calculado por debajo de 5 ppb.

5- Las pruebas subletales sobre el crecimiento de postlarvales con una concentración de 1 ppb, demostraron que esta concentración inhibe la muda y el crecimiento de los ejemplares, no así su respuesta a estímulos externos y a la alimentación.

6- La concentración presumiblemente no dañina fue calculada como 0.47 ppb (µg/l).

7- Para los ejemplares de control, el ajuste a ecuaciones de crecimiento logístico y de Gompertz permite explicar el fenómeno del crecimiento, no así la de Bertalanffy que mostró las mayores variaciones respecto a los valores observados.

8- La tasa de crecimiento media "k" fue estimada en 0.2022 ± 0.1495 y es típicamente geométrica progresiva.

5.2 CROMO

1- El licor cromo provoca los efectos tóxicos característicos de un metal pesado y es un residual de relativa estabilidad.

2- El LC50 para *P. notialis* a las 24; 48; 72; 96 y 120 horas fue de 198; 95; 74; 73 y 52 mg Cr/l respectivamente.

3- Los LT50 para concentraciones de 1123.6; 92.7 y 74.16 mg Cr/l fueron de 24; 48 y 96 horas respectivamente.

4- Todos los ejemplares antes de morir mostraban evidente pérdida de equilibrio y actividad.

5- Se calculó la concentración que presumiblemente no es dañina como 6.2 mg Cr/l.

6- No se comprobó diferencias estadísticas significativas en el comportamiento entre los camarones colectados en la Ensenada de la Broa y en la Bahía de Cienfuegos.

7- La tasa media de acumulación para el cromo fue de 60.6 $\mu\text{g Cr/kg/día}$ y la de desacumulación de 41.5 $\mu\text{ Cr/kg/día}$.

8- El coeficiente de Van Hoff (Q_{10}) tomó un valor de 2.23 con un error medio de 0.009.

9- Las ecuaciones de la tasa metabólica a 27°C según el peso de los ejemplares sometidos a concentraciones diferentes de cromo fueron:

$$Q_{27}^{\circ C} = 405.15 P^{0.12} \quad (03.82 \text{ g de peso y } 115.0 \text{ mg Cr/l})$$

$$Q_{27}^{\circ C} = 111.42 P^{0.52} \quad (11.60 \text{ g de peso y } 7.5 \text{ mg Cr/l})$$

$$Q_{27}^{\circ C} = 5584.61 P^{-1.07} \quad (13.31 \text{ g de peso y } 1.36 \text{ mg Cr/l})$$

$$Q_{27}^{\circ C} = 548.73 P^{-0.23} \quad (13.70 \text{ g de peso y } 0.0 \text{ mg Cr/l})$$

10- El cromo actúa como un acelerador metabólico variando no solo, la tasa metabólica media, sino la velocidad de respiración que tomó valores de negativo a positivo tendiendo a cero para concentraciones letales.

11- Las ecuaciones para calcular la tasa metabólica en función del peso, la temperatura y la concentración de cromo fueron las siguientes:

$$QO_2 = 142.83 - 17.25p - 27.72T \quad \text{para } 0.0 \text{ mg Cr/l}$$

$$QO_2 = 293.433063 - 21.676099 - 18.530964T \quad \text{para } 1.3 \text{ mg Cr/l}$$

$$QO_2 = 487.223337 - 9.208816p - 30.083962T \quad \text{para } 7.5 \text{ mg Cr/l}$$

$$QO_2 = 682.994549 - 1.269671p - 50.083235T \quad \text{para } 115 \text{ mg Cr/l}$$

12- Los camarones mostraron una reacción de rechazo al incremento del gradiente de concentraciones experimental con un "mpv" de 3.3 y un "rv" de -1.2.

13- El umbral de preferencia estimado sobre la base de las reacciones de comportamiento esta cercano a la concentración calculada como presumiblemente no dañina.

5.3 COBRE

- 1) El 50 % de los camarones *P. notialis* mueren en un período de 24, 48, 72 y 96 horas, si son sometidos a concentraciones de 18.0; 11.0; 9.0 y 5.56 mg/l.
- 2) La concentración normal de cobre en el tejido para los camarones *P. notialis* es de 56 ± 36 mg/Kg con 16.2 % de proteínas totales, ambos sobre la base de peso húmedo.
- 3) Según la concentración que Mc Kee y Wolf (1963) consideran como tóxico para el hombre, para que una persona se intoxique con camarones tendría que devorar de una vez entre 500 y 1000 camarones, por lo que no existe un peligro real en su ingestión.
- 4) Los camarones pierden el equilibrio antes de morir, ocurriendo esto último en concentraciones de 1.2 mg Cu/l.
- 5) La concentración presumiblemente no dañina, calculada según Van Horn (1949) es realmente dañina, porque provoca pérdida de actividad y equilibrio, facilitando que los ejemplares queden indefensos.
- 6) Una concentración de 0.18 mg/l es capaz de provocar cierta letalidad en el 50 % de los camarones juveniles en un período de exposición de 72 horas.
- 7) Una concentración de 2.1 mg/l es capaz de evitar que ocurra la muda a los ejemplares que estén sometidos a ella.
- 8) El factor de acumulación para el cobre en los camarones es del orden de unas 155 veces, para una concentración por debajo del nivel letal.

9) Se deberá evitar que ocurran vertimientos de residuales con cobre a las áreas costeras, las cuales provocarían mortandades a fases juveniles de diferentes organismos, ya que se ha demostrado que estos son más susceptibles que los adultos.

5.4 PLOMO

1- El LC50 de los camarones **P. notialis** fue de 20190; 3922; 3140; 2128; 1508 y 1148 $\mu\text{h/l}$ para periodos de 96; 120; 144; 168; 216 y 240 horas.

2- Los LT50 fueron de 300; 216;; 140; 120; 115 y 96 horas para concentraciones de 560; 900; 1800; 5600; 6000 y 8700 $\mu\text{g/l}$ respectivamente.

3- Para la concentración de 560 $\mu\text{g/l}$ ocurre la pérdida de actividad en los camarones a las 120 horas y la pérdida de equilibrio a las 240 horas, muriendo los ejemplares a las 300 horas; esta fue la menor concentración a la cual reportamos un valor igual o mayor al 50% de la mortalidad.

4- Los camarones sometidos al efecto del plomo, primeramente pierden actividad, posteriormente el equilibrio y finalmente mueren.

5- La concentración de seguridad o umbral para el plomo fue de 50 $\mu\text{g/l}$, valor que no debe ser superado en las aguas receptoras.

6.0 RECOMENDACIONES

Como recomendación general, cada vez que sea posible deberá utilizarse el método de los probits para el análisis de los resultados de los bioensayos de toxicidad, ya que es la única metodología que permite realizar una evaluación estadística de la información recopilada, lo cuál le ofrece a los datos una posibilidad mayor de ser comparados con otros publicados por diferentes autores.

6.1 DDT

1- Evitar la fumigación masiva con DDT en las cercanías a las áreas de abundancia de postlarvales de langosta, y así evitar sus efectos subletales sobre la muda y el crecimiento.

2- Utilizar con precaución la metodología de Von Bertalanffy para el análisis del crecimiento de postlarvales de langosta, porque no representa en su totalidad al fenómeno del crecimiento, como se demostró mediante su comparación con otras ecuaciones.

3- La utilización de modelos logísticos para interpretar el crecimiento en largo de los postlarvales de langosta.

6.2 CROMO

Debido a la toxicidad que es inducida por los residuales de las tenerías que contienen cromo se recomienda tratar los residuales con un sistema que no permita una concentración de

salida mayor a 6.2 mg Cr/l y para esto podría contemplarse la separación y pretratamiento de varias fracciones de desecho, seguidas de un tratamiento biológico en una serie de lagunas aerobias y anaerobias estratificadas que permitirían obtener una reducción del orden del 85 al 95 % para la DBO y los sólidos suspendidos. Si no existe un área con espacio suficiente para la construcción de lagunas de estabilización se podría utilizar el sistema de canales de oxidación que según datos recientes es capaz de lograr reducciones del orden de los 98 % para la DBO, pero la bibliografía también señala que la filtración por prensas es capaz de obtener un sólido que después de su tratamiento con FeSO_4 al 3 % y CA(OH)_2 al 15 % resulta como no contaminador.

6.3 COBRE

Se recomienda evitar la ocurrencia de vertimientos de residuales o licores que contengan una concentración de cobre superior a 0.1 mg/l; donde no se reportó degradación enzimática ni pérdida de equilibrio y de esa forma se evitarían mortandades a las fases juveniles de esta especie de importancia comercial para Cuba.

6.4 PLOMO

Respecto a este metal pesado se recomienda no sean vertidas a las aguas costeras residuales que logren incrementar el

contenido de plomo por encima de 50 µg/l, debiéndose efectuar el tratamiento de los residuales que lo presenten para evitar daños al ecosistema que podrían provocar perjuicio a la salud del hombre o deterioros a los recursos pesqueros de la plataforma cubana y llevar a cabo experimentos de acumulación o subletales para evaluar un daño que se presentaría en las poblaciones camarónicas, en caso de ocurrir una contaminación por este elemento.

7.0 REFERENCIAS

- ABBOT, W.S. (1925): A method of computing effectiveness of an insecticid. J. Econ. Entomol (18). pp: 265-267
- ALABASTER, J.S. y LLOYD. (1984) : Watr quality criteria for freshwater fish. FAO. Butterworths. U.K. : 362 pp.
- APHA. (1985): Standard methods for the examination of water and waste waters. 16th Ed. Water Pollution Control Federation. N. Y.: 834 pp.
- APHA. (1992): Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th Ed. American Public Health Association. Washington. D.C. USA : 984 pp.
- BAYNE, B. L; K. R. CLARKE y J. S. GRAY. (1988): Biological effects of pollution: Results of a Practical Workshop. Mar. ecol. Progr. Ser. 46: 1-278
- BELLAN, G. (1981): Manual of methods in aquatic enviroment research. Part 7. Selected biossays for the Mediterranean. (Test used by the FAO (GGCM)/UNEP. Joint Coordinated Project on Pollution in the Mediterranean) FAO. Fish. Tech. Pap.(208). 31 pp.
- BERG, I, y A. GRAMMO (1976): Procedures for toxicity testin in a continuous flow system: 75-80. En : FAO/SIDA Training course on Marine Pollution in relation to protection of living resources. Rome. FAO/SIDA/TF 108. Suppl 1: 109 pp.
- BITTEL, R. (1973): Estude du comportement des metaux ioupds en milieu marin, en vue de l'evaluation de la capacite limited dáceptation des ecosistems oceaniques pour la polution chimie. Rev. Intern. Oceanograf. Med. tomo XXX 1973. pp: 3-37
- BLISS, C. I. (1941): Quantitative aspects of bioassays. Journ. Americ. Pharm. Assoc. Vol. 29: pp 400-495
- BLISS, C. (1935): The calculation of the dosage, mortality curve. Ann. Appl. Biol. pp: 134-167
- BLISS, C. I. (1938): The determination of the dosage mortality curve from small numbers. Q. J. Pharmacal. 11. pp: 192-216
- BROWN, V. M; T. L. SHAW y D. G. Shurber (1974): Aspects of water quality and the toxicity of copper ti rainbow trout. Water Research 8: 797-803

- BRYAN, G. W (1968): Concentration of zinc and copper in the tissues of decapod crustaceans. J. Mar. Biol. Ass. UK. 48 (2):303-321
- BUESA, R.J. (1972): La langosta espinosa **Panulirus argus**: su pesca y biología en aguas cubanas. 3ra. Reunión de Balance de Trabajo. CIP (1): pp 29-86
- BUTLER, P. A. (1965): Commercial fishery investigations. En :The effluents of pesticides on fish and wildlife. Circ. U.S. Fish. Wild. Serv. (226): pp 65-77
- CARSON, R. (1984): Primavera silenciosa. Ed. Luis de Carralt. Barcelona. 3ra. edición : 364 pp.
- CLARKE, G. L. (1974): Poisoning and recovery in barnacles and mussels. Biol. Bull. 92: 73-91
- CLARKE, E. G. AND M. L. CLARKE. (1985): Toxicología veterinaria. Garner. Editorial Orbe. 2 ed. Inst. Cubano del Libro. La Habana. : 470 pp.
- CLARKE, K. R. y R. H. GREEN. (1988) : Statistical design and analysis for a biological effects study. Mar. Ecol. Prog. Ser. 46 : 213-226 pp.
- CORNER, E. D. S. y B. S. W. SPARROW (1956): The modes of action of toxic agents. I. Observations on the poisoning of certain crustaceans by copper and mercury. J. Mar. Biol. Ass. UK. 35: 531-548
- COUCH, S. A. (1978): Diseases, parasites and toxic responses of commercial Penaeis. Shrimps of the Gulf of Mexico and South Atlantic Coast of North America. Fishery Bulletin. 76(1): 1-45
- CRUZ I, R; BAISRE A, J. A; DIAZ I, E; BRITO, P. R; GARCIA D, C; BLANCO A. W. y CARRODEGUAS R, C. (1987): Atlas biológico pesquero de la langosta en el archipiélago cubano. Cuba. MIP: 126 pp.
- DAUGHERTY, F. M. (1951): Effects of some chemicals used in oil well drilling in marine animals. Sewage and Ind. Wastes. 23: 1114-1282
- DETALEPSEN, E. (1977): Uptake, retention and loss of Cadmium by brown shrimp **Crangon crangon**. Meerosforsshung. Report on Marine Research. 78 : 205-207

- EIFAC (1975): Report on fish toxicity testing procedures. EIFAVC. Working Party on toxicity testing procedures. EIFAC. tech. Pap. (24). 25 pp.
- EISLER, R. (1969): Acute toxicity of insecticides to marine decapod crustaceans. 16: pp 302-310
- ENGEL, H. R ; M. J. HEAT y R. E. HILLMAN. (1972): Sublethal chronic effects of DDT and Lindano on glycolyties and gluconeogenic enzymes of the quahog, ***Mercenaria mercenaria*** : 257-260 en: RUIVO, M. Marine Pollution and Sea Life. Fishing News (Book). FAO : 630 pp.
- FAO. (1975): Manual of methods in aquatic environment research. Part1. Methods for detection, measurement and monitoring of water pollution. FAO. FIR/T 137: 328 pp.
- FAO. (1976): Manual of methods in aquatic environment research Part. 2. Guidelines for the use of a biological accumulators in marine pollution monitoring. FIRI/T 150: 76 pp.
- FAO. (1981): Manual of methods in aquatic environment research. Part 4. Bases for selecting biological test to evaluate marine pollution. FAO. Fish. Tech. Paper. (164) : 31 pp.
- GARNER, R. J. y D. S. PAPWORTH. (1975): Toxicología veterinaria. Editorial Orbe. Instituto Cubano del Libro. 470 pp.
- GESAMP. (1990): Rewiew of potencially harmful substances. Nutrients. Rep. Stud. GESAMP. No. 34: 40pp.
- GRANDE, M. (1967): Effects of copper and zinc on salmonid fishes. En : Jaag, D. y H. Liebmann. Advances in water pollution research. Vol. 1. Water Poll. Cont. Fed. USA: 97-111
- GRAY, J. S; McINTYRE, A. D. y STIRN. (1991) : Manual of methods in aquatic environment research. Part. 11. Biological assessment of marine pollution with particular reference to benthos. FAO. Fish. Technical. Paper. (324) : 64 pp.
- GONZALEZ, M. (1978): Bioensayos sobre los efectos del tetracloruro de mercurio en el camarón ***P. duorarum*** y el ostión de mangle ***Crassostrea rizophorae***. Informe CIP. Cuba. 18 pp.

- GUILCHER, A. (1966): Oceanografía. Hidrología de los océanos y mares. Editora Universitaria. La habana, Cuba. 263 pp.
- HIATT, R. W. (1948): The biology of the live shore crab ***Pachygrapsus crassipes*** Randall. Pac. Sci. (2): 135-213
- HOGLUND, L. B. (1953): A new method of studying the reaction of fishes in gradients of chemical and other agents. Oikos 30(2): 247-267
- HOGLUND, L. B. (1961): The reaction of fishes in concentration gradients. Inst. Fresh. res. Report 43: 1-147
- HUBSCHMANN, J. H. (1967a): Effects of copper on the crayfish ***Orconectes rusticus*** (Girard). I. Acute toxicity. Crustaceana 12(1): 33-42
- HUBSCHMANN, J. H. (1967b): Effects of copper on the crayfish ***Orconectes rusticus*** (Girard). II. Toxic action. Crustaceana. 12(2): 140-150
- JOHNSON, S. K. (1974): Ectocomensals and parasites of shrimp from Texas rearing ponds. A. Univ. Sea Grant. Public. Tome 56(74). 19 pp.
- JONES, J. (1938): The relative toxicity of salts of lead, zinc and copper to stickleback (*Basterosteus aculeatus* L.) and the effect of calcium on the toxicity of lead and zinc salts. Jour. Exper. Biol. 15. pp: 394-403
- JONES, J. R. (1947): The reaction of ***Pygosteus pungitius*** L. to toxic solutions. G. Expl. Biol. 24:110-122
- JONES, J. R. E. (1942): The effect of ionic copper on the oxygen consumption of ***Gammarus pulex*** and ***Polyeclis nigra***. J. Exper. Biol. 18: 153- 161
- KORZHOVA, J. (1966): Analisis químicos de los productos marinos. Centro de Investigaciones Pesqueras. Cuba. Boletín de Invest. técnica. No. 3: 36 pp.
- KURATA. H. (1962): Increase in size at the molting in crustacea. Bull. Hokkaido Regional Fisheries. Res. Lab. (22): pp 1-48

- LARSSTUVOLD, M. (1975): Choice an handling organism. Fourth
FAO/SIDA Trainig Course on aquatic pollution in relation
to protection of living resources. F:R/TPLR/75.2/8. 4 pp.
- LEWIS, R. J. (1992): Sax's dangerous properties of industrial
materials. 8th de. Van Nostrand Reinhold. N. Y. : 4368 pp.
- LIEBMAN, H. (1960): Handbuch der fuischwasser und
abwasserbiologie. Vol. II. Oldenbounq, Munchen. 255 pp.
- LITCHFIELD, J. T. y F. WILCOXON. (1949): A simplified method of
evaluating dose effect experiments. J. Pharmac. Exp. 96:
99-113
- LLUIS RIERA, M. (1983): Régimen hidrológico de la plataforma
insular de Cuba. Ciencias de la Tierra y el Espacio. Cuba;
(7): 81-110
- MARCHETTI, R. (1960): I criteri biologici per l'aecettabilita
di aeque di scanico industrialala in acque pubbliche. Atti
del Convegno sulle acque di scanico industriale. Milano 47.
pp: 123-241
- MARTIN, J. L. M. (1974): Metals in **Cancer irroratus**:
factors and correlation. Marine Biology. 28(4): 245-251
- Mc KEE, J. E. y H. W. WOLF. (1963): Water quality criteria .
Publs. St. Wat. Qual. Control. Bd. Calif. (3-A): 548 pp.
- MOORE, D. L. y P. S. OSHIDA. (1987) : Manual of methods in
aquatic environment research. Part. 10. Short term static
bioassays. FAO. Fisheries Technical Paper. 247 : 64 pp.
- PERKINS, E. J. (1972): Some methods of assesment of toxic
effects upon marine invertebrates. Proc. Soc. Analyt.
Chem. 9(5). pp: 105-114
- PERKINS, E. J. (1972a): Some problems of marine toxicity
studies. Mar. Poll. Bull. 3(11). pp: 13-14
- PASCUA, M. (1974): Metodología bioestadística. 2da. Edición.
Editorial Paz, Montalvo. España. 450 pp.
- POOWERS, E. B. Y R. T. CLARK. (1943): Further evidence of
chemical factors affecting the migretory movements of
fishes, especialy the salmon. Ecol. 24: 109-113
- PORA, A. E; R. I. DIMITRU; C. WITHENBERGER Y S. FLORICA.
(1953): Metoda comoda de urmari consumul de oxigen la

concentr

animale acuatice timp indelungat: aplicarea ei la citiva pesti marini. Bul Inst. Cercetasi Piscicole. Anul XIV (i): 23-28

- PORTMAN, E. S. (1970): The toxic of 120 substances to marine organisms. Shellfish inf. Leaflet. No. 19:10 pp.
- PORTMAN, E. S. (1972): Results of acute toxicity test with marine organisms, using a standard method. pp 212-214. En Ruivo, M. Marine Pollution and SeaLife. Fishing News (Books). FAO.
- POWERS, E. B. (1917): The goldfish (*Carasius carasius*) as a test animal in the study of toxicity. Illinois Biological Nomographs 4. pp: 121-193
- REISH, D. J. (1986): Manual of methods in aquatic environment research. Part. 10. Short term bioassays. FAO. Fish. Tech. Paper. (247): 62 pp.
- SHAW. T. L. y V. M. BROWN. (1974): The toxicity of some forms of copper to rainbow trout. Water Researc. 8: 377-382
- SHELFORD, V. E. Y M. C. ALLEE. (1913): The reactions of fish to gradient of dissolved gases. G. Exp. Zool. Inv. (10): 207-226
- SPRAGUE, J. B. (1964): Lethal concentrations of copper and zinc for young atlantic salmon. J. Fish. Res. Bd. Canada. 21(1): 17-26
- SPRAGUE, J. B. y ANN RAMSAY. (1965): Lethal level of mixed copper zinc solutions for juvenil salmon. J. Fish. Res. Bd. Canada. 22(2): 425-432
- SPRAGUE, J. B; P. F. ELSON y R. L. SAUNDERS. (1965): Sublethal copper zinc pollution in a salmon river a field and laboratory study. Int. J. Air Wat. Poll, Pergamon Press. 9: 531-543
- SPRAGUE, J. B. (1969): Measurement of pollutant toxicity to fish I. Bioessay methods for acute toxicity. Wat. Res. Pergamon Press. U. K. Vol. 3. pp: 793-821
- SPRAGUE, J. B. (1973): The ABC's of pollutant bioassay using fish. Biological methods for the assessment of water quality. American Society for testing and materials. USA.Special technical publications No. 528: pp 6-30

- STORA, G. (1972): Contribution á l'étude de la notion de concentration léthale limite moyenne (CL50) appliquée á des invertébrés marins. 1. Etude méthodologique. *Téthys* 4(3). pp: 597-644
- STRICKLAND, J. D. H. y T. R. PARSON (1985): A practical handbook of sea water analysis. *Bull. Fish. Res. Board. Can.* (167): 311 pp.
- SUÁREZ, G. E. PERIGÓ Y M. I. CARAZA: (1975): Efectos letales y subletales de algunos contaminantes en la plataforma . MIP/CIP Cuba; *Res. Invest.* (1): 135-138
- SUÁREZ, G. Y M. SOTOLONGO. (1977): Efecto del cobre sobre los camarones acaramelados *P. duorarum*. Informe al CIP. Cuba. 18 pp.
- SUÁREZ, G. (1978): Toxicidad aguda del plomo sobre camarones acaramelados. *P. duorarum*. Informe al CIP. Cuba. 15 pp.
- SUÁREZ, G. Y M. E. RAMIRO. (1980): Metabolismo respiratorio del camarón rosado *P. notialis* Pérez Farfante, 1967. Primera Jornada Científica de la Sociedad de Ciencias Biológicas. Cuba. 25 pp.
- SUTTERLING, A. M. (1974): Development of water quality criteria for aquatic animals. Prospective and review chemical senses anf flower. (1): 167-178
- SUTCLIFE, W. H. (1957): Observations on the growth rate of inmature Bermuda Spiny lobster, *Panulirus argus*. *Ecology* 38(3): pp 526-529
- SWEDMARK, M. (1974): Toxicity testing at Cristereberg Zoological Station. En: Ecological aspects of toxicity testing of oil and dispersants. Editado por Baynon, L. R. y Cowell F. B. Essex, England, Applied Science Publishers. pp: 41-51
- TARZWELL, C. M. y HENDERSON, C. (1957): Toxicity of dieldrin to fish. *Transaction of the American Fisheries Society* 86. pp: 245-257
- TRAVIS, D. F. (1954): The molting cycle of the spiny lobster *P. argus* *Biol. Bul.* 107: pp 443-450
- VAN HORN, W. M. (1949): The biological indices of stream quality. *Proc. 5th. Ind. Wastes. Conf. Pardue Univ. Enq. Bull.:* pp

- VIBRENZO, A. et al. (1988) : Integrated celular stress indices in trace metals contamination : Critical evaluation in a field study. Mar. Ecol. Prog. Ser ; 46 : 65-70
- WALDICHUK, M. (1974): Effects of environmental contaminants. Intergouvernanmental Oceanographic Commision. Technical Series. 18: 24-27
- WARREN, C. E. (1971): Biology and water pollution control. W.B. Saunders. Co. London. 434 pp.
72-215
- WATERMAN, T. M. (1960): The physiology of crustacea. Vol. 1. Metabolism and growth. Academic Press. London . 1670 pp.
- WELLS, M. M. (1915a): Reactions and resistance of fishes in their natural environments to salts. Jour. Exper. Zool. (19): 196-248
- WELLS, M. M. (1915a): Reactions and resistance of fishes in their natural environment to nutrients, alkalinity and neutrality. Biol. Bull. 29: 34-221
- WILSON, K. W. (1972): Assessing the toxicity of industrial effluents. Fisheries Improvement Commitee. ICES E-19: 9 pp.
- WINBERG, G. G. 1956): Rate of metabolism and food requirements of fishes. Fish. Res. Board of Canada. Translation Series. 194: 202 pp.
- WORD, G. S. y P. R. PARRICH. (1982) : Manual de métodos de investigación del medio ambiente acuático. Parte 6. Ensayos de toxicidad. FAO. Doc. Tec. Pesca. (185) : 25 pp.
- ZENETON, A y E. PAPATHANASSIOUS. (1989) : Community parameters and multivariate aalysis as a means of asesting the effects of tannery effluents on macrobenthos. Mar. Poll. Bull. 20 : 176-181

ANEXO I

TABLAS

Tabla 1: Características físico químicas del agua de dilución utilizada en los bioensayos.

PRUEBA	ESTADISTICOS	OXIGENO	TEMPERATURA	SALINIDAD	pH
DDT	Media	6.98	26.0	35.6	8.0
	D.E	0.45	0.5	0.9	0.2
Cr	Media	6.96	25.5	36.7	8.0
	D.E	0.17	0.20	0.7	0.1
Pb	Media	6.50	28.3	36.7	8.2
	D.E	0.30	0.30	0.3	0.2
Cu	Media	7.02	26.7	36.1	8.2
	D.E	1.70	1.4	0.1	0.7

Tabla 2: Largo medio (base de anténulas hasta final del telson), desviación estándar (D.S), mínimos y máximos para los post larvales sometidos a experimentación con DDT.

EXPERIMENTOS	LARGO (mm)	D.S.	MINIMO	MAXIMO
CONTROLES	26.1	6.4	16.5	40.0
TOXICIDAD	26.8	7.2	16.0	40.0
CRECIMIENTO	26.5	6.5	16.0	40.0

Tabla 3: Cantidad de ejemplares utilizados para las pruebas de toxicidad con plomo y su relación por sexo.

No. EJEMPLARES	PESO MEDIO (g)	PESO TOTAL (g)	SEXO
130	5.7	735	Ambos
58	5.2	302	Machos (45%)
72	6.0	433	Hembras (55%)

Tabla 4: Peso de los ejemplares utilizados y cantidad por experimento para las pruebas con cobre.

TIPO DE BIOENSAYO	NUMERO DE EJEMPLARES	PESO MEDIO (g)	PESO TOTAL (g)
Letal	100	3.6	363
Acumulación	20	4.5	90

Tabla 5: Guía para la selección de las concentraciones de ensayo, basadas en la bisección progresiva de los intervalos en una escala logarítmica. (Modificado de Reish y Oshida, 1986).

1	2	3	4	5
10.0				8.7
			7.5	6.5
		5.6		4.9
			4.2	3.7
	3.2			2.8
			2.4	2.1
		1.8		1.6
			1.4	1.2
1.0				

Tabla 6: Ejemplo numérico para el cálculo de la LC50 a las 48 horas de langostas *Panulirus argus*, (Modificado de Suárez, et al, 1975).

CONC (%)	MORT (%)	N	X	X ²	P	Pe	Y	Z ² /PQ	N	MX	MY	MX ²	MY ²	WX	WY
0,0	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,3	0	10	0,1139	0,0130	-	3,0877	2,6579	0,1497	1,4971	0,1706	3,9792	0,4534	7,0644	0,0195	10,5763
3,2	13	15	0,5052	0,2552	4,0349	4,0471	3,8892	0,4550	6,8250	3,4480	26,5438	13,4100	15,1259	1,7417	103,2343
5,6	38	12	0,7482	0,5598	4,6942	5,6432	4,6955	0,6067	7,2804	5,4472	34,1851	25,5773	22,0477	4,0756	160,5161
8,7	50	10	0,9395	0,8827	5,0000	5,1124	4,9995	0,6336	6,3362	5,9529	31,6778	29,7590	24,9950	5,5930	158,3733
10,0	63	13	1,0000	1,0000	5,3343	5,2607	5,3309	0,6206	8,0678	8,0678	43,0886	43,0086	28,4185	8,0678	229,2748
13,5	100	10	1,1303	1,2777	-	5,5804	6,4137	0,5625	5,6250	6,3582	36,0771	40,7796	41,1355	7,1871	231,3872

$\bar{x} = 0,8264$
 $\bar{y} = 4,9246$
 $b = 3,3954$
 $\log LC50 = 0,8486$
 $\log LC84 = 0,9183$
 $\log LC16 = 0,7718$
 $DS = 0,0318$
 $\text{lim.sup. LC50} = 7,4\%$
 $\text{lim.inf. LC50} = 6,8\%$
 $\text{lim.sup. LC84} = 8,6\%$
 $\text{lim.inf. LC84} = 0\%$
 $\text{lim.sup. LC16} = 6,2\%$
 $\text{lim.inf. LC16} = 5,6\%$

Σ	35,6315	29,4447	175,471	152,987	138,787	26,684	893,3620
----------	---------	---------	---------	---------	---------	--------	----------

Chi² (calculado) = 2,12 < Chi² (tab .. La linealidad de la recta es significativa, la muestra es homogénea.

Tabla 7: Probits y mortalidad porcentual de Bliss, 1935.

MORTALIDAD (%)	PROBITS (P)	MORTALIDAD (%)	PROBITS (P)	MORTALIDAD (%)	PROBITS (P)
1	2,674	60	5,253	90	6,282
5	3,355	62	5,306	91	6,341
10	3,718	64	5,358	92	6,405
15	3,964	66	5,412	93	6,476
20	4,158	68	5,468	94	6,555
25	4,326	70	5,524	95	6,645
30	4,476	72	5,583	96	6,751
34	4,588	74	5,642	97	6,881
36	4,642	76	5,706	98	7,054
38	4,694	78	5,772	98,5	7,170
40	4,747	80	5,842	99,0	7,326
42	4,798	81	5,878	99,1	7,366
44	4,849	82	5,915	99,2	7,409
46	4,900	83	5,954	99,3	7,457
48	4,950	84	5,994	99,4	7,512
50	5,000	85	6,036	99,5	7,576
52	5,050	86	6,080	99,6	7,652
54	5,100	87	6,126	99,7	7,748
56	5,151	88	6,175	99,8	7,878
58	5,200	89	6,226	99,9	8,090

Tabla 8: Probits de trabajo, máximos, mínimos, rango y coeficientes de peso. (Finney, (1971))

Pe	Y-P/Z(min)	1/Z	Y+Q/Z(max)	Pe	Z ² /PQ
1,1	0,8579	5034,0	9,1421	8,9	0,00082
1,2	0,9522	3425,0	9,0478	8,8	0,00118
1,3	1,0462	2354,0	8,9538	8,7	0,00167
1,4	1,1400	1634,0	8,8600	8,6	0,00235
1,5	1,2334	1146,0	8,7666	8,5	0,00327
1,6	1,3266	811,50	8,6734	8,4	0,00451
1,7	1,4194	580,50	8,5806	8,3	0,00614
1,8	1,5118	419,40	8,4882	8,2	0,00828
1,9	1,6038	306,10	8,3962	8,1	0,01104
2,0	1,6954	225,60	8,3046	8,0	0,01457
2,1	1,7866	168,00	8,2134	7,9	0,01903
2,2	1,8772	126,34	8,1228	7,8	0,02458
2,3	1,9673	95,960	8,0327	7,7	0,03143
2,4	2,0568	73,620	7,9432	7,6	0,03977
2,5	2,1457	57,050	7,8543	7,5	0,04979
2,6	2,2339	44,654	7,7661	7,4	0,06168
2,7	2,3214	35,302	7,6786	7,3	0,07564
2,8	2,4081	28,189	7,5919	7,2	0,09179
2,9	2,4938	22,736	7,5062	7,1	0,11026
3,0	2,5786	18,522	7,4214	7,0	0,13112
3,1	2,6624	15,240	7,3376	6,9	0,15436
3,2	2,7449	12,666	7,2551	6,8	0,17994
3,3	2,8261	10,633	7,1739	6,7	0,20774
3,4	2,9060	9,0154	7,0940	6,6	0,23753
3,5	2,9842	7,7210	7,0158	6,5	0,26907
3,6	3,0606	6,6788	6,9394	6,4	0,30199
3,7	3,1351	5,8354	6,8649	6,3	0,33589
3,8	3,2074	5,1497	6,7926	6,2	0,37031
3,9	3,2773	4,5903	6,7227	6,1	0,40474
4,0	3,3443	4,1327	6,6557	6,0	0,43863
4,1	3,4083	3,7582	6,5917	5,9	0,47144
4,2	3,4687	3,4519	6,5313	5,8	0,50260
4,3	3,5251	3,2025	6,4749	5,7	0,53159
4,4	3,5770	3,0010	6,4230	5,6	0,55788
4,5	3,6236	2,8404	6,3764	5,5	0,58099
4,6	3,6643	2,7154	6,3357	5,4	0,60052
4,7	3,6982	2,6220	6,3018	5,3	0,61609
4,8	3,7241	2,5573	6,2759	5,2	0,62742
4,9	3,7407	2,5192	6,2593	5,1	0,63431
5,0	3,7467	2,5066	6,2533	5,0	0,63662
5,1	3,7401	2,5192	6,2599	4,9	0,63431
5,2	3,7186	2,5573	6,2814	4,8	0,62742
5,3	3,6798	2,6220	6,3202	4,7	0,61609
5,4	3,6203	2,7154	6,3797	4,6	0,60052
5,5	3,5360	2,8404	6,4640	4,5	0,58099
5,6	3,4220	3,0010	6,5780	4,4	0,55788
5,7	3,2724	3,2025	6,6276	4,3	0,53159
5,8	3,0794	3,4519	6,9206	4,2	0,50260
5,9	2,8335	3,7582	7,1665	4,1	0,47144
6,0	2,5230	4,1327	7,4770	4,0	0,43863
6,1	2,1324	4,5903	7,8676	3,9	0,40474
6,2	1,6429	5,1497	8,3571	3,8	0,37031
6,3	1,0295	5,8354	8,9705	3,7	0,33589
6,4	0,2606	6,6788	9,7394	3,6	0,30199
6,5	0,7052	7,7210	10,705	3,5	0,26907

Tabla 9: Chi² y probits para una probabilidad de 0,05 según los grados de libertad (g.l) del experimento. Modificado de Moller (1979).

g.l.	Chi ²	g.l.	Chi ²
1	3,841	16	26,296
2	5,991	17	27,587
3	7,815	18	28,869
4	9,488	19	30,144
5	11,070	20	31,410
6	12,592	21	32,670
7	14,067	22	33,924
8	15,507	23	35,172
9	16,919	24	36,415
10	18,307	25	37,652
11	19,675	26	38,885
12	21,026	27	40,113
13	22,362	28	41,337
14	23,685	29	42,557
15	24,996	30	43,773

$$x^2 = \{[\sum(wy^2) - y\sum(wy)] - b[\sum(wxy) - x\sum(wy)]\}$$

$$gl = n - 2$$

Si $x^2_{cal} < x^2_{tabla}$ —> Los datos son consistentes con la línea de regresión calculada, es decir, que las observaciones no difieren más de la curva de mortalidad-dosis, que con frecuencia podría esperarse al azar.

Tabla 10: Valores experimentales de mortalidad de langostas *P. argus* en Dimecrón. (Modificado de Suárez et al, 1972).

CONC. ppm	N	MORTALIDAD OBSERVADA (%)	MORTALIDAD ESPERADA (%)	MORTALIDAD OBS-ESP	Chi ²
2,50	8	100(99,7)	98,6	1,1	0,0090
1,00	10	90	93	3,0	0,0180
0,70	8	63	59	4,0	0,0080
0,50	10	40	36	4,0	0,0060
0,35	8	13	18	5,0	0,0250
0,20	10	0(0,7)	1	0,3	0,0004

Ecuación de ajuste

$$\text{Mort}(\%) = 115,3562[\text{conc}(\text{ppm})] - 22,0396$$

$$r = 0,9880 \quad ** 95\%$$

$$\Sigma[\text{Chi}^2(N)] = 0,58$$

$$\text{Chi}^2 \text{ tabla}, 95\%P (K-2) = 9,49$$

$$K = 6$$

$$N' = 30 \quad (N' = 5,48)$$

$$\text{LC84} = 1,20 \text{ ppm}$$

$$\text{LC50} = 0,60 \text{ ppm}$$

$$\text{LC16} = 0,38 \text{ ppm}$$

9,49 > 0,58 La homogeneidad de los datos es significativa. Ajuste de la ecuación de la recta es significativo con una probabilidad del 95% .

$$\text{lim. sup. } 0,91 \text{ ppm}$$

$$\text{lim. inf. } 0,51 \text{ ppm}$$

} LC50

$$S = [(1,20/0,68) + (0,68/0,38)]/2 = 1,78$$

$$A = 1,26 \text{ (Nomograma)}$$

$$f \text{ LC50} = 1,78 \quad \frac{2,77/130}{1,37} = 1,34$$

$$f S = A = 1,37$$

$$\text{lim. sup. } S = 2,34$$

$$\text{lim. inf. } S = 1,30$$

Tabla 11: Valores corregidos para un efecto de 0 ó 100%, correspondiente a los valores esperados. (Litchfield y Wilcoxon, 1949)

EFEECTO ESPERADO	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	0,3	0,7	1,0	1,3	1,6	2,0	2,3	2,6	2,9
10	3,2	3,5	3,8	4,1	4,4	4,7	4,9	5,2	5,5	5,7
20	6,0	6,2	6,5	6,7	7,0	7,2	7,4	7,6	7,8	8,1
30	8,3	8,4	8,6	8,8	9,0	9,2	9,3	9,4	9,6	9,8
40	9,9	10,0	10,1	10,2	10,3	10,3	10,4	10,4	10,4	10,5
50	-	89,5	89,6	89,6	89,6	89,7	89,7	89,8	89,9	90,0
60	90,1	90,2	90,4	90,5	90,7	90,8	91,0	91,2	91,4	91,6
70	91,7	91,9	92,2	92,4	92,6	92,8	93,0	93,3	93,5	93,8
80	94,0	94,3	94,5	94,8	95,1	95,3	95,6	95,9	96,2	96,5
90	96,8	97,1	97,4	97,7	98,0	98,4	98,7	99,0	99,3	99,7

Tabla 12: Concentraciones letales para el 50; 84 y 16 % según el tiempo de observación para los métodos aritmético (A); logarítmico (L) y probits, para postlarvales en DDT.

TIEMPO	A	L	PROBITS		
	LC50	LC50	LC50	LC84	LC16
24 h	29.1	33.0	28.1	52.8	12.7
48 h	10.8	11.8	10.7	37.1	02.2
72 h	08.2	08.3	08.6	12.3	05.5
96 h	06.9	07.1	07.2	16.9	02.4

Tabla 13: Coeficientes de la ecuación de la recta y valores de χ^2 para cada tiempo de reacción de postlarvales en DDT

TIEMPO DE REACCION	χ^2		COEFICIENTES DE LA RECTA		
	TABLA	CALCULADO	A	b	VARIANZA
24 h	5.991	0.9121	-0.379102	3.71444	0.912056
48 h	5.991	0.5344	+3.067592	1.87997	0.534375
72 h	5.991	0.2524	-1.199844	6.62914	4.252409
96 h	7.815	1.0429	+2.663518	2.73093	1.042871

Tabla 14: Constantes de crecimiento (k) para cada instar y parámetros de la ecuación lineal que lo relaciona según según la "k". PL (postlarva) y largo medio (L[medio]).

INSTAR	"k"	DS	PL	L[medio]
12	0.3867	0.1558	1	18.27
13	0.2786	0.1247	2	21.00
14	0.2906	0.1451	2a	21.33
15	0.1779	0.1252	3	23.50
16	0.1383	0.0856	4	25.03
17	0.1505	0.0991	5	25.84
18	0.1675	0.1150	6	27.57
19	0.1336	0.0581	7	30.86
20	0.1604	0.0468	7a	34.60
21	0.0662	0.0176	8	38.25
22	0.1134	0.0442	9	40.00
PROMEDIO	0.2022	0.1495	*****	26.45
A	0.5996			
b	-0.0242			
r	0.8631			

Tabla 15: Ecuaciones de crecimiento de Kurata, según varios autores y valores de la constante "k".

ECUACION	AUTOR	"k"
$\ln+1 = 1.030385 + 1.031371 (\ln)$	Este trabajo	0.03089
$\ln+1 = 4.61000 + 0.9800000 (\ln)$	Travis (1954)	0.02020
$\ln+1 = 1.807400 + 1.07320 (\ln)$	Sutcliffe (1957)	0.07060
$\ln+1 = -6.500000 + 1.35900 (\ln)$	Buesa (1972)	0.30670

Tabla 16: Valores encontrados para el análisis de residuales y los coeficientes de determinación para cada ecuación de ajuste.

ECUACION DE AJUSTE	ANALISIS DE RESIDUALES	COEFICIENTES DE DETERMINACION (r^2)
BERTALANFFY	13.170	0.889
LOGISTICA	0.310	1.000
GOMPERTZ	- 0.420	1.000

Tabla 17: Valores físico-químicos medios observados durante las pruebas de toxicidad aguda con camarones sometidos al efecto del cromo.

CONCENTRACION (mg/l)	p H		O X I G E N O (mg / l)		T E M P E R A T U R A (°C)			S A L I N I D A D (g / kg)			
	X	MAX	MIN	X	MAX	MIN	X	MAX	MIN		
1,98	6,8	8,2	7,8	6,14	6,40	6,1	25,0	28	22	37,62	-
6,18	7,58	7,7	7,4	7,5	-	-	26,5	27	26	35,79	-
11,20	7,35	7,4	7,3	6,19	6,25	6,14	25,0	28	22	37,52	-
12,36	-	-	-	6,8	7,1	6,03	25,3	26,2	24,6	33,99	37,45
20,39	7,15	7,6	6,7	7,5	-	-	26,5	27	26	35,90	-
20,41	7,5	7,9	7,6	7,61	-	-	26,5	27	26	35,96	-
24,72	-	-	-	6,5	7,3	5,83	25,14	26,2	24	37,14	38,08
34,60	7,0	7,2	6,8	6,17	6,39	6,00	25,0	28	22	36,36	-
43,26	-	-	-	6,87	7,06	6,51	25,13	24,2	26,2	35,17	35,75
52,53	-	-	-	6,59	7,28	5,64	25,3	26,4	24	36,2	38,98
61,80	5,8	6,3	5,5	7,71	-	-	26,5	27	26	35,93	-
74,16	-	-	-	6,9	7,33	6,55	25,0	26	24,2	36,15	37,45
93,00	5,0	5,4	4,9	7,08	7,82	7,33	20,5	20	14,2	-	-
123,60	-	-	-	6,46	6,78	5,33	25,8	26	24,2	36,8	37,15
154,50	6,1	6,8	4,9	7,08	7,82	6,33	20,53	23	17,5	-	-

Tabla 18: Tasas de mortalidad y ecuaciones de mortalidad calculadas en los bioensayos de toxicidad aguda con cromo.

TIEMPO (HORAS)	LC 50 (%)	LC 50 (PPM)	LC 84 (%)	LC 84 (PPM)	LC 16 (%)	LC 16 (PPM)	ECUACION DE MORTALIDAD
24	0,3200	198	0,6400	396	0,1560	96	$Y = 4,5325 + 3,28 (X - 3,3620)$
48	0,1535	95	0,1845	114	0,1274	79	$Y = 4,8432 + 12,31 (X - 3,1236)$
72	0,1200	74	0,1486	92	0,0688	43	$Y = 4,4335 + 5,95 (X - 2,9714)$
96	0,1175	73	0,2188	135	0,0635	39	$Y = 4,2939 + 3,76 (X - 2,8905)$
120	0,8000	52	0,1950	66	0,0658	41	$Y = 3,7303 + 9,60 (X - 2,7900)$

Tabla 19: Sensibilidad del camaron P. notialis a diferentes metales.

METAL (mg/l)	LC 50 (24 HORAS)	LC 50 (48 HORAS)	LC 50 (72 HORAS)	LC 50 (96 HORAS)	LC 50 (120 HORAS)	CONC. PRESUMIBLES. NO DAÑINA	AUTOR
Cu	18	11	9	5,5	4,5	1,2	SUAREZ Y SOTOLONGO (1977)
Pb	-	-	-	20,19	3,9	0,05	SUAREZ (1978)
Hg	0,31	0,29	-	-	-	0,08	GONZALEZ (1977)
As	16,5	8,4	7	5	-	0,05	SUAREZ Y PERIGO (1975)
Cr	198	95	74	73	52	6,18	RESULTADOS DE ESTE TRABAJO

Tabla 20: Tasa metabólica para *P. notialis* en función del peso, temperatura y concentración de oxígeno calculados de acuerdo a las ecuaciones de análisis multivariados determinados para este trabajo.

C. R. (pasa)	PESO (g)	T E M P E R A T U R A (°C)													
		20,0	21,0	22,0	23,0	24,0	25,0	26,0	27,0	28,0	29,0	30,0			
	10	239	266	294	322	349	377	405	433	460	488	516			
	11	219	246	274	302	329	357	385	413	440	468	496			
	12	204	232	260	287	315	343	370	398	426	454	481			
0,0	13	187	215	242	270	298	325	353	381	409	436	464			
	14	170	197	225	253	280	308	336	364	391	419	442			
	15	152	180	208	235	263	291	319	346	374	402	430			
	16	135	163	191	218	246	274	301	329	357	385	412			
	17	118	146	173	201	229	256	284	312	340	367	392			
	10	305	355	406	456	506	556	606	656	706	755	806			
	11	304	354	404	454	504	555	605	655	705	755	805			
	12	303	353	403	453	503	553	603	653	704	754	804			
115,0	13	302	352	402	452	502	552	602	652	701	752	802			
	14	300	350	400	451	501	551	601	651	701	751	801			
	15	299	349	399	449	499	549	600	650	700	750	800			
	16	298	348	398	448	498	548	598	648	698	749	799			
	17	297	347	397	447	497	547	597	647	697	747	797			
	11	215	245	275	305	335	366	396	426	456	486	516			
	12	224	255	283	315	345	375	405	435	465	495	525			
7,5	13	234	264	294	324	354	384	414	444	474	504	535			
	14	243	273	303	333	363	393	423	453	484	514	544			
	15	252	282	312	342	372	403	433	463	493	523	553			
	16	261	291	321	351	382	412	442	472	502	532	562			
	12		368	387	406	424	443	461	480	498	517	535			
	13	328	347	367	386	402	421	439	458	476	495	514			
1,36	14	307	325	344	362	381	399	418	436	455	473	492			
	15	285	303	322	341	359	378	396	415	433	452	470			
	16	263	282	300	319	337	356	374	393	411	430	449			

Tabla 21 : Valores físico-químicos medios observados durante los experimentos semicontinuos de letalidad.

PARAMETRO	CONCENTRACION DE COBRE EN MG/L						
	CONTROL	2.1	4.9	6.5	9.0	13.4	15.4
pH	8.1	8.1	8.0	8.0	7.9	7.6	7.7
SALINIDAD (g/l)	36.05	36.03	36.35	35.82	35.97	35.56	35.79
OXIGENO (mg/l)	7.22	7.5	7.00	7.44	7.35	7.0	7.02
TEMPERAT. (°C)	27.9	26.9	25.0	26.9	26.9	25.0	27.0
PESO MEDIO (g)	3.6	3.0	4.3	3.3	3.0	4.3	4.0
EJEMPLARES	40	10	10	10	10	10	10
PESO TOTAL (g)	144	30	43	33	30	43	40

Tabla 22 : Factores físico-químicos observados durante los experimentos de acumulación en el agua experimental.

PARAMETRO	CONTROL	MAX Y MIN	0.26 ppm	MAX Y MIN
pH	8.1	6.5-7.5	8.1	6.1-7.4
SALINIDAD (g/l)	36.24	36.2-36.3	35.95	35.7-36.2
OXIGENO (mg/l)	7.13	6.5-7.5	6.92	6.1-7.4
TEMPERATURA (°C)	25.7	23.5-26.0	25.7	23.5-26.0
PESO MEDIO (g)	4.4	2.0-6.7	4.6	3.3-6.6

Tabla 23: Tasas de mortalidad observadas en los bioensayos de letalidad con cobre.

TIEMPO (HORAS)	L C 50	L C 84	L C 16	LIM. CONF. DEL LC 50
24	18.0	115.0	3.3	36.0-9.0
32	14.0	60.0	3.2	25.9-7.6
48	11.0	48.0	2.3	19.8-6.1
72	9.0	40.0	2.0	16.2-5.0
96	5.5	22.0	1.4	9.4-3.2
120	4.5	16.0	1.3	7.2-2.8
144	4.5	16.0	1.3	7.2-2.8
168	2.8	9.5	0.9	5.0-1.6
192	2.0	5.6	0.8	4.0-1.2
216	1.4	3.6	0.4	-
240	1.0	2.4	0.4	-

Tabla 24: Factores de acumulación de cobre, para diferentes concentraciones, según el tiempo de letalidad.

CONCENTRACION	f. a.	TIEMPO LETAL EN HORAS
2.1	157	>240
4.5	52	240
8.0	60	168
12.0	49	140
15.0	12	72

Tabla 25: Peso medio (g), máximo y mínimo de los camarones empleados para concentración ($10^3 \mu\text{g/l}$) de plomo.

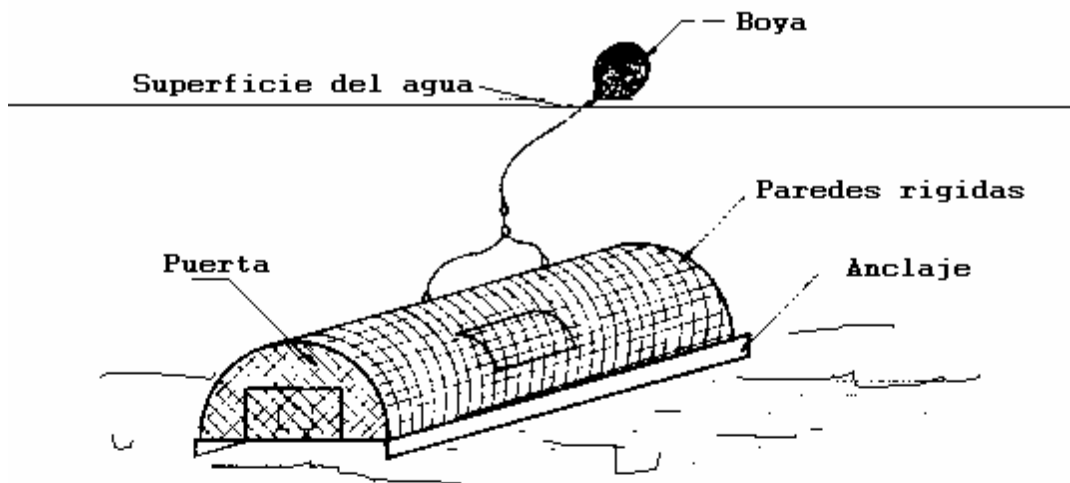
CONCENTRACION	PESO MEDIO (g)	PESO MAXIMO	PESO MINIMO
Control	5.1	7.0	3.7
0.01	6.5	9.8	3.5
0.03	6.4	9.1	4.9
0.10	5.6	9.0	3.2
0.18	5.4	7.0	3.9
0.32	7.5	10.9	5.8
0.56	5.0	6.0	4.0
0.90	5.3	6.2	4.0
1.80	5.8	6.5	4.9
5.60	5.5	6.4	4.1
6.00	5.2	10.4	2.8
8.70	5.6	9.3	2.8
10.0	4.0	4.5	3.5
13.0	4.6	5.2	4.0
17.0	4.5	5.0	3.8
Media general	5.7	-	-

Tabla 26: Valores medios de temperatura ($^{\circ}\text{C}$), salinidad ($^{\circ}/_{\text{oo}}$), oxígeno (mg/l) y pH para el plomo ($10^3 \mu\text{g/l}$).

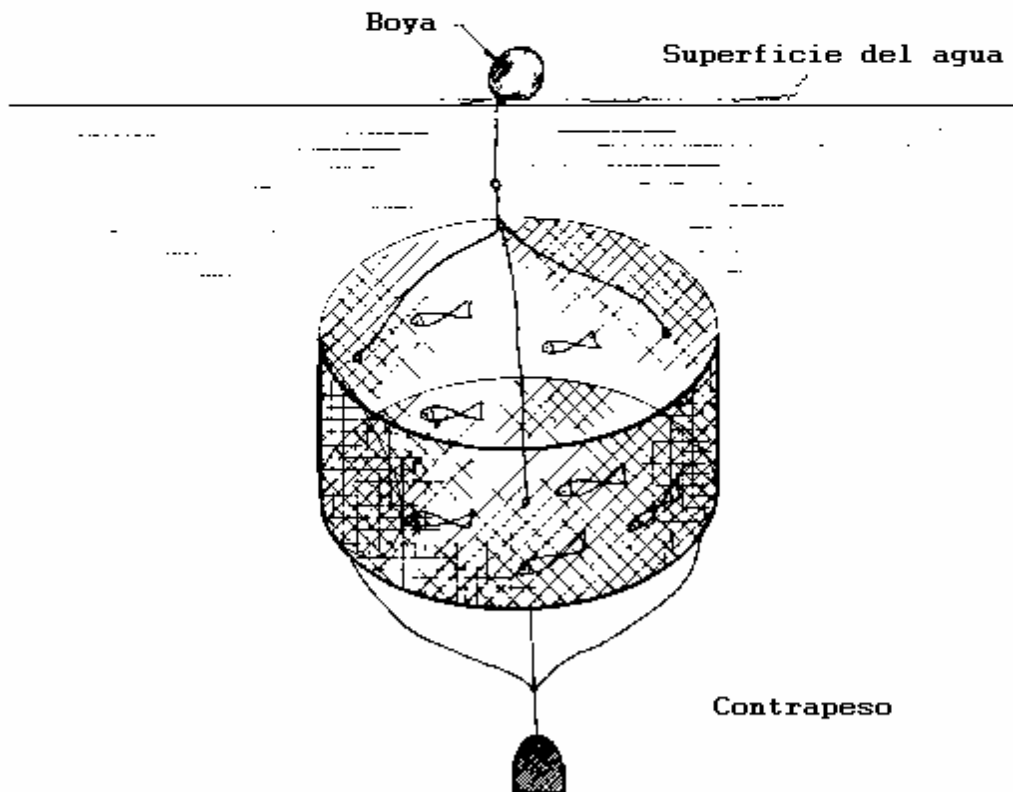
Conc. $\mu\text{g/l}$	T ($^{\circ}\text{C}$)		S		O ₂ mg/l		pH	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
0.01	28.20	0.60	37.21		6.30	0.40	8.10	0.20
0.03	28.10	0.40	37.21		5.75	0.20	8.15	0.40
0.10	28.10	0.50	36.60		6.00	0.20	8.05	0.20
0.18	28.30	0.50	37.06	0.20	6.15	0.04	8.25	0.10
0.32	28.30	0.50	36.03	1.63	6.20	0.05	8.30	0.10
0.56	27.80	1.40	37.00	0.56	5.15	0.02	8.20	0.20
0.90	28.10	0.85	34.42	0.47	5.30	0.01	8.20	0.06
1.80	27.80	1.10	36.75	0.50	5.20	0.03	8.20	0.08
5.60	27.80	1.09	37.10	0.65	5.20	0.03	8.10	0.10
6.00	27.80	1.20	36.18		6.15		8.10	0.13
8.70	27.75	1.20	36.51		6.20		8.10	0.20
10.00	22.95	0.60	36.80		6.10		8.45	0.60
13.00	23.10	0.70	36.72		6.70		8.10	1.40
17.00	22.85	0.90	36.65		6.75		8.00	

ANEXO II

FIGURAS



Jaula para organismos bentónicos



Jaula de flotación para peces

Fig. 1: Jaulas para bioensayos de campo con respuesta directa

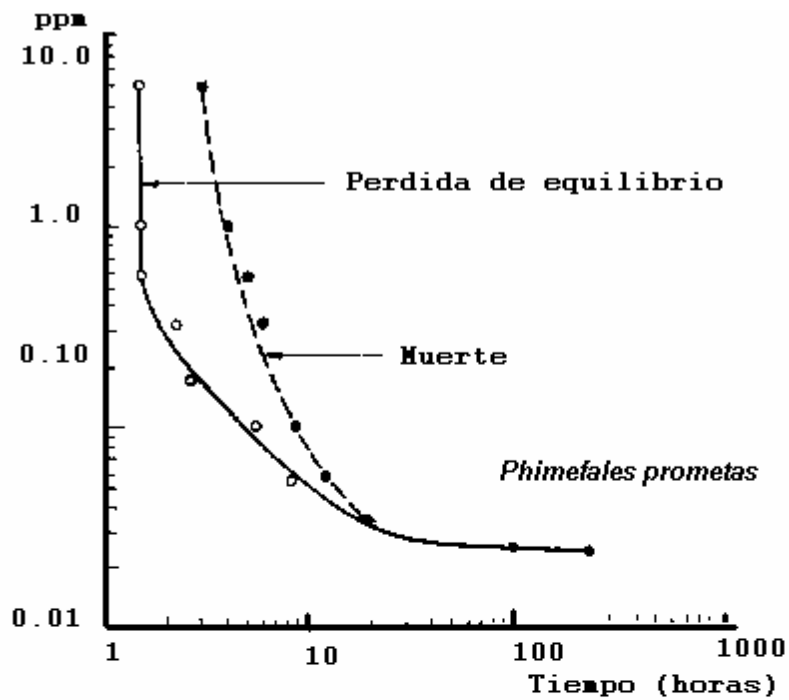


Fig. 2: Curva de toxicidad del Dieldrin, modificado de Tarzwell y Henderson (1957)

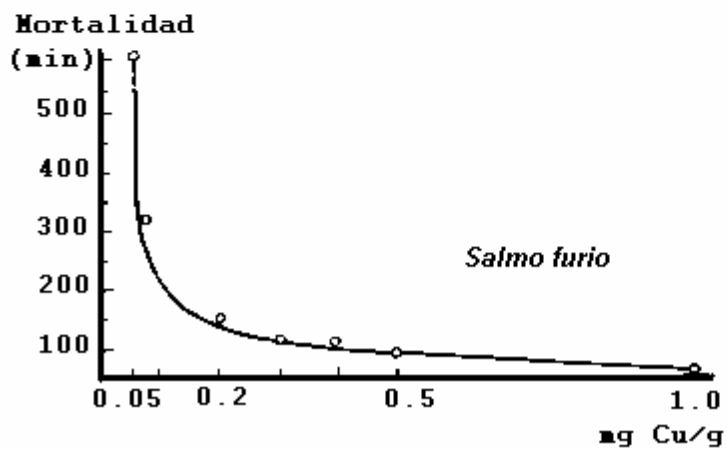


Fig. 3: Curva de concentración contra tiempo de reacción

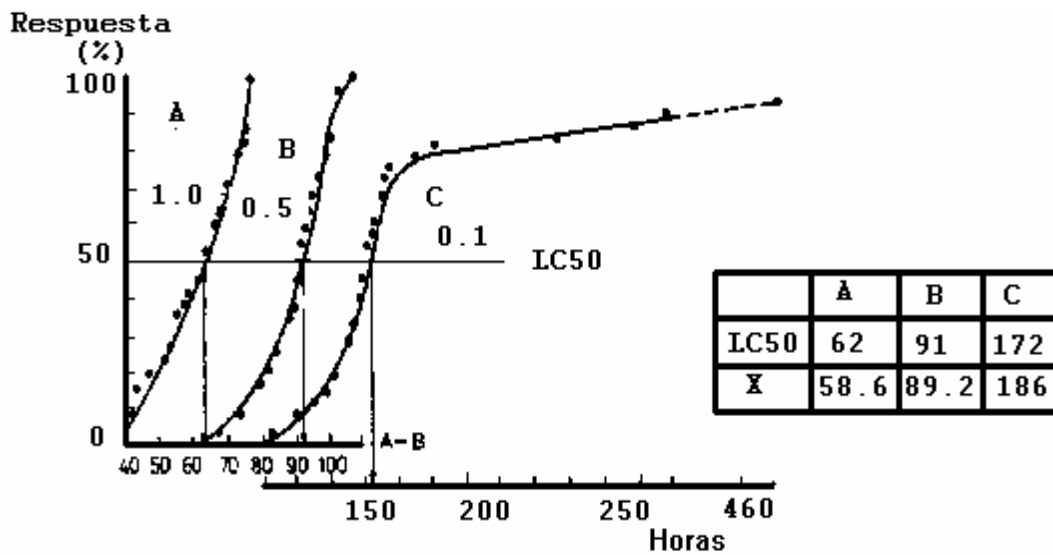


Fig. 4: Curva de contacto porcentaje de mortalidad contra tiempo de muerte

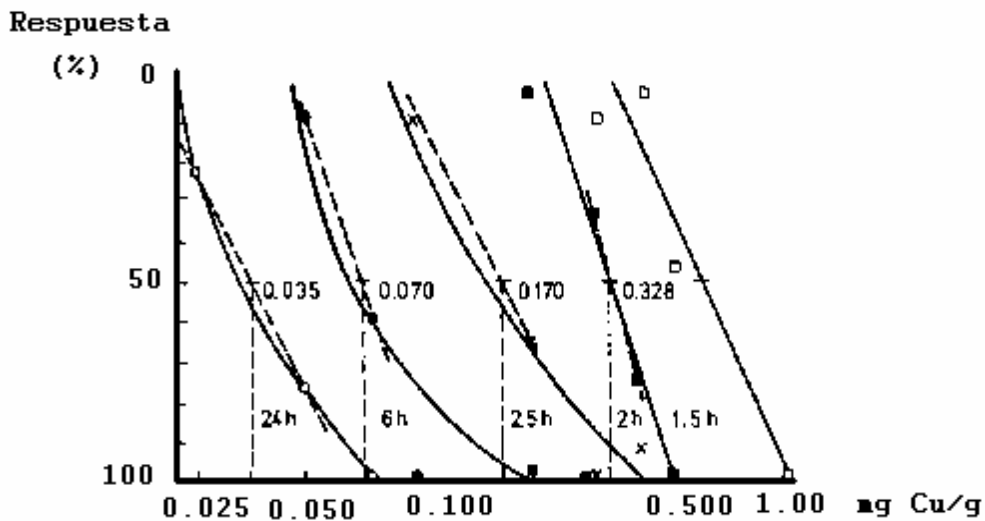


Fig. 5: Curva de concentración respuesta porcentual según el tiempo

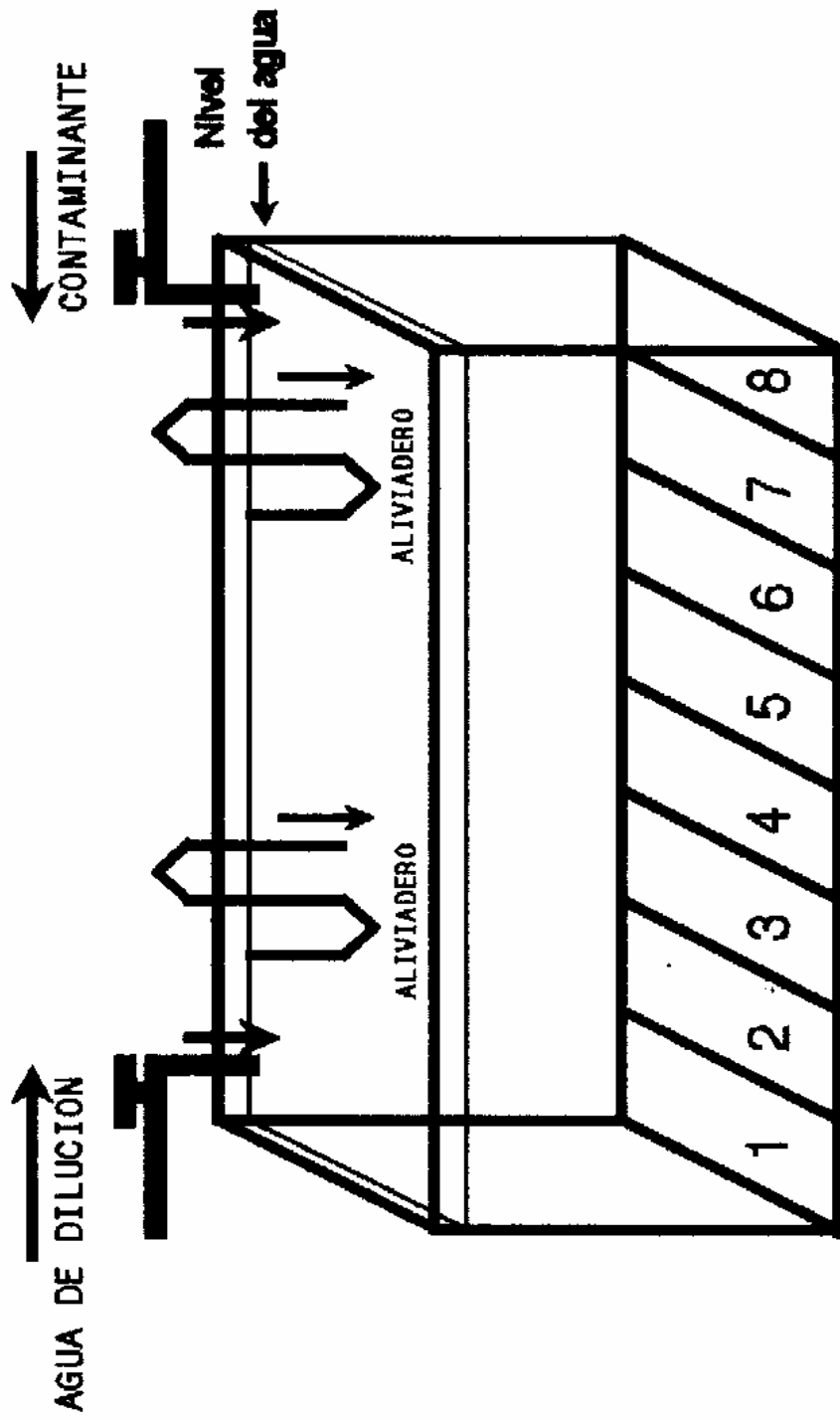


Fig. 6: Fluvioario empleado en las pruebas de conducta

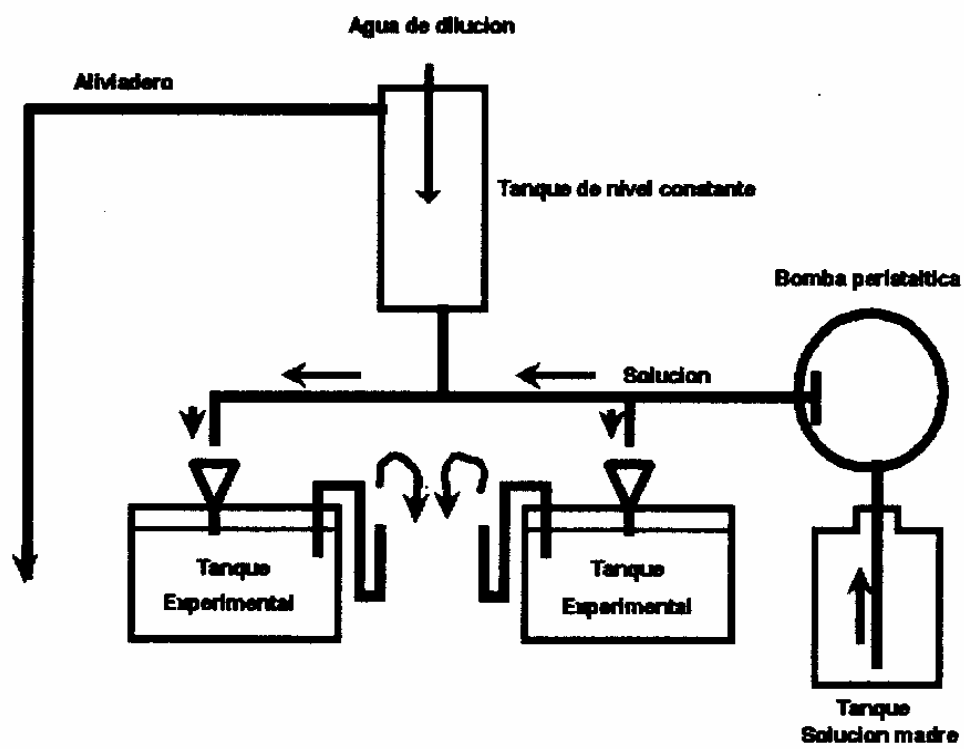


Fig. 7: Esquema del sistema de mezcla empleado para los bloensayos

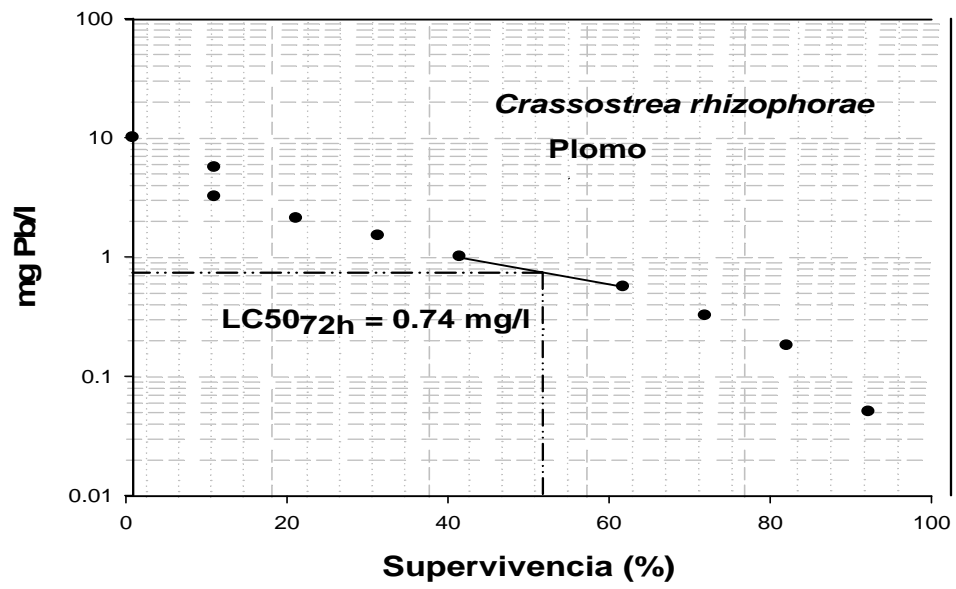
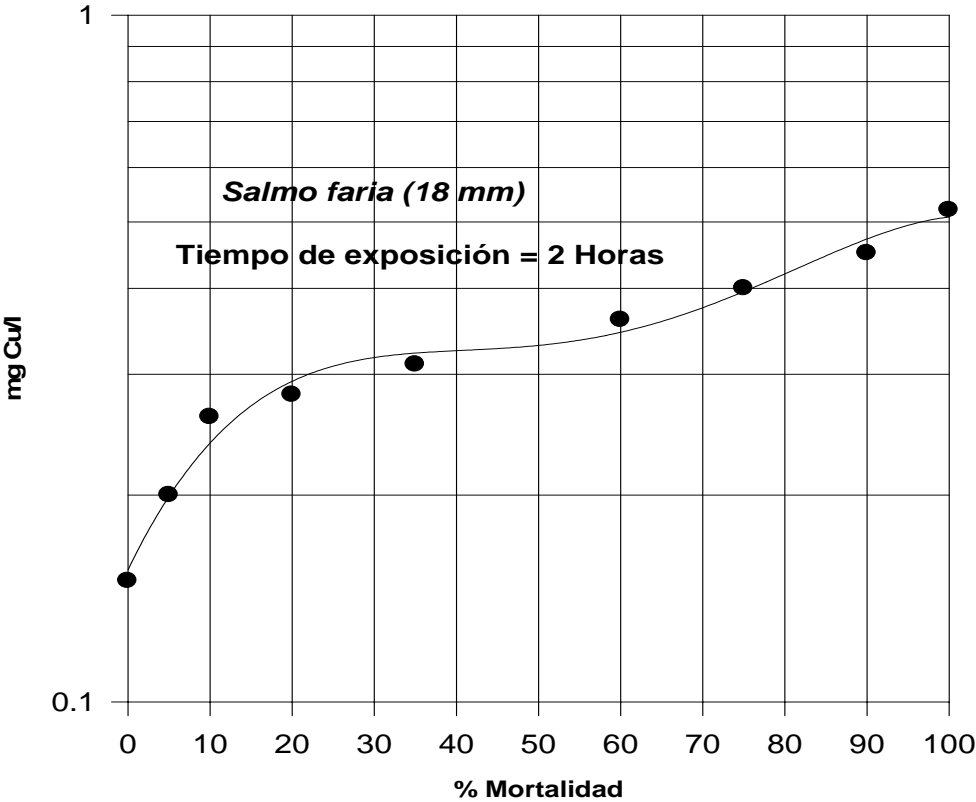


Fig. 8: Distribución estándar del LC50, (Suárez, MS)

Fig. 9: Curva sigmoidea de mortalidad. (Modificado de Marchetti, 1962)



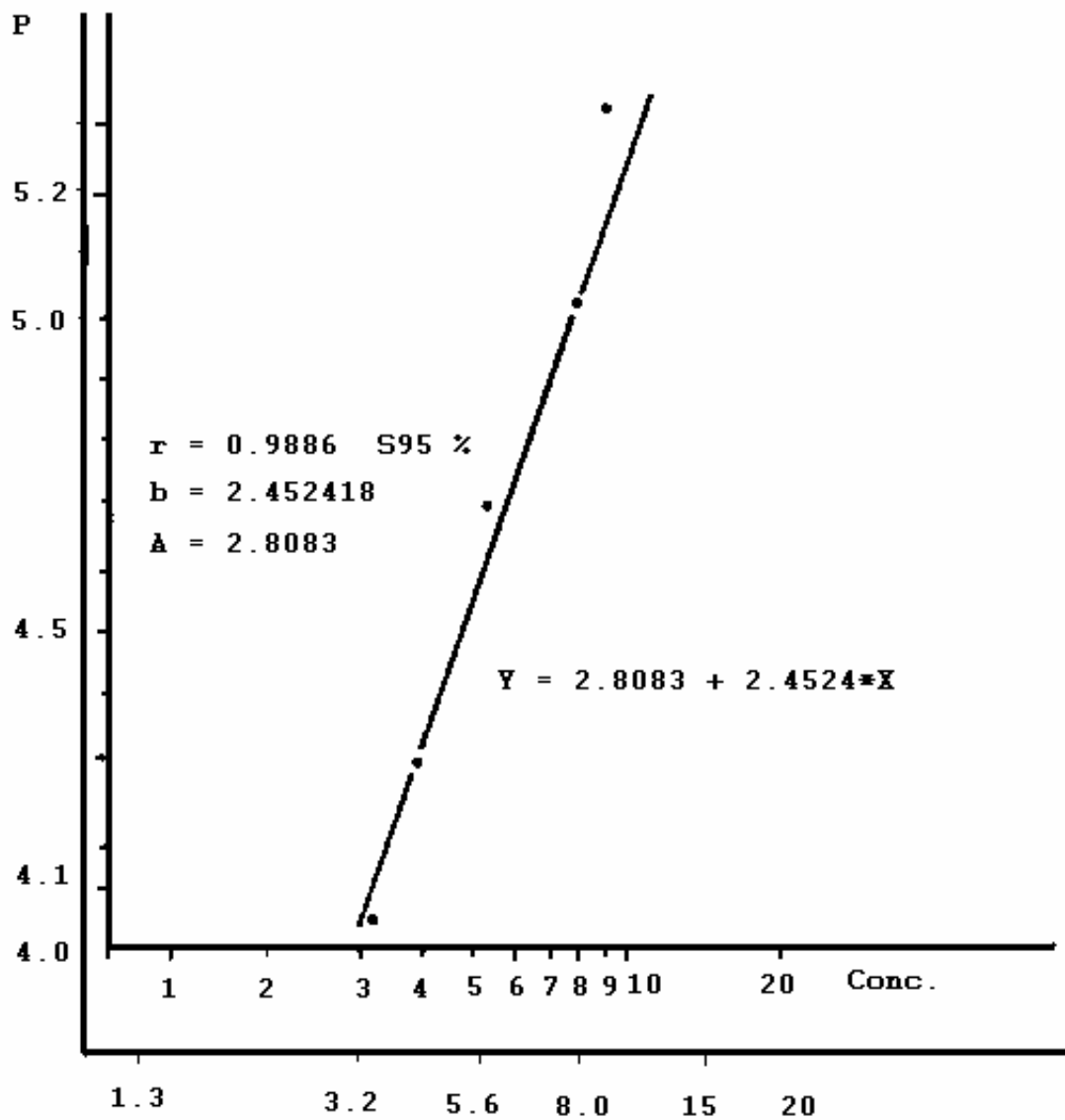


Fig. 10: Probits de mortalidad empíricos vs. logaritmo de la concentración

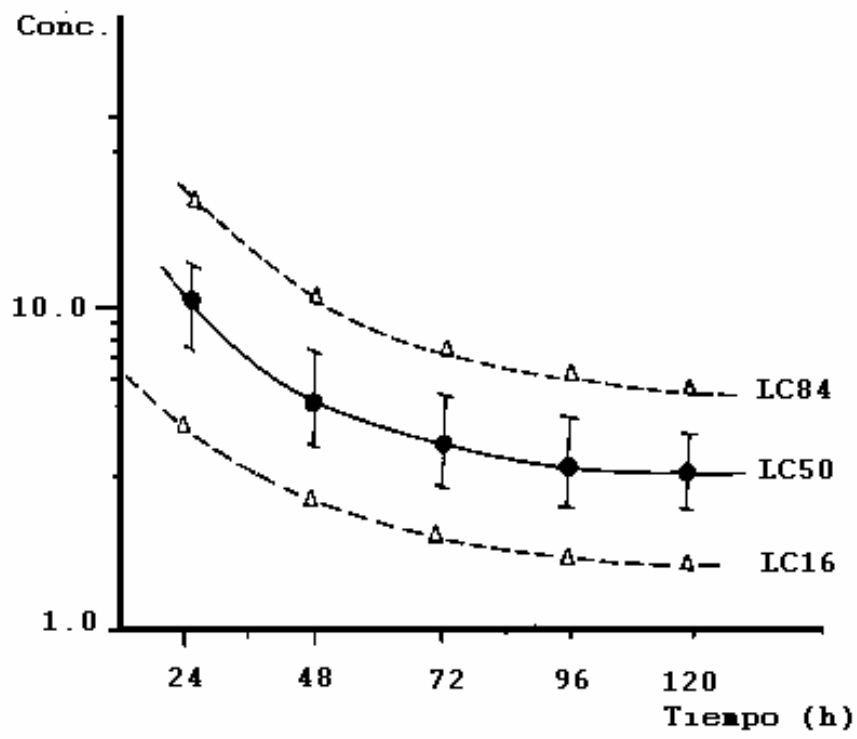


Fig. 11: LC50; LC16; y LC84 con limites de confianza

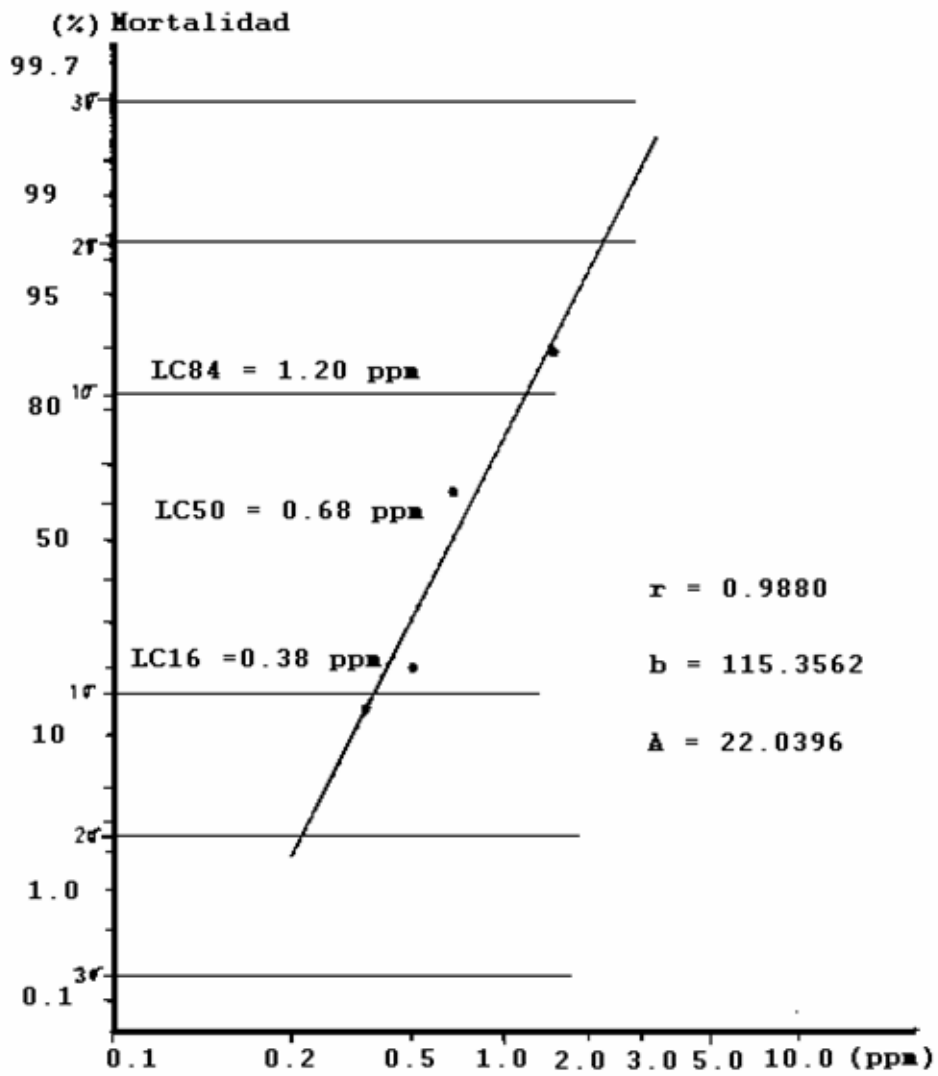


Fig. 12: Concentración contra mortalidad porcentual en Probits

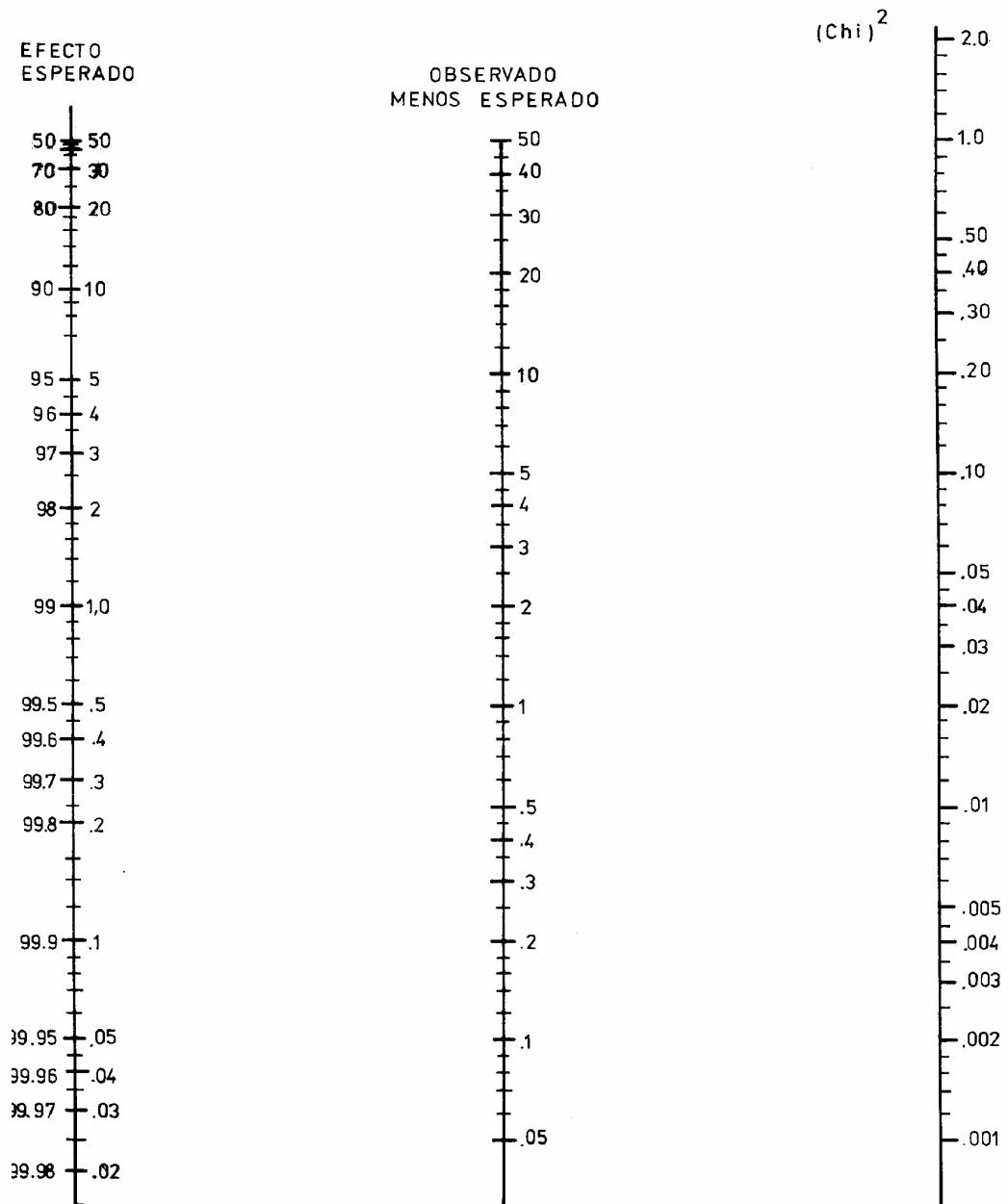


Fig. 13: Nomograma No.1 para el calculo de Chi²

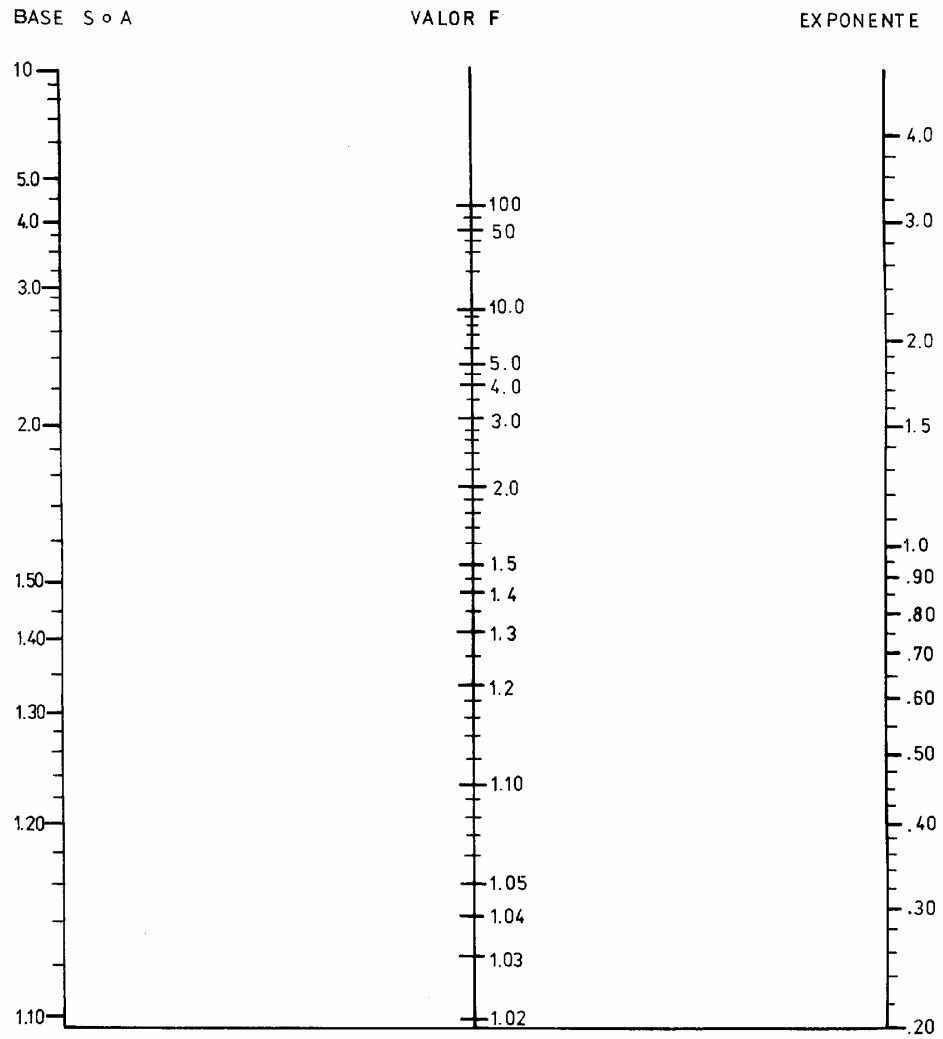


Fig. 14: Nomograma No. 2 para determinar el factor "f"

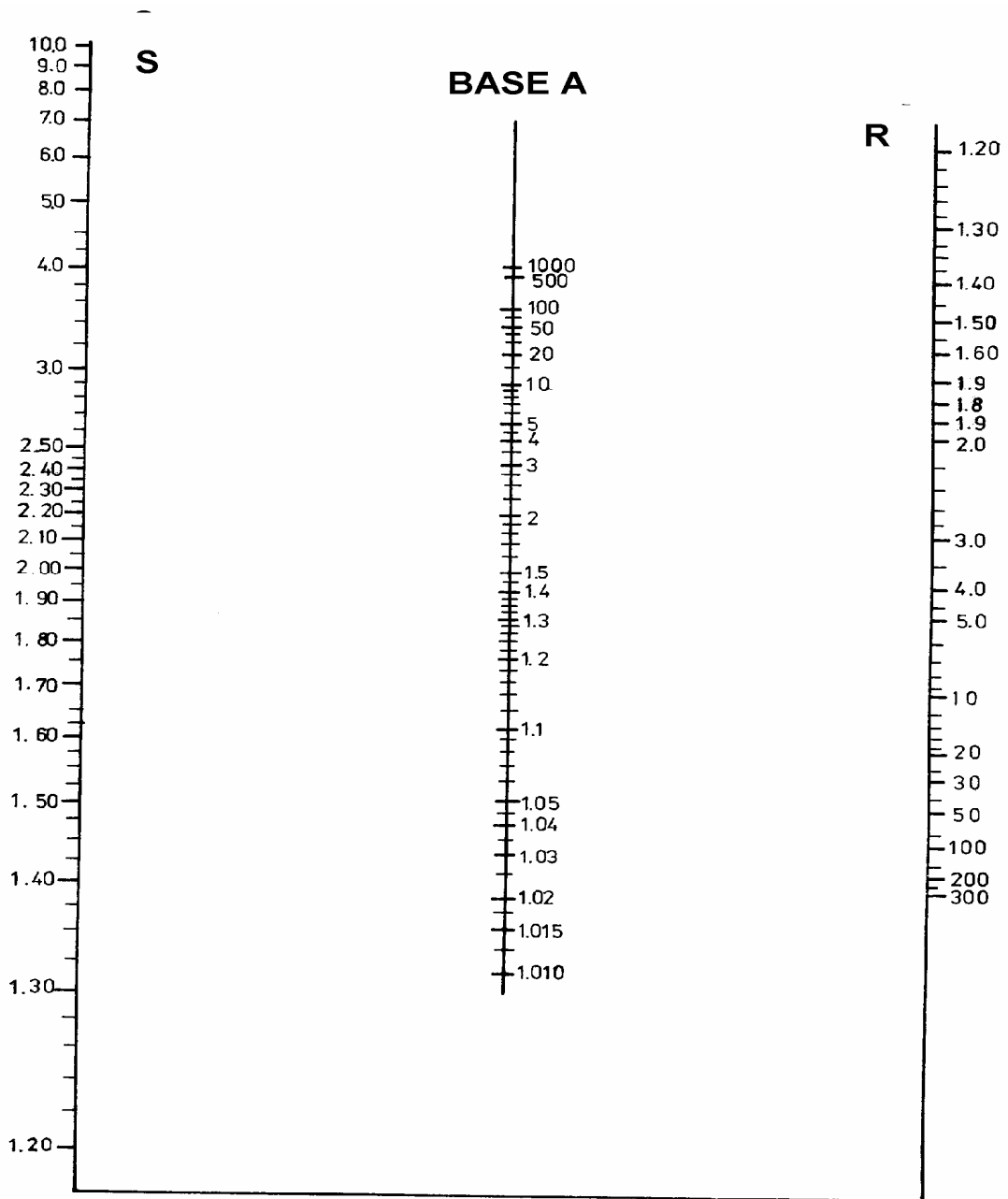


Fig. 15: Nomograma No. 3 para calcular "S"

Fig. 16: Curvas de toxicidad para el DDT según el método aritmético grafico

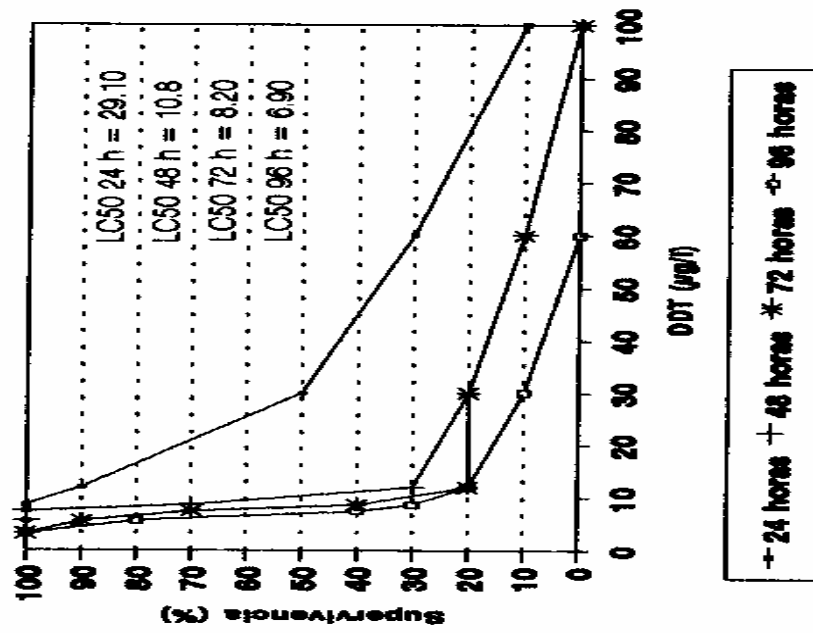


Fig. 17: Curvas de toxicidad para el DDT según el método logarítmico

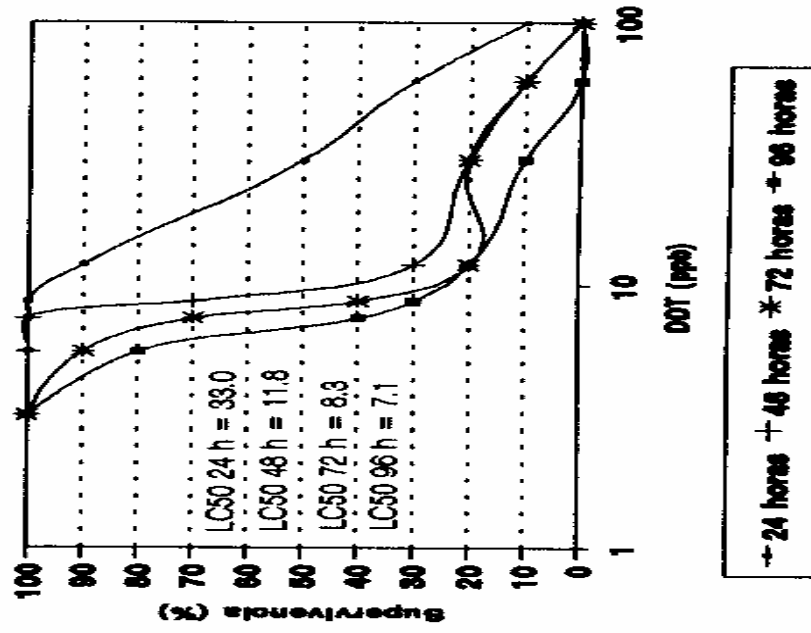


Fig 18: Curva de toxicidad para el DDT determinada por el método de Probits

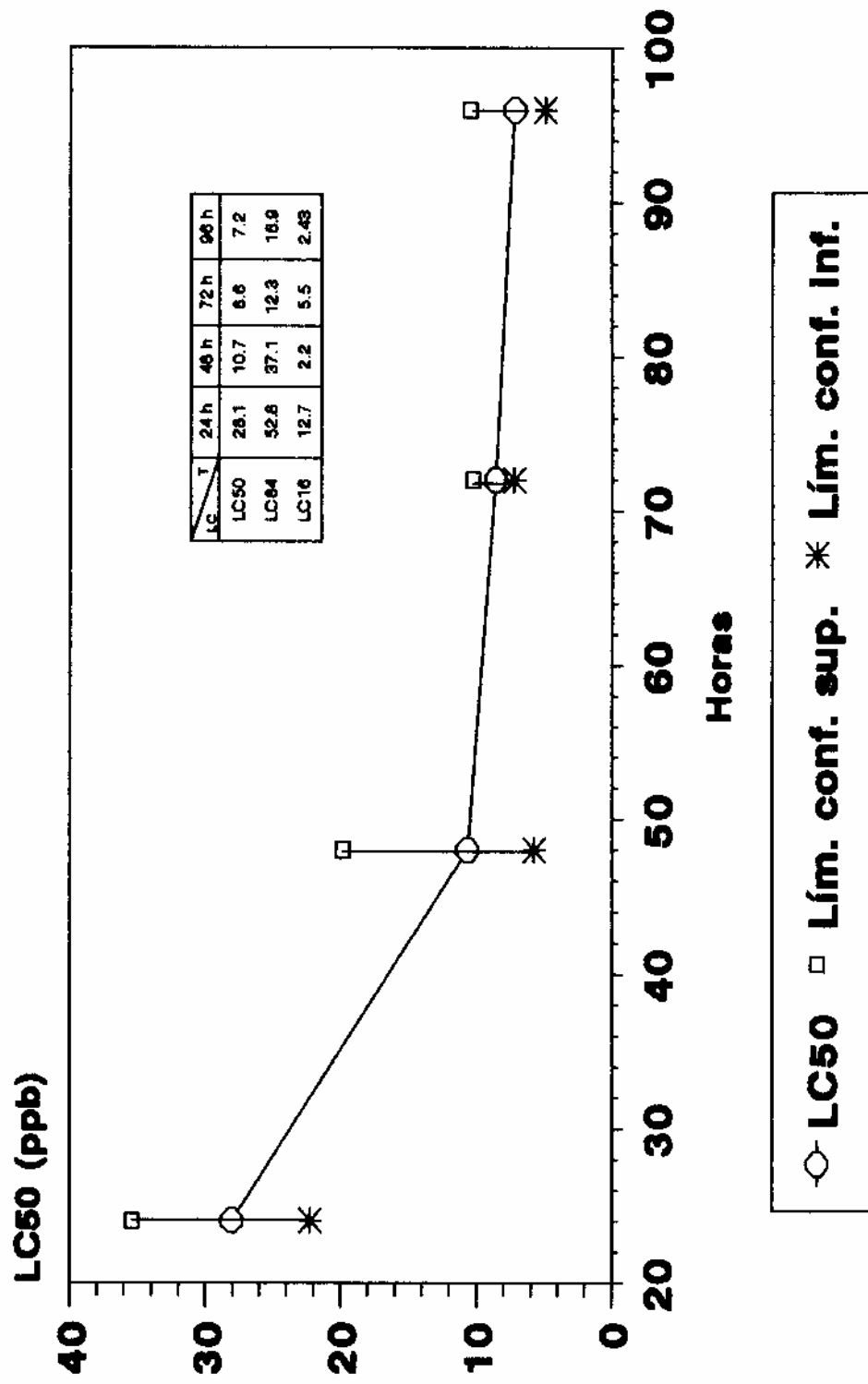


Fig. 19: Crecimiento de Postlarvas de Langosta P. argus sin DDT.

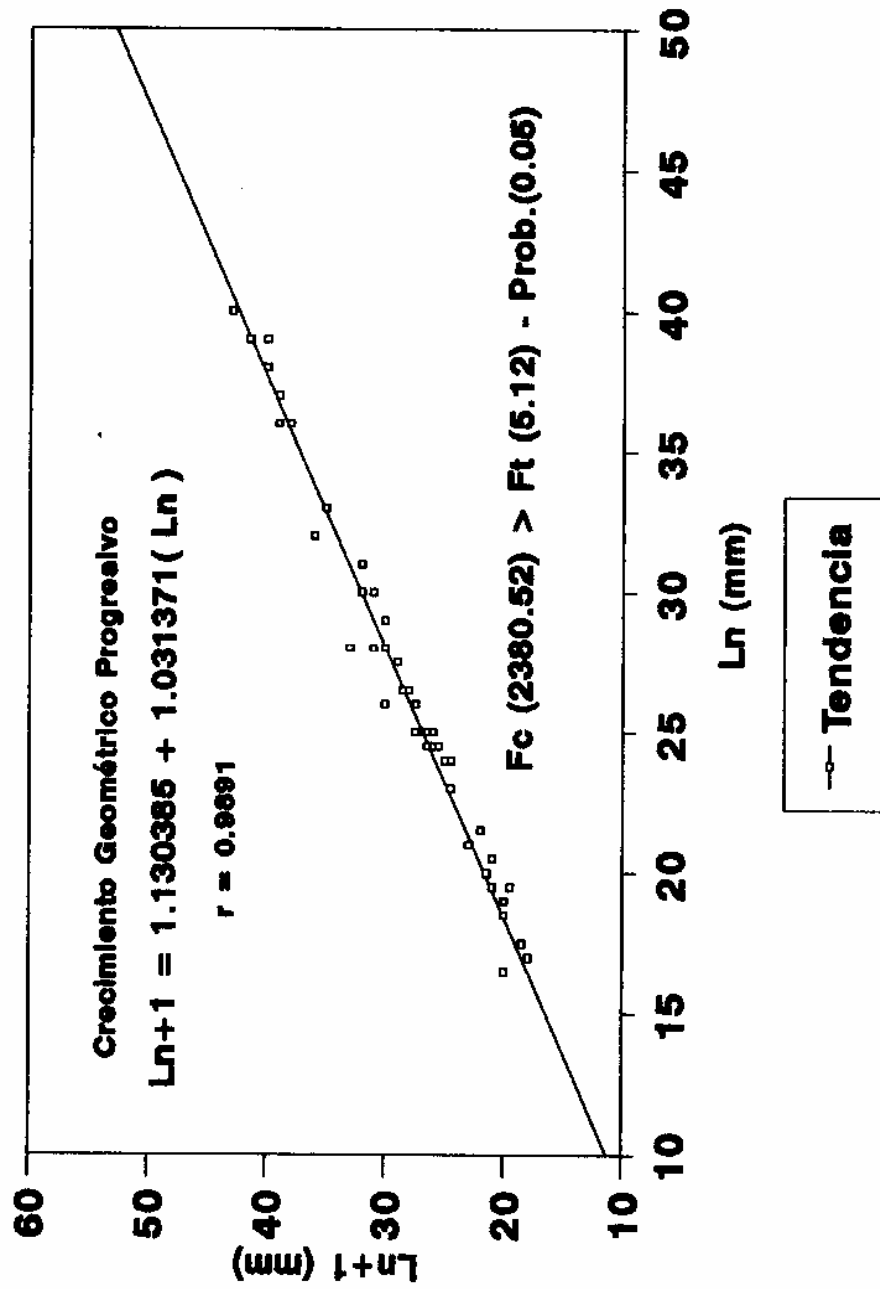


Fig. 21: Ecuaciones de crecimiento según Bertalanffy, Logística y de Gompertz

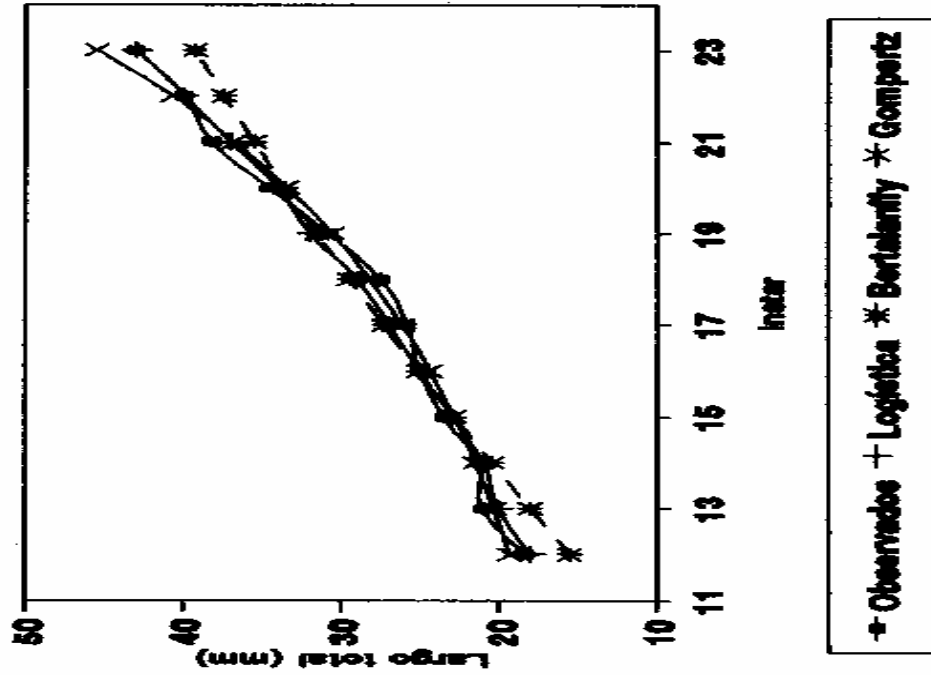
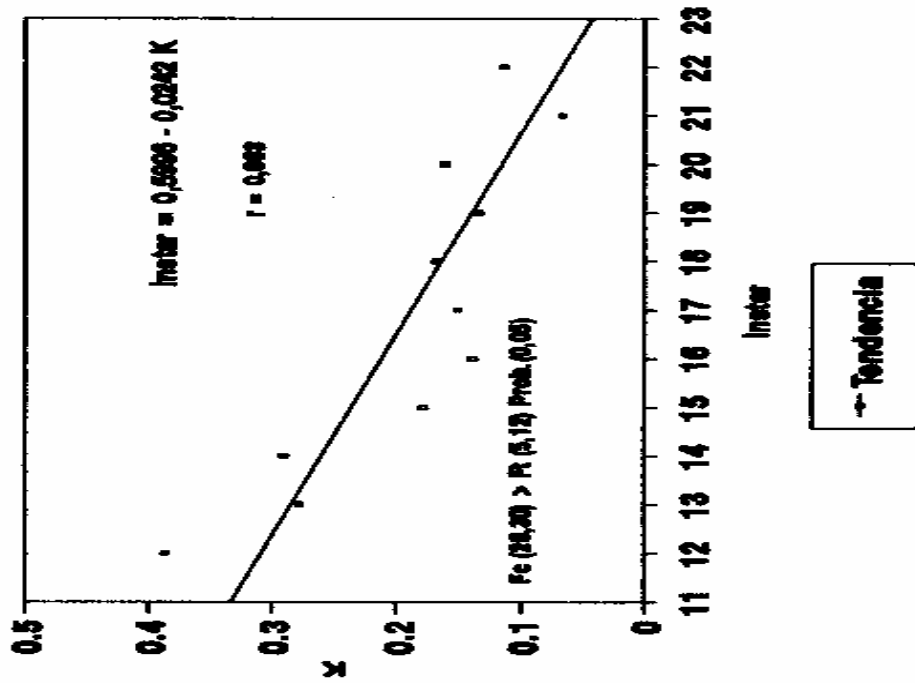


Fig. 20: Tasa de crecimiento por Instar en Postlarvas de Langosta ein DDT.



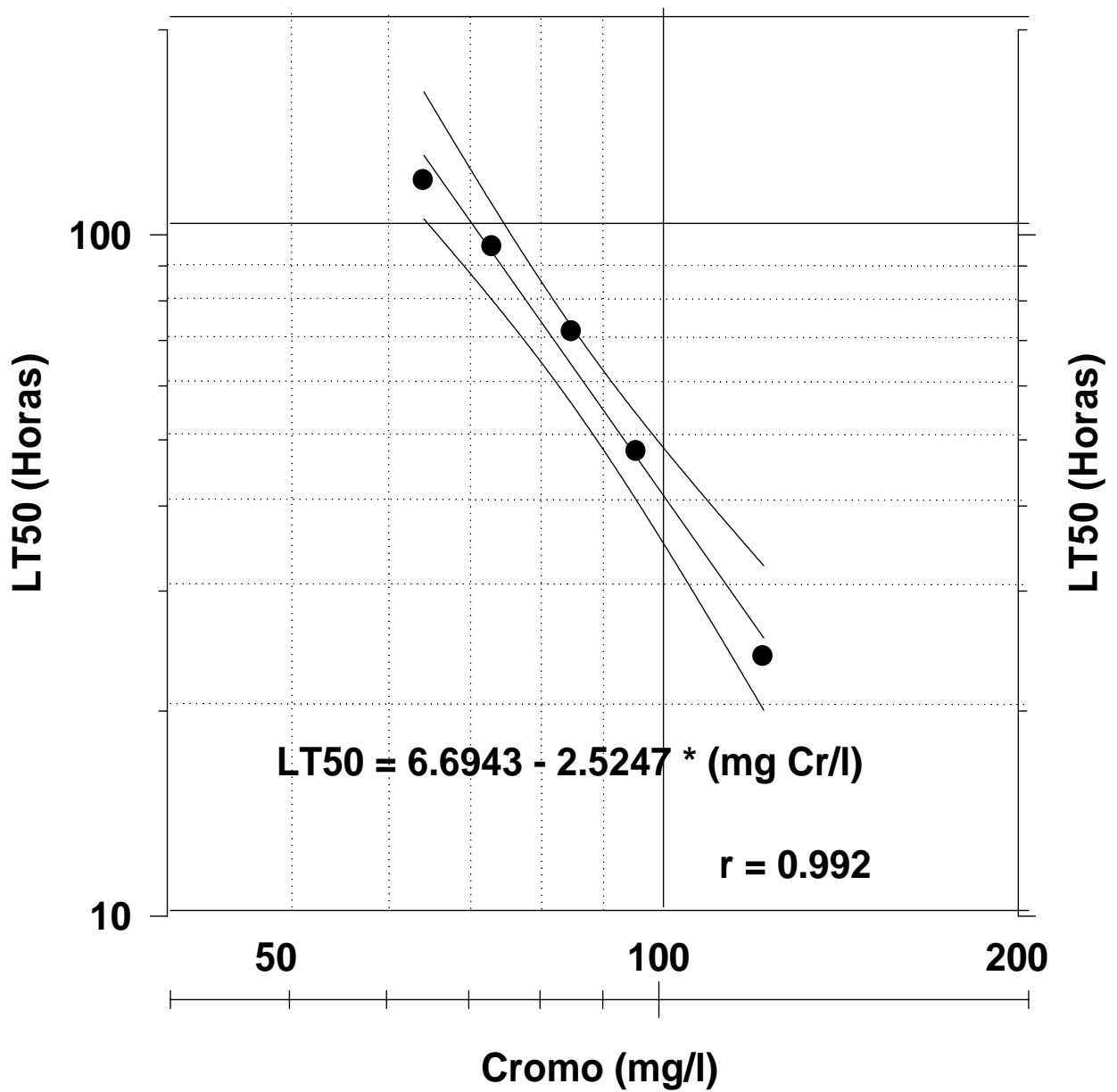
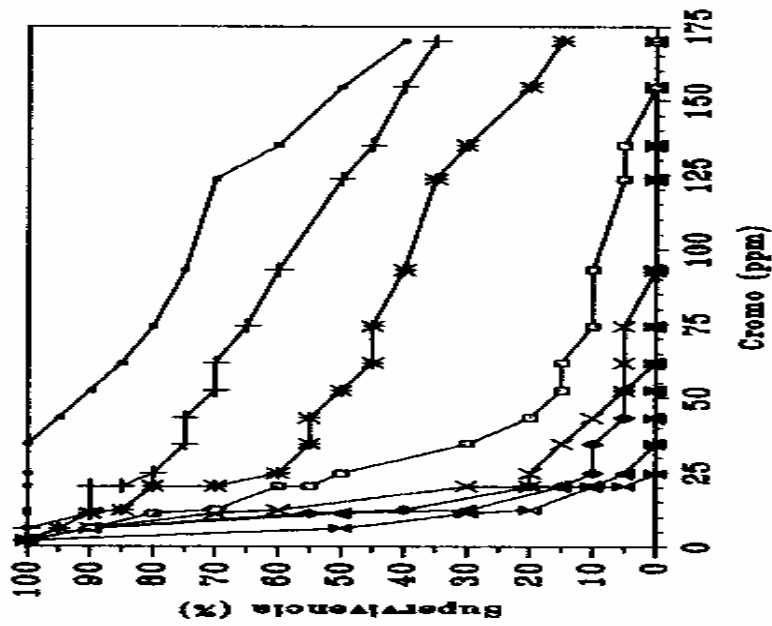


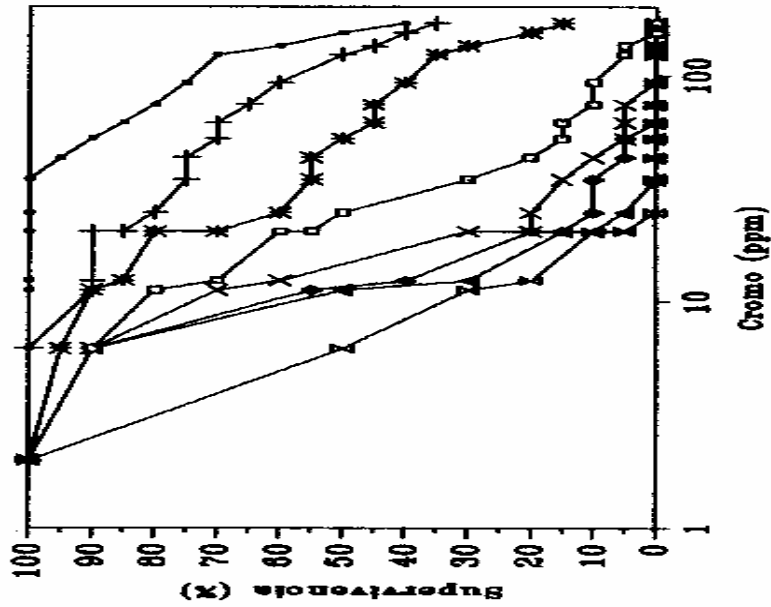
Fig. 22: LT50 y limites de confianza del cromo

Fig. 23: Curvas de toxicidad según el método aritmético gráfico para el cromo



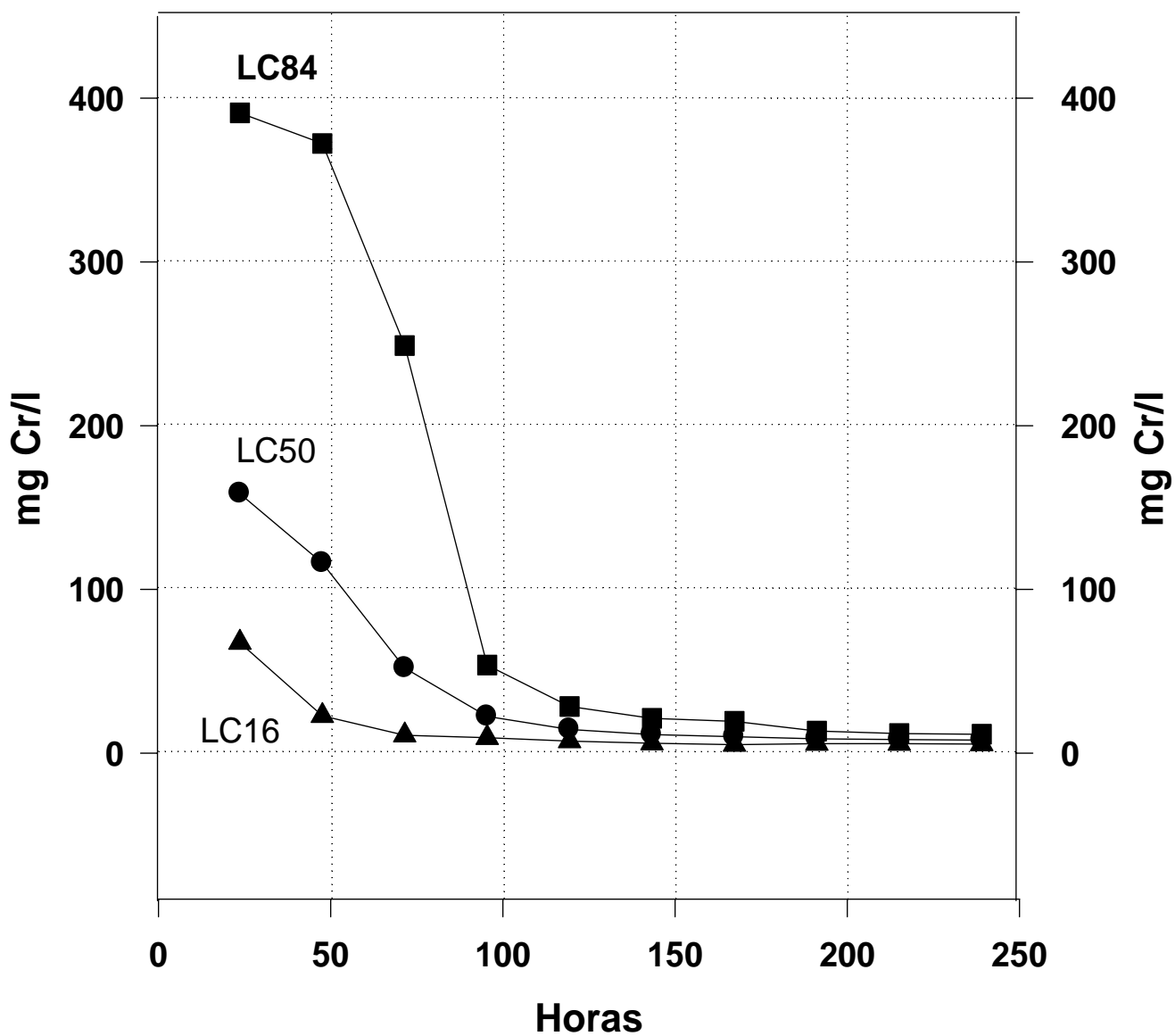
→ 24 h + 48 h * 72 h ◊ 96 h * 120 h + 144 h * 168 h ± 192 h

Fig. 24: Curvas de toxicidad según el método logarítmico para el cromo



→ 24 h + 48 h * 72 h ◊ 96 h * 120 h + 144 h * 168 h ± 192 h

Fig. 25: Curvas de toxicidad en Probits para el cromo



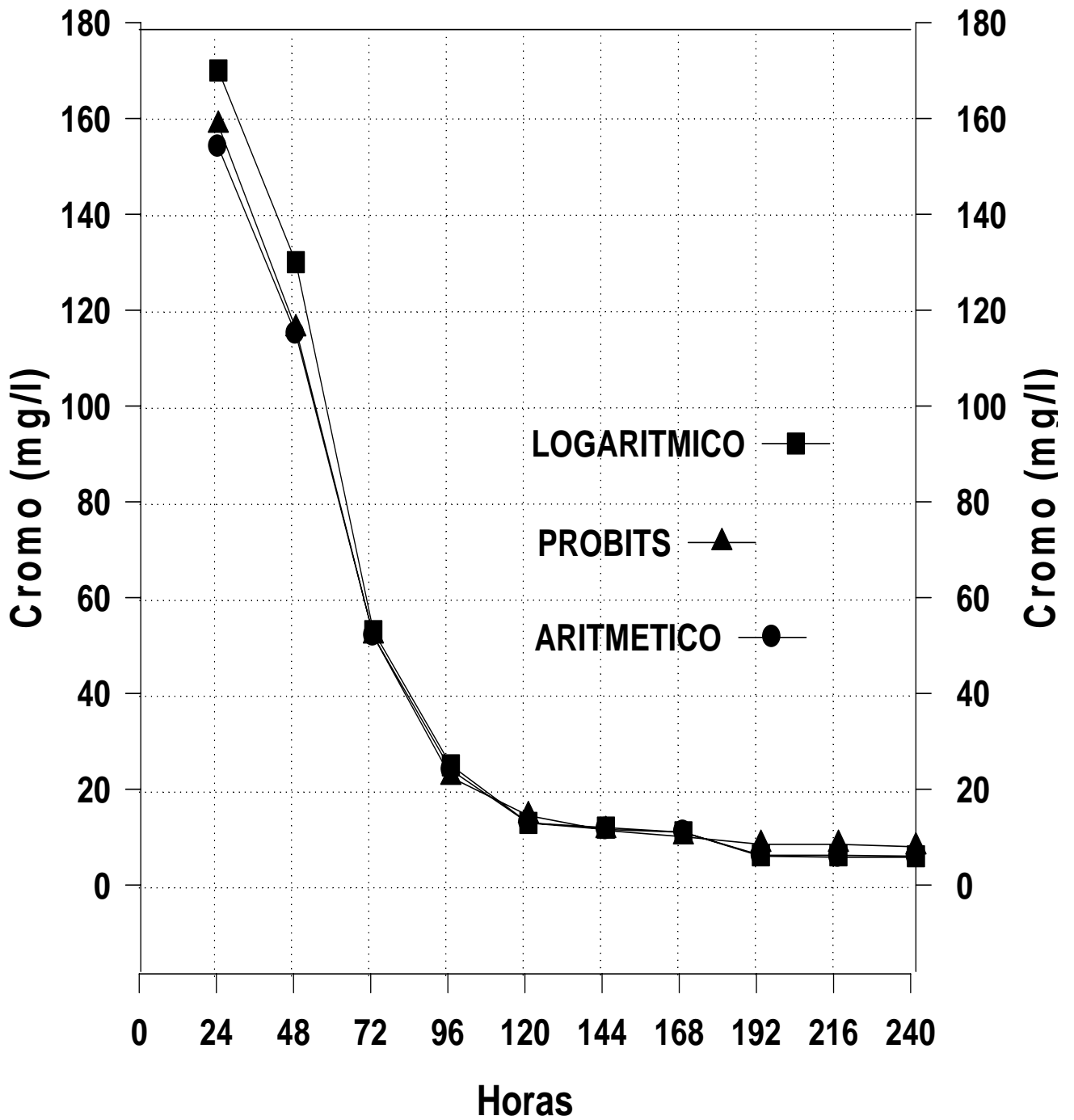


Fig. 26: Curvas de toxicidad según las metodologías

Fig. 27 : Tasas de acumulacion y desacumulación de cromo

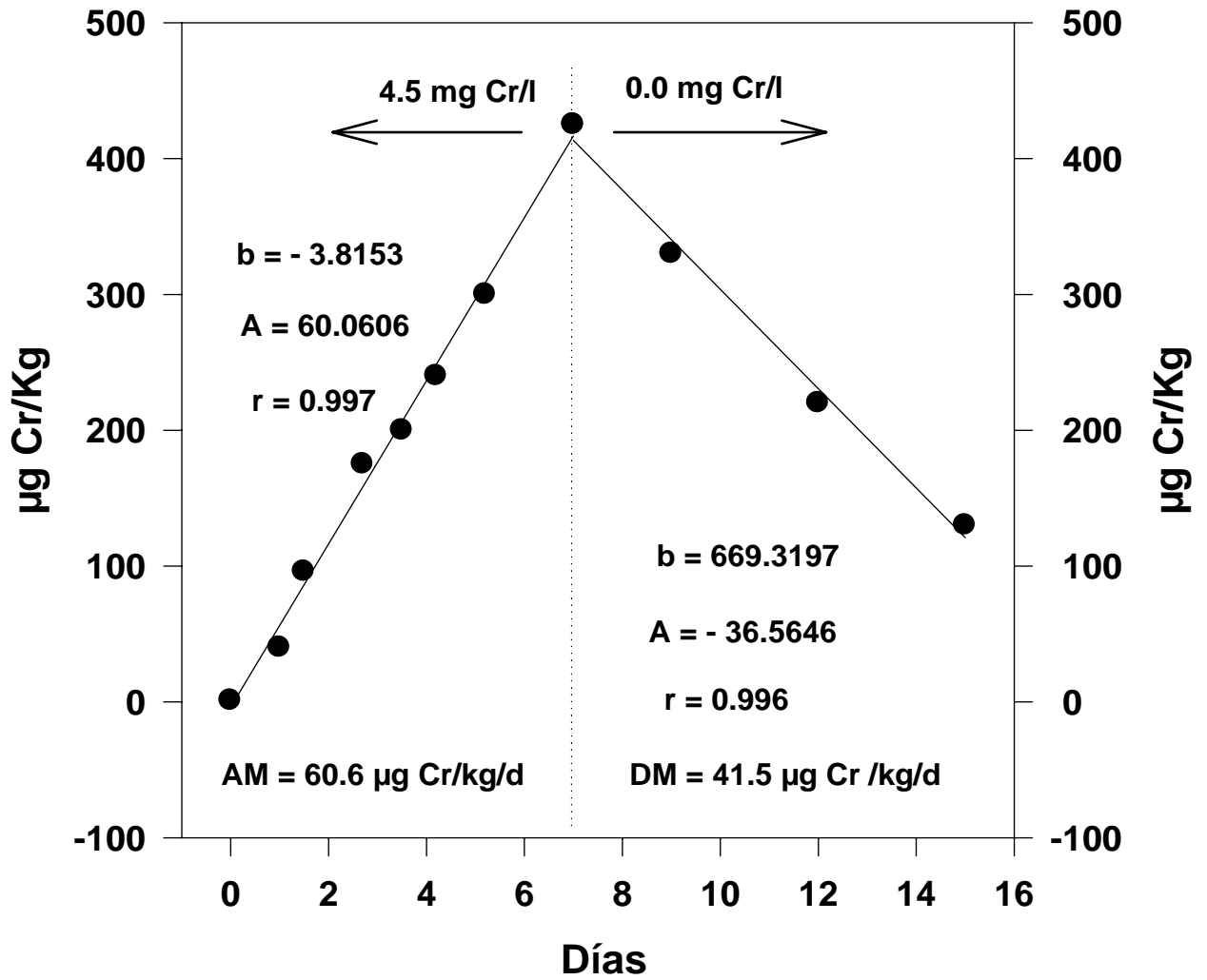


Fig. 28: Tasa metabólica según el nivel de cromo

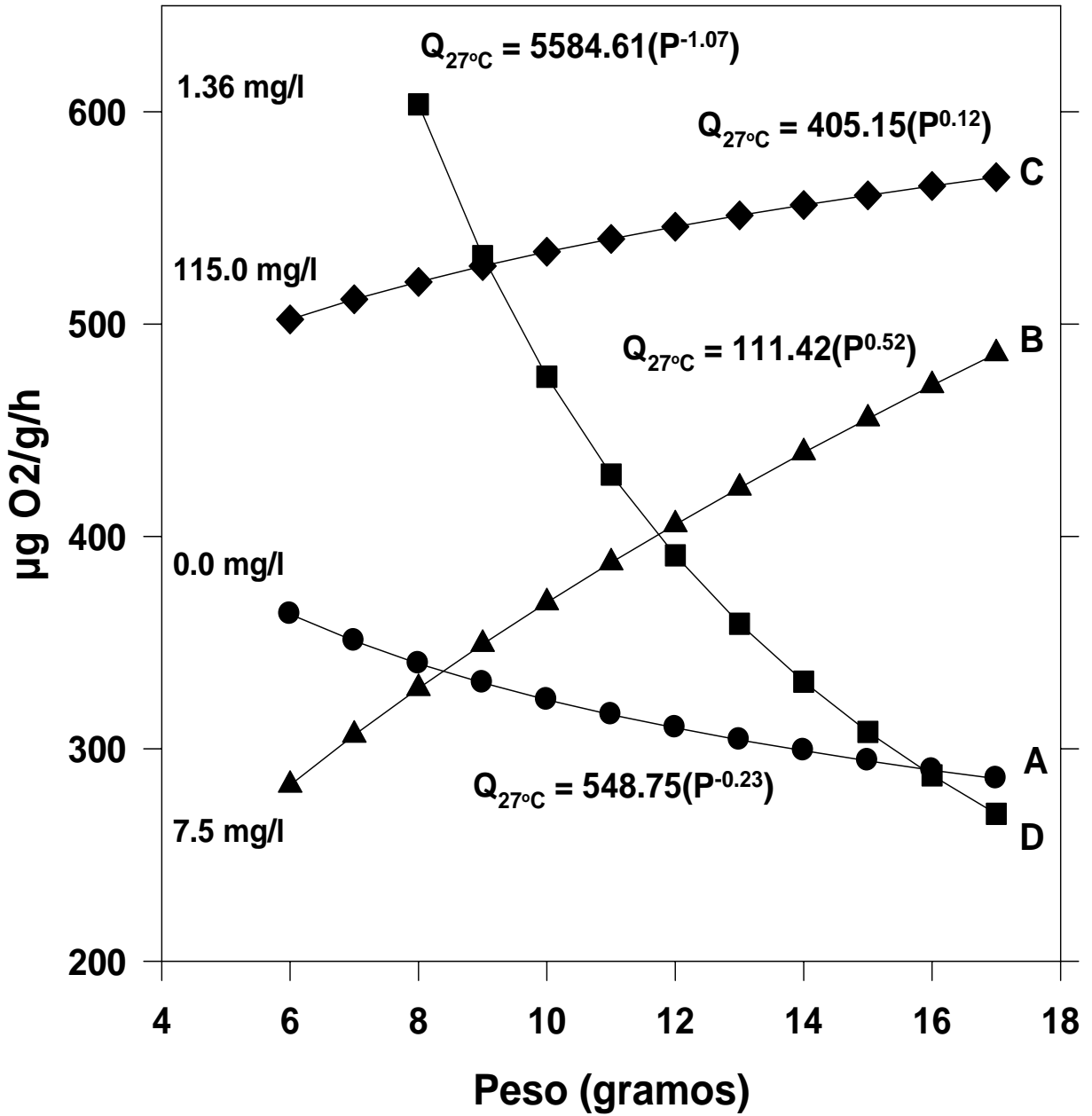


Fig. 29: Diagrama de reacción al gradiente de cromo

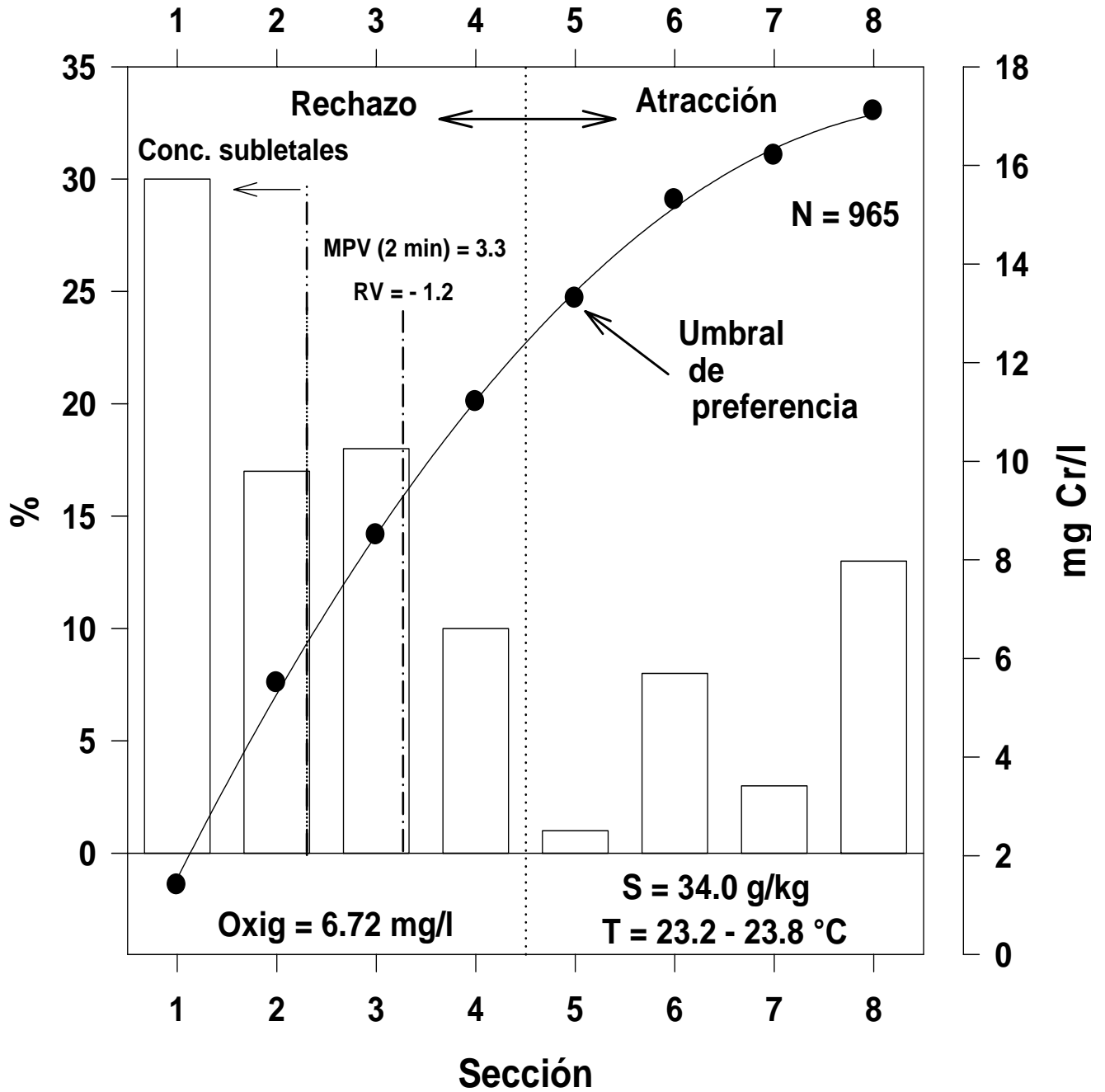


Fig. 30: Diagrama de reacción para períodos continuos de observación.

MPV = Posición media ocupada (períodos de 2 minutos)

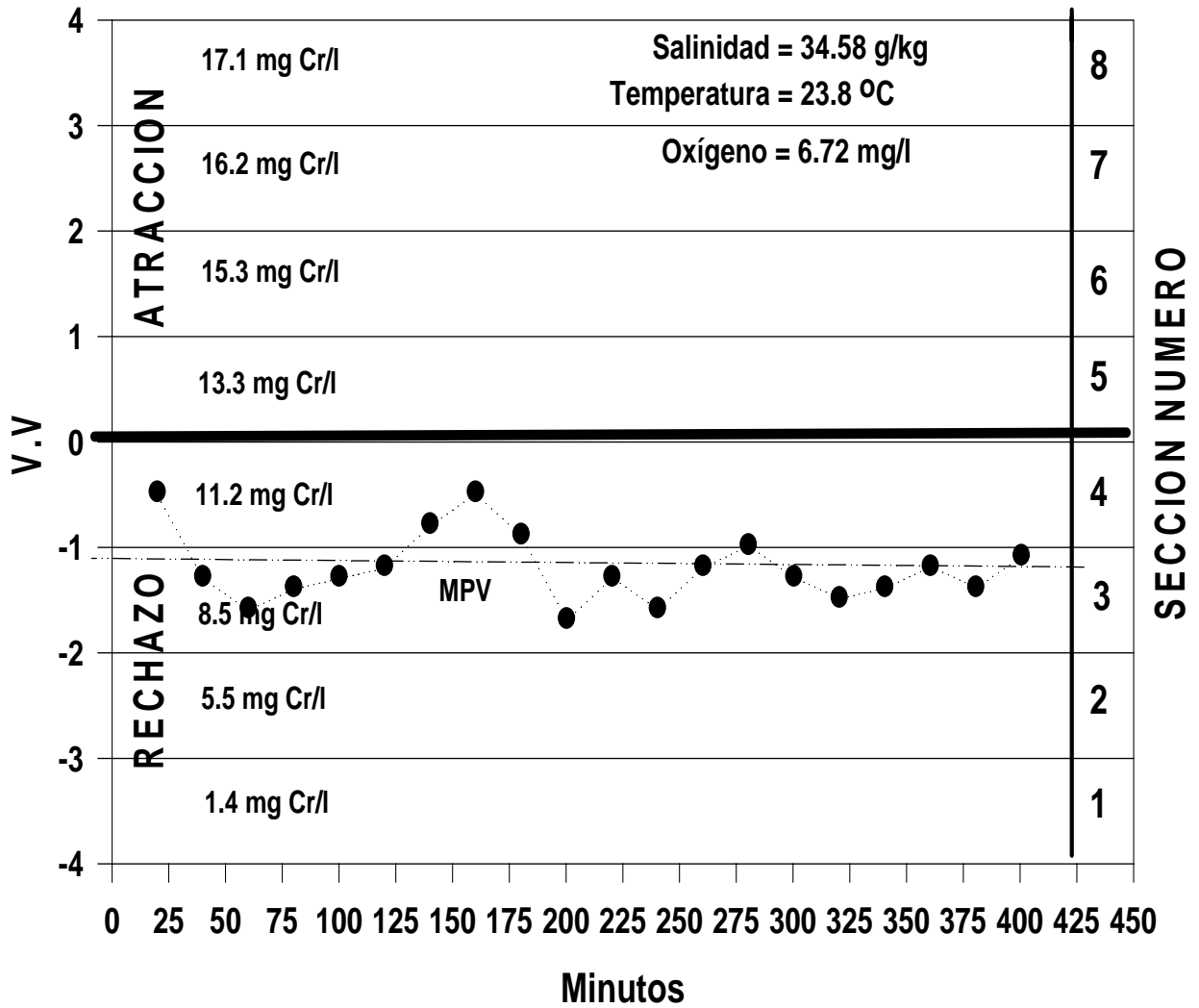
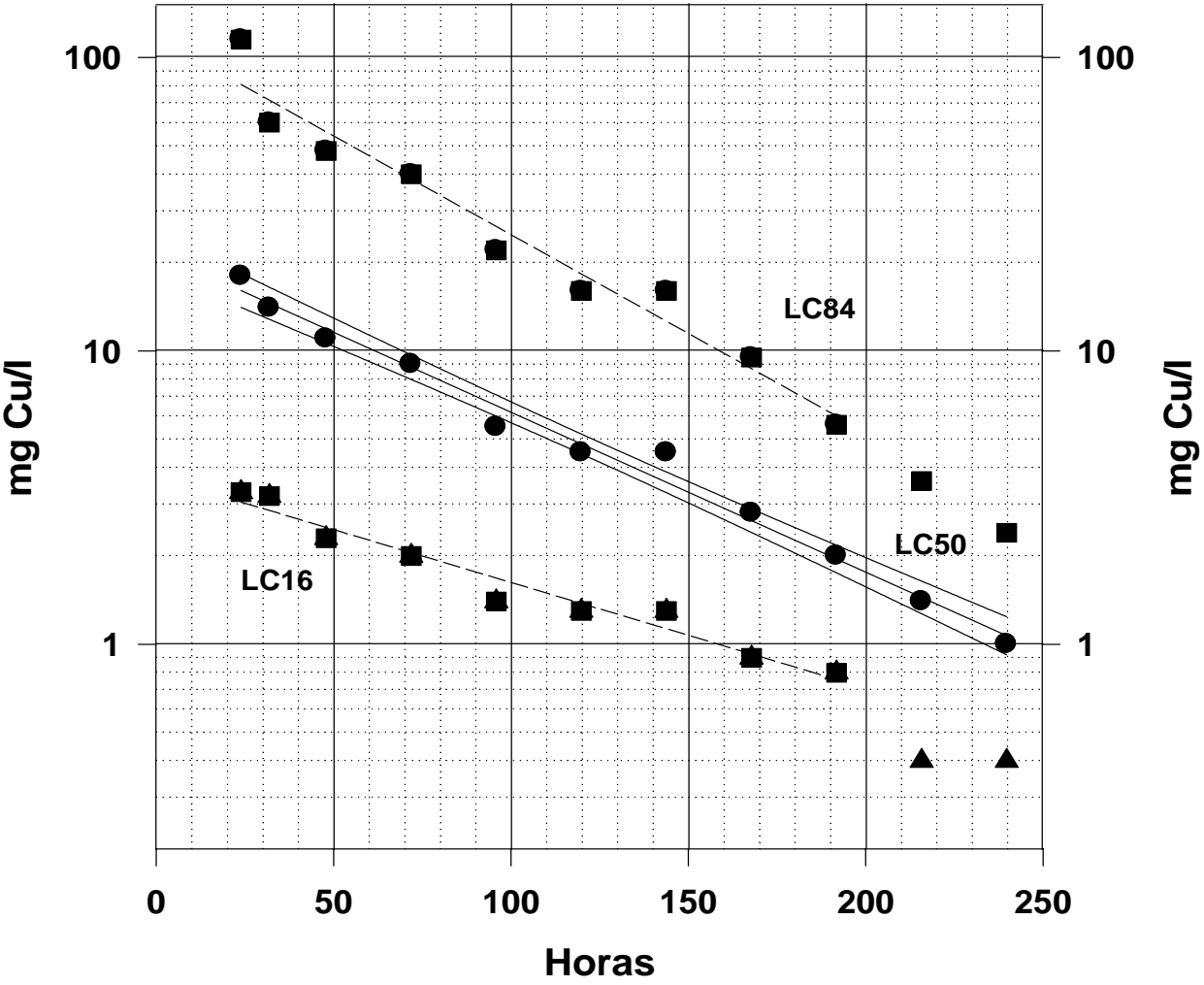


Fig. 31: Curvas de toxicidad para 50; 84 y 16 % de respuesta



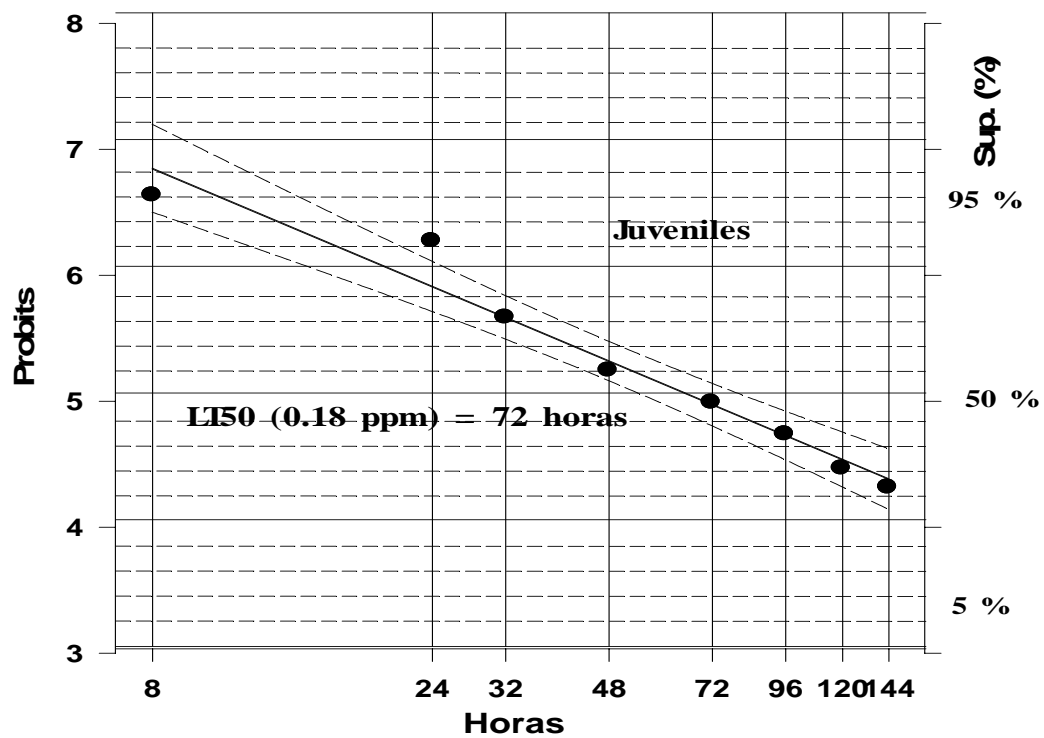


Fig. 32: Curva de toxicidad de juveniles en 0.18 mg Cu/l

Fig. 33: Concentración interna en dependencia del agua

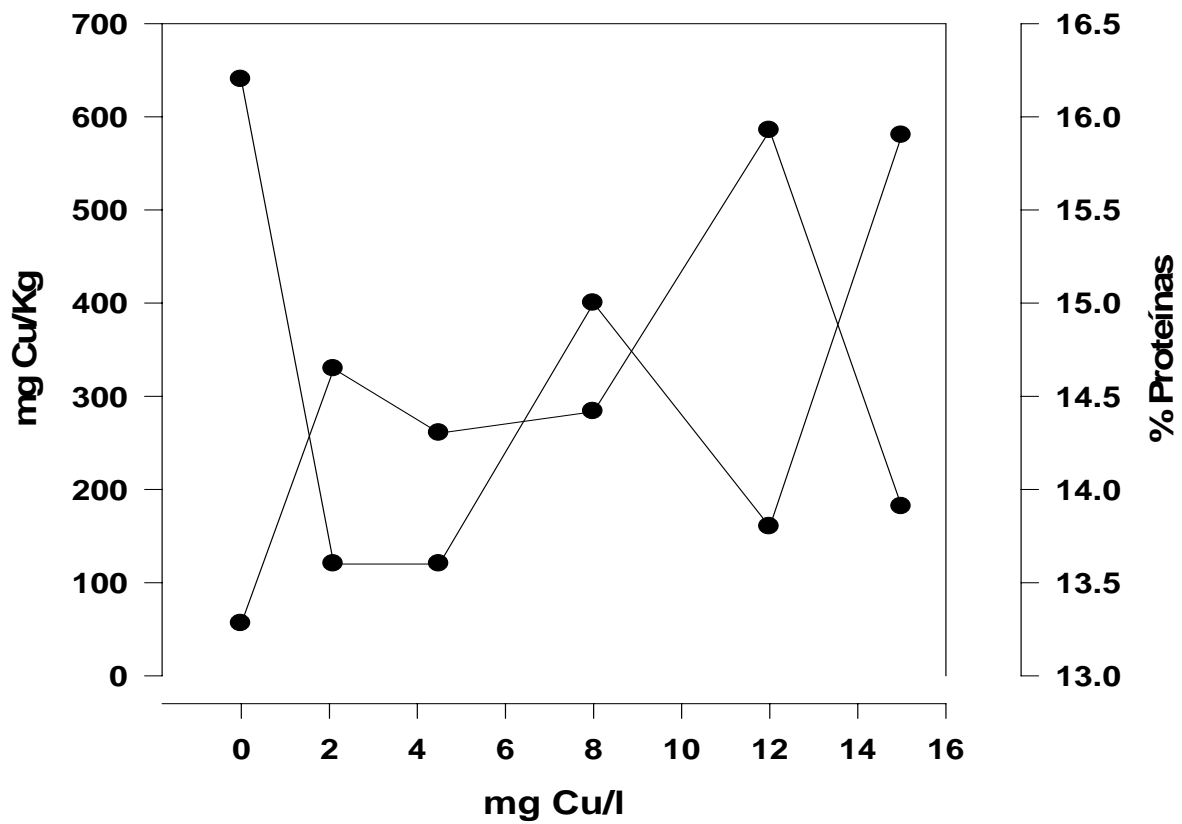


Fig. 34: LT50, perdida de actividad (PA50) y equilibrio

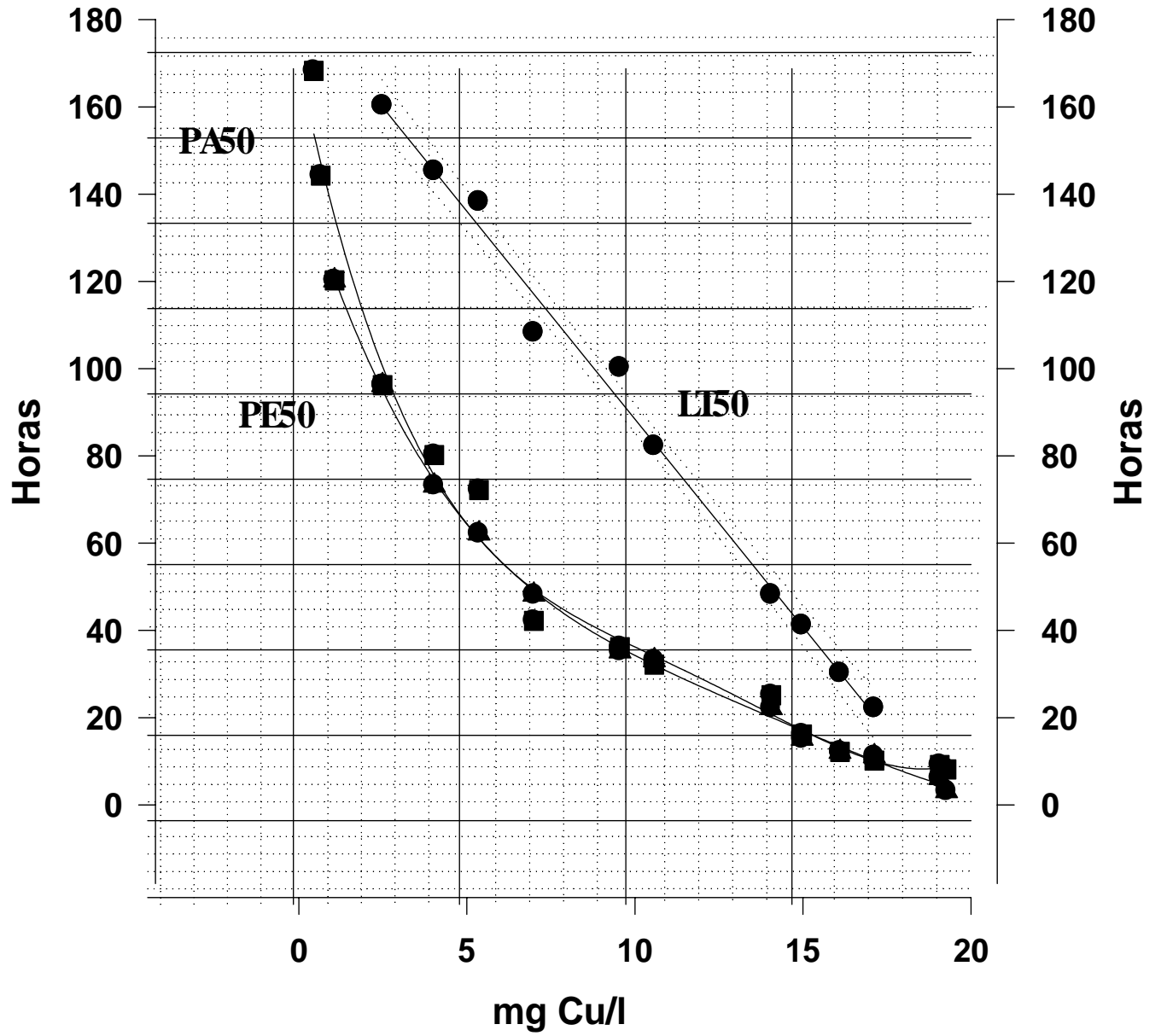
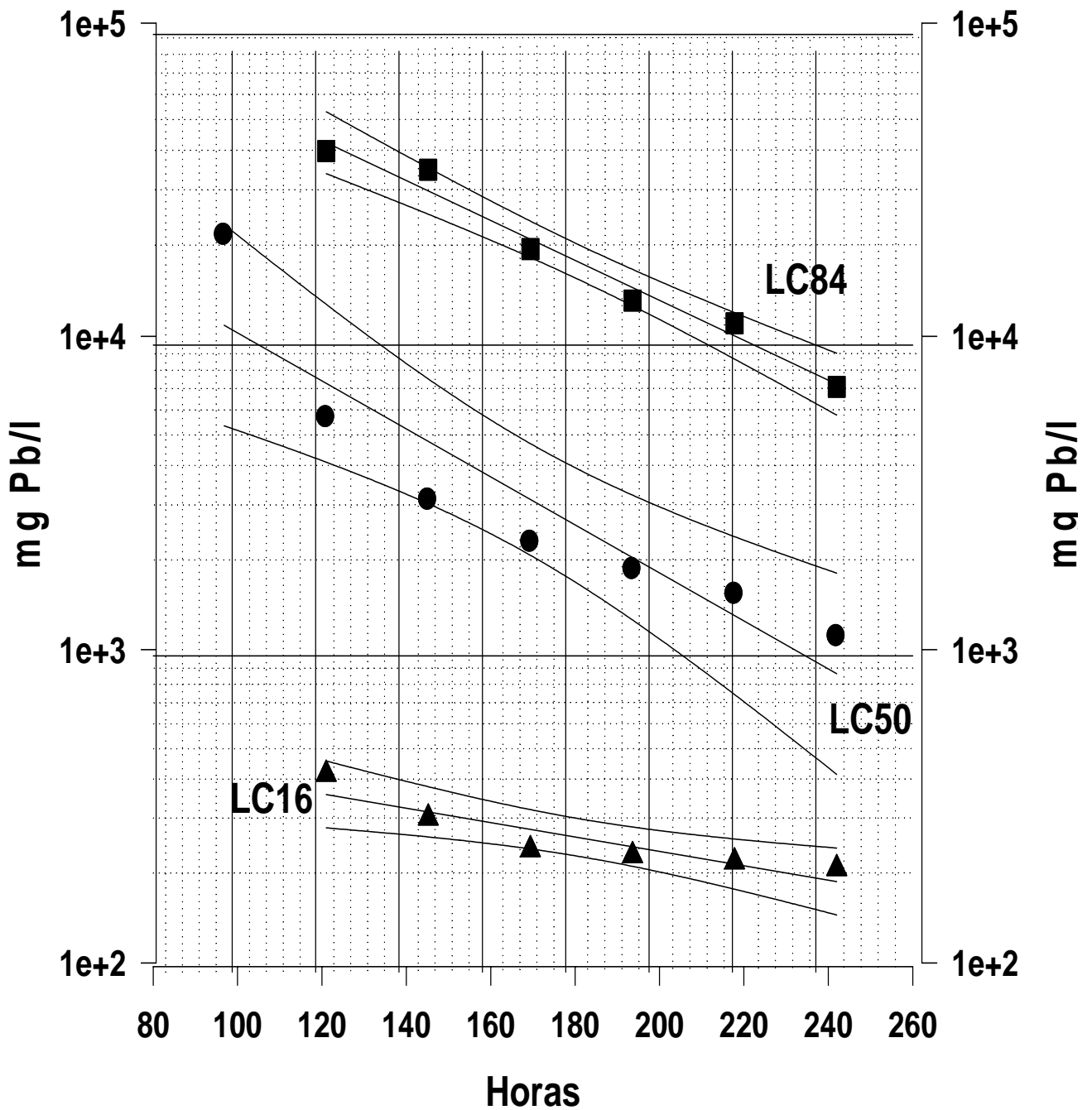


Fig. 35: Curvas de toxicidad del plomo (LC50-LC84-LC16)



**Fig. 36: Curvas de comportamiento
(Letalidad, actividad, equilibrio)**

