

1  
6384  
6UE



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**  
**Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar**



**“Pruebas de Tolerancia de juveniles de *Argopecten ventricosus*  
=*circularis* (Sowerby II, 1842) a algunos productos químicos  
utilizados en granjas camaroneras”.**

**Rubén Enrique Guerrero Arellano**

**TESIS DE GRADO**

**previa la obtención del Título de:**

**ACUICULTOR**



**2001**



**D-27039**

## **DECLARACION EXPRESA**

“La responsabilidad para los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y, el patrimonio intelectual de la misma, a la **ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL**”.

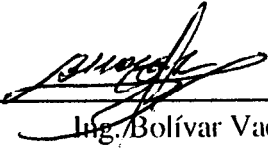
(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la **ESPOL**)

---

**Rubén Enrique Guerrero Arellano**

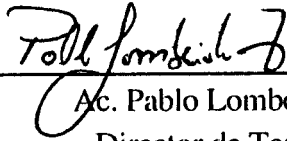
# DEDICATORIA

A mis Padres Emma y Alberto y  
a mis Hermanos.



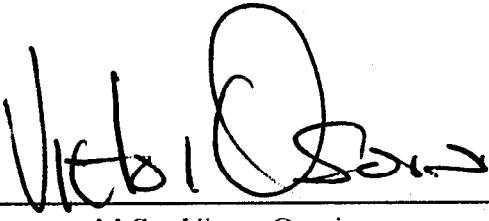
---

Ing. Bolívar Vaca  
Presidente del Tribunal



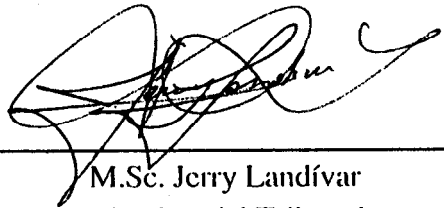
---

Ac. Pablo Lombeida  
Director de Tesis



---

M.Sc. Victor Osorio  
Miembro del Tribunal



---

M.Sc. Jerry Landívar  
Miembro del Tribunal



## AGRADECIMIENTOS

A Dios por brindarme la oportunidad de vivir, por darme la familia que tengo, por **los** padres más comprensivos del mundo.

A mis padres Emma y Alberto por darme la oportunidad de estar en este mundo, por apoyarme en todo momento y estar en todo momento conmigo. Muchas gracias papi y mami, esta Tesis va por ustedes.

A mis hermanos **Helen**, Manuel y Catalina gracias por ayudarme cuando más lo necesitaba.

Al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, a su director, Jorge Calderón V., Ph. D. por permitirme realizar esta tesis en tan prestigioso centro de investigaciones.

Al Acuicultor Pablo Lombeida por haberme dado la oportunidad de idealizar, realizar y culminar esta tesis, muchas gracias por siempre Pablito

Toda mi gratitud a todo el departamento de Moluscos, a Daniel Ortega millón gracias amigo, a Luis Viejó, Alberto García, Pedro Aquino “Periquito”, Victor Granados, **Ivan** Murillo, Darío Zambrano gracias por ser como un hermano y a **Karina** Ponce mi “**Hermanita**”.

A Constanza Erazo, muchas gracias por la paciencia, por las canciones, por ayudarme a luchar conmigo mismo y hacer realidad muchos sueños, gracias **porque** siempre estuviste aquí en cada momento. Gracias mi Compañera.

A todos mis amigos **tesistas** Eduardo R, Marcos, Anita, Eduardo C, Patricio, Leonardo, Luis, **Ivan**, **Karina**, gracias a la vida por haber encontrado grandes amigos.

A mis amigos colombianos Ingrid, Ricardo, Camilo mi otro hermano y a **Ivan** David, sé que puedo contar con ustedes siempre.

A mis compañeros de facultad por soportarme durante las clases, ustedes saben quienes son (son todos).

A Stanislaus por ayudarme con mis datos y por tus consejos.

A María Herminia Cornejo por las veces que necesité de su ayuda.

A María de Lourdes Cobo y al departamento de Fitoplancton por las algas nuestras de todos los días.

Un agradecimiento a Inge Vissers y Soraya Townsend por toda la ayuda prestada, por siempre les estaré agradecido.

Muchas gracias a todos quienes de una u otra forma me ayudaron a cumplir esta meta

A **todos** gracias, por la aventura de escalar acompañado, cada barrera que la ruta me **ha** marcado, pues yo **sólo** soy **la suma** de **todo** lo que he **pasado**.

# TABLA DE CONTENIDOS

Tabla de contenidos	ii
Abreviaturas	vii
Indice de figuras	viii
Indice de tablas	xi
Indice de fotos	xiv
Resumen	
Introducción	1
1. Antecedentes	3
1.1. Descripción de la especie	3
1.1.1. Posición taxonómica	3
1.1.2. Descripción morfológica	3
1.1.3. Hábitat	4
1.1.4. Distribución geográfica	4
1.1.5. Ciclo de vida	4
1.1.6. Aspectos ecológicos importantes	5
1.1.6.1. Depredadores	5
1.1.6.2. Competidores	5
1.1.6.3. Parasitismo	5
1.2. Aspectos Biológicos	6
1.2.1. Anatomía funcional del scallop	6
1.2.2. El Manto y sus derivados	8
1.2.2.1. Anatomía funcional	8
1.2.3. Branquias	8
1.2.4. Palpos labiales	9
1.2.5. Sistema Cardiovascular	9
1.2.5.1. Circulación general	10
El Sistema Arterial	10
El Sistema Venoso	11
1.2.5.2. El Corazón	11
1.2.5.3. Hemolinfa	12
Plasma	13



1.2.5.4.	Hemoci tos	13
1.2.6.	Sistema Excretor	14
1.2.6.1.	Riñón	14
1.2.6.2.	Glándula Pericardial (Auricular)	14
1.2.7.	Sistema Nervioso y Sensorial	15
1.2.7.1.	Ganglios Cerebro y Pedal	15
1.2.7.2.	El Ganglio Parietovisceral y sus Nervios	15
1.2.7.3.	El Nervio Circumpaleal	16
1.2.7.4.	Estructuras Sensoriales	16
	Sistema Visual	16
	Células Sensoriales Epiteliales y Tentáculos	16
	Estatoreceptores	17
1.2.7.5.	Complejo Pie-Bisus	17
	Morfología externa y desarrollo del complejo Pie-Bisus	17
	El Biso	18
1.3.	Test de Toxicidad	18
1.3.1.	Diferentes pruebas de renovación de soluciones	19
1.3.2.	Pruebas de toxicidad en laboratorio	19
1.3.2.1.	Prueba de toxicidad aguda	19
1.3.2.2.	Prueba de toxicidad crónica	21
1.3.2.3.	Terminología	22
	<b>Materiales y Métodos</b>	24
2.1	Metodología de experimentos de Toxicología	24
2.1.1.	Recepción y mantenimiento de la semilla	24
2.1.2.	Ensayo de Toxicidad Aguda	25
2.1.3.	Ensayo de Toxicidad Crónica	26
2.2	Preparaciones de soluciones patrón y concentraciones usadas	27
2.2.1.	Pruebas Preliminares	27
2.2.2.	Ensayo con Carbonato de Calcio	28
2.2.3.	Ensayo con Hidróxido de Calcio	29
2.2.4.	Ensayo con Amonio	29
2.2.5.	Ensayo con Rotenona (Predatox®)	30

2.2.6. Ensayo con Urea	30	
2.2.7. Ensayo con Hipoclorito de Calcio (Cloro HTH)	30	
2.3. Ensayo de Toxicidad Crónica	31	
2.3.1. Preparación de solución patrón y concentraciones usadas	31	
2.3.1.1. Carbonato de Calcio	31	
2.3.1.2. Hidróxido de Calcio	31	
2.3.1.3. Amonio	31	
2.3.1.4. Rotenona	31	
2.4. Distribución de los beakers en el set (Tratamientos y Réplicas)	32	
2.5. Análisis Estadístico	33	
3. Resultados	34	
3.1. Prueba de Toxicidad Aguda	34	
3.1.1. Carbonato de Calcio	34	
3.1.2. Hidróxido de Calcio	35	
3.1.3. Amonio	37	
3.1.4. Rotenona	39	
3.1.5. Cloro	41	
3.1.6. Urea	43	
3.2. Prueba de Toxicidad Crónica	45	
3.2.1. Carbonato de Calcio	4	5
3.2.2. Hidróxido de Calcio	46	
3.2.3. Amonio	48	
3.2.4. Rotenona	50	
4. Discusión	52	
4.1. Pruebas con Carbonato de Calcio	52	
4.2. Pruebas con Hidróxido de Calcio	53	
4.3. Pruebas con Cloruro de Amonio	54	
4.4. Pruebas con Rotenona	55	
4.5. Pruebas con Hipoclorito de Calcio	56	
4.6. Pruebas con Urea	57	



Conclusiones	59
Recomendaciones	61
Referencias bibliográficas	62
Anexos	67

## ABREVIATURAS

CNA	Cámara Nacional de Acuicultura
$\text{Ca(OH)}_2$	Hidróxido de calcio
caco,	Carbonato de calcio
cel	células
CENAIM	Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas
$\phi$	diámetro
desv. stand.	desviación estándar
EC	Concentración Efectiva
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FDA	Food and Drug Administration
g	gramos
h	Hora
ha	hectárea
HTH	High test hypochlorite
IHHNV	Infection Hipodermal & Hematopietyc Necrosis Virus
kg	kilogramo
l	litro
LC	Concentración Letal
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration
LT	Tiempo Letal
mg	miligramos
ml	mililitros
mm	milímetros
$\mu\text{l}$	microlitros
$\mu\text{m}$	micrometros
$\text{NH}_3$	Amonio no ionizado (Amoníaco)

<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	<b>Amonio Ionizado(Amonio)</b>
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	<b>Nitritos</b>
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	<b>Ni tratos</b>
<b>NOEC</b>	<b>No observed effect concentration</b>
<b>OD</b>	<b>Oxígeno Disuelto</b>
<b>PH</b>	<b>Potencial de Hidrógeno</b>
<b>ppb</b>	<b>partes por billión</b>
<b>ppm</b>	<b>partes por millón</b>
<b>TSV</b>	<b>Taura Sindrom Virus</b>
<b>w s s v</b>	<b>White Spot Sydrom Virus</b>
<b>°C</b>	<b>grado Celsius</b>

## INDICE DE FIGURAS

Fig 1	Vista de los beakers y del Set Experimental para Urea y Cloro	25
Fig 2	Vista de los beakers para los ensayos de toxicidad crónica	26
Fig 3.	Registro del pH durante la exposición a Carbonato de calcio	67
Fig 4	Registro de la temperatura durante la exposición a Carbonato de calcio.	67
Fig 5	Registro de la concentración de oxígeno en los beakers durante la exposición a Carbonato de calcio	67
Fig 6	Registro de la temperatura en los beakers durante el segundo experimento con Carbonato de calcio	68
Fig 7	Registro de la concentración de oxígeno disuelto durante la exposición a Carbonato de calcio	68
Fig 8	Registro del pH durante la exposición a Carbonato de calcio	68
Fig 9	Registro de la concentración de oxígeno disuelto durante la exposición a Hidróxido de calcio	69
Fig 10	Registro del pH durante la exposición a Hidróxido de calcio	69
Fig 11	Curva de Mortalidad del Test Agudo con Hidróxido de Calcio a diferentes concentraciones	36
Fig 12	Registro de la temperatura durante la exposición a Cloruro de amonio	69
Fig 13	Registro de la concentración de oxígeno disuelto durante la exposición a Cloruro de amonio	70
Fig 14	Registro del pH durante la exposición a Cloruro de amonio	70
Fig 15	Curva de Mortalidad del Test Agudo con Cloruro de Amonio	38
Fig 16	Curva de Mortalidad del Test Agudo con Rotenona	40
Pig 17	Registro de la temperatura durante la exposición a Rotenona	70
Fig 18	Registro de Oxígeno disuelto durante la exposición a Rotenona	71
Fig 19	Registro del pH durante la exposición a Rotenona	71
Fig 20	Curva de Mortalidad del Test Agudo con Hipoclorito de Calcio (HTH)	43
Fig 21	Registro de la temperatura durante la exposición al Hipoclorito de calcio	71

<b>Fig 22 Registro de la concentración de oxígeno disuelto durante la exposición al Hipoclorito de calcio</b>	<b>72</b>
<b>Fig 23 Registro de la temperatura durante la exposición a Urea</b>	<b>72</b>
<b>Fig 24 Registro de la concentración de oxígeno disuelto durante la exposición a Urea</b>	<b>72</b>
<b>Fig 25 Sobrevivencia de los scallops en el test de toxicidad crónica con Carbonato de Calcio a diferentes concentraciones</b>	<b>45</b>
<b>Fig 26 Cuadro de los incrementos de altura <math>\pm</math>desv.stand.</b>	<b>46</b>
<b>Fig 27 Promediofdesv. stand. de la concentración de oxígeno disuelto durante el experimento con Carbonato de calcio</b>	<b>73</b>
<b>Fig 28 Promediokdesv. stand. de la temperatura durante el experimento con Carbonato de calcio</b>	<b>73</b>
<b>Fig 29 Gráficos de porcentaje de fijación vs tiempo utilizando Carbonato de Calcio</b>	<b>83</b>
<b>Fig 30 Cuadro de los incrementos de altura <math>\pm</math>desv.stand, bajo la acción de Hidróxido de calcio.</b>	<b>47</b>
<b>de Calcio a diferentes concentraciones</b>	<b>4</b>
<b>Fig 3 1 Sobrevivencia de los scallops en el test de toxicidad crónica con Hidróxido de Calcio a diferentes concentraciones</b>	<b>47</b>
<b>Fig 32 Promediokdesv. stand. de la temperatura durante el experimento con Hidroxido de calcio</b>	<b>73</b>
<b>Fig 33 Promediokdesv. stand. de la concentración de oxígeno disuelto durante el experimento con Hidroxido de calcio</b>	<b>74</b>
<b>Fig 34 Gráficos de porcentaje de fijación vs tiempo utilizando Cal-P24</b>	<b>83</b>
<b>Fig 35 Sobrevivencia de los scallops en el test de toxicidad crónica con Cloruro de amonio a diferentes concentraciones</b>	<b>48</b>
<b>Fig 36 Cuadro de los incrementos de altura <math>\pm</math>desv.stand, bajo la acción de Cloruro de amonio.</b>	<b>49</b>

<b>Fig 37 Promedio<math>\pm</math>desv. stand. de la temperatura durante el experimento con Cloruro de amonio</b>	<b>74</b>
<b>Fig 38 Promedio<math>\pm</math>desv. stand. de la concentración de oxígeno disuelto durante el experimento con Cloruro de amonio</b>	<b>74</b>
<b>Fig 39 Gráficos de porcentaje de fijación vs tiempo utilizando Cloruro de amonio</b>	<b>85</b>
<b>Fig 40 Promedio<math>\pm</math>desv. stand. de la temperatura durante el experimento con Rotenona</b>	<b>75</b>
<b>Fig 41 Promedio<math>\pm</math>desv. stand. de la concentración de oxígeno disuelto durante el experimento con Rotenona</b>	<b>75</b>
<b>Fig 42 Cuadro de los incrementos de altura <math>\pm</math>desv. stand, bajo la acción de Rotenona</b>	<b>50</b>
<b>Fig 43 Sobrevivencia de los scallops en el test de toxicidad crónica con Rotenona a diferentes concentraciones</b>	<b>51</b>
<b>Fig 44 Efectos del pH sobre la proporción relativa de HOCl y OCl</b>	<b>76</b>
<b>Fig 45 Efecto del pH en estanques de peces de agua caliente</b>	<b>76</b>

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación de Toxicidad según la concentración	20
Tabla 2	Porcentaje de camaronas que utilizan carbonato, hidróxido, urea y analizan la concentración de amonio en su producción.	27
Tabla 3	Ordenamiento de los tratamientos y réplicas durante el primer experimento con Carbonato de Calcio	77
Tabla 4	Ordenamiento de los tratamientos y réplicas durante el segundo experimento con Carbonato de Calcio	77
Tabla 5	Ordenamiento de los tratamientos y réplicas durante el experimento con hidróxido de Calcio	77
Tabla 6	Ordenamiento de los tratamientos y réplicas durante el experimento con Cloruro de Amonio	78
Tabla 7	Ordenamiento de los tratamientos y réplicas durante el experimento con Rotenona	78
Tabla 8	Ordenamiento de los tratamientos y réplicas durante el experimento con Urea	78
Tabla 9	Ordenamiento de los tratamientos y réplicas durante el experimento con Cloro HTH (Hipoclorito de Calcio)	79
Tabla 10	Ordenamiento de los tratamientos y réplicas durante el experimento con Carbonato de Calcio	79
Tabla 11	Ordenamiento de los tratamientos y réplicas durante el experimento con Hidróxido de Calcio	79
Tabla 12	Ordenamiento de los tratamientos y réplicas durante el experimento con Cloruro de Amonio	80
Tabla 13	Ordenamiento de los tratamientos y réplicas durante el experimento con Rotenona	80
Tabla 14	Porcentajes de Mortalidad durante el primer ensayo de Carbonato de Calcio	34

Tabla 15	Porcentajes de Mortalidad durante el segundo ensayo de Carbonato de Calcio	34
Tabla 16	Porcentajes de Mortalidad durante el ensayo con Hidróxido de Calcio	35
Tabla 17	Resultados del análisis Spearman-Karber en distintos tiempos para Hidróxido de Calcio	37
Tabla 18	Porcentaje de mortalidad durante el ensayo de Cloruro de Amonio después de varios periodos de exposición	38
Tabla 19	Resultados del análisis Spearman-Karber en distintos tiempos para Cloruro de amonio	39
Tabla 20	Porcentaje de mortalidad durante el ensayo de Rotenona después de varios periodos de exposición	40
Tabla 21	Resultados del análisis Spearman-Karber en distintos tiempos para Rotenona	41
Tabla 22	Porcentaje de mortalidad durante el ensayo de Hipoclorito de Calcio (HTH) después de varios periodos de exposición	42
Tabla 23	Resultados del análisis Spearman-Karber en distintos tiempos para Hipoclorito de calcio	43
Tabla 24	Porcentaje de mortalidad durante el ensayo con Urea después de varios periodos de exposición	44
Tabla 25	Número de animales fijados, animales totales y porcentaje de fijación diario usando Carbonato de Calcio	81
Tabla 26	Número de animales fijados, animales totales y porcentaje de fijación diario usando Cal-P24	82
Tabla 27	Número de animales fijados, animales totales y porcentaje de fijación diario usando Cloruro de amonio	84
Tabla 28	Número de animales fijados, animales totales y porcentaje de fijación diario usando Rotenona	86
Tabla 29	Análisis ANOVA de las mortalidades del ensayo de toxicidad	



	crónica de Carbonato de calcio	87
Tabla 30	Análisis ANOVA de las tallas del ensayo de toxicidad crónica de Carbonato de calcio	88
Tabla 31	Análisis ANOVA de las mortalidades del ensayo de toxicidad crónica de Hidróxido de calcio	89
Tabla 32	Análisis ANOVA de las tallas del ensayo de toxicidad crónica de Hidróxido de calcio	90
Tabla 33	Análisis ANOVA de las mortalidades del ensayo de toxicidad crónica de Cloruro de amonio	91
Tabla 34	Análisis ANOVA de las tallas del ensayo de toxicidad crónica de Cloruro de amonio	92
Tabla 35	Análisis ANOVA de las de las mortalidades del ensayo de toxicidad crónica de Rotenona	93
Tabla 36	Análisis ANOVA de las tallas del ensayo de toxicidad crónica de Rotenona	94

**INDICE DE FOTOS**

Foto 1	Branquias en buen estado	95
Foto 2	Pedúnculo ocular bueno	95
Foto 3	Vista general del Músculo Aductor	96
Foto 4	Necrosis en el Pedúnculo Ocular	96
Foto 5	Ojos y tentáculos co Necrosis	97
Foto 6	Necrosis en el borde del manto	97
Foto 7 y 8	Necrosis en branquias	98
Foto 9	Manto y ojos con necrosis	99
Foto 10	Manto en buen estado	99

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fué conocer los límites de tolerancia del scallop y saber si puede adaptarse a las condiciones de cultivo normales en una piscina con camarones, sin interferir en las prácticas de manejo rutinarias tales como: fertilizado y tratamientos químicos que generahnente se administran en el agua y/o suelo de cada piscina dependiendo de la situación, y sobre todo establecer **una** concentración mínima en la cual este bivalvo pueda desarrollarse normalmente.

Se llevó a cabo esta experimentación tomando **como** base **la** información **obtenida** por el CENAIM durante un monitoreo a camaroneras de la provincia del Guayas y de El Oro hasta el año de 1997; los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Carbonato de Calcio, no es tóxico para el scallop y no provocan un efecto negativo en el crecimiento y/o fijación.

El Hidróxido de Calcio (Cal P24) concentración letal obtenida para 96 horas: 64,58 mg/l y límite máximo de tolerancia 30 ppm, esta sustancia provoca daños en manto, ojos y tentáculos.

Para Cloruro de Amonio (Amonio Total) concentración letal de 5,13 ppm y límite máximo de tolerancia 2 ppm Amonio total, expuesto a concentraciones prolongadas se observan daños en branquias, ojos y manto.

Rotenona (Predatox) concentración letal de 89,72 ppb de Rotenona, límite máximo de tolerancia 28 ppb, expuesto a períodos prolongados disminuye el crecimiento y la capacidad de fijación.

Hipoclorito de Calcio (Cloro HTH) concentración letal de 2,97 ppm de cloro, límite de tolerancia 1,8 ppm.

Por último la Urca, no mostró toxicidad en las 96 horas que duró la prueba.

Todas estas sustancias son utilizadas regularmente en los cultivos de camarón, en concentraciones que no lo afectan, pero que podrían afectar el desarrollo de los scallops.

La clasificación de las sustancias de acuerdo al grado de toxicidad queda de la siguiente manera: Rotenona, Hipoclorito de calcio, Cloruro de amonio, Hidróxido de calcio, Urea y Carbonato de calcio.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. DESCRIPCION DE LA ESPECIE

#### 1.1.1. Posición taxonómica

Reino	<i>Animalia</i>
Phyllum	<i>Mollusca</i>
Clase	<i>Pelecypoda</i>
Subclase	<i>Pteriomorpha</i>
Orden	<i>Pteriodea</i>
Superfamilia	<i>Pectinacea</i>
Familia	<i>Pectinidae</i>
Género	<i>Argopecten (Monterosato,1889)</i>
Especie	<i>circularis (Sowerby,1835)</i> <i>ventricosus (Sowerby II, 1842)</i>
NOMBRE CIENTIFICO	<i>Argopecten ventricosus</i>
NOMBRE COMUN	<b>Almeja catarina</b>

#### 1.1.2. Descripción Morfológica

La almeja catarina, concha abanico o viera es un bivalvo de talla mediana; de forma orbicular; gruesa y convexa. Se encuentra formada por 20 - 22 costillas radiales; en la valva izquierda éstas son angostas, separadas por amplios interespacios cubiertos por finas lamelas concéntricas de crecimiento; en la valva derecha las costillas son anchas, rectangulares y aplanadas con interespacios angostos y profundos.

Externamente el color es variable, la valva izquierda casi siempre más oscura que la derecha con manchas rojo-púrpura a café; la valva derecha generalmente de un solo color ya sea amarillo, blanco, rosado o jaspeado con líneas en V invertida de color café oscuro.

La valva derecha tiene la cara interna blanca y la valva izquierda presenta manchas cafés o violeta en la cavidad del umbo y en las aurículas. Su longitud es de 45.0 mm, y de alto 42.02 mm (Vicencio *et.al.*, 1988), aunque, se han encontrado ejemplares pequeños de 32 mm a 18.5 mm de largo y 3.6 mm a 19.0 mm de alto.

### 1.1.3. Hábitat

Habita en aguas profundas entre 20 y 40 metros y sobre un sustrato mixto, areno-fangoso, fangoso, arena gruesa o sobre rocas asociadas con algas, corales o gorgonias. Es una especie que se alimenta de fitoplancton y detritus.

### 1.1.4. Distribución geográfica

Esta especie se la encuentra desde la Isla de Cedros en Baja California Sur hasta Perú (Vicencio *et.al.*, 1988). En la costa ecuatoriana está presente en toda su extensión, desde Esmeraldas pasando por Puerto Cayo, Salango, Península de Santa Elena y Playas donde se han encontrado bancos naturales (Mora E., 1990).

### 1.1.5. Ciclo de vida

Esta especie es hermafrodita y cuando alcanza el estado máximo de madurez expulsa sus productos sexuales al medio; en primer lugar los espermios, estimulando de esta forma el desove de la parte femenina, ocurre la fecundidad y se forman pequeñas larvas

planctónicas por espacio de 14-20 días, luego sufren una metamorfosis (aproximadamente 1-2 mm) que las hace precipitarse hasta el fondo y buscar un sustrato al cual adherirse mediante el byso, a partir de ese momento la almeja mantiene la forma de un adulto.

#### 1.1.6. Aspectos ecológicos importantes

##### 1.1.6.1. Depredadores

Entre los organismos que son considerados como depredadores en el medio natural tenemos a peces, i-ayas, jaibas, pulpos y estrellas de mar.

##### 1.1.6.2. Competidores

Esto se da tanto por alimento como por espacio con todos los moluscos bentónicos filtradores, además de barnacles (*Balanus sp.*), hidroides, algas, que son organismos denominados organismos marinos de “fouling”.

##### 1.1.6.3. Parasitismo

Existe referencia de que en almejas adultas de la zona norte de Baja California Sur, aloja un nemátodo (*Echinocephalus pseudouncinatus*) “Oyster drills”, que se hospeda dentro del músculo aductor o callo. En casos extremos, este nemátodo puede debilitar el callo y causar la tuerca de la almeja, aunque no se ha detectado que pudiera ser dañino al hombre en caso de consumirlo.

Las bacterias coliformes también están presentes en cultivos de esta especie, siendo aconsejable tener conteos de bacterias dentro de los límites permisibles para poder ser consumidos por el hombre.

## 1.2. ASPECTOS BIOLÓGICOS

### 1.2.1. Anatomía funcional del scallop

La familia pectinidae exhibe uno de los mayores grados de diferenciación anatómica entre los bivalvos.

Las caras internas de las valvas están cubiertas por un manto transparente y muy delgado, el cual se engrosa y divide en el interior en varios dobleces en el margen de la concha. La parte más evidente de esos dobleces es la cortina del manto, o velum, el cual controla la salida del agua entre las valvas bajo condiciones normales y durante el nado. El margen del manto lleva un gran y variable número de ojos y tentáculos sensoriales.

Los pectinidos son bivalvos monomiarios, por esta razón solamente poseen un gran músculo aductor posterior que está situado cerca del centro de la concha. Esto sirve como un punto de referencia conveniente para las otras partes del cuerpo.

El corazón está contenido dentro de un pericardio transparente y fino, inmediatamente dorsal y ligeramente posterior al músculo aductor. Está formado de 2 aurículas y un solo y gran ventrículo desde el cual se extiende una aorta anterior, mientras que la aorta posterior surge del ventrículo y se curva alrededor del margen ventral del músculo aductor. Esos dos vasos se ramifican para formar el Sistema Arterial Periférico. El Sistema Venoso está principalmente compuesto de un número de sinus desde el cual la sangre fluye de los riñones hacia las branquias. La sangre de las branquias ingresa a la correspondiente aurícula derecha o izquierda por un vaso branquial aferente.

Los riñones pareados están adheridos directamente al margen anterior del músculo aductor. Estos se abren internamente dentro de la región anterior de la cavidad pericardial y externamente dentro del poro urogenital común en su extremo ventral.



Las **gónadas de los scallops** maduros también están adheridos al margen anterior del músculo aductor, cubriendo los riñones. Estos rodean el margen ventral del músculo aductor, donde **no están** adheridos. En **algunas** especies, como *Himmites multirugosus* y *Placopecten magellanicus*, el tejido gonadal puede extenderse dorsalmente dentro de los palpos labiales, glándula digestiva o manto desde la terminación anterior.

El pie y su complejo bisal asociado surge de la extremidad anterodorsal de la gónada, está adherido a la concha izquierda por **un solo** músculo retractor pedal, el cual está variablemente desarrollado en diferentes especies.

Ventral a las gónadas están dos grandes branquias, adheridas al músculo aductor por medio de membranas suspensorias sobre las inserciones derecha e izquierda del músculo en la concha. Las branquias relajadas, siguen la curvatura del margen de la concha, desde el nivel postero-dorsal del músculo aductor hasta un punto ventral al margen anterior de la charnela. Cada extremidad anterior de la branquia está envuelta en las caras derecha e izquierda por los palpos labiales, los cuales están plegados hasta formar el aparato labial dorsal y ventral cubriendo la boca.

El esófago conduce directamente al estómago que está situado junto **con la glándula** digestiva ventral al condróforo. Después de varias vueltas, el intestino sale del estómago y la glándula digestiva posteriormente, desciende ventralmente e ingresa la gónada en su extremidad más antero-dorsal. Después de girar por la gónada, el intestino se curva alrededor de la porción dorsal del músculo **aductor y sube hacia la charnela, desciende** ventralmente y transversal al pericardio y ventrículo.

La porción distal del intestino está adherido a la **cara** posterior del músculo aductor llegando a estar libre en la región del recto y ano.

## 1.2.2 El Manto y sus derivados

El manto de los scallops es un integumento ciliado, el cual interviene en varias funciones: secreción de la concha y ligamento, así como la circulación de agua y movimiento de partículas con la cavidad palial en el animal sedentario y durante el nado.

### 1.2.2.1 Anatomía funcional

El manto está compuesto de 2 lóbulos, izquierdo y derecho respectivamente, los cuales están continuos a través del dorso y conectados muy cerca del músculo aductor, glándula digestiva y pericardio, separados de la masa visceral en la base de las branquias, encerrando la gran cavidad palial ventral. **En** el margen del manto se encuentran varios pliegues y surcos incluido los numerosos ojos y tentáculos.

Los bordes libres de los lóbulos del manto son bien desarrollados y divididos en 3 pliegues y 2 surcos o canales. Empezando con la formación más externa, es posible identificar los siguientes:

- **Un** Pliegue Externo o de la Concha, subdividido en un Pliegue Primario, un Canal Periostracal y un Pliegue Secundario;
- un Canal Externo;
- un Pliegue Medio o Sensorial;
- un **Canal** Interno, y
- un Pliegue Interno o Velar.

## 1.2.3. Branquias

Las branquias de los scallops tienen forma de W, cada una (izquierda y derecha) abarca una demibranchia interna y externa, están compuestas de dos tipos diferentes de

filamentos, suspendidos del eje branquial de una manera ondulada. Los filamentos principales están situados en el canal de las ondulaciones, separadas de otros por un número variable ( 11 - 20) de filamentos ordinarios.

#### 1.2.4. Palpos Labiales

Los palpos labiales de los scallops son similares a aquellos bivalvos no protobranquios, consisten de un par de tejidos de cubierta derecho e izquierdo, en el cual la terminación anterior de las branquias están insertadas en una configuración clasificada como categoría III. Las dos caras superficiales de la branquias consiste de un epitelio ciliado organizado en una serie de canales y elevaciones, orientados en ángulo recto a la branquia, cada elevación contiene un borde secundario.

En secciones histológicas, mucocitos alargados pueden encontrarse esparcidos entre las células ciliadas. a menudo en grupos de dos o tres justo encima del borde secundario. En la base de las superficies internas está un surco oral ciliado dirigido anteriormente a la boca. Las superficies externas ("liso") de los palpos poseen penachos de cilios aislados. Un gran número de mucocitos globosos típicos se han encontrado en este epitelio. Entre las superficies onduladas y suaves se ha encontrado un tejido músculo-conectivo vesicular, con el cual numerosos hemocitos pueden ser observados.

#### 1.2.5. Sistema Cardiovascular

Como en todos los bivalvos el sistema circulatorio de los pectinidos se dice que es abierto, puesto que la hemolinfa es colectada mayormente en un número de sinuses bien desarrollados.

### 1.2.5. 1. Circulación General

La circulación general puede ser dividida en un sistema arterial y otro venoso.

#### El Sistema Arterial

Dos vasos principales constituyen los elementos centrales del sistema arterial: las aortas anterior y posterior.

La aorta anterior suministra a la mayoría de la masa visceral y es así el más complejo de los dos sistemas de vasos. Este proviene del margen más dorsal del ventrículo y gira dorsalmente alrededor de la glándula digestiva. Casi inmediatamente después de salir del ventrículo, éste da una branca derecha e izquierda las que suministran sangre a la glándula digestiva; estas son visibles en la superficie de la glándula y ellas empiezan a ramificarse e ingresar a la glándula.

Desde la glándula digestiva, la aorta emite una ramificación que pasa anteriormente para suministrar el labio dorsal y los palpos labiales externos. Como la aorta continúa ventralmente con la glándula, esto da origen a otra ramificación la cual se dirige ventroanteriormente y gira dorsalmente dentro del pie.

La aorta sigue en dirección ventral, corre posteriormente a la glándula digestiva, dividiéndose en tres vasos desde la gónada, suministrando a la gónada y al intestino. La aorta posterior, principalmente suministra al rectum, al músculo aductor y los dos lóbulos del manto.

## El Sistema Venoso

Además de los vasos sanguíneos, el sistema venoso comprende un número de sinuses que colectan la sangre desde varias partes del cuerpo. Esos sinuses están localizados a lo largo del margen del músculo aductor.

Una gran vena hepática corre ventrahmente hasta unirse a la vena pedal en un seno dorsal, localizado entre el pericardio y el músculo aductor. La sangre venosa desde el músculo fluye dentro del sinus, comunicándose con la extremidades dorsales de los riñones izquierdo y derecho.



Gran parte de la sangre del intestino y la masa visceral fluyen a través de venas en la superficie de la gónada hacia las caras externas de los riñones, donde las venas se comunican con los pequeños vasos de los riñones.



En resumen, toda la sangre que retorna hasta aquí descrita pasa dentro de los riñones. De allí la sangre fluye hacia los vasos branquiales aferentes izquierdo y derecho en los respectivos ejes branquiales. Después de circular en las branquias, la sangre se une en los vasos branquiales aferentes con los ejes branquiales izquierdo y derecho. Esos vasos continúan dorsalmente entre la glándula digestiva y el músculo aductor, abriéndose dentro de los ápices de las aurículas. Las venas paliales izquierda y derecha se unen en el correspondiente vaso branquial eferente justo antes de entrar en las aurículas izquierda y derecha.

### 1.2.5.2. El Corazón

Las almejas poseen un corazón típico en bivalvos compuesto por dos aurículas y un ventrículo.



El ventrículo es una cámara de paredes lisas con una morfología algo compleja. El recto pasa a través de la porción central del ventrículo que tiene forma de saco, mientras que sobre cualquier cara se unen las aurículas correspondientes en dos sacos, creando así una cámara con tres compartimentos **incompletamente** separados. También existe un **esfínter** muscular o válvulas entre las aurículas y el ventrículo; esas estructuras presuntamente aseguran el flujo de sangre en una dirección desde las aurículas hasta el ventrículo.

**La** cámara del ventrículo está atravesada por numerosas fibras musculares. Esta disposición, también encontrada en las aurículas, es responsable del grado de contracción del corazón.

La estructura interna de las aurículas se parecen al del ventrículo, con fibras musculares entrecruzadas y numerosas lagunas. Las paredes de las aurículas difieren de las del ventrículo, y han sido implicadas en dos tipos de funciones excretoras.

### 1.2.5.3. Hemolinfa

La **hemolinfa** de los bivalvos participa en varias funciones fisiológicas como intercambio de gases, osmorregulación, distribución de nutrientes, eliminación de desechos y defensa interna, además sirve como un esqueleto **hidrostático**, tal como en el movimiento del aparato labial, tentáculos, pie y margen del manto.

La mayoría de los bivalvos carecen de pigmento respiratorio. El **hábito** de vida sedentaria, la enorme superficie del cuerpo expuesta y el hábitat epibéntico de la almeja probablemente obvian la necesidad de pigmentos respiratorios.

## Plasma

La concentración de  $K^+$  plasmático en los bivalvos es de 1 a 2 veces más grande que el agua de mar, reflejando el normal gradiente intra y extracelular de  $K^+$ .

El plasma de los bivalvos contiene numerosas moléculas orgánicas disueltas, sobre todo en *P. magellanicus* se han encontrado proteínas  $153 \pm 28 \text{ mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$ , amonio-N  $0.24 \pm 0.12 \text{ mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$ , carbohidratos  $5.2 \pm 1.2 \text{ mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$ , lípidos  $13.7 \pm 2.4 \text{ mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$ .

### 1.2.5.4. Hemocitos

Se ha clasificado a estas células en tres categorías en *Chlamis varia* :

Hemocitos tipo I: contienen un núcleo lobulado y central con abundante cromatina, parcialmente condensado dentro de pequeños coágulos y una cromatina periférica.

Hemocitos tipo II: no son lobulados, son excéntricos y con abundante cromatina, está presente una cromatina periférica y nucleolo.

Hemocitos tipo III: tienen formas irregulares y un núcleo polimórfico cerca del centro de la célula, contiene además pequeños coágulos de heterocromatina y una cromatina periférica.

Los hemocitos circulantes participan en 5 clases de funciones fisiológicas en los bivalvos: reparación de heridas por infiltraciones sucesivas, reparación de valvas por transferencia de la matriz orgánica y calcio desde la glándula digestiva al sitio de reparación; transporte y digestión de nutrientes; excreción. y defensa interna ya que los leucocitos de los bivalvos son capaces de fagocitar material extraño y degradarlos por medio de los lisosomas.

### 1.2.6. Sistema Excretor

El sistema excretor de los bivalvos comprende diversos sitios de función excretora, siendo el **principal órgano los riñones también llamado** “Nefridios u órganos de Bojanus”, además están las células tipo podocito encontradas en la glándula pericardial, en el tejido conectivo del *mant*o, alrededor del intestino y en la base de las branquias.

#### 1.2.6.1 Riñón

Estos órganos son color pardo, de forma de saco adheridos al músculo aductor, parcialmente ocluído por la gónada. Cada riñón consiste de un tubo recto rodeado por tejido glandular. El tubo está dividido en *una* sección proximal o pericardial y una sección distal o sinus posterior.

Los túbulos del riñón se abren dentro de numerosos ductos glandulares, dándole una apariencia esponjosa.

#### 1.2.6.2. Glándula Pericardial (Auricular)

La glándula pericardial es una modificación del epitelio auricular localizadas en la aurícula o en el pericardio anterior. Los podocitos glandulares *son* células epiteliales auriculares modificadas que se proyectan dentro de la cavidad pericardial. Casi todo el volumen celular es llenado con productos secretados dando una coloración parduzca. Estas células *son* idénticas a los podocitos encontrados en el riñón de los mamíferos. Ellas *son* capaces de filtrar y de extraer sustancias orgánicas e inorgánicas desde el hemolinfa, sobre todo en *Mytilus edulis*.



### **1.2.7. Sistema Nervioso y Sensorial**

El sistema nervioso del scallop consiste de dos concentraciones gangliónicas principales y sus nervios: los ganglios cerebro - pedal y el ganglio parietovisceral.

#### **1.2.7.1. Ganglios Cerebral y Pedal**

Los ganglios cerebral y pedal están localizados completamente cerca y bajo el integumento, entre el labio ventral y el pie. El ganglio cerebral individual se une dorsalmente por una comisura cerebral circumesofágica inmediatamente posterior a la boca.

Además proveniente de la porción antero-dorsal del ganglio cerebral están los nervios paliales anteriores izquierdo y derecho, los mismos que corren hacia el esófago y a través de la glándula digestiva entra al manto, encima del labio dorsal.

Tres nervios pequeños también se originan de la región antero-dorsal del ganglio cerebral izquierdo y derecho: el nervio labial, el nervio del palpo y el nervio del estatocisto.

El ganglio pedal está casi fusionado debido a la masiva comisura pedal. Un gran nervio pedal proviene de cada ganglio, ramificando y enervando los músculos del pie.

#### **1.2.7.2. El Ganglio Parietovisceral y sus nervios**

El ganglio visceral en los pectínidos está fusionado hasta formar uno grande, el complejo ganglio parietovisceral está compuesto de varios lóbulos distintos.

Este ganglio está situado posteroventralmente al poro excretor del riñón derecho y tiene además una relación anatómica cercana con este órgano. Este da origen a la mayoría de los nervios de las vísceras, músculo aductor y el manto. Uniendo el ganglio sobre las caras izquierda y derecha están los nervios paliales, nervios del músculo aductor, nervios osfradiales y los nervios osfradio-branquial.

### 1.2.7.3. El Nervio Circumpalial

El nervio circumpalial está ubicado justamente en el interior de la arteria circumpalial. Es enervado por los nervios paliales anterior y posterior, los cuales se originan en los ganglios cerebral y parietovisceral respectivamente. Los nervios circumpaliales de los dos lóbulos del manto están fusionados anterior y posteriormente en la charnela

### 1.2.7.4. Estructuras Sensoriales

#### Sistema Visual

Los ojos están distribuidos alrededor del margen del pliegue medio (sensorial) del manto. Consiste de una córnea, lente y doble retina. El nervio óptico de cada ojo se une al nervio circumpalial, el cual es enervado por extensiones del lóbulo lateral (óptico) del ganglio parietovisceral.

#### Células Sensoriales Epiteliales y Tentáculos

Las células sensoriales epiteliales están dispersas sobre la epidermis del scallop, pero están particularmente concentradas sobre los tentáculos largos, situados en el margen del lóbulo medio del manto. La base de la célula sensorial está unida a fibras nerviosas que corren en el nervio tentacular.

## Estatoreceptores

Existen dos tipos de estatoreceptores en los bivalvos: los de vesícula cerrada (estatocistos), y los de vesícula comunicante con el exterior (estatocriptos). Un estatocisto puede contener un solo estatolito o estatoconia; un estatocripto contiene muchas partículas llamadas pseudoestatoconia.

La gran asimetría de los estatoreceptores de scallops puede deberse a su hábito de vida sedentario y sobre todo a estar descansando siempre sobre la misma valva, sin embargo, se ha notado que la ablación de los estatoreceptores no afecta el reflejo de reacomodarse, pero, el componente de dirección vertical del reflejo del nado es afectado por la extirpación del estatoreceptor izquierdo, aunque no se afecta por la eliminación del derecho.

### 1.2.7.5. Complejo Pie-Bisus



#### Morfología Externa y Desarrollo del Complejo Pie-Bisus

El pie de los pectínidos aparece de la superficie antero-dorsal de la gónada y tiene una forma cilíndrica rugosa, terminando en una formación de émbolo llamada suela o más apropiadamente la corneta. El pie de los pectínidos es pequeño comparado con el de los Mytilidae. sin embargo, este puede ser más o menos desarrollado dependiendo de los hábitos de vida del adulto y la importancia de la glándula bisal en diferentes especies.

En la mayoría de los bivalvos el pie está conectado a la valva por medio de un par anterior y otro posterior de músculos retractores pedales, sin embargo, el músculo retractor está ausente y en los Pectinidae únicamente queda el retractor posterior izquierdo, estando insertado sobre la valva izquierda cerca del margen dorsal del músculo aductor. El grado de desarrollo de este músculo varía entre especies de acuerdo al grado de desarrollo del pie, siendo más desarrollado en *Chlamys opercularis* y rudimentario en *Pecten maximus*.

El Biso

El biso está formado por una raíz desde la cual se extienden varias cintas espesas, formadas de un complejo de moléculas protéicas; la raíz está formada de 30 - 50 cintas fibrosas formadas de las secreciones de la glándula del biso primaria. Esas fibras están cubiertas por una fina matriz de material amorfo en su extremidad proximal. Las cintas están limitadas por una cubierta fibrosa secretada por la glándula bisal secundaria.

### 1.3. TEST DE TOXICIDAD

Las pruebas de toxicidad son deseables en evaluación de aguas contaminadas porque las pruebas físicas y químicas por sí mismas no son suficientes para asignar efectos potenciales en la biota acuática.

Pruebas de toxicidad son útiles para una variedad de propósitos que incluyen:

- a) apropiadas condiciones ambientales para la vida acuática,
- b)** factores ambientales favorables y desfavorables, como OD, pH, temperatura, salinidad o turbidez,
- c) efectos de factores ambientales en toxicidad de desechos,
- d)** toxicidad de desechos a especies evaluadas, y
- e) sensibilidad relativa de organismos acuáticos a un efluente o tóxico, entre otros.

### 1.3.1. Diferentes pruebas de renovación de solución

**Test Estático:** prueba en la cual la solución y los organismos son colocados en una cámara y se los mantiene durante todo el test.

**Test de Renovación:** test en el cual los organismos son expuestos a soluciones de la misma composición que son renovadas periódicamente durante el tiempo que dure el test (con renovaciones usualmente en intervalos de 24 horas). Esto está acompañado de transferencia de organismos o reemplazo de la solución.

**Test de Flujo Continuo:** en este test la solución es reemplazada continuamente.

### 1.3.2. Pruebas de toxicidad en laboratorio

#### 1.3.2.1. Prueba de Toxicidad aguda

Término fetal relativamente corto u otro efecto, usualmente definido como ocurrencia de 4 días para peces y macroinvertebrados y de corto tiempo (2 días) para organismos con cortos estadios de vida. La evaluación de este tipo de prueba es mediante la “Concentración Letal” (LC), que es la concentración estimada para producir muerte en una proporción específica de organismos. Usualmente definida como Concentración Letal Media (50%), LC50, i.e., concentración que mata el 50% de los organismos evaluados en un tiempo específico de observación, por ejemplo 96-h LC50.

La tabla 1 muestra los diferentes grados de toxicidad en que puede ser clasificada una sustancia.

Tabla 1.- Grados de Toxicidad según la concentración según J.D. Walker, 1993.

<b>Grados de Toxicidad</b>	<b>Rango de Concentración</b>
Muy tóxico	EC50 o LC50 < 1 mg/l
Tóxico	EC50 o LC50 = 1 - 100 mg/l
Toxicidad moderada	EC50 o LC50 = 100 - 1000 mg/l
Ligeramente tóxico	EC50 o LC50 = 1000 - 10000 mg/l
No tóxico	EC50 o LC50 = 10000 mg/l

También podemos evaluar por medio de la “Concentración Efectiva” (EC), que es aquella concentración que causa un efecto específico en una proporción designada de organismos. El efecto es subletal, tal como un cambio en la tasa de respiración o pérdida del equilibrio, pero esto es definido en términos de cantidad, i.e., un individuo en particular puede mostrar o no los efectos. El tiempo de exposición además es específico; por ejemplo, el 96h EC50 para pérdida de equilibrio es la concentración efectiva para el 50% de los organismos en 96 horas, para esta clase de efecto.

Este tipo de pruebas son consideradas ensayos de primera evaluación y los datos obtenidos pueden ser utilizados para establecer un rango de toxicidad de cualquier contaminante que puede generar mortalidad en cualquier especie bajo estudio.

### 1.3.2.2. Prueba de Toxicidad crónica

Toxicidad crónica involucra un estímulo prolongado o continuo por un largo período de tiempo, con frecuencia entre 1-10 días. Crónico puede ser considerado un término relativo dependiendo del estilo de vida de un organismo. Un efecto puede ser medido en términos de reducción de crecimiento, reproducción, etc.

Los términos de evaluación de resultados son:

**NOEC ( No Effect Concentration):** es aquella concentración en la cual no se observa efecto negativo estadísticamente comparada con el control.

**LOEC (Lowest Effect Concentration):** es la concentración mas baja de un tóxico que causa efecto negativo comparándolo con el control.

**MATC (Maximum Acceptable Concentration - Concentración Permisible Máxima de Tóxico):** concentración de un tóxico que puede estar presente en un afluente sin causar un daño significativo para la productividad u otros usos, generalmente es el promedio del NOEC y LOEC.

### 1.3.2.3 Terminología

La siguiente terminología fue establecida por Rand et. *al.* (1995) y el Standard Methods (1992) para los distintos ensayos de toxicología.

- **Aclimatar:** acostumar los organismos a diferentes condiciones ambientales, tales como temperatura, luz, y calidad de agua.
- **Control:** tratamiento en un test de toxicidad que duplica todas las condiciones de la exposición del tratamiento pero no contiene el material a evaluar.
- **Respuesta:** la medida del efecto biológico de la variable evaluada. En toxicidad aguda la respuesta usualmente es muerte o inmovilización.
- **Test definitivo:** diseñado para establecer concentraciones en la cual ocurre un punto final. Los tiempos de exposición para estos test son más largos que los anteriores, incorporan múltiples concentraciones en intervalos cercanos y muchas réplicas.
- **Tets de observación:** test de toxicidad para determinar si un impacto es probable de ser observado; el diseño del test incorpora una concentración, muchas réplicas, exposición de 24 a 94 h.
- **Test de rango de alimentación:** test preliminar para establecer toxicidad aproximada de una solución. Diseño del test incorpora concentraciones múltiples ampliamente espaciadas con una sola réplica; la exposición es usualmente de 8 a 24h.
- **Concentración Inhibitoria (IC):** concentración que causa un porcentaje de inhibición específica o deterioro en la función biológica. Por ejemplo, un IC25 puede



ser la concentración estimada para causar una reducción del 25% en el crecimiento larval de peces, relativo al control. Este término puede ser usado con cualquier test toxicológico que mida un cambio en la tasa de respiración, número de prole, incremento en el número de algas, etc.

- **Dosis:** cantidad de un tóxico que ingresa en el organismo. Dosis y concentración no son intercambiables.
- **LC50 Asintomática:** concentración en la cual el LC50 se aproxima a una constante por un prolongado tiempo de exposición.
- **Nivel de Seguridad:** generalmente es el valor del LC50 multiplicado por un factor de  $10^{-1}$ .
- **Tiempo de Exposición:** tiempo de exposición de los organismos a la solución.
- **Toxicidad:** potencial o capacidad de un material para causar efectos adversos en organismos vivos, generalmente un veneno o mezcla de venenos. Toxicidad es un resultado de dosis o concentración de exposición y tiempo de exposición, modificado por variables como temperatura, forma química y disponibilidad.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. METODOLOGÍA DE EXPERIMENTOS DE TOXICOLOGÍA**

Los experimentos fueron realizados en la sala de Toxicología del CENAIM en San Pedro de Manglaralto, provincia del Guayas desde el 18 de mayo de 1999 al 10 de marzo del **2000**.

En el presente trabajo se realizó una adaptación a la metodología propuesta por Chen & Lin(1990) y Chin & Chen ( 1987); para intoxicaciones en varias especies de camarones y del Standard Methods(1992), manteniendo los principios para ensayos de toxicología en moluscos.

Para todas estas pruebas se utilizó agua de mar filtrada con un filtro de piola de  $5\mu\text{m}$  y una salinidad constante de 34 ppt.



#### **2.1.1. Recepción y mantenimiento de la semilla**

Los scallops utilizados fueron obtenidos de los cultivos en el mar, con un peso de  $0.16 \pm 0.04$  g y una altura de  $9,02 \pm 0.8$  mm y mantenidos en tanques de 100 litros, con recambio diario de agua y aeración moderada durante tres días. Durante este período fueron alimentados con microalgas de los géneros Isochrysis y Chaetoceros, una vez al día, dejando de alimentar 24 horas antes de cada experimento.

Para los ensayos de toxicidad aguda se midieron, pesaron y separaron los animales un día antes de iniciar los mismos.



### 2.1.2. Ensayo de Toxicidad Aguda

Un bioensayo de renovación estática fue utilizado para valorar la concentración letal media (LC50-96 horas). Se seleccionaron 240 scallops por prueba, posteriormente fueron colocados aleatoriamente en vasos de precipitación de vidrio Pyrex® de 2000 ml a una densidad de 10 animales por litro, con excepción de los experimentos realizados con urea e hipoclorito de calcio en donde se utilizaron vasos de precipitación de plástico (Fig 1).

Cinco concentraciones experimentales de cada sustancia y un control (tratamiento sin tóxico) fueron utilizadas para cada prueba, siendo recambiados al 100% diariamente.

Todos los tratamientos tuvieron 4 réplicas.



Fig. 1.- Vista de los beakers del Set Experimental para Urea y Cloro.

Durante los experimentos se mantuvieron las condiciones de: temperatura a  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  mediante baño María utilizando bandejas cuadradas de 77 cm por lado y de 20 cm de altura y calentadores de acuario (18 -  $32^{\circ}\text{C}$ , marca VISI-THERM) la temperatura fue registrada usando un termómetro de mercurio, el pH con un pHmetro TOA HM 5-S, la salinidad fue registrada con un refractómetro ATAGO (MODEL S/MILL OGAWA SEIKI Co. LTD) y la concentración de oxígeno disuelto con un Oxigenómetro YSI modelo 57B, datos que fueron registrados cada día.

### 2.1.3. Ensayo de Toxicidad Crónica

Se siguió el mismo diseño de renovación estática con la misma cantidad de tratamientos, réplicas y animales por beaker (6, 4 y 10 respectivamente), al igual que el registro de los parámetros físicos tales como temperatura, salinidad, pH y concentración de oxígeno disuelto.

Diariamente se registraba el número de scallops fijados en los beakers tocándolos suavemente con una pipeta Pasteur. Se midieron los animales al inicio y al final del experimento para su posterior análisis con un vernier digital MITUTOYO de  $\pm 0,05$  mm de exactitud. La duración de esta prueba fue de 30 días.

Los vasos de este experimento estuvieron colocados sobre una superficie de plástico negro para poder diferenciar estructuras como tentáculos y manto; también se registró diariamente el número de animales fijados a los beakers, además fueron mantenidos en baño María para tener una temperatura constante ( $24 \pm 1$  °C) reguladas con termostato y con aeración moderada, las almejas fueron alimentadas con *Isochrysis sp.* a una concentración de 100.000 cel/ml/día en una sola dosis, al final del experimento los animales fueron fijados en solución de Davidson para un posterior análisis histológico con tinción de Hematoxilina & Eosina.

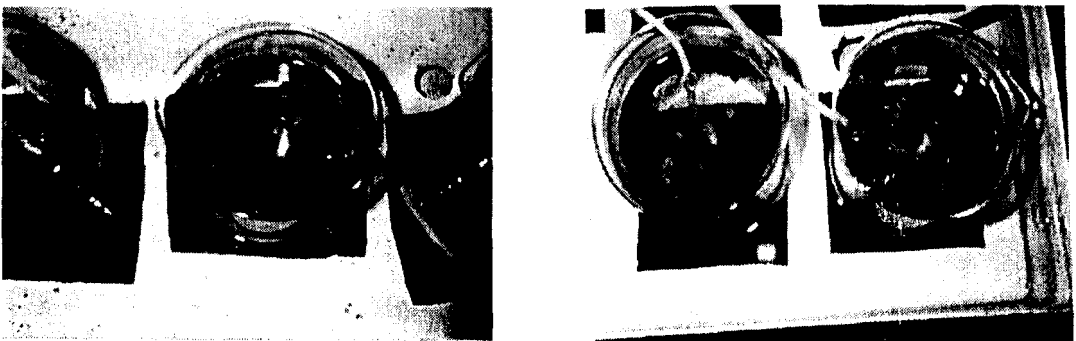


Fig 2 Vista de los beakers para los ensayos de toxicidad crónica.

## 2.2. PREPARACIONES DE SOLUCIONES PATRÓN Y CONCENTRACIONES USADAS

Las sustancias ensayadas fueron: Carbonato de Calcio, Hidróxido de Calcio (Cal P-24), Cloruro de Amonio (GR) (para evaluar el efecto del atnonio), Rotenona, Hipoclorito de Calcio (paraevaluar el efecto del cloro) y la Urea, tomando cotno referencia los datos de las encuestas realizadas por el CENAIM durante el tnonitoreo a catnaroneras efectuado en 1997 (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de camaroneras que utilizan carbonato, hidróxido, urea y analizan la concentración de amonio en su producción. Tomado de Encuesta Sobre Manejo de Camaroneras, 1998, CENAIM. INFORME INTERNO.

<b>Provincia del Guayas</b>				
	<b>Carbonato</b>	<b>Hidróxido</b>	<b>Análisis de Amonio</b>	<b>Urea</b>
<b>Suelo</b>	54%	46%		
<b>Agua</b>	33%	50%	80%	40%
<b>Provincia de El Oro</b>				
<b>Suelo</b>	57%	50%		
<b>Agua</b>	44%	44%	78%	NR

### 2.2.1. Pruebas Preliminares

Las pruebas prelitninares se realizaron manteniendo las condiciones del diseño experimental (tratamientos, réplicas y número de animales), la única diferencia fue el tietmpo de duración, ya que este tipo de pruebas tuvieron una duración de 48 horas.

Las concentraciones evaluadas en cada prueba se detallan a continuación:

Carbonato de Calcio: 1 - 10 - 100 - 1000 y 10000 ppm.

Hidróxido de Calcio: 1 - 10 - 100 - 1000 y 10000 ppm.

Cloruro de Amonio: 1 - 5 - 10 - 15 y 20 ppm.

Rotenona: 28 - 50 - 90 - 160 y 2800 ppb.

Urea: 1 - 10 - 100 - 1000 y 5000 pptn.

Hipoclorito de Calcio: 1 - 5 - 10 - 15 - 20 - 50 ppm.

### **2.2.2. Ensayo con Carbonato de Calcio.**

Se realizaron dos pruebas con esta sustancia, en dos tiempos distintos.

El Carbonato de Calcio utilizado en estos experimentos fue el que se utiliza en los tratamientos de cal para las camaronas.

#### Primer ensayo

Las concentraciones utilizadas fueron de 10, 50, 100, 500 y 1000 ppm; siendo escogidas después de obtener resultados del ensayo preliminar, en el que se presentó mortalidad entre concentraciones de 1000 y 10000 ppm. De tal forma que permitiera determinar algún efecto a menor concentración.

Para las concentraciones de 500 y 1000 ppm se pesó directamente la cantidad necesaria y para las concentraciones de 10, 50 y 100 pptn se disolvió 2 g del producto en un beaker plástico, en 1000 ml de agua destilada, obteniéndose una solución patrón de 2000 ppm, luego se hicieron las diluciones correspondientes a cada concentración.

Los scallops seleccionados para este experimento tuvieron un peso de  $0,18 \pm 0,05$  g y una altura de  $9,26 \pm 0,89$  mtn.

#### Segundo ensayo:

Las concentraciones usadas en este ensayo fueron: 1000, 2000, 3000, 4000 y 5000 ppm.

Para todas ellas se pesó la cantidad requerida.

Los animales escogidos para este ensayo tuvieron  $0,16\pm 0,03$  g de peso y  $9,46\pm 0,54$  mm de altura.

### **2.2.3. Ensayo con Hidróxido de Calcio (Cal P-24)**

Se utilizaron las siguientes concentraciones: 1, 10, 50, 100 y 500 ppm. Las concentraciones de 1 y 10 ppm fueron hechas a partir de una solución patrón de 1000 ppm, y para las restantes se pesó lo requerido. El hidróxido de calcio utilizado fue el producto comercial conocido como Cal P-24.

Animales con un peso de  $0,12\pm 0,02$  g y con una altura de  $7,77\pm 0,58$  mm fueron seleccionados para realizar esta prueba.

### **2.2.4. Ensayo con Amonio (Cloruro de Amonio)**

La solución patrón de Amonio fue preparada siguiendo la metodología de Chen & Lin (1991); Chin & Chen (1987) y Zhao *et.al.* (1997) para pruebas de toxicidad con amonio en camarones, disolviendo 3,82 g de Cloruro de Amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) GR en un litro de agua destilada para alcanzar una concentración de 1000 ppm de Amonio Total ( $\text{NH}_3+\text{NH}_4^+$ ).

Las concentraciones utilizadas fueron: 2, 4, 6, 8 y 10 ppm de Amonio Total ( $\text{NH}_3+\text{NH}_4^+$ ).

Los animales para este experimento tenían las siguientes características: peso  $0,16\pm 0,03$  g y altura de  $8,95\pm 0,69$  mm.

### **2.2.5. Ensayo con Rotenona (Predatox®)**

La solución patrón usada de Rotenona se obtuvo diluyendo 200  $\mu$ l del producto comercial Predatox® (5% de Rotenona W:V), en un litro de agua destilada, las concentraciones probadas fueron: 16, 28, 50, 90 y 160 ppb de Rotenona.

Los animales escogidos para este ensayo pesaban  $0,19\pm 0,12$  g y tenían una altura de  $9,83\pm 0,69$  mm.

### **2.2.6. Ensayo con Urea**

Las concentraciones utilizadas fueron: 320, 560, 1000, 1800 y 3200 ppm de Urea y se prepararon pesando la cantidad necesaria para cada concentración y disolviéndola directamente en el vaso de precipitación.

Los scallops seleccionados tenían un peso de  $0,18\pm 0,04$  g y una altura de  $9,62\pm 0,47$  mm.

### **2.2.7. Ensayo con Cloro**

Las concentraciones utilizadas de Cloro fueron 1.0, 1.8, 3.2, 5.6 y 10.0 ppm, utilizando cloro granulado HTH (Hipoclorito de Calcio con un 65% de producto activo), disolviendo previamente en un litro de agua destilada 0,5 g del producto para obtener una concentración madre de 500 ppm.

Los animales escogidos para este ensayo, pesaron  $0,12\pm 0,02$  g y midieron  $7,89\pm 0,61$  mm de altura.



## 2.3. ENSAYO DE TOXICIDAD CRÓNICO

### 2.3.1. Preparación de Solución Patrón y Concentraciones Usadas.

#### 2.3.1.1. Carbonato de Calcio

Se preparó una solución patrón de 500 ppm, a partir de ella se prepararon las siguientes concentraciones: 10, 18 y 32 ppm; para las concentraciones de 56 y 100 ppm se pesó la cantidad de carbonato necesario.

#### 2.3.1.2. Hidróxido de Calcio

La solución patrón fue de 500 ppm y con ella se prepararon las siguientes concentraciones: 3.2, 5.6, 10, 18 y 32 ppm.

Estos dos experimentos iniciaron al mismo tiempo, por lo tanto se hizo la siembra de los scallops simultáneamente, utilizando un mismo lote de animales cuya altura promedió  $9,84 \pm 0,4$  mm y pesaron  $0,18 \pm 0,05$  g.

#### 2.3.1.3. Amonio

Se disolvió 3,82 g de Cloruro de Amonio en un litro de agua destilada y a partir de ella se prepararon las siguientes concentraciones: 0.32, 0.56, 1.0, 1.8 y 3.2 ppm de Amonio Total ( $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ ).

#### 2.3.1.4. Rotenona

Se disolvió 200  $\mu\text{l}$  de Predatox en un litro de agua destilada. Las concentraciones utilizadas fueron: 5.6, 10, 18, 32 y 56 ppb.

De la misma forma estos dos experimentos se realizaron al mismo tiempo, por lo tanto se hizo la siembra de los scallops simultáneamente, utilizando un mismo lote de animales cuya altura promedió  $9,91 \pm 0,5$  mm y pesaron  $0,18 \pm 0,05$  g.

#### 2.4. DISTRIBUCIÓN DE LOS BEAKERS EN EL SET (TRATAMIENTOS Y RÉPLICAS)

Los beakers fueron distribuidos aleatoriamente en su totalidad tanto en los experimentos de toxicidad aguda como en los de toxicidad crónica (ANEXOS. Tablas 3- 13)

## 2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinación del LC50 se utilizó el método Spearman-Kärber que es un modelo-libre (model-free), que requiere únicamente la simetría de la distribución de tolerancia. Según Gelber *et. al.* (1985), por este método, el experimentador debe elegir un valor  $\alpha$  en el rango  $0 \leq \alpha \leq 50$  el cual es el porcentaje de los valores extremos a ser cortados de cada cola de la distribución de tolerancia antes de calcular el estimado de LC50. (Por ejemplo, si  $\alpha = 10$ , únicamente el 80% central de la distribución de tolerancia estimada podría ser usada para estimar el LCSO). La estimación delineada es fuerte en el sentido que sus valores confían en los valores en el centro, porción más estable de la distribución de tolerancia.

### VALORES DEL NOEC Y LOEC

Se utilizó para los valores NOEC (Concentración en la cual no se observa ningún efecto) y el LOEC (Concentración más baja en donde se observa efecto) los datos de mortalidad del test de Toxicidad Agudo, comparando estos resultados con el control. El efecto a medir fué mortalidad.

Un análisis de Varianza fué utilizado para ver diferencias en los valores de mortalidad y de crecimiento (altura) de los ensayos agudo y crónico.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA**

##### **3.1.1. Carbonato de Calcio.**

En ninguno de los dos ensayos existieron los porcentajes de mortalidad necesarias para calcular el valor del LC50. En el primer ensayo únicamente en el tratamiento de mayor concentración se presentaron 2 scallops muertos después de las 96 horas de duración del experimento como se observa en la Tabla 14; mientras que, en el ensayo posterior las mortalidades fueron muy similares (ver Tabla 15)

Tabla 14. Porcentajes de Mortalidad durante el primer ensayo de Carbonato de Calcio.

Tiempo (horas)	<u>Concentraciones de CaCO<sub>3</sub> (ppm)</u>					
	Control	10	50	100	500	1000
96	0	0	0	0	0	5

Tabla 15. Porcentajes de Mortalidad durante el segundo ensayo de Carbonato de Calcio.

Tiempo (horas)	<u>Concentraciones de CaCO<sub>3</sub> (ppm)</u>					
	Control	1000	2000	3000	4000	5000
2	0	0	0	0	0	0
12	0	0	2.5	0	2.5	0
72	0	0	2.5	0	2.5	0
84	0	0	5	0	5	0
96	5	5	12.5	15	7.5	10

Los parámetros como temperatura, pH y oxígeno disuelto se mantuvieron sin alteración durante la prueba (ANEXOS Figuras 3 - 8).

### 3.1.2. Hidróxido de Calcio

La tabla 16 nos muestra que todos los animales expuestos a 500 y 100 ppm de  $\text{Ca(OH)}_2$  murieron después de 6 y 60 horas respectivamente. Sin embargo, aquellos expuestos a 50, 10 y 1 ppm empezaron a morir después de 24, 2 y 72 horas respectivamente, mientras que en el control no se registró ninguna mortalidad.

Tabla 16. Porcentajes de Mortalidad durante el ensayo con Hidróxido de Calcio

Tiempo (horas)	<u>Concentraciones de <math>\text{Ca(OH)}_2</math> (ppm)</u>					
	Control <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	500 <sup>c</sup>
2	0	0	0	0	2.5	67.5
4	0	0	5	0	2.5	97.5
6	0	0	5	0	2.5	100
12	0	0	5	0	5	-
24	0	0	5	0	7.5	-
36	0	0	5	5	37.5	-
48	0	0	5	5	72.5	-
60	0	0	5	5	100	-
72	0	0	5	5	100	-
84	0	2.5	5	5		
96	0	2.5	5	5		

Filas con superíndices iguales al control no son significativamente diferentes al mismo.

Los valores de pH en el control y los tratamientos con 1, 10, 50 y 100 ppm de  $\text{Ca(OH)}_2$  estuvieron dentro de los límites permisibles para esta especie, sin embargo, el valor correspondiente al tratamiento de 500 ppm tuvo un promedio de 9,9 valor que es letal para el scallop (Proyecto No. P-BID-198, 1997).

Los parámetros como temperatura, oxígeno disuelto y pH se mantuvieron sin alteración durante la prueba (ANEXOS Figuras 9 y 10).

El resultado de la prueba con el programa de Spearman-Kärber estimó un valor de LC50-96 Horas de 64.58 mg/l  $\text{Ca(OH)}_2$  y los límites de confianza de 54.20 mg/l  $\text{Ca(OH)}_2$  hasta 76.95 mg/l  $\text{Ca(OH)}_2$ . La gráfica de mortalidad (Fig 11) nos muestra los valores de LC50 calculados por el programa.

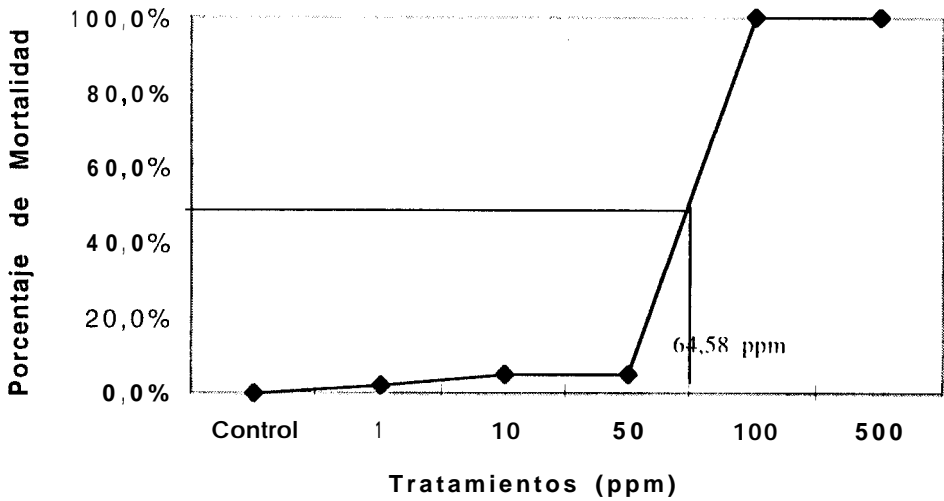


Fig 11. Curva de Mortalidad del Test Agudo con Hidróxido de Calcio a diferentes concentraciones.

El LT50 (tiempo letal medio, tiempo requerido para matar la mitad de la población) para las almejas expuestas a 100 y 500 ppm fueron, 40.28 y 1.48 horas respectivamente. La tabla 17 muestra los valores del LC50 a diferentes tiempos.

Tabla 17. **Resultados** del análisis Speartnan-Karber en distintos tiempos para Hidróxido de Calcio.

<b>Horas</b>	<b>Límite Inferior</b>	<b>LC50</b>	<b>Límite Superior</b>
2	247,47	324,18	424,67
4	210,77	223,61	237,23
<b>6</b>	210,77	223,61	237,23
<b>12</b>	170,26	195,32	224,07
24	163,76	189,78	219,94
<b>36</b>	98,21	124,31	157,35
48	66,30	83,08	104,11
<b>60</b>	51,77	60,54	70,79
72	51,77	60,54	70,79
84	54,20	64,58	76,95
<b>96</b>	54,20	64,58	76,95

En la concentración de 100 pptn todas las altnejas murieron de tranera progresiva y no de fortna intnediata.

### 3.1.3. Cloruro de Amonio

Tanto la temperatura, oxígeno disuelto, y pH se mantuvieron sin variación extrema durante el experimento como lo muestran las figuras 12, 13 y 14 respectivamente (Anexos).

Todas las altnejas de los tratamientos de 10 y 8 mg/l de Atonio-N murieron después de 72 y 96 horas, mientras que aquellos que fueron expuestos a 6 y 4 mg/l de Amonio-N empezaron a morir después de 24 y 84 horas respectivamente. No se produjo ninguna mortalidad en los ll-atamientos de 2 mg/l de Amonio-N y en el control después de las 96 horas de exposición (ver Tabla 18).

Tabla 18. Porcentaje de mortalidad durante el ensayo de Cloruro de Amonio

Tiempo (horas)	Concentraciones de Amonio (ppm de Amonio total)					
	Control <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	8 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>
2	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	5	27.5	52.5
48	0	0	0	5	50	85
60	0	0	0	22.5	72.5	97.5
72	0	0	0	37.5	85	100
84	0	0	0	55	95	
96	0	0	2.5	85	100	

Filas con superíndices iguales al control no son significativamente diferentes al mismo ( $p < 0,05$ ).

El LC50-96 l horas se estableció en 5.13 mg/l Amonio Total-N y los límites de confianza en 4.89 y 5.40 mg/l Amonio Total-N (Fig 15).

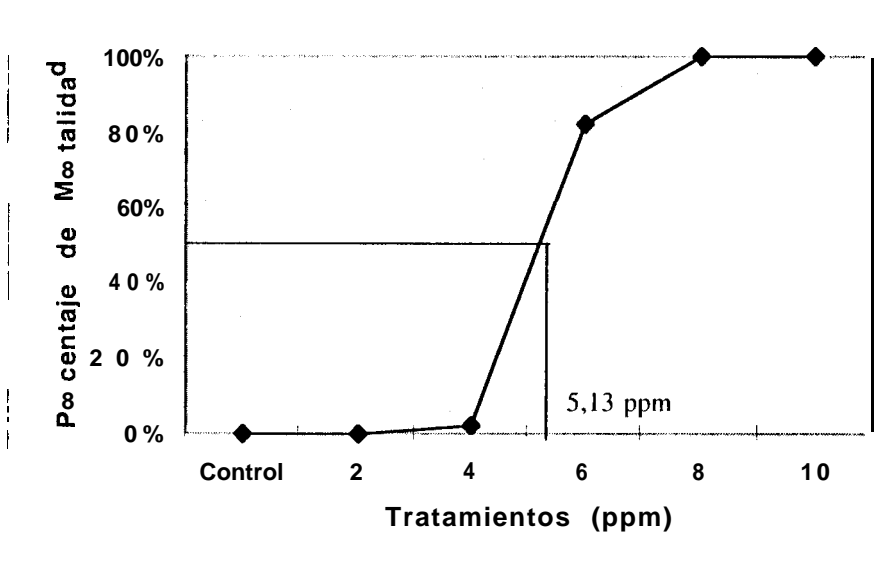


Fig 15. Curva de Mortalidad del Test Agudo con Cloruro de Amonio.

Los valores de LT50 para las almejas expuestas a 10, 8 y 6 mg/l de Amonio-N fueron, 35.42, 48 y 80.57 horas respectivamente.



La tabla 19 muestra los valores del LC50 a diferentes tiempos. No fue posible calcular los valores de LC para menos de 48 horas porque las mortalidades no eran suficientes.

Tabla 19 Resultados del análisis Spearman-Kärber en distintos tiempos para Cloruro de amonio.

<b>Horas</b>	<b>Límite Inferior</b>	<b>LC50</b>	<b>Límite Superior</b>
48	7,8	8,31	8,84
<b>60</b>	NC	NC	NC
72	6,14	6,54	6,97
84	5,67	6,04	6,43
<b>96</b>	4,89	5,13	5,40

N.C. Valor No Calculado

#### **3.1.4. Roteuoua**

Los scallops presentes en los tratamientos de 160, 90 y 50 ppb de rotenona comenzaron a morir después de 6, 12 y 84 horas respectivamente, con porcentajes de mortalidad al final de las 96 horas de 97.5, 50 y 2.5%. En los tratamientos Control, 28 y 16 ppb de rotenona, no se presentaron mortalidades en las 96 horas que duró el ensayo (Tabla 20).

Tabla 20. Porcentaje de mortalidad durante el ensayo de Rotenona

Tiempo (horas)	Concentraciones de Rotenona (ppb)					
	Control <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	28 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	160 <sup>b</sup>
2	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	5
24	0	0	0	0	2.5	12.5
36	0	0	0	0	2.5	42.5
48	0	0	0	0	7.5	60
60	0	0	0	0	27.5	80
72	0	0	0	0	37.5	95
84	0	0	0	0	42.5	95
96	0	0	0	2.5	50	97.5

Filas con superíndices iguales al control no son significativamente diferentes al mismo ( $p < 0,05$ ).

El valor calculado de LC50-96Horas es 89,72 ppb Rotenona, los límites de confianza son 81,25 y 99,07 ppb Rotenona (Fig 16).

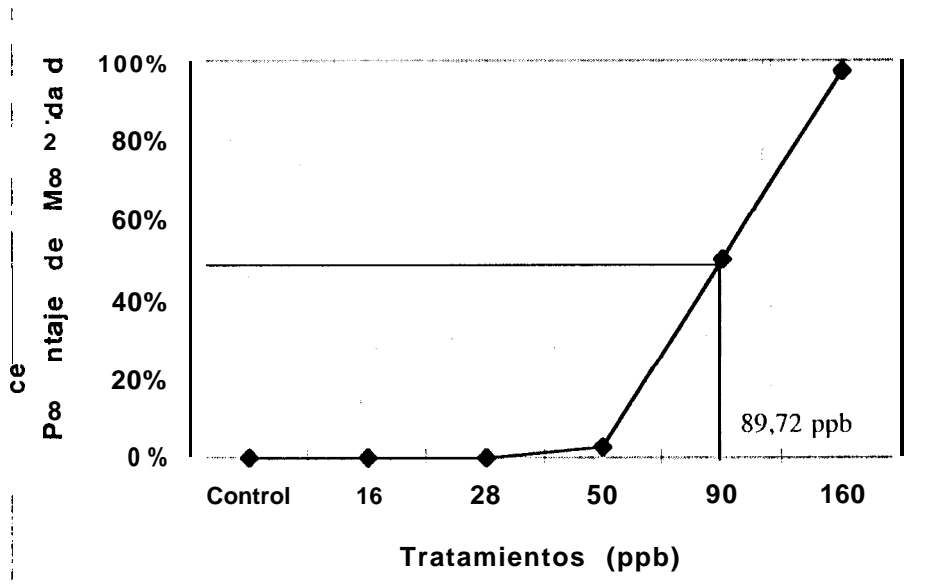


Fig 16. Curva de Mortalidad del Test Agudo con Rotenona

Los valores de LT50 para 60 y 90 ppb de rotenona fueron 41,14 y 96 horas. La tabla 21 hace mención a los distintos valores de LC50 a distintos tiempos. Tampoco se calculó los valores de LC50 para tiempos menores a 48 horas.

Tabla 21 Resultados del análisis Spearman-Kärber en distintos tiempos para Rotenona.

<b>Horas</b>	<b>Límite Inferior</b>	<b>LC50</b>	<b>Límite Superior</b>
48	124,84	143,39	164,70
60	95,37	114,61	137,72
72	89,07	98,65	109,27
84	86,10	95,54	106,02
<b>96</b>	81.25	89.72	99.07

Durante el experimento los valores de los parámetros permanecieron constantes como se observan en la figuras 17, 18 y 19 de ANEXOS.

### 3.1.5. Hipoclorito de Calcio

En este experimento se presentaron mortalidades en menos de una hora de iniciado los tratamientos con las concentraciones más altas como se observa en la tabla 22. Los datos indican que a concentraciones de 10 y 5,6 ppm de hipoclorito las mortalidades son inmediatas, mientras que en el Control y el tratamiento de 1,0 ppm no hubo mortalidades durante todo el experimento; y en los tratamientos de 1,8 y 3,2 ppm la mortalidad fue de 5 y 55%.

Tabla 22. Porcentaje de mortalidad durante el ensayo de Hipoclorito de Calcio (Cloro HTH)

Tiempo (horas)	Concentraciones de cloro (ppm)					
	Control <sup>n</sup>	1,0 <sup>a</sup>	1,8 <sup>n</sup>	3,2 <sup>b</sup>	5,6 <sup>c</sup>	10,0 <sup>c</sup>
1	0	0	0	0	17,5	35
2	0	0	0	15	60	55
4	0	0	0	25	77,5	80
6	0	0	0	27,5	82,5	82,5
12	0	0	0	27,5	82,5	82,5
24	0	0	0	32,5	89,5	90
36	0	0	0	32,5	89,5	90
48	0	0	0	45	97,5	100
60	0	0	0	45	100	100
72	0	0	2,5	50	100	100
84	0	0	2,5	50	100	100
96	0	0	5,0	55	100	100

Filas con superíndices iguales al control no son significativamente diferentes al mismo ( $p > 0,05$ ).

El valor calculado de LC50-96Horas es 2,97 ppm de hipoclorito y los límites de confianza entre 2,69 - 3,27 ppm (Figura 20). Los valores de LT50 para 10 y 5,6 ppm de cloro fueron, 1,75 y 1,76 horas.

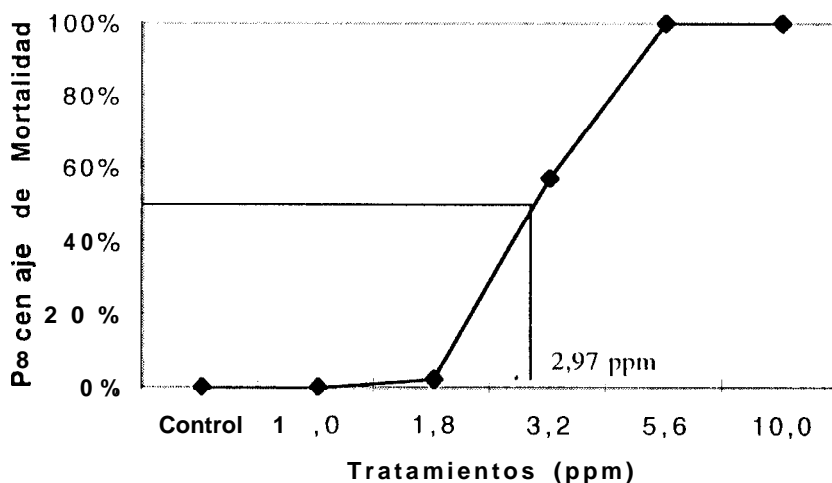


Fig 20. Curva de Mortalidad del Test Agudo con Hipoclorito de Calcio (HTH)

Los valores de LC50 de hipoclorito como lo muestra la tabla 23 varían muy poco, el 63% de las concentraciones calculadas están alrededor de los 3 ppm, valor que podría tomarse como letal para cualquier tipo de tratamiento.

Tabla 23. Resultados del análisis Spearman-Kärber en distintos tiempos para Hipoclorito de calcio.

Horas	Límite Inferior	LC50	Límite Superior
2	4,27	5,07	6,02
4	3,57	4,21	4,97
6	3,54	4,08	4,70
12	3,48	3,89	4,34
24	3,37	3,67	4,00
36	3,23	3,52	3,84
48	2,94	3,23	3,55
60	2,94	3,23	3,55
72	2,86	3,14	3,45
84	2,78	3,05	3,35
96	2,69	2,97	3,27

Las figuras 21 y 22 muestran los valores de temperatura y concentración de oxígeno vemos que son constantes. El pH promedio durante todo el experimento fue de  $8,2 \pm 0,26$ .

### 3.1.6. Urea

En este ensayo no se presentaron mortalidades mayores al 18% dentro de las 96 horas. Sin embargo, se dejó transcurrir 24 horas más y sin recambio en todos los tratamientos para ver que efecto tenía, la mayor mortalidad se desarrolló en el tratamiento con 320 ppm de urea (97,5%, ver Tabla 24) y valores de mortalidad de 57,5 , 15 , 17,5 y 7,5% en los tratamientos de mayor concentración (560, 1000, 1800 y 3200 ppm).

No fue posible calcular un valor de LC50 para las 96 horas y tampoco se pudo realizar una cuantificación de los niveles de amonio.

En cuanto a los valores de temperatura y concentración de oxígeno estos se muestran en las figuras 23 y 24 (Anexos) y el pH fue  $8,2 \pm 0,26$ .

Tabla 24. Porcentaje de mortalidad durante el ensayo con Urea.

Tiempo (horas)	<u>Concentraciones de Urea (ppm)</u>					
	Control	320	560	1000	1800	3200
2	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0
48	0	0	5,0	0	0	0
60	0	2,5	7,5	0	0	0
72	0	2,5	7,5	2,5	0	0
84	0	2,5	7,5	2,5	0	0
96	0	17,5	7,5	5,0	2,5	5,0
*120	0	97,5	57,5	15	17,5	7,5

\*: Observación realizada 24 después de finalizar el experimento y sin haber realizado recambio de las soluciones tóxicas.

### 3.2. PRUEBA DE TOXICIDAD CRÓNICA

#### 3.2.1. Carbonato de Calcio

La figura 25 muestra que pocos scallops murieron durante este experimento y al igual que en el test de toxicidad aguda, esta sustancia no produce ningún efecto en la supervivencia.

Al utilizar carbonato de calcio para el incremento de tamaño, el scallop aprovecha la presencia de este compuesto en el medio evidenciando un pequeño crecimiento, pero no de forma significativa (Fig. 26).

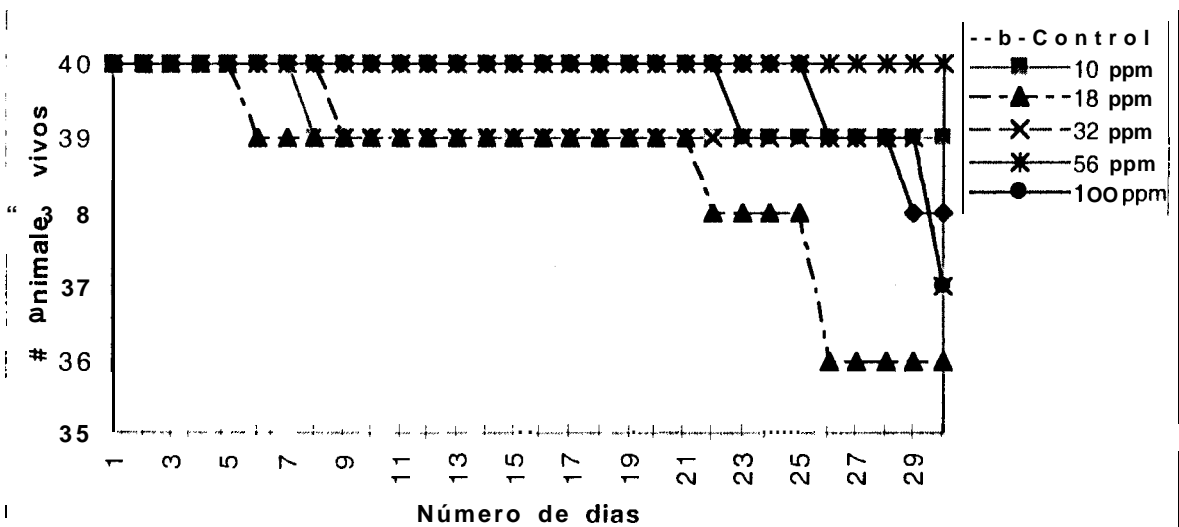


Figura 25. **Sobrevivencia** de los scallops en el test de toxicidad crónica con Carbonato de Calcio a diferentes concentraciones.

Los parámetros tales como oxígeno disuelto y temperatura se pueden ver en las figuras 27 y 28 de Anexos.

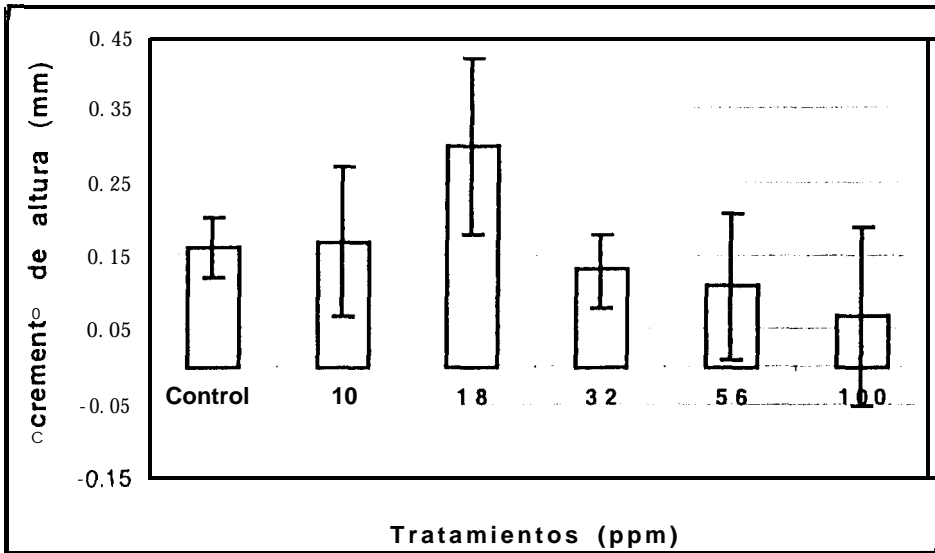


Figura 26. Cuadro de los incrementos de altura  $\pm$  desv. stand. No hubo ninguna diferencia entre los tratamientos ( $p > 0,05$ )

En cuanto al efecto sobre la capacidad de fijación, en la gráfica se observa una tendencia a no fijarse en determinados días, sobre todo en el día 18 donde se observó el porcentaje más alto de animales no fijados. (Anexo, Tabla 25 y Figura 29), incluyendo el control. Las causas de esta conducta no fueron posibles de determinar.

Al haber elegido las concentraciones menores a las utilizadas para el ensayo de toxicidad aguda, esperábamos encontrar algún efecto a largo plazo sobre los scallops, en supervivencia, talla y capacidad de fijación, sin embargo, al aplicar ANOVA a los datos, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.2. Hidróxido de Calcio

El incremento de altura durante esta prueba tampoco mostró una diferencia significativa ( $p > 0,05$ ), pero en el tratamiento con 10 ppm de hidróxido el incremento fue el mayor (0,3 mm) como se puede observar en la figura 30.



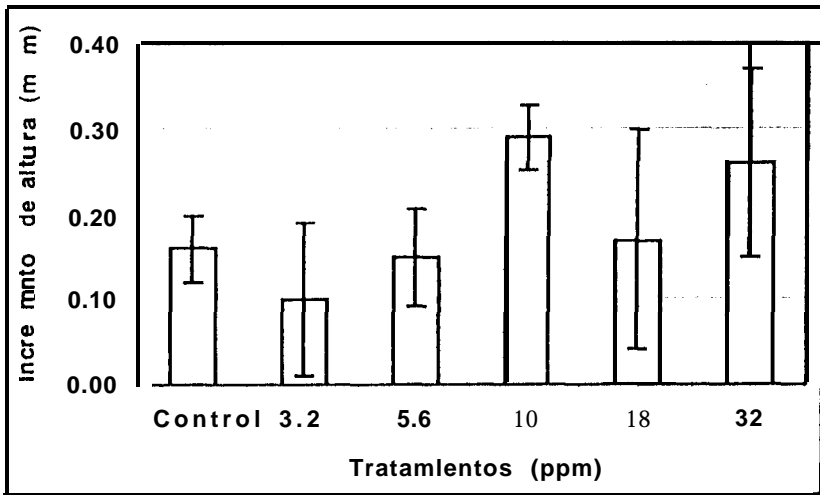


Figura 30. Cuadro de los incrementos de altura  $\pm$  desv. stand, bajo la acción de Hidróxido de calcio. No hubo ninguna diferencia entre los tratamientos ( $p > 0,05$ )

La mortalidad registró valores bajos como se observa en la figura 31. Los parámetros que fueron constantes se presentan en las gráficas 32 y 33 (Anexos). Tampoco hubo daño a nivel histológico en ninguna de las concentraciones utilizadas.

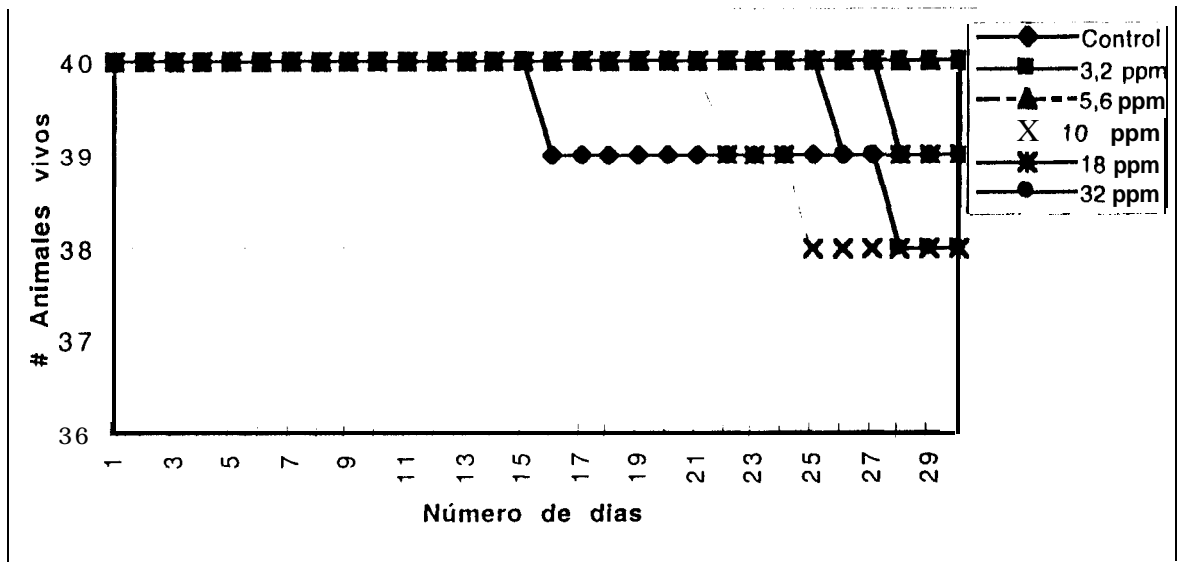


Figura 31. Supervivencia de los scallops en el test de toxicidad crónica con Hidróxido de Calcio a diferentes concentraciones.

La gráfica de animales fijados (Anexos Tabla 26 y Figura 34) también muestra una tendencia de los scallops de perder la capacidad de fijarse en determinado tiempo (día 11 del

del experimento), quizás se deba a algún problema en la secreción del pegamento en la glándula basal al existir un incremento en el valor del pH del medio.

### 3.2.3. Cloruro de Amonio

En cuanto al resultado de mortalidad vemos que a la concentración de 3,2 ppm esta alcanza el 62,5%. La concentración mas alta en la que no se nota un efecto en la supervivencia (NOEC) del amonio, es el tratamiento de 1,0 ppm; mientras que, la concentración mas baja que provoca un efecto en la supervivencia (LOEC) es la de 1,8 ppm de amonio (Ver fig. 35).

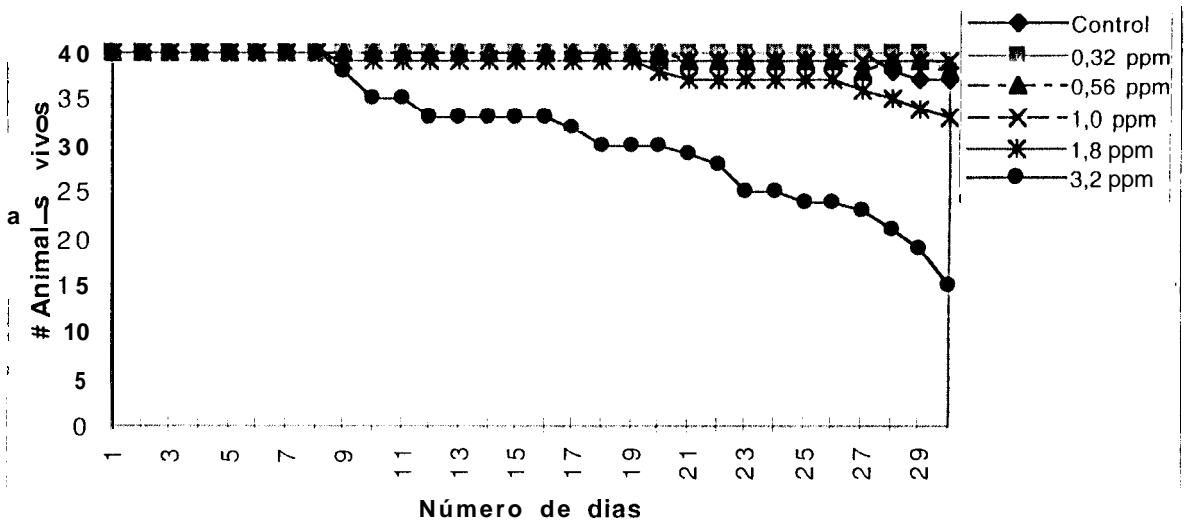


Figura 35. Supervivencia de los scallops en el test de toxicidad crónica con Cloruro de amonio a diferentes concentraciones.

El gráfico de incremento de altura nos muestra que hubo un ligero incremento en la altura de los scallops sobre todo a una concentración de 0,32 ppm de amonio total, pero no hubo diferencias significativas de los tratamientos comparadas contra el control ( $p < 0,05$ ) (Ver Fig 36).

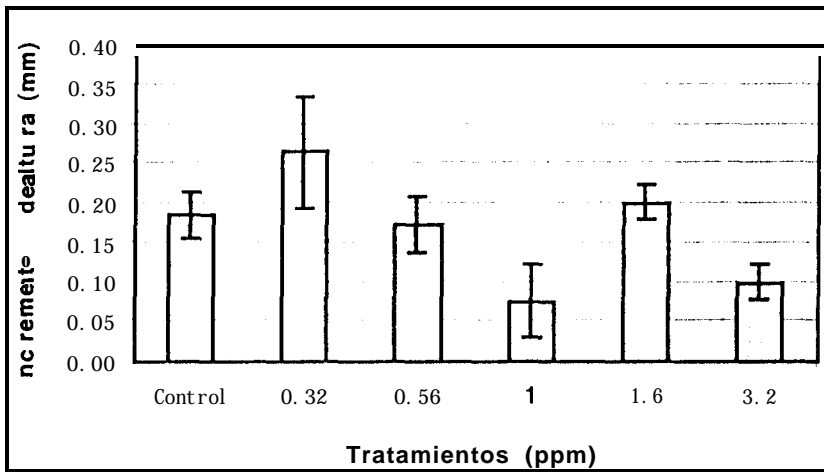


Figura 36. Cuadro de los incrementos de altura  $\pm$  desv. stand, bajo la acción de Cloruro de amonio. No hubo ninguna diferencia entre los tratamientos ( $p > 0.05$ )

Lo que concierne a los parámetros, Estos podemos observarlos en las figuras 37 y 38 de Anexos.

En cuanto al efecto sobre la capacidad de fijación podemos decir que al día 29 el mayor porcentaje de animales no fijados se observó en el tratamiento de 3,20 ppm de Amonio total (Anexo, Tabla 27 y Figura 39).

Los efectos del amonio sobre las estructuras celulares son conocidas, y esta podría ser la causa principal de las mortalidades presentadas en estos ensayos, efectos sobre el crecimiento no se observan pues todos los tratamientos tienen un incremento de talla al final del experimento.

La capacidad de fijación fue progresivamente disminuyendo a medida que transcurría el tiempo, observándose que el 47% de los scallops no fijados tomándose esta concentración como el LOEC. No puede establecerse una concentración NOEC ya que la fijación de estos organismos varió mucho (incluyendo el control) a lo largo del experimento y con porcentajes altos.

### 3.2.4. Rotenona

En relación al ensayo con rotenona las condiciones se presentaron estables, sobre todo temperatura y concentración de oxígeno (Figuras 40 y 41 Anexos), el pH fue  $8,15 \pm 0,03$  y la salinidad se mantuvo constante en 34 ppt.

En la figura 42 se observan los valores de incremento de altura de los scallops, este fue el menor de todas las pruebas realizadas; que lo podemos atribuir a que al afectarse el manto, este deja de cumplir una función muy importante que es la de segregar la concha, esa podría ser la causa del poco crecimiento, otra puede ser que los animales mas grandes fueron los que murieron, además de que en este experimento se observó el mayor número de animales muertos.

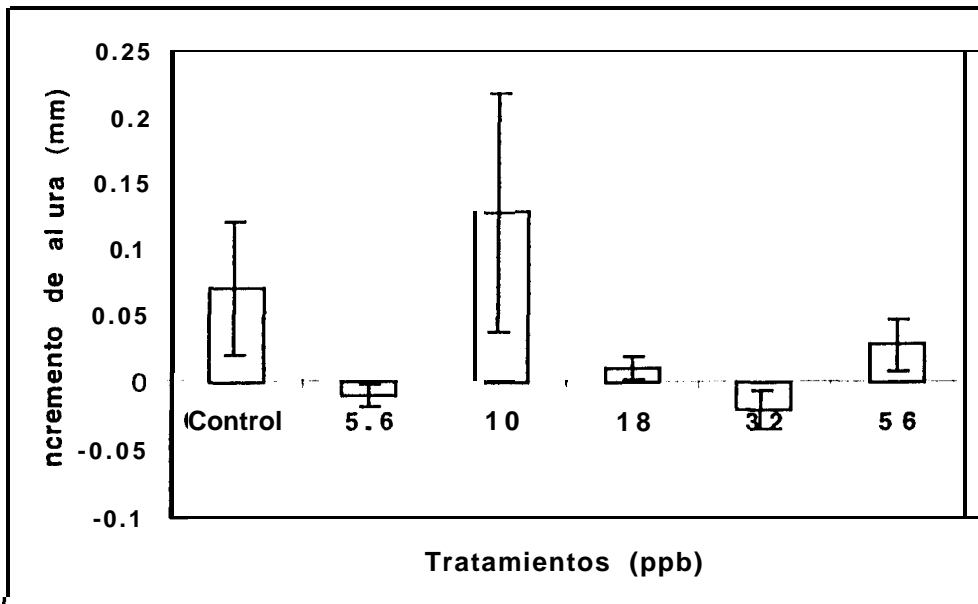


Figura 42. Cuadro de los incrementos de altura  $\pm$  desv. stand, bajo la acción de con Rotenona a diferentes concentraciones. No hubo ninguna diferencia entre los tratamientos ( $p > 0,05$ )

La variación muy grande de fijación diaria nos muestra que esta sustancia **al igual** que el amonio hacen que el scallop pierda progresivamente esta capacidad.

La mortalidad se hace presente en la concentración mas alta (figura 43) demostrando que un tratamiento con Rotenona contínuo puede causar mortalidades elevadas.

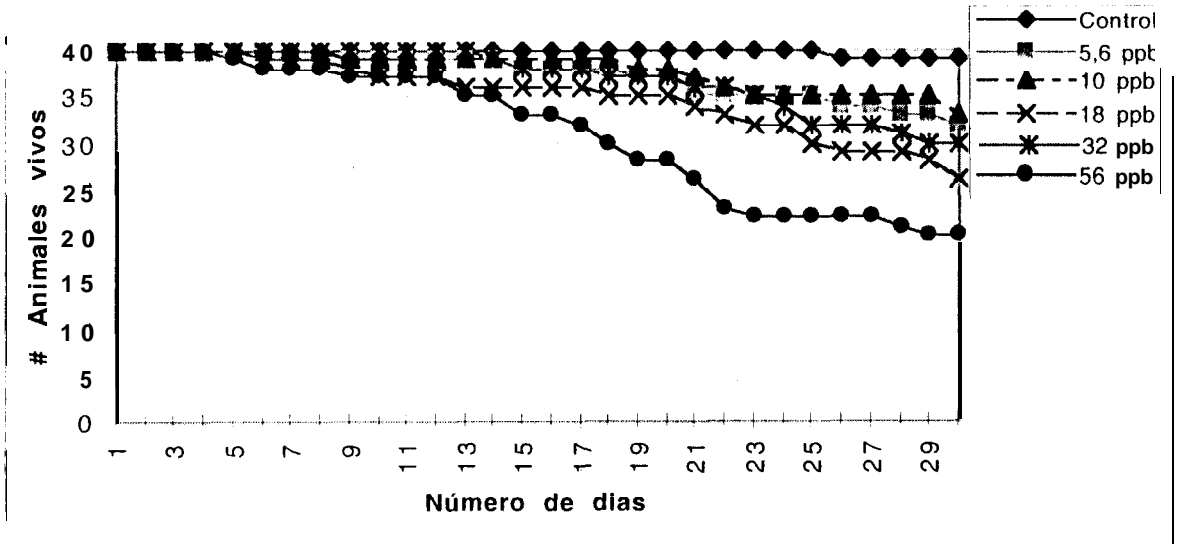


Figura 43 Sobrevivencia de los scallops en el test de toxicidad crónica con Rotenona a diferentes concentraciones.

Los efectos en este ensayo fueron considerables, sobre todo en mortalidad, ya que en la concentración mas alta alcanza el 50%, el crecimiento también se ve afectado al igual que la capacidad de fijación que a diario mostraba fluctuaciones.

## 4. DISCUSION

### 4.1. CARBONATO DE CALCIO

El Carbonato de calcio se utiliza comúnmente en tratamientos de suelos, sobre todo para ajustar el pH. La dosificación va desde 1000 hasta 3000 kg/ha de  $\text{CaCO}_3$  si se quiere incrementar el pH de 3 a 6 y de 5 a 7, respectivamente (Akiyama & Polanco, 1995). Otro uso del calcio es en la formación de los huesos en peces y del exoesqueleto en los crustáceos. Los crustáceos aprovechan el calcio del agua para su crecimiento durante la muda. La dureza total del agua para carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) está entre 300 - 500 mg/l como  $\text{CaCO}_3$ . Boyd (1990), registra datos de dureza de calcio de 65 mg/l para un mejor crecimiento de *M. rosenbergii* y que para el red swamp crawfish 50 mg/l de dureza total es necesario para un buen crecimiento y supervivencia.

Los resultados nos indican que exposiciones de corta o larga duración en dosis inferiores a 100 ppm tto provocan ningún efecto en los scallops. Sin embargo, dosis de 10000 pptn (que no se dan en los cultivos) registraron mortalidades probablemente debido a la sobresaturación del medio con el carbonato sin disolver provocando algún tipo de trastorno en el animal (por ejemplo taponamiento de branquias) por exceso de sólidos en suspensión.

La turbidez según Boyd (1990), es uno de los problemas más graves en estanques de peces de aguas cálidas, produciendo cambios en la conducta y mortalidades masivas cuando esta alcanza los 20000 mg/l de turbidez de arcilla.

Cabe recalcar que todos los scallops que sobrevivieron de los dos experimentos de toxicidad aguda, se recuperaron después de 3 días con abundante alimentación.

En cuanto al efecto sobre la capacidad de fijación durante el ensayo crónico, se observa una tendencia a no fijarse en determinados días, sobre todo en el día 18 donde se observó

el porcentaje mas.(Anexo, Tabla 25 y Figura 29), incluyendo el control. Las causas de esta conducta no fueron posibles de determinar.

#### 4.2. HIDRÓXIDO DE CALCIO

El hidróxido de calcio es utilizado en las camaroneras como desinfectante de fondos de piscinas y para eliminar depredadores; en el tratamiento de fondos de piscinas las dosis están alrededor de 1000 a 2000 kg/ha (Akiyama & Polanco, 1995), igual dosis se utiliza como piscicida y/o control de depredadores.

A diferencia del carbonato de calcio, se registró mortalidad de scallops en las pruebas de toxicidad aguda, sin embargo, el valor de LC50-96 horas calculado de 64,58 ppm correspondería a una dosificación en piscina de 645,8 kg/ha, tratamiento que muy difícilmente se lleva a cabo con estos valores (Stalin Mendoza com. pers.).

El tratamiento con 500 ppm del tóxico tuvo un efecto inmediato y antes de las doce horas de iniciado el experimento todos los organismos bajo evaluación murieron. Durante el ensayo crónico se produjeron lesiones en branquias y ojos, sobre todo en las concentraciones de 18 y 32 ppm, sin embargo, el crecimiento y la supervivencia no son mayormente afectados,

En un trabajo realizado por CENAIM (Proyecto No. P-BID-198, 1997) para determinar la tolerancia a cambios de pH, se concluyó que el scallop tiene un rango muy estrecho de tolerancia y que a valores de pH = 9 la mortalidad es del 100%. Por otro lado, Boyd (1990) hace referencia que el rango de pH deseable para la producción de peces está entre 6,5 a 9 (Fig 45 ANEXOS).

Entonces es posible que el efecto tóxico para los scallops esté dado por el incremento en los valores de pH. Se ha visto en peces que el efecto debido a valores de pH alcalinos se producen sobre todo en las branquias afectando la respiración y el balance ácido-base de la sangre, además de daños en córneas y lentes. No se encontraron referencias que indiquen los efectos del pH sobre los tejidos de los scallops.

La gráfica de animales fijados (Anexos Tabla 26 y Figura 34) muestra una tendencia de los scallops a perder la capacidad de fijarse en determinado tiempo (día 11 del experimento), quizás se deba a algún problema en la secreción del pegamento en la glándula bisal al existir un incremento en el valor del pH del medio.

#### 4.3. CLORURO DE AMONIO

Los fertilizantes que contienen amonio son ampliamente usados en estanques porque son más baratos que aquellos fertilizantes que contienen nitrato. Se los aplica directamente al estanque para incrementar la concentración de amonio total en el agua, liberando amonio ionizado ( $\text{NH}_4^+$ ).

Se han encontrado valores de LC50-96h de amonio no ionizado ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) entre 0,4 a 3,1 mg/l para peces; 0,40 a 2,31 mg/l para crustáceos, y 3,3 a 6,0 mg/l para moluscos marinos (Cok & Armstrong, 1984), por lo tanto el valor de LC50-96 horas registrado en este experimento de 5,13 ppm para scallops está dentro de este rango. Esta sustancia se puede clasificar como tóxica.

Se tiene información de efectos del amonio en peces y muy poca o casi nada de información sobre los efectos que el amonio produce en moluscos. Colt & Armstrong (1984). indican que el cloruro de amonio actúa aumentando la concentración de amonio en



la sangre y tejidos cuando éste aumenta en el agua. Los mismos autores manifiestan que el amonio causa un serio efecto negativo sobre las branquias y por lo tanto puede verse afectado el transporte de oxígeno hacia los tejidos ayudado en parte también por la poca capacidad de los hemocitos a transportar oxígeno al darse una baja del pH sanguíneo. Además del tejido branquial, se ven afectados los hemocitos y el tejido hematopoyético en peces. En este experimento se han logrado ver daños histológicos superficiales en branquias, manto y cuerpos oculares. ( ver Fotos).

Colt & Amrstrong (1984), determinaron que solamente el amonio no ionizado ( $\text{NH}_3$ ) produce toxicidad en peces, sin embargo, la forma ionizada de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) puede ser algo tóxica si el medio tiene un pH bajo en el cual la concentración de  $\text{NH}_3$  también es baja, pero esta última, siempre es más tóxica.

En cuanto al efecto sobre la capacidad de fijación podemos decir que el día 29 se observó el mayor porcentaje de animales no fijados en el tratamiento de 3,20 ppm de Amonio total (Anexo, Tabla 27 y Figura 39). Efectos sobre el crecimiento no se observan pues todos los tratamientos tienen un incremento de talla al final del experimento.

#### 4.4. ROTENONA

La Rotenona es uno de los piscicidas aprobados por la EPA (Environmental Protection Agency). Se lo utiliza para eliminar poblaciones de peces indeseables en estanques de cultivo de peces o camarones. Es un producto natural que se obtiene de las raíces de plantas tropicales (Brunson, 2000; Avault, 1996; Boyd, 1990).

El rango de rotenona usado para eliminar peces está entre 0,5 y 5,0 ppm de una formulación que contenga el 5% de rotenona. Esta se degrada rápidamente y es favorecida

por temperatura, luz y alcalinidad elevadas, además, el permanganato de potasio también puede ser usado como una estrategia para neutralizar la rotenona en proporciones de 2: 1.

Brunson (2000) indica que esta sustancia actúa inhibiendo procesos bioquímicos a nivel celular, sobre todo incapacita a los peces a usar el oxígeno durante los procesos de respiración normal.

Según Boyd (1990) y Avault (1996), la respuesta de diferentes especies de peces a la rotenona es variable, y también depende de ciertos factores ambientales como temperatura es así que a temperaturas altas ( $>16^{\circ}\text{C}$ ) es más tóxica su acción, y también en aguas ácidas ó neutras antes que alcalinas ( $\text{pH} < 7$ ) y en aguas blandas (dureza total  $< 50$  ppm).

El efecto sobre los scallops fué inmediato, la concentración de  $3,2 \mu\text{g/l}$  provocó mortalidad del 37,5% en los ensayos de toxicidad crónica. En cortes histológicos se observan daños a nivel del manto, branquias, ojos y tentáculos, el crecimiento también se vió afectado sobre todo cuando fueron expuestos por períodos largos.

#### 4.5. HIPOCLORITO DE CALCIO

El Hipoclorito de calcio (Cloro HTH), usado de manera generalizada en piscinas vacías ó húmedas como desinfectante del fondo de las mismas, en dosis de 10 - 300 ppm (Akiyama & Polanco, 1995), esta sustancia basa su poder tóxico en la facilidad de difundirse a través de las paredes de las células, provocando una alteración en los procesos bioquímicos.

La acción desinfectante del HTH se produce por acción del ácido hipocloroso que se forma al disolverse con el agua y también del cloro residual en sus dos formas clásicas, la forma libre (ácido hipocloroso, ion hipoclorito ó, a  $\text{pH} < 4$  como cloro (Fig 44 ANEXOS); y la otra forma es de cloro residual combinado como cloramina orgánica e inorgánica, siendo estas dos formas de cloro residual altamente tóxicas para peces (Boyd, 1990).

Las concentraciones utilizadas fueron capaces de alterar el comportamiento normal del scallop, dosis superiores a 2,97 mg/l de este químico registraron mortalidades mayores al 50% para la especie.

#### 4.6. UREA

La urea es utilizado como fertilizante, fuente rica en nitrógeno, ya que posee el 45% de nitrógeno disponible, la tasa de aplicación típica está entre 5 - 10 kg/ha a intervalos de 1 a 4 semanas (Boyd & Massaut, 1999).

Bajo las condiciones del ensayo, la urea no produjo mortalidades, esto pudo deberse a que la urea se hidroliza a amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) que es una forma no muy tóxica, además después de 24 horas de aplicación aproximadamente cerca del 66% de la urea se hidroliza a amonio.

El pH influye de una forma muy importante en la proporción relativa de amoniaco/amonio existente en un cuerpo de agua. Las lesiones que produce una intoxicación por amoniaco son a nivel de branquias y también en el sistema nervioso de peces.

Los máximos niveles admisibles en un acuario dependen del tipo de peces, pero en general, son: Amoniaco ( $\text{NH}_3$ ): 0,1 mg/litro, Amonio ( $\text{NH}_4^+$ ): 50 mg/litro, Nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ): 0.25 mg/litro, y Nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ): 100 mg/litro.

Podemos decir que al disolver la urea en los beakers ésta se transformó en amonio y no tuvo el tiempo necesario para transformarse en amoniaco ya que la solución era nuevamente recambiada y cuando dejamos 24 horas más y sin haber hecho el recambio las mortalidades surgieron, además de que la calidad del agua también empeoró.

## CONCLUSIONES

El Carbonato de calcio no es tóxico y los scallops pueden soportar concentraciones de hasta 100 ppm (1000 Kg/l) durante 30 días sin ningún tipo de efectos negativos, ya que las concentraciones normales están entre 1000 – 3000 Kg/ha. En las concentraciones crónicas utilizadas no se produce mortalidad, tampoco generan un efecto contrario en la capacidad de crecimiento y en la capacidad de fijación a un sustrato.

Hidróxido de calcio es tóxico para los scallops, el LC50-96h es de 64,58 ppm. Valor de NOEC : 50 ppm de Cal P-24. Sin embargo, el scallop está en capacidad de soportar concentraciones subletales de hasta 30 ppm Cal-P24 de manera continua, sin manifestar ninguna alteración..

El Cloruro de amonio tiene clasificación de tóxico. El scallop tiene mayor tolerancia al amonio que peces y camarones, el valor de LC50-96h es de 5,13 ppm de Amonio total. Provoca daños superficiales en branquias, manto y cuerpos oculares. Valor de NOEC: 1,8 ppm de Amonio total y el LOEC es 4 ppm de Amonio total para un período de 30 días.

La Rotenona sustancia muy tóxica. No solo es piscicida, también existe efecto en moluscos, sobre todo retrasa el crecimiento e inhibe la fijación. Provoca daños a nivel de branquias, manto y ojos. El valor de LC50-96h fue de 89,72 ppb, valor que es muy parecido a los encontrados para algunos peces. Concentración NOEC 18 ppb y LOEC 32 ppb.

El Hipoclorito de Calcio (**HTH**) considerado tóxico, mostró ser letal. aunque los niveles calculados son mayores a los comparados con aquellos encontrados para peces, LC50-96h de 2,97 ppm. Concentración NOEC: 1,0 ppm de cloro. Produce daños en tejidos blandos como branquias, manto y cuerpos oculares.

No podemos concluir que la urea no sea tóxica, pero bajo las condiciones del experimento los scallops resistieron las 96 horas.

El scallop tolera concentraciones mayores de estas sustancias a las que normalmente se utilizan en las camarónicas

La pobre respuesta en crecimiento durante las pruebas crónicas pudo deberse a una baja tasa de alimentación de los animales.

La clasificación de las sustancias de acuerdo al grado de toxicidad (de forma descendente) queda de la siguiente manera: Rotenona, Hipoclorito de calcio, Cloruro de amonio, Hidróxido de calcio, Urea y Carbonato de calcio.

## **RECOMENDACIONES**

Realizar ensayos midiendo el tiempo de fijación como respuesta fisiológica.

Utilizar el peso como un parámetro de evaluación, sobre todo en animales de tallas menores a 10 mm.

Utilizar una tasa de alimentación que asegure un crecimiento en pruebas de larga duración.

Hacer más ensayos de este tipo utilizando otras sustancias.

El resultado obtenido puede usarse como un dato referencial para tratamientos contra otras especies de moluscos que habitan en las piscinas de catnarones.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akiyama D. & Polanco B. 1995. Manejo de granjas en cultivos semi-intensivos de camarones. Manual Técnico. Asociación Americana de Soya.
2. Avault J.W.Ph.D. 1996. A Step by Step Guide to Commercial Aquaculture. Fundamentals of Aquaculture.
3. Beninger P.G. and LePennec M. 1991. Functional Anatomy of Scallops. SCALLOPS: BIOLOGY, ECOLOGY AND AQUACULTURE. Developments in Aquaculture and Fisheries Science, Volume 21. ELSEVIER.
4. Boyd C. E. & Massaut L. 1999. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. Aquacultural Engineering. Volume 20 (1999). pp: 113 -132.
5. Boyd C.E. 1990 Water Quality in Ponds for Aquaculture.
6. Boyd C.E. 1982. Water Quality Management for Pond Fish Culture. Developments in Aquaculture and Fisheries Science, Volume 9. ELSEVIER.
7. Brunson Martin W. 2000. Using Rotenone to Renovate Fish Populations in Farm Ponds. Mississippi State University Extension Service. URL:<http://www.ext.msstate.edu/pubs/pub1954.htm>
8. CENAIM. 1999. ENCUESTA SOBRE MANEJO DE CAMARONERAS, **Informe Interno.**
9. Chen J-C and Lin J-N. 1991. Lethal and Sublethal effects of Ammonia to *Penaeus penicillatus* juveniles. Department of Aquaculture, National Taiwan Ocean University. Bull. Inst. Zool., Academia Sinica 30 (2): 73-80
10. Chin T-S and Chen J-C. 1987. Acute Toxicity of Ammonia to Larvae of the Tiger Prawn, *Penaeus monodon*. Aquaculture, 66. pp: 247-253.



11. Colt J. and Armstrong D. 1984. Nitrogen Toxicity to Crustaceans, Fish, and Molluscs. Bio-Engineering Sytnposiutn for Fish Culture (FCS Publ. 1):34-47. © The Fish Culture Section of the American Fisheries Society.
12. Dueñas F. 1998. "Estudio de la susceptibilidad de las Postlarvas *Penaeus vannamei* a los pesticidas Tilt y Calixin". Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil, Ecuador.
13. Frobish L.T. 1989. Water Quality Management and Aeration in Shritnp Frming. Fisheries and Allied Aquacultures Departtntnal Series #2. Alabama Agricultura1 Experiment Station. Auburn University.
14. Galtsoff P.S. 1964. The American Oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Scrvicce. Vol 64. United States Government Printing Office. Washington.
15. Gelber R.D., Lavin P.T., Metha C.R. and Schoenfeld D.A. 1985. Statistical Analisys, Chapter #5. Fundamentals of Aquatic Toxicology. Ed. G.M. Rand & S.R. Petrocelli.
16. Informe Técnico del Segundo Semestre de 1997. Fundación Cenaitn - Espol, "Cultivo de Espccics no Tradicionales (Moluscos)". Proyecto No. P-BID- 198, 1997.pp:8.
17. Lombeida P. 1997. Manual para el cultivo de ostras en Granjas Camaroneras. Proyecto JICA-CENAIM.
18. Marion J.E. 1998. Water Quality for Pond Aquaculture. Research and Development Series #43. International Center for Aquaculture and Aquatic Envirotnents. Alabama Agricultural Experiment Station. Auburn University.

19. Mora E., 1990. Catálogo de bivalvos marinos del Ecuador. Boletín Científico Técnico, Instituto Nacional de Pesca Vol. X, No. 1. Guayaquil-Ecuador, pp:55.
20. Osorio, V. 1989. Cultivo Experimental *de la Ostra del Pacífico (Crassostrea gigas)* en la costa de la Provincia del Guayas. Culltivo de Moluscos en América Latina. Memorias de la Segunda Reunión del Grupo de trabajo Técnico de la Red Regional de Acuicultura ACUICIID. Ancud-Chile. 297-309.
21. Osorio V., Akaboshi S., Álvarez R., Lombeida P., Ortega D. 1993. Cultivo integrado de la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) y el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en Ecuador . Acuicultura Tropical, Vol I. pp: I-5.
22. Osorio V. 1993. Las posibilidades de diversificación de la acuicultura en el Ecuador. Acuicultura Tropical, Vol I. pp: 37-39.
23. Rand G., Wells P.G. and McCarty L. 1995. Introduction to Aquatic Toxicology. Effects, Enviromental fate, and Risk Assesment. Second Edition. Taylor & Francis.
24. STANDARD METHODS, 1992. 18th Edition. For the Examination of Water and Wasterwater.
25. Stephan, C.E. 1977. Methods for Calculating an LC50. *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*. ASTM STP 634, F.L. Mayer and J.L. Hamelink. Eds., American Society for Testing and Materials, pp: 65-84
26. Sicard Ma. Teresa. 1998. Temperatura Letal Superior y Temperatura Optima en una población de almeja catarina (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842). Tesis de Maestro en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional, La Paz, B.C.S., México, 71 pp.

27. Third Practical Training Course in Aquatic Toxicity Testing. 1994. Volume II. Conventional Bioassays and Microbiotests. University of Ghent, Belgium. September 19-24.
28. Vicencio M.D., Singh J., Bojórquez G., y López G. 1988. Cultivo de la Almeja Catarina.
29. Walker J.D. 1995. Toxic Substances Control Act (TSCA) Interagency Testing Committee: Data Developed under section 4 of TSCA. Effects, Enviromental fate, and Risk Assesment. Second Edition. Taylor & Francis.
30. Waller Thomas R. 1995. The Misidenlified Holotype of *Argopecten circularis* (Bivalvia: Pectinidae). The Veliger 38(4): 298-303.
31. Wang, J.-K. 1990. Managing Shritnp Pond Water to Reduce Discharge Problems. Agricultural Engineering Department, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, Hawaii. Aquacultural Engineering 9:6 I-73.
32. Wang, J.-K. & Jakob, G.S. 1991. Pond Desing and Water Management Strategy for an Integrated Oyster and Shritnp Production System. Agricultural Engineering Department, University of I Hawaii at Manoa, Honolulu, Hawaii. Aquacultural System Engineering 2:70-82.
33. Zhao J-H, Lam T.J.& Guo J-Y. 1997. Acute toxicity of ammonia to the early stage-larvae and juveniles of *Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards, 1853 (Decapoda: Grapsidae) reared in the laboratory. Aquaculture Research. 28, 5 17-525.

# **ANEXOS**

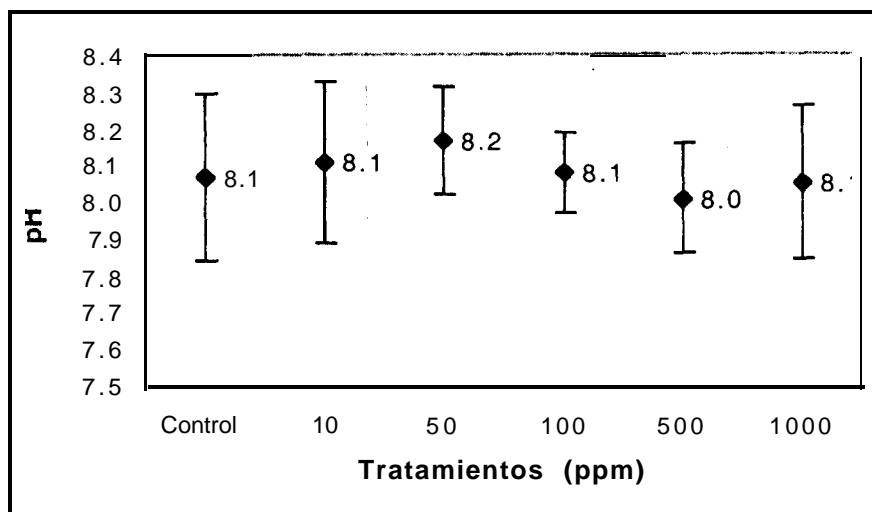


Fig 3. Registro del pH durante la exposición a Carbonato de calcio.

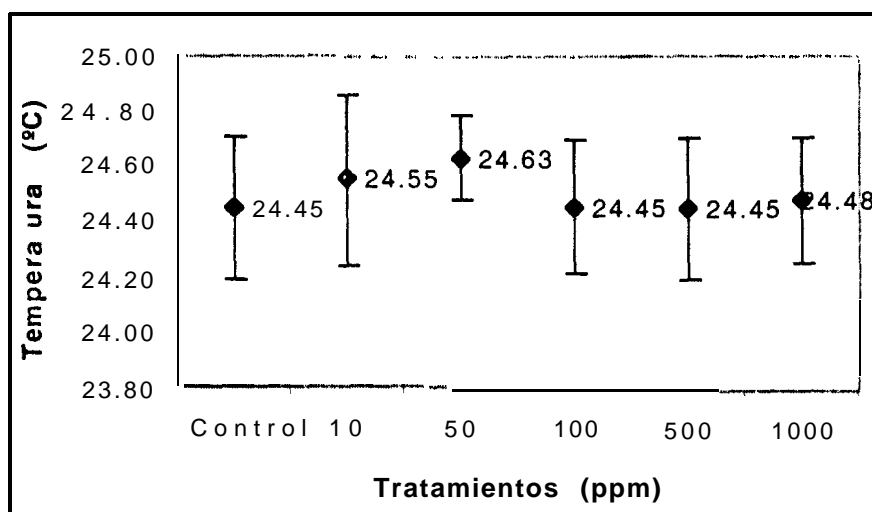


Fig 4. Registro de la temperatura durante la exposición a Carbonato de calcio.

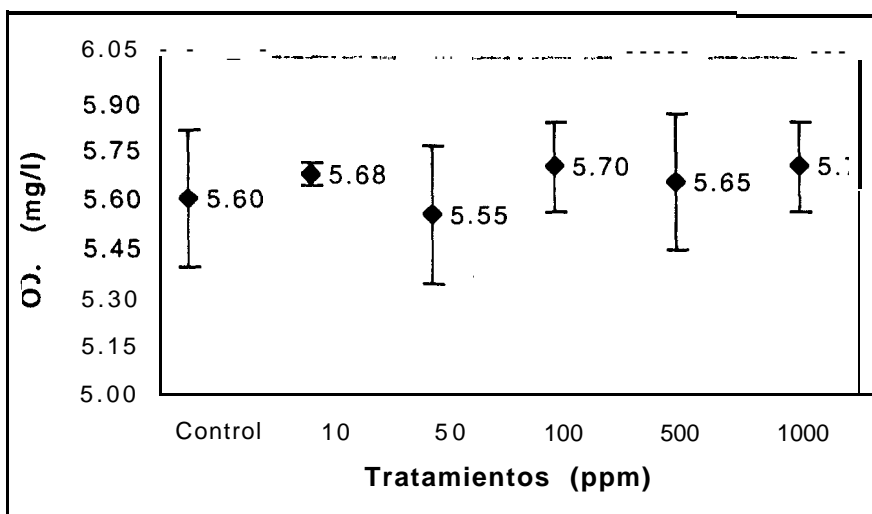


Fig. 5 Registro de la concentración de oxígeno en los beakers durante la exposición a Carbonato de calcio.

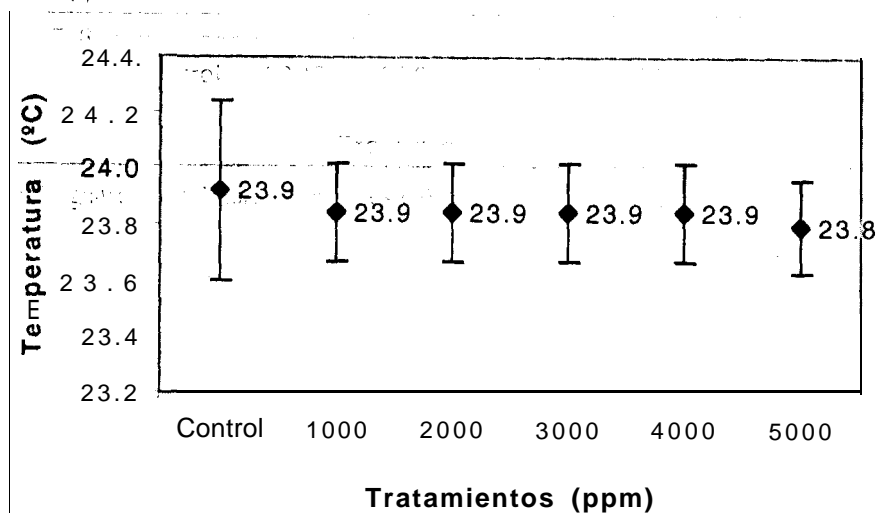


Fig 6 Registro de la temperatura en los beakers durante el segundo experimento con Carbonato de calcio.

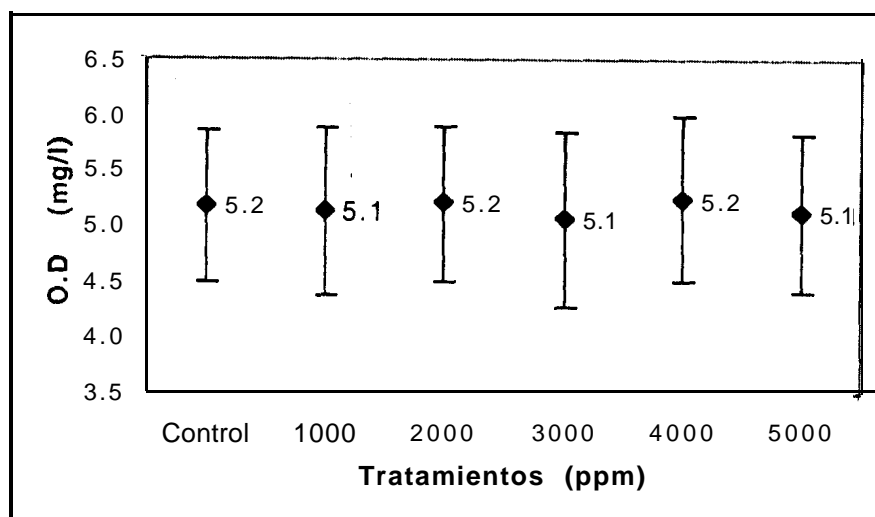


Fig. 7 Registro de la concentración de oxígeno disuelto durante la exposición a Carbonato de calcio.

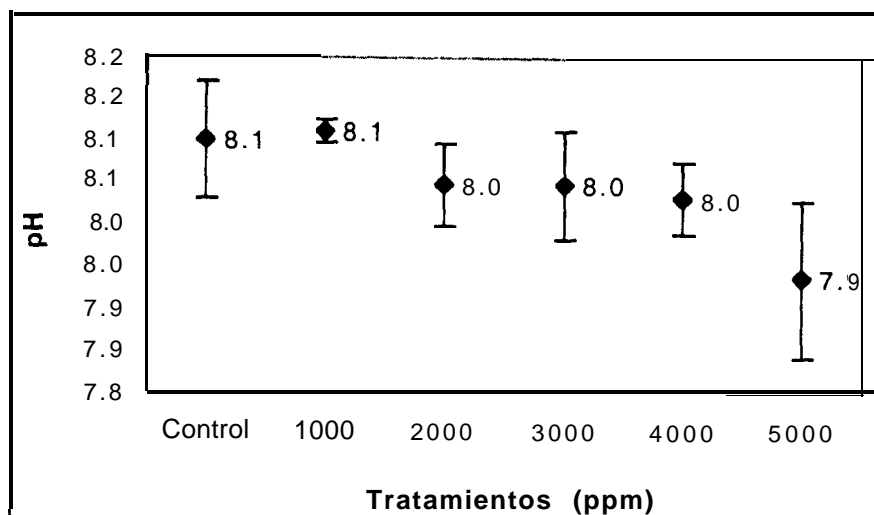


Fig. 8 Registro del pH durante la exposición a Carbonato de calcio.

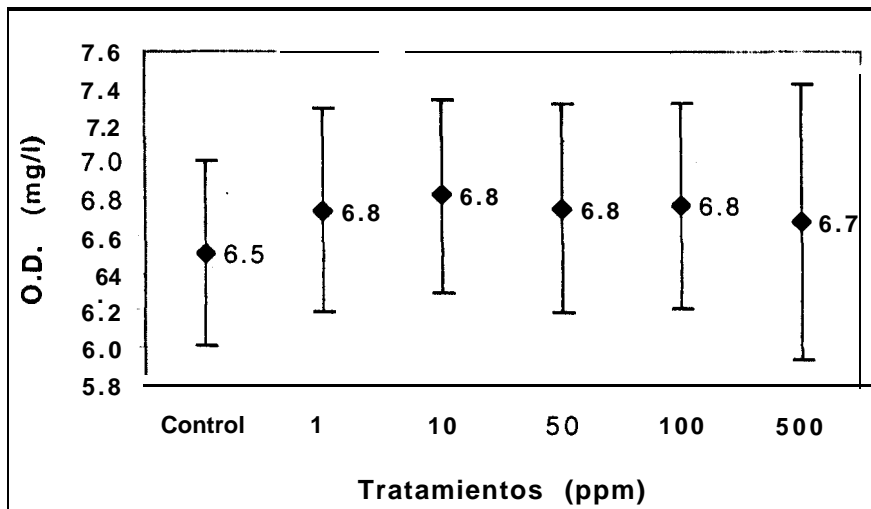


Fig. 9 Registro de la concentración de oxígeno disuelto durante la exposición a Hidróxido de calcio.

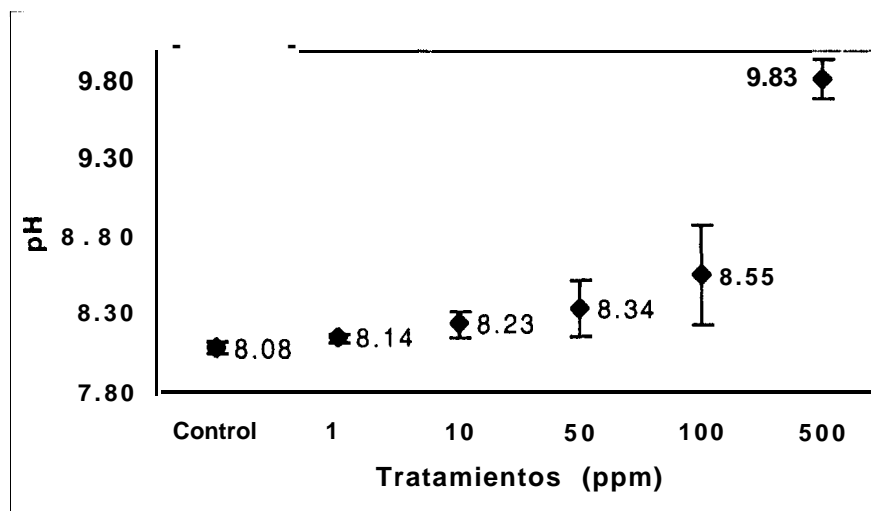


Fig. 10 Registro del pH durante la exposición a Hidróxido de calcio.

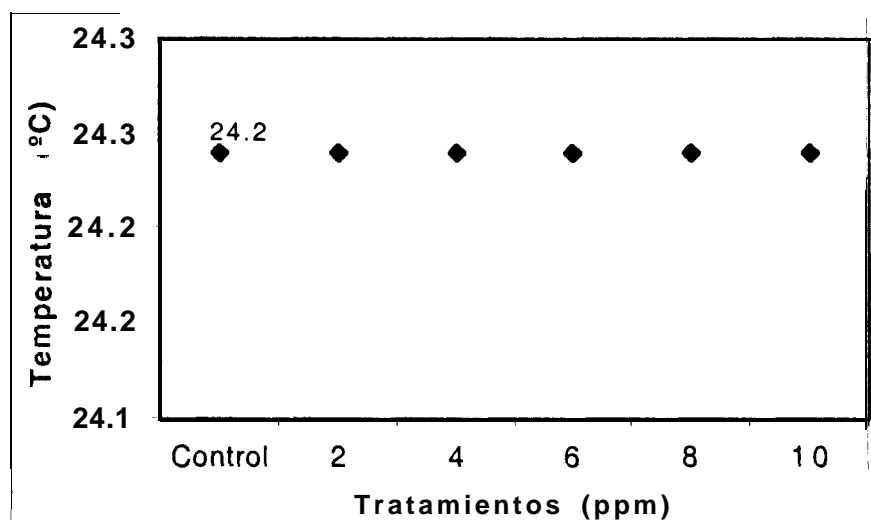


Fig. 12 Registro de la temperatura durante la exposición a Cloruro de amonio.

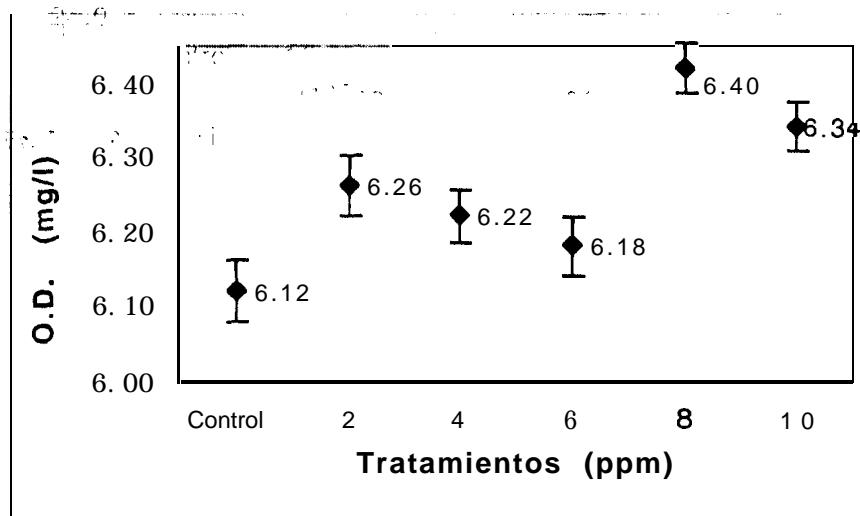


Fig. 13 Registro de la concentración de oxígeno disuelto durante la exposición a Cloruro de amonio.

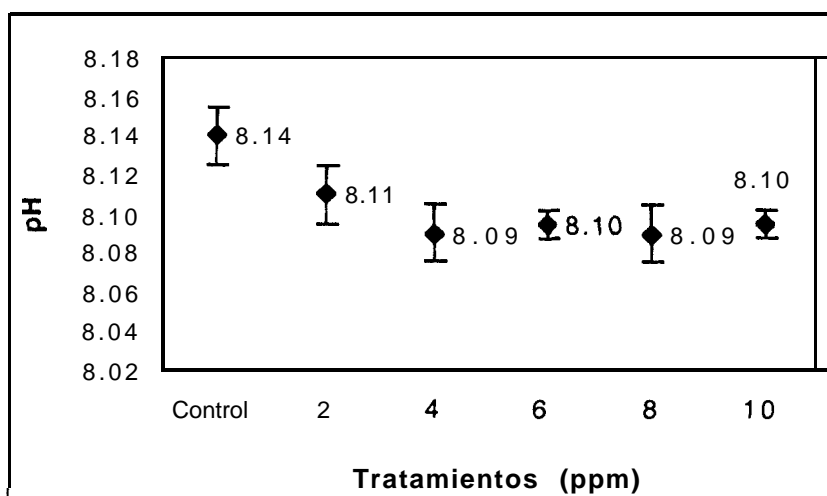


Fig. 14 Registro del pH durante la exposición a Cloruro de amonio.

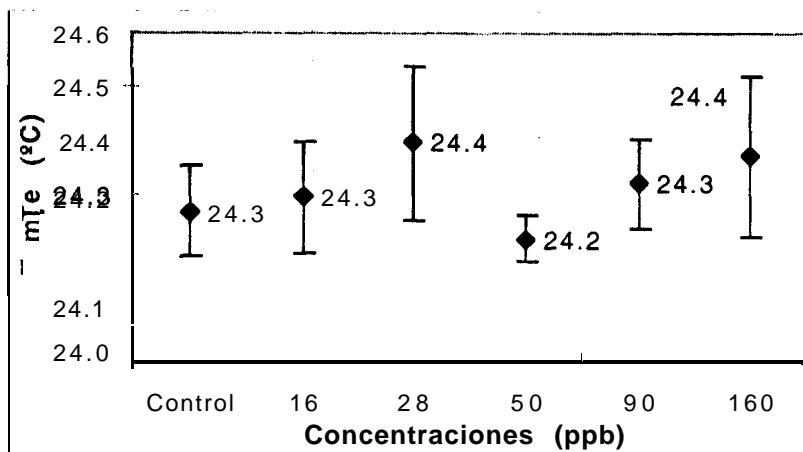


Fig. 17 Registro de la temperatura durante la exposición a Rotenona.



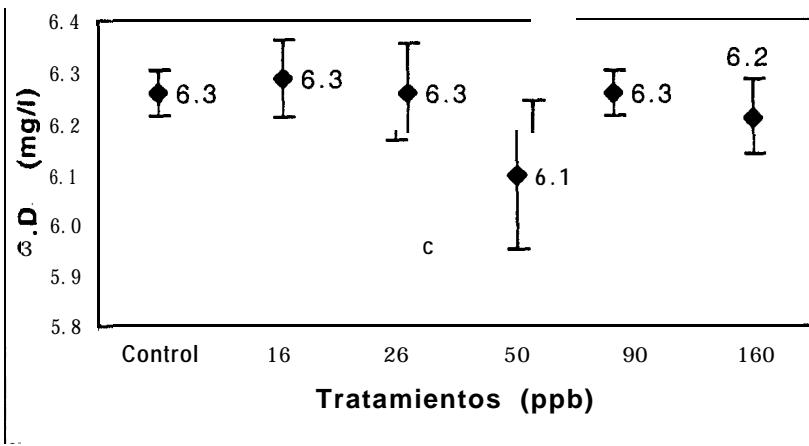


Fig. 18 Registro de Oxígeno disuelto durante la exposición a Rotenona.

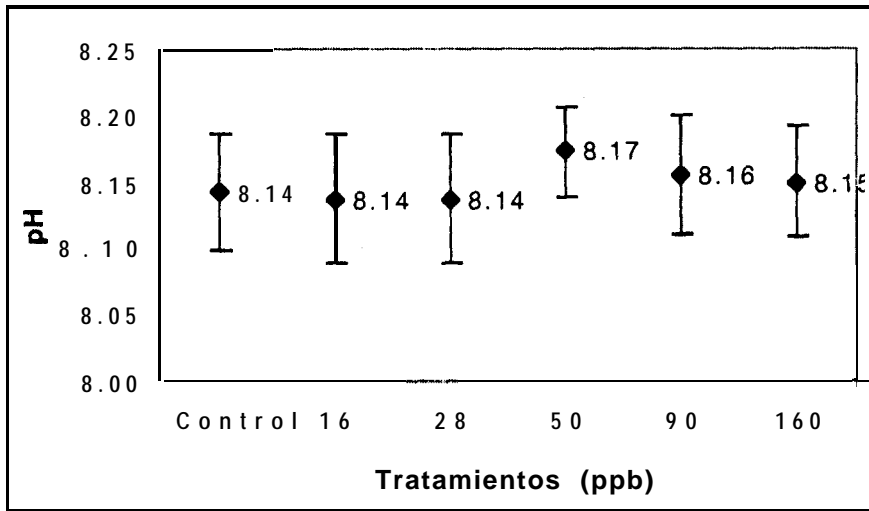


Fig. 19 Registro del pH durante la exposición a Rotenona.

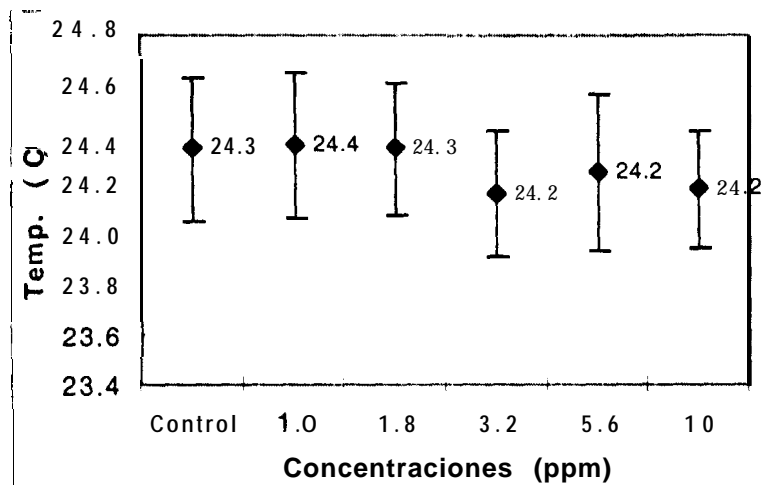


Fig. 21 Registro de la temperatura durante la exposición al Hipoclorito de calcio.

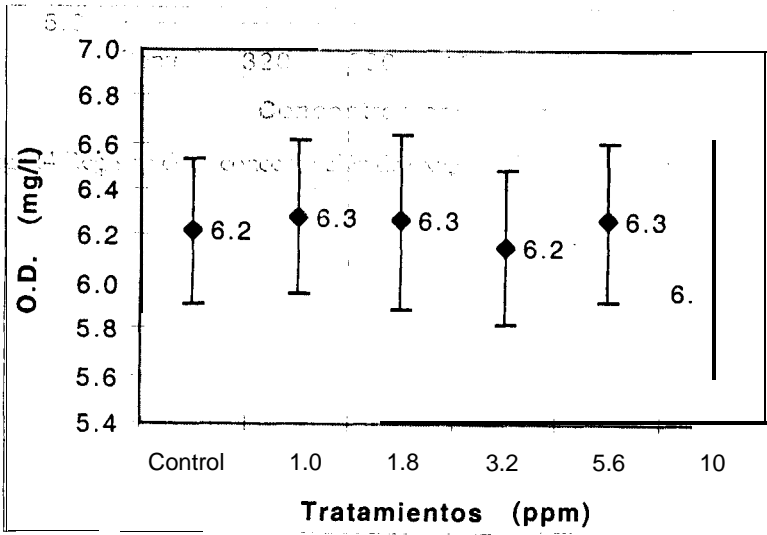


Fig. 22 Registro de la concentración de oxígeno disuelto durante la exposición al Hipoclorito de calcio.

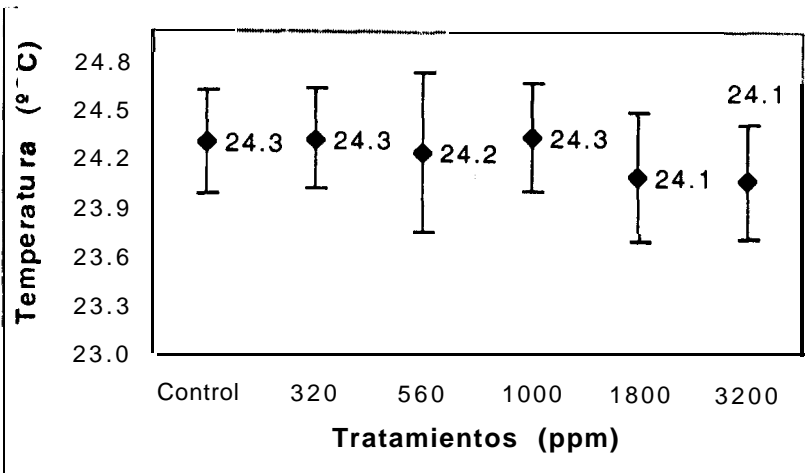


Fig. 23 Registro de la temperatura durante la exposición a Urea,

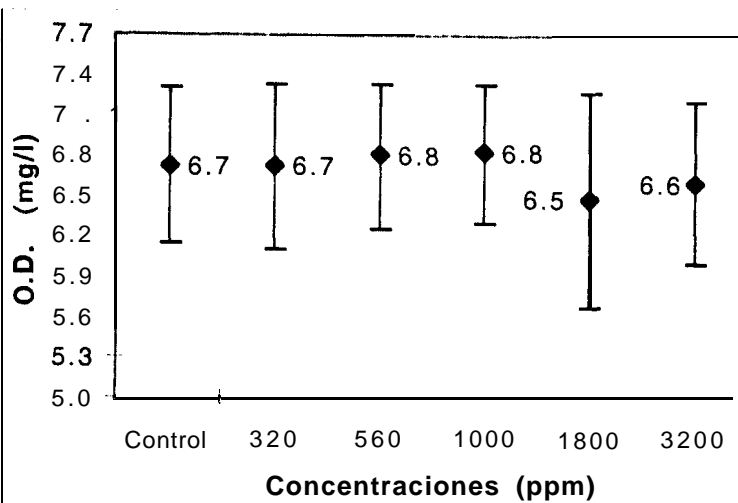


Fig. 24 Registro de la concentración de oxígeno disuelto durante la exposición a Urea

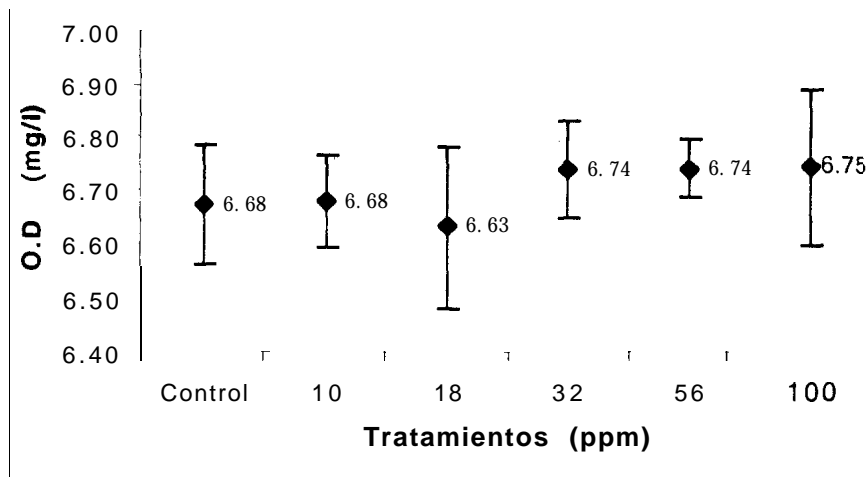


Fig. 27. Promedio desv. stand. de la concentración de oxígeno disuelto durante el experimento con Carbonato de calcio.

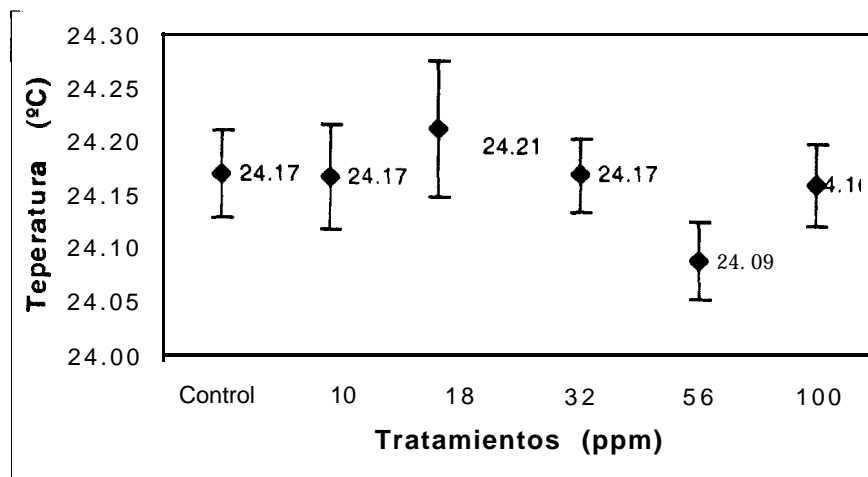


Fig. 28. Promedio desv. stand. de la temperatura durante el experimento con Carbonato de calcio.

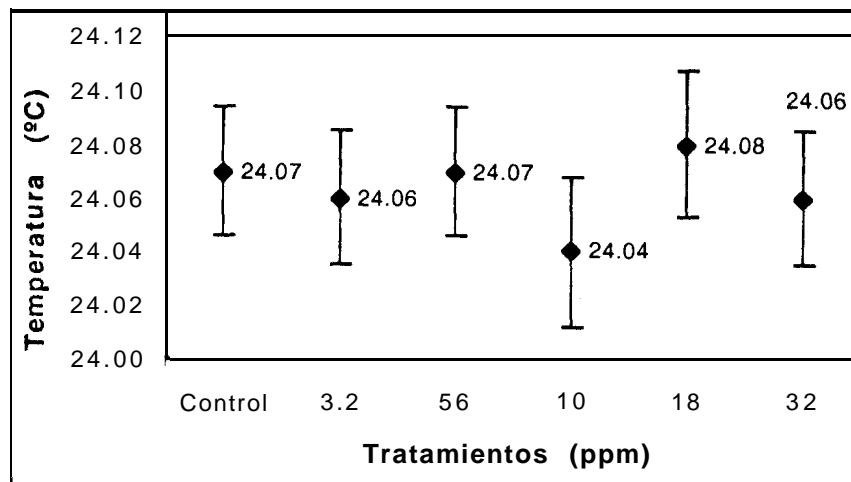


Fig. 32 Promedio desv. stand. de la temperatura durante el experimento con Hidróxido de calcio.

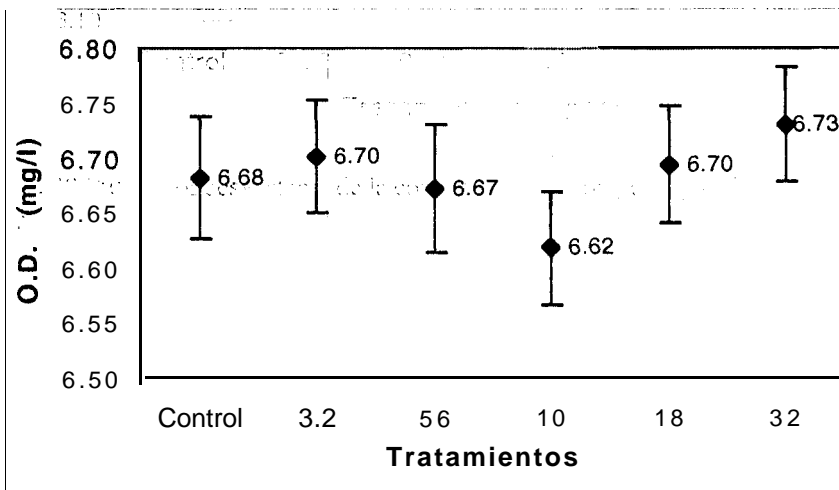


Fig. 33 Promedio  $\pm$  desv. stand. de la concentración de oxígeno disuelto durante el experimento con Hidróxido de calcio.

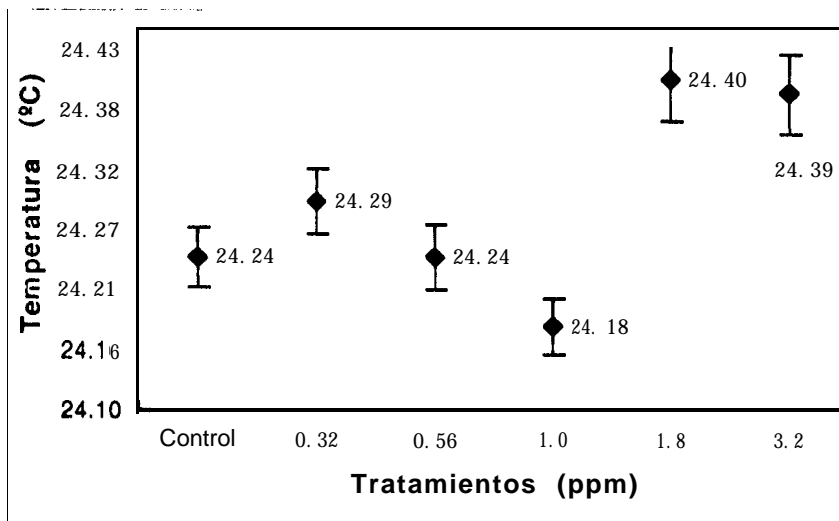


Fig. 37 Promedio  $\pm$  desv. stand. de la temperatura durante el experimento con Cloruro de amonio.

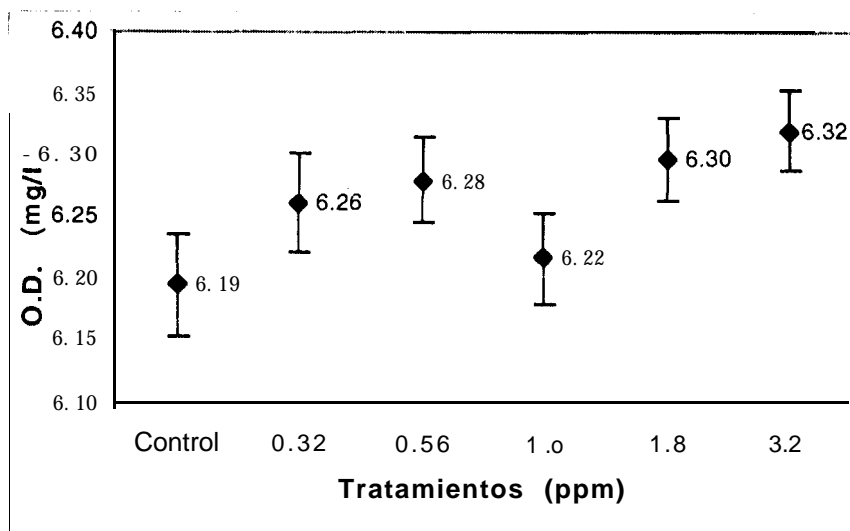


Fig. 38 Promedio  $\pm$  desv. stand. de la concentración de oxígeno disuelto durante el experimento con Cloruro de amonio.

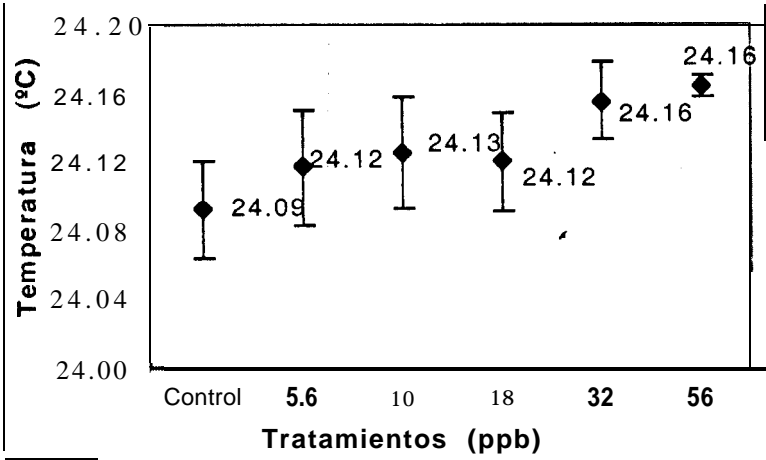


Fig.40. Promedio desv. stand. de la temperatura durante el experimento con Rotenona.

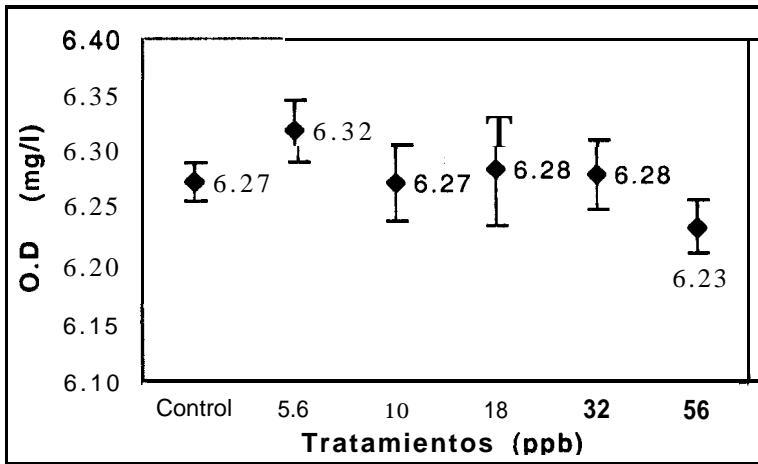


Fig.41 Promedio desv. stand. de la concentración de oxígeno disuelto durante el experimento con Rotenona.

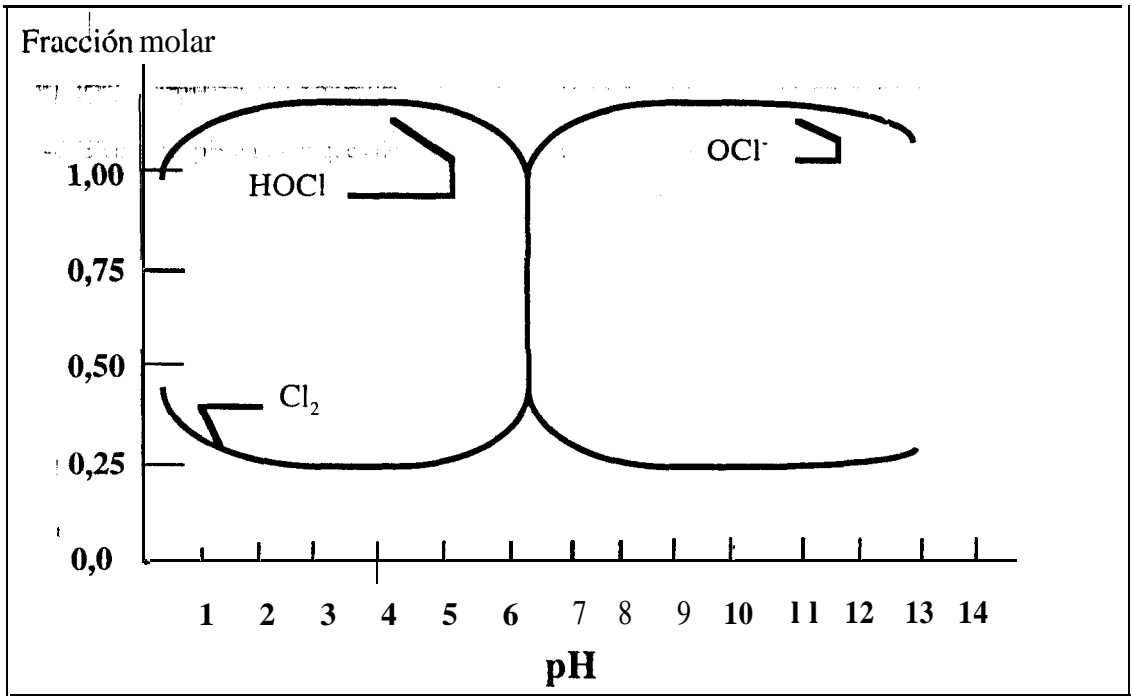


Fig 44. Efectos del pH sobre la proporción relativa de HOCl y OCl<sup>-</sup>. Tomado de Boyd, 1990.

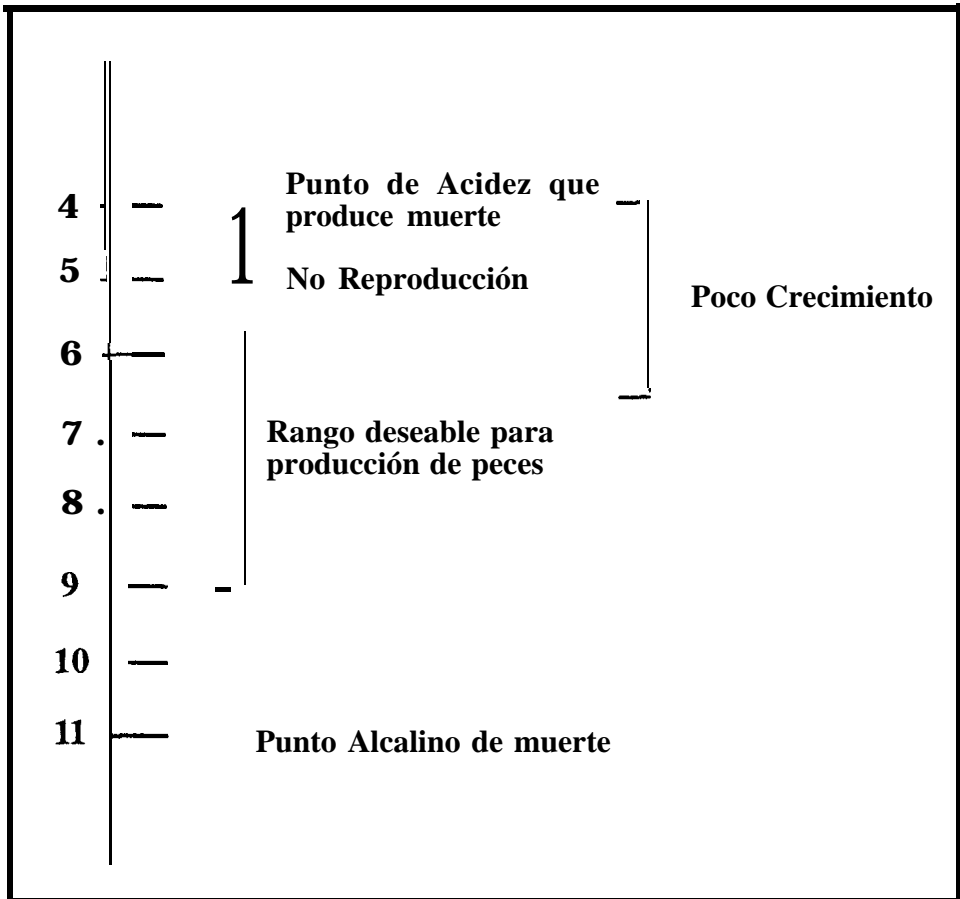


Fig 45 Efecto del pH en estanques de peces de agua caliente. Después de Swinglc (1969).

## Anexo 1.- Distribución de los tratamientos y réplicas

Tabla 3. Ordenamiento de los tratamientos y réplicas durante el primer experimento de toxicidad aguda con Carbonato de Calcio

	Tratamiento 1 (Control)	Tratamiento 2 (10 ppm)	Tratamiento 3 (50 ppm)	Tratamiento 4 (100 ppm)	Tratamiento 5 (500 ppm)	Tratamiento 6 (1000 ppm)
Réplica 1	4	2	9	3	1	6
Réplica 2	12	7	14	5	8	11
Réplica 3	13	17	18	10	15	22
Réplica 4	19	20	21	16	23	24

Tabla 4. Ordenamiento de los tratamientos y réplicas durante el segundo experimento de toxicidad aguda con Carbonato de Calcio

	Tratamiento 1 (Control)	Tratamiento 2 (1000 ppm)	Tratamiento 3 (2000 ppm)	Tratamiento 4 (3000 ppm)	Tratamiento 5 (4000 ppm)	Tratamiento 6 (5000 ppm)
Réplica 1	4	8	1	10	2	5
Réplica 2	11	12	6	15	3	7
Réplica 3	19	13	14	16	17	9
Réplica 4	22	21	23	18	20	24

Tabla 5 Ordenamiento de los tratamientos y réplicas durante el experimento con Hidróxido de Calcio

	Tratamiento 1 (Control)	Tratamiento 2 (1 ppm)	Tratamiento 3 (10 ppm)	Tratamiento 4 (50 ppm)	Tratamiento 5 (100 ppm)	Tratamiento 6 (500 ppm)
Réplica 1	7	17	1	2	6	3
Réplica 2	8	18	5	9	16	4
Réplica 3	12	21	11	14	19	10
Réplica 4	22	23	15	20	24	13

Tabla 6 Ordenamiento de los tratamientos y réplicas durante el experimento de toxicidad aguda con Cloruro de Amonio.

	Tratamiento 1 (Control)	Tratamiento 2 (2 mg/l)	Tratamiento 3 (4 mg/l)	Tratamiento 4 (6 mg/l)	Tratamiento 5 (8 mg/l)	Tratamiento 6 (10 mg/l)
<b>Réplica 1</b>	2	5	3	1	6	4
<b>Réplica 2</b>	10	7	9	8	16	17
<b>Réplica 3</b>	21	11	13	12	19	18
<b>Réplica 4</b>	22	15	14	24	20	23

Tabla 7 Ordenamiento de los tratamientos y réplicas durante el experimento de toxicidad aguda con Rotenona.

	Tratamiento 1 (Control)	Tratamiento 2 (16 ppb)	Tratamiento 3 (28 ppb)	Tratamiento 4 (50 ppb)	Tratamiento 5 (90 ppb)	Tratamiento 6 (160 ppb)
<b>Réplica 1</b>	9	3	2	7	5	1
<b>Réplica 2</b>	10	4	13	8	6	14
<b>Réplica 3</b>	16	11	18	17	15	19
<b>Réplica 4</b>	20	12	21	23	22	24

Tabla 8 Ordenamiento de los tratamientos y réplicas durante el experimento de toxicidad aguda con Urea.

	Tratamiento 1 (Control)	Tratamiento 2 (320 ppm)	Tratamiento 3 (560 ppm)	Tratamiento 4 (1000 ppm)	Tratamiento 5 (1800 ppm)	Tratamiento 6 (3200 ppm)
<b>Réplica 1</b>	12	4	6	3	1	7
<b>Réplica 2</b>	17	5	11	10	2	13
<b>Réplica 3</b>	19	9	15	18	8	21
<b>Réplica 4</b>	24	14	16	20	22	23



Tabla 9. Ordenamiento de los tratamientos y réplicas durante el experimento de toxicidad aguda con Cloro HTH (Hipoclorito de Calcio).

	<b>Tratamiento 1 (Control)</b>	<b>Tratamiento 2 (1,0 ppm)</b>	<b>Tratamiento 3 (1,8 ppm)</b>	<b>Tratamiento 4 (3.2 ppm)</b>	<b>Tratamiento 5 (5,6 ppm)</b>	<b>Tratamiento 6 (10 ppm)</b>
<b>Réplica 1</b>	14	1	2	6	7	4
<b>Réplica 2</b>	16	3	8	9	10	15
<b>Réplica 3</b>	17	5	19	11	13	20
<b>Réplica 4</b>	18	23	24	12	21	22

Tabla 10 Ordenamiento de los tratamientos y réplicas durante el experimento de toxicidad crónica con Carbonato de Calcio).

	<b>Tratamiento 1 (Control)</b>	<b>Tratamiento 2 (10 ppm)</b>	<b>Tratamiento 3 (18 ppm)</b>	<b>Tratamiento 4 (32 ppm)</b>	<b>Tratamiento 5 (56 ppm)</b>	<b>Tratamiento 6 (100 ppm)</b>
<b>Réplica 1</b>	6	3	4	1	8	2
<b>Réplica 2</b>	7	9	11	5	14	10
<b>Réplica 3</b>	15	20	12	13	21	16
<b>Réplica 4</b>	19	24	18	23	22	17

Tabla 11 Ordenamiento de los tratamientos y réplicas durante el experimento de toxicidad crónica con Hidróxido de Calcio).

	<b>Tratamiento 1 (Control)</b>	<b>Tratamiento 2 ( 3,2 ppm)</b>	<b>Tratamiento 3 (5,6 ppm)</b>	<b>Tratamiento 4 (10 ppm)</b>	<b>Tratamiento 5 (18 ppm)</b>	<b>Tratamiento 6 (32 ppm)</b>
<b>Réplica 1</b>	6	5	8	1	2	3
<b>Réplica 2</b>	16	11	9	10	4	7
<b>Réplica 3</b>	23	14	15	12	17	13
<b>Réplica 4</b>	24	20	21	22	19	18

Tabla 12 Ordenamiento de los tratamientos y réplicas durante el experimento de toxicidad crónica con Cloruro de Amonio.

	Tratamiento 1 (Control)	Tratamiento 2 (0,32ppm)	Tratamiento 3 (0,56ppm)	Tratamiento 4 (1,0 ppm)	Tratamiento 5 (1,8 ppm)	Tratamiento 6 (3,2 ppm)
Réplica 1	9	8	3	14	2	1
Réplica 2	20	10	13	15	5	4
Réplica 3	22	16	18	17	7	6
Réplica 4	23	21	18	24	12	11

Tabla 13 Ordenamiento de los tratamientos y réplicas durante el experimento con Rotenona.

	Tratamiento 1 (Control)	Tratamiento 2 (5,6 ppb)	Tratamiento 3 (10 ppb)	Tratamiento 4 (18 ppb)	Tratamiento 5 (32 ppb)	Tratamiento 6 (56 ppb)
Réplica 1	3	1	8	2	12	13
Réplica 2	4	10	11	6	18	17
Réplica 3	5	14	16	9	19	20
Réplica 4	7	22	24	15	23	21

FECHA	totales			totales			totales			totales			totales			totales		
	Fj.	Tot.	%	Fj.	Tot.	%	Fj.	Tot.	%	Fj.	Tot.	%	Fj.	Tot.	%	Fj.	Tot.	%
	Control			10 ppm			18 ppm			32 ppm			56 ppm			100 ppm		
30-ago	40	40	100%	40	40	100%	40	40	100%	40	40	100%	40	40	100%	40	40	100%
31-ago	33	40	83%	40	40	100%	39	40	98%	40	40	100%	39	40	98%	40	40	100%
1-sep	37	40	93%	39	40	98%	40	40	100%	39	40	98%	37	40	93%	40	40	100%
2-sep	39	40	98%	39	40	98%	40	40	100%	34	40	85%	38	40	95%	39	40	98%
3-sep	40	40	100%	38	40	95%	40	40	100%	40	40	100%	39	40	98%	40	40	100%
4-sep	40	40	100%	38	40	95%	37	39	95%	38	40	95%	40	40	100%	39	40	98%
5-sep	36	40	90%	39	40	98%	39	39	100%	39	40	98%	40	40	100%	39	40	98%
6-sep	38	40	95%	37	39	95%	35	39	90%	37	40	93%	36	40	90%	38	40	95%
7-sep	38	40	95%	38	39	97%	36	39	92%	35	39	90%	36	40	90%	39	40	98%
8-sep	38	40	95%	35	39	90%	39	39	100%	37	39	95%	36	40	90%	39	40	98%
9-sep	34	40	85%	38	39	97%	37	39	95%	36	39	92%	37	40	93%	37	40	93%
10-sep	39	40	98%	38	39	97%	38	39	97%	33	39	85%	40	40	100%	37	40	93%
11-sep	39	40	98%	36	39	92%	37	39	95%	39	39	100%	40	40	100%	38	40	95%
12-sep	40	40	100%	38	39	97%	37	39	95%	36	39	92%	40	40	100%	38	40	95%
13-sep	37	40	93%	38	39	97%	39	39	100%	38	39	97%	36	40	90%	38	40	95%
14-sep	35	40	88%	34	39	87%	38	39	97%	34	39	87%	35	40	88%	40	40	100%
15-sep	33	40	83%	35	39	90%	35	39	90%	36	39	92%	34	40	85%	39	40	98%
16-sep	30	40	75%	34	39	87%	30	39	77%	32	39	82%	36	40	90%	28	40	70%
17-sep	39	40	98%	34	39	87%	37	39	95%	34	39	87%	37	40	93%	37	40	93%
18-sep	37	40	93%	36	39	92%	36	39	92%	35	39	90%	35	40	88%	33	40	83%
19-sep	35	40	88%	35	39	90%	35	39	90%	32	39	82%	30	40	75%	31	40	78%
20-sep	35	40	88%	35	39	90%	36	38	95%	35	39	90%	30	40	75%	30	40	75%
21-sep	38	40	95%	35	39	90%	36	38	95%	35	39	90%	35	40	88%	33	39	85%
22-sep	37	40	93%	34	39	87%	36	38	95%	37	39	95%	35	40	88%	35	39	90%
23-sep	34	40	85%	33	39	85%	31	38	82%	37	39	95%	35	40	88%	32	39	82%
24-sep	35	39	90%	35	39	90%	29	36	81%	32	39	82%	35	40	88%	32	39	82%
25-sep	34	39	87%	36	39	92%	32	36	89%	35	39	90%	30	40	75%	32	39	82%
26-sep	34	39	87%	34	39	87%	34	36	94%	36	39	92%	30	40	75%	32	39	82%
27-sep	32	38	84%	34	39	87%	35	36	97%	37	39	95%	29	40	73%	33	39	85%
28-sep	29	38	76%	28	39	72%	27	36	75%	31	37	84%	29	40	73%	32	37	86%

Tabla 2.5. Número de animales fijados, animales totales y porcentaje de fijación diario usando Carbonato de Calcio.

Fj.: animales fijados

Tot.: animales totales

%.: porcentaje de fijación

FECHA	totales			totales			totales			totales			totales				
	Fj.	Tot.	%	Fj.	Tot.	%	Fj.	Tot.	%	Fj.	Tot.	%	Fj.	Tot.	%		
	Control			3,2 ppm			5,6 ppm			10 ppm			18 ppm			32 ppm	
30-ago	40	40	100%	40	40	100%	40	40	100%	40	40	100%	40	40	100%		
31-ago	38	40	95%	40	40	100%	40	40	100%	40	40	100%	40	40	100%		
1-sep	40	40	100%	38	40	95%	40	40	100%	40	40	100%	36	40	90%		
2-sep	37	40	93%	40	40	100%	39	40	98%	39	40	98%	38	40	95%		
3-sep	40	40	100%	40	40	100%	40	40	100%	40	40	100%	40	40	100%		
4-sep	39	40	98%	40	40	100%	40	40	100%	38	40	95%	40	40	100%		
5-sep	38	40	95%	39	40	98%	39	40	98%	36	40	90%	37	40	93%		
6-sep	38	40	95%	40	40	100%	40	40	100%	39	40	98%	37	40	93%		
7-sep	38	40	95%	40	40	100%	40	40	100%	39	40	98%	39	40	98%		
8-sep	39	40	98%	39	40	98%	37	40	93%	38	40	95%	38	40	95%		
9-sep	28	40	70%	30	40	75%	28	40	70%	31	40	78%	33	40	83%		
10-sep	36	40	90%	37	40	93%	36	40	90%	38	40	95%	37	40	93%		
11-sep	40	40	100%	39	40	98%	38	40	95%	38	40	95%	39	40	98%		
12-sep	38	40	95%	36	40	90%	39	40	98%	39	40	98%	39	40	98%		
13-sep	38	40	95%	35	40	88%	38	40	95%	35	40	88%	38	40	95%		
14-sep	37	39	95%	36	40	90%	37	40	93%	39	40	98%	35	40	88%		
15-sep	34	39	87%	35	40	88%	34	40	85%	34	40	85%	38	40	95%		
16-sep	36	39	92%	37	40	93%	36	40	90%	37	40	93%	34	40	85%		
17-sep	36	39	92%	38	40	95%	33	40	83%	33	40	83%	39	40	98%		
18-sep	35	39	90%	31	40	78%	36	40	90%	35	40	88%	35	40	88%		
19-sep	38	39	97%	34	40	85%	34	40	85%	31	40	78%	35	40	88%		
20-sep	38	39	97%	34	40	85%	34	40	85%	30	39	77%	37	40	93%		
21-sep	38	39	97%	34	40	85%	34	40	85%	33	39	85%	34	40	85%		
22-sep	39	39	100%	34	40	85%	34	40	85%	34	39	87%	34	40	85%		
23-sep	38	39	97%	38	40	95%	33	40	83%	32	38	84%	39	40	98%		
24-sep	38	39	97%	36	40	90%	35	40	88%	35	38	92%	37	40	93%		
25-sep	35	39	90%	34	40	85%	35	40	88%	35	38	92%	39	40	98%		
26-sep	35	39	90%	35	40	88%	35	40	88%	35	38	92%	35	39	90%		
27-sep	33	39	85%	35	40	88%	35	40	88%	37	38	97%	34	39	87%		
28-sep	34	39	87%	34	40	85%	29	40	73%	30	38	79%	34	39	87%		

Tabla 26. Número de animales fijados, animales totales y porcentaje de fijación diario usando Cal-P24.

Fj.: animales fijados

Tot.: animales totales

%: porcentaje de fijación

Figura 29. Gráficos de porcentaje de fijación vs tiempo utilizando Carbonato de Calcio.

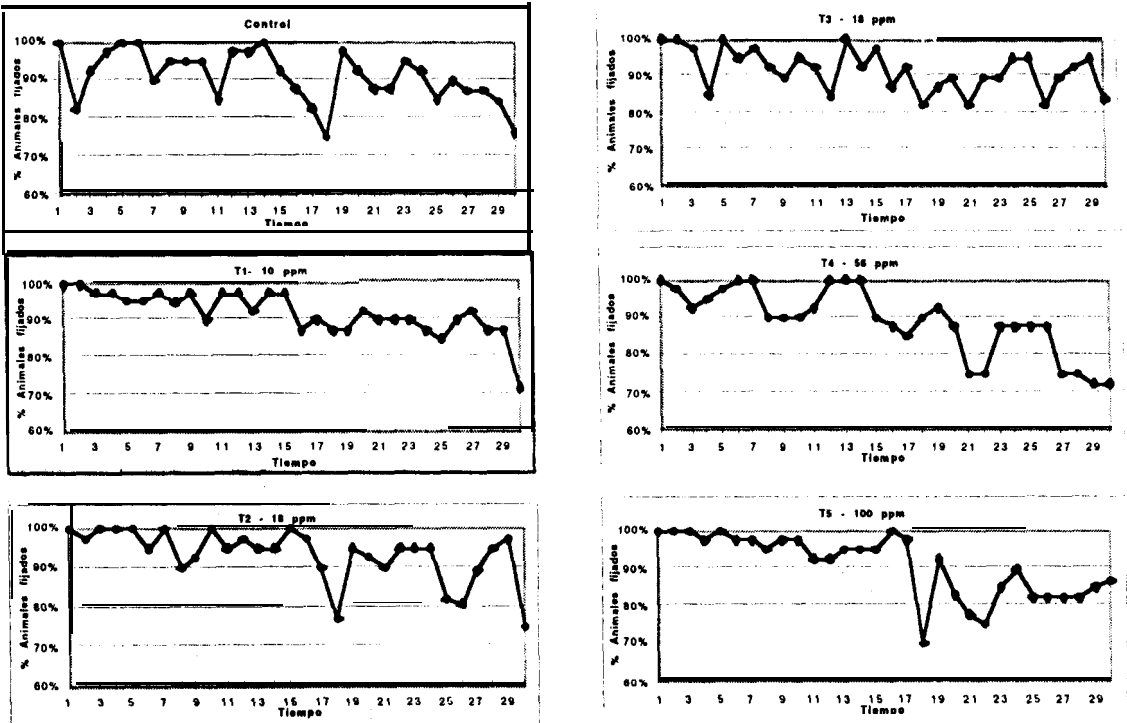


Figura 29. Gráficos de porcentaje de fijación vs tiempo utilizando Carbonato de Calcio.

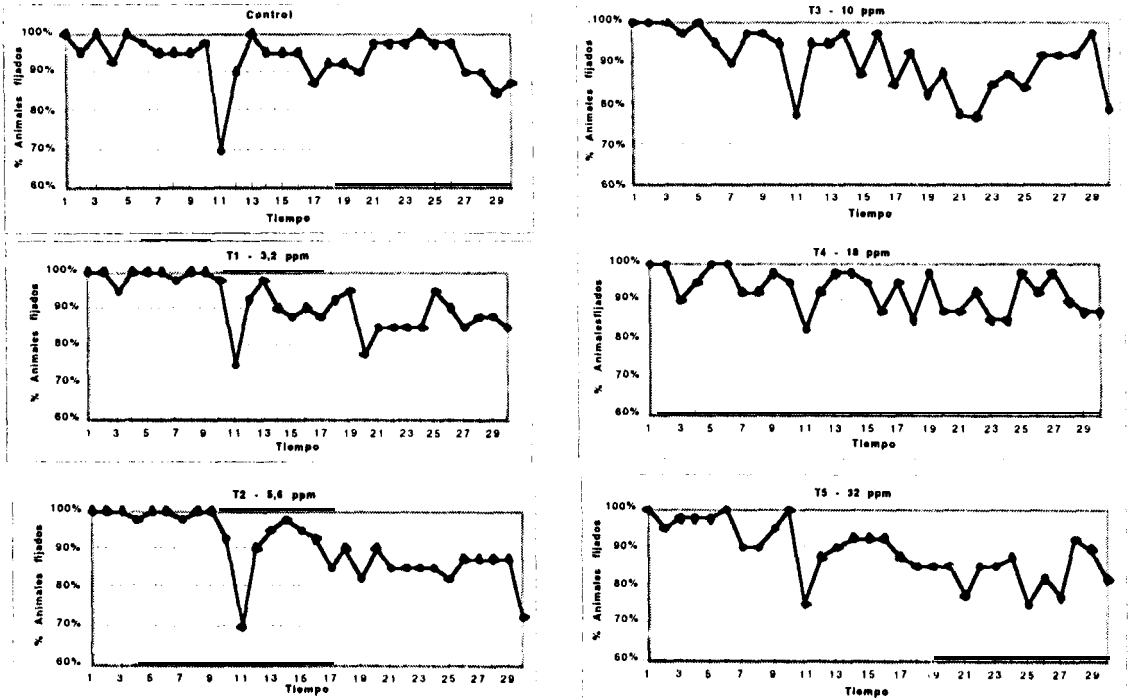


Figura 34. Gráficos de porcentaje de fijación vs tiempo utilizando Cal-P24.

FECHA	totales			totales			totales			totales			totales				
	Fj.	Tot.	%	Fj.	Tot.	%	Fj.	Tot.	%	Fj.	Tot.	%	Fj.	Tot.	%		
	control			0,32 ppm			0,56 ppm			1,0 ppm			1,8 ppm			3,2 ppm	
29-sep	40	40	100%	40	40	100%	40	40	100%	40	40	100%	40	40	100%		
30-sep	38	40	95%	40	40	100%	39	40	98%	40	40	100%	39	40	98%		
1-oct	39	40	98%	40	40	100%	39	40	98%	40	40	100%	39	40	98%		
2-oct	39	40	98%	40	40	100%	39	40	98%	40	40	100%	39	40	98%		
3-oct	40	40	100%	36	40	90%	40	40	100%	40	40	100%	39	40	98%		
4-oct	40	40	100%	39	40	98%	38	40	95%	35	40	88%	37	40	93%		
5-oct	40	40	100%	39	40	98%	34	40	85%	36	40	90%	37	40	93%		
6-oct	36	40	90%	39	40	98%	36	40	90%	37	40	93%	37	40	93%		
7-oct	39	40	98%	39	40	98%	35	40	88%	37	39	95%	38	39	97%		
8-oct	37	40	93%	35	40	88%	39	40	98%	38	39	97%	37	39	95%		
9-oct	36	40	90%	35	40	88%	35	40	88%	35	39	90%	36	39	92%		
10-oct	39	40	98%	35	40	88%	39	40	98%	35	39	90%	36	39	92%		
11-oct	35	40	88%	35	40	88%	36	40	90%	32	39	82%	37	39	95%		
12-oct	40	40	100%	39	40	98%	38	40	95%	36	39	92%	37	39	95%		
13-oct	40	40	100%	39	40	98%	38	40	95%	36	39	92%	37	39	95%		
14-oct	39	40	98%	39	40	98%	38	40	95%	36	39	92%	38	39	97%		
15-oct	39	40	98%	39	40	98%	38	40	95%	37	39	95%	38	39	97%		
16-oct	40	40	100%	39	40	98%	38	40	95%	37	39	95%	38	39	97%		
17-oct	40	40	100%	39	40	98%	38	40	95%	39	39	100%	36	39	92%		
18-oct	40	40	100%	37	40	93%	37	40	93%	37	39	95%	34	38	89%		
19-oct	36	40	90%	37	40	93%	30	39	77%	35	39	90%	34	37	92%		
20-oct	37	40	93%	37	40	93%	37	39	95%	34	39	87%	32	37	86%		
21-oct	39	40	98%	38	40	95%	36	39	92%	38	39	97%	34	37	92%		
22-oct	39	40	98%	38	40	95%	37	39	95%	38	39	97%	34	37	92%		
23-oct	38	40	95%	37	40	93%	37	39	95%	38	39	97%	34	37	92%		
24-oct	38	40	95%	37	40	93%	38	39	97%	37	39	95%	34	37	92%		
25-oct	35	40	88%	35	40	88%	35	38	92%	35	39	90%	32	36	89%		
26-oct	30	38	79%	35	40	88%	27	39	69%	29	39	74%	30	35	86%		
27-oct	32	37	86%	29	40	73%	31	39	79%	27	39	69%	30	34	88%		
28-oct	29	37	78%	31	38	82%	32	38	84%	32	39	82%	25	33	76%		

Tabla 27. Número de animales fijados, animales totales y porcentaje de fijación diario usando Cloruro de amonio.

Fj.: animales fijados

Tot.: animales totales

Yo: porcentaje de fijación

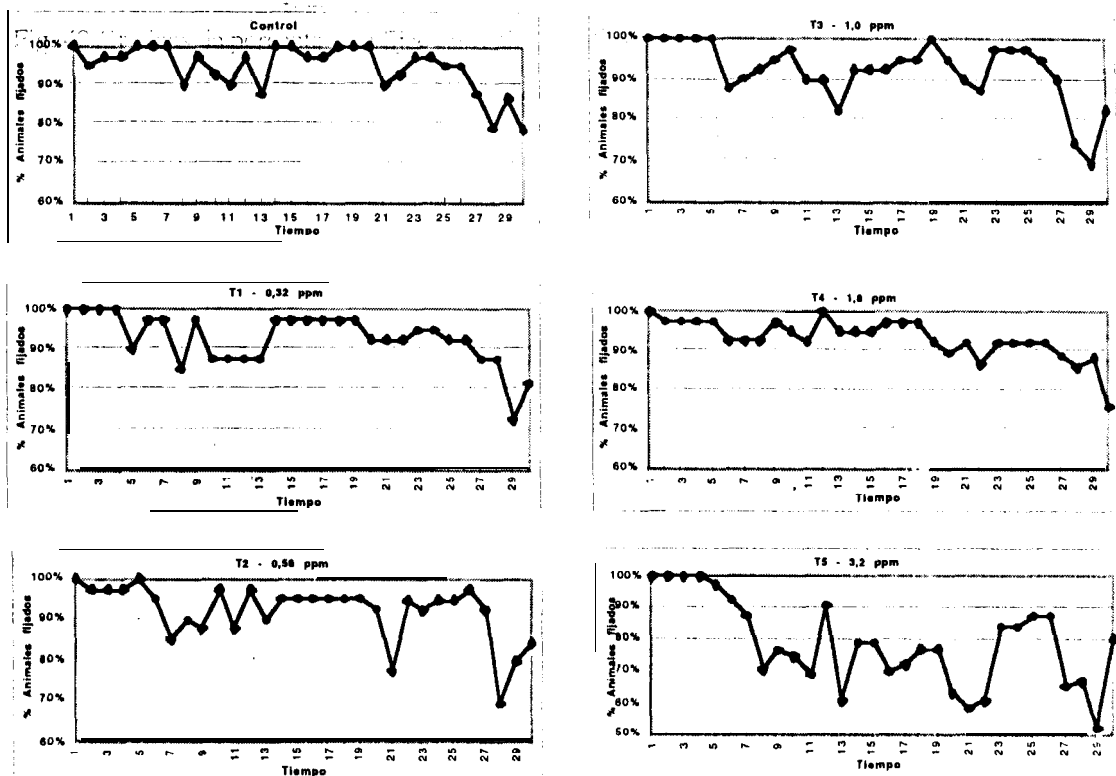


Fig. 39. Gráficos de porcentaje de fijación vs tiempo utilizando Cloruro de amonio.

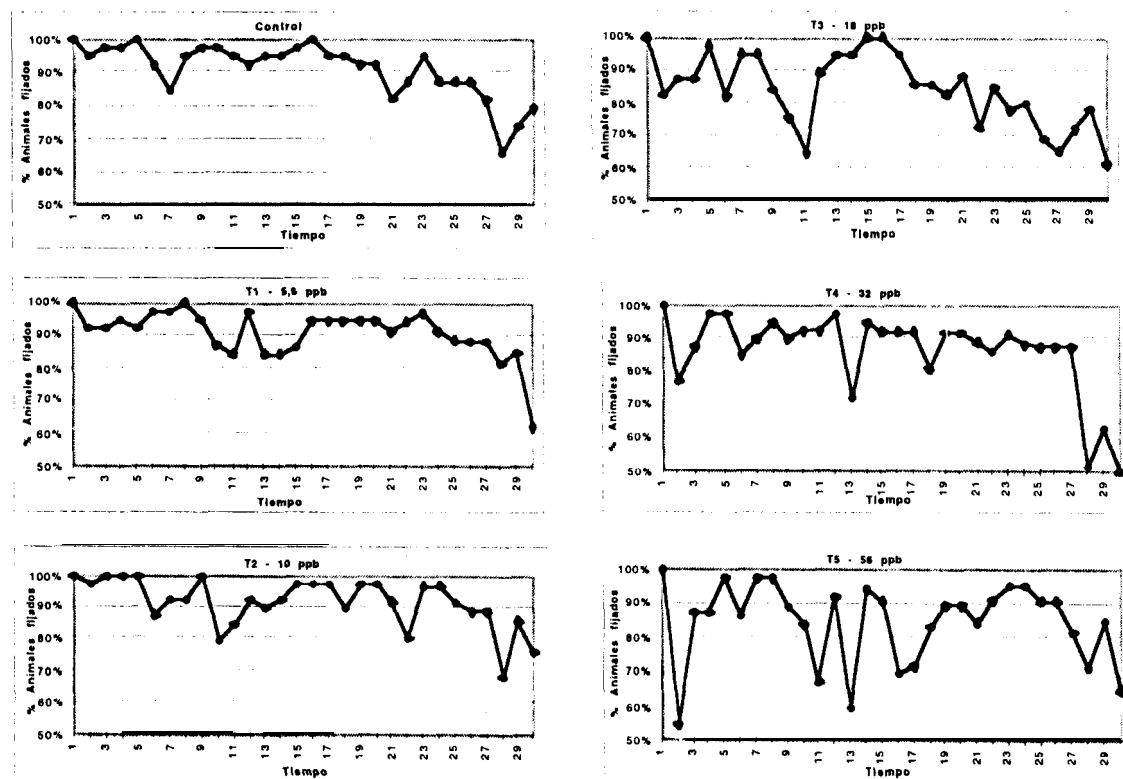


Fig. 42. Gráficos de porcentaje de fijación vs tiempo utilizando Ketenona.

FECHA	totales			totales			totales			totales			totales				
	Fj.	Tot.	%	Fj.	Tot.	%	Fj.	Tot.	%	Fj.	Tot.	%	Fj.	Tot.	%		
	Control			5,6 ppb			10 ppb			18 ppb			32 ppb			56 ppb	
28-sep	40	40	100%	40	40	100%	40	40	100%	40	40	100%	40	40	100%		
29-sep	38	40	95%	37	40	93%	39	40	98%	33	40	83%	31	40	78%		
30-sep	39	40	98%	37	40	93%	40	40	100%	35	40	88%	35	40	88%		
1-oct	39	40	98%	38	40	95%	40	40	100%	35	40	88%	39	40	98%		
2-oct	40	40	100%	37	40	93%	40	40	100%	39	40	98%	39	40	98%		
3-oct	37	40	93%	39	40	98%	35	40	88%	32	39	82%	34	40	85%		
4-oct	34	40	85%	38	39	97%	37	40	93%	37	39	95%	36	40	90%		
5-oct	38	40	95%	39	39	100%	37	40	93%	37	39	95%	38	40	95%		
6-oct	39	40	98%	37	39	95%	39	39	100%	32	38	84%	36	40	90%		
7-oct	39	40	98%	34	39	87%	31	39	79%	28	37	76%	37	40	93%		
8-oct	38	40	95%	33	39	85%	33	39	85%	24	37	65%	37	40	93%		
9-oct	37	40	93%	38	39	97%	36	39	92%	33	37	89%	39	40	98%		
10-oct	38	40	95%	33	39	85%	35	39	90%	34	36	94%	29	40	73%		
11-oct	38	40	95%	33	39	85%	36	39	92%	34	36	94%	37	39	95%		
12-oct	39	40	98%	33	38	87%	38	39	97%	36	36	100%	35	38	92%		
13-oct	40	40	100%	36	38	95%	38	39	97%	36	36	100%	35	38	92%		
14-oct	38	40	95%	36	38	95%	38	39	97%	34	36	94%	35	38	92%		
15-oct	38	40	95%	36	38	95%	35	39	90%	30	35	86%	30	37	81%		
16-oct	37	40	93%	35	37	95%	37	38	97%	30	35	86%	34	37	92%		
17-oct	37	40	93%	35	37	95%	37	38	97%	29	35	83%	34	37	92%		
18-oct	33	40	83%	32	35	91%	34	37	92%	30	34	88%	32	36	89%		
19-oct	35	40	88%	33	35	94%	29	36	81%	24	33	73%	31	36	86%		
20-oct	38	40	95%	34	35	97%	34	35	97%	27	32	84%	32	35	91%		
21-oct	35	40	88%	32	35	91%	34	35	97%	25	32	78%	30	34	88%		
22-oct	35	40	88%	31	35	89%	32	35	91%	24	30	80%	28	32	88%		
23-oct	34	39	87%	30	34	88%	31	35	89%	20	29	69%	28	32	88%		
24-oct	32	39	82%	30	34	88%	31	35	89%	19	29	66%	28	32	88%		
25-oct	26	39	67%	27	33	82%	24	35	69%	21	29	72%	16	31	52%		
26-oct	29	39	74%	28	33	85%	30	35	86%	22	28	79%	19	30	63%		
27-oct	31	39	79%	20	32	63%	25	33	76%	16	26	62%	15	30	50%		

Tabla 2X. Número de animales fijados, animales totales y porcentaje de fijación diario usando Rotenona.

Fj.: animales fijados

Tot.: animales totales

%: porcentaje de fijación



Tabla 29. Análisis ANOVA de las mortalidades del ensayo de toxicidad crónica de Carbonato de calcio

DESIGN

Dependent variables

**Name Code**

**Data Dta**

Type of analysis: OLS ANOVA

**Factors**

<b>Name</b>	<b>Code</b>	<b>Nested in</b>	<b>F/R</b>	<b>Kind</b>
<b>Groups</b>	<b>Grp</b>	<b>0</b>	<b>Fix</b>	<b>Disc</b>

Partial (Type 3) Sums of Squares

Interactions up to 1 - way

No Modifications

**RESULTS**

General **Results**

**24 total cases**

**ANOVA**

Analysis of Variance For Data  
No Selector

Source	df	Sums of Squares	Mean Square	F-ratio	Prob
<b>Const</b>	<b>1</b>	<b>0,033750</b>	<b>0,033750</b>	<b>11,571</b>	<b>0.0032</b>
<b>Grp</b>	<b>5</b>	<b>0,023750</b>	<b>0,004750</b>	<b>1,6286</b>	<b>3.2032</b>
<b>Error</b>	<b>18</b>	<b>0,052500</b>	<b>0,002917</b>		
<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>0,076250</b>			

**Results** for factor **Grp**

**Coefficients**

**Expected Cell Means**

**Scheffe Post Hoc Tests**

	Difference	std. err.	Prob
T1 - CONTROL	-0,025000	0,0382	0,993590
T2 - CONTROL	0,050000	0,0382	0,880117
T2 - T1	0,075000	0,0382	0,582597
T3 - CONTROL	-0,025000	0,0382	0,993590
<b>T3 - T1</b>	<b>-0,000000</b>	<b>0,0382</b>	<b>1</b>
<b>T3 - T2</b>	<b>-0,075000</b>	<b>0,0382</b>	<b>0,582597</b>
T4 - CONTROL	-0,050000	0,0382	0,880117
T4 - T1	-0,025000	0,0382	0,993590
T4 - T2	-0,100000	0,0382	0,281137
T4 - T3	-0,025000	0,0382	0,993590
T5 - CONTROL	-0,025000	0,0382	0,993590
T5 - T1	0	0,0382	1
T5 - T2	-0,075000	0,0382	0,582597
<b>T5 - T3</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,0382</b>	<b>1</b>
<b>T5 - T4</b>	<b>0,025000</b>	<b>0,0382</b>	<b>0,993590</b>

Tabla 30 Análisis ANOVA de las tallas del ensayo de toxicidad crónica de Carbonato de calcio .

**DESIGN**

**Dependent variables**

**Name Code**  
Data Dta

Type of analysis: OLS ANOVA

**Factors**

**Name Code Nested in F/R Kind**  
Groups Grp 0 Fix Disc

Partial (Type 3) Sums of Squares

Interactions up to 1 - way

**No Modifications**

**RESULTS**

**General Results**

24 total cases

**ANOVA**

Analysis of Variance For Data  
No Selector

Source	df	Sums of Squares	Mean Square	F-ratio	Prob
Const	1	2412,02	2412,02	63847	≤ 0,0001
Grp	5	0,205000	0,041000	1,0853	0,4017
Error	18	0,680000	0,037778		
Total	23	0,885000			

**Results for factor Grp**

Coefficients

Expected Cell Means

Scheffe Post Hoc Tests

	Difference	std. err.	Prob
TRAT. 1 - CONTROL	0,200000	0,1374	0,826255
TRAT. 2 - CONTROL	0,250000	0,1374	0,656986
TRAT. 2 - TRAT. 1	0,050000	0,1374	0,999612
TRAT. 3 - CONTROL	0,050000	0,1374	0,999612
TRAT. 3 - TRAT. 1	-0,150000	0,1374	0,940375
TRAT. 3 - TRAT. 2	-0,200000	0,1374	0,826255
TRAT. 4 - CONTROL	0,025000	0,1374	0,999987
TRAT. 4 - TRAT. 1	-0,175000	0,1374	0,891788
TRAT. 4 - TRAT. 2	-0,225000	0,1374	0,746424
TRAT. 4 - TRAT. 3	-0,025000	0,1374	0,999987
TRAT. 5 - CONTROL	0,075000	0,1374	0,997266
TRAT. 5 - TRAT. 1	-0,125000	0,1374	0,972083
TRAT. 5 - TRAT. 2	-0,175000	0,1374	0,891788
TRAT. 5 - TRAT. 3	0,025000	0,1374	0,999987
TRAT. 5 - TRAT. 4	0,050000	0,1374	0,999612

Tabla 3 1. Análisis ANOVA de las de las mortalidades. del ensayo de toxicidad crónica de Hidróxido de calcio .

#### DESIGN

##### Dependent variables

**Name Code**

Data Dta

Type of analysis: OLS ANOVA

##### Factors

**Name Code Nested in F/R Kind**

Groups Grp 0 Fix Disc

Partial (Type 3) Sums of Squares

Interactions up to 1 - way

No Modifications

#### RESULTS

##### General Results

24 total cases

##### ANOVA

Analysis of Variance For Data

No Selector

Source	df	Sums of Squares	Mean Square	F-ratio	Prob
Const	1	0,015000	0,015000	7,7143	0,0124
Grp	5	0,010000	0,002000	1,0286	0,4305
Error	18	0,035000	0,001944		
Total	23	0,045000			

##### Results for factor Grp

Coefficients

Expected Cell Means

Scheffe Post Hoc Tests

	Difference	std. err.	Prob
T1 - CONTROL	-0,025000	0,0312	0,983913
T2 - CONTROL	-0,025000	0,0312	0,983913
T2 - T1	0	0,0312	1
T3 - CONTROL	0,025000	0,0312	0,983913
T3 - T1	0,050000	0,0312	0,762029
T3 - T2	0,050000	0,0312	0,762029
T4 - CONTROL	0	0,0312	1
T4 - T1	0,025000	0,0312	0,983913
T4 - T2	0,025000	0,0312	0,983913
T4 - T3	-0,025000	0,0312	0,983913
T5 - CONTROL	0,025000	0,0312	0,983913
T5 - T1	0,050000	0,0312	0,762029
T5 - T2	0,050000	0,0312	0,762029
T5 - T3	-0,000000	0,0312	1
T5 - T4	0,025000	0,0312	0,983913

Tabla 32. Análisis ANOVA de las tallas del ensayo de toxicidad crónica de Hidróxido de calcio .

**DESIGN**

**Dependent variables**

**Name Code**

Data Dta

Type of analysis: OLS ANOVA

**Factors**

**Name Code Nested in F/R Kind**  
Groups Grp 0 Fix Disc

Partial (Type 3) Sums of Squares

Interactions up to 1 - way

No Modifications

**RESULTS**

**General Results**

24 total cases

**ANOVA**

Analysis of Variance For Data  
No Selector

Source	df	Sums of Squares	Mean Square	F-ratio	Prob
Const	1	2408,01	2408,01	114083	≤ 0,0001
Grp	5	0,213333	0,042667	2,0211	0,1241
Error	18	0,380000	0,021111		
Total	23	0,593333			

**Results for factor Grp**

Coefficients

Expected Cell Means

Scheffe Post Hoc Tests

	Diference	std. err.	Prob
TRAT. 1 - CONTROL	0,225000	0,1027	0,468114
TRAT. 2 - CONTROL	0,075000	0,1027	0,989443
TRAT. 2 - TRAT. 1	-0,150000	0,1027	0,824323
TRAT. 3 - CONTROL	0,250000	0,1027	0,355465
TRAT. 3 - TRAT. 1	0,025000	0,1027	0,999946
TRAT. 3 - TRAT. 2	0,175000	0,1027	0,714694
TRAT. 4 - CONTROL	0,025000	0,1027	0,999946
TRAT. 4 - TRAT. 1	-0,200000	0,1027	0,591515
TRAT. 4 - TRAT. 2	-0,050000	0,1027	0,998415
TRAT. 4 - TRAT. 3	-0,225000	0,1027	0,468114
TRAT. 5 - CONTROL	0,125000	0,1027	0,908790
TRAT. 5 - TRAT. 1	-0,100000	0,1027	0,962760
TRAT. 5 - TRAT. 2	0,050000	0,1027	0,998415
TRAT. 5 - TRAT. 3	-0,125000	0,1027	0,908790
TRAT. 5 - TRAT. 4	0,100000	0,1027	0,962760

Tabla 33. Análisis ANOVA de las de las mortalidades del ensayo de toxicidad crónica de Cloruro de amonio .

**DESIGN**

Dependent variables

**Name Code**  
Data Dta

Type of analysis: OLS ANOVA

**Factors**

**Name Code Nested In F/R Kind**  
Groups Grp 0 Fix Disc

Partial (Type 3) Sums of Squares

Interactions up to 1 - way

No Modifications

**RESULTS**

General Results

24 total cases

**ANOVA**

Analysis of Variance For Data  
No Selector

Source	df	Sums of Squares	Mean Square	F-ratio	Prob
Const	1	0,742017	0,742017	102,98	≤ 0,0001
Grp	5	1,27508	0,255017	35,392	≤ 0,0001
Error	18	0,129700	0,007206		
Total	23	1,40478			

**Results for factor Grp**

Coefficients

Expected Cell Means

Scheffe Post Hoc Tests

	Difference	std. err.	Prob
T1 - CONTROL	-0,025000	0,0600	0,999251
T2 - CONTROL	-0,025000	0,0600	0,999251
T2 - T1	0,000000	0,0600	1
T3 - CONTROL	-0,050000	0,0600	0,980950
T3 - T1	-0,025000	0,0600	0,999251
T3 - T2	-0,025000	0,0600	0,999251
T4 - CONTROL	0,100000	0,0600	0,732712
T4 - T1	0,125000	0,0600	0,521845
T4 - T2	0,125000	0,0600	0,521845
T4 - T3	0,150000	0,0600	0,327854
T5 - CONTROL	0,605000	0,0600	0,000001
T5 - T1	0,630000	0,0600	0,000000
T5 - T2	0,630000	0,0600	0,000000
T5 - T3	0,655000	0,0600	0,000000
T5 - T4	0,505000	0,0600	0,000011

Tabla 34. Análisis ANOVA de las tallas del ensayo de toxicidad crónica de Cloruro de amonio.

**DESIGN**

**Dependent variables**

**N e m e Code**

Data Dta

Type of analysis: OLS ANOVA

**Factors**

**Name Code Nested in F/R Kind**

Groups Grp (,) Fix Disc

Partial (Type 3) Sums of Squares

Interactions up to 1 - way

**No Modifications**

**RESULTS**

**General Fresults**

24 total cases

**ANOVA**

Analysis of Variance For Data

No Selector

Source	df	Sums of Squares	Mean Square	F-ratio	Prob
Const	1	2434,12	2434,12	91757	≤ 0,0001
Grp	5	0,112083	0,022417	0,84503	0,5356
Error	18	0,477500	0,026528		
Total	23	0,589583			

**Resulte for factor Grp**

Coefficients

Expected Cell Means

Scheffe Post Hoc Tests

	Difference	std. err.	Prob
TRAT. 1 - CONTROL	-0,150000	0,1152	0,882397
TRAT. 2 - CONTROL	-0,050000	0,1152	0,999085
TRAT. 2 - TRAT. 1	0,100000	0,1152	0,977157
TRAT. 3 - CONTROL	-0,125000	0,1152	0,941692
TRAT. 3 - TRAT. 1	0,025000	0,1152	0,999970
TRAT. 3 - TRAT. 2	-0,075000	0,1152	0,993744
TRAT. 4 - CONTROL	0,050000	0,1152	0,999085
TRAT. 4 - TRAT. 1	0,200000	0,1152	0,698358
TRAT. 4 - TRAT. 2	0,100000	0,1152	0,977157
TRAT. 4 - TRAT. 3	0,175000	0,1152	0,799464
TRAT. 5 - CONTROL	-0,050000	0,1152	0,999085
TRAT. 5 - TRAT. 1	0,100000	0,1152	0,977157
TRAT. 5 - TRAT. 2	-0,000000	0,1152	
TRAT. 5 - TRAT. 3	0,075000	0,1152	0,993744
TRAT. 5 - TRAT. 4	-0,100000	0,1152	0,977157

Tabla 35. Análisis ANOVA de las de las mortalidades del ensayo de toxicidad crónica de Rotenona .

**DESIGN**

Dependent variables

**Name Code**  
Data Dta

Type of analysis: OLS ANOVA

**Factors**

**Name Code Nested in F/R Kind**  
Groups Grp 0 Fix Disc

Partial (Type 3) Sums of Squares

Interactions up to 1 - way

**No Modifications**

**RESULTS**

**General Results**

24 total cases

**ANOVA**

Analysis of Variance For Data  
No Selector

Source	df	Sums of Squares	Mean Square	F-ratio	Prob
Const	1	1,56570	1,56570	133,05	≤ 0,0001
Grp	5	0,577571	0,115514	9,8159	0,0001
Error	16	0,211825	0,011768		
Total	23	0,789396			

**Results for factor Grp**

Coefficients

Expected Cell Means

Scheffe Post Hoc Tests

	Difference	std. err.	Prob
<b>T1 - CONTROL</b>	0,175000	0,0767	0,424079
<b>I-2 - CONTROL</b>	0,150000	0,0767	0,586966
<b>T2 - T1</b>	-0,025000	0,0767	0,999774
<b>T3 - CONTROL</b>	0,332500	0,0767	0,016633
<b>T3 - T1</b>	0,157500	0,0767	0,536747
<b>T3 - T2</b>	0,182500	0,0767	0,379192
<b>T4 - CONTROL</b>	0,227500	0,0767	0,172290
<b>T4 - T1</b>	0,052500	0,0767	0,992133
<b>T4 - T2</b>	0,077500	0,0767	0,956487
<b>T4 - T3</b>	-0,105000	0,0767	0,859377
<b>T5 - CONTROL</b>	0,497500	0,0767	0,000300
<b>T5 - T1</b>	0,322500	0,0767	0,021135
<b>T5 - T2</b>	0,347500	0,0767	0,011575
<b>T5 - T3</b>	0,165000	0,0767	0,487386
<b>T5 - T4</b>	0,270000	0,0767	0,070961

Tabla 36. Análisis ANOVA de las tallas del ensayo de toxicidad crónica de Rotenona.

**DESIGN****Dependent variables****Name Code**

Data Dta

Type of analysis: OLS ANOVA

**Factor8****Name Code Nested In F/R Kind**

Groups Grp 0 Fix Disc

Partial (Type 3) Sums of Squares

Interactions up to 1 - way

**No Modifications****RESULTS****General Results**

30 total cases

**ANOVA**

Analysis of Variance For Data

No Selector

Source	df	Sums of Squares	Mean Square	F-ratio	Prob
Const	1	2984,02	2984,02	149201	≤ 0,0001
Grp	5	0,318667	0,063733	3,1867	0,0240
Error	24	0,480000	0,020000		
Total	29	0,798667			

**Results for factor Grp**

Coefficients

Expected Cell Means

Scheffe Post Hoc Tests

	Difference	std. err.	Prob
TRAT. 1 - CONTROL	-0,080000	0,0894	0,974755
TRAT. 2 - CONTROL	-0,220000	0,0894	0,334571
TRAT. 2 - TRAT. 1	-0,140000	0,0894	0,780385
TRAT. 3 - CONTROL	-0,160000	0,0894	0,671427
TRAT. 3 - TRAT. 1	-0,080000	0,0894	0,974755
TRAT. 3 - TRAT. 2	0,060000	0,0894	0,993078
TRAT. 4 - CONTROL	-0,320000	0,0894	0,054178
TRAT. 4 - TRAT. 1	-0,240000	0,0894	0,246143
TRAT. 4 - TRAT. 2	-0,100000	0,0894	0,935688
TRAT. 4 - TRAT. 3	-0,160000	0,0894	0,671427
TRAT. 5 - CONTROL	-0,100000	0,0894	0,935688
TRAT. 5 - TRAT. 1	-0,020000	0,0894	0,999966
TRAT. 5 - TRAT. 2	0,120000	0,0894	0,870674
TRAT. 5 - TRAT. 3	0,060000	0,0894	0,993078
TRAT. 5 - TRAT. 4	0,220000	0,0894	0,334571



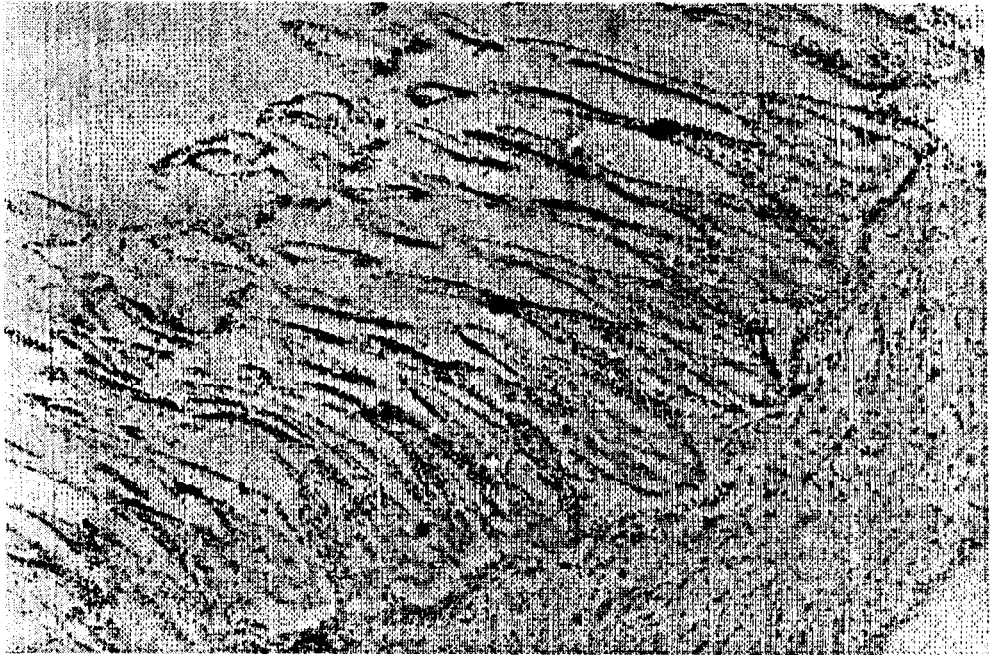


Foto # 1. Branquias en buen estado.

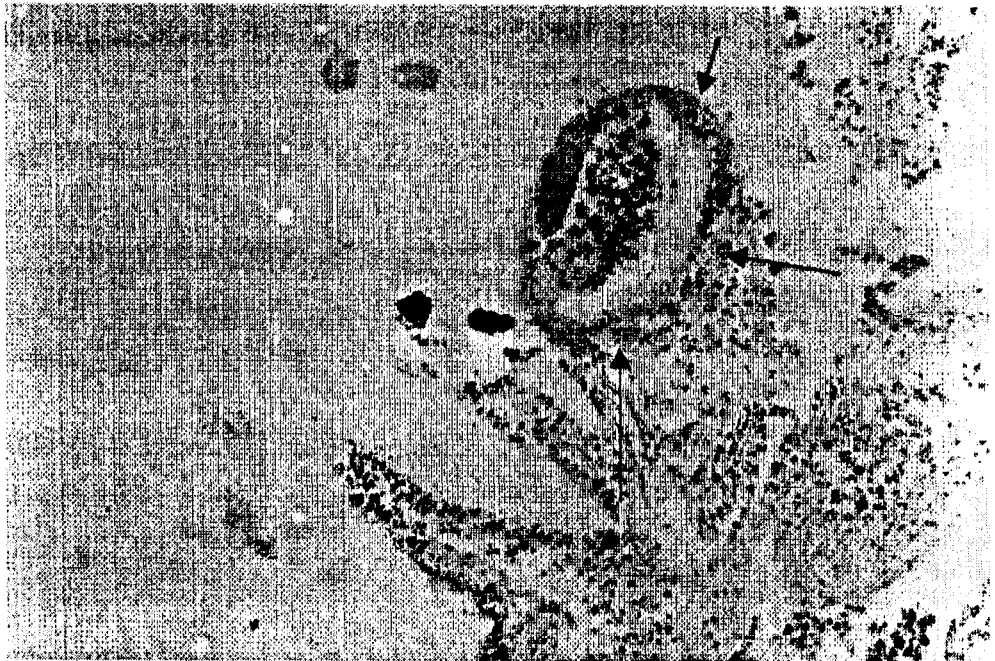


Foto # 2. Pedúnculo ocular. Necrosis en los bordes del pedúnculo ocular.

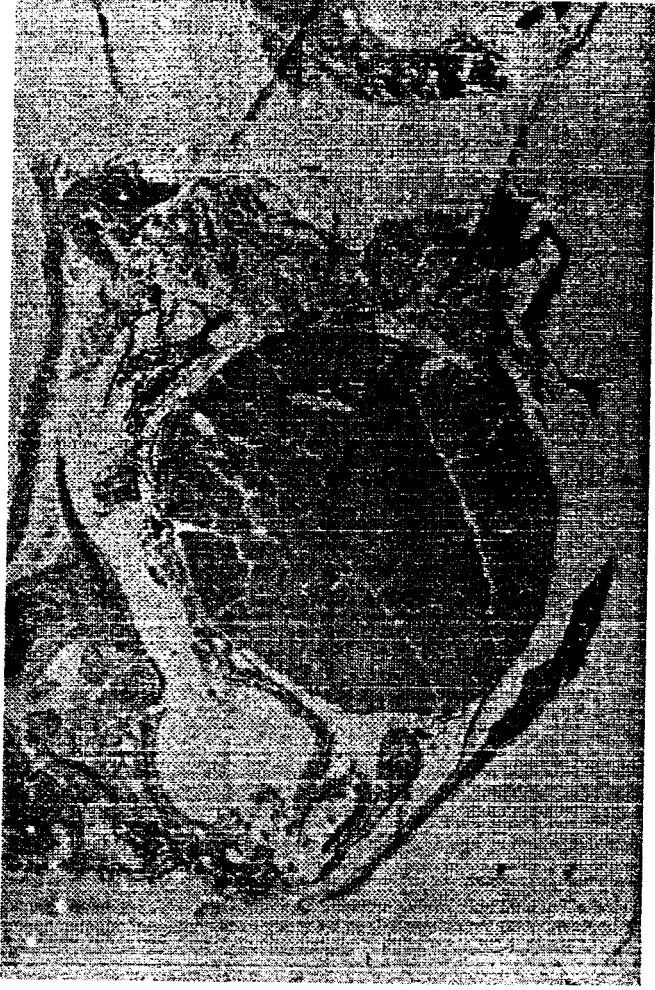


Foto # 3. Vista general del músculo aductor en buen estado.



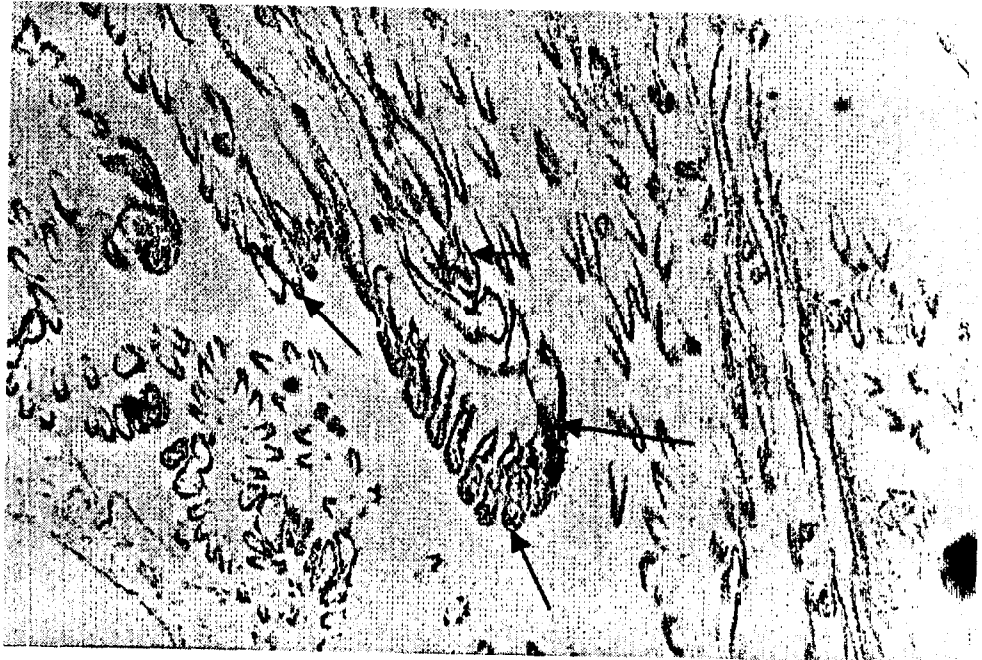
Foto # 4. Necrosis en el Pedúnculo ocular. La necrosis alcanzó los tentáculos adyacentes al pedúnculo



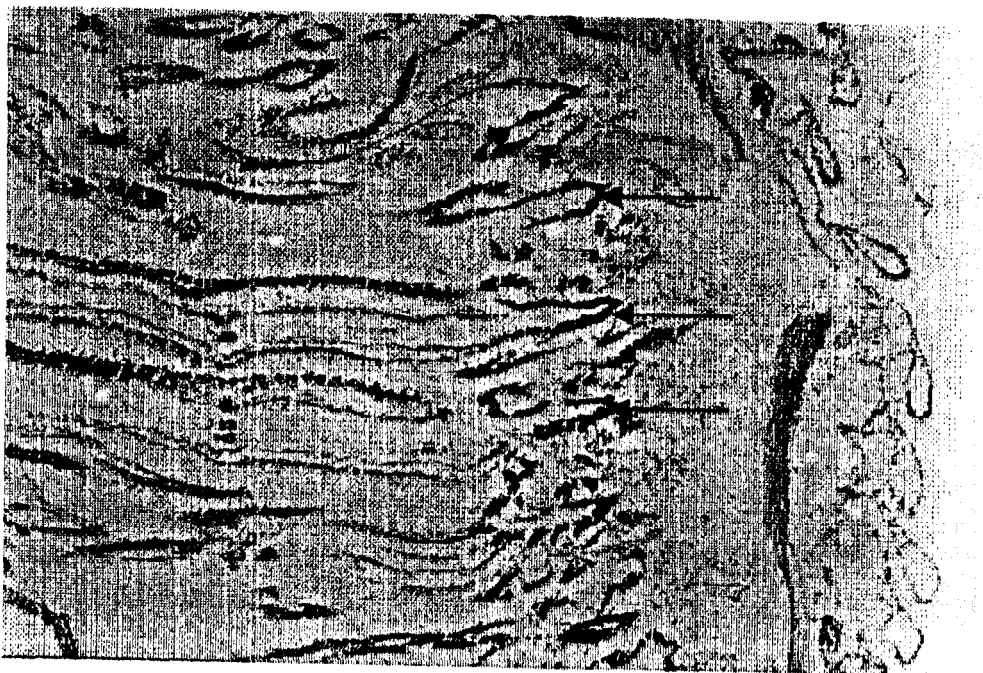
Foto # 4. Ojos y tentáculos con necrosis. Las flechas indican la zona con necrosis



Foto #6. Necrosis en el borde del Manto. Las zonas oscuras del manto con necrosis.



**Foto # 7.** Necrosis en Branquias Filamentos oscuros necrosados.



**Foto # 8.** Necrosis en branquias Láminas branquiales externas necrosadas.

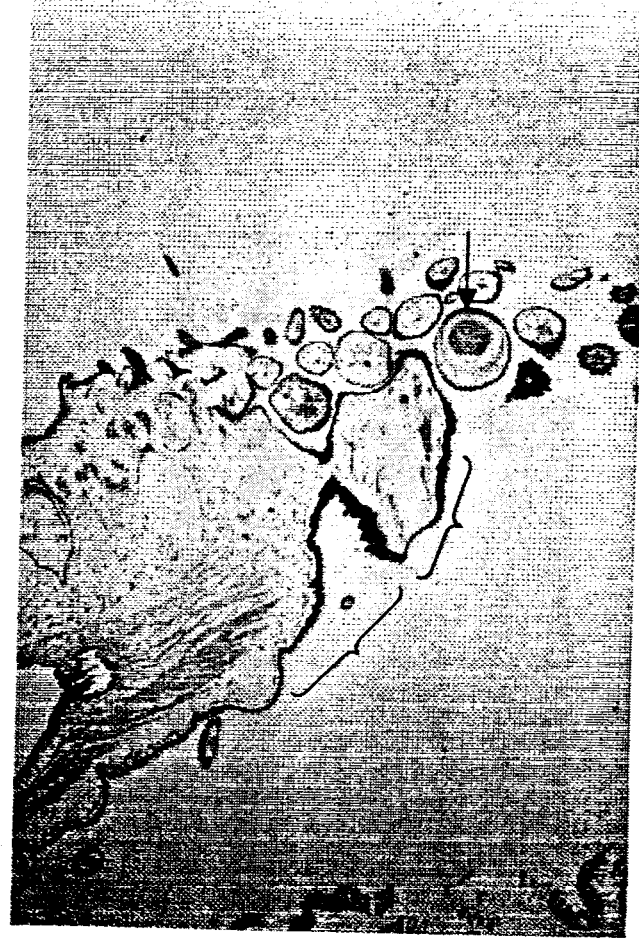


Foto # 9. Mante y ojos con necrosis

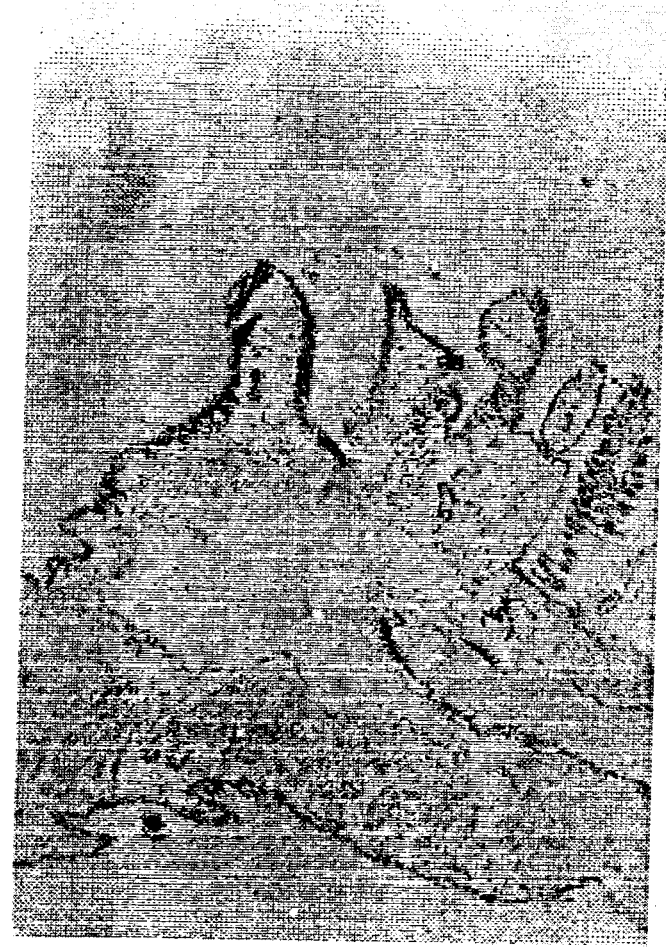


Foto # 10. Mante en buen estado.