

“APLICACIÓN ESTADÍSTICA EN LOS BIOENSAYOS DE TOXICIDAD CON SEDIMENTOS EXTRAÍDO DEL ESTERO SALADO, CANAL DE ACCESO AL PUERTO MARITIMO DE GUAYAQUIL”.

Por: Francisco Villamar(1)

ABSTRACT

With the purpose of proving and determining in a short term the impact of the dredged material that can be caused by the organisms that inhabit the marine-estuary ecosystem, was performed toxicity bioassay of the sediment extracted from the bottom of the Salado Estuary. This sediment obstructs the access channels of the Maritime Port of Guayaquil.

For this bioassay, was used white shrimp larvae of the species *Litopenaeus vannamei*, a commercially important organism that depends for its food on the organic detritus coming from the sediment and the column of estuary water in the studied area.

The results obtained were analyzed applying the graphic arithmetic method and statistical analysis, through which it was determined that there is a direct relation between the concentrations and the organic effects with 95% certainty.

The survival average of the organisms were obtained with the results of the performed test, the same which was statistically significant for all the analyzed samples.

Through the Kurtosis test, it was observed that the data had normal distribution. Furthermore, the Cochran test was used and it was determined that there is a homogeneity of the variances.

No type of histopathological abnormality was found that could be considered significant. Furthermore, during and after the bioassay, the absence of pathogenic bacteria was observed. In the same way, the analysis for the white stain virus (WSSV) was negative.

RESUMEN

Se realizó el bioensayo de toxicidad de los sedimentos extraídos de los fondos del Estero Salado, que obstruyen los canales de acceso al Puerto Marítimo de Guayaquil, con el propósito de comprobar y determinar en corto tiempo el impacto que el material de dragado puede ocasionar a los organismos que habitan en el ecosistema marino - estuarino.

Se utilizó para este bioensayo larvas de camarón blanco de la especie *Litopenaeus vannamei*, organismo de importancia comercial que depende para su alimentación de los detritus orgánicos proveniente de los sedimentos y la columna de agua estuarina del área de estudio.

Los resultados obtenidos fueron analizados aplicando el método gráfico aritmético y análisis estadístico. Mediante la aplicación del análisis de varianza (ANOVA), se determinó que a un nivel del 95% de confianza existe un efecto significativo de cada una de las concentraciones, así también de cada una de las estaciones en el ensayo.

Se obtuvo la media de mortalidad de los organismos con los resultados de la prueba realizada, la misma que fue estadísticamente significativa para todas las muestras analizadas.

Mediante el test de la Kurtosis se observó que los datos no tienen distribución normal. Además, se utilizó la prueba de Cochran determinándose que existe homogeneidad de las varianzas.

No se encontró ningún tipo de anormalidad histopatológico que sea considerado significativo, además

durante y después del bioensayo se observó ausencia de bacteria patógena, de la misma manera el análisis para virus de la mancha blanca (WSSV) fue negativo.

INTRODUCCION

Por la necesidad de extraer los sedimentos que obstruyen los canales de acceso al Puerto Marítimo, se realizan los bioensayos de toxicidad con los sedimentos que se encuentran en el Estero Salado, con el propósito de comprobar o determinar en corto tiempo el impacto que el material de dragado puede ocasionar a los organismos que habitan en el ecosistema estuarino.

A través de estos ensayos de toxicidad del agua con los sedimentos se pueden obtener resultados del potencial impacto que produce el material de dragado a los organismos sensibles que viven en la columna de agua y en los fondos del estuario. Para esta prueba se escogió al camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, organismo epibentónico que interactúa con los sedimentos y la columna de agua, sensibles a la experimentación (Leong, 1983) y (Alcázar, 1988). Además, estos organismos son importantes porque se encuentran en las piscinas camaroneras cercanas al área de estudio (Cum, 1982).

Existen algunos bioensayos realizados en el Ecuador principalmente para medir la concentración media letal del 50% (CL50) de los dispersantes de petróleo con camarones (Villamar, 1990) y con células del fitoplancton (Villamar, 1996)

MATERIALES Y METODOS

El bioensayo fue de tipo estático y se aplicó la técnica recomendada por la EPA (1991), PBS&J (1999) y Bellan (1981), realizado en el laboratorio del Instituto Oceanográfico de la Armada del Ecuador, que posee una sección de aclimatación y producción de organismos para bioensayos y otro de experimentación con temperatura controlada y luz blanca de fluorescentes.

Las diferentes muestras de sedimento fueron obtenidas con una draga tipo Vann Veen (0.1 m²) y, penetra aproximadamente 20 cm de

profundidad de los fondos lodosos y arcillosos del canal, ubicadas en cinco estaciones que coinciden con las boyas de señalización de navegación. Est. 1 (Boya 72), Est. 2 (Boya 59), Est. 3 (Boya 48), Est. 4 (Boya 33) y Est. 5 (Boya 17) respectivamente (Fig. 1), luego se tomaron con cucharas estériles un litro del sedimento y agua del estero las mismas que fueron puestas en refrigeración para su análisis posterior.

Para la preparación del agua con el sedimento se utilizó un litro de sedimento y colocados en recipientes con agua de las bocatomas de las camaroneras, se lo mezcló vigorosamente con aireadores. Luego se dejó sedimentar la mezcla por 24 horas, transcurrido este tiempo se separó el sobrenadante del sedimento mediante el procedimiento de sifoneado para preparar las respectivas diluciones de 10% - 50% y 100%.

Para el análisis de toxicidad se utilizó post-larvas del camarón *Litopenaeus vannamei* de 12 días de crecimiento, con longitud promedio entre 7 ± 1 mm, fueron aclimatadas a las condiciones del laboratorio con 21.8°C de temperatura, 6.35 ml/l. de oxígeno disuelto, luminosidad relativa al día o la noche y 23.5 ups de salinidad.

Se utilizó concentraciones de 10% 50% y 100% de agua con sedimento suspendido sedimentado y de la misma forma controles sin el sedimento y 4 réplicas correspondientes en cada una de las diluciones, en recipientes de 1 litro de capacidad con aireación continua.

Las observaciones de supervivencia y de mortalidad se las realizó durante 12 - 24 - 48 - 72 y 96 horas, luego se continuó la observación durante 10 - 12 y 14 días de exposición, con el objetivo de dar mas tiempo para determinar efectos orgánicos a largo plazo y contabilizar los organismos vivos y muertos.

ANALISIS ESTADÍSTICO

A los resultados obtenidos del bioensayo de toxicidad, fueron analizados aplicando diversas pruebas estadísticas principalmente el método gráfico aritmético de Stewart (1975), asimismo la prueba de kurtosis para observar si los datos tienen una distribución normal. Además, se utilizó la prueba de Cochran (Moller, 1979) para determinar la homogeneidad o heterogeneidad de las varianzas, el análisis estadístico de varianza (ANOVA) y, la prueba de hipótesis de que la media de los tratamientos (concentración) es igual a cero.

Normalidad de los datos:

Para probar la normalidad de los datos se utilizó el test de la Kurtosis, definido como sigue:

$$b_2 = \frac{\mu_4}{\mu_2^2} = \frac{n \sum (x_i - \bar{x})^4}{(\sum (x_i - \bar{x})^2)^2}$$

Si b_2 toma el valor de 3, los datos están distribuidos normalmente.

De acuerdo a los datos del estudio, el valor de kurtosis es 0.24 por lo que no se encuentran distribuidos normalmente.

Homogeneidad de varianzas

Para probar homogeneidad de los datos se utilizó el test de Cochran, definido como el cociente entre la más grande varianza y la sumatoria de todas las varianzas

$$C_{k,v} = \frac{S_c^2}{\sum_{i=1}^c S_i^2} = \frac{0.58}{0.58 + 0.47} = 0.555$$

Si el valor de $C_{calc.}$ es mayor al valor de $C_{i,v}$ tabulado, la hipótesis de homogeneidad de varianzas se rechaza.

Se realiza el cálculo estadístico C para cada nivel de concentración.

Si comparamos este resultado (0.55) con el tabulado en las tablas de Cochran (0.6), la decisión es que a un nivel de confianza del 95% no existe evidencia estadística para rechazar la hipótesis de que existe

homogeneidad de varianza.

Análisis de varianza (ANOVA):

El problema de estudio se lo modela con un Diseño de dos factores con interacción.

El diseño se parametriza en la siguiente forma:

$$y_{ijl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + e_{ijl}$$

siendo μ la $m\bar{e}\Sigma\alpha_i = 0$ eral, el efecto del nivel i del factor A ($\Sigma\beta_j = 0$), $\alpha\beta_{ij}$ efecto del nivel j del factor B ($\Sigma\alpha_i = 0$), la interacción entre los efectos $\Sigma\alpha\beta_{ij} = 0$ nivel i del factor A y j del factor B ($\Sigma\alpha_i = 0$) y el error aleatorio correspondiente a la observación ijl que sigue una distribución normal $N(0, \sigma^2)$.

Para el contraste de hipótesis

El criterio de decisión es:
Si $F_{exp} > F_e(k-1, n-k)$ se rechaza la H_0

Si $F_{exp} \leq F_e(k-1, n-k)$ no se rechaza H_0
 $F_e(k-1, n-k)$

siendo el valor que se obtiene en las tablas de la distribución F de Fisher - Snedecor,

Prueba de hipótesis de que la media de los tratamientos (concentración) es igual al promedio cero del control:

A fin de determinar cual de los efectos de los niveles de concentración en promedio es significativamente igual al valor de control (nivel de mortalidad igual a cero), se procede a elaborar la siguiente prueba t, definida como:

$$t_{calc} = \frac{\bar{X}_{control}}{\sigma / \sqrt{n}}$$

Donde X es el promedio de la mortalidad sometida al i -ésimo nivel de concentración (100%, 50%, 10%) en la j -ésima estación (Est. 1, Est. 2, Est. 3, Est. 4, Est. 5).

Si el valor de $T_{calc.}$ es mayor al valor de T

(k-1) tabulado, la hipótesis de que la media de mortalidad sea cero se rechaza.

Las técnicas estadísticas aplicadas a los resultados de este bioensayo son las recomendadas por la FAO (Moller, 1979), propuestas por la Comisión Permanente del Pacífico Sur (Alcázar, 1988), el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA, 1989), la Agencia Internacional de Energía Atómica (FAO, 1981, 1989), Environmental Protection Agency (EPA, 1991), An employee - owned company (PBS&J, 1999) y Pearson et al (1958).

Todos los datos de análisis microbiológico y patológico fueron realizados y proporcionados por el Centro de Servicios para la Acuicultura (CSA) de la Unidad de Diagnóstico de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL).

RESULTADOS

Se determinó que la mortalidad de las post-larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* expuestas al agua con sedimento suspendido en concentraciones de 10%, 50% y 100% y los resultados de los efectos orgánicos se consideran aceptables dentro de un ambiente controlado en condiciones de laboratorio.

Al finalizar el bioensayo se observó que los datos obtenidos, en los recipientes que contenían concentraciones de 10% a las 96 horas de exposición fue el 100% de supervivencia en todas las muestras analizadas que corresponden a las boyas # 17 y # 33.

Para las concentraciones de 50% y 100% de sedimento la supervivencia fue menor, alcanzando valores entre 85% y 100% coincidiendo con las boyas # 48, #54 y # 72.

Se continuó con las observaciones de supervivencia hasta los 14 días, y se comprobó que existió estabilidad y crecimiento normal en la población en experimentación, razón por la cual se dio por terminado el análisis de toxicidad de los sedimentos en suspensión. (Fig. 3)

Durante el ensayo no se observó efectos

subletales significativos en las post-larvas de camarón *Litopenaeus vannamei*, aunque en pocos individuos después del ensayo presentaban necrosis muscular y en los apéndices con grado muy leve, por probable canibalismo entre la población en experimentación.

De acuerdo a los análisis realizados de tipo patológico e histopatológico a las larvas utilizadas en las diferentes concentraciones de agua con material suspendido antes y después del bioensayo, no se encontró ningún tipo de anomalía histopatológica que sea considerado significativo, además durante y después del bioensayo se determinó ausencia de bacteria patógena, de la misma manera el análisis fue negativo para virus de la mancha blanca (WSSV) utilizando para esta finalidad el Kit IQ.2000 que es el protocolo sensible, el análisis incluyó a las larvas de camarón correspondiente a los controles sin sedimento antes y después de los ensayos.

Mediante la prueba de kurtosis se observó que los datos no se distribuyen normalmente (Fig. 2). Además, mediante la prueba de Cochran se determinó que existe homogeneidad de las varianzas. (Tabla 1)

Los resultados del t calculado indican que en las estaciones 1 y 2 a los niveles de concentración del 100% y 50% se rechaza la hipótesis de igualdad entre el promedio de la prueba y el promedio del control. (Tablas 2 y 3).

El ANOVA a un nivel de confianza del 95 %, son resultados indicativos de que existe un efecto directo de la concentración y la estación en el experimento. En cambio el efecto de la interacción de las concentraciones y las estaciones es nulo. (Tabla 4)

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a través de este estudio para el análisis de toxicidad de la fase particulada suspendida de los sedimentos, indican que no existe un significativo efecto negativo sobre las larvas de camarón

homogeneidad de varianza.

Litopenaeus vannamei, mortalidad estimada a pesar de que estuvieron sometidas en concentraciones desde el 10% hasta el 100% de agua y sedimentos diluidos, durante un total de 14 días de exposición.

Se concluye además, que los análisis de la fase particulada suspendida de los sedimentos es considerada no tóxica para las larvas de camarón y con posibilidades de no afectar en grado mayor a los camarones adultos y otros organismos bentónicos.

Además, no se encontró ningún problema patológico producido por bacteria o virus que en estos casos están asociados a problemas con camarones en cautiverio.

Existe la posibilidad que la actividad de dragado puede ser causa de un aumento de la turbidez del agua, perturbando la respiración de los organismos filtradores con características sésiles (moluscos, poríferos, etc.), no afectando la calidad del agua en el área de las bocatomas de las camaroneras por estar situadas la mayoría de ellas dentro de los canales protegidos por los manglares. Mediante las pruebas estadísticas se ha demostrado que los datos obtenidos no se distribuyen normalmente, que existe homogeneidad de las varianzas y además se rechaza la hipótesis de igualdad entre el promedio de la prueba y el promedio del control.

AGRADECIMIENTO

El autor expresa su agradecimiento al Sr. Director del INOCAR CPNV Byron SanMiguel, al CPCB Jorge Cárdenas Amores Subdirector Científico, al Jefe del Departamento de Estudios Ambientales y a los biólogos de la División de Ecosistemas Marinos por todo el apoyo brindado para la realización de este artículo científico. A la Ing. Iliana Rosero por su acertada colaboración en el análisis estadístico. Al Sr. Danny Castillo por su oportuna traducción del resumen al inglés.

BIBLIOGRAFIA

Alcázar, F., 1988. Documento guía del Curso Regional CPPS/PNUMA/COI, sobre Bioensayos y pruebas de toxicidad en organismos marinos del Pacífico Sureste. Cartagena. Colombia:162 p.

Bellan, G., 1981. Manual of Methods in Aquatic Environment Research. Part 7. Selected Bioassay for the Mediterranean (Tests Used by FAO (GFCM)/UNEP. Joint Coordinated Project on Pollution in the Mediterranean. Fish. Tech. Pap., (208):31.

Cun, M. 1982. Guía práctica para la cría de camarones comerciales (*Penaeus*) en Ecuador. Inst. Nac. de Pesca. Bol. Cient. Tec., 5(1):29

EPA, 1991. Evaluation of Dredged Material Proposed for Ocean Disposal (Testin Manual). Environmental Protection Agency. Department of the Army. Washington, DC. EPA Contract No. 68-c8-0105: 1 - 53

FAO, 1981. Manual de métodos de investigación del medio ambiente acuático. Parte 4a. Bases para la elección de ensayos biológicos para evaluar la contaminación marina. FAO, Doc. Tec. PESCA. (164):34

FAO, UNEP, IAEA.- 1989.- Estimation of acute lethal toxicity of pollutants to marine fish and invertebrates. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 43, UNEP.

Leong, J., 1983. bioassay system for studying diseases in juvenile Penaeid shrimp. CRC Handbook of Mariculture. crustacean Aquaculture. Florida. 1:321-327.

Moller, F. 1979.- Manual of methods in aquatic environment research. Part 3. Statistical tests. FAO. Fish. Tech. Pap., (182):131

PBS&J.- 1999. Estero Salado – Guayaquil Ship Channel Contaminant Assessment. Department of Fisheries and Allied Aquacultures. Auburn University, Auburn, Alabama. Doc. No. 990921. PBS&J job No. 440029. Cámara Nacional de Acuicultura. Guayaquil, Ecuador:

Pearson, E. y H. Hartley, 1958. Biometrika

tables for statisticians. 1.London, Cambridge University Press, 2nd. ed:240 p.

Stewart, N., 1975. Methods for Acute Toxicity Tests with fish, Macroinvertebrates, and Amphibians. National Water Quality NTS.PB: 242 - 105. Ecological Research. EPA 660/375 -009: 61

Villamar, F. A. 1990. Bioensayo para calcular el CL50 del dispersante de petróleo BP 1100 con larvas de camarón *Penaeus vannamei*. Acta Oceanográfica del Pacífico. INOCAR, Ecuador 6 (1): 73 - 78.

Villamar, F. A. 1996. Bioensayo de toxicidad (CL50) del dispersante de petróleo BP 1100 con fitoplancton marino (*Tetraselmis* sp.). Acta Oceanográfica del Pacífico. INOCAR, Ecuador 8 (1): 67 - 73.

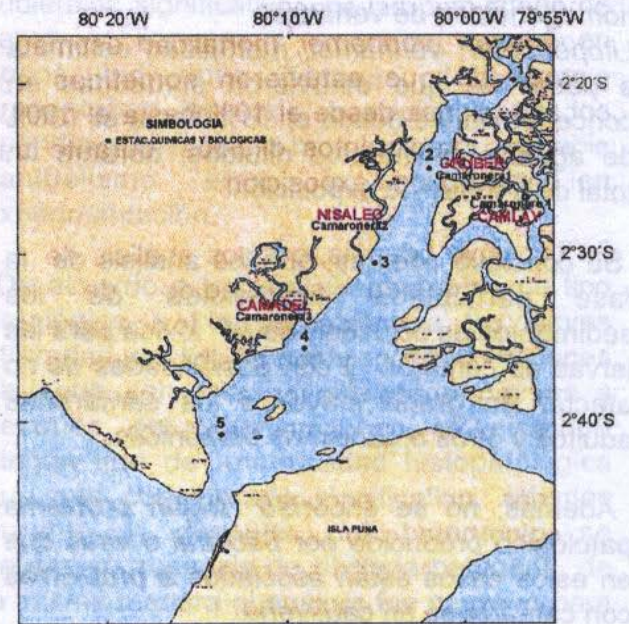


FIG 1.-ESTACIONES DE MUESTREO DE SEDIMENTOS

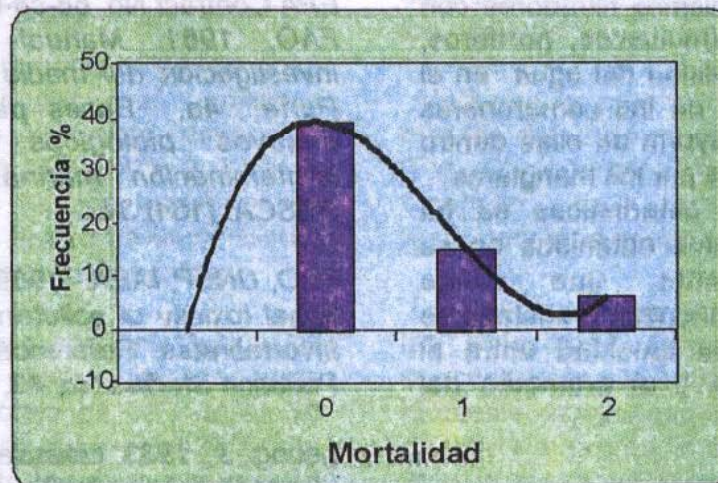


FIG. 2.- DISTRIBUCIÓN DEL NIVEL DE MORTALIDAD DE LAS LARVAS Y LA FRECUENCIA PORCENTUAL

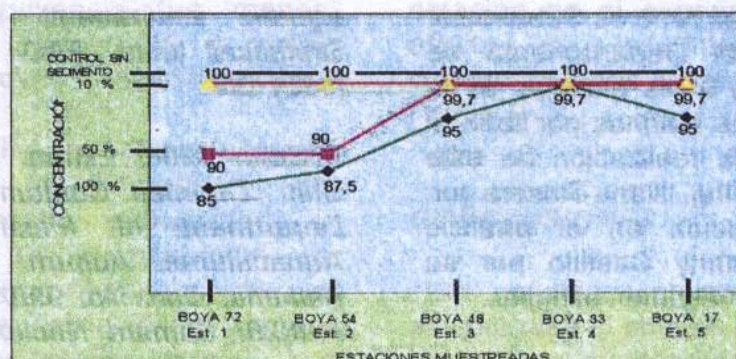


Fig. 3.- Supervivencia porcentual de las larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* después de 96 horas de exposición a las diferentes concentraciones de sedimento suspendido. Julio del 2001.