

639.543
DUE



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

**“Estudio de la susceptibilidad de las ~~Penaeus~~ larvas
Penaeus vannamei a los pesticidas Tilt y Calixin”**

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del título de
ACUICULTOR

Presentada por
Franklin Dueñas Alvarado

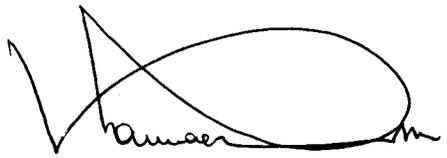
GUAYAQUIL-ECUADOR
1998

DECLARACION EXPRESA

“La responsabilidad por 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).

Biblioteca Central

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ann Van Hauwaert', written over a horizontal line.

Ann Van Hauwaert

Directora de tesis del Sr. Franklin Dueñas Alvarado

A G R A D E C I M I E N T O

Nuestro **más** sincero y **afectuoso** agradecimiento a:

Dr. Jorge Calderón Velázquez
DIRECTOR DE LA **FUNDACIÓN CENAIM**
Ing. Eduardo Cervantes **Bernabé**
DECANO DE LA **FACULTAD DE INGENIERIA**
MARITIMA Y CIENCIAS DEL MAR
CONSEJO **DIRECTIVO** DE LA FACULTAD
Sra Claudia Barco V.
SECRETARIA RE LA FACULTAD

Por la invaluable **colaboración** prestada para que se haga posible la **aprobación** y publicación de **la Tesis** de Grado de:

FRANKLIN GIOVANNI DUEÑAS ALVARADO

Especial e imperecedero agradecimiento a los amigos:

Ing. Ann Van **Hauwaert**
DIRECTORA DE TESIS

Y

Ernesto Valenzuela **Domínguez**
Entrañable compañero de Giovanni

Quienes con su **cariffo, esfuerzo y dedicación**, recopilaron y culminaron la Tesis de nuestro querido Giovanni, para honrar su memoria y eternizar su recuerdo.

A todos ustedes, muchas gracias, en nuestro nombre **y** en el de Giovanni.

Franklin Dueñas **Galarza**
Cecilia Alvarado de **Dueñas**
Darío Dueñas Alvarado
Natasha Dueñas Alvarado
Yira Freire de **Dueñas**
Darío Dueñas Freire



Biblioteca



Biblioteca Central



TABLA DE CONTENIDOS.

Tabla de Contenidos.....	Biblioteca Central	i
Abreviaturas		v
Indice de Figuras.....		vi
Indice de Tablas.....		viii
Resumen.....		x
Introducción		1
1. ANTECEDENTES		3
1.1. Historia del Síndrome de Taura		3
1.2. Síntomas típicos del Síndrome de Taura		4
1.2.1. Características macroscópicas.....		4
1.2.2. Características microscópicas.....		6
1.3. Origen del Síndrome de Taura		8
1.3.1. Causa toxicológica.....		8
1.3.1.1. Indicadores de etiología tóxica.....		8
1.3.1.1.1. Incremento del área bananera y aumento de la incidencia de Sigatoka negra.....		8
1.3.1.1.2. Análisis de agua, lodo y camarones.....		9
1.3.1.1.3. Pruebas de filtración con carbón activado.....*		10
1.3.1.1.4. Síndrome de Taura en jaibas.....		11
1.3.1.2. Pruebas directas.....		11
1.3.1.2.1. Efecto de Tilt® y Calixin® sobre diferentes organismos planctónicos.....		12
1.3.1.2.2. Ensayos de toxicidad aguda para camarón.....		13
1.3.1.2.3. Pruebas de toxicidad crónica agregando pesticidas al agua.....		14

1.3.1.2.4.	Pruebas de toxicidad crónica agregando pesticidas al alimento...	17
1.3.1.2.5.	Pruebas del efecto de los pesticidas sobre la digestibilidad del camarón	18
1.3.1.2.6.	Factores que influyen en la aparición del Síndrome de Taura	19
1.3.1.2.7.	Conclusión del origen toxicológico.....*	21
1.3.2.	Causa viral	22
1.3.2.1.	Pruebas de la presencia de un patógeno.....	22
1.3.2.2.	Sonda nucleíca específica para el virus del Síndrome de Taura (VST).....	25
1.4.	Toxicología Acuática.....	26
1.4.1	Definición de la toxicología acuática.....	26
1.4.2.	Diferentes tipos de pruebas de toxicidad.....	27
1.4.2.1.	Diferentes enfoques para realizar pruebas de toxicidad.....	27
1.4.2.2.	Diferentes sistemas de pruebas.....	28
1.4.2.3.	Diferentes pruebas de laboratorio.....	28
1.4.2.3.1.	Ensayo de toxicidad aguda.....	28
1.4.2.3.2.	Ensayo de toxicidad crónica.....	29
1.4.2.3.3.	Ensayo subletal de corta duración.....	29
1.4.2.3.4.	Pruebas de bioacumulación.....	29
1.4.3.	Prueba de toxicidad aguda: validez.....	30
1.4.4.	Cálculo de concentraciones letales usando el análisis Probit	30
1.4.5.	Cálculo de NOEC y LOEC.....	1
1.5.	Perspectivas de Investigación científica.....	33





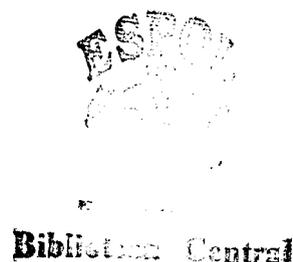
2.MATERIALES Y METODOS	34
Biblioteca Central	
2.1. Metodología de los ensayos toxicológicos.....	34
2.1.1. Recepción y mantenimiento de las post larvas.....	34
2.1.1.1. Procedimiento estandar de recepción de Post larvas para ensayos de toxicidad.....	34
2.1.1.2. Procedimiento estandar de mantenimiento de Post larvas para ensayos de toxicidad.....	35
2.1.1.3. Procedimiento estandar de inicio de ensayos de toxicidad.....	36
2.1.2. Preparación de las soluciones para los ensayos.....	37
2.1.2.1. Preparación de soluciones patrón.....	37
2.1.2.2. Preparación de soluciones de prueba.....	38
2.1.3. Procedimiento usado en los ensayos de toxicidad aguda.....	38
2.1.3.1. Estructuración	38
2.1.3.2. Trabajo rutinario.....	39
2.1.4. Procedimiento usado en el ensayo de toxicidad crónica.....	40
2.1.4.1. Estructuración	40
2.1.4.2. Trabajo rutinario.....	41
2.1.4.3. Alimentación	41
2.1.5. Evaluación de resultados.....	41
2.1.5.1. Cálculo de LC.....	41
2.1.5.2. Mortalidad y peso.....	42
2.1.5.3. Histología	42
2.2. Materiales utilizados.....	42
2.2.1. Cámaras de prueba.....	42
2.2.2. Filtros de piola y de celulosa.....	43
2.2.3. Lámparas U V.....	43
2.2.4. Material de vidrio Pirex.....	44
2.2.5. Refractómetro	44

2.2.6.Sala de Bioensayos44
3. RESULTADOS Y DISCUSION.....	46
3.1. Ensayos de toxicidad aguda.....	46
3.1.1. Porcentajes de mortalidad.....	46
3.1.2. Cálculo de Concentraciones Letales usando el análisis Probit.....	50
3.1.3. Parámetros que influyen la toxicidad.....	55
3.2. Ensayo de toxicidad crónica.....	56
3.2.1. Evaluación del parámetro supervivencia.....	56
3.2.2. Ensayo de toxicidad crónica y Síndrome de Taura.....	61
CONCLUSIONES	62
RECOMENDACIONES	63
BIBLIOGRAFIA	64



ABREVIATURAS

ARN	:	ácido ribonucleico
GDPH	:	Enzima glucosa-G-fosfato deshidrogenasa
GOT	:	Enzima aspartato amino-transferasa
GPT	:	Enzima alanina amino-transferasa
IHHNV	:	Virus de la Necrosis Infecciosa del tejido Hipodérmico y Hematopoyético
Kb	:	Kilo par de base
KDa	:	Kilo Dalton
LC	:	concentración letal
LC 10	:	concentración que provoca el 10% de mortalidad en la población
LC 50	:	concentración que provoca el 50% de mortalidad en la población
LOEC	:	mínima concentración que genera estadísticamente efectos adversos en comparación con el control
LOVV	:	Virus de la Vacuolización del Organo Linfoide
NOEC	:	máxima concentración que no genera estadísticamente efectos adversos en comparación con el control
ppb	:	partes por billón
ppm	:	partes por millón
ppt	:	partes por mil
RD	:	radio de digestibilidad
ST	:	Síndrome de Taura
TSV	:	Virus del Síndrome de Taura





Biblioteca Central

INDICE DE FIGURAS

- Fig. 1 .Evolución del Síndrome de Taura de 1992 a 1994 en el Golfo de Guayaquil..3
- Fig. 2. Características macroscópicas del Síndrome de Taura. Fase aguda. Juvenil moribundo *P. vunnumei* proveniente de Ecuador. Necrosis multifocal del epitelio cuticular en los urópodos. Magnificación aproximada 10 X. (Tomado de Lightner, 1995).....5
- Fig. 3. Características macroscópicas del Síndrome de Taura. Fase crónica. Juveniles *P. vunnumei* provenientes de Ecuador. Múltiple melanización en los sitios de necrosis del epitelio cuticular. (Tomado de Lightner, 1995).....5
- Fig. 4. Características microscópicas del Síndrome de Taura. Fase aguda. Corte histológico del estómago de un juvenil *P. vunnumei*. Areas prominentes de necrosis en el epitelio cuticular. Adyacente a las lesiones focales están células epiteliales aparentemente normales. Magnificación 600 X. (Tomado de Mayer-Bennett H&I *vide* Lightner, 1995).....7
- Fig. 5. Características microscópicas del Síndrome de Taura. Fase crónica. Sección midsagital del órgano linfoide de un juvenil *P. vunnumei* infectado experimentalmente. Capas múltiples de células de envoltura de un seno central de hemolinfa. Vacuolas citoplasmáticas prominentes y otras inclusiones citoplasmáticas. Magnificación 450 X. (Tomado de Mayer-Bennett H&I *vide* Lightner, 1995).....7
- Fig. 6. Sonda nucleíca específica contra TSV. Corte histológico de un apéndice de una postlarva *P. vunnumei* en la fase aguda del Síndrome de Taura. La sonda ha reaccionado intensamente con las células infectadas con TSV, reconociendo el citoplasma de las células del epitelio cuticular y de las células del tejido conectivo subcuticular. La sonda no reconoció los nucleos pignóticos y carioquinéticos, debido a que el TSV solo afecta al citoplasma. Magnificación 900 X (Tomado de DIG-labeled probe & Bismarck Brown *vide* Lightner, 1995)..... 26
- Figura 7. (a) Distribución normal. Curva sigmoidea. (b) mortalidad en escala aritmética y concentración en escala logarítmica. (c) mortalidad expresada como probit versus concentración en escala logarítmica.....32

Figura 8.- Promedio de supervivencia final de camarones <i>P. vannamei</i> a las diferentes concentraciones de Tilt® usadas en el ensayo.....	58
Figura 9.- Promedio de supervivencia final de camarones <i>P. vannamei</i> a las diferentes concentraciones de Calixin® usadas en el ensayo.....	58
Figura 10.- Promedio de supervivencia final de camarones <i>P. vannamei</i> a las diferentes concentraciones de Mezcla (Tilt®-Calixin®) en relación 1: 1 usadas en el ensayo.	59
Figura 11.- Supervivencia diaria de camarones sometidos a diferentes concentraciones de Tilt®.....	59
Figura 12.- Supervivencia diaria de camarones sometidos a diferentes concentraciones de Calixin®.....	60
Figura 13.- Supervivencia diaria de camarones sometidos a diferentes concentraciones de Mezcla (Tilt®-Calixin®) en relación 1:1.....	60



Biblioteca Central



Biblioteca Central

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.-Resultados de análisis realizados en laboratorios de los Estados Unidos a muestras de agua, suelo y camarón.....	10
Tabla 2.- Características de los fungicidas usados para el control de Sigatoka negra en los bananos	11
Tabla 3 .Toxicidad de propionazole sobre diferentes organismos fito y zooplanctónicos.. . .	12
Tabla 4.- Resultados de ensayos de toxicidad para Tilt® a diferentes salinidades y pesos para determinar 96-horas LC 50.....	13
Tabla 5.- Resultados de ensayos de toxicidad para determinar 96-horas LC 50 en animales de 0.1 g. a diferentes salinidades.....	13
Tabla 6.- Resultados de ensayos de toxicidad aguda para Tilt®, Calixin®, Tilt®+Calixin® y Aceite Agrícola.....	14
Tabla 7.- Resultados de ensayos de toxicidad para determinar 96-horas LC 50, realizados por Dibs.....	14
Tabla 8.- Resultados de ensayos de toxicidad para determinar 24-horas LC 50 usando P. vannamei (Pl-1 1, Temp. 22±1 °C), sin alimentación.....	14
Tabla 9.- Resultados de ensayos de toxicidad para determinar 96-horas LC 50, sin alimentación, Temp. 29-30°C, no se menciona la especie y estadio de animales utilizados	15
Tabla 10.- Rangos de toxicidad aguda de fungicidas en el P. vannamei , sin considerar edad de los animales ni método de análisis de datos utilizado	15
Tabla 11.- Concentraciones usadas en los ensayos de toxicidad crónica con temperatura constante de 24°C.....	16

Tabla 12.- porcentajes de animales autoclavados y no autoclavados en cada dieta (variando de 0 a 25%) para los experimentos en 0 y 35 ppt.....	25
Tabla 13.- Concentración de Tilt® y su respectivo porcentaje de mortalidad obtenida en cada ensayo de toxicidad aguda usando este pesticida.....	47
Tabla 14.- Concentración de Calixin® y su respectivo porcentaje de mortalidad obtenida en cada ensayo de toxicidad aguda usando este pesticida.....	48
Tabla 15.- Concentración de Mezcla (Tilt®:Calixin® en relación 1: 1) y su respectivo porcentaje de mortalidad obtenida en cada ensayo de toxicidad aguda usando este pesticida	49
Tabla 16.- Porcentajes de mortalidad en los controles de cada ensayo de toxicidad aguda...50	
Tabla 17. Resultados de análisis Probit para ensayos con Tilt®	52
Tabla 18. Resultados de análisis Probit para ensayos con Calixin®	53
Tabla 19. Resultados de análisis Probit para ensayos con Mezcla (Tilt®:Calixin® en relación 1:1).....	54
Tabla 20. Resumen de los valores LC50 de los xenobióticos	54
Tabla 21.- Porcentaje de mortalidad de camarones a diferentes concentraciones de pesticidas durante el ensayo crónico.....	57



Biblioteca Central



Resumen

Biblioteca Central

El desarrollo de protocolos estandarizados de toxicidad de pesticidas, utilizando al *Penaeus vannamei* como organismo objetivo (target organism), surgió como una necesidad después de la aparición del Síndrome de Taura.

En el presente trabajo se estandarizó la realización de ensayos de toxicidad aguda y crónica de los fungicidas Tilt® y Calixin® en postlarvas *P.vannamei*. Obteniendo en las pruebas de toxicidad aguda los valores, 0.547 ± 0.064 ppm para Tilt® LC50-96 horas (promedio de 4 pruebas), 0.347 ± 0.092 ppm para Calixin® LC50-96 horas (promedio de 2 pruebas), y 0.505 ± 0.011 ppm para la mezcla de Tilt® y Calixin® (1: 1) (promedio de 2 pruebas). La estandarización de las pruebas de toxicidad con Calixin® fueron mas difíciles que con Tilt®, lo cual se refleja también en el LC 50 de la mezcla (1:1) de ambos productos. También se observó que la calidad larvaria es un factor que dificulta la obtención de los valores LC 50 con un coeficiente de varianza menor al 50 %.

En los ensayos de toxicidad crónica se utilizó el LC 50-96 horas como dato de referencia. La revisión histológica de las postlarvas obtenidas al culminar el ensayo crónico, no mostraron las características patognomónicas del Síndrome de Taura. No fue posible calcular los valores NOEC y LOEC debido a que no hubo diferencias de mortalidad entre el control y las diferentes concentraciones. Se concluyó que en camarones *P.vannamei*, no es eficiente una extrapolación directa de los resultados obtenidos en ensayos de toxicidad aguda a concentraciones a utilizarse en ensayos de larga duración. Estos datos solo pueden ser utilizados como referencias para la realización de pruebas crónicas.



Biblioteca Central

INTRODUCCION

En el Ecuador, la industria camaronera se inició en 1952 con una flota de buques de arrastre, que en 1954 alcanzó una producción anual de 660 TM, 3340 TM en 1958 y 8700 TM en 1969. En 1968 se inició el cultivo de camarón en la provincia de El Oro, con la cría rudimentaria de *P. vannamei* y *P. stylirostris*. En 1971, Manabí, Esmeraldas y Guayas se sumaron a esta actividad, reportándose para esa época 400 criaderos que ocupaban una superficie de 26360 Ha. (Zapata y Fierro, 1988; Sutinen *et.al.*, 1989 *fide* Cornejo y Bonilla, 1994). La mayor concentración de hectáreas dedicadas a esta actividad estaban en el Guayas con más de 1000 camaroneras que corresponden al 70.2% del total nacional. En El Oro se registraron cerca de 350 camaroneras que representaban el 17.7%, en Manabí 214 camaroneras (8.4%) y en Esmeraldas aproximadamente 100 camaroneras que representaban el 3.7% restante del total nacional (Cámara de Productores de Camarón, 1993 *fide* Cornejo y Bonilla, 1994). Pero no fue sino hasta 1977 cuando la acuicultura (especialmente la camaronicultura) cobró impulso en el país. Una década después, el Ecuador se convirtió en uno de los principales exportadores de camarón de cultivo del mundo. Hasta 1992 se cultivaron más de 133000 hectáreas y se produjeron 115000 toneladas netas de camarón entero. Las exportaciones se cuadruplicaron en 10 años, pasando de US\$122 millones en 1982 a US\$526 millones en 1992. Constituyéndose entonces la industria camaronera en el 3.1% de las exportaciones privadas y las dos terceras partes de la Reserva Monetaria Internacional.

Sin embargo el sostenimiento de la industria camaronera en el Ecuador ha sido seriamente amenazado por la aparición de diferentes enfermedades infecciosas (episodios causados por Vibrios, protozoarios, Virus) y en un mayor grado en los años 1992, 1993 y 1994 por el denominado “Síndrome de Taura”.

La aparición del Síndrome de **Taura** coincidió con un incremento del consumo de los fungicidas **Tilt®** y **Calixin®** por parte del sector agrícola, el cual los utiliza para controlar la Sigatoka negra, enfermedad de origen fúngico que afecta a las plantaciones bananeras. De acuerdo a lo reportado por Intriago, 1992 fide Cámara Nacional de Acuicultura, 1994, los fungicidas **Tilt®** y **Calixin®** eran los causantes del Síndrome de **Taura**. Sin embargo, Lightner en 1995, atribuyó una etiología viral a la enfermedad , denominándose al agente causal como “Virus del Síndrome de **Taura** “ (TSV).

En este trabajo se plantea estandarizar los protocolos de pruebas de toxicidad aguda y crónica de los fungicidas **Tilt®** y **Calixin®** sobre postlarvas de camarón **P. vannamei**, investigando el efecto de estos químicos sobre el camarón y su posible relación con el Síndrome de **Taura**.



Biblioteca Central

1. ANTECEDENTES

1.1. HISTORIA DEL SÍNDROME DE TAURA

El Síndrome de Taura (ST) es una enfermedad relativamente nueva que ataca al camarón *Penaeus vannamei*. Fue reconocida por primera vez en Junio de 1992 (Fig. 1) (Jiménez, 1992; Lightner, 1995). Su nombre proviene de la zona en donde se detectó inicialmente, es decir, del río Taura en el Golfo de Guayaquil del cual las camaroneras de la zona toman el agua para sus cultivos.

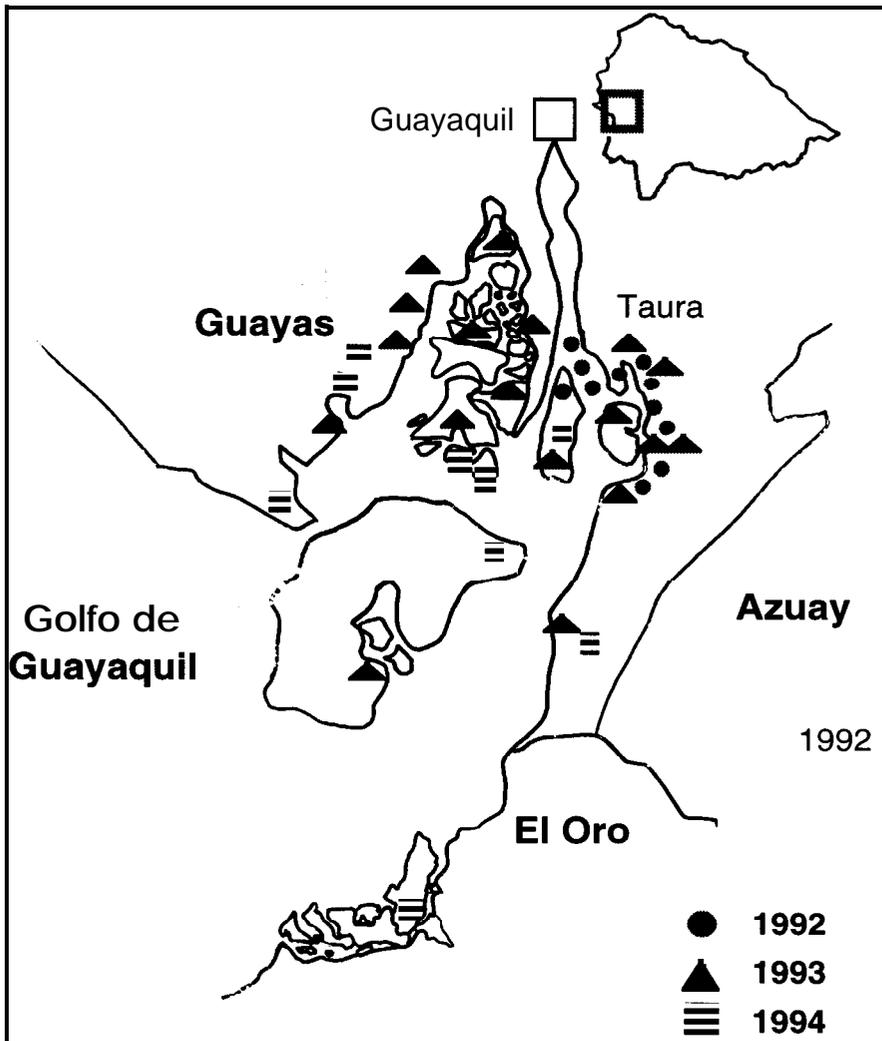


Fig. 1.- Evolución del Síndrome de Taura de 1992 a 1994 en el Golfo de Guayaquil.

Desde 1992 hasta 1993 dicha enfermedad declinó la producción de camarón en un 16%. Actualmente, el Síndrome de Taura, se ha extendido por toda la costa ecuatoriana e incluso se ha reportado su aparición en todos los países que cultivan camarón en América (Chamberlain, 1994; Wigglesworth, 1994; Lightner, 1995).

1.2. SÍNTOMAS TÍPICOS DEL SÍNDROME DE TAURA

1.2.1. Características macroscópicas

Los primeros síntomas del Síndrome de Taura son observados entre 14 y 40 días. luego de la siembra en las piscinas. Ataca a juveniles pequeños cuyo peso está entre 0.1 gramos y no más de 5 gramos (Jiménez, 1992; Lightner, 1995).

La enfermedad tiene dos fases: aguda y crónica. En la fase aguda, el camarón moribundo presenta expansión de los cromatóforos rojos lo que le da al animal enfermo un color rojizo muy característico de la enfermedad (especialmente en la cola y los pleópodos, de allí su nombre de “cola roja”) (Figura 2). Usualmente, el camarón afectado muere en el proceso de muda. Los animales presentan además necrosis cuticular en los urópodos y pleópodos (también en el cuerpo). El camarón con estos síntomas presenta además: exoesqueleto blando, intestino vacío, y se encuentra usualmente en la fase D del ciclo de muda (Jiménez. 1992; Lightner, 1995).

En la fase crónica, el camarón muestra melanización en los sitios de necrosis (Figura 3) provocada por infección bacteriana de la cutícula, el animal puede presentar exoesqueleto blando y expansión de los cromatóforos, sin embargo, el camarón nada y se alimenta normalmente). Los camarones que sobreviven resuelven el problema de melanización cuticular al superar la muda (Lightner, 1995).

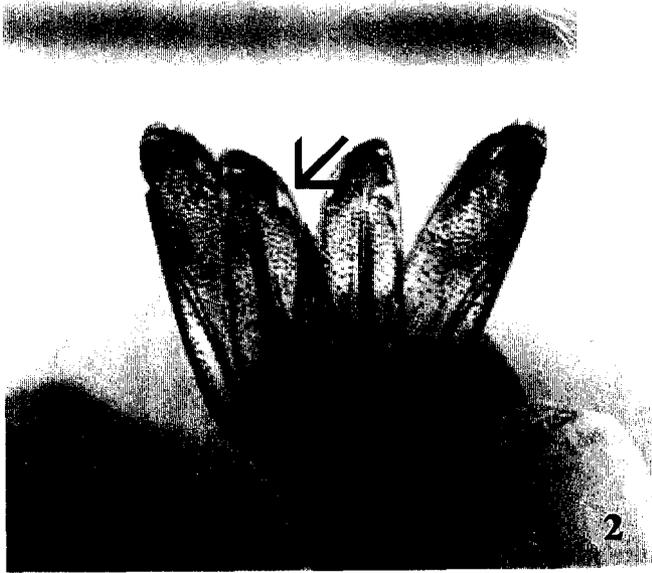


Figura 2. Características macroscópicas del Síndrome de Taura. Fase aguda. Juvenil moribundo *P. vannamei* proveniente de Ecuador. Necrosis multifocal del epitelio cuticular en los urópodos. Magnificación aproximada 10 X. (Tomado de Lightner, 1995)



Figura 3. Características macroscópicas del Síndrome de Taura. Fase crónica. Juveniles *P. vannamei* provenientes de Ecuador. Múltiple melanización en los sitios de necrosis del epitelio cuticular. (Tomado de Lightner, 1995)

1.2.2. Características microscópicas

La histopatología distintiva consiste en áreas de necrosis multifocal del epitelio cuticular y subcutícula (de la cutícula en general, agallas, apéndices e intestino anterior y posterior), lo cual está caracterizado por la presencia de muchos cuerpos de inclusión citoplásmaticos de tamaño variable, esto le da a la lesión ocasionada por el Síndrome de Taura una apariencia característica de “perdigones” (Lightner, 1995).

La definición histológica adoptada en el taller sobre Síndrome de Taura realizado en Arizona (1994) describe al mismo como: “Necrosis multifocal en el epitelio cuticular y subcuticular del cuerpo en general, branquias, apéndices e intestino anterior y medio. Lesiones características en la fase aguda del Síndrome de Taura muestran una ligera inflamación, células necróticas con núcleos pignóticos alargados (usualmente) y carioquinéticos. eosinofilia citoplásmatica incrementada, y pocas o numerosas inclusiones citoplásmaticas en el cuerpo con un rango de eosinófilo a basófilo oscuro” (Figuras 4 y 5) (Lightner, 1995).

Se relaciona además al Síndrome de Taura con la presencia de enfermedades secundarias como: el Virus de Necrosis Infecciosa del Tejido Hipodérmico y Hematopoyético (IHHNV). y el Virus de Vacuolización del Organo Linfoide (LOVV). Aparentemente la presencia del Síndrome de Taura favorece el ataque de estos dos patógenos en el camarón (Jiménez, 1995).

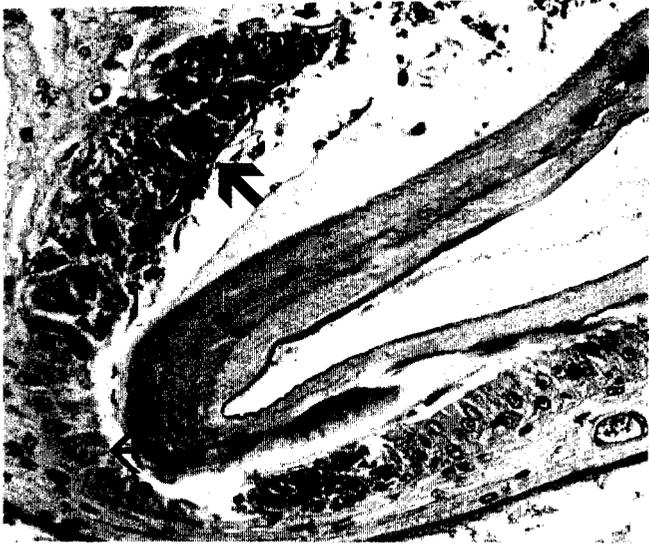


Figura 4. Características microscópicas del Síndrome de Taura. Fase aguda. Corte histológico del estómago de un juvenil *P. vannamei*. Areas prominentes de necrosis en el epitelio cuticular (flecha grande). Adyacente a las lesiones focales están células epiteliales aparentemente normales (flecha pequeña). Magnificación 600 X. (Tomado de Mayer-Bennett H&I *vide* Lightner, 1995)

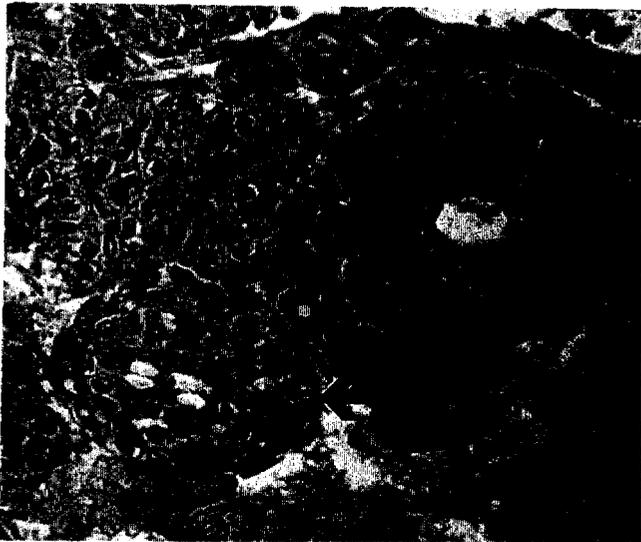


Figura 5. Características microscópicas del Síndrome de Taura. Fase crónica. Sección mid-sagital del órgano linfóide de un juvenil *P. vannamei* infectado experimentalmente. Capas múltiples de células de envoltura de un seno central de hemolinfa (flecha pequeña). Vacuolas citoplasmáticas prominentes y otras inclusiones citoplasmáticas (flecha grande). Magnificación 450 X. (Tomado de Mayer-Bennett H&I *vide* Lightner, 1995)

1.3. ORIGEN DEL SÍNDROME DE TAURA

Desde la aparición del Síndrome de Taura no se ha podido establecer su etiología de manera unánime.



Biblioteca Central

1.3.1 Causa toxicológica

1.3.1.1. Indicadores de etiología tóxica

1.3.1.1.1. Incremento del área bananera y aumento en la incidencia de Sigatoka negra

Ante la aparición del Síndrome de Taura y las considerables pérdidas en la producción de camarón, las compañías camaroneras ecuatorianas iniciaron una investigación orientada a determinar la causa de la enfermedad. Se encontró así que la única variante de importancia encontrada en la zona de Taura con relación a los años anteriores a 1992, durante los cuales no se presentó tan elevada mortalidad del camarón, era un significativo incremento en la superficie de terreno destinado al cultivo de banano que fue de 71000 hectáreas en 1991 a 135000 hectáreas en 1992. Al mismo tiempo se inició la fumigación bananera con fungicidas para el control de la Sigatoka negra en la zona que influencia el sistema de esteros de Churute, de donde toman agua las camaroneras de la zona de Taura, estableciéndose la hipótesis de que la presencia de estos fungicidas en el agua era la causa del problema (Cámara Nacional de Acuacultura, 1994).

La Sigatoka negra, es una enfermedad causada por un hongo (*Mycosphaerella sp.*) el cual es combatido mediante el uso de los fungicidas Tilt®: Propiconazole, Calixin®: Tridemorph y Benlate®: Benomyl; producto y principio activo respectivamente. Estos fungicidas inhiben la síntesis de esteroides. Estos pesticidas se aplican junto al aceite agrícola en las fumigaciones de las plantaciones bananeras en cantidades de 3.5 l de aceite agrícola con: 0.4 l de Tilt®(4 aplicaciones/año) o 0.6 l de Calixin®(5 aplicaciones/año) por hectárea de terreno. El aceite, un producto refinado del petróleo crudo ecuatoriano, sirve como disolvente y además tiene función fungistática.

Alternativamente se emplea **Benomyl®** (0.28 Kg/Ha en 5 aplicaciones/año), dando un total de 14 aplicaciones de fungicida al año, que dependiendo de la incidencia de la Sigatoka negra, pueden subir hasta 17 aplicaciones al año (EPA, 1994). Esto es corroborado por un comunicado sobre la práctica de una bananera, en el que se avisa del inicio del programa anual de fumigación que consta de: 6 ciclos de Propiconazole, 5 de Tridemorph y 5 de Benomyl, es decir, 16 ciclos al año (Cámara Nacional de Acuicultura, 1994). Sin embargo, el aceite agrícola y el **Benomyl®** han sido usados en las plantaciones bananeras de Ecuador mucho tiempo antes de presentarse el Síndrome de Taura en las camaronerías por lo que se presume que no están relacionados directamente con el problema (Turnbull y Stagg, 1994).

En cambio, las importaciones de **Tilt®** y **Calixin®** aumentaron **Tilt®** de 115000 kilogramos en 1991 a 189000 kilogramos en 1992; y **Calixin®** de 46500 kilogramos en 1991 a 68000 kilogramos en 1992 (aproximadamente). En los Estados Unidos el **Tilt®** por disposiciones del Departamento de Protección Ambiental no puede usarse cerca o en lugares que estén o fueren potencialmente a usarse para fines de acuicultura, ni cerca de cuerpos de agua de los cuales la actividad acuícola haga uso; mientras que el **Calixin®** debido a su alta toxicidad tiene negado el registro para su uso legal en este país, (Barniol, 1995).

1.3.1.1.2. Análisis de agua, lodo y camarones

Varias empresas camaronerías enviaron durante 1992 y 1993 muestras de animales enfermos, agua y suelo de las piscinas camaronerías afectadas por Síndrome de Taura a los Estados Unidos, para diferentes análisis.

En el agua se reporta la presencia de una serie de sustancias entre las cuales están metales pesados como: Aluminio, Zinc, entre otros. También se detectó compuestos organoclorados y organofosforados. Con respecto a pesticidas se detectó: Propiconazole, Tridemorph y Benomyl.

En el lodo (solo una muestra) también se encontraron metales pesados en menores cantidades y Propiconazole.

El hepatopáncreas (solo un análisis) presentó altas concentraciones de Aluminio y Cadmio. detectándose además 13 ppb de Propiconazole.

En la Tabla 1 se detallan las cantidades de los pesticidas involucrados (Tilt® y Calixin®) encontradas en los resultados de estos análisis. Se puede observar que solo en una muestra. se pudo detectar Calixin®, debido a que los niveles mínimos de detección son 10 veces mayores que los de Tilt® (Cámara Nacional de Acuacultura, 1994).

Tabla 1.- Resultados de análisis realizados en laboratorios de los Estados Unidos a muestras de agua, suelo y camarón (Cámara Nacional de Acuacultura, 1994). ND.- No detectable.

TIPO DE MUESTRA	PECHA DE ANALISIS	PRODUCTO ENCONTRADO	
		Propiconazole (ppb)	tridemorph (ppb)
Agua	22/Ago/93	0.26	1.47
Agua	4/Nov/93	0.018	ND
Hepatopáncreas	27/Ago/93	13	ND
Sedimentos	28/Oct/93	0.8	ND
Sedimentos	19/Dic/93	0.21	ND

Se enviaron muestras de camarón para revisión histológica a laboratorios nacionales e internacionales, en ellos se encontraron anormalidades a nivel de organización celular del epitelio subcuticular. Sin embargo, dichas anormalidades no fueron atribuibles a patógeno alguno, incluyendo estudios de microscopía electrónica de transmisión (Cámara Nacional de Acuacultura, 1994).

1.3.1.1.3. Pruebas de filtración con carbón activado

En 1993 se realizaron pruebas que demuestran mortalidades elevadas al usar agua del estero sin tratar, y disminución considerable de la misma al filtrar el agua por carbón activado. Esto indica claramente que la causa de mortalidad es una sustancia disuelta en el agua, la cual es retenida por el carbón activado durante la filtración (Cámara Nacional de Acuacultura, 1994).

Un filtro de carbón activado, es incapaz de retener patógenos, pero si puede retener por adsorción compuestos orgánicos (pesticidas) disueltos en el agua (Wheaton, 1993).

1.3.1.1.4. Síndrome de Taura en Jaibas

Ante el raro comportamiento de las jaibas presentes en las piscinas y canales de las camaroneras de la zona de Taura, las cuales no soportaban permanecer dentro del agua y salían de ella para morir en los muros, se efectuaron en 1992 revisiones histológicas de estos animales, los cuales presentaron el mismo tipo de lesiones descritas para el Síndrome de Taura. Esta observación es de particular importancia ya que los patógenos son específicos para una especie, lo que implica una etiología no infecciosa para el Síndrome de Taura (Barniol, 1995).

1.3.1.2. Pruebas Directas

Tal como muestran los indicadores de etiología tóxica hasta aquí descritos, los posibles causantes del Síndrome de Taura pueden ser el Tilt® y el Calixin®. En la tabla 2 se observan las características de ambos pesticidas (Turnbull and Stagg, 1994).

Tabla 2.- Características de los fungicidas usados para el control de Sigatoka negra en los bananos (Turnbull and Stagg, 1994).

	Propiconazole	Tridemorph
CAS No. Registro	60207-90-1	81412-43-3
Log K_{ow}	3.6	4.2
K_{oc}	100-1000	1900-2 1 00
Degradación de productos en el Ambiente	1,2,4 Triazole	2,6 Dimethylmorpholine
Media vida-suelo	20- 110 días 40-70 días 25-85 días	14-50 días"
Media vida en ambiente acuático	113 días" 73 días (sedimento)8	16 días"

a= Datos de BASF

b= Datos de CIBA GEIGY

1.3.1.2.1. Efecto de Tilt® y Calixin® sobre diferentes organismos planctónicos

Se han realizados diferentes pruebas de toxicidad con propiconazole sobre otros organismos que el camarón, cuyos resultados están resumidos en tabla 3.

Tabla 3. Toxicidad de propiconazole sobre diferentes organismos tito y zooplanctónicos

Organismo	Parámetro	Conc (ppm)
Gastrópodos <i>Physa fontinalis</i>	LC50-96 hrs	1.3 ^c
Crustáceos <i>Daphnia magna</i> Jaiba Mysidaceae	LC50-48hrs LC50-96 hrs LC50-96 hrs MATC 21 días NOEC 28 días	2.2 - 11.5 ^b 42 ^b 0.51 ^b 0.36 ^c 0.205 ^c
<i>Gammarus lacustris</i>	LC50-96 hrs	1.3 ^c
Fitoplancton	EC-50 (tasa de crecimiento)	
<i>Selenastrum capricornutum</i>		5 ^d
<i>Cryptomonas pyrenoidiflia</i>		0.13 ^d
<i>Cyclotella sp.</i>		3.3 ^d
<i>Microcystis aeruginosa</i>		10 ^d
<i>Synechococcus leopoliensis</i>		4.5 ^d
<i>Chlamydomonas noctigama</i>		0.0008 ^d
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		2.2 ^d
<i>Chlamydomonas obesa</i>		5.4 ^d

a.- Datos de BASF (Turnbull and Stagg, 1994)

b.- Datos de Ciba Geigy (Turnbull and Stagg, 1994)

c.- Aanes & Bækken, 1994.

d.- Källqvist & Romstand, 1994 (a).

En Noruega algunos investigadores han estudiado el nivel de toxicidad de propiconazole para diferentes organismos zoo y fitoplanctónicos (ver tabla 3). Se realizaron estudios en mesocosmos y concluyeron que el propiconazole afecta la diversidad de algas (Källqvist & Romstad, 1994 a).

También se encontró que hay una diferencia en toxicidad entre varias especies y taxa (diferencias en toxicidad para diferentes taxa de *Chlamydomonas* sp.) lo cual indica que no es válido concentrarse en una sola especie para ver el efecto de un pesticida sobre el medio ambiente (Källqvist *et.al.*, 1994 b).

1.3.1.2.2. Ensayos de toxicidad aguda para camarón

Para verificar el efecto sobre el organismo de interés, el camarón *Penaeus vannamei*, diferentes laboratorios han realizado pruebas de toxicidad aguda para establecer los niveles de concentración letal para el 10% (LC 10) y 50% (LC 50) de la población de *P. vannamei* usando los fungicidas implicados y el aceite agrícola.

El CENAIM completó en el año 1993 diferentes estudios toxicológicos para determinar una dosis letal media (LC 50) en *P. vannamei* sometidos a los pesticidas (Tilt® y Calixin® y la mezcla en proporción 1: 1) utilizando ensayos de toxicidad aguda de hasta 96 horas (Buike, 1994). Las tablas 4 y 5 contienen los resultados.

Tabla 4.- Resultados de ensayos de toxicidad para Tilt® a diferentes salinidades y pesos para determinar 96-horas LC 50 (Buike, 1994).

96horas-LC50(ppb)			
Salinidad ppt\Peso(gr.)	1.0	0.5	0.1
32	326	317	242
15	342	319	267
2	238	132	123

Tabla 5.- Resultados de ensayos de toxicidad para determinar 96-horas LC 50 en animales de 0.1 g. a diferentes salinidades (Buike, 1994).

96horas-LC50(ppb) para Tilt®, Calixin® y mezcla			
Pesticida\Salinidad(ppt)	32	15	2
Calixin®	755	395	275
Calixin®+Tilt®	328	262	159
Tilt®	242	267	123

Durante 1994 y 1995 el CENAIM continuó haciendo ensayos de tipo toxicológico en el marco de un proyecto de investigación con la UNESCO con la finalidad de obtener el 48-horas LC 50 para utilizar esta concentración en pruebas de toxicidad crónica (Carrera *et.al.*, 1996). Los resultados se detallan en la tabla 6.

De igual manera muchas compañías privadas afectadas por el Síndrome de Taura desarrollaron pruebas de toxicidad aguda (Cámara Nacional de Acuicultura, 1994). Estos resultados se detallan en la tabla 7, 8 y 9.

Tabla 6.- Resultados de ensayos de toxicidad aguda para Tilt®, Calixin®, Tilt®+Calixin®. (Carrera *et.al.*, 1996)

Producto	# test	Salinidad (ppt)	48h LC10 (ppb)	48h LC50 (ppb)
Tilt®	II ^a	35	290	500
	III ^b	35	340	n.c.
	V ^a	2	320	1300
Calixin®	II ^a	35	550	1590
	V ^b	35	300	1000
Tilt®+ Calixin®	II ^{a, c}	35	110:190	270:460
	III ^{b, c}	35	160:270	360:610
	V ^{a, d}	2	150:150	n.c.

n.c.- no calculable.

a.- prueba realizada con *P. vannamei*.

c.- relación Tilt®:Calixin® 1: 1.7.

b.- prueba realizada con *P. stilyrostris*.

d.- relación Tilt®:Calixin® 1: 1.

Tabla 7.- Resultados de ensayos de toxicidad para determinar 96-horas LC 50, realizados por Ibsa (Cámara Nacional de Acuicultura, 1994)

Producto	# test	Estadio	Salinidad (ppt)	LC50-96h (ppb)
Tilt®	I	Pl. 20	2	150
			20	230
	II	Pl. 20	2 (N.F.)	240
			2 (P.F.)	290
	III	Pl. 13	20 (N.F.)	320
			20 (P.F.)	ND
Calixin®	I	Pl. 20	2	<100
			20	370
	II	Pl. 20	2 (N.F.)	290
			2 (P.F.)	ND
	III	Pl. 13	20 (N.F.)	ND
			20 (P.F.)	ND

ID.- No determinado

P.F.- Pre-filtrada en carbón activado

N.F.- No filtrada

Tabla 8.- Resultados de ensayos de toxicidad para determinar 24-horas LC 50 usando *P. vannamei* (PI- II, Temp. 22±1°C), sin alimentación (Intriago *et.al.*, 1992; fide Cámara Nacional de Acuicultura, 1994).

24horas-LC50(ppb) para diferentes pesticidas	
Pesticida\Salinidad(ppt)	10
Calixin®	1544.9
Tilt 250 EC®	1527.8
Tilt®+Calixin® (1: 1)	1008.7
Benlate OD	5245
Ambush 50 CE	0.036
Curacron 500 EC	10.48

Tabla 9.- Resultados de ensayos de toxicidad para determinar 96-horas LC 50, sin alimentación, Temp. 29-30°C, no se menciona la especie y estadio de animales utilizados (Daniels y Pavel, 1994).

96horas-LC50(ppb) para diferentes pesticidas	
Pesticida\Salinidad(ppt)	
Tilt®	210
Calixin®	>2<5
Bravo®	alrededor de 100
Tilt®+Calixin® (1: 1)	ND

ND.- no determinado.

Observando los datos de 96-horas LC 50 presentados, no se puede establecer comparaciones entre ellos porque cada autor trabajó con un peso o estadio diferente.

Además no se menciona (a excepción de Buike, 1994), el método estadístico usado para el cálculo de las concentraciones letales.

Se puede **unicamente** observar una serie de concentraciones, descritas en las tablas 4 a 9. Sin tomar en cuenta la edad de los animales o método de análisis de datos, tendríamos los rangos descritos en la tabla 10, como concentraciones letales para los pesticidas involucrados.

Tabla 10.- Rangos de toxicidad aguda de fungicidas en el *P. vannamei*, sin considerar edad de los animales ni método de análisis de datos utilizado por cada autor.

Prueba	salinidad	Tilt® ppb	Calixin® ppb	Tilt®+Calixin® (1:1) ppb
24h LC50	10	1520	1540	1008
48h LC10	2	320	330	300
	35	290-340	550-700	300-430
48h LC50	2	1300	1000	--
	35	500	1590	730-970
96h LC50	2	123-290	2-290	159
	15	342	395	262
	20	230-320	370	--
	32	326	755	328

Los valores de 96-horas LC 50 para la mezcla de Tilt®:Calixin® en relación 1: 1 reportados por Buike (1994) no demuestran un efecto sinérgico de esta mezcla manifestado en mayor mortalidad.

Esto es corroborado por Daniels y Pavel (1994) quienes reportan mortalidades menores en camarones expuestos a la mezcla de los pesticidas, en comparación con las mortalidades obtenidas al aplicar únicamente un pesticida.

Es importante destacar que Intriago (1995), reporta la aparición de Síndrome de **Taura** en las muestras colectadas al final de sus pruebas de toxicidad aguda, las cuales tuvieron una duración de 24 horas. Esta observación no ha sido reportada en ningún otro ensayo de toxicidad aguda.

1.3.1.2.3. Pruebas de toxicidad crónica agregando pesticidas al agua

Con este tipo de ensayos se intentó replicar el Síndrome de **Taura**, sometiendo los animales a largos períodos de exposición con los pesticidas, los cuales fueron adicionados en el agua.

El CENAIM durante los años de 1994 y 1995 desarrolló ensayos de toxicidad crónica, en ellos se usaron postlarvas de *P. vannamei* con distintos pesos húmedos, salinidades, concentraciones de pesticidas y duración (datos mostrados en tabla II) (Carrera *et.al.*, 1996).

Tabla II.- Concentraciones usadas en los ensayos de toxicidad crónica con temperatura constante de 24°C (Carrera *et. al.*, 1996).

TEST	PESO HUM.(g)	S (ppt)	DIAS	ppb			
				Tilt®	Calixin®	Tilt® + Calixin®	
I	0.03-0.08	35	21	300	500	100:200	
II	0.08-o. 12	35	31	300	500	100:200	
III	0.03-0.08	2	33	300	300	150:150	
				T + AA	C + AA	T + C + AA	AA
I v	0.004-O. 12	2 y 35	21	300: 1000	300: 1000	150:150:1000	1000

T: Tilt®

C: Calixin®

AA: Aceite Agrícola

Las muestras obtenidas durante las revisiones diarias (camarones moribundos) y las obtenidas al final de cada ensayo fueron analizadas. La histopatología no reveló las características patognomónicas del Síndrome de **Taura** ni otras lesiones que se puedan relacionar al efecto de los pesticidas. No se encontró diferencias significativas de crecimiento

entre los animales de control y los sometidos a los pesticidas en el ensayo 1. La supervivencia no fue **evaluada** estadísticamente.

Sin embargo, en 1996, *Intriago et.al.*, reportó la inducción exitosa de la enfermedad al someter camarones *P. vannamei* a concentraciones de 1 y 10 ppb de la mezcla (relación 1: 1) en el agua, por un período de 18 días, a 0 ppt de salinidad (dureza de 21 mg/l como CaCO₃) y temperatura de 28°C.

1.3.1.2.4. Pruebas de toxicidad crónica agregando pesticidas al alimento

Intriago *et.al.*, (1992) *fide* Cámara Nacional de Acuicultura (1994), investigaron el efecto de los fungicidas administrando 3 diferentes concentraciones de la mezcla de estos en la dieta y comparando estos tratamientos con el control (0 ppb de fungicidas en la dieta). Después de 15 días de experimentación, no hubo una diferencia en la supervivencia y solo los tratamientos que recibieron 50 y 100 ppb de coctel, mostraron un 44% y 75% de su población afectada con Síndrome de **Taura**, al contrario de los demás tratamientos. Comparando el efecto de administrar 50 ppb de coctel en la comida, a larvas colocadas a diferentes salinidades, estos autores concluyen que en salinidades de 22 y 35 ppt existe un porcentaje de supervivencia ligeramente menor que el obtenido en 2 ppt (12.5% vs. 2 1.9% para 2 ppt). Sin embargo, hay que destacar que a la salinidad de 12 ppt, solo se reportó 9.4% de incidencia de Síndrome de **Taura**.

Resumiendo los datos de Intriago *et.al.*, (1992) *fide* Cámara Nacional de Acuicultura (1994), se puede concluir que ellos replicaron la enfermedad, administrando la mezcla de los fungicidas en la dieta.

Estos experimentos fueron repetidos en 1996 por Intriago *et.al.*, Nuevamente no se produjeron diferencias en la supervivencia entre tratamientos (agua con 108 mg Ca/l), pero se observó desde una **concentracion** de 1000 ppb de coctel, incidencia severa de Síndrome de

Taura en los tratamientos. El mismo caso se observó en agua con 21 mg **Ca/l**, con la diferencia de que la supervivencia fué considerablemente más baja.

1.3.1.2.5. Pruebas del efecto de los pesticidas sobre la digestibilidad del camarón

Trabajos realizados por Intriago *et.al.*,(1994), presentan evidencia que involucra a los pesticidas **Tilt®** y **Calixin®** en el desarrollo del Síndrome de **Taura** y en problemas de digestibilidad en el camarón. Se realizó una prueba *in vivo*, que consistió en observar el efecto de diferentes concentraciones de Pancreatina agregada en la dieta y suministrada a juveniles expuestos a 75 ppb de Propiconazole y 59.2 ppb de Tridemorph en el agua, a salinidad de 2 ppt. Los animales usados en esta prueba fueron previamente alimentados con trozos de camarones durante 3 días antes de la prueba, y durante la misma, fueron alimentados con dieta balanceada, la cual contenía las diferentes concentraciones de Pancreatina. El uso de Pancreatina en la dieta incrementó la supervivencia del camarón (de $29\pm 1.4\%$ agregando 0.01% de pancreatina hasta $45\pm 1.4\%$ agregando 0.1%) y disminuyó la presencia tanto de Síndrome de **Taura** (de 68.8% a 3 1.3%), como de IHHNV (de 8 1.3% a 37.5%).

Como la pancreatina contiene muchas enzimas como **amilasa**, tripsina, lipasa, ribonucleasa y proteasa (Sigma, 1995), una posible explicación para las observaciones aquí descritas, puede ser que añadiendo enzimas, se ayuda en forma general a la asimilación de los nutrientes, la dieta es digerida mas eficaz y eficientemente, por lo cual, se obtiene un camarón más fuerte y resistente contra IHHNV y ST.

Los mismos autores realizaron también pruebas de toxicidad *in vitro*, extrayendo hepatopáncreas de 10-20 camarones sanos y mezclándolos con caseína, usada como fuente de proteína.

Se determinó la digestibilidad, analizando la cantidad total de proteína consumida y las moles de aminoácidos producidos, calculando el ratio de digestibilidad (RD) siendo éste los μg de proteína o aminoácidos libres producidos por μg de proteína de extracto de hepatopáncreas digerido por minuto. El porcentaje de inhibición es: $[(RD_{\text{control}} - RD_{\text{tratamiento}}) * 100] / RD_{\text{control}}$.

Los resultados indican que hay una disminución de 9% al ser sometido a la mezcla de los pesticidas en relación 1: 1. Menciona además que el uso de esta mezcla con aceite agrícola en relación 1: 13.5 duplica el efecto de inhibición de la digestibilidad (disminución del 22%).

Experimentos de evaluación de actividad enzimática del camarón *in vivo*, son reportados por Carrera *et.al.*, (1996), su estudio enfoca la actividad de tres enzimas específicas: la Glucosa-ó-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), Aspartato aminotransferasa (GOT) y Alanina aminotransferasa (GPT). Sus resultados indican que el Tilt® y Calixin® provocan una alteración en el metabolismo del nitrógeno y la glicólisis (subiendo la actividad de una enzima y bajando la actividad de otra), y, al contrario de lo que reporta Intriago *et.al.*, (1992) *fide* Cámara Nacional de Acuicultura (1994), que la mezcla de los pesticidas (Tilt®:Calixin® en relación 1: 1) no tiene efecto sinérgico en la actividad de las enzimas mencionadas.

1.3.1.2.6. Factores que influyen en la aparición del Síndrome de Taura

a) Salinidad.- Las pruebas hasta aquí mencionadas establecen una relación inversamente proporcional entre salinidad y toxicidad (Intriago *et.al.*, 1992 *fide* Cámara Nacional de Acuicultura, 1994; Buike, 1994). La literatura disponible presenta diferentes hipótesis: es probable que el trabajo osmótico requerido abaja salinidad, para mantener la homeostasis en el camarón, sea un factor de constante estrés fisiológico, lo cual lleva al camarón a ser más sensible ante la presencia de un tóxico (Buike, 1994). Por su parte, Brown, 1967 *fide* Buike, 1994 sugiere que cuando la salinidad se incrementa, el coeficiente de asociación iónica se incrementa y como resultado existen menos iones disponibles para reacciones que involucran iones libres.

b) Tamaño del organismo.- Los animales de mayor tamaño tienen mayor capacidad de almacenar pesticidas en sus reservas de lípidos antes de que dicho pesticida circule por su sistema humoral. Se cree que el metabolismo en la mayoría de especies de camarón cambia de lípidos a proteínas con la edad (Mc Kenny, 1986), en cuyo caso los animales más pequeños tendrían varias condiciones adversas que potencializan la acción del tóxico: la limitada capacidad de almacenar lípidos, la velocidad de movilización y catabolización de los mismos, y el permanente estrés osmótico que se da al camarón en agua de baja salinidad. Esto significa que los camarones de menor tamaño no tienen posibilidad de colocar los pesticidas que entran en su metabolismo sino en su sistema humoral, haciendo más rápida la manifestación de la toxicidad (Buike, 1994). Es importante destacar, que esta condición (animales de 0.1 gramos a 5 gramos) se mantiene como factor común en los episodios de Síndrome de **Taura** tal como lo sostiene Jiménez (1995) cuando menciona que nunca ha observado la enfermedad en camarones mayores a 5 gramos.

c) Dureza del agua.- Otro factor que Intriago *et.al.*, (1996) asociaron a la expresión de toxicidad de los fungicidas es la dureza del agua. Según se concluye, la toxicidad es inversamente proporcional a la dureza del agua (expresada como CO_3Ca).

El 24-horas **LC50** para la mezcla en agua con dureza de 21 mg **Ca/l** es de 75 ppb, en 108 mg **Ca/l** 200 ppb y en 459 mg **Ca/l** es de 325 ppb. En pruebas de toxicidad aguda (24 horas) añadiendo un inhibidor de consumo de calcio (Verapamil) a concentraciones de 4 y 15 mg/l se observó que las concentraciones letales de 50% para la mezcla son más bajas cuando se añade 15 mg/l de Verapamil.

Esto muestra, de otra manera, que la disponibilidad de Calcio en el agua es importante cuando se verifica el efecto de fungicidas sobre la supervivencia del camarón.

d) Estabilidad de los fungicidas.- Mediante análisis espectrográficos, se ha determinado que el **Tilt®** fabricado en 1992, presenta una curva espectrográfica diferente a la que presenta el **Tilt®** fabricado en 1995 y que se continúa usando en las plantaciones bananeras de Ecuador. No así el **Calixin®** que sigue presentando la misma curva espectrográfica (Intriago *et.al.*, 1996). Los test de toxicidad aguda con los dos lotes de **Tilt®** enseñan que el 24-horas **LC50** del **Tilt®** fabricado en 1994 es ± 2500 ppb mientras que el lote del año 1992, abierto en 1994, da un 24-horas **LC50** de 500 ppb, es decir 5 veces más tóxico que el anterior. También se ha determinado mediante ensayos que el **Tilt®**, una vez sacado de su envase o una vez abierto el mismo, pierde actividad con el tiempo (períodos de más de un año).

Esta condición debe ser tomada muy en cuenta al momento de realizar pruebas toxicológicas, de usarse un producto almacenado mucho tiempo, se podría atenuar el efecto tóxico del mismo (Intriago *et.al.*, 1996).

1.3.1.2.7. Conclusión del origen toxicológico

Basados en toda la información aquí presentada, se cuenta con algunas pruebas que indican que los pesticidas **Tilt®** y **Calixin®** son los causantes del problema de Síndrome de Taura, esto fué expresado formalmente durante el Taller sobre Síndrome de Taura realizado en Arizona, en la tercera moción, la cual concluye: “A la fecha, toda la evidencia sugiere que una toxina o toxinas, o un metabolito de ellas, es el agente causal del Síndrome de Taura” lo que confirma los resultados obtenidos por Intriago *et.al.*, (1992) *fide* Cámara Nacional de Acuicultura (1994). Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, estos resultados no han podido repetirse, y la razón que exponen los mismos autores en 1996 es que no se han considerado factores claves como: tamaño de los animales, dureza del agua, estabilidad del fungicida y salinidad del agua (cuya forma de acción se explicó anteriormente).

1.3.2 Causa viral

Si bien es cierto que hasta 1994 la etiología toxicológica se presentaba como la causa más probable del Síndrome de **Taura**, nunca se reportó observación de partículas virales en muestras de animales con Síndrome de **Taura** (Cámara Nacional de Acuacultura, 1994).

1.3.2.1. Pruebas de la presencia de un patógeno

Para este efecto, se han utilizado dos tipos de pruebas a las que se denomina “de infectividad”. La primera modalidad consiste en alimentar camarones sanos, con trozos de otros camarones que presenten todas las características del Síndrome de **Taura** (signos clínicos e histológicos), con la finalidad de transmitir horizontalmente el agente patógeno. Esta modalidad es conocida como infección oral y utiliza como controles trozos autoclavados de camarones enfermos con Síndrome de **Taura** (Brock *et.al.*, 1995; Hasson *et.al.*, 1995; Carrera *et. al.*, 1996). La segunda modalidad, denominada infección vía inyección intramuscular, consiste en inyectar un homogenizado crudo de camarones enfermos con Síndrome de **Taura** en camarones, los animales que mueren en esta fase son inmediatamente colectados y congelados a -80°C , posteriormente se recupera el patógeno en forma pura, es decir aislándolo, para volverlo a inyectar en camarones sanos como un inóculo de virus purificado.

Esto constituye la segunda fase de este tipo de pruebas, en la que de igual manera se colectan los animales muertos para una segunda recuperación y aislamiento del patógeno que es vuelto a inyectar en forma de inóculo purificado (tercera fase del experimento). Los animales moribundos son colectados aquí para la confirmación histológica de la enfermedad, y los muertos se colectan para recuperar el patógeno (Brock *et.al.*, 1995; Hasson *et.al.*, 1995).

En ambos tipos de ensayos se cumplen los postulados de River (vigentes desde 1937) los cuales dicen: “Para demostrar la etiología infecciosa de un enfermedad, el patógeno debe ser aislado del animal enfermo y debe ser capaz de inducir la misma enfermedad, con todas sus

características, cuando es inyectado en forma de extracto de células libres en un animal de la misma especie libre de dicha enfermedad”. Este postulado se utiliza como condición fundamental para poder establecer si la etiología de una enfermedad es infecciosa.

La causa originalmente atribuida al Síndrome de **Taura** fueron los pesticidas Tilt® y Calixin®, sin embargo, como se ha detallado anteriormente, la exposición de camarones *P. vannamei* a estos fungicidas en el agua no provocan la enfermedad, a excepción de Intriago *et.al.*, 1996. Adicionalmente, se comenzaron a reportar y confirmar episodios de Síndrome de **Taura** en zonas donde no se cultiva banano, es decir, zonas sin influencia de pesticidas (Brock *et.al.*, 1995).

Durante 1994, se efectuaron estudios en Hawai que posteriormente se repitieron en el Centro de Patología Acuicola de la Universidad de Arizona (UAZAPC), en los que se demostró que era posible inducir Síndrome de **Taura** en *P. vannamei* utilizando ensayos de infectividad vía oral con exposición de 5 a 6 días, la revisión de los tejidos de camarón enfermo en el microscopio electrónico reveló la presencia de partículas citoplásmicas de un virus putativo (Brock *et.al.*, 1995).

Basado en esta observación, Brock *et.al.*, (1995) desarrollaron pruebas de infectividad vía oral e inyección intramuscular, confirmando la presencia de este virus putativo. Estos resultados coinciden con los reportados por Hasson *et.al.*, (1995); Laramore (1995) y Carrera *et.al.*, 1996), quienes usaron este mismo tipo de pruebas.

El agente patógeno encontrado se clasificó tentativamente como un picornavirus, basándose en su morfología (icosaedro de 30-32 nm de diámetro). Es citoplásmico, con densidad de 1.337 g/ml, negativo a la tinción Feulgen, contiene una cadena lineal de ARN de 9kb (aproximadamente), la cual. tiene tres polipéptidos mayores (49, 36.8 y 23 kDa) y dos menores (5 1.5 y 52.5 kDa) que forman su cápsula (Lightner, 1995).

Sin embargo, una prueba de infección vía oral realizada por Intriago *et.al.*, (1992) *fide* Cámara Nacional de Acuicultura, 1994, presenta resultados opuestos a los encontrados y descritos por Brock *et.al.*, (1995); Hasson *et.al.*, (1995); Laramore (1995) y Carrera *et.al.*, (1996). Los animales, según reporta Intriago *et. al.*, (1992), fueron alimentados con trozos de camarones enfermos con Síndrome de **Taura** durante 3 días, posteriormente se les proporcionó dieta artificial durante 15 días, tiempo en el que fueron colectados para su evaluación. Al efectuar la revisión histológica, no observó Síndrome de **Taura** en ninguno de los tratamientos (autoclavados y sin autoclavar), sin embargo, la supervivencia reportada en el caso en que se usó alimento autoclavado, es significativamente mayor, comparada con la supervivencia **obtenida** cuando se usó alimento sin autoclavar.

Esto sustenta, según Intriago *et.al.*, (1992) *fide* Cámara Nacional de Acuicultura (1994), la hipótesis de la existencia de un metabolito tóxico que el camarón produce al incorporar el pesticida en su metabolismo. Al autoclavar los trozos de camarones enfermos, se reduce significativamente la mortalidad, lo cual demuestra que el metabolito es lábil.

Posteriormente Intriago *et.al.*, (1994), alimentan antes de la prueba con animales enfermos congelados (suministrando además pancreatina en la dieta), junto con la presencia de pesticidas en el agua. El resultado del análisis histopatológico indica la presencia del Síndrome de **Taura** en todos los casos. Por esto, no se puede concluir si la enfermedad es originada por la administración de los fungicidas al agua o por la alimentación con los animales afectados con Síndrome de **Taura**.

Intriago *et.al.*, (1996) repitieron el experimento de infectividad con una diferencia, todos los ingredientes de la dieta (incluso los animales congelados autoclavados y no autoclavados) fueron liofilizados. En la tabla 12, se observan los porcentajes de animales autoclavados y no autoclavados en cada dieta (variando de 0 a 25%) para los experimentos en 0 y 35 ppt.

En el último caso no hubieron entre las diferentes dietas, diferencias en supervivencia, lo cual no fué el caso en 0 ppt en donde se notó en la dieta 3 (0% animales autoclavados y 25% animales no autoclavados) sólo 54% de supervivencia. Sin embargo, en ninguno de los casos, se pudo observar lesiones del Síndrome de **Taura**.

Tabla 12.- porcentajes de animales autoclavados y no autoclavados en cada dieta (variando de 0 a 25%) para los experimentos en 0 y 35 ppt (Intriago *et.al.*, 1996).

	0 ppt			35 ppt		
	D1%	D2%	D3%	D1%	D2%	D3%
TS ¹ en dieta	0	2.5	25	0	12.5	25
TS ¹ no autoclavado	0	2.5	25.0	0	12.5	25.0
TS ¹ autoclavado	25.0	22.5	0	25.0	12.5	0

1.- TS: El porcentaje de camarón cortado en trozos con Síndrome de **Taura**(+) es calculado basándose en el peso seco.

1.3.2.2. Sonda nucleica específica para el Virus del Síndrome de Taura (VST)

Uno de los mayores adelantos realizados en la investigación de la etiología del Síndrome de **Taura**, posterior a la aislación y purificación del virus, es sin duda, el desarrollo de una sonda nucleica específica para el VST (Figura 6) en los laboratorios de la Universidad de Arizona (Hasson, 1995). Con dicha sonda, se demostró la presencia de los ácidos nucleicos del virus en lesiones cuticulares patognomónicas del Síndrome de **Taura** de camarones infectados (colectados en 1992 en piscinas camaroneras de Ecuador). Estos resultados confirmaron la existencia del patógeno desde 1992 en Ecuador y lo convierte en la etiología directa del Síndrome de **Taura** (Hasson, 1995; Brock, 1995).

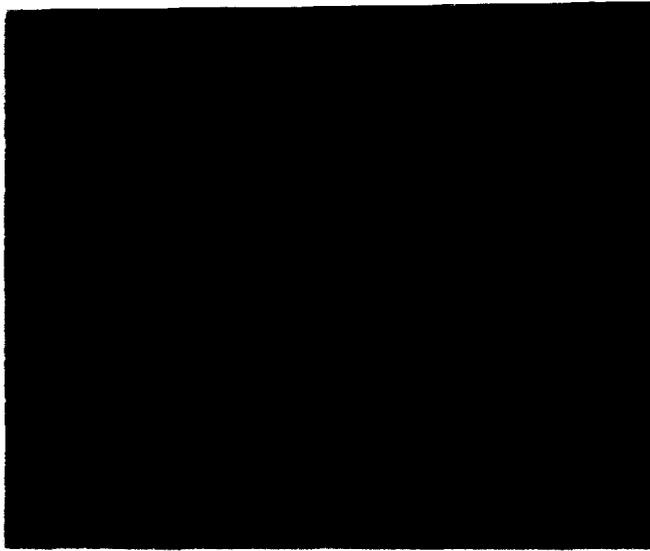


Figura 6. Sonda nucleica específica contra TSV. Corte histológico de un apéndice de una postlarva *P. vannamei* en la fase aguda del Síndrome de Taura. La sonda ha reaccionado intensamente con las células infectadas con TSV, reconociendo el citoplasma de las células del epitelio cuticular y de las células del tejido conectivo subcuticular. La sonda no reconoció los **nucleos** pignóticos y carioquinéticos (flechas), debido a que el TSV solo afecta al citoplasma. Magnificación 900 X (Tomado de DIG-labeled probe & Bismarck Brown *vide* Lightner, 1995)

1.4. TOXICOLOGIA ACUATICA

1.4.1. Definición de la Toxicología acuática

La toxicología acuática es el estudio de los efectos de químicos u otros materiales antropogénicos o naturales (juntos llamados agentes o sustancias tóxicas) sobre organismos acuáticos a diferentes niveles de organización: desde el nivel subcelular hasta organismos individuales, comunidades y ecosistemas. Los efectos pueden ser desviaciones positivas y negativas, pero la toxicología acuática más que nada se enfoca en los procesos adversos a la naturaleza. Esta ciencia es una rama de la Ecotoxicología, la cual es definida como la ciencia que estudia los efectos tóxicos de sustancias naturales o artificiales sobre organismos vivos (p.ej. peces, pájaros, plantas), sea de naturaleza animal, vegetal o acuática, los cuales constituyen la biosfera. Su objetivo principal es proteger poblaciones y comunidades de muchas especies de la exposición a sustancias y materiales tóxicos en concentraciones que pueden ser asociadas con efectos adversos (Rand *et.al.*, 1995).

1.4.2. Diferentes tipos de pruebas de toxicidad

Las pruebas de toxicidad son utilizadas para evaluar las concentraciones de un químico y la duración de exposición requeridos para producir los efectos de criterio. La relación dosis-respuesta es la base de los resultados de dichas pruebas .

1.4.2.1. Diferentes enfoques para realizar pruebas de toxicidad

Los efectos adversos pueden ser estudiados

- 1) en experimentos controlados en laboratorios.
- 2) en un modelo del ecosistema (interior o exterior)
- 3) en un ecosistema natural (*in situ*).

Cada uno tiene sus ventajas y desventajas. Al nivel del laboratorio se puede estandarizar bien los ensayos por lo cual es fácil establecer una relación causa-efecto. La limitación es que los efectos son observados bajo condiciones controladas, con un ambiente artificial. La interacción con otras especies no está incluida, como tampoco la influencia del medio natural. Por estas razones un ensayo a nivel de laboratorio no sirve como índice de la toxicidad para una comunidad entera o para un ecosistema natural . Los ensayos del campo (sea con una o con diferentes especies, o un ensayo a nivel de un ecosistema) dan resultados más reales pero son difíciles de monitorear y los resultados pueden ser atribuidos a diferentes factores. Por lo tanto la relación causa-efecto es difícil de establecer (Rand *et.al.*, 1995).

1.4.2.2. Diferentes sistemas de pruebas

El funcionamiento de los diferentes ensayos puede ser diseñado de 4 maneras diferentes:

- 1) Ensayo estático.- el químico es añadido al agua de dilución y no hay recambio de agua durante la prueba.
- 2) Ensayo de **recirculación**. es similar al ensayo estático sólo que las soluciones son recirculadas
- 3) Ensayo de renovación.- con recambio periódico de agua.
- 4) Ensayo de flujo continuo.-se instala un flujo continuo por medio del cual se puede obtener continuamente la concentración deseada del químico.

1.4.2.3. Diferentes pruebas de laboratorio

Las pruebas más utilizados al nivel de laboratorio son : ensayo de toxicidad aguda, ensayo de toxicidad crónica, ensayo subletal de corta duración, prueba de bioacumulación.

1.4.2.3.1. Ensayo de toxicidad aguda

Estas pruebas son utilizadas para evaluar la toxicidad relativa de un químico con una corta duración sobre organismos acuáticos seleccionados. Los efectos más comunes son mortalidad, movilidad y tasa de crecimiento. Los datos generados son expresados en forma de la concentración que genera el efecto para un cierto porcentaje de la población, p.ej. **EC50-96** horas es la concentración que resulta de un efecto al 50 % de la población en un tiempo de 96 horas. En caso que el efecto es mortalidad, se usa el LC, cual es la concentración letal (Rand *et.al.*, 1995).

1.4.2.3.2. Ensayo de toxicidad crónica

Estas pruebas permiten evaluar el efecto adverso de un químico por un tiempo largo con concentraciones subletales. En una prueba de toxicidad crónica completa los organismos son expuestos durante todo el tiempo de vida. Una prueba crónica de ciclo de vida parcial cubre solo estadios de vida sensibles, por ejemplo para *Daphnia magna* la prueba estandarizada es ± 21 días, mientras que para el *Pimephales promelas* es **275300** días.

Los datos obtenidos se expresan en forma de :

1)NOEC (No effect **concentration**)._ es la máxima concentración que no genera estadísticamente efectos adversos al ser comparada con el control.

2)LOEC (Lowest effect **concentration**)._ es la más baja concentración que genera un efecto adverso estadísticamente, en comparación con el control.

3)MATC (Maximum **acceptable concentration**)._ es la concentración crítica de un químico que se calcula en muchos casos como el promedio geométrico del NOEC y LOEC (Rand *et.al.*, 1995).

1.4.2.3.3. Ensayo subletal de corta duración

La EPA desarrolló esta prueba de corta duración para evaluar el efecto tóxico de efluentes a organismos acuáticos (7-9 días), sólo enfocando a los estadios más sensibles. Se puede expresar los datos de LC o EC 50, NOEC, LOEC y MATC (Rand *et.al.*, 1995).

1.4.2.3.4. Pruebas de bioacumulación

Los químicos **lipídicos** con una baja solubilidad en agua, tienden a concentrarse en tejidos **lipídicos** y mostrar una toxicidad acumulativa. Para estos productos a través de pruebas de bioacumulación se trata de obtener el factor de bioconcentración (BCF), el cual es la relación entre el promedio de la concentración acumulada en los tejidos de los animales sobre el promedio de la concentración medida en el agua (Rand *et.al.*, 1995).

1.4.3. Prueba de toxicidad aguda: validez

Según Rand *et.al.*, (1995).es difícil extrapolar resultados obtenidos con una especie y un punto final, al efecto del químico al medio ambiente. Por esta razón Cairns *et.al.*,(1992) expresa la necesidad de evolucionar en la toxicología acuática para desarrollar hipótesis incluyendo sistemas naturales y modelos que son validos en el campo y no sólo en recipientes de vidrio.

Aún Abel y Axiak, (1991) consideran algunas situaciones en las cuales los ensayos de toxicidad letal tienen su valor. Las pruebas de toxicidad aguda son ensayos de primera evaluación (“screening tests”), los cuales pueden ser utilizados para establecer el rango de las concentraciones en las cuales un polucionante genera mortalidad en una especie. Se evalúa de una manera simple por lo cual el resultado sólo se puede utilizar como una guía aproximativa de la concentración tóxica real, que puede ser **obtenida** por medio de experimentos más complejos.

Hay que tomar en cuenta que un ensayo de corta duración puede ser insuficiente para productos con un $\log K_w > 5$ y una solubilidad baja, lo que implica que los estudios crónicos sean preferidos para estas sustancias (Pack, 1993).

1.4.4.Cálculo de concentraciones letales usando el análisis Probit

Los gráficos de la concentración-repuesta, que es la concentración versus porcentaje de mortalidad, tienen una forma sigmoidea (Figura 7A). Existe una linearidad en la parte central de la curva alrededor del LC 50. Por esta razón el LC 50 es el valor estadístico que se puede estimar con una mayor certeza. La transformación de los datos permite estimar con mas exactitud el LC 50 y facilita el calculo de los intervalos de confianza.

El valor LC 50 puede ser calculado por varios métodos, sean por gráfico o por computadora, los métodos mas comunes son: Lichfield-Wicoxon, Binomial, Probit, Logit, Moving average y Spearman-Karber (Peltier y Weber, 1985)

Stephan (1977), muestra que utilizando los diferentes métodos con un mismo set de datos se llega aproximadamente a valores LC 50 similares. La diferencia radica en la estimación de los límites de confianza. Uno de los métodos mas populares es el **Probit** (Peltier y Weber, 1985)

El programa **PROBIT** implica una transformación de las concentraciones a su logaritmo, lo cual reduce la asimetría de la distribución normal. De esta manera la curva guarda la forma sigmoidea, pero se acerca a una línea recta (Figura 7B). Un segundo cambio es la transformación de los porcentajes de mortalidad en **probits**, lo cual resulta en una línea recta (fig.2C). **Probits** son unidades de desviación del promedio, adicionando el valor 5 para evitar valores negativos. Una mortalidad de 50% significa un **probit** de 5.

Los límites de confianza son las líneas en puntos en la Figura 7C, a ambos lados de la línea recta. Estos indican el área en la cual se espera que se encuentra la línea de concentración-repuesta (Rand *et.al.*, 1995).

De la línea de regresión se realiza un test de bondad de ajuste, via el test de χ^2 . Mientras más bajo es el valor de χ^2 , mejor es la regresión. Se debe comparar los χ^2 observados con χ^2 de la tabla con los mismos grados de libertad. Cuando el valor χ^2 observado es mayor al χ^2 de la tabla, se descarta la prueba y no se puede tomar en cuenta los valores de LC obtenidos (Abel y Axiak, 1991)

1.4.5 ..Cálculo de NOEC y LOEC

Para el calculo de la concentración de no efecto (NOEC) y la más baja concentración que produce efecto (LOEC) se realiza un T-test de los resultados (los cuales pueden ser porcentajes de mortalidad, pesos, etc.) de cada concentración con los datos del control a un nivel límite de confianza del 95%. La concentración más alta que no da diferencia con el control es el NOEC. La concentración más baja que da diferencia con el control es el LOEC.

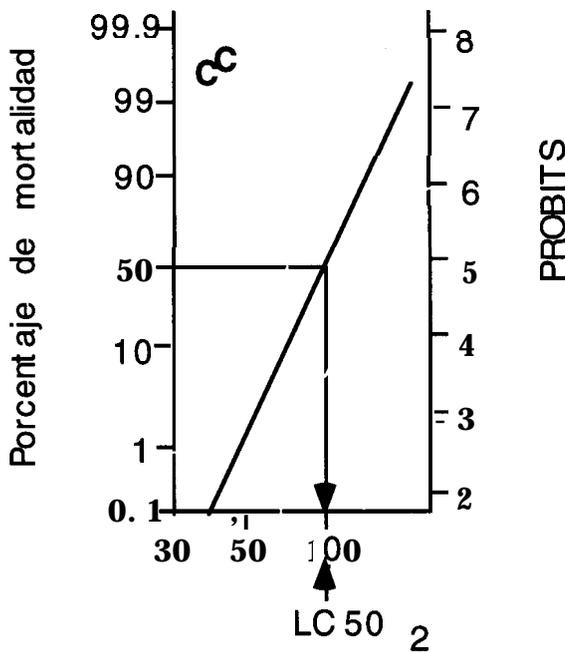
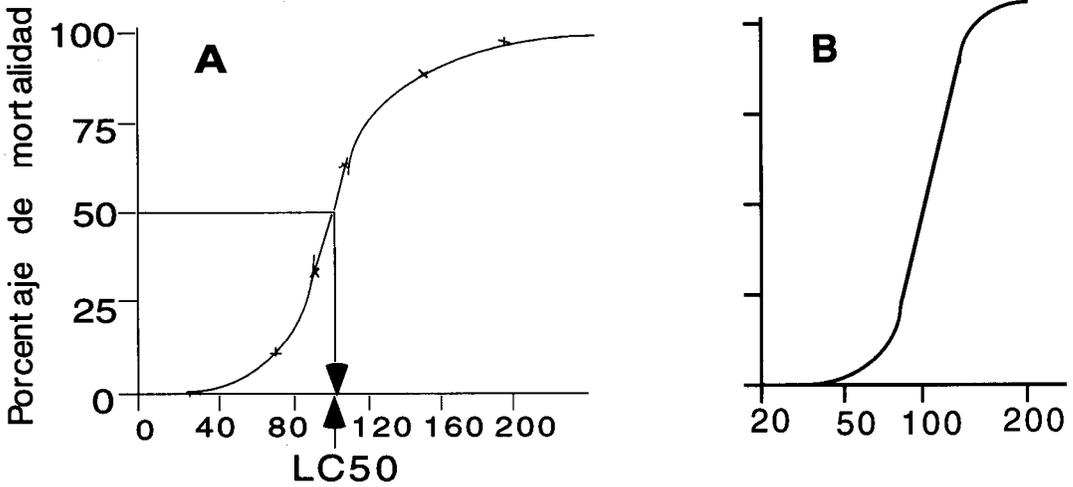


Figura 7. (a) Distribución normal. Curva sigmoidea. (b) mortalidad en escala aritmética y concentración en escala logarítmica. (c) mortalidad expresada como probit versus concentración en escala logarítmica. Las líneas continuas en la curvas representan límites de confianza del 95 %. (Tomado de Rand *et.al.*, 1995)

1.5. PERSPECTIVAS DE INVESTIGACION CIENTIFICA

Es imprescindible efectuar una mayor cantidad de estudios sobre el Síndrome de Taura para poder verificar la etiología del mismo.

Es también necesario, estandarizar procedimientos que permitan establecer concentraciones letales precisas para ciertos estadios de postlarvas, en los que usualmente se presentan los problemas en los sistemas de producción. Por otra parte debe establecerse criterios toxicológicos que ayuden a establecer un equilibrio entre el uso de pesticidas, y los niveles de tolerancia del medio ambiente y las especies que viven en presencia de estos contaminantes. Este tema de tesis generará datos que ayuden a determinar si la etiología del ST es toxicológica, tal como recomienda la EPA: “realizar estudios toxicológicos para probar o confirmar la hipótesis de que los fungicidas Tilt® y Calixin® (individualmente o en combinación) son capaces de inducir el Síndrome de Taura en el camarón” (EPA, 1994). También se establecerán los valores (NOEC) y (LOEC) en camarones *P. vannamei*, usando los pesticidas involucrados en el problema del Síndrome de Taura, esperando que esta información dé pautas para que la actividad Agrícola y Acuícola continúen desarrollándose en forma sostenida en nuestro país.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. METODOLOGÍA DE LOS ENSAYOS TOXICOLÓGICOS

2.1.1. Recepción y mantenimiento de las post larvas

2.1.1.1. Procedimiento estandar de recepción de Post larvas para ensayos de toxicidad.

1) Se tomaron la temperatura y salinidad del agua en que llegan las post larvas (agua de la funda de embalaje y transporte).

2) Los animales fueron colocados en un balde de 20 l y se procedió a estimar el número de post larvas recibidas por el método de **cubicaje** que consiste en sacar al menos 10 muestras de agua del balde de volumen conocido en un beaker de 100-150 ml, y se estimó el número total de animales.

3) Se colocaron las post larvas en un tanque de fibra de vidrio de 200 l a una densidad de 40 **PI/l**, con aireación y con circulación **continua** del 500% en 24 horas (usando 2 sifones a nivel y una línea de entrada controlada de agua, con un caudal de 11.6 ml/segundo). La temperatura y salinidad del agua del tanque tenían que ser las mismas que las medidas anteriormente en el agua de transporte de la funda de embalaje de las post larvas al recibir los animales, de ser necesario se procedió a ajustar de una manera paulatina hasta 28°C y 35 ppt.

4) Una vez sembrado el tanque, se sacó una muestra de aproximadamente 30-40 post larvas semanalmente para pesarlas y calcular el promedio de peso húmedo. En base al peso húmedo promedio se calculó la biomasa del tanque y se determinó las dosis de alimento diario que son:

a) Para alimento **DIAMASA STARTER**, 25% de la biomasa, dividido en 5 dosis diarias (4 de ellas equivalen a las dos terceras partes de la dosis diaria y 1 equivale al tercio restante de dicha dosis), estas raciones se dieron a las 8:00, 12:00, 15:00, 17:00 y 22:00 horas respectivamente, siendo la ración de las 22:00 la mayor, ya que por la noche no se alimentó.

b) Para alimento **SANTA MONICA**, se aplicó la concentración de 4 mg/l en cada ración (4 veces al día) a las mismas horas que el alimento anterior.

2.1.1.2. Procedimiento estandar de mantenimiento de Post larvas para ensayos de toxicidad.

- 1) Se sifoneó el fondo del tanque para extraer heces, alimento sobrante y post larvas muertas (1 vez al día).
- 2) Se hizo un recambio de agua de $\pm 63\%$, usando sifones con malla de 1mm de diámetro de poro. El sifón consistió de un tubo pvc de 4 pulgadas de diámetro y 60 cm de largo, al cual se le practicaron 4 aberturas laterales para permitir el paso del agua. Dicho tubo es recubierto con una malla de 1mm de diámetro de poro a manera de funda que se sujeta en su parte superior e inferior con bandas elásticas, en el interior del tubo se ha colocó una manguera de 1cm de diámetro por la que se succionar-á el agua para activar el sifón.
- 3) Limpieza de sifones y mangueras, que diariamente fueron sacados durante el recambio para lavarlos exteriormente e interiormente en agua clorinada, con la finalidad de extraer alimento acumulado y destapar los mismos para su normal funcionamiento (evitar taponamientos y aparición de manchas rojas).
- 4) La alimentación, se dió a las 8:00, 12:00, 15:00, 17:00 horas y 22:00 horas tal como se indica en la tabla de alimentación.
- 5) Muestreo semanal, que consistió en sacar aproximadamente 30-40 post larvas para determinar su peso húmedo y hacer los ajustes necesarios en la dosis alimenticia diaria.

2.1.1.3. Procedimiento estandar de inicio de ensayos de toxicidad.

Este procedimiento se inició cuando las post larvas estaban en estadio de Pl_{31-32} :

1er. día.- Se inició la aclimatación de las post larvas a la salinidad deseada (8:00 horas), para bajar la salinidad se usó agua dulce suministrada por la línea respectiva del CENAIM, con un flujo de 3.5 **ml/segundo**, en un tanque de 200 litros. La salinidad fue monitoreada frecuentemente usando un refractómetro.

2do. día.- El flujo de agua dulce se incrementó a 5 **ml/segundo**, a partir de las 16:00 horas, ya que la disminución de salinidad en ésta fase (de 6-7 ppt a 2 ppt es muy lenta). De igual forma se monitoreó la salinidad periódicamente durante todo el día.

3er. día.- La salinidad en este día a las 8:00 horas debe ser la deseada. Una vez que las larvas se encuentren a la salinidad deseada se espera 48 horas para aclimatarlas a las nuevas condiciones.

4to. día.- Se sacó una muestra de aproximadamente 30-40 larvas para determinación de peso húmedo promedio y selección del rango de peso que se va a usar en el bioensayo (según la distribución y frecuencia acumulada de pesos) estas deben ser de al menos el 70% de la población.

5. **día.**- A partir de las 8:00 horas se transportaron las larvas cosechadas (del tanque de cultivo) en un balde de 20 l hacia la sala de bioensayos, allí se procedió a sacar post larvas que tengan los pesos **seleccionados** anteriormente para ponerlas en una bandeja, estas larvas sirvieron de “ejemplo o muestra” ya que el conteo y selección de post larvas a usarse en el bioensayo se hizo por comparación con estos animales de muestra. Se procedió con cuidado, sacando en un beaker plástico algunas post larvas del balde de transporte con un cedazo pequeño, se procedió a su selección y **contaje**. Las post larvas que coincidieron en tamaño con las puestas en la bandeja de muestra se sembraron en las cámaras de prueba en forma aleatoria a una densidad de 6 **Pl/l** (12 post larvas/beaker). Las cámaras fueron llenadas previamente con agua (de salinidad deseada) filtrada por 3 filtros de cartucho y esterilizada con luz UV. El sistema de baño de María funcionó una vez que se ha terminado la siembra de

las post larvas en las cámaras de prueba. Finalmente se colocó la aireación. Posteriormente se alimentó con balanceado a razón de 0.02 g por beaker.

6. **día.** - Transcurridas 24 horas desde la siembra se procedió a la primera revisión de mortalidad, en esta se sacaron todas las post larvas muertas.

7. **día.** -Transcurridas 24 horas se efectuó la segunda revisión de mortalidad, se sembró a la densidad de 12 **Pl/beaker**, usando si es necesario post larvas de cámaras de prueba adicionales que se sembraron a igual densidad. Se sifoneó animales muertos, residuos de alimento y heces. La alimentación fue suspendida desde ésta revisión hasta el final de la prueba. Finalmente se colocó encima de cada cámara de prueba una malla de 1 mm de diámetro de poro sostenida con una banda elástica. Efectuado este procedimiento se inició el ensayo (a menos que la mortalidad haya sido muy alta o permanente, en cuyo caso se debió esperar un día mas) cambiando el agua de la cámara de prueba por la solución con el tóxico a la concentración deseada.

2.1.2. Preparación de las soluciones para los ensayos

2.1.2.1. Preparación de soluciones patrón

El Tilt® y Calixin® fueron adquiridos en locales comerciales de expendio de agroquímicos en Guayaquil (provincia del Guayas) y en la estación de insumos agrícolas de la “Standard Fruit Company” en San Juan (provincia de Los Rios).

Las soluciones fueron preparadas una hora antes de iniciar la rutina diaria de recambio de agua, tanto en los ensayos de toxicidad aguda como en los de toxicidad crónica. Las soluciones patrón de los productos Tilt®, Calixin® y su mezcla en relación 1: 1, fueron preparadas a diferentes concentraciones dependiendo del volumen de alícuota necesario para obtener las concentraciones deseadas en las cámaras de prueba. Los cálculos se hicieron programando una hoja electrónica de Excel 5.0. En todos los casos la solución patrón se preparó en un balón de vidrio de 500 ml usando agua destilada como medio de dilución hasta completar el volumen del balón (medio litro). Luego de su preparación se agitó manualmente

el balón de preparación, y se guardó la solución patrón en botellas oscuras de vidrio. La cristalería usada en la preparación de cada solución patrón fué marcada con colores diferentes, previniendo de esta forma posibilidades de contaminación entre los tratamientos con distintos pesticidas.

2.1.2.2. Preparación de soluciones de prueba

Estas fueron preparadas en balones de 2 litros de capacidad al momento del recambio. Se colocó primero la alícuota de solución patrón necesaria para obtener una concentración determinada, y luego se agregó agua a 2 ppt hasta completar los 2 litros. Posteriormente, la solución dispuso en un beaker de 2 litros y se procedió a realizar la renovación diaria de la solución.

No se efectuaron análisis cuantitativos para verificar las concentraciones de cada producto en las cámaras de prueba o en las soluciones patrón, debido a que no se cuenta con el equipo necesario para cuantificar estos pesticidas disueltos en el agua.

2.1.3. Procedimiento usado en los ensayos de toxicidad aguda

2.1.3.1. Estructuración

Al recibir las post larvas y previo al inicio de los ensayos de toxicidad aguda las larvas fueron llevadas hasta el estadio de P1 3 1 en tanques de Policarbonato de 200 l (Materiales y Métodos 2.1.1).

En todos los ensayos de toxicidad aguda se usaron post larvas 35 de camarón *P. vannamei*, procedentes de varios laboratorios del sector de la Península de Santa Elena. La temperatura del agua se mantuvo en 26°C con el sistema de baño de María. La salinidad en todas los ensayos fué de 2 ppt. La iluminación fué artificial, usando lamparas fluorescentes, y sin influencia de luz solar, se estableció un fotoperíodo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad. Cada ensayo tuvo diferentes series de concentraciones (Tabla 13, 14 y 15), sin embargo, cada concentración, en los 3 primeros ensayos, se hizo por triplicado, y en los dos últimos

ensayos cada concentración tuvo 4 réplicas. Las cámaras de prueba fueron llenadas con 2 litros de solución (agua de 2 ppt + pesticida) en todas las pruebas.

2.1.3.2. Trabajo rutinario

El desarrollo del ensayo de toxicidad aguda tuvo una duración de 4 días en los que se implantó la siguiente rutina para cada día:

8:00 H, encender las luces fluorescentes de la sala de ensayos.

8:05 H, llenar un tanque reservorio de 200 litros (de policarbonato) con agua filtrada a 2 ppt. Esta agua fue usada para preparar los medios a diferentes concentraciones de pesticidas y fue calentada (con un calentador de barra) o enfriada (con hielo hecho usando esta misma agua) según la temperatura ambiente, hasta obtener los 26°C (temperatura constante de todos los ensayos).

12:00 H, preparar las soluciones patrón para cada uno de los pesticidas a probar .

12:30 H, suspender la aireación del sistema, sacando las pipetas de vidrio de cada una de las cámaras de prueba, sin cerrar la válvula de paso del aire (evitando que residuos de la solución tóxica queden adheridas a la pipeta).

12:45 H, tomar la temperatura de al menos 3 cámaras de prueba con un termómetro. Medir la salinidad del agua del tanque reservorio con un refractómetro.

12:50 H, llenar un balde plástico de 50 l con agua procedente del tanque reservorio de 200 l (llenado previamente). Igualar la temperatura del agua del balde con la registrada en las cámaras de prueba.

13:00 H, realizar el conteo de post larvas vivas, muertas o saltadas y registrar dicho conteo, extraer con una pipeta de 10 ml las post larvas muertas y las heces del fondo de la cámara de prueba, recambiar totalmente la solución de prueba. Esta rutina se realizó sacando cada cámara de prueba de la bandeja del baño de María y colocándola en una mesa de madera, luego de la revisión, se regresa la cámara de prueba a su bandeja correspondiente. La revisión se inició en todos los ensayos por las cámaras de control, evitando así cualquier tipo de contaminación, luego los tratamientos con **Tilt®**, **Calixin®**, Mezcla y aceite agrícola, fueron revisados siempre en orden ascendente de concentraciones. Al terminar la rutina de

recambio, se descartó cualquier sobrante de las soluciones patrón de las botellas oscuras, se las enjuagó con agua filtrada, y **despues** con ácido muriático. De igual forma se eliminó el agua sobrante del tanque reservorio de 200 l, tomando en este momento una muestra de medio litro para análisis de dureza. Finalmente se reestablece la aireación introduciendo nuevamente las pipetas en su correspondiente cámara de prueba. Es importante destacar que para cada pesticida, se utilizó un set de materiales que son: balón de vidrio de 2 litros, tres cámaras de prueba (beakers) de 2 litros cada una, 4 pipetas de vidrio de 1, 5, 10 y 20 ml de capacidad para colocación de alícuotas, 3 pipetas de vidrio de 10 ml para sifoneo de las cámaras de prueba y una jarra de plástico. Cada set **fué** marcado con un color para cada pesticida (Tilt®:rojo, Calixin®:azul, mezcla:verde, Aceite agrícola:negro y Control:blanco) evitando así posibles contaminaciones.

2 1:50 H, chequeo general de todo el sistema.

22:00 H, apagar las luces de la sala de ensayos.

2.1.4. Procedimiento usado en el ensayo de toxicidad crónica

2.1.4.1. Estructuración

En el ensayo de toxicidad crónica se usaron también post larvas 35 de camarón ***P. vannamei***, procedentes de un laboratorio del sector de la Península de Santa Elena. Los parámetros físicos (como iluminación, temperatura, etc.) fueron los mismos que en los ensayos de toxicidad aguda. Las concentraciones usadas en el ensayo se detallan en la Tabla 21. Cada concentración **fué** quintuplicada.

A los 15 días de experimento, se retiró la quinta réplica de cada concentración para obtener el peso húmedo y seco de las larvas. El peso húmedo se obtuvo capturando cada post-larva con un cedazo pequeño, directamente del beaker, y colocando al animal sobre papel toalla para retirar el exceso de agua, una vez seca, se pesó individualmente cada post-larva en una balanza analítica. Obtenido el peso húmedo, las post larvas fueron depositadas en copas de papel aluminio para someterlas a secado en un horno eléctrico, a 60°C por 24 horas, luego se

colocaron en un desecador. Finalmente con la ayuda de una pinza se pesó individualmente cada post-larva. Al final del experimento se efectuó el mismo procedimiento aquí descrito con la cuarta réplica, permitiéndonos esto conocer los pesos húmedos y secos de las post larvas de cada concentración para cada pesticida.

2.1.4.2. Trabajo rutinario

La prueba realizada tuvo una duración de 21 días, estableciéndose una rutina diaria similar al test agudo.

Las diferencias fueron:

- Se alimentó 3 veces al día.

-Se chequeó las larvas 3 veces al día para sacar las moribundas, y fijarlas en solución de **Davidson** para su posterior revisión histológica.

2.1.4.3. Alimentación

Usando pruebas alimenticias, se determinó que las post larvas 35 eran capaces de consumir un promedio de 40 **artemias** de 4 días de edad en 2 horas; y usando pruebas toxicológicas se determinó que las artemias de 4 días de edad, toleraban la concentración más alta de cada pesticida y su mezcla a usarse en el ensayo durante 2 horas sin mostrar mortalidad o efecto en su comportamiento (nado). Se estableció que la dosis para cada alimentación en la rutina diaria debía consistir en artemias de 4 **días** de edad a razón de 40 artemias/post-larva/2 horas.

2.1.5. Evaluación de resultados

2.1.5.1. Cálculo de LC

Para calcular los valores LC, se utilizó el programa **Probit** instalado por la EPA. Este programa permite calcular los valores LC 10 y LC **99,99** con límites de confianza y expresa si la regresión fue adecuada según el χ^2 test.

2.1.5.2. Mortalidad y peso

Los datos de mortalidad y peso húmedo/seco de cada concentración para cada pesticida, se compararon, usando el Análisis de Varianza (ANOVA) ($p < 0.05$) transformando primeramente los porcentajes de mortalidad con la función $\arcsin(\%Mort.)^{1/2}$. Esto permitió establecer si existían diferencias significativas entre la mortalidad o peso del control con cada tratamiento. Además, la concentración más alta que no presentó diferencias significativas con el control, fue la denominada Concentración de Efecto No Observado (NOEC); y, la concentración más baja que presentó diferencias significativas con el control fue la denominada Menor Concentración de Efecto Observado (LOEC).

2.1.5.3. Histología

Se empleó el método histológico con tinción de Hematoxilina y Eosina para camarones Peneidos descrito por Bell y Lightner (1988), para la determinación de anomalías a nivel de organización celular en el camarón. La revisión de estas placas, se efectuó en un microscopio de campo claro para todas las muestras que se obtuvieron durante las revisiones diarias realizadas en el ensayo de toxicidad crónica. Además se aplicó para revisar algunas de las post larvas que sobrevivieron al final del ensayo.

2.2. MATERIALES UTILIZADOS

2.2.1. Cámaras de prueba

Consisten en beakers de vidrio Pyrex de 2 litros de capacidad, con graduación cada 100 ml.

2.2.2. Filtros de piola y de celulosa

Dos filtros de piola de 5 y 3 μm . (Modelo: cartridge filter TCW-CS cotton wound type) y uno de celulosa de lum. (Modelo: cartridge filter TCF type. PTFE membrane). Los tres filtros son de tipo cartucho, con carcasa plástica transparente (Modelo: Plastic housing for single hold. Model: 1 PC). A continuación se detallan las especificaciones de los 2 tipos de filtros y de la carcasa, marca ADVANTEC:

Especificaciones de los dos tipos de filtro.

Características	Modelo TCW-CS	Modelo TCF
Tamaño nominal de poro (μm).	3, 5	1 00
Resistencia a la presión	5 Kg/cm^2 (4.9E5 Pa)	4 Kg/cm^2 (3.9E5 Pa)
Resistencia a la temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	150	80
Material	Algodón, fibra: sus-304	Membrana PTFE y resina de polipropileno
Area efectiva de filtración (cm^2)		7

Especificaciones de la carcasa.

Características	Modelo 1PC
Diámetro de entrada/salida	3/4" PF
Resistencia a la presión	5 Kg/cm^2
Resistencia a la temperatura	90 $^{\circ}\text{C}$ a 3 Kg/cm^2
Material	Tapa Cono
	Policarbonato Policarbonato

2.2.3. Lámparas UV

Lámparas esterilizadoras de luz UV portátiles con carcasa plástica, de diámetro de entrada/salida de 1/8", con balastro de encendido en frío, de 1.5 voltios. Bulbo de 25 Watts
Marca XX. Modelo: esterilizador UV Q-SIL-HP.

2.2.4. Material de vidrio Pvrex

- Pipetas, de 1, 5, 10, 20 y 30 ml.
- Cilindros graduados, de 100 ml.
- Pipetas descartables, de 1 ml.
- Usadas para oxigenar los beakers durante la prueba.
- Fiola, de 2000 ml.
- Matraces aforados, de 500 y 2000 ml con tapa plástica.
- Beakers, de 10, 50, 100 y 150 ml.
- Botellas oscuras, marca Sibata, color ambar, de 500 ml con tapa.

2.2.5. Refractómetro

Marca TANAKA SANJIRO CO., LTD. modelo “S-100 Salinity Refractometer.

2.2.6. Sala de Bioensayos

El área física donde se desarrolló el experimento es de 28 m².

La sala cuenta con un sistema de recirculación interna de agua temperada, gracias a una instalación paralela a la línea de distribución normal del CENAIM. Este sistema permite hacer circular agua a temperatura constante ya que posee una bomba intercambiadora de calor marca REI-SEA modelo HCR-1D. De igual forma la sala posee dispositivos fabricados con tubería PVC para repartir aireación a los 16 beakers dispuestos en cada bandeja. Los dispositivos consisten en unir la tubería por sus extremos formando un cuadrado de 50 cm por lado con una cruz en su interior, con ellos se reparte aireación a 96 beakers. Estos tienen 16 perforaciones de 1/16” cada una en las cuales se coloca un extremo de las mangueras de aireación y en el otro extremo se coloca la pipeta descartable de vidrio de 1 ml para proporcionar una aireación fina.

En la sala se encuentran dispuestas 6 bandejas de PVC, de forma cuadrada con 77 cm por lado y 20 cm de altura con doble fondo por el cual ingresa el agua temperada y circula para luego salir por un rebose (orificio circular de 1.5”) practicado en la parte posterior de la bandeja a 16.5 cm (medidas en la luz del orificio) del fondo de la misma, el agua es colectada por mangueras y regresa al intercambiador de calor en donde es temperada y vuelta a bombear al sistema de circulación interna.

La sala cuenta también con un tanque de 55 galones, plástico, equipado con un termostato y barra calentadora de inmersión de Titanio marca Jakko modelo R- 100N.

La iluminación de la sala es a base de bulbos fluorescentes dispuestos en 3 lámparas (2 bulbos en cada lámpara) en forma longitudinal.



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

3.1.1. Porcentajes de mortalidad

Se efectuaron 5 ensayos de toxicidad aguda, el rango de concentraciones usadas para la primera prueba fue seleccionado usando como referencia los datos de ensayos anteriores realizados en el CENAIM por el departamento de toxicología (Buike, 1994; Carrera *et.al.* . 1996). En los cuatro ensayos posteriores se afinó dicho rango evaluando los efectos que tuvieron sobre las post-larvas de camarones las concentraciones de pesticidas utilizadas. En la tabla 13, 14, 15, 16 se detallan las concentraciones usadas en cada prueba con sus respectivos porcentajes de mortalidad para cada producto. Es importante destacar que el segundo ensayo (B2) solo se efectuó hasta las 48 horas de duración usando solamente Tilt®.

Las diferentes concentraciones usadas, así como las repeticiones realizadas, permitieron observar que los porcentajes de mortalidad varían entre cada ensayo comparando concentraciones similares, a pesar de tener todos los factores inherentes a las mismas constantes. Esto sugiere la presencia de un factor que no controlamos en las pruebas, el cual varía en cada lote de larvas, es decir, la calidad larvaria. Este factor es aparentemente crítico al momento de evaluar la respuesta (mortalidad) del organismo en una prueba de toxicidad.

Las mortalidades del control son aceptables, menos del 20 % (Abel y Axiak, 1991) para pruebas de 24 horas. En las pruebas de 48 y 96 horas se sobrepasan los límites con una excepción. Esto sugiere que los límites de mortalidad no son transferibles a pruebas con camarón. Aún reconociendo el problema de mortalidad en pruebas con camarón se recomienda tratar de disminuir este porcentaje ajustando el manejo (Fucik, K.com.pers.. 1997).

Tabla 13.- Concentración de Tilt® y su respectivo porcentaje de mortalidad obtenida en cada ensayo de toxicidad aguda usando este pesticida.

Horas	B1		B2		B3		B4		B5	
	Conc.	%Mort								
24	0.32	5	0.1	18.5	0.025	10	0.05	18.2	0.01	16.7
	0.56	9.5	0.32	25.9	0.1	40	0.56	45.5	0.1	26.7
	1	21.1	0.56	14.8	0.32	31.6	1	97.7	0.56	33.3
	1.8	100	1	33.3	0.56	38.9	1.8	100	1	58.1
	2.4	100	1.8	51.9	1	50	2.4	100	2.1	100
	3.2	100		-	1.8	100	-	--	-	--
48	0.32	20	0.1	18.5	0.025	30	0.05	29.6	0.01	26.7
	0.56	23.8	0.32	25.9	0.1	60	0.56	54.6	0.1	46.7
	1	68.4	0.56	25.9	0.32	42.1	1	100	0.56	53.3
	1.8	100	1	55.6	0.56	61.1	1.8	100	1	74.2
	2.4	100	1.8	65.4	1	60	2.4	100	2.1	100
	3.2	100		-	1.8	100	-	--	-	--
96	0.32	45			0.025	50	0.05	47.7	0.01	60
	0.56	61.9			0.1	65	0.56	70.5	0.1	63.3
	1	89.5			0.32	68.4	1	100	0.56	80
	1.8	100			0.56	77.8			1	96.8
	2.4	100			1	85			2.1	100
	3.2	100			1.8	100	-	--	-	--

Los valores en celdas a for no se usaron en los análisis Probit.

Tabla 14.- Concentración de Calixin® y su respectivo porcentaje de mortalidad obtenida en cada ensayo de toxicidad aguda usando este pesticida

Horas	B1		B3		B4		B5	
	Conc.	% Mort	Conc.	%Mor	Conc.	%Mort	Conc.	%Mor
24	0.32	14.3	0.05	20	0.025	18.2	0.01	30
	0.56	19.1	0.1	28.6	0.1	20.5	0.1	16.7
	1	9.5	0.32	36.8	1	90.5	1	41.9
	1.8	25	1	28.6	2.4	89.7	2.1	88.9
	2.4	20	1.8	55	4.2	97.4	3.7	100
	3.2	55.6	2.4	85.7	-	-	-	-
	-	-	3.2	65	-	-	-	-
48	-	-	0.05	50	0.025	25	0.01	43.3
	0.56	33.3	0.1	57.1	0.1	29.6	0.1	26.7
	1	36.8	0.32	52.6	1	97.6	1	64.5
	1.8	55	1	52.4	2.4	97.4	2.1	100
	2.4	90	1.8	90	4.2	100	3.7	100
	3.2	94.4	2.4	95.2	-	-	-	-
	-	-	3.2	100	-	-	-	-
96	0.32	52.4	0.05	65	0.025	41.9	0.01	70
	0.56	61.9	0.1	66.7	0.1	47.7	0.1	53.3
	1	79	0.32	68.4	1	97.6	1	83.9
	1.8	85	1	76.2	2.4	100	2.1	100
	2.4	95	1.8	95	4.2	100	3.7	100
	3.2	100	2.4	95.2	-	-	-	-
	-	-	3.2	100	-	-	-	-

Los valores en celdas a color no se usaron en los análisis Probit

Tabla 15. Concentración de Mezcla (Tilt®:Calixin® en relación 1:1) y su respectivo porcentaje de mortalidad obtenida en cada ensayo de toxicidad aguda usando este pesticida

Horas	B1		B3		B4		B5	
	Conc.	%Mort	Conc.	%Mort	Conc.	%Mort	Conc.	%Mort
24	0.32	9.5	0.1	26.3	0.1	9.1	0.01	23.3
	0.56	9.5	0.32	25	0.32	52.4	0.1	16.7
	1	19.1	0.56	19.1	1	100	0.56	40
	1.8	70.6	1	50	1.8	100	1	60
	2.4	72.2	1.8	65	3.2	100	2.4	88.9
	3.2	100	2.4	94.7		–	--	–
48	0.32	19.1	0.1	47.4	0.1	29.6	0.01	40
	0.56	38.1	0.32	40	0.32	57.1	0.1	46.7
			0.56	28.6	1	100	0.56	53.3
	1.8	88.2	1	79	1.8	100	1	82.8
	2.4	100	1.8	90	3.2	100	2.4	96.3
			2.4	100	–	--	--	--
96	0.32	28.6	0.1	57.9	0.1	47.7	0.01	56.7
	0.56	61.9	0.32	60	0.32	69.1	0.1	66.7
	1	66.7	0.56	66.7	1	100	0.56	73.3
	1.8	100	1	89.5	1.8	100	1	93.1
			1.8	100	3.2	100	2.4	96.3
			2.4	100		–	--	--

Los valores en celdas a color no se usaron en los análisis Probit.

Tabla 16.- Porcentajes de mortalidad en los controles de cada ensayo de toxicidad aguda.

Horas	B 1	B 2	B 3	B 4	B 5
	%Mort	%Mort	%Mort	%Mort	%Mort
24	0	14.8	14.8	16.9	12.2
48	0	33.3	22.2	31.2	31.7
96	9.5	–	48.2	52	53.7

3.1.2. Cálculo de Concentraciones Letales

El método **Probit** fue utilizado para el cálculo de las concentraciones letales de 10% y 50% de mortalidad de la población (Materiales y Métodos 2.1.5.1). Para la aplicación de este análisis se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones con los datos obtenidos en cada ensayo:

- a) Las larvas desaparecidas de cualquier beaker se consideraron como muertas por efecto del pesticida aplicado.
- b) Las larvas saltadas fueron consideradas como no sembradas
- c) Las concentraciones de pesticidas que originaron porcentajes de mortalidad erráticos (porcentajes de mortalidad más bajos que el originado por la inmediata concentración menor anterior, o mayor posterior) fueron eliminadas al momento de efectuar los cálculos.
- d) Las concentraciones de pesticidas que originaron porcentajes de mortalidad iguales (siendo estas concentraciones consecutivas) fueron utilizadas para los cálculos, excepto cuando se obtuvo mortalidad de 100% en las últimas concentraciones (más altas), en cuyo caso, se usó únicamente la primera (más baja) de las concentraciones que originó dicho porcentaje de mortalidad.

En las tablas 13, 14, 15 se observa cuáles concentraciones fueron eliminadas.

El coeficiente de **varianza** es la relación entre la desviación estándar y el promedio, este **cuantificador** es usado para establecer diferencias entre valores calculados de concentración letal para cualquier porcentaje de población y tiempo de duración del ensayo. Para efectos de cálculos se consideró que si el valor de este coeficiente es mayor o igual al 50% los valores no pueden ser considerados como semejantes y por lo tanto no pueden promediarse. Mientras mayor es el coeficiente de **varianza** mayor es la dispersión entre los datos, lo cual genera un promedio con una desviación estándar de gran magnitud, esto se traduce en un promedio poco confiable (Fucik, K.com. pers., 1997).

Consecuentemente, para calcular el promedio de los valores de LC50 y LC10 obtenidos, se descartan los valores que no permiten obtener un coeficiente de **varianza** menor del 50 %.

En las tablas 17,18, 19 se observan las concentraciones letales obtenidas, mencionando cuales pruebas fueron descartadas en el calculo final del promedio de los valores LC 10 y LC 50. En los casos en que no se menciona una prueba en estas tablas, significa que con el análisis **Probit** no pudo calcularse los valores LC 10 y LC 50.

Un resumen de los datos de LC 50 son mostrados en la tabla 20. Se puede observar que para Calixin la estandarización es más difícil, un mayor número de pruebas no pudieron ser analizadas por **Probit**. Eso implica, que los resultados de la tabla 20 no son concluyentes y se debe realizar más pruebas para definir los valores. En Tilt los resultados tampoco no son concluyentes, a pesar que los promedios son resultado de mínimo 3 pruebas, no tienen un patrón normal. En principio organismos expuestos a un tóxico durante mayor tiempo son más sensibles, lo cual se expresaría en una menor concentración letal. Pero en este caso el LC 50 24 horas para Tilt es menor que el de 48 horas.



Tabla 17. Resultados de análisis Probit para ensayos con Tilt®.

24 H			
	Límite inferior	LC10	Límite superior
B1	0.167	0.969	1.015
B4	0.378	0.447	0.497
B5	0.188	0.550	0.755
Promedio LC,,	0.655 ± 0.276		(42% c.v.)
	Límite inferior	LC50	Límite superior
B1	1.055	1.128	354,470
B4	** 0.568	0.617	0.664
B5	0.612	0.924	1.1175
Promedio LC,,	0.890 ± 0.257		(29% c.v.)
48 H			
	Límite inferior	LC10	Límite superior
B1	0.237	0.302	0.364
B2	0.182	0.467	0.689
B3	0.0097	0.335	0.526
B5	0.189	0.469	0.646
Promedio LC,,	0.393 ± 0.087		(22% C.V.)
	Límite inferior	LC50	Límite superior
B1	0.801	0.926	0.998
B2	1.136	1.443	1.860
B3	0.468	0.770	1.008
B5	0.571	0.826	1.025
Promedio LC,,	0.991 ± 0.308		(31% c.v.)
96 H			
	Límite inferior	LC10	Límite superior
B1	0.132	0.202	0.268
B3	0.046	0.246	0.420
B4	0.324	0.460	0.512
B5	0.145	0.335	0.451
Promedio LC,,	0.311 ± 0.114		(37% C.V.)
	Límite inferior	LC50	Límite superior
B1	0.359	0.454	0.540
B3	0.256	0.597	0.023
B4	0.517	0.574	0.632
B5	0.396	0.564	0.669
Promedio LC,,	0.547 ± 0.064		(12% C.V.)

Tabla 18. Resultados de análisis Probit para ensayos con Calixin®.

24 H			
	Límite inferior	LC10	Límite superior
B5	0.593	0.784	0.938
Promedio LC₅₀		0.784	
	Límite inferior	LC50	Límite superior
B5	1.145	1.320	1.478
Promedio LC₅₀		1.320	
48 H			
	Límite inferior	LC10	Límite superior
B1	0.182	0.340	0.487
Promedio LC₅₀		0.340	
	Límite inferior	LC50	Límite superior
B1	0.856	1.078	1.290
Promedio LC₅₀		1.078	
96 H			
	Límite inferior	LC10	Límite superior
B1	0.043	0.091	0.150
B3*	0.316	0.669	0.930
B4	0.017	0.113	0.232
Promedio LC₅₀		0.102 ± 0.016 (15% C.V.)	
	Límite inferior	LC50	Límite superior
B1	0.283	0.412	0.542
B3*	0.848	1.219	1.473
B4	0.093	0.282	0.460
Promedio LC₅₀		0.347 ± 0.092 (26% c.v.)	

* No fue tomado en cuenta para el cálculo del promedio

En los datos obtenidos no se pudo observar un efecto sinérgico entre los 2 productos, debido a que los LC 50 son similares para los pesticidas individuales como para la mezcla.

Con respecto a los valores obtenidos mediante los cálculos se observa que los resultados en el caso del fungicida Tilt®, son comparables a los reportados por Carrera *et. al.*, (1996), para el 48-horas LC 10 y LC 50. Ningún otro valor reportado en la bibliografía, por autores como: Buike, (1994); Daniels y Pavel, (1994) e Intriago *et.al.*, (1994), es similar a los resultados obtenidos. Es decir, al ser comparados presentan un coeficiente de variación mayor que el 50%.

Tabla 19. Resultados de análisis Probit para ensayos con Mezcla (Tilt®:Calixin® en relación 1:1).

24 H			
	Límite inferior	LC10	Límite superior
B5	0.190	0.333	0.462
Promedio LC₁₀ 0.333			
	Límite inferior	LC50	Límite superior
B5	0.783	0.968	1.152
Promedio LC₅₀ 0.968			
48 H			
	Límite inferior	LC10	Límite superior
B1	0.143	0.259	0.362
B5	0.191	0.351	0.484
Promedio LC₁₀ 0.305 ± 0.065 (21% c.v.)			
	Límite inferior	LC50	Límite superior
B1	0.495	0.653	0.840
B4	0.617	0.801	0.965
Promedio LC₅₀ 0.727 ± 0.105 (14% c.v.)			
96 H			
	Límite inferior	LC10	Límite superior
B1	0.039	0.233	0.416
B4	0.020	0.161	0.327
Promedio LC₁₀ 0.197 ± 0.051 (26% c.v.)			
	Límite inferior	LC50	Límite superior
B1	0.264	0.583	0.840
B4	0.244	0.568	0.816
Promedio LC₅₀ 0.575 ± 0.011 (2% c.v.)			



Tabla 20. Resumen de los valores LC 50 de los xenobióticos

	TILT	CALIXIN	MEZCLA
24 H	0.890 ± 0.257	1.145	0.968
48 H	0.991 ± 0.308	1.078	0.727 ± 0.105
72 H	0.547 ± 0.064	0.347 ± 0.092	0.505 ± 0.011

Se tiene así que el valor de 96-horas LC 50 de Tilt® obtenido en las pruebas con animales de 8 mg es significativamente mayor que el reportado por Buike, (1994), usando animales de 1 g a igual salinidad, observándose claramente que el tamaño del animal no intervino en la expresión de la toxicidad.

En el caso del fungicida Calixin®, las concentraciones letales de este ensayo calculadas no son comparables con ningún dato publicado a excepción de Carrera *et.al.*, (1996), cuyos valores de 48-horas LC 10 y LC 50 son iguales a los de este trabajo.

Con respecto a los resultados obtenidos en 24-horas LC50 y en 48-horas LC10 para la mezcla de Tilt®:Calixin® en relación 1: 1 los datos del trabajo coinciden con los reportados por Intriago *et. al.*, (1994) y por Carrera *et. al.*, (1996). El resultado obtenido en 96-horas LC 50 para la mezcla de Tilt®:Calixin® en relación 1: 1 no guarda relación alguna con el reportado por Buike, (1994). Este es significativamente inferior al calculado en el presente trabajo, incluso para concentraciones letales reportadas a salinidad y talla de animales mayores que lo aplicado en estos ensayos, siendo esto opuesto a la teoría de disminución en la expresión de la toxicidad al aumentar la salinidad, propuesta por autores como Buike. (1994) e Intriago *et. al.*, (1994).

3.1.3. Parámetros que influyen la toxicidad

Intriago *et. al.*, (1996) afirma que la composición química de los fungicidas, específicamente el Tilt®, ha variado con respecto a 1992. Para realizar este trabajo fué imposible conseguir Tilt® con esa fecha de fabricación. Los pesticidas utilizados se renovaron cada 4 meses.

En las pruebas efectuadas se cuantificó la dureza del agua por método de titulación Hach (1992). El promedio de 13 mediciones en diferentes períodos de tiempo fué de 548 ± 66 mg/L de CaCO₃. Aunque según Intriago *et. al.*, (1996) hay una relación inversa entre la dureza del agua y la toxicidad : menor dureza, mayor toxicidad. Pero por aspectos de costos y logística fué imposible transportar las cantidades de agua de baja dureza necesarias para el desarrollo de los ensayos.

3.2. ENSAYO DE TOXICIDAD CRONICA

3.2.1. Evaluación del sarámetro supervivencia

Como se describió anteriormente (Antecedentes 1.4.2.3.2), las pruebas de toxicidad crónica tienen como objetivo determinar los efectos que un tóxico provoca en la viabilidad de una especie sometida al mismo. Se escogieron las concentraciones, según recomendación de la EPA (1995), de la siguiente manera: se tomó el LC50-96 horas y se realizó una serie de disminuciones (50 o 30 %), dependiendo si el LC10-96 horas se encuentra dentro del rango.

Finalizado el ensayo, se procedió a evaluar los resultados de mortalidad diaria para cada producto y se realizó una comparación estadística entre las mortalidades obtenidas en cada concentración con la obtenida en el control, además se evaluó los tejidos del animal o sus órganos mediante histología en busca de una lesión en ellos. El peso húmedo (promedio) inicial de las larvas usadas en este ensayo fué de 4.4 ± 3.2 mg.

En la tabla 21 se detallan las concentraciones usadas junto a los porcentajes de mortalidad observados en cada una de ellas. Estos valores de mortalidad no presentaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos con los diferentes pesticidas a diferentes concentraciones luego de la aplicación del ANOVA, por ello es imposible determinar la “Concentración de Efecto No Observado”.

Eso significa que se debe escoger un rango más amplio para obtener mortalidades en las concentraciones diferentes del control. Muy probablemente, la razón es que las larvas tienen una mayor resistencia contra los fungicidas cuando son alimentadas.

Tabla 21.- Porcentaje de mortalidad de camarones a diferentes concentraciones de pesticidas durante el ensayo crónico.

Producto	Conc. (ppb)	% Mort.	Peso seco(mg)	Peso Seco(mg)
			15 días	final
Tilt	4	31 ± 21 ^a	4.0±1.7 ^a	5.23 ± 2.06 ^{''}
	14	24 ± 9 ^a	4.2± 2.3 ^a	4.83 ± 1.05 ^a
	48	24 ± 5 ^{''}	3.4± 0.8 ^a	5.01 ± 1.31 ^a
	160	33 ± 21 ^a	4.0± 4.0 ^{''}	6.39 ± 0.35 ^a
	535	33 ± 5 ^{''}	4.7± 3.3 ^a	4.44 ± 0.81 ^a
Calixin	3	38 ± 15 ^{''}	5.1± 2.6 ^{''}	5.61 ± 1.98 ^{''}
	11	49 ± 27 ^a	4.1± 2.8 ^{''}	6.10 ± 3.07 ^{''}
	37	32 ± 17 ^{''}	4.4± 1.9 ^{''}	5.28 ± 1.08 ^a
	124	25 ± 19 ^a	3.3± 1.7 ^{''}	5.21 ± 2.15 ^{''}
	412	41 ± 18 ^{''}	4.5± 1.4 ^{''}	4.98 ± 0.75 ^a
Mezcla (1:1)	5	36 ± 5 ^{''}	4.2± 2.1 ^a	4.94 ± 1.07 ^a
	17	35 ± 22 ^{''}	3.8± 1.9 ^{''}	4.48 ± 1.54 ^{''}
	58	29 ± 11 ^{''}	4.4± 2.7 ^{''}	5.01 ± 1.65 ^{''}
	193	35 ± 13 ^a	4.1± 2.2 ^{''}	5.79 ± 1.55 ^a
	642	41 ± 8 ^a	3.9± 2.6 ^a	4.99 ± 0.83 ^{''}
Control	0	30 ± 12 ^a	4.7± 3.9 ^a	5.05 ± 1.08 ^a

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

En las figuras 8, 9 y 10 se presentan los promedios de supervivencia de los camarones a cada concentración de pesticida con la desviación estandar de cada uno al final de cada ensayo.

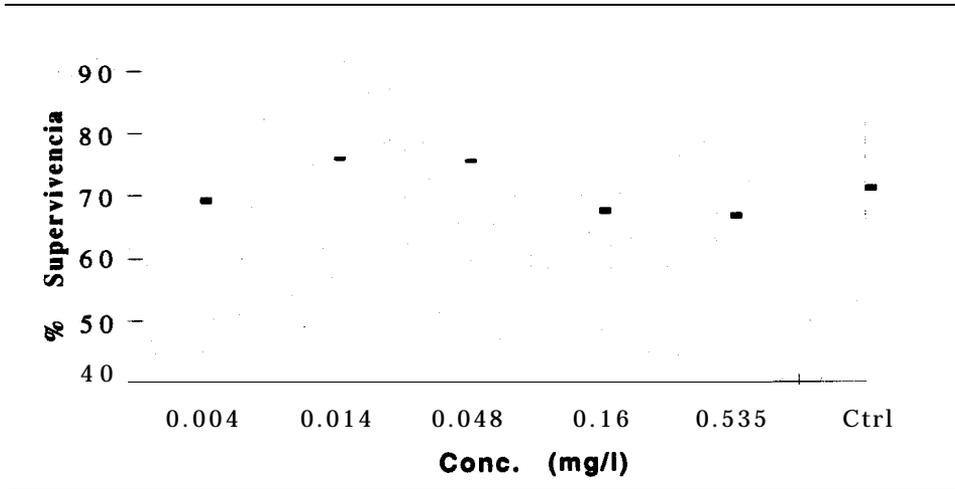


Figura 8. - Promedio de supervivencia final de camarones *P. vannamei* a las diferentes concentraciones de Tilt® usadas en el ensayo.

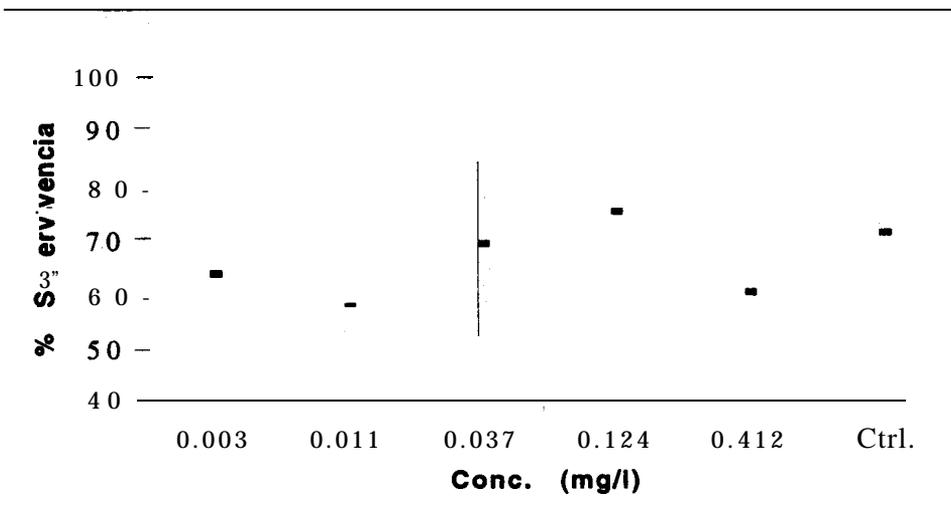


Figura 9. - Promedio de supervivencia final de camarones *P. vannamei* a las diferentes concentraciones de Calixin® usadas en el ensayo.

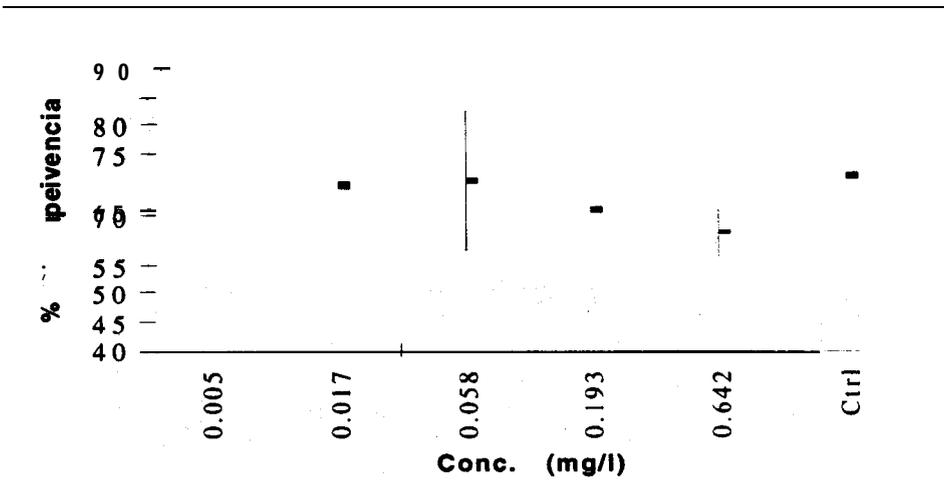


Figura 10.- Promedio de supervivencia final de camarones *P. vannamei* a las diferentes concentraciones de Mezcla (Tilt®-Calixin®) en relación 1: 1 usadas en el ensayo.

El monitoreo diario de la supervivencia muestra que a medida que se prolonga la prueba, la supervivencia de los camarones tiende a estabilizarse. Las figuras 11, 12 y 13 muestran la supervivencia diaria de los camarones sometidos a los pesticidas.

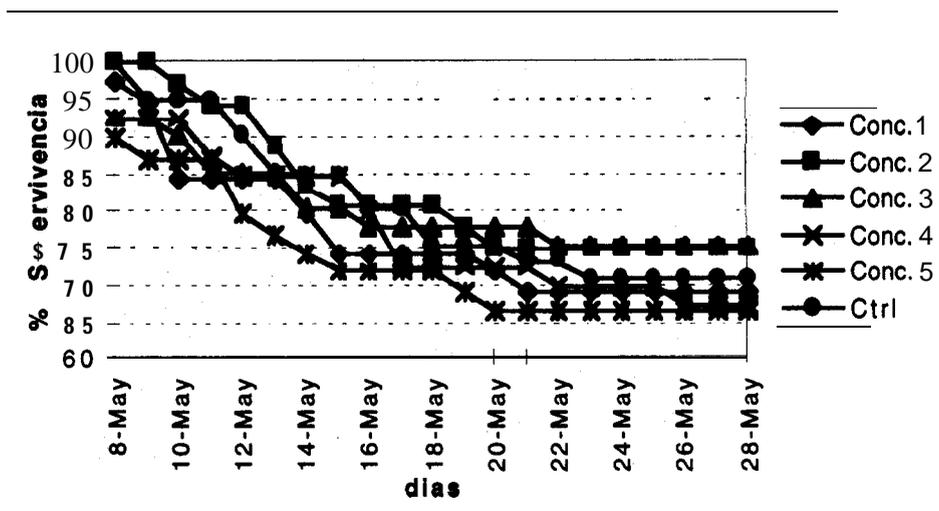


Figura 11.- Supervivencia diaria de camarones sometidos a diferentes concentraciones de Tilt®.

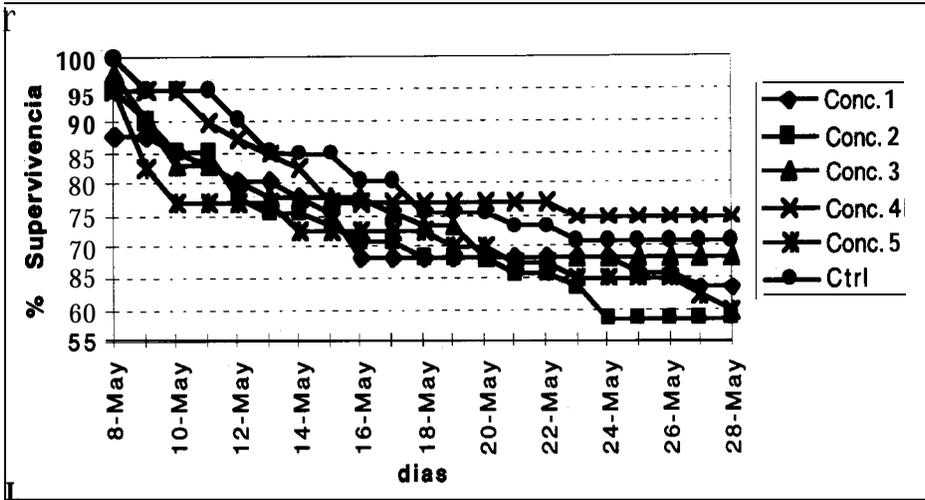


Figura 12.- Supervivencia diaria de camarones sometidos a diferentes concentraciones de Calixin®.

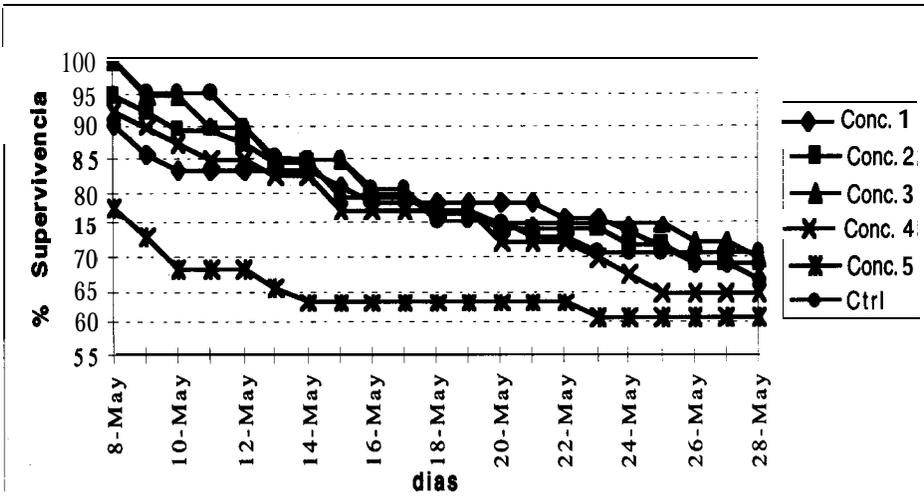


Figura 13.- Supervivencia diaria de camarones sometidos a diferentes concentraciones de Mezcla (Tilt®-Calixin®) en relación 1: 1.

3.2.2. Ensayo de toxicidad crónica v Síndrome de Taura

La revisión histológica de los animales supervivientes no mostró las características del Síndrome de **Taura**. Tampoco se encontró, con las técnicas de revisión utilizadas (método de Bell & Lightner, 1988), y observación de placas en microscopio (de campo claro con un aumento máximo de **100X**, en inmersión) ninguna otra lesión a nivel de organización celular de tejidos u órganos, que se puedan relacionar o atribuir a la presencia de los fungicidas probados.

Por la experiencia **obtenida** en este trabajo, se puede concluir que no hay una relación directa entre una prueba de toxicidad aguda con una prueba crónica. La primera solo sirve como dato **referencial**. Un rango alrededor de este valor debe ser escogido para realizar la primera prueba crónica en ensayos que tengan como objetivo observar el efecto a largo plazo de tóxicos sobre el organismo de interés, lo que permitirá al ajustar el valor obtener valores confiables de NOEC y LOEC.

Conclusiones

Los resultados de las pruebas de toxicidad aguda dan una indicación preliminar del valor de LC 50-96 horas para *P. vannamei*.

En todas las pruebas de toxicidad aguda se trabajó de una manera estandarizada. No fue posible disminuir la mortalidad en el control al valor recomendado del 20%, lo cual fue parcialmente resultado del factor influyente calidad larvaria.

Las pruebas agudas con Tilt permitieron obtener resultados coherentes para cada lapso de tiempo, a excepción del LC 50-48 horas que fue mayor al LC 50-24 horas.

La estandarización de una prueba aguda con Calixin es mas difícil, lo que fue reflejado en los resultados de la prueba con la mezcla de los dos fungicidas.

En lo que concierne a las pruebas de toxicidad crónica, las reglas vigentes deben ser revisadas, no es posible utilizar el LC 50-96 horas como valor máximo. Esto determinó que no se pueda calcular el NOEC y LOEC porque todas las concentraciones tenían un promedio de supervivencia alrededor del 70 %.

En las pruebas de toxicidad crónica, el análisis histológico de los camarones supervivientes no mostró las características patognomónicas del Síndrome de Taura.

Recomendaciones

Se debe perfeccionar el método del Test agudo para poder llegar a una mortalidad en el control menor al 20 %. Se puede investigar la influencia de la calidad del alimento durante el período de alimentación sobre los resultados de supervivencia de los controles.

Elaborar más pruebas de toxicidad aguda con el fin de obtener un promedio confiable de los valores críticos.

Realizar estudios sobre la influencia de la dureza del agua sobre la resistencia contra los fungicidas.

Las pruebas crónicas tienen que ser perfeccionadas basándose en las pruebas agudas, en cuanto a las concentraciones a utilizarse. Se debe aumentar la concentración más alta, con el fin de obtener los valores NOEC y LOEC.

Se debe tomar en consideración además de la mortalidad también el peso, como parámetro de evaluación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abel P.D., y Axiak V. 1991: Ecotoxicology and the Marine Environment. Ellis Horwood serie en Acuaculture and fisheries support.
- Aanes K., y Bækken T. 1994. **Acute** and long-term effects of propiconazole **on** freshwater invertebrate communities and periphyton **in** experimental streams. Norwegian Journal of **Agricultural Sciences**. Supplement No. 13: 179-193. ISSN 0802-1600.
- Barniol R. 1995. Historia del Síndrome de **Taura**. Tercer Congreso Ecuatoriano de Acuacultura.
- Bell** T. y Lightner D. 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society. Baton Rouge. Louisiana. page 2-6.
- Brock** J., Gose R., Lightner D. y **Hasson** K. 1995. **An** overview on **Taura** Syndrome, an important disease of farmed *Penaeus vannamei*. *En*: Swimming through troubled water, Proceedings of the **special** session on shrimp farming, Aquaculture'95 (C.L. Browdy & J.S. Hopkins, eds.). World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, pp. 84-94.
- Buiké P. 1994. The Toxicity of Certain Pesticides to Hatchery **Reared** White Shrimp *Penaeus vannamei* using short term static bioassays. Informe interno del CENAİM.
- Cairns J., Neiderlehner B.R., y Smith E. 1992. The emergence of **functional** attributes endpoints **in** ecotoxicology. Sediment Toxicity Assessment, editado por G.A. Burton, Jr. pp. 11-128. Boca Ratón, **FL**:Lewis.
- Cámara Nacional de Acuacultura 1994. El problema camaronero y recomendaciones del sector. Producido por el comité técnico de la Cámara Nacional de Acuacultura.
- Carrera L., Enriquez M., Molina C., Bolland A. y Panchana F. 1996. Estudio de la Etiología del Síndrome de **Taura**. Informe final enviado a la UNESCO por CENAİM.
- Chamberlain G. 1994. **Taura** syndrome and China Collapse **caused** by new shrimp virus. World Aquaculture **25**(3):22-25.

Ciba. 1994. **Taura** and Propiconazole-Ciba's Statement. January 17, Biblioteca CENAİM

Cornejo M. y Bonilla M. 1994. Descripción de la situación ambiental en el Golfo de Guayaquil. Informe técnico de CENAİM.

Daniels H. y **Pavel D.** 1994. El problema camaronero y recomendaciones del sector. Comité Técnico, **Camara** Nacional de Acuicultura. pp. 22-26.

Environmental Protection Agency. 1985. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organism. Peltier W.H. & C.I. Weber (Eds.). **EPA/600/4-85/013.**

Environmental Protection Agency. August 22nd. 1994. **Report** of recommendations to the government of Ecuador concerning the "**Taura Syndrome**". EPA Reconnaissance Team. U.S. Environmental Protection Agency.

Hasson K., Lightner D., Poulos B., **Redman R.,** White B., **Brock J.** y **Bonami J.** 1995. **Taura Syndrome** of Marine Penaeid Shrimp: Demonstration of a viral etiology. Diseases of aquatic organisms.

Intriago P., **Espinoza J.,** Jimenez R., Machuca M., Barniol R., Krauss E. y Salvador X. 1994. **Taura Syndrome**, a toxicity syndrome of *Penaeus vannamei* in Ecuador. AQUALAB S.A. *En:* El problema camaronero y recomendaciones del sector. Producido por el comité técnico de la Cámara Nacional de Acuicultura.

Intriago P. 1995. Demostración de la etiología de Síndrome de **Taura**. Tercer Congreso Ecuatoriano de Acuicultura.

Intriago P., Jimenez R., Machuca M., Barniol R., Krauss E y Salvador X. 1996. Experimental and Biochemical **Evidences** Supporting the Toxic Nature of the **Taura Syndrome** in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *En:* Aquaculture'96. World Aquaculture Society, Baton Rouge; LA, USA.

Jiménez F. 1992. "Síndrome de **Taura**". Acuicultura del Ecuador, pp. 1- 16.

Jiménez F. 1995. Síndrome de **Taura**: evidencia histológica y ultraestructural de la etiología tóxica. Tercer Congreso Ecuatoriano de Acuicultura.

Jiménez F. 1996. Las experiencias en México de una enfermedad similar al Síndrome de **Taura**. En: Tercera Sesión Técnica: El Síndrome de **Taura**. III Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. CENAIM. Campus Politécnico. Guayaquil. Ecuador.

Källqvist T. y **Romstad R.** 1994a. Effects of agricultural pesticides on planktonic algae and cyanobacteria-examples of intraspecific sensitivity variations. Norwegian Journal of Agricultural Sciences. Supplemento No. 13: 117- 131. ISSN 0802- 1600.

Källqvist T., Abdel-Hamid M. y Berge D. 1994b. Effects of agricultural pesticides on freshwater plankton communities in enclosures. Norwegian Journal of Agricultural Sciences. Supplement No. 13: 133-152. ISSN 0802-1600.

Laramore R.,1995.Taura Syndrome before Ecuador. Research notes from Shrimp Culture Technologies, INC: **FT. Pierce, Fl.** 2: 1-3.

Lightner D., 1995. A Handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. Section 3/viruses/TSV pp. 1-8.

Mc Kenny C. Jnr. 1986. **Critical responses** of crustaceans to toxicants. EPA press. Washington D.C.

Pack S ., 1993. A review of statistical data analysis and experimental design in OECD Aquatic Toxicology Test Guidelines.

Peltier W.H. y Weber C.I. 1985. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. EPA/600/4-85/013. Sección II, pp 50-78.

Rand G., Wells P and Mac Carty L. 1995. Introduction to aquatic toxicology: Effects, Environmental fate, and Risk Assessment, Segunda Edición. Taylor & Francis.

Revista Acuicultura del Ecuador. 1996. Síndrome de **Taura**: un problema Ecuatoriano. Abril. Número 14. Págs 48-50.

Stephan C.E.1997. Methods for calculating an LC 50. Aquatic toxicology and hazard evaluation. ASTM STP 634, F.L.Mayer y D.L., editores, American Society for testing and materials, 1977, pp.65-84.

Sigma, Biochemicals. **Organic** Compounds for Research & Diagnostic Reagents. 1995. Sigma Chemical Company.

Tumbull J., y Stagg M. 1994. Reporte sobre las visitas para estudiar la mortalidad del Síndrome de **Taura** en la industria del cultivo de camarón en Ecuador.

Wheaton F. 1993. Aquacultural Engineering: Chapter Thirteen. John Wiley & Sons, New York. Chichester. Brisbane. Toronto.

Wigglesworth J. 1994. **Taura** Syndrome hits Ecuador Farms. Fish Farmer 17(3):30-31



Biblioteca Central