

PRUEBAS DE TOXICIDAD AGUDA CL (I) 50 EN CAMARONES MARINOS (*Litopenaeus schmitti* Y *L. vannamei*) UTILIZANDO EFLUENTES INDUSTRIALES A LA BAHÍA DE CARTAGENA, COLOMBIA

María Fernanda Chacón-Castro¹
Sandra Villamarín-Jiménez²
Ricardo Álvarez-León³

RESUMEN

Se efectuaron pruebas de toxicidad con dos efluentes de ALCO Ltda. (Cospique que descarga desechos industriales y Casimiro donde se vierten aguas de enfriamiento), para analizar su efecto en los camarones *Litopenaeus schmitti* y *L. vannamei* en un tiempo de 24, 48, 72 y 96 horas de exposición, con sistemas estáticos y sin recambio. En los análisis estadísticos se realizan regresiones por mínimos cuadrados ordinarios para determinar el tiempo letal medio y las curvas de toxicidad, se hallan los valores de la CL (I) 50 con sus límites de confianza bajo el método PROBIT. Con el efluente Cospique los porcentajes (%) y el tiempo de exposición que se encontraron CL (I) 50 fueron de 6,43 en 24 horas, 6,29 en 48 horas, 6,11 en 72 horas y 5,66 en 96 horas sobre *L. vannamei*; para 24 horas de 7,02; 48 horas de 6,9; 72 horas de 6,92 y 96 horas de 6,71 en *L. schmitti*. Por tanto, el efluente Cospique es de mayor letalidad, demostrando el efecto inmediato. Para el caso de los efluentes de ALCO Ltda. se encontró que a mayor concentración hay mayor mortalidad y menor tiempo letal medio. Los efluentes industriales estudiados son considerados inestables por la formación de complejos químicos resultado de sus compuestos alcalinos.

Palabras clave: bioensayos, toxicidad, efluentes, camarones, Colombia.

ACUTE TOXICITY TESTS CL (I) 50 IN MARINE SHRIMP (*Litopenaeus schmitti* AND *L. vannamei*) USING INDUSTRIAL EFFLUENTS IN THE BAY OF CARTAGENA, COLOMBIA

ABSTRACT

Toxicity tests were carried out with two effluents of ALCO Ltda. (effluent Cospique which discharges industrial wastes, and effluent Casimiro into which the cooling water is discharged) in order to analyze their effect on *Litopenaeus schmitti* and *L. vannamei* shrimp during an exposure period of 24, 48, 72, and 96 hours within static systems and without replacement. Regressions by ordinary minimum quadratic were carried out in the statistical analyses to determine the median lethal time and the toxicity curves. The values for LC (I) 50 and their confidence limits were found using the PROBIT method. With the Casimiro effluent the percentages (%) and the exposure time found LC (I) 50 were 6.43 in 24 hours, 6.29 in 48 hours, 6.11 in 72 hours, and 5.66 in 96 hours for *L. vannamei*. For *L. schmitti* the results were 7.02 in 24 hours, 6.9 in 48 hours, 6.92 in 72 hours, and 6.71 in 96 hours of exposure respectively. The above results indicate that effluents Cospique is of a higher lethality, demonstrating its immediate effects. In the case of ALCO Ltda. Effluents it was found that to higher concentrations was highest the mortality and lesser the lethal median time. The industrial effluents studied are considered unstable because of the formation of chemical complexes resulting from their compounds.

Key words: bioassays, toxicity, effluents, shrimps, Colombia.

¹ Bióloga Marina. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Bogotá D.C., Colombia.

² Bióloga Marina. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Bogotá D.C. Colombia

³ Biólogo Marino. M.Sc. Fundación Verdes Horizontes. Manizales, Caldas, Colombia. Correo electrónico: ricardoalvarezleon@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La valoración del impacto ambiental causado por la contaminación del medio natural ha tomado gran importancia durante las últimas décadas, fundamentalmente por el auge industrial que ha desarrollado el hombre a nivel mundial, dando como resultado tanto el vertimiento accidental de desechos durante su manejo, transporte o procesos de tratamiento, como también abiertamente en forma de efluentes residuales (1).

La contaminación de los mares causa diversos problemas que solamente una acción nacional e internacional podrá resolver. La prevención de la contaminación de los mares tiende primordialmente a proteger las aguas, la salud pública y los organismos vivos, especialmente los moluscos, crustáceos y peces que se capturan en las pesquerías (2).

Las pruebas de toxicidad acuática, son utilizadas para detectar y evaluar los efectos potenciales toxicológicos sobre los organismos acuáticos. Estas pruebas proporcionan información de referencia que se puede utilizar para evaluar los riesgos de los agentes químicos del organismo y las condiciones de exposición (3).

Los bioensayos, según la FAO (3) comprenden:

[la] prueba en la cual un tejido vivo, un organismo o un grupo de organismos es usado como agente para la determinación de la potencia de alguna sustancia fisiológicamente activa de acción desconocida. Por tanto, los estudios toxicológicos mediante bioensayos y pruebas de toxicidad proporcionan información valiosa en el proceso de evaluación de los riesgos ambientales (4).

Hasta mediados de 1984 en Colombia no se habían dictado normas específicas que reglamentaran la máxima concentración permisible de los contaminantes para vertimientos de aguas

residuales en las diferentes industrias. El Gobierno colombiano en vista de que en el país existen fuentes receptoras altamente contaminadas por descargas industriales y domésticas, y teniendo en cuenta el crecimiento de nuevas industrias y de la población, expidió el Decreto 1594 de junio 26 de 1984 sobre las concentraciones máximas permisibles de los contaminantes para los vertimientos de aguas residuales industriales.

Este trabajo tuvo como objetivo conocer el efecto de los efluentes que ALCO Ltda., vierte a la bahía mediante pruebas de toxicidad aguda, con el fin de determinar la concentración letal inicial que causa el 50% de mortalidad CL (I) 50 a 24, 48, 72 y 96 horas. Estos ensayos actualmente en Colombia son el criterio más utilizado para determinar y comprobar los efectos de la contaminación acuática. Se utilizaron camarones (*L. schmitti* y *L. vannamei*) comunes en las costas colombianas; estas especies fueron seleccionadas por la posibilidad de mantener un stock poblacional, por ser fácil el manejo a nivel de laboratorio, y por ser especies de importancia económica.

En el país los trabajos sobre bioensayos y pruebas de toxicidad aguda son escasos. Entre los primeros trabajos que incluyeron bioensayos y pruebas de toxicidad aguda sobre especies carcinológicas colombianas, con sistemas estáticos se encuentran los de Arango (5).

Posteriormente se realizaron bioensayos para determinar la contaminación en aguas costeras y oceánicas de Colombia (6), se trabajó con tres pesticidas organoclorados (Tordon 101, Stam 100, Celbane 40-20) con y sin aireación y se hallaron las concentraciones letales medias iniciales sobre el camarón nativo de río, *Macrobrachium acanthurus* (7).

Otros autores como Arango y Fonseca (8) realizaron pruebas de toxicidad aguda con metil parathion determinando la CL 50 sobre camarones marinos, *Farfantopenaeus duorarum*.

Escobar (9) realizó bioensayos y pruebas de toxicidad para evaluar las concentraciones de hidrocarburos en organismos acuáticos y los efectos potenciales de derrames. Cabrales et al. (10) utilizaron bioensayos de toxicidad para obtener los valores del CL 50 a 24, 48 y 96 horas de exposición de crudos venezolanos, y los dispersantes Corexit 7619 y sus respectivas mezclas sobre *F. notialis*. Amaya y Gutiérrez (11) estudiaron el efecto de mezclas de hidrocarburos derivados del petróleo en *F. notialis* y varios peces. Martínez (12) desarrolló pruebas de toxicidad con el dispersante Numatrol 220 y su mezcla con el crudo Caño Limón en tres especies marinas; mientras Mosquera (13) realizó las mismas pruebas y además observó la demanda bioquímica de oxígeno. Rolón y Prieto (14) realizaron estudios con el mismo dispersante y su mezcla con el crudo de Orito sobre *Litopenaeus*. Álvarez y Borda (15) realizaron pruebas de toxicidad crónica con el dispersante Numatrol 220, el Fuel Oil No. 2 y su mezcla sobre la nueva alga *Tetraselmis* sp.

Específicamente sobre efluentes se encuentran los trabajos de Escobar (16), quien realizó estudios de contaminación con efluentes de refinerías sobre sistemas béntónicos del Valle del Magdalena Medio. En la Bahía de Cartagena, Cabrales et al. (10) y Cabrales et al. (17) elaboraron pruebas de toxicidad con métodos estáticos y recambio manual de concentraciones para comprobar los efectos de los efluentes de hidrocarburos aromáticos procedentes de la refinería de ECOPELROL-CAR sobre *Litopenaeus schmitti* y *Dormitator muculatus* en 24, 48 y 96 horas de exposición. Cabrales et al. (18) realizaron bioensayos de tolerancia térmica del efluente de CORELCA en la Bahía de Cartagena utilizando *F. notialis* y *Centropomus ensiferus*. Martínez (19) trabajó con los efluentes de ALCO Ltda. en las microalgas *Tetraselmis chuii* y *Skeletonema costatum* determinando las CL (I) 50 para cada especie.

La Bahía de Cartagena está situada en la costa norte del Caribe colombiano entre los 10°15' y 10°28'N y los 75°28' y 75°42' W. Tiene una longitud máxima de 15 km y una anchura de 8 km (Figura 1). El volumen de agua es de 122 millones de m³ y la profundidad promedio es de 16 m. La bahía además presenta áreas de intercambio con el mar abierto de 4000 m² en Bocagrande y de 5000 m² en Bocachica. En su extremo sur recibe las aguas del Canal del Dique, brazo artificial del río Magdalena, que aporta un volumen promedio de 85 m³/seg, y la convierten en un sistema estuarino positivo (20).

Sobre la región suroriental se encuentra la Zona Industrial de Mamonal situada a 15 km de la ciudad y con un área de 60 km², considerada el mayor núcleo de industria química y petroquímica en el país (21). Esta zona vierte en sus aguas residuales, sustancias químicas de diversa naturaleza y composición. Aunque algunas industrias poseen instalaciones para el tratamiento de sus desechos acuosos, otras tienen muelles propios para recibir las materias primas y embarcar los productos elaborados, lo que afecta notablemente la calidad de las aguas de la Bahía de Cartagena.

Los efluentes de ALCO Ltda. están localizados en esta zona industrial. De los dos efluentes, uno descarga desechos químicos alcalinos previa sedimentación en extensas lagunas (efluente Cospique), y el otro aguas de enfriamiento (efluente Casimiro). El área de Cospique tiene 134 ha y limita con CORELCA, ATUNCOL y la Bahía de Cartagena. Asimismo, el Caño Casimiro atraviesa las instalaciones de ALCO y llega a la bahía en forma paralela al muelle de la empresa. La zona donde está ubicada esta empresa contiene islotes cubiertos por manglar, los cuales se encuentran aislados, en algunos sectores de la línea de costa del resto de la bahía y se distribuyen entre CORELCA-ALCO y ELECTRIBOL-ALCO-PETROQUÍMICA (Figura 1).

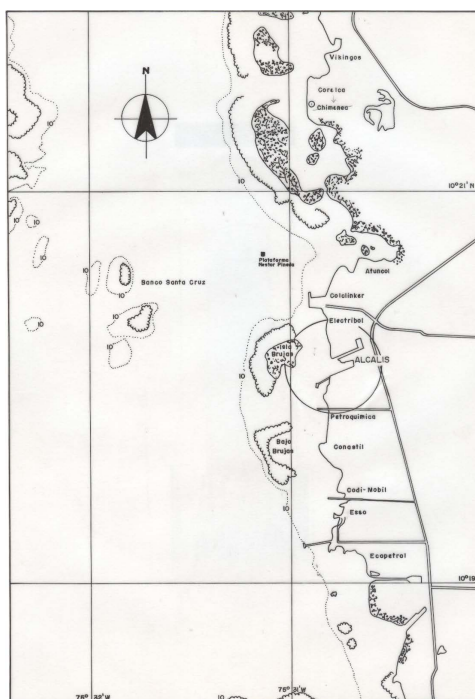


Figura 1. Zona Industria de Mamonal (Cartagena, Caribe colombiano) donde se muestran los efluentes de Casimiro y de Cospique.

Los bioensayos y las pruebas químicas se llevaron a cabo en los laboratorios del CIP-INDERENA, Regional Bolívar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Después de realizar una salida de reconocimiento con el fin de identificar la posición geográfica y las características físicas de los efluentes Cospique y Casimiro, se observó que Cospique posee tres vertimientos en la bahía que están situados en la margen occidental de la laguna norte de sedimentación 54 (ha) donde se confinan los residuos industriales de ALCO Ltda. Las muestras de efluentes se tomaron en el punto de descarga de la laguna norte de sedimentación con el fin de desarrollar las pruebas de toxicidad aguda, CL (I) 50 a 24, 48, 72 y 96 horas.

Para conocer el efecto de este efluente en la bahía, se realizaron transectos longitudinales durante agosto, septiembre y noviembre de

1991, desde la línea de costa hasta el grupo de islas que bordean la zona costera. Estas muestras se tomaron a media agua (1 m) cada 100 m. Se tomaron parámetros físico-químicos *in situ* (temperatura, salinidad, pH, sólidos y alcalinidad) (22).

Al Caño Casimiro, en cambio llegan cuatro (4) afluentes de ALCO Ltda. (aguas de enfriamiento de los procesos industriales). Las muestras del efluente para desarrollar las pruebas de toxicidad aguda CL (I) 50 a 24, 48, 72 y 96 horas se tomaron bajo el puente que se sitúa al sur de la puerta 2 de la empresa.

Se realizaron también transectos longitudinales en agosto, septiembre y noviembre de 1991 ubicando estaciones cada 100 m, para observar la dinámica de las concentraciones del efluente a lo largo del caño hasta llegar a la Bahía de Cartagena y se determinaron parámetros físico-químicos (temperatura, salinidad, pH, sólidos y alcalinidad) (22) (Figura 2).

DISEÑO EXPERIMENTAL

Tratamiento de las muestras de los efluentes

La recolección de las muestras de los efluentes para las pruebas se llevó a cabo en tanques de plástico amarillos y rojos de 100 l. Temperatura, salinidad y pH se determinaron al llegar al laboratorio. Estas muestras se trabajaron inmediatamente (efluente Casimiro), o se almacenaron en tanques de 100 l para decantarlas por un máximo de 24 horas (efluente Cospique).

Las muestras para los análisis químicos (pH, salinidad, conductividad, dureza magnésica y dureza cálcica), se tomaron en envases plásticos.

Estos análisis fueron desarrollados por el INDERENA en el laboratorio de química.

Por su parte ALCO Ltda. llevaba un registro interno de la caracterización de sus efluentes realizando análisis similares a los realizados en el INDERENA; determinando para el Casimiro: sólidos solubles, insolubles totales, sólidos totales, sólidos sedimentables, cloruros, carbonatos solubles, bicarbonatos solubles, carbonatos insolubles, sulfatos, amoníacos, turbiedad, pH; y para Cospique: sólidos solubles, sólidos en suspensión, sólidos totales, alcalinidad (P, Mg, OH, CO₃), dureza cálcica, dureza magnésica, amoníaco, turbiedad y pH.

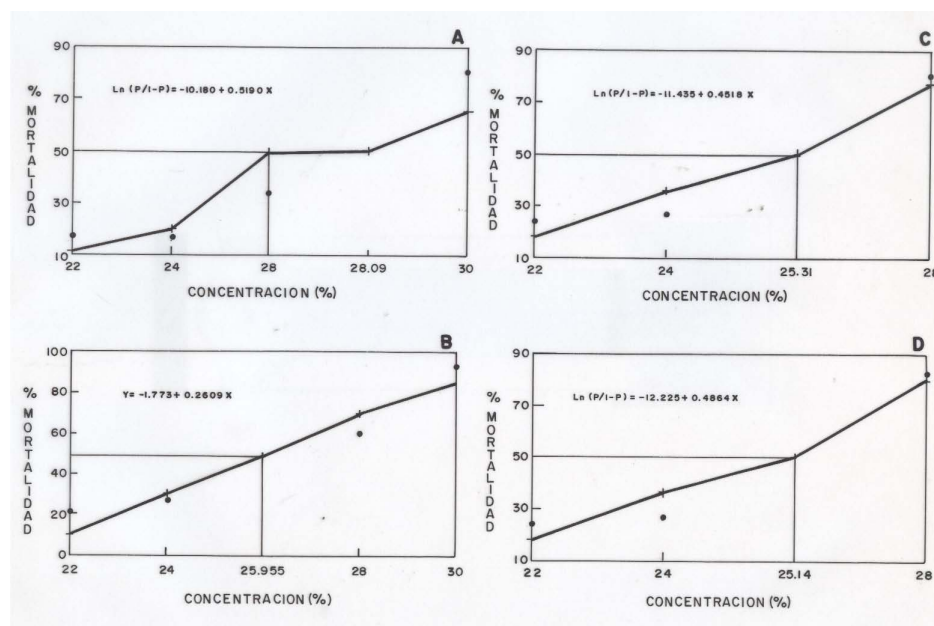


Figura 2. Determinación de la concentración letal media CL (I) 50-48, 72 y 96 horas de exposición del efluente Casimiro vs. *L. vannamei* (A, B y C) (* mortalidad observada; --- mortalidad ajustada).

Tipos de ensayo

Se corrieron ensayos estáticos y sin recambio del efluente durante el transcurso de la prueba con una duración de 96 horas, de acuerdo con Ramírez (1) y Ward y Parrish (25).

Se mantuvieron con aireación controlada al mínimo (140 burbujas/minuto), mangueras de silicona y capilares de vidrio. La densidad fue de 10 individuos por acuario (1 ind/2l). Se utilizaron dos baterías cada una constituida por tres hileras de seis acuarios de vidrio de 20 l de capacidad.

Preparación del material de laboratorio

El protocolo de limpieza que se describe a continuación aseguró un buen grado de descontaminación (23):

- ü Escobilleo con detergente.
- ü Enjuague con pequeñas cantidades de HCL y HNO₃ al 10%.
- ü En el lavado inicial se dejó reposar por 24 horas en la solución ácida para eliminar metales.
- ü Se enjuagó cinco veces con agua potable, eliminando así residuos de detergente y de ácido.
- ü Secado libre de polvo atmosférico.

Tratamiento de especies

Se tuvieron en cuenta los criterios propuestos por la FAO (3), Gutiérrez (23) y Reish y Oshida (24).

Las larvas de *L. vannamei* fueron suministradas por Camarones de Caribe con tallas de 0,6 mm y 1 g de peso, la temperatura 27°C, salinidad de 31 ups y pH de 7,8. Los de *L. schmitti* fueron suministrados por la CVS (Corporación Autónoma Regional del Valle del Sinú), con tallas de PL 19, bajo condiciones de temperatura de 16°C, salinidad de 24 ups y pH de 7,2; los parámetros fueron tomados *in situ*.

Se transportaron en bolsas plásticas de polietileno de 50 l llenándolas a un volumen de 15 l con agua del estanque y con oxígeno, con una densidad de 10 individuos/l dependiendo del tamaño de estos, evitando siempre su exposición a la luz solar hasta su llegada al laboratorio. Se les adicionó hielo alrededor de las bolsas, para su mayor conservación. Estas bolsas se colocaron en tanques *Eternit* con capacidad de 1000 l, se abrieron para variar la salinidad paulatinamente 2 a 3 ppm/h hasta 15 ppm, y luego un 1 ppm/h. La temperatura se varió hasta la del ambiente del laboratorio (M. Prieto, com. pers.).

Se llevó un registro de la sintomatología presentada por las dos especies bajo los efectos de los efluentes; también se tabularon concentración (%), tiempo (h) y parámetros observados.

Para evitar el contagio se procedió a aislar los enfermos del resto del lote. Para el tratamiento de las enfermedades se probaron tres antibióticos. Cloranfenicol: en dilución 3 ppm, con baños de 12 horas. Verde de Malaquita: 0,7 ppm con baños de 24 horas y Azul de Metileno: con dilución de 0,7 ppm, baños de 24 horas (M. J. Torres-Virviescas, com. pers.).

El tratamiento fue utilizado hasta la desaparición total de las manchas. Para iniciar los ensayos con estos organismos se dejaron pasar 5 días después del tratamiento. Para evitar la proliferación de microorganismos en el siguiente lote, se esterilizaron los acuarios y todo el material de laboratorio con 200 mg/l de hipoclorito (25).

Aclimatación primaria

Los camarones trasladados al Centro de Investigaciones Pesqueras CIP-INDERENA, se colocaron en estanques exteriores de cemento con un área de 18 m², profundidad de 1,20 m y densidades de 25 ind/m² según el tamaño de los animales. Se hicieron recambios según la necesidad del medio durante 15 días, suministrando alimentación diaria de 8 a 9:30 a.m. y nocturna de 4:30 a 5:00 p.m. A veces solo se alimentaron en la mañana, con CAMARONINA 35%. La cantidad dependió de las necesidades del crecimiento.

Aclimatación secundaria

Los camarones y peces se pasaron después a acuarios de 100 l realizando diariamente recambios de 70% de agua, alimentándolos con CAMARONINA 35% de acuerdo al 1, 2 o 3% de la biomasa total húmeda. Diariamente se midió la temperatura y salinidad, manteniéndose

a condiciones de laboratorio; en un rango de 28-30°C y 25 ups. La duración de esta fase fue de 10 días. El alimento se les suspendió 24 horas antes de empezar las pruebas, siguiendo recomendaciones de la FAO (3).

Aclimatación terciaria

Se inicia con el proceso de traspaso de los animales de aclimatación secundaria a los acuarios de 20 l con agua de dilución en volúmenes previamente establecidos; con aireación controlada y sin alimentación; con temperatura de 26°C y salinidad de 25 ups, por 24 horas.

Pruebas letales

Los efluentes se trabajaron como un 100% y por escala aritmética se establecieron cinco concentraciones para cada caso. Estas se diluían con agua de mar debidamente filtrada proveniente del Laguito.

Pruebas de búsqueda

Los ensayos comenzaron cuando se tuvo contacto de los organismos con el efluente (Cospique o Casimiro según el caso), determinando un tiempo de exposición de 96 horas. Las pruebas se desarrollaron por duplicado y se escogieron cinco concentraciones en la mayoría de los casos, aunque en las pruebas desarrolladas tanto para *L. schmitti* como para *L. vannamei* hubo la necesidad de disponer hasta 8 concentraciones (determinadas por modelo aritmético). Para hallar los volúmenes respectivos se utilizó la siguiente fórmula:

$$[] * v2 = []^2 * v1$$

Donde []1 = Efluente 100%

[]2 = Concentración escogida

V1 = 20 l (Capacidad del acuario)

V2 = Volumen necesario de efluente.

Estas concentraciones variaron para cada caso y se realizaron con el fin de encontrar rangos más estrechos utilizados en las pruebas definitivas.

Se procedió a llenar los acuarios con agua de mar (agua de dilución) al volumen preestablecido, utilizando para ellos balones aforados de 1 y 2 l. Posteriormente se colocaron los organismos (10 por acuario) con aireación mínima controlada 24 horas antes de iniciar la prueba, para minimizar el estrés de los mismos. El efluente se adicionó midiendo el volumen con balones aforados de igual manera que se realizó con el agua de mar. Los volúmenes en mililitros se tomaron con probetas de 250, 500 y 1000 ml, hasta completar el volumen de 20 l. Iniciada la prueba se realizaron observaciones de sintomatología y mortalidades cada hora consecutivamente durante las primeras 12 horas, y posteriormente espaciadas cada 24 horas hasta completar las 96 horas establecidas.

Los organismos muertos se retiraron con pinzas metálicas protegidas con cinta aislante y se colocaron en cajas de Petri rotuladas según la concentración y con formol al 10%. Se tomaron parámetros físico-químicos desde las cero horas cada 24 horas. Hasta las 96 horas se midió temperatura (termómetro Silber Brand), salinidad (refractómetro Atago S-10 Salt 10%) y pH (potenciómetro Schott Gerate, tipo pH-Meter C67/2).

Pruebas definitivas

Las pruebas definitivas se desarrollaron por triplicado, con los rangos encontrados en las pruebas de búsqueda. El procedimiento seguido fue el mismo descrito anteriormente para las pruebas de búsqueda.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se basaron en los métodos establecidos en el Curso Regional CPPS / PNUMA, específicamente en los lineamientos de Ramírez (1).

Con el método Dosis-Respuesta (PROBIT) se obtuvieron las concentraciones letales medias CL (I) 50 con sus límites de confianza

al 95%; teniendo en cuenta el coeficiente de determinación más alto se escogió el modelo de mayor ajuste para estas; se realizaron gráficas de CL (I) 50 (mortalidad vs. concentración) para 24, 48, 72 y 96 horas en todos los casos, excepto para *L. vannamei* con el efluente Casimiro, donde se graficaron valores desde 48 horas. Se plotearon los puntos observados y se ajustaron las curvas con las ecuaciones respectivas en cada tiempo de exposición. Las regresiones lineales por mínimos cuadrados ordinarios, se determinaron tanto para las ecuaciones de toxicidad como para el tiempo letal medio, cada uno de estos análisis con sus límites de confianza.

Para la realización de las gráficas de ecuación de toxicidad (concentración letal vs. tiempo), se tuvo en cuenta que el coeficiente de correlación fuera de 0,95 para cuatro puntos y de 0,97 para tres puntos observados (1).

Se llevaron a cabo gráficas del tiempo letal medio (mortalidad vs. tiempo), considerando aquellos valores obtenidos cercanos al 50% de mortalidad.

Sintomatología

Las observaciones sobre el comportamiento de las especies al ponerlas en contacto con las diferentes concentraciones de los efluentes, se registraron dando a cada una la descripción

macroscópica de la reacción, buscando usar los términos más representativos a la reacción observada. En el caso de *L. schmitti* y *L. vannamei* se utilizaron 9 grupos de características (nado, tegumento, movimientos de los pereiópodos, movimientos de los pedúnculos oculares, mudas, canibalismo, espasmos, estrés, localización en el acuario) y 9 sub-características.

RESULTADOS

Enfermedades

En los camarones *L. vannamei* se presentó una serie de manchas negras sobre el telson y el caparazón, que corresponden a síntomas de la enfermedad de "black-spot". Como se mencionó en la metodología, se utilizaron tres antibióticos de los cuales el Verde de Malaquita presentó mejores resultados.

Parámetros físico-químicos

Los parámetros físico-químicos iniciales de los efluentes en las especies utilizadas oscilaron en un rango de 9,5-12,0 para pH; temperatura de 29°-31° y salinidad de 10-24 ups para el efluente Casimiro; de 11,2-12 en pH, de 27°-31° en temperatura y de 80-92 ups en salinidad para el efluente Cospique (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos iniciales de los efluentes de ALCO Ltda. para las pruebas definitivas

Efluente	Especie	Parámetros			Fechas M-D-A
		pH	T (°C)	S (ups)	
Casimiro	<i>L. vannamei</i>	9,5	31	13	11-02-90
Casimiro	<i>L. schmitti</i>	10,4	29	24	02-13-91
Cospique	<i>L. vannamei</i>	11,2	31	87	11-14-90
Cospique	<i>L. schmitti</i>	11,8	27	92	01-25-91

Se tomaron variables físico-químicas y los parámetros determinados durante las pruebas definitivas con las diferentes especies. Los rangos de estos resultados se sintetizan en la Tabla 2.

Concentraciones letales

Para el efluente Casimiro las CL (I) 50 y sus límites de confianza se sintetizan en la Tabla 3. En *L. vannamei* se grafican los valores

correspondientes a 48, 72 y 96 horas, sin incluir las de 24 horas por no alcanzarse el 50% de mortalidad (Figura 3). Para *L. schmitti* (Figura 4); estas últimas registrando valores desde 24 horas hasta 96 horas.

Las CL (I) 50 y sus límites de confianza para el efluente Cospique se describen en la Tabla 4. Los valores correspondiente a *L. vannamei* y *L. schmitti* se presentan en las Figuras 5 y 6 respectivamente.

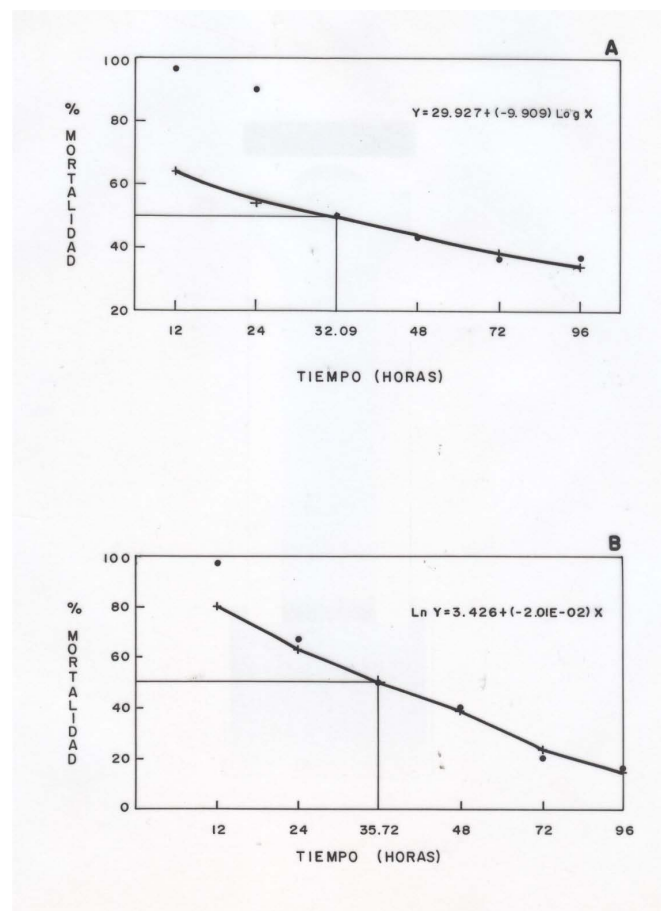


Figura 3. Determinación de la concentración letal media CL (I) 50-24 y 48 horas de exposición del efluente Casimiro vs. *L. schmitti* (A y B), y CL (I) 50-72 y 96 horas (C y D) (* mortalidad observada; --- mortalidad ajustada).

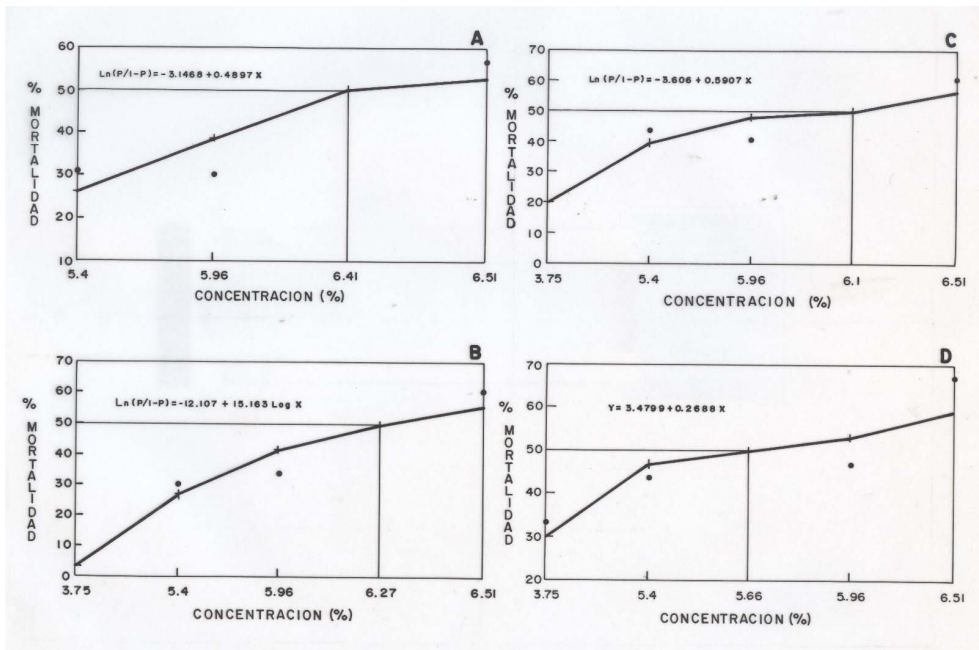


Figura 4. Determinación de la concentración letal media CL (I) 50-24 y 48 horas de exposición del efluente Cospique vs. *L. vannamei* (A y B) y CL (I) 50-72 y 96 horas (C y D) (* mortalidad observada; --- mortalidad ajustada).

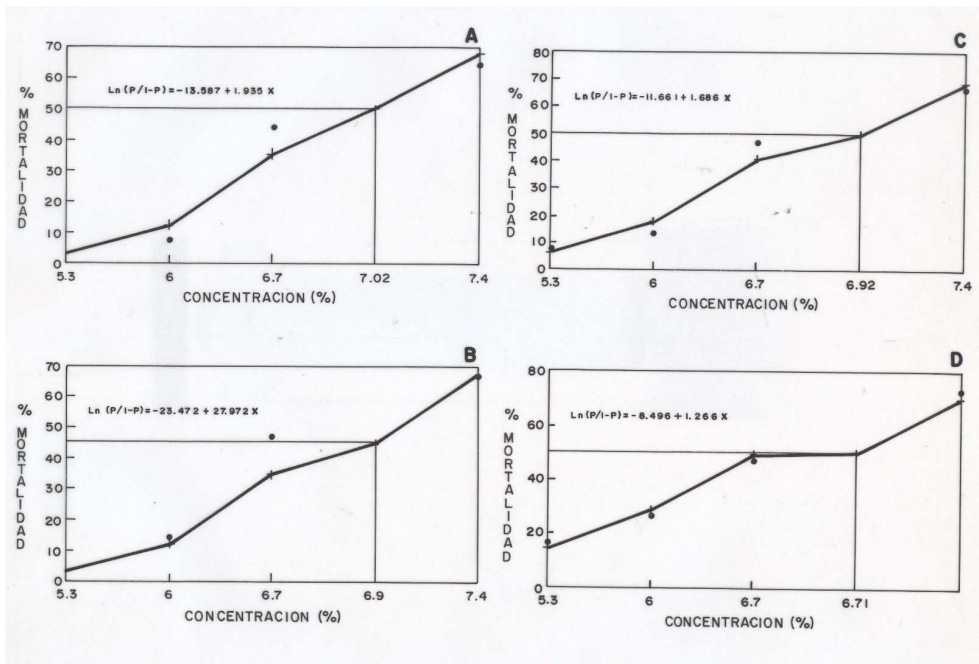


Figura 5. Determinación de la concentración letal media CL (I) 50-24 y 48 horas de exposición del efluente Cospique vs. *L. schmitti* (A y B) y CL (I) 50-72 y 96 horas (C y D) (* mortalidad observada; --- mortalidad ajustada).

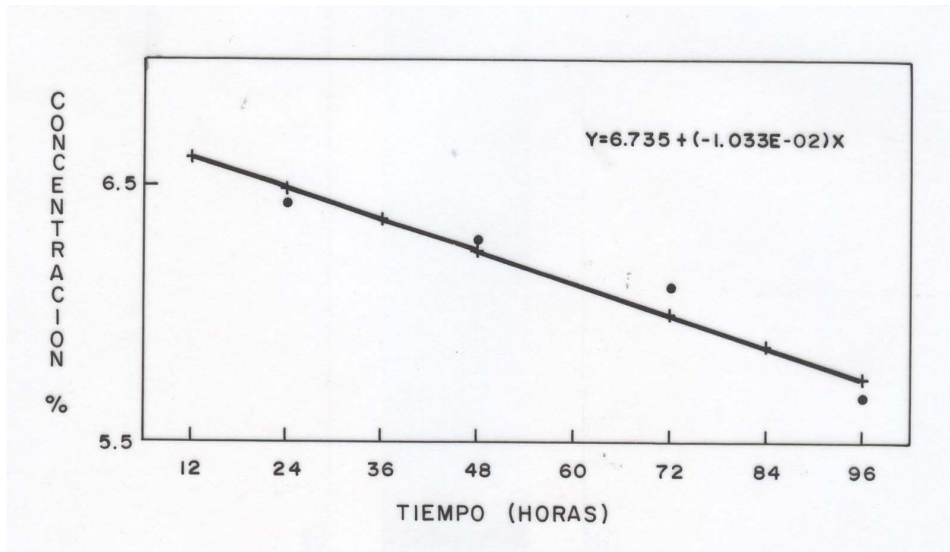


Figura 6. Tiempo letal medio TL (I) 50 para la prueba definitiva del efluente Casimiro vs. *L. vannamei* (A) y del efluente Casimiro vs. *P. schmitti* (B) (* mortalidad observada; --- mortalidad ajustada).

Tiempo letal medio

Ecuaciones de toxicidad

Se determinó el tiempo letal medio por mínimos cuadrados ordinarios de *L. vannamei* y *L. schmitti* con cada efluente, cuyos resultados se presentan en las Figuras 7 y 8.

Los valores de las ecuaciones de toxicidad se presentan en la Tabla 8.

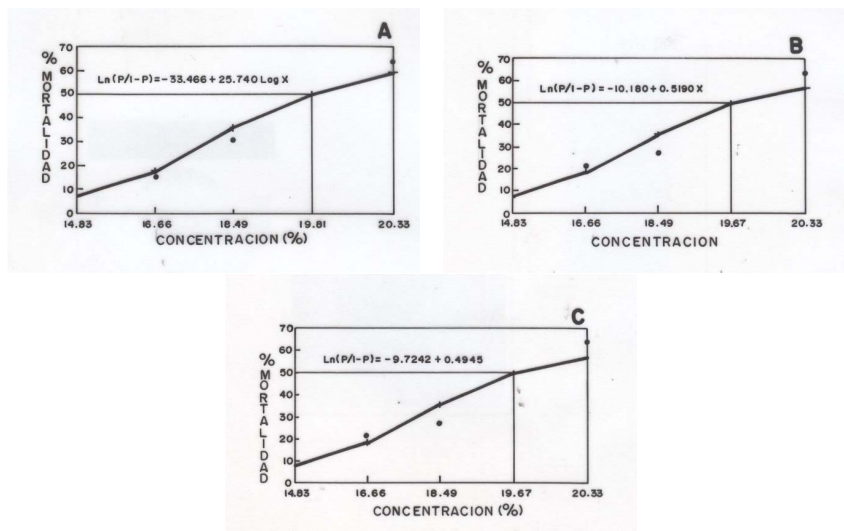


Figura 7. Tiempo letal medio TL (I) 50 para la prueba definitiva del efluente Cospique vs. *L. vannamei* a una concentración de 6,5% (A), del efluente Cospique vs. *L. schmitti* a una concentración de 6,7% (B) y del efluente Cospique vs. *L. schmitti* a una concentración de 7,4% (C) (* mortalidad observada; --- mortalidad ajustada).

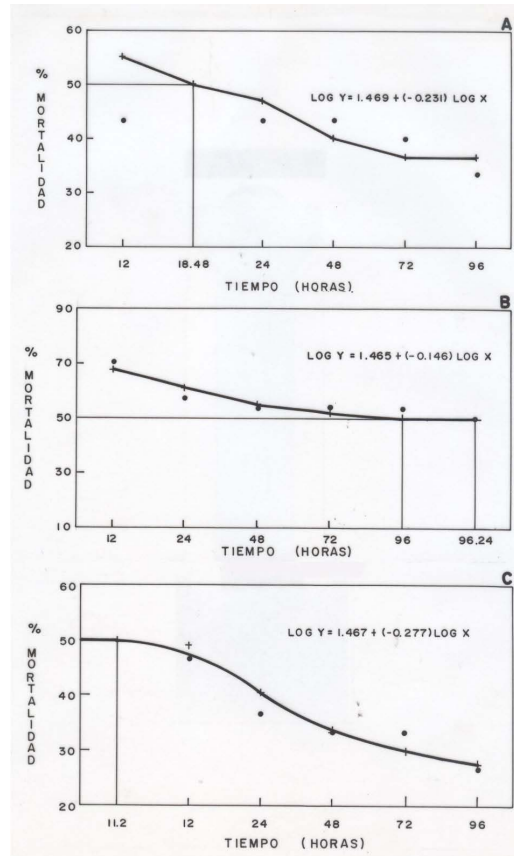


Figura 8. Tiempo letal medio TL (I) 50 para la prueba definitiva del efluente Cospique vs. *L. vannamei* a una concentración de 6,5% (A), del efluente Cospique vs. *L. schmitti* a una concentración de 6,7% (B) y del efluente Cospique vs. *L. schmitti* a una concentración de 7,4% (C) (* mortalidad observada; --- mortalidad ajustada).

Sintomatología

Los datos de sintomatología observados en cada una de las pruebas y para cada una de las especies aparecen en las Tablas 5 y 6.

DISCUSIÓN

Efluente Casimiro

Como se describió en la metodología, el Caño Casimiro es el resultado de las aguas de enfriamiento que utiliza la empresa para sus procesos y la vertiente natural que nace

en Turbaná y recorre la zona industrial por su margen oriental.

El efluente Casimiro es de composición química inestable, pudiéndose incluso percibir fuertes olores a amoníaco en la zona donde se tomaron las muestras, dicho olor disminuye o desaparece en la época de invierno; contiene sólidos en suspensión que le dan apariencia lodosa. Respecto a los parámetros físico-químicos iniciales a las pruebas realizadas se observaron rangos de pH entre 9-10,4; temperatura entre 29-31°C y salinidad entre 13-24 ups en la mayoría de las pruebas, aunque para la definitiva de *L. schmitti* la salinidad registrada fue de 24 ppm (Tabla 1).

En las pruebas tanto de búsqueda como en las definitivas, estos parámetros se mantuvieron en los siguientes rangos: pH entre 7,2-9,1; temperatura entre 26°-33°C y salinidad de 16-35 ups (Tabla 2).

Tabla 2. Síntesis del rango de los parámetros físico-químicos de las pruebas definitivas con los efluentes ALCO Ltda.

Efluente	Especie	Parámetros			Fechas M-D-A
		pH	T (°C)	S (ups)	
Casimiro	<i>L. vannamei</i>	7,3-9,1	26,0-28,0	16-19	11-02-90
Casimiro	<i>L. schmitti</i>	7,2-8,6	26,5-33,0	27-35	02-13-91
Cospique	<i>L. vannamei</i>	7,3-9,8	26,0-28,0	16-21	11-14-90
Cospique	<i>L. schmitti</i>	7,2-9,9	26,0-26,0	24-31	01-25-91

Por la inestabilidad del efluente se dificultó en gran medida la ubicación de los rangos de las concentraciones a escoger; las búsquedas arrojaron resultados antagónicos y por ello la necesidad de realizar 2 o 3 pruebas para asegurar las concentraciones de las definitivas por no encontrarse correlación en los resultados obtenidos en las búsquedas; fue el caso para *L. schmitti* donde se utilizaron ocho concentraciones para cada prueba.

Las concentraciones letales donde se presenta una mortalidad del 50% para *L. schmitti* y *L. vannamei* (Tabla 3) corroboran la similitud de los rangos entre las pruebas, determinándose así la letalidad del efluente con un 25% en promedio. Es

importante anotar los efectos sintomatológicos observados en el transcurso de las pruebas; primero se observó una reacción inmediata de los organismos al contacto con el efluente, presentándose movimientos acelerados, estrés, nado errático y en algunos casos cambios en la pigmentación y otra serie de síntomas que se describen en las Tablas 5 y 6, posteriormente los organismos muestran una adaptabilidad progresiva al efluente. Es importante resaltar nuevamente que aunque todos los coeficientes de correlación estuvieron por encima de 0,8 no se considera conveniente realizar gráficas para 3 o 4 puntos con coeficientes por debajo de 0,97 y 0,95 respectivamente, por no ser significativos a un 95% de confiabilidad.

Tabla 3. Síntesis de las CL (I) 50 y sus límites de confianza para las pruebas definitivas con el efluente Casimiro a 24, 48, 72 y 96 horas

Prueba definitiva efluente Casimiro vs. <i>Litopenaeus vannamei</i>				
Tiempo	Modelo	CL (I) 50	Límite sup.	Límite inf.
24	-	-	-	-
48	LOGIT LOG	19,958	20,490	19,246
72	LOGIT	19,613	20,141	19,085
96	LOGIT	19,666	20,231	19,101

Prueba definitiva efluente Casimiro vs. <i>Litopenaeus schmitti</i>				
Tiempo	Modelo	CL (I) 50	Límite sup.	Límite inf.
24	LOGIT	28,087	28,852	27,322
48	PROBIT	25,955	25,457	25,454
72	LOGIT	25,310	25,891	24,729
96	LOGIT	25,135	25,685	24,5855

Los sólidos en suspensión producen obstrucción en las branquias de los organismos y molestias a nivel del pedúnculo óptico.

Con el tiempo letal medio se determinó que a altas concentraciones, se alcanza el 50% de mortalidad en un corto tiempo, mientras que para las concentraciones más bajas este tiempo es muy prolongado; de tal manera que la mortalidad muestra dependencia tanto por la concentración del tóxico, como por el tiempo de exposición al mismo.

En *L. vannamei* a una concentración de 20,33% el tiempo letal medio es de 32,09 horas (Figura 8); los valores del tiempo letal para las demás concentraciones propuestas no se adicionaron debido a que los datos de mortalidad encontrados fueron muy estrechos y no es factible extrapolarlos para la determinación del TI (50). De esta manera se procedió en el análisis de las demás especies con respecto a estas regresiones. En *L. schmitti* el TI (50) encontrado fue de 35,70 horas para la concentración de 28% (Figura 8), para la concentración del 30% al TI (50) se halló por debajo de las 12 horas.

Tabla 4. Síntesis de las CL (I) 50 y sus límites de confianza para las pruebas definitivas con el efluente Cospique a 24, 48, 72, 96 horas

Prueba definitiva efluente Cospique vs. <i>Litopenaeus vannamei</i>				
Tiempo	Modelo	CL (I) 50	Límite sup.	Límite inf.
24	LOGIT	6,410	6,707	6,113
48	LOGIT LOG	6,287	6,530	6,044
72	LOGIT	6,105	6,485	5,824
96	PROBIT	5,655	6,097	5,213

Prueba definitiva efluente Cospique vs. <i>Litopenaeus schmitt</i>				
Tiempo	Modelo	CL (I) 50	Límite sup.	Límite inf.
24	LOGIT	7,020	7,151	6,889
48	LOGIT	6,904	7,042	6,767
72	LOGIT	6,918	7,061	6,776
96	LOGIT	6,711	6,884	6,537

Es importante aclarar que el modelo exponencial es un modelo deductivo que se ajusta tanto en el medio natural como en el laboratorio, aunque para el efecto de este trabajo se escogieron aquellos modelos que por coeficiente de determinación resultaron de mejor ajuste, siendo esto una elección de tipo inductivo (1).

Efluente Cospique

Al igual que el efluente Casimiro, este efluente también se caracterizó por su inestabilidad química y presencia de sólidos en suspensión,

pero su coloración es blancuzca debido a las altas concentraciones de magnesio y calcio. Es de textura viscosa y suave, a medida que se sedimenta el color se aclara; en el laboratorio se trató de simular lo que en realidad sucede en la laguna de sedimentación y así evitar nuevas interferencias a nivel del verdadero efluente a través de los tres vertederos a la Bahía de Cartagena. Los rangos de los parámetros físico-químicos del efluente inicial fueron: pH entre 11,2-11,8; temperatura entre 27°-31°C y salinidad entre 87 y 92 ups (Tabla 1).

Tabla 5. Sintomatología observada en *L. vannamei* con aguas del efluente Casimiro y Cospique (x = presencia; - = ausencia)

SINTOMATOLOGÍA	Control	3,75%	4,85%	5,40%	5,96%	6,51%
Horas	12-96	12-96	12-96	12-96	12-96	12-96
- Nado						
Normal	-	-	x (12-24)	x (12-48,72)	x (12-24)	x (12)
Acelerado	-	-	-	-	x (12-24)	x (12)
Errático	-	-	-	x (24-48)	-	-
Circular	-	-	-	-	-	-
Contra Acuario	-	-	-	x (12-96)	x (12-24)	x (12)
- Tegumento						
Cambio Pigmentación	-	-	-	x (24-48)	x (12-24)	x (12)
- Mov. Pereiópodos						
Acelerado	-	x (12)	x (12)	x (12-48)	x (12-24)	x (12)
- Mov. Pedúnculos Oculares						
- Mudas						
- Canibalismo	-	-	-	-	x (12)	x (12)
- Espasmos						
- Estrés						
- Localización						
Superficie	x (12-96)	x (12-96)	x (12-96)	x (12-48)	x (12)	-
Media agua	x (12-96)	x (12-96)	x (12-96)	x (12-48)	x (12)	-
Fondo						

Durante las pruebas los parámetros de pH, temperatura y salinidad registraron rangos de 7,2-9,8; 26-28°C y 16-31 ups respectivamente (Tabla 2).

El pH en el momento de iniciada la prueba fue muy alto (9,8) y a medida que transcurrió la misma se observó su disminución en 3 o 4 unidades, debido a la presencia de materias fecales excretadas por los organismos y a la disolución de sales; mientras que la temperatura y la salinidad se mantienen en los mismos rangos, variando de 1 a 2°C o 1 a 2 ups.

Los camarones son muy sensibles a este efluente, esto se observó en los rangos de las concentraciones para las pruebas definitivas (3,75 a 6,51%) con *L. vannamei* y 4,7-7,4% con *L. schmitti*. Las concentraciones letales se determinaron

entre 6,4-5,6% para *L. vannamei* y de 7,02-6,7% para *L. schmitti* confirmándose la letalidad del efluente desde bajas concentraciones.

La respuesta de los diferentes organismos al efluente fue también inmediata como en el caso de Casimiro, presentándose estrés, nado errático, espasmos y específicamente en este efluente se notó muy marcadamente la rapidez en el cambio de mudas, desde las concentraciones más altas a las más bajas por los altos porcentajes de salinidad.

Se apreció muy frecuentemente que, en los camarones, el efluente produce escozor a nivel de la epidermis, esta observación se confirmó posteriormente puesto que los organismos muertos presentaron resequeidad en esta (Tablas 5 y 6).

Tabla 6. Sintomatología observada en *L. schmitti* con aguas del efluente Casimiro y Cospique (x = presencia; - =ausencia)

SINTOMATOLOGÍA	Control	3,75%	4,85%	5,40%	5,96%	6,51%
Horas	12-96	12-96	12-96	12-96	12-96	12-96
- Nado						
Normal	-	-	x (12-24)	x (12-48,72)	x (12-24)	x (12)
Acelerado	-	-	-	-	x (12-24)	x (12)
Errático	-	-	-	x (24-48)	-	-
Circular	-	-	-	-	-	-
Contra Acuario	-	-	-	x (12-96)	x (12-24)	x (12)
- Tegumento						
Cambio Pigment.	-	-	-	x (24-48)	x (12-24)	x (12)
- Mov. Pereiópodos						
Acelerado	-	x (12)	x (12)	x (12-48)	x (12-24)	x (12)
- Mov. Pedúnculos Oculares						
- Mudas						
- Canibalismo	-	-	-	-	x (12)	x (12)
- Espasmos						
- Estrés						
- Localización						
Superficie	x (12-96)	x (12-96)	x (12-96)	x (12-48)	x (12)	-
Media agua	x (12-96)	x (12-96)	x (12-96)	x (12-48)	x (12)	-
Fondo						

Tabla 7. Análisis de regresión para determinar la ecuación de toxicidad

Efluente	Especie	Modelo	Coefficiente de correlación	Ecuación de toxicidad
Casimiro	<i>L. vannamei</i>	LO	0,832658	$\text{Log Y} = 21,643 + (-10,030499) \text{Log X}$
Casimiro	<i>L. schmitti</i>	E	0,895458	$\text{Log Y} = \log 28,489597 + (-14798\text{E}-03) X$
Cospique	<i>L. vannamei</i>	LI	0,964600	$\text{Log Y} = 6,735 + (-10,330\text{E}-02) X$
Cospique	<i>L. schmitti</i>	LI	0,913065	$\text{Log Y} = 7,125 + (-3,916677\text{E}-03) X$

El efecto inmediato del efluente se determinó para las primeras 24 horas, puesto que como en el Casimiro los organismos sobrevivientes en las pruebas alcanzaron adaptabilidad en este medio, hecho que se confirma en la gráfica de la curva de toxicidad de *L. vannamei* con coeficiente de correlación de 0,97 (Figura 7).

Con respecto al tiempo letal medio se puede mencionar que a mayor concentración el valor de este parámetro se alcanza en un tiempo corto, mientras que a menor concentración este tiempo es difícil de lograr.

Al igual que para el efluente Casimiro, en Cospique se encontraron rangos muy estrechos en la mayoría de las concentraciones en todas las especies con excepción de 6,5% en *L. vannamei* que fue de 18,48 horas y en *L. schmitti* para 7,4% de 11,20 horas.

Aunque los efluentes Casimiro y Cospique son de diferente composición química se comportan de manera similar, ya que se observan efectos letales inmediatos donde a mayor tiempo de exposición se reduce la tasa de mortalidad, presumiblemente porque las fracciones más

tóxicas se evaporan, oxidan o degradan en el medio.

En las normas de vertimiento del Decreto 1594 de 1984, los rangos permisibles de contaminación con respecto al pH se establecen entre 5 y 9 unidades; dichos niveles se sobrepasan tanto en las pruebas definitivas como en las estaciones realizadas para las radiales de los efluentes estudiados.

Infortunadamente no existen trabajos similares en cuanto a la naturaleza de los efluentes, a excepción del realizado por Martínez (19) con los mismos efluentes de ALCO Ltda. y utilizando las microalgas marinas *Skeletonema costatum* y *Tetraselmis chuii* en el cual se obtuvieron resultados muy similares. En el área de estudio, también Cabrales et al. (18) realizaron bioensayos y pruebas de tolerancia térmica con el efluente de TERMOCARTAGENA, utilizando camarones (*Farfantepenaeus notialis*) y róbalos (*Centropomus ensiferus*). Los organismos estuarinos y marinos, utilizados en la presente contribución, no habían sido usados como bioindicadores, por ello esta contribución es pionera en Colombia.

CONCLUSIONES

El efecto tóxico de los efluentes (Casimiro y Cospique) es de acción inmediata, en camarones, los cuales muestran gran susceptibilidad.

A medida que transcurre el tiempo se reduce la tasa de mortalidad de los organismos expuestos, lo que indica que presumiblemente hay pérdida de las fracciones más tóxicas.

Los efluentes industriales estudiados en el presente trabajo se consideran inestables, resultado de la complejidad de compuestos y los caudales diferentes que allí se vierten, por lo que los resultados encontrados son representativos de unas condiciones particulares del mismo.

La concentración letal sobre *L. vannamei* se presenta en un rango de 19,67-19,96% y en *L.*

schmitti de 25,14-28,09% con el efluente Casimiro. Con el efluente Cospique sobre *L. vannamei* la CL (I) 50 fue de 5,65-6,43% y en *L. schmitti* fue de 6,71-7,02%, indicando de esta manera que Cospique tiene una letalidad aproximadamente de 2 a 3 veces mayor que Casimiro.

El tiempo letal medio para el efluente Casimiro sobre *L. vannamei* en las concentraciones de 20,33% y 28% es 32,09 y 35,70 horas respectivamente; en *L. schmitti* a 30% es de 7,6 horas. En el efluente Cospique el tiempo letal medio sobre *L. vannamei* en 6,5% es 18,48 horas; en *L. schmitti* para 7,4% es 11,20 horas; indicando que para el caso de los efluentes industriales de ALCO Ltda. a mayor concentración letal, mayor mortalidad y menor tiempo letal medio.

La línea recta que se observa en la curva de toxicidad del efluente Cospique vs. *L. vannamei* indica que a mayor unidad de tiempo la concentración letal presenta una reducción constante; demostrando de esta manera la acción inmediata de los efluentes.

Los rangos de pH de los efluentes industriales de ALCO Ltda. medidos en las pruebas definitivas con *L. vannamei* y *L. schmitti* sobrepasan el rango (5-9 unidades) estipulado en el Decreto 1594 de 1984.

La reacción de los organismos expuestos a los efluentes de ALCO Ltda. fue inmediata y constante hasta las 48 horas de exposición, a partir de las cuales se presentó una aparente adaptación de los mismo al medio; determinándose que no se produce aumento en el efecto tóxico de los efluentes.

Los organismos utilizados (*L. schmitti* y *L. vannamei*) se comportan como bioindicadores ante los contaminantes (aguas calientes y compuestos alcalinos) de los dos efluentes industriales evaluados, de acuerdo a los criterios de Mohammad et al. (26) y Wickins (27).

Infortunadamente no existen trabajos similares en cuanto a la naturaleza de los efluentes, al

área de estudio, a las sustancias presentes, ni a los organismos utilizados (estuarinos y marinos), por ello esta contribución es pionera en Colombia y en el exterior.

AGRADECIMIENTO

A las directivas del IFI y de ALCO Ltda.
—Planta de Cartagena— por su colaboración

en los muestreos y en la información básica suministrada. A la dirección regional del INDERENA, a los colegas J. Álvarez, A. Martínez, M. Prieto, y O. Gutiérrez por su apoyo en la parte experimental, y a A. Ramírez por sus sugerencias y comentarios en el análisis de resultados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ramírez A. Fundamentos cuantitativos para realizar ensayos biológicos y pruebas de toxicidad. Curso Regional de Entrenamiento PNUMA / PAC / COI / INDERENA sobre Ensayos Biológicos de Toxicidad en el Gran Caribe. Cartagena (Bol.), Colombia, junio 1-25; 1989.
2. Alcázar F. Toxicidad y efectividad del dispersante SEAF-014 MOLYPAC Ltda. Dpto. de Oceanología, Univ. Chile. Sede Valparaíso, Montemar (Chile); 1980.
3. FAO. Manual de métodos de investigación del medio ambiente acuático. Parte 4a. Base para la elección de ensayos biológicos para evaluar la contaminación marina. FAO. Doc. Téc. Pesca 1981; 164:1-34.
4. Rand GM, Petrocelli M. Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications. Hemisphere Publ Corp Washington (USA); 1985.
5. Arango H. Concentración letal media del azul de metileno sobre larvas de *Penaeus duorarum*. INDERENA-CIP, Laboratorio de Ensayos Biológicos. Cartagena (Bol.). Inf. Técnico 1978; 1-5.
6. Escobar JJ. Determinación de los niveles de seguridad mediante bioensayos en la contaminación acuática de Colombia, aguas oceánicas y costeras. Proyecto de Investigaciones INDERENA / FUNDEMAR / COLCIENCIAS. Cartagena (Bol.); 1980.
7. Arévalo LM, Rolón ME, García ME. Concentración letal media inicial LC(1)50 de TORDON 101, STAM 100 y CELBANE 40-20 sobre *Macrobrachium acanthurus* (Wiegman, 1836). Tesis Profesional. Fac. de Biología Marina, Univ. de Bogotá Jorge Tadeo Lozano; 1981.
8. Arango H, Fonseca C. Determinación del LC50 sobre juveniles de *Penaeus duorarum*, cultivados en laboratorio a partir de METIL PARATHION. INDERENA-Rev. Divulgación Pesquera 1981; 17(1):1-5.
9. Escobar JJ. Bioensayos y pruebas de toxicidad para evaluar el efecto de la contaminación acuática de los organismos hidrobiológicos y los efectos tóxicos de los derrames de hidrocarburos. INDERENA-Subgerencia Medio Ambiente. Bogotá D.E., Inf. Técnico 1983.
10. Cabrales OR, García S, Del Valle L, Rojas S. Bioensayos y pruebas de toxicidad con crudos utilizados por ECOPETROL, dispersante (COREXIT 9527, COREVIT 7664) y sus mezclas respectivas. INDERENA / ECOPETROL Cartagena (Bol.). Inf. Técnico 1984; 1-52.
11. Amaya MJ, Gutiérrez E. Evaluación de los hidrocarburos derivados del petróleo en la Bahía de Cartagena en 1983 y algunos de sus efectos tóxicos. Tesis Profesional. Fac. Biol. Marina, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano; 1985.
12. Martínez DL. Efectividad y pruebas de toxicidad del dispersante NUMATROL 220 y su mezcla con el crudo Caño Limón en tres especies marinas. Tesis Profesional. Fac. de Biología, Universidad del Valle; 1989.
13. Mosquera AI. Demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y toxicidad del crudo Caño Limón y su mezcla con el dispersante NEUMATROL 220 en tres especies marinas. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, Univ. del Valle; 1989.
14. Rolón S, Prieto CL. Pruebas de toxicidad y análisis cuantitativo del dispersante NUMATROL 220 y su mezcla con el crudo Orito sobre un macrocrustáceo del género *Litopenaeus*. Tesis Profesional. Fac. de Biología, Univ. Nal. de Colombia; 1989.
15. Álvarez J, Borda LB. Pruebas de toxicidad crónica con un dispersante, el FUEL-OIL No. 2 y su mezcla respectiva sobre la especie de microalga Chlorophyta *Tetraselmis* sp. Tesis Profesional. Fac. de Biología Marina, Univ. de Bogotá Jorge Tadeo Lozano; 1989.
16. Escobar JJ. Contribución al conocimiento de la contaminación con efluentes de refinería en dos sistemas lénticos del Valle del Magdalena Medio. Tesis Profesional. Fac. de Biología Marina, Univ. de Bogotá Jorge Tadeo Lozano; 1975.
17. Cabrales OR, García S, Del Valle L, Ocaña M. Estudio ecológico de las áreas de influencia de ECOPETROL sobre la Bahía de Cartagena - Fase IV, Parte 1: Bioensayos con compuestos cíclicos y efluentes de ECOPETROL en la Bahía. INDERENA / ECOPETROL. Cartagena (Bol.). Inf. Final 1982; 1-57.

18. Cabrales OR, Del Valle L, García S. Bioensayos y pruebas de tolerancia térmica sobre el efluente de la Corporación Eléctrica de la Costa Atlántica CORELCA / TERMOCARTAGENA / INDERENA. Cartagena (Bol.). Inf. Técnico 1983.
 19. Martínez A. Pruebas de toxicidad subletales con los efluentes de Alcalis de Colombia Ltda. en las microalgas marinas *Skeletonema costatum* y *Tetraselmis chuii* a 96 y 120 horas respectivamente. INDERENA-CIP Cartagena (Bol.). Inf. Técnico 1991.
 20. CGA. Estudio del control de la contaminación en la Bahía de Cartagena y sus áreas de influencia. Cartagena (Bol.). Inf. Final 1983.
 21. Hernández EJ. Contaminación acuática en Colombia (aguas continentales y marinas). UBJTL-Inf. Museo del Mar 1976; 17:1-47.
 22. Chacón MF, Villamarín-Jiménez S. Pruebas de toxicidad aguda L (50) a 24, 48, 72 y 96 horas a partir de efluentes industriales en camarones *Penaeus vannamei*, *P. schmitti* y peces (*Gambusia affinis*). Tesis Profesional. Fac. de Biol. Marina, Univ. de Bogotá Jorge Tadeo Lozano; 1991.
 23. Gutiérrez EA. Bioensayos y pruebas de evaluación toxicológicas. Curso Regional de Entrenamiento INDERENA / PAC / PNUMA / COI sobre Ensayos Biológicos y Pruebas de Toxicidad en el Gran Caribe. Tomo 2. Cartagena (Bol.), Colombia; 1989.
 24. Reish DJ, Oshida LS. Manual of methods in aquatic environment research. Part 10. Short-term static bioassays. FAO. Fish Tech. Pap. 1977; 247:1-62.
 25. Ward GS, Parrish LR. Manual de métodos de investigación del medio ambiente acuático. Parte 6. Ensayos de toxicidad. FAO. Doc. Tec. Pesca 1983; 185:1-25.
- Mohammad BZ, Garza-Cuevas R, Garza-Almanza V, Landeros-Flores J. Los indicadores biológicos en la evaluación de la contaminación por agroquímicos en ecosistemas acuáticos y asociados. 2005. Disponible en: <http://www2.uacj.mx/IIT/CULCYT/Enero-Febrero2005/5ArtPrin.pdf>
26. Wickins J.F. The tolerance of warm-water prawns to recirculated water. Aquaculture 1976; 9:19-37.