



**UNIVERSIDAD LAICA ELOY ALFARO DE MANABÍ**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN RECURSOS NATURALES Y**  
**AMBIENTALES**

**Evaluación de la calidad del agua en diferentes puertos de la costa de  
Manta: Respuesta de fuga del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*)**

**AUTORES**

**INTRIAGO CHICA DALVA MASSIEL**  
**VERA RODRÍGUEZ ELIZABETH NIKOLL**

**TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**  
**DRA. DAYANARA MACÍAS MAYORGA PhD**

**MANTA – MANABÍ – ECUADOR**

**2018**

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL**

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaran que han aprobado el Proyecto de Investigación: **“Evaluación de la calidad del agua en diferentes puertos de la costa de Manta: Respuesta de fuga del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*)”** que ha sido propuesto, desarrollado y sustentado por: Intriago Chica Dalva Massiel y Vera Rodríguez Elizabeth Nikoll, previa la obtención del título de Ingeniero en Recursos Naturales y Ambientales, de acuerdo al Reglamento para la elaboración de Proyecto de Investigación de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí “ULEAM”

## **MIEMBROS DEL TRIBUNAL**

**Ing. Edison Lavayen. M. Sc.** \_\_\_\_\_

**Ing. Luis Macías. M. Sc.** \_\_\_\_\_

**Biol. David Mero Del Valle. M. Sc.** \_\_\_\_\_

## CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Dra. Dayanara Macías Mayorga certifica haber tutelado el Proyecto de Investigación “**Evaluación de la calidad del agua en diferentes puertos de la costa de Manta: Respuesta de fuga del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*)**.” que ha sido desarrollado por Intriago Chica Dalva Massiel y Vera Rodríguez Elizabeth Nikoll, egresadas de la carrera Ingeniería en Recursos Naturales y Ambientales, previo a la obtención del título de Ingeniero en Recursos Naturales y Ambientales, de acuerdo al reglamento para la elaboración del Proyecto de Investigación del tercer nivel, de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí.

---

Dra. Dayanara Macías Mayorga PhD

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA**

La responsabilidad de los hechos, ideas y doctrinas expuestos en el presente Proyecto de Investigación corresponde exclusivamente al tutor y el patrimonio intelectual de los autores, estudiantes de la carrera de Ingeniería en Recursos Naturales y Ambientales de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí.

---

Intriago Chica Dalva Massiel  
CI: 131671108-2

---

Vera Rodríguez Elizabeth Nikoll  
CI: 131204170-8

## **AGRADECIMIENTOS**

Quedamos agradecidas con la Dra. Dayanara Macías por la guía brindada en todo este proceso. En especial al Dr. Cristiano Araújo por haber impartido sus enseñanzas sobre este tipo de investigación.

A nuestros amigos por hacer de todo este camino algo especial e inolvidables en nuestras vidas. A don Atilio por siempre indicarnos donde estaban los docentes y a que aula deberíamos entrar cuando llegábamos atrasadas. Finalmente agradecemos a la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí y a cada docente que nos ayudó en el proceso de formación académica y también ciertas enseñanzas de vida.

**Dalva Intriago & Nikoll Vera**

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar este trabajo a esas personas que más han influido en mí, guiándome y brindándome aportes invaluableles que servirán para toda mi vida. Con todo mi amor y afecto para mi familia.

**Intriago Chica Dalva Massiel**

Para quienes me han demostrado que a pesar de las adversidades siempre se puede ser fuerte y seguir. Quienes me rodean de amor, para ellos, mi familia.

**Vera Rodríguez Elizabeth Nikoll**

# INDICE

MIEMBROS DEL TRIBUNAL .....	II
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR .....	III
DECLARACIÓN DE AUTORIA DE LOS ESTUDIANTES.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	IV
DEDICATORIAS .....	IV
RESUMEN .....	1
SUMMARY .....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	5
3. JUSTIFICACIÓN .....	6
4. OBJETIVOS .....	7
4.1 Objetivo general .....	7
4.2 Objetivos específicos .....	7
5. HIPÓTESIS .....	8
6. VARIABLES .....	8
6.1 Variable dependiente .....	8
6.2 Variable independiente .....	8
7. MARCO TEORICO.....	9
7.1 La Ecotoxicología.....	9
7.2 Efectos ecotoxicológicos.....	9
7.3 Bioensayos.....	10
7.4 Organismos de ensayos.....	10
7.5 La respuesta Fuga (avoidance).....	11
8. METODOLOGÍA.....	12
8.1 Zonas de estudio.....	12
8.2 Caracterización de muestras.....	13
8.3 Especie: características, obtención y mantenimiento.....	13
8.4 Sistema estatico de exposición no forzada .....	13
8. 5 Calibración del sistema.....	14
8. 6 Experimentos de exposición no forzada.....	15
8.6.1 Ensayos de control de distribución.....	15
8.6.2 Ensayos de fuga.....	15
8. 7 Análisis estadístico.....	15

8.7.1 Ensayo de distribución.....	15
8.7.2 Ensayo de fuga.....	16
8.7.3 Cálculo de AC50.....	16
8.7.4 Análisis multifactorial en fuga.....	16
9. RESULTADOS .....	17
9.1 Parámetros analizados .....	17
9.2 Validación del sistema .....	18
9.2.1 Calibración.....	18
9.2.2 Ensayo de distribución.....	18
9.3 Bioensayos de Fuga.....	18
9.3.1 Exposición de PL 20.....	18
9.3.2 Exposición de PL 32.....	19
9.3.3 Exposición de PL 40.....	20
9.4 ANOVA multifactorial.....	21
10. DISCUSIÓN.....	23
11. CONCLUSIÓN.....	25
12. RECOMENDACIONES.....	26
13. BIBLIOGRAFÍAS.....	27
14. ANEXOS.....	31

### ÍNDICE DE GRÁFICAS

Fig 1. Área del Puerto de Manta (Test #1) .....	12
Fig 2. Área del Puerto de San Mateo (Test #2).....	12
Fig 3. Dimensiones y calibración del sistema estático no forzado.....	14
Fig 4. Gradiente de contaminación lineal .....	14
Fig 5. Calibración del sistema mediante registro de conductividad a las 0 y 24 h .....	18
Fig 6. Porcentaje de fuga de <i>L. vannamei</i> en estadio PL20, expuesta a Test #1 = Puerto de Manta (A) y Test #2 = Puerto de San Mateo (B).....	19
Fig 7. Porcentaje de fuga de <i>L. vannamei</i> en estadio PL32, expuesta a Test #1 = Puerto de Manta (A) y Test #2 = Puerto de San Mateo (B).....	19
Fig 8. Porcentaje de fuga de <i>L. vannamei</i> en estadio PL40, expuesta a Test #1 = Puerto de Manta (A) y Test #2 = Puerto de San Mateo (B).....	20

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de muestras.....	17
Tabla 3. Análisis multifactorial para ensayos con TEST #1 (Puerto Manta).....	21
Tabla 4. Análisis multifactorial para ensayos con Test #2 (Puerto San Mateo).....	22

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad del agua en los puertos de Manta mediante la respuesta de fuga del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Ensayos de toxicidad fueron realizados con muestras de aguas procedentes del Puerto Manta (Test #1) y el Puerto de San Mateo (Test #2). Especímenes de camarón blanco en estadios PL20, PL32, y PL40 fueron utilizados para evaluar la respuesta de fuga. Los ensayos fueron realizados en un sistema multi-compartimentado de exposición no forzada. Las diluciones fueron obtenidas mezclando agua del Test con agua de mar filtrada. Seis tratamientos (0; 5; 10; 25; 50; 75; 100 %) de exposición más el control fueron testados. Los ensayos tuvieron una duración de tres horas y fueron realizados en oscuridad. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. En el caso del Test #1, los organismos en PL20 mostraron una fuga del 53,3% en la concentración más alta de exposición. En PL32 se registró un 46,7 % de fuga en la exposición al tratamiento del 50%, y en los especímenes en PL40 se reportó una fuga del 73,3% en la concentración más alta de exposición. Para el Test #2 solo se reportó un 24,4% fuga en el estadio PL20 expuesto al 50% de la concentración. Estos resultados sugieren que la respuesta de fuga en la especie *L. vannamei* puede ser utilizada para evaluar la calidad del agua en las zonas portuarias de la costa de Manta (Ecuador).

## SUMMARY

The objective of this work was to evaluate the water quality in the ports of Manta through the leakage response of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Toxicity tests were performed with water samples from Puerto Manta (Test # 1) and the Port of San Mateo (Test # 2). Specimens of white shrimp in stages PL20, PL32, and PL40 were used to evaluate the leakage response. The tests were carried out in a multi-compartmented system of non-forced exposure. The dilutions were obtained by mixing water from the test with filtered seawater. Six treatments (0; 5; 10; 25; 50; 75; 100%) of exposure plus control were tested. The trials lasted three hours and were performed in darkness. All the experiments were performed in triplicate. In the case of Test # 1, organisms in PL20 showed a 53.3% leak at the highest concentration of exposure. In PL32 there was a 46.7% leak in the treatment exposure of 50%, and in the PL40 specimens a leak of 73.3% was reported in the highest concentration of exposure. For Test # 2, only a 24.4% leak was reported in the PL20 stadium exposed to 50% of the concentration. These results suggest that the leakage response in the species *L. vannamei* can be used to evaluate the water quality in the port areas of the coast of Manta (Ecuador).

# 1. INTRODUCCIÓN

Los puertos por ser zonas costeras juegan un papel importante, como un eslabón clave dentro de la cadena de transporte, funcionamiento de todas las instalaciones portuarias, las industrias, mientras mayor sean las actividades el impacto ambiental provocado será más intenso en los ecosistemas tanto terrestres como acuáticos. En consecuencia, toda actividad humana tiene percusión sobre el entorno en el cual se desarrolla (CONAMA 2000). La importancia de evaluar la calidad de los ecosistemas reside en que muchos de los contaminantes introducidos son tóxicos, persistentes, bioacumulables y biomagnificables (Romero 2013).

Existen múltiples evidencias a nivel mundial sobre la contaminación generada por estas actividades portuarias que va alterando paulatinamente la calidad de las aguas y sedimentos. Un ejemplo de ello es la contaminación portuaria por tributilestaño (TBT) a los caracoles marinos en la Costa Patagónica (Bigatti et al., 2015). De igual manera alteración de las condiciones naturales del agua donde la problemática ambiental estuvo asociada por las actividades portuarias del río Itaya en Perú (Cerdeña et al. 2014). Contaminantes como hidrocarburos aromáticos policíclicos, materia orgánica, metales trazas (Cd, Pb y Cu) y toxicidad no específica han afectado la calidad de sedimentos en puertos de Chile (Aguirre-Martínez et al. 2009). A nivel local, un estudio en el puerto de Guayaquil demostró la presencia de residuos de aguas de sentinas generadas por diferentes embarcaciones (Rodríguez 2006).

Con el deterioro de los recursos naturales, se han ampliado estudios propuestos a evaluar los cambios ecosistémicos y su respuesta biológica ante la actividad antropogénica. En la actualidad la ecotoxicología como ciencia de evaluación nos permite ver el efecto potencial de los contaminantes sobre los organismos. Por otra parte, se enfoca en evaluar los efectos de la contaminación sobre los ecosistemas, incluyendo toda la comunidad biológica asociada, su estructura y funcionamiento, al igual que las consecuencias para la especie humana (Chapman 2002).

Sin embargo, la evaluación de la pérdida de una especie en un ecosistema integrando la respuesta de fuga de los organismos a este tipo de contaminación es poco estudiada. Diversos estudios han demostrado la utilidad de la respuesta de fuga en la evaluación de algún compartimento ambiental en organismos de distintas taxas, expuestos a diferentes contaminantes. Entre los más recientes tenemos un estudio realizado con el caracol (*Hydrobia ulvae*) expuestos a sedimentos contaminado (Araújo et al. 2012). Así mismo, con pez Cobia (*Rachycentron canadum*) y el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) expuesto a un gradiente de contaminación de Cu (Araújo et al. 2016b). Otra investigación de ensayo de fuga realizado con el pez Tilapia (*Oreochromis sp*) expuesto a un gradiente de contaminación de efluentes de las fábricas atuneras en la zona de Manta (Araújo et al. 2016a)

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo de este estudio fue evaluar la calidad del agua procedentes del Puerto de Manta y Puerto de San Mateo mediante la respuesta de fuga de las larvas de camarón blanco en diferentes etapas postlarval.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los puertos son infraestructuras complejas en la que existen varias actividades; el comercio marítimo, el sector pesquero y toda la industria relacionada a las actividades del puerto son responsables del crecimiento económico. Los beneficios económicos de los puertos suelen estar relacionadas con importantes problemas ambientales y de salud humana. Las fuentes de generación de contaminación son las actividades propiamente portuarias, tales como el tráfico naval (CONAMA 2000), los residuos de embarcaciones, ya sea por basura en el agua o transmisión de impurezas, los residuos de aceites y lubricantes, los líquidos de lavados de tanques, las aguas de sentinas, los aditivos antiincrustantes nocivos utilizados en la pintura de barcos pueden alterar las condiciones naturales de la calidad del agua, y posteriormente, a la vida marina y los ecosistemas. Entre estos efectos encontramos contaminaciones bacteriológicas y virales de especies de peces y mariscos para uso comercial, el agotamiento de oxígeno en el agua y la bioacumulación y biomagnificación de toxinas en peces (Bailey et al. 2004).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Es evidente la problemática ambiental que ocasionan las actividades portuarias en los ecosistemas. Sin embargo, dicha perturbación por lo general solo es evaluada con la medición de parámetros físico-químicos, y no a través del efecto real que esta contaminación ambiental ocasiona en la biota. La implementación de bioensayos ecotoxicológicos ayuda a tener una respuesta inmediata de cómo afecta la contaminación a los organismos. Usualmente los ensayos ecotoxicológicos realizados en laboratorio en los que una población es expuesta a un compuesto nocivo se da bajo condiciones controladas (SEMARNAT 2009). De modo que, las alternativas para aumentar la relevancia en los experimentos son siempre bienvenidas. A partir de esto, surge la respuesta de fuga como mecanismo para evaluar el potencial tóxico y las consecuencias ambientales de estos, preservar y proteger las especies y la estructura y función del ecosistema para que no dañen la vida en el medio ambiente (Cairns & Pratt 1989). Esta respuesta es fácil de apreciar, confiable, rápida y relevante (Lopes et al. 2004). Para lograr una mayor relevancia ecológica los ensayos ecotoxicológicos se realizaron en sistemas multi-compartimentados con exposición no forzada lo cual crea una respuesta más efectiva. Se tomó como especie de prueba el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) por su importancia económica y alta demanda de consumo. El camarón blanco se cultiva en muchos países incluido en el Ecuador debido a que presenta condiciones biológicas con fácil manipulación y reproducción (FAO 2006). De manera que, la respuesta de fuga puede ayudar a evaluar la utilidad del camarón como indicador.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general:**

- Evaluar la calidad del agua en los puertos de Manta mediante la respuesta de fuga del camarón blanco (*L. vannamei*).

### **4.2. Objetivos específicos:**

- Caracterizar las muestras de agua procedentes de los Puertos Manta y San mateo.
- Evaluar la capacidad de la especie *L. vannamei* para ser propuesto como organismo bioindicador de la contaminación de las zonas portuarias en la costa de Manta.
- Determinar en qué estadio la especie *L. vannamei* es más sensible.
- Comparar si la respuesta de fuga varía en función del punto de muestreo.

## **5. HIPÓTESIS**

La respuesta de fuga de la especie *L. vannamei* sirve para determinar la potencial toxicidad del agua en los puertos de Manta.

## **6. VARIABLES**

### **6.1. Variable dependiente:**

- Respuesta de Fuga

### **6.2. Variable Independiente:**

- Concentración de agua procedente del Puerto de Manta.
- Concentración de agua procedente del Puerto de San Mateo.

## **7. MARCO TEÓRICO**

### **7.1. La Ecotoxicología**

El término de ecotoxicología se estableció por Truhaut en 1975, está formada por dos importantes ramas científicas como son la ecología y la toxicología (Capó 2005). En la siguiente descripción muestra un análisis de la diferencia y conjunción de estas disciplinas en el dominio de la ecotoxicología.

La ecología es una ciencia muy conocida, estudia los seres vivos, su distribución y abundancia en los ecosistemas, y en cómo ellos se relacionan con los factores ambientales (Capó 2005; Underwood et al., 2000). Por otra parte, la toxicología se enfoca en evaluar los efectos de los contaminantes sobre el ser humano (Walker et al., 2001). La ecotoxicología se define como “La ciencia que estudia la polución, su origen, evolución y efectos sobre los seres vivos y sus ecosistemas” (Capó 2005)

Por ello, la ecotoxicología con los aspectos relacionados con la calidad ambiental tienen un espectro más amplio, integrando los organismos, ecosistemas, paisaje y seres humanos dentro del mismo contexto. La ecotoxicología aplicada tiene como objetivo el desarrollo de protocolos de ensayo para ser utilizados como herramientas de predicción tempranas aceptables, y sirvan de guía a las entidades reguladores para la toma de decisiones (Day et. al 1998).

### **7.2. Evaluación ecotoxicológica**

La ecotoxicología se basa en dos herramientas esenciales que son: monitoreo ambiental y biológico. El monitoreo ambiental permite intuir las formas las cuales se descartan los contaminantes y estudiar cuál es su destino en el ambiente, es decir, detectar su presencia en distintos compartimentos como agua, suelo, aire y sedimentos. El monitoreo biológico evalúa los efectos de los contaminantes sobre los individuos, poblaciones, comunidad y ecosistema, aplicando pruebas de laboratorio o estudios de campo (SEMARNAT, 2009).

### **7.3. Bioensayos**

Los bioensayos son herramienta de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Los efectos pueden manifestarse a diferentes niveles, desde estructuras subcelulares o sistemas de enzimas, hasta organismos completos, poblaciones o comunidades (Castillo 2004).

Los bioensayos pueden ser definidos de acuerdo con:

- Su duración: corto, mediano o largo plazo.
- El método utilizado para incorporar la muestra al sistema de ensayo: estático, con renovación, de flujo continuo.
- El propósito para el cual son utilizados: control de calidad de vertidos, evaluación de compuestos específicos, toxicidad relativa, sensibilidad relativa, etc.

Según el tipo de respuesta, los ensayos pueden ser:

- Agudos
- Crónicos

### **7.4. Organismos de ensayo**

Se debe tomar en cuenta un organismo que sea sensible a la contaminación que se pueda causar en su hábitat (Maltby et al., 2005). Las respuestas que se obtengan de estos deben ser aprovechadas para establecer normas para procurar el bienestar del resto de especies (Cairns, 1984).

La utilización de organismos que llevan un cultivo fácil ya que puede tener una respuesta certera al provenir estos de una misma población y un desarrollo similar (Chapman, 2002; Álvarez, 1996). Según la USEPA (1991), cada organismo responde de manera distinta a un contaminante, de modo que una especie puede ser sensible a un tóxico, pero tolerante a otro y la única manera de evaluar la gama de sensibilidades es probar con un número de diferentes

especies y grupos taxonómicos, es decir, que se incluyan especies de distintos niveles tróficos.

### **7.5. La respuesta de fuga (*avoidance*).**

Una respuesta clave en los organismos para estimar el riesgo ecológico es la fuga, pues se representa mucho más temprano que la letalidad (Lopes et al., 2004). El comportamiento de fuga es la habilidad que tienen los organismos al desplazarse a una zona la cual garantice la supervivencia de su especie (Moreira-Santos et al., 2008). La importancia de medir la respuesta de fuga se debe que es apreciable en niveles más bajos de toxicidad (Kravitz et al., 1999; Araújo et al., 2014a), dando indicios de señales de alerta temprana sobre un posible deterioro del ecosistema (Hellou, 2011).

## 8. METODOLOGÍA

### 8.1. Zonas de estudio

Los Puertos de Manta (Fig. 1) y San Mateo (Fig. 2) fueron seleccionados como las zonas de estudio. Ambos sitios ubicados en Ecuador, provincia de Manabí, cantón Manta. Las muestras de agua se colectaron en botellas plásticas y se mantuvieron en refrigeración y total oscuridad con el objetivo de no alterar su composición natural, para su posterior caracterización, y utilización en ensayos de toxicidad. Para el ensayo toxicidad el Puerto de Manta fue considerado el Test #1, y el Puerto de San Mateo el Test #2.

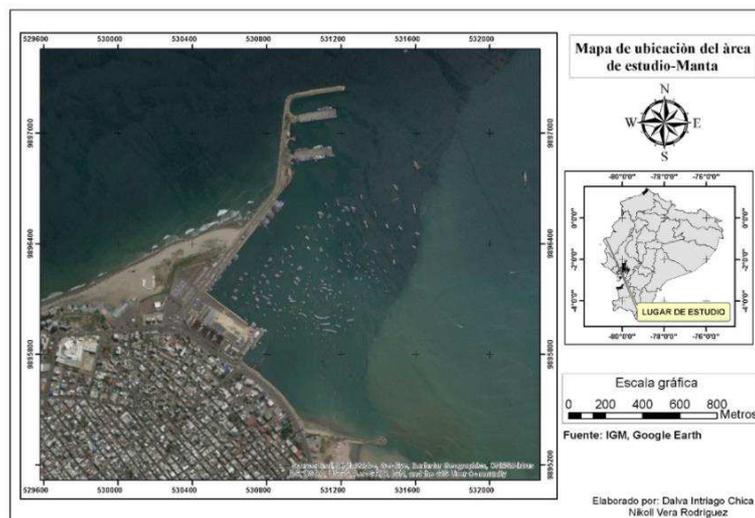


Fig. 1. Área del Puerto de Manta (Test #1)

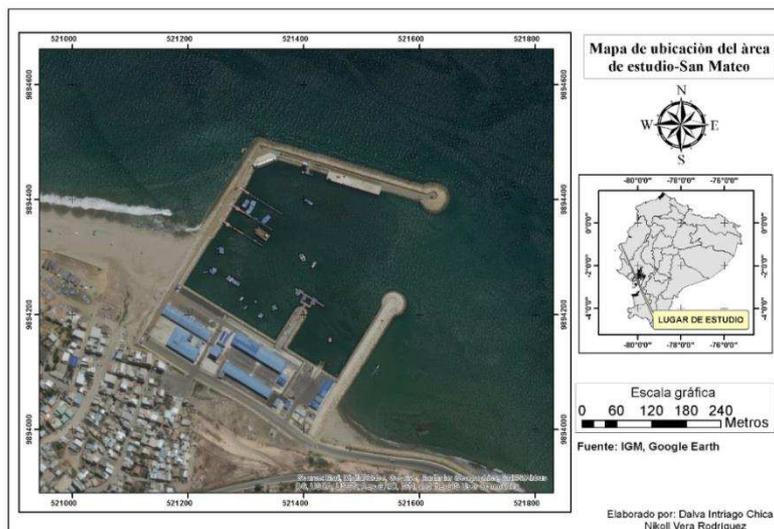


Fig. 2. Área del Puerto de San Mateo (Test #2)

## **8.2. Caracterización de muestras de agua**

En las muestras de agua procedentes del Puerto de Manta y el Puerto San Mateo se analizaron parámetros físicos-químicos como pH, salinidad, conductividad (mS), y sólidos totales disueltos (mg/L) a través de una sonda mutiparamétrica JEMWAY modelo 3540. Los sólidos totales en suspensión fueron analizados según el protocolo descrito en el Manual de prácticas de análisis y residuos líquidos (Marín & Colina 2013). El análisis de metales pesados (mg/L) (Pb, Cu, Hg, Cd, As) se hizo mediante espectrometría de emisión óptica con plasma de inducción acoplado. El análisis de hidrocarburos totales del petróleo (mg/L) fue realizado con la técnica de gravimetría.

## **8.3. Especie: Características, obtención y mantenimiento**

Los especímenes de camarón blanco *L. vannamei* fueron obtenidos en las granjas de acuicultura UFRELAB localizada en San Clemente (Manabí-Ecuador). Los organismos con aproximadamente 13 días de edad fueron transportados al laboratorio en bolsas plásticas con agua de cultivo saturada de oxígeno. Una vez en el laboratorio fueron puestos en dos tanques de 40 L con aireación continua. El proceso de aclimatación tuvo una duración de una semana. Los organismos fueron alimentados con Zeigler I-40 dos veces al día. Los organismos utilizados en los ensayos de fuga (sección 8.6.2) estaban en la etapa post larval: PL20; PL32; PL40.

## **8.4. Sistema estático de exposición no forzada.**

Se elaboró el sistema estático de exposición no forzada descrito por Araújo et al., 2014. Este sistema fue conformado por siete compartimentos. Los compartimentos fueron contruidos con dos botellas plásticas cortadas en la base y unidas entre sí con pegamento no tóxico Sikaflex- 11FC. La boca de las botellas fue el punto de unión entre los compartimentos. El sistema tuvo una longitud total de 189 cm y capacidad para un volumen de agua de 2100 mL. Se realizó un corte en la mitad de cada compartimento, dejando una abertura en la parte superior para poder introducir los organismos al momento del ensayo (Fig. 3). Se usaron tapones a base de plastilina no tóxica envuelta en teflón para aislar

cada compartimento y evitar mezclas bruscas de las diluciones antes de la conformación del gradiente de contaminación

El sistema fue colocado sobre una base firme de PVC para asegurar la estabilidad del mismo al momento de los ensayos. Se realizó una prueba llenando el sistema con agua y se dejó por 24 h para verificar que no tuviera pérdida de líquido.

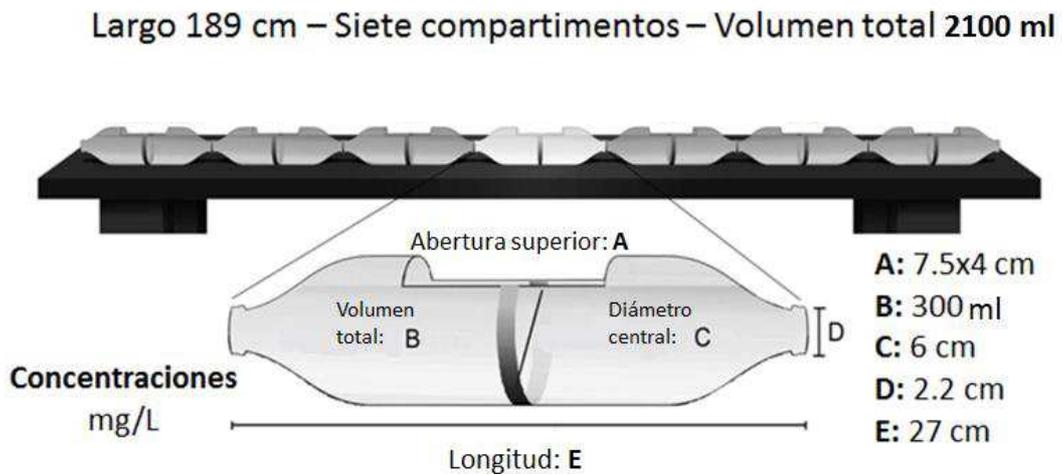


Fig. 3. Sistema estático de exposición no forzada

### 8.5. Calibración del sistema.

Para la calibración del sistema se utilizaron diluciones de agua de mar con agua destilada. Se prepararon seis concentraciones porcentuales de agua de mar (6,25; 12,5; 25; 50; 75; 100 %) más un control (0%) (Fig. 4). Para asegurar la estabilidad del gradiente lineal se tomaron datos de conductividad a las 0 y 24 horas, esto fue realizado por triplicado.

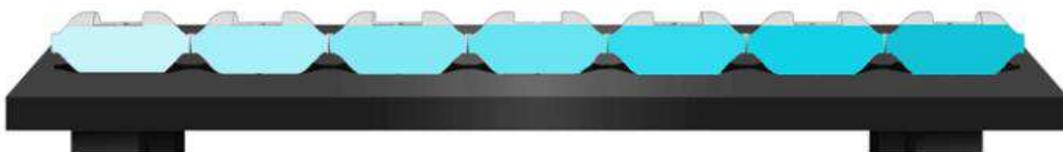


Fig. 4. Gradiente de contaminación lineal

## **8.6. Experimentos de exposición no forzada**

### **8.6.1. Ensayos de control de distribución.**

Con el objetivo de verificar que los organismos no mostraban preferencia o evasión por ninguno de los compartimentos del sistema, se llevó a cabo un ensayo de distribución usando agua de cultivo (sin contaminante). Cinco organismos fueron colocados en cada compartimento. Se realizó un conteo de organismos cada hora durante 3 horas de exposición. El ensayo fue realizado por triplicado y en total oscuridad.

### **8.6.2. Ensayos de fuga.**

Se llevaron a cabo tres ensayos de fuga por cada test. Es decir, un ensayo con cada etapa postlarval (PL20, PL32, Y PL40). Un total de 6 ensayos fueron realizados. El gradiente de concentración lineal estuvo formado por seis concentraciones (5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%) de exposición más un control (0%). Las diluciones fueron preparadas a partir de agua del Test (100%) más agua de cultivo.

Estos tratamientos fueron colocados de forma individual en un compartimento del sistema, tal como se describe en Araújo et al. 2014. Se colocaron los tapones en el sistema antes de colocar las diluciones para evitar una alteración brusca del gradiente de contaminación. Una vez preparado el gradiente, se colocaron cinco organismos por compartimento. Un total de 35 organismos por sistema. Los experimentos fueron realizados por triplicado y el tiempo de exposición fue de 3 h en total oscuridad. Los conteos de organismos se realizaron cada hora durante las tres horas que duró el ensayo. Para el conteo de organismo se utilizó una luz roja para evitar espantar a los camarones ante la presencia de luz o movimiento.

## **8.7. Análisis Estadístico**

### **8.7.1. Ensayo de distribución**

La distribución aleatoria de los organismos en el sistema sin contaminante fue revisada comparando el número de organismos en cada compartimento después

de las 3 horas de exposición. Se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA).

### **8.7.2. Ensayos de Fuga**

En los ensayos de fuga para calcular el número de organismos fugados en cada compartimento se utilizó la fórmula descrita por Moreira-Santos et al. 2008; calculando el número de organismos esperados ( $N_E$ ) menos el número de organismos observados ( $N_O$ ): Organismos Fugados = ( $N_E - N_O$ ).

El  $N_E$  es el número de organismos que se espera en cada compartimento, considerando una distribución homogénea de los organismos observados, suponiendo ninguna preferencia para cualquier concentración de exposición. Se determinó con el número total de organismos observados dentro de los compartimentos, y dividido entre el número correspondiente al compartimento.  $N_O$  es igual a los organismos observados en cada compartimento, sumados a los demás compartimentos con concentraciones más altas dentro de un mismo sistema.

Para la fuga (%) en cada compartimento se determinó dividiendo el número de organismos fugados por los esperados: Fuga = (Fugados /  $N_E$ ) \* 100.

### **8.7.3. Calculo de AC50**

Los valores del AC50 (concentración que causa la fuga del 50% de la población) fue calculada por el programa de software PritProbit 1.63 (Sakuma, 1998).

### **8.7.4. Análisis multifactorial en la respuesta fuga**

Un ANOVA multifactorial fue realizado para determinar si la respuesta de fuga en los organismos estaba relacionada específicamente con la concentración de exposición y no condicionada al tiempo de exposición. Este análisis fue realizado con el programa STATISTICA.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Parámetros analizados

Los resultados obtenidos de los análisis indican que la diferencia entre el Test #1 y el Test #2 se dio en la cantidad de Arsénico presente en los mismos (Tabla 1 y Tabla 2).

**Tabla 1. Caracterización de las muestras de agua del Puerto Manta y Puerto San Mateo.**

	<b>Puerto Manta (Test # 1)</b>	<b>Puerto San Mateo (Test # 2)</b>
pH	8,18	8,13
Salinidad	34,33	33,67
Conductividad (mS)	5,46	5,29
Sólidos Totales (mg/L)	3256,33	3995
Sólidos Totales en Suspensión (mg/L)	208,67	172
Arsénico	0,0686	<0,0031
Cadmio	<0,0004	<0,0004
Cobre	<0,0037	<0,0037
Mercurio	<0,005	<0,005
Plomo	<0,0008	<0,0008
Hidrocarburos Total	0,25	0,25

## 9.2. Validación del sistema

### 9.2.1. Calibración

La figura 5 demuestra que la conductividad tiene un comportamiento similar en las 0 y las 24 horas. Lo que garantiza que el gradiente de contaminación se mantiene en el sistema durante este intervalo de tiempo.

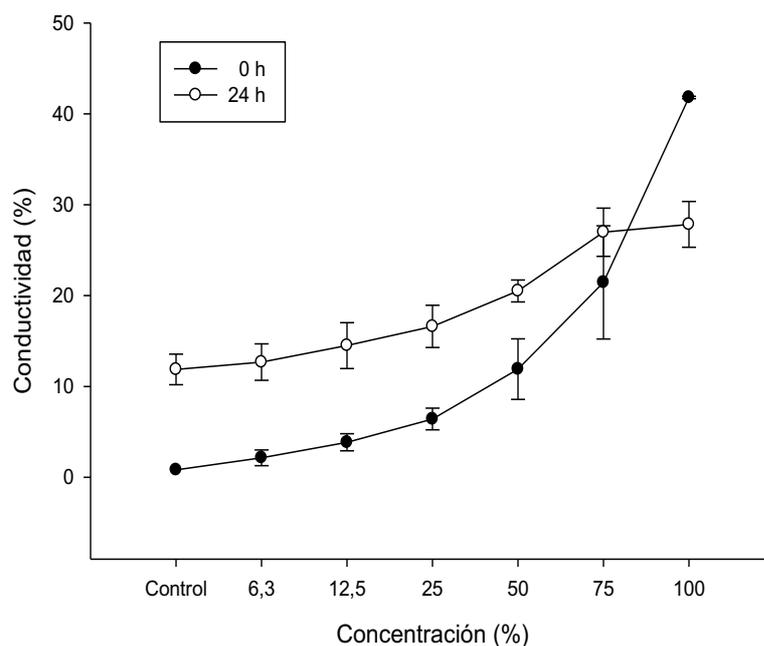


Fig. 5. Calibración del sistema mediante registro de conductividad a las 0 y 24 h.

### 9.2.2. Ensayo de distribución

Las larvas de camarón blanco presentaron una distribución homogénea en todo el sistema. No se observó preferencia por ningún compartimento ( $p > 0,05$ ).

## 9.3. Bioensayos de fuga

### 9.3.1. Exposición de PL 20

Durante este ensayo los organismos expuestos al Test #1 mostraron una fuga de 53,3 % en las concentraciones de 75% y 100 % ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 6A). La AC50 fue 73,4%. En el Test #2 se dio una fuga menor al 50% (24,4% en la segunda

concentración más alta de exposición) por lo cual no se calculó la AC50 (Fig. 6B). Ambos resultados se registraron a la segunda hora de exposición.

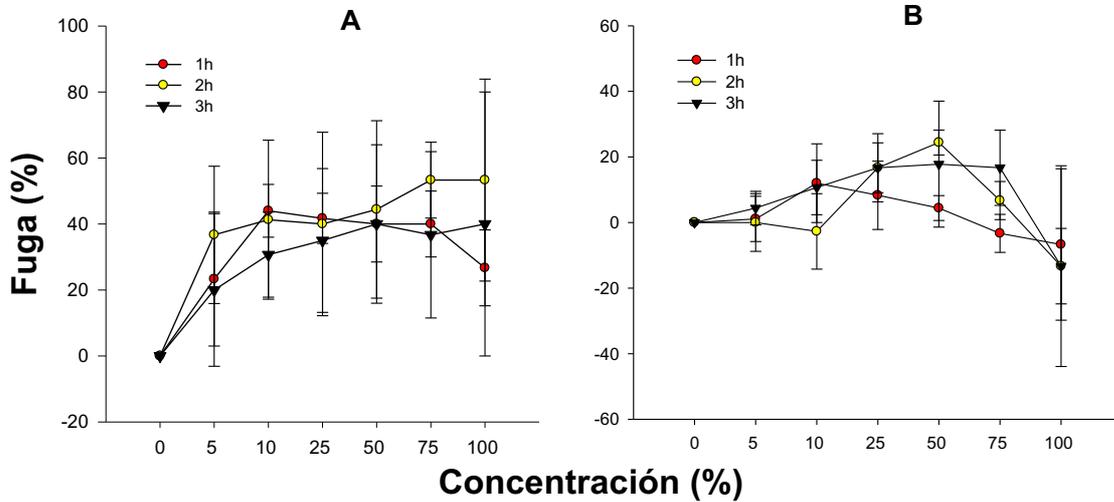


Fig. 6. Porcentaje de fuga de *L. vannamei* en estadio PL20, expuesta a Test #1 = Puerto Manta (A) y Test #2 = Puerto San Mateo (B)

### 9.3.2. Exposición de PL 32

Los organismos en PL32 expuestos al Test #1 mostraron una fuga significativa de 46,7% en las concentraciones de 50% y 75% ( $P < 0,0001$ ) en la segunda hora de exposición, tal como se muestra en la figura 7A. En el caso del Test #2 no se evidenció fuga en los organismos de este estadio postlarval (Fig. 7B).

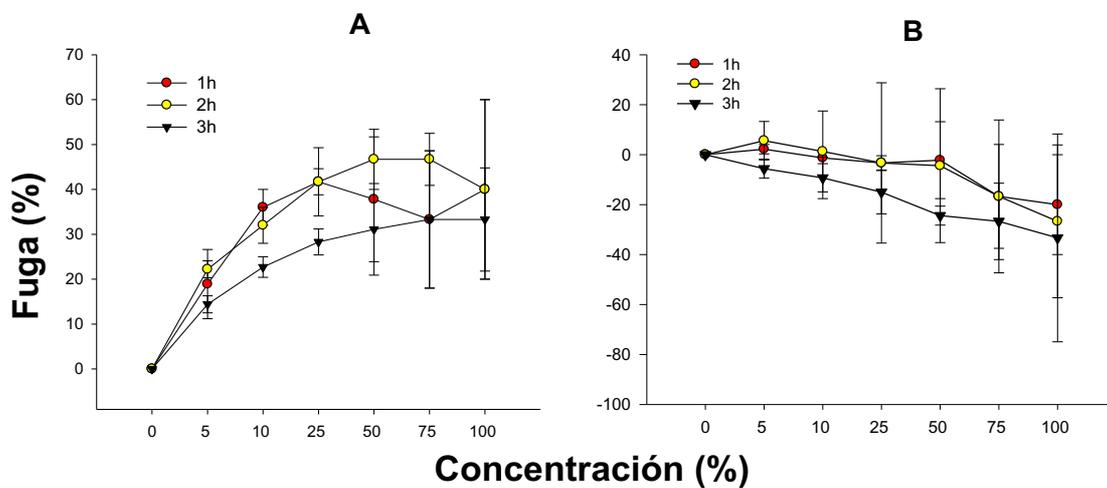


Fig. 7. Porcentaje de fuga de *L. vannamei* en estadio PL32, expuesta a Test #1 = Puerto Manta (A) y Test #2 = Puerto San Mateo (B)

### 9.3.3. Exposición de PL 40

En el caso del Test #1, los organismos expuestos a la concentración más alta mostraron un 73% de fuga en la segunda hora de exposición ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 8A). La AC50 para el Test #1 fue 39,8%. En el Test #2 no evidenció fuga (Fig. 8B).

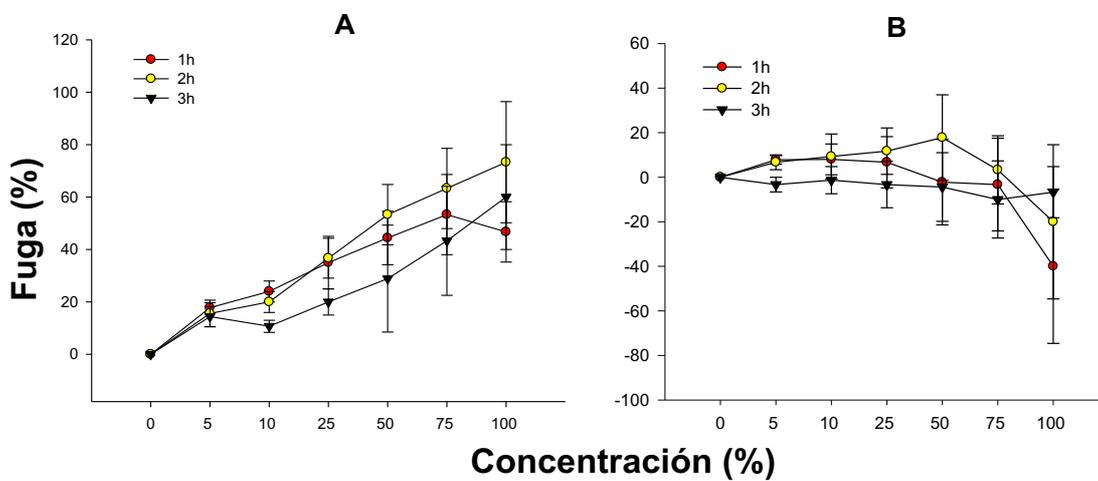


Fig. 8. Porcentaje de fuga de *L. vannamei* en estadio PL40, expuesta a Test #1 = Puerto Manta (A) y Test #2 = Puerto San Mateo (B)

## 9.4. ANOVA Multifactorial

En ambos Test (#1 y #2) la respuesta de fuga estuvo directamente relacionada con el tratamiento de exposición ( $p < 0,05$ ) (Tabla 1 y Tabla 2).

Tabla 3. Análisis multifactorial en ensayos de fuga con *L. vannamei* en distintos estadios postlarvales (PL), expuesto al TEST #1 (Puerto Manta)

EFF	SS	G.L	MS	F	P
<b>PL20</b>					
Tiempo	0.0	2	0.0	0.00	1.000
Tratamiento	772.0	6	128.7	13.33	0.000*
Tra*Tiem	90.7	12	7.6	0.78	0.664
<b>PL32</b>					
Tiempo	0.0	2	0.00	0.00	1.000
Tratamiento	439.1	6	73.19	59.88	0.000*
Tra*Tiem	27.6	12	2.30	1.88	0.066
<b>PL40</b>					
Tiempo	0.0	2	0.00	0.00	1.000
Tratamiento	367.1	6	61.19	43.31	0.000*
Tra*Tiem	27.6	12	2.30	1.63	0.121

Tabla 4. Análisis multifactorial en ensayos de fuga con *L. vannamei* en distintos estadios postlarvales (PL), expuesto al Test #2 (Puerto San Mateo)

EFF	SS	G.L	MS	F	P
<b>PL20</b>					
Tiempo	0.0	2	0.00	0.000	1.000
Tratamiento	68.00	6	11.33	6.000	0.000*
Tra*Tiem	82.67	12	6.89	3.647	0.001*
<b>PL32</b>					
Tiempo	0.00	2	0.00	0.000	1.000
Tratamiento	35.33	6	5.889	2.108	0.072
Tra*Tiem	31.33	12	2.611	0.935	0.523
<b>PL40</b>					
Tiempo	0.00	2	0.000	0.000	1.000
Tratamiento	38.00	6	6.333	2.478	0.058
Tra*Tiem	52.67	12	4.389	1.717	0.097

## 10. DISCUSION

La disminución de una especie en un entorno no se rige exclusivamente a la mortandad que puede causar un tóxico, también existe la respuesta de fuga donde el organismo tiene la capacidad de percibir un agente extraño en su medio y dirigirse a lugares que aseguren su supervivencia (Novais et al. 2010).

Un punto clave al momento de realizar ensayos de fuga es escoger organismos que presenten sensibilidad ante una contaminación en su medio. Diferentes especies como *Litopenaeus vannamei*, *Rachycentron canadum* (Araújo et. al 2016b), *Leptodactylus latrans*, *Lithobates catesbeianus* y *Pelophylax perezii* (Araújo et. al 2014) fueron capaces de detectar y fugar de las concentraciones de Cu a las que estaban expuestos. Por consiguiente, la respuesta de fuga observada en la especie *L. vannamei* durante su exposición a la muestra de agua procedente del Puerto Manta, es indicativo de la sensibilidad de esta especie para detectar la contaminación.

De todas las variables medidas en la caracterización del agua en ambas zonas de estudio, los niveles de arsénico encontrados en el Puerto de Manta están por encima del límite permisible por las Normas TULSMA. Estudios realizados con especies como *Chironomus calligraphus* y *Moina macrocopa*, expuestas al arsénico indican que este metal es un causante de estrés sobre los organismos (Iannacone & Dale 1999). Otro trabajo con invertebrados marinos presentaron una respuesta toxica aguda cuando fueron expuestos a 5 mg/L de arsénico (Taylor 1981). Esto nos podría sugerir que la respuesta de fuga encontrada en la especie *L. vannamei* durante su exposición a la muestra de agua del Puerto de Manta, fue debida principalmente a la concentración de este metal pesado en el medio.

El arsénico es movilizado al medio ambiente a través de una combinación de procesos que incluyen tanto naturales (meteorización, actividad biológica, emisiones volcánicas), así como antropogénicos (actividad minera, uso de combustibles fósiles, uso de pesticidas, herbicidas, desecantes, conservadores de la madera, y uso como aditivos de piensos), en los puertos es común que existan la utilización de algunos de estos (Lillo, J.2008).

La sensibilidad que presentaron las larvas de camarón blanco fue mayor en los organismos con 40 días de edad en comparación con los organismos de 20 y 32 días. Existen estudios donde se ha demostrado que el camarón blanco muestra una sensibilidad mayor conforme van aumentando su edad (Burbano-Gallardo et. al 2015). Sin embargo, no existen trabajos puntuales donde se mida la sensibilidad de los organismos por edad. Teorías basadas en las etapas de los camarones blancos se supone que, al alcanzar una edad juvenil dan una apariencia adulta, además de un desarrollo de setas en los pleópodos que se convierten en los apéndices natatorias (Chapas, 1980) y con esto alcanzan un estrés mayor debido a estos cambios (Duran et. al 1991). El estrés se define como una alteración fisiológica medible la cual puede ser influida por un cambio medioambiental lo cual perjudica a una población, comunidad u organismo expuestos a estos cambios (Lignot et. al 2000).

La respuesta de fuga debe ser considerada como una herramienta importante y relevante frente a un proceso de contaminación, ya que esta podría ser la causa principal de la desaparición de una especie en el ecosistema. Sin embargo, sería una manera de garantizar su supervivencia. La respuesta fuga es un mecanismo de defensa inmediata por parte de los organismos que se encuentran en presencia de alteración de su medio antes de que sucedan efectos con mayor gravedad (Oliveira et al., 2013).

## 11. CONCLUSION

- La respuesta de fuga observada en *L. vannamei* durante su exposición a muestras de agua del Puerto de Manta demuestra la alteración de este sitio, y puede ser considerado como un indicativo de afectación de la calidad del agua en esta zona. Por el contrario, la respuesta observada en el Puerto San Mateo, demuestra que en este sitio aún *L. vannamei* no percibió una potencial alteración en el medio.
- Aunque la variación encontrada en la respuesta fuga de *L. vannamei* fue asociada principalmente a la presencia de arsénico, hay que tener en cuenta que en muestras de campo parte de esta variación también puede estar asociada a otros parámetros que no fueron medidos.
- La alta sensibilidad observada en la especie *L. vannamei* demuestra el potencial de esta especie para ser propuesto como organismo bioindicador, aunque esta capacidad fue mayor en los organismos en estadio PL40.

## **12. RECOMENDACION**

Se recomienda realizar bioensayos de toxicidad similares implementando la utilización de otros organismos que puedan ser considerados potenciales bioindicadores de contaminación.

### 13. BIBLIOGRAFIA

Aguirre-Martínez, G; Rudolph, A; Ahumada, R; Loyola, R; Medina, V. 2009. Toxicidad no específica en sedimentos portuarios, una aproximación al contenido de contaminantes críticos. *Revista de biología marina y oceanografía* 44(3):725-735

Álvarez, S. G. 1996. Metodología de bioensayos y efectos tóxicos de algunos contaminantes sobre organismos de interés ecológico pesquero. Tesis de Maestría. Centro de investigaciones Marinas Universidad de la Habana

Araújo, CV, Rodríguez, EN; Salvatierra, D; Cedeño-Macias, LA; Vera-Vera, VC; Moreira-Santos, M; Ribeiro, R. 2016a. Attractiveness of food and avoidance from contamination as conflicting stimuli to habitat selection by fish. *Chemosphere*. 163: 177-183.

Araújo, CVM; Blasco, J; Moreno-Garrido, I. 2012. Measuring the avoidance behaviour shown by the snail *Hydrobia ulvae* exposed to sediment with a known contamination gradient. *Ecotoxicology*. 21: 750 – 758.

Araújo, CVM; Cândida Shinna; Matilde Moreira-Santos; Isabel Lopes; Evaldo L.G. Espíndola; Rui Ribeiro. 2014. Copper-driven avoidance and mortality in temperate and tropical tadpoles. *Aquatic Toxicology*. 146: 70 – 75.

Araújo, CV; Cedeño Macías, LA; Vera Vera, VC; Salvatierra, D; Rodríguez, EN; Zambrano, U; Kuri, S. 2016b. Predicting the effects of copper on local population decline of 2 marine organisms, cobia fish and whiteleg shrimp, based on avoidance response. *Environmental toxicology and chemistry*. 35(2): 405-410.

Bailey, D; Plenys, T; Solomon, G; Campbell, T; Ruderman, G; Masters, J; Tonkonogy, B. 2004. Anclando la contaminación portuaria. (En línea, sitio web). Consultado 12 abr. 2018. Disponible en <https://futurocostaensenada.files.wordpress.com/2008/09/estrategias-para-la-limpieza-de-puertos.pdf>

Bigatti, G; Averbuj, M; Primost, M; Giulianelli, S. 2015. Contaminación costera y masculinización de caracoles marinos. *Revista Ciencias Hoy* 25(145):37-42

Cairns, J. Jr. 1986. The Myth of the Most Sensitive Species. *BioScience*, Vol. 36, N° 10, pp. 670-672.

Burbano-Gallardo, E. Imués-Figueroa, M. Gonzalez-Legarda, E. Brito, L. Galvez, A. Vinatea, L. 2015. Supervivencia de poslarvas de *Litopenaeus vannamei* sometidas a la prueba de estrés osmótico y su relación con el estado de muda. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. Vol. 50, pp. 323-329.

Cairns, J. Jr. 1984. Are single species toxicity test alone adequate for estimating environmental hazard?. *Environmental Monitoring and Assessment*, Vol. 4, pp. 259- 273.

Cairns, J. Jr. 1986. The Myth of the Most Sensitive Species. *BioScience*, Vol. 36, N° 10, pp. 670-672

Cairns, J. Jr. & Pratt J. R. 1989. The scientific basis of bioassays. *Hydrobiology* 188/189, pp. 5-20

Capó, M. 2007. Principios de Ecotoxicología: diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente. España. Editorial Tebar. 320pp

Castillo, G. 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Primera Edición. México. IDRC. 188pp

Cerdeña, P; Reyes-Lázaro, W; Vásquez-Matute, A. 2014. Contaminación de las aguas del río Itaya por las actividades portuarias en el Puerto Masusa, Iquitos, Perú. *Ciencia amazónica (Iquitos)* 4(1):100-105

Chapa. S.H. 1980 "La Biología y el estudio del camarón."

Chapman, P. M. 1998. New and emerging issues in ecotoxicology – the shape of testing to come? *Australasian Journal of Ecotoxicology*, Vol. 4, pp. 1-7

Chapman, P. M. 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 44, pp 7-15.

CONAMA (Consejo Nacional del Medio Ambiente, Chile). 2000. Guía para el control y prevención de la contaminación industrial: actividad portuaria. (en línea, sitio web). Consultado 12 abr. 2018. Disponible en: <http://www.ecomabi.cl/biblioteca/file/255-82?tmpl=component&start=20>

Day, K. Ongley, E. Scroggins, R & Eisenhauer, R. 1988. Biology in the New Regulatory Framework for Aquatic Protection. National Water Research Institute (Burlington, Ontario) and Environment Canada (Ottawa).

Duran, R. Rodríguez, J M. Morales, J. 1991. Stress-tests: a practical tool to control post larval shrimp quality. Larvi 91 Fish & Crustacean larviculture symposium. European aquaculture society. Special publication No 15, Gent. Belgium.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Italia). 2006. Programa de información de especies acuáticas. *Penaeus vannamei*. (En línea, sitio web). Consultado 12 abril. 2018. Disponible en: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus\\_vannamei/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es)

Iannacone, J. & Dale, W. 1999. Protocolo de bioensayo ecotoxicológico para evaluar metales pesados contaminantes de agua dulce con *Chironomus calligraphus* (Diptera: Chironomidae) y *Moina macrocopa* (Crustacea: Cladocera), en el Río Rímac, Lima, Perú. *Revista Peruana de Entomología*. Vol. 41, pp. 111-120.

Kravitz, M. J; Lamberson, J. O; Ferraro, S. P; Swartz, R. C; Boese, B. L; Specht, D. T. 1999. Avoidance response of the estuarine amphipod *Eohaustorius estuaris* to Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Contaminated, Field-Collected Sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 18, N°6, pp. 1232-1235.

Lignot, J H. Spanings-Pierrot, C. Charmantier, G. 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture*. pp 209-245.

Lillo, J. 2008. Peligros geoquímicos: arsénico de origen natural en las aguas. (En línea, sitio web). Consultado 20 jul. 2018) Disponible en: [http://www.aulados.net/GEMM/Documentos/Peligros\\_geoquimicos\\_As/Peligros\\_As\\_2.pdf](http://www.aulados.net/GEMM/Documentos/Peligros_geoquimicos_As/Peligros_As_2.pdf)

Lopes, I; Baird, D. J; Ribeiro, R. 2004. Avoidance of Copper Contamination by Field Populations of *Daphnia longispina*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 23, N°7, pp. 1702-1708

Maltby, L; Naomi, B; Brock, T.C.M; Brink, P. J. V. 2005. Insecticide species sensitivity distributions: Importance of test species selection and relevance to aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 24, N° 2, pp. 379-388.

Mardirosian, M. 2015. Ecotoxicología del arsénico y mecanismos de acción en el desarrollo del anfibio *Rhinella arenarum*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. (En línea, sitio web). Tesis Doctoral. Consultado 22 jul. 2018. Disponible en: [http://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n5664\\_Mardirosian.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n5664_Mardirosian.pdf)

Marín, J. Colina, G. 2013. Manual de práctica de análisis de aguas y de residuos líquidos. La universidad del zulia facultad de ingeniería escuela de ingeniería civil departamento de ingeniería sanitaria y ambiental (DISA).

Moreira-Santos, M; Donato, C; Lopes, I; Ribeiro, R. 2008. Avoidance test with small fish: Determination of the median avoidance concentration and of the lowest-observed-effect gradient. *Environmental Toxicology Chemistry*, Vol. 27, pp 1576-1582.

Novais SC, Soares AMVM, Amorim MJB. 2010. Can avoidance of *Enchytraeus albidus* be used as screening parameter for pesticide testing?. *Chemosphere*. Vol. 79, pp. 233-237.

Oliveira, C; Almeida, J. R; Guilhermino, L; Soares, A. M. V. M; Gravato, C. 2014. Swimming velocity, avoidance behavior and biomarkers in *Palaemon serratus* exposed to fenitrothion. *Chemosphere*, Vol. 90, pp. 936-944.

Rodríguez, A. 2006. Contaminación por residuo de hidrocarburo del petróleo en el puerto marítimo de Guayaquil y su área de influencia debido a actividades navieras periodo 1984 al 2004. (En línea, sitio web). Consultado 3 jul. 2018) Disponible en: [https://www.inocar.mil.ec/web/phocadownloadpap/actas\\_oceanograficas/acta13/OCE1301\\_2.pdf](https://www.inocar.mil.ec/web/phocadownloadpap/actas_oceanograficas/acta13/OCE1301_2.pdf)

Romero, N. 2013. Niveles de contaminación de agua y propuesta de manejo de residuos sólidos no peligrosos para el puerto artesanal pesquero de Esmeraldas-papes. (En línea, sitio web). Tesis Ing. Ges. Amb. Esmeralda, Ecuador, PUCESE. Consultado 5 de oct. 2017. Disponible en <https://repositorio.pucese.edu.ec/handle/123456789/205>

Sakuma, M. 1998. Probit analysis of preference data. *Applied Entomology Zoology*. Vol. 33, pp. 339-347.

SEMARNAT (Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales). Ecotoxicología. Última actualización lunes, 17 de Agosto del 2009. En línea.

Taylor D; Maddock, B; Marce, G. 1985. The acute toxicity of nine grey list metals (arsenic, boron, chromium, copper, lead, nickel, tin, vanadium and zinc) to two marine fish species: Dab (*Limanda limanda*) and grey mullet (*Chelon labrosus*). *Aquatic Toxicity*. Vol. 7, pp. 135-144.

Underwood, A. J; Chapman, M.G; Connell, S.D. 2000. Observations in ecology: you can't make progres on processes without understanding the patterns. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Vol. 250, pp. 97-115.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1991. Technical Support Document for Water Quality-Based toxics control. EPA 505/2-90-001. Washington, DC

Texto Unificad de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente (TULSMA). AÑO. Libro VI Anexo 1 Norma de calidad ambiental y descarga de efluentes: recurso agua. Tabla 3.

Walker C. H., S. P. Hopkin, R. M. Sibly, D. B. Peakall. 2001. *Principles of Ecotoxicology*. 2nd ed., Taylor & Francis, Boca Raton, FL. 309 p.

## 14. ANEXOS



**Anexo 1.** Elaboración del sistema de fuga.



**Anexo 2.** Sistemas armados.



**Anexo 3.** Mantenimiento de los organismos.



**Anexo 4.** Preparación de las soluciones.



**Anexo 5.** Separación de organismos por compartimento.



**Anexo 6.** Laboratorio en total oscuridad.



**Anexo 7.** Observación y conteo de los organismos con luz roja.



**Anexo 8.** Organismos en el control.