



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

Determinación del límite de tolerancia del amoníaco y sus síntomas asociados en el cultivo de juveniles de huayaípe (*Seriola rivoliana*).

PROYECTO INTEGRADOR

Previo a la obtención del Título de:

Ingeniero Acuicultor

Presentado por:

Bryan Andres Aguilar Galarza

Luis Andres Vera Delgado

GUAYAQUIL - ECUADOR

2022



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
College of Maritime Engineering and Sea Science

Determination of the tolerance limit of un-ionized ammonia and its associated symptoms in the culture of longfin yellowtail juveniles (*Seriola rivoliana*)

CAPSTONE COURSE

A project submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of:

Aquaculture Engineer

By:

Bryan Andres Aguilar Galarza

Luis Andres Vera Delgado

GUAYAQUIL - ECUADOR

2022

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres Raquel y Bolívar por enseñarme a luchar por mis sueños y metas sin desviarme de mis objetivos ni los caminos que los conducen, por muy cansados que estos sean, a mi hermano Adolfo, por ser el ejemplo a seguir del cual aprendí tantas cosas y agradezco hoy en día, a mis abuelos Sara, Bolívar, Victoria y Adolfo que aunque no se encuentren físicamente siempre vivirán en mi corazón y recuerdos.

A mi amiga y confidente, Karen T., que ha sido mi compañera y copiloto durante todo este viaje denominado vivir. A mi familia porque con sus oraciones y consejos hicieron de mí una mejor persona. A mis amigos Marcelo y Ariel que han sido como mis hermanos. A mi amigo Luis V. por ayudarme a desarrollar este trabajo.

Bryan Aguilar Galarza.

DEDICATORIA

Este proyecto va dedicado a Dios por brindarme la fuerza y aliento día a día, a mi madre Johanna y mi abuela Rosario por darme la formación e inculcarme valores en mi vida para ser una persona de bien, por apoyarme a lo largo de mi etapa estudiantil, por estar presentes en todo momento de mi vida. A mi enamorada Ariana por el amor, cariño y apoyo incondicional en las buenas y malas. A Edu que me ha brindado su amistad desde el colegio. A mis amigos Diego, Steeven, Julio I., Julio G., Samuel, Victor, Luis y Bryan por acompañarme en mi carrera universitaria.

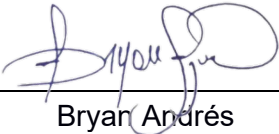
Luis Vera Delgado.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro profundo agradecimiento a Dios por proveernos salud e inteligencia para continuar con nuestra carrera. A nuestros padres que sin su apoyo nada de esto fuera posible. A nuestro tutor Wilfrido Argüello-Guevara Ph. D., por darnos la oportunidad, tiempo, conocimiento y ser el principal apoyo en este proyecto, porque mas que un tutor ha sido nuestro maestro. Al CENAIM por permitirnos trabajar en sus instalaciones y brindarnos sus recursos para desarrollar la investigación. Al personal del Laboratorio de Piscicultura: Ing. Samira Reinoso; Milton Bohórquez M. Sc.; Sra. Sandra Rodriguez y Sr. Jefferson Borbor. A todo el personal de Fitoplancton, Zooplancton. A cada profesor de FIMCM por compartir su conocimiento a través de las aulas de clase. A todos nuestros compañeros y futuros colegas por cada momento triste y feliz compartido.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; (*Bryan Andrés Aguilar Galarza y Luis Andrés Vera Delgado*) y damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”



Bryan Andrés
Aguilar Galarza



Luis Andrés
Vera Delgado

EVALUADORES



Firmado electrónicamente por:
WILFRIDO ERNESTO
ARGUELLO GUEVARA

.....
Wilfrido Argüello-Guevara Ph. D.
TUTOR/PROFESOR DE LA MATERIA

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Kleber Herrera Palomeque', written over a horizontal line.

.....
Kleber Herrera Palomeque M. Sc.
PROFESOR CO-TUTOR

RESUMEN

En piscicultura los parámetros de calidad son importantes para el éxito de los sistemas de producción, ya que se enfrentan a la acumulación de sustancias químicas que en concentraciones elevadas pueden ser tóxicas como el amoníaco (NH_3), causando un desarrollo inadecuado, bajo crecimiento y mortalidad en los peces, por lo que este estudio tuvo como objetivo “La determinación del límite de tolerancia del amoníaco y sus síntomas asociados en el cultivo de juveniles de huayaípe *Seriola rivoliana*”, con estos problemas como antecedentes, se deben determinar las concentraciones letales y los síntomas asociados del amoníaco en juveniles de huayaípe, asegurando de esta manera el mejoramiento de las condiciones de cultivo. Así, en el presente proyecto se determinó las concentraciones letales y la evaluación del efecto tóxico del amoníaco en juveniles de huayaípe, donde los peces se sometieron a los tratamientos (0,00, 0,55, 0,94, 1,18, 1,72, 1,97) mg/L NH_3 . Para medir estos niveles se utilizó un protocolo estándar de concentraciones letales que genere hasta el 50% de mortalidad en los peces, denominado LC_{50} y para su cálculo se empleó el método de transformación PROBIT y un análisis de regresión. Luego del análisis estadístico la prueba de concentraciones letales la LC_{50} a las 96 horas fue de 0,58 mg/L NH_3 y 16.76 mg/L TAN. Un nivel seguro se define como la cantidad de sustancia tóxica que no tiene efectos adversos en los organismos acuáticos, dicho nivel se calcula mediante la división del valor de la prueba LC_{50} a las 96 horas por un factor de 10, por lo que los niveles seguros estimados en este estudio para *Seriola rivoliana* fueron de 0,06 mg/L NH_3 y 1.68 mg/L TAN.

Palabras Clave: NH_3 , TAN, LC_{50} , Toxicidad por amoníaco, Supervivencia, *Seriola rivoliana*.

ABSTRACT

*In fish farming, quality parameters are important for the success of production systems, since they face the accumulation of chemical substances that in high concentrations can be toxic, such as non-ionized ammonia (NH₃), causing inadequate development, low growth and mortality in fish, so this study had as its objective "The determination of the tolerance limit of non-ionized ammonia and its associated symptoms in the cultivation of juveniles of huayaibe (*Seriola rivoliana*)", with these problems as background, lethal concentrations should be determined and its associated symptoms, thus ensuring the improvement of culture conditions. Thus, in the present project were determined the lethal concentrations and the evaluation of the toxic effect of un ionized ammonia in huayaibe juveniles, where the fish were subjected to treatments (0.00, 0.55, 0.94, 1.18, 1, 72, 1.97) mg/L NH₃. To measure these levels, a standard protocol of lethal concentrations was used that generates up to 50% mortality in fish, called LC₅₀, and for its calculation, the PROBIT transformation method and a regression analysis were used. After statistical analysis, the lethal concentration test LC₅₀ at 96 hours was 0.58 mg/L NH₃ and 16.76 mg/L TAN . A safe level is defined as the amount of toxic substance that has no adverse effects on aquatic organisms, this level is calculated by dividing the value of the LC₅₀ test at 96 hours by a factor of 10, so safe levels Estimated in this study for *Seriola rivoliana* were 0.06 mg/L NH₃ and 1.68 mg/L TAN.*

Keywords: NH₃, TAN, LC₅₀, Unionized ammonia toxicity, survival, *Seriola rivoliana*.

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES.....	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT	9
ÍNDICE GENERAL	10
ABREVIATURAS.....	13
SIMBOLOGÍA.....	14
ÍNDICE DE FIGURAS	15
ÍNDICE DE TABLAS.....	16
CAPÍTULO 1.....	17
1. Introducción.....	17
1.1 Descripción del problema.....	18
1.2 Justificación del problema	19
1.3 Objetivos	20
1.3.1 Objetivo General.....	20
1.3.2 Objetivos Específicos	20
1.4 Marco Teórico	21
1.4.1 Biología de la especie y distribución geográfica	21
1.4.2 Características de la especie	23
1.4.3 Calidad del agua relacionado al cultivo.....	23
CAPÍTULO 2.....	31
2. Metodología.....	31
2.1 Descripción del lugar.....	31

2.2	Información disponible sobre el límite de tolerancia del amonio no ionizado en juveniles de huayaibe	31
2.3	Animales utilizados.....	31
2.3.1	Larvicultura	31
2.4	Transferencia y aclimatación.....	32
2.5	Diseño experimental y pruebas de toxicidad	32
2.5.1	Unidades observacionales.....	32
2.5.2	Descripción del control del sistema.....	33
2.5.3	Prueba de toxicidad	34
2.5.4	Supervivencia	34
2.6	Análisis de sangre e histología.....	35
2.7	Análisis estadísticos	36
CAPÍTULO 3.....		37
3.	resultados y análisis	37
3.1	Parámetros de calidad de agua.....	37
3.2	Mortalidad.....	38
3.3	Prueba de toxicidad LC ₅₀	39
3.4	Biometría y parámetros hematológicos	41
3.5	Síntomas asociados a las diferentes concentraciones de amonio no ionizado en juveniles de Huayaibe (<i>Seriola rivoliana</i>)	45
3.6	Formas de reducir y/o controlar los niveles altos de amoniaco en los cultivos de juveniles de Huayaibe (<i>Seriola rivoliana</i>)	46
CAPÍTULO 4.....		47
4.	Conclusiones Y Recomendaciones.....	47
4.1	Conclusiones.....	47
4.2	Recomendaciones.....	48

BIBLIOGRAFÍA.....49

APÉNDICES.....52

ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
ANOVA	Analysis of Variance
ATP	Trifosfato de adenosina
DPE	Dias post-eclosion
LC50	Protocolo de concentraciones letales que genere el 50% de mortalidad

SIMBOLOGIA

l	Litros
°	Grados
g	Gramos
mg	Miligramos
h	Hora
%	Porcentaje
NH ₄	Amonio
NH ₃	Amoniaco
TAN	Nitrógeno amoniacal total
Ppt	Partes por mil
pH	Potencial de hidrogeno
p	Probabilidad
OH	Radical hidroxilo
H ₂ O	Agua

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Beneficiarios del presente proyecto (Aguilar Galarza & Vera Delgado, 2021) ..	20
Figura 1.2 Distribución geográfica mundial de <i>Seriola Rivoliana</i> (Froese y Pauly, 2010)...	21
Figura 1.3 Pez Huayaípe. (Aguilar & Vera, 2021).....	23
Figura 1.4 Ciclo del nitrógeno en un estanque (modificado de Hopher).....	25
Figura 1.5 Medición de TAN amonio y amoniaco en biofloc. Imagen de Bioquafloc ©, todos los derechos reservados.....	29
Figura 2.1 Sistema experimental ubicado en la sala experimental #4 en las instalaciones del CENAIM. (Aguilar Galarza & Vera Delgado, 2021)	33
Figura 3.1 Mortalidad acumulada (%) de los juveniles de huayaípe (<i>Seriola rivoliana</i>) con relación al tiempo de exposición a diferentes concentraciones de NH ₃ . (Aguilar G. & Vera D., 2022).....	38
<i>Figura 3.2</i> Concentración letal media (LC50) de juveniles de huayaípe (<i>Seriola rivoliana</i>) en diferentes tiempos de exposición de amonio no ionizado (NH ₃). (Aguilar G. & Vera D., 2022)	40
Figura 3.3 Cortes histológicos de branquias de juveniles de <i>Seriola rivoliana</i> (400X. a) un control; b-e) alteraciones branquiales de peces expuestos a diferentes concentraciones de NH ₃ ; f) destrucción severa del epitelio lamelar (tejido cicatricial). PL lamelas primarias, SL lamelas secundarias, HEC hiperplasia irregular de células epiteliales con relleno de espacios interlaminares, SSL acortamiento de lamelas secundarias, HRE hemorragias con ruptura del epitelio, LT telangiectasias lamelares, FSL fusión de las puntas de las lamelas secundarias, LEC levantamiento de vías respiratorias células epiteliales.....	43
Figura 3.4 Grado de cambios (<i>I value</i>) y efectos asociados en branquias de juveniles de <i>Seriola rivoliana</i> expuestos a diferentes concentraciones de amonio no ionizado NH ₃	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Biología de la especie <i>Seriola rivoliana</i> (Viader, 2019).....	22
Tabla 1.2 Porcentaje de NH ₃ (amoníaco) a diferentes valores de pH y temperatura. (Emerson, Russo, Lund, & Thurston, 1975)	28
Tabla 1.3 Tabla de cálculos de equilibrio del amoníaco en agua: Efecto del pH y la temperatura. (Journal of the Fisheries Board of Canada, Emerson et al. 1975).....	30
Tabla 2.1 Nitrógeno amoniacal total (TAN) y niveles de NH ₃ en el experimento de exposición. (Aguilar Galarza & Vera Delgado, 2021)	34
Tabla 3.1 Parámetros de calidad de agua tomados en las diferentes concentraciones de Amonio no ionizado. Los valores ($\sigma \pm s$) indican la media y desviación estándar de los valores. (Aguilar Galarza & Vera Delgado, 2021).....	37
Tabla 3.2 Concentraciones letales (LC 50) de amoníaco y TAN a diferentes tiempos de exposición. (Aguilar Galarza & Vera Delgado, 2021)	39
Tabla 3.3 Parámetros de biometría (Peso(W, longitud(LT) y factor de condición(K _F)) y hematológicos (Hematocritos(HT), recuento de glóbulos rojos(RBC), volumen corpuscular medio (MCV)) en los juveniles de huayaípe (<i>Seriola rivoliana</i>) expuestos a diferentes concentraciones de amonio no ionizado. Los valores (media \pm desviación estándar) con diferentes letras son diferentes significativamente (Prueba de Tukey, P < 0.05). (Aguilar Galarza & Vera Delgado, 2021).....	41
Tabla 3.4 Lesiones branquiales en las etapas I, II, III y porcentaje de ocurrencia en cada tratamiento de los juveniles de <i>Seriola rivoliana</i> expuestos a diferentes concentraciones de NH ₃ . N=18 peces (Aguilar Galarza & Vera Delgado, 2021).....	42
Tabla 3.5 Síntomas asociados a la toxicidad generada por las diferentes concentraciones de amonio no ionizado (NH ₃) en los juveniles de huayaípe (<i>Seriola rivoliana</i>). (Aguilar Galarza & Vera Delgado, 2021).....	45

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

Muchas especies acuícolas como la carpa, cobia, tilapia, róbalo, salmón, lisa, almejas japonesas, entre otras, tienen un alto valor económico y han logrado establecerse como una importante industria para la generación de divisas y alimentos para el consumo humano. Pero factores adversos como las enfermedades ponen en riesgo su mantenimiento y expansión. Por ejemplo, en Ecuador en 1998 el virus de la mancha blanca (White Spot Syndrome Virus, WSSV) golpeó el sector acuícola generando cuantiosas pérdidas en el sector camaronero. Por ello, se plantean nuevas alternativas de desarrollo a futuro como el cultivo de Huayaipe (*Seriola rivoliana*) gracias a su sabor, su carne blanca (Blacio; Darquea; Rodríguez., 2003), y su precio internacional que lo posiciona como una especie acuícola prometedora para la producción masiva en el campo de la maricultura llegando a alcanzar los USD 15 dólares por kilo.

Por ende, para el mejor aprovechamiento de esta especie se utiliza sistemas semi-intensivos o intensivos, que debido a la alta densidad larvaria se requiere utilizar alimento balanceado para soportar la biomasa (intensiva), la cual permite determinar la cantidad de alimento, tasa de intercambio de agua, evaluación de los estanques, y a su vez decidir si pueden o no ser cosechados (CHIM, 1989).

Además, las especies mantenidas en cautiverio en estos sistemas (semi-intensivo, intensivo) se enfrentan a la acumulación de sustancias químicas que en concentraciones elevadas pueden ser tóxicas como el amoníaco (NH_3). El amoníaco es un subproducto proveniente del catabolismo de aminoácidos, que a menudo es excretado por los peces a través de las branquias (los peces excretan alternativamente amoníaco en forma de urea) (Franklin & Edward, 2019). El nitrógeno amoniacal total (TAN) existe en solución en forma ionizada (NH_4^+) y no ionizada (NH_3). Se ha demostrado que el NH_3 existe en el agua en equilibrio con el NH_4^+ según el pH, la temperatura y la salinidad (Zuffo, Ratke, González, & Steiner, 2021). Los niveles elevados de amonio no ionizado en el ambiente afectan la excreción de amoníaco o provocan una absorción neta de amoníaco del ambiente (Meeren & Mangor-Jensen, 2020). Un gradiente negativo causado por una alta

concentración de amoníaco ambiental hace que se acumule dentro de los tejidos de los peces y cause efectos tóxicos (Franklin & Edward, 2019). Por lo tanto, la determinación de la toxicidad del amoníaco es necesaria para obtener la viabilidad técnica en condiciones de cultivo artificial, especialmente en cultivos semi-intensivos e intensivos, así como en sistemas acuícolas de recirculación (RAS), donde generalmente resultan en la degradación de la calidad del agua por los alimentos no consumidos y los desechos de productos (Peh, Chew, Ching, Loong, & Ip, 2010); (Cobo, Sonnenholzner, Wille, & Sorgeloos, 2014). En acuicultura, la acumulación de amoníaco excretado puede provocar una disminución del crecimiento, una mayor vulnerabilidad a las enfermedades, cambios patológicos en la estructura de las branquias, respuestas fisiológicas y de comportamiento y mortalidad (Wilkie, 1997); (Pedrotti, y otros, 2018); (Zuffo *et al.*, 2021). La toxicidad aguda y crónica del amoníaco ha sido ampliamente revisada para las especies de agua dulce. Sin embargo, existe poca información relacionada con los efectos del amoníaco en los peces marinos (Franklin & Edward, 2019); (Meeren & Mangor-Jensen, 2020). La toxicidad del amoníaco depende de la temperatura, el pH, la salinidad, la edad y la especie de los organismos (Lemarié, y otros, 2004)

1.1 Descripción del problema

El amoníaco es un subproducto nitrogenado del catabolismo de aminoácidos que a menudo excretan los peces a través de las membranas branquiales, por ello la determinación de su toxicidad es necesaria para obtener las condiciones óptimas de cultivo y evitar situaciones de estrés que afecten el rendimiento productivo y ocasionen pérdidas económicas, especialmente en cultivos semi-intensivos e intensivos y sistemas de recirculación en acuicultura (RAS) donde los compuestos nitrogenados tienden a acumularse y llegar a concentraciones tóxicas. Los peces sometidos a altas concentraciones de amoníaco reflejan alteraciones a nivel fisiológico, estructural y de comportamiento, así por ejemplo, se ha observado que en concentraciones letales y subletales de amoníaco, los peces pueden presentar natación errática, desorientación, convulsiones, daños a nivel tisular especialmente en branquias e hígado, desintegración de mucosas, hiperplasia branquial, hemorragias, poco crecimiento, inanición, entre otros síntomas provocando inclusive la muerte.

La información existente sobre los niveles de toxicidad del amoniaco en peces marinos de interés comercial es escasa, y para el caso del Huayaipe es inexistente.

1.2 Justificación del problema

La creciente demanda de productos pesqueros orienta hacia la intensificación de los cultivos y la utilización de sistemas de RAS, y como un efecto posible es la acumulación de los productos tóxicos como resultado del catabolismo de las proteínas y la degradación de calidad del agua debido a los alimentos no consumidos por los peces y los productos de desechos. Así por ejemplo, en la lubina (*Dicentrarchus labrax*) niveles entre 0,90 y 0,88 mg/L NH₃ produce la mortalidad entre 28.9 % y 48.6% respectivamente. Además, concentraciones subletales de amoníaco generan pérdida de peso o un periodo transitorio de estancamiento del crecimiento desde el inicio de la exposición (Lemarié, y otros, 2004). Así mismo, existen especies más sensibles como la dorada (*Sparus aurata*) donde se reportaron daños en el riñón, limitación de crecimiento, supervivencia y mortalidad (50%) cuando los niveles de amonio alcanzaron los 35-40 mg/L N-NH₄⁺ (Person-LeRuyet, Chartois, & Quemener., 1995).

Con estos problemas como antecedentes, se debe determinar las concentraciones letales y los síntomas asociados de amonio no ionizado (NH₃) que podrían causar mortalidad en juveniles de Huayaipe (*Seriola rivoliana*) como especie importante para la diversificación acuícola ecuatoriana (Figura 1.1), así como diseñar un plan piloto que permita tener un registro de cómo actuar cuando se llegue a estos niveles y mitigar los síntomas asociados asegurando de esta manera el mejoramiento de las condiciones de cultivo. (Sinha, Shrivastava, Romano, & De Boeck, 2019).

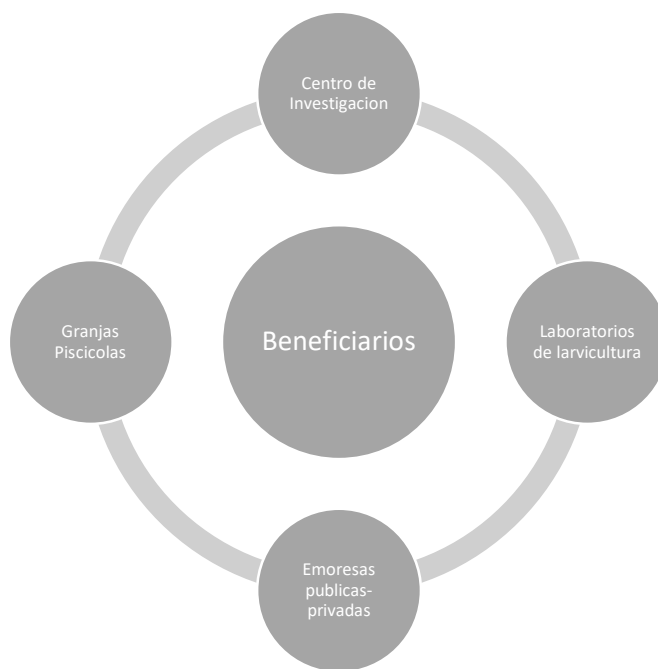


Figura 1.1 Beneficiarios del presente proyecto(Aguilar Galarza & Vera Delgado, 2021)

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

- Determinar los niveles tóxicos de amonio no ionizado y sus síntomas asociados en el cultivo de juveniles de Huayaípe (*Seriola rivoliana*).

1.3.2 Objetivos Específicos

- Determinar el tiempo y supervivencia de los juveniles de Huayaípe (*Seriola rivoliana*) bajo diferentes concentraciones de amoniaco no ionizado.
- Identificar los principales síntomas dentro del rango de tolerancia que genera el amoniaco antes que se vea afectada la supervivencia de la especie.
- Realizar un metaanálisis para establecer las formas de reducir y controlar niveles altos de amonio no ionizado en los cultivos de juveniles de Huayaípe (*Seriola rivoliana*).

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Biología de la especie y distribución geográfica



Figura 1.2 Distribución geográfica mundial de *Seriola Rivoliana* (Froese & Pauly, 2010)

La especie de pez Huayaipe (*Seriola rivoliana*) es un pez pelágico, epibentónico marino y demersal que se encuentra en aguas abiertas cerca de la superficie, a temperaturas entre 18°C y 29°C (Vaniz, Kaufman, & Glowacki, 1995) y a profundidades de 50 metros aproximadamente. (Tabla 1.1)

Tabla 1.1 Biología de la especie *Seriola rivoliana* (Viader, 2019)

Biología de la especie	
Rango de temperatura	Entre los 18 y 29 °C, por debajo de los 15 °C su crecimiento disminuye, e inferior a 9 °C y superior a 31°C estos peces mueren.
Alimentación	Se alimenta de organismos planctónicos durante su fase de larvicultura y luego en su fase juvenil y adulta de Moluscos, crustáceos, equinodermos, peces pequeños. En cautiverio durante la fase de juvenil se alimenta con balanceado.
Origen y distribución geográfica	Se encuentra a lo largo de las zonas subtropicales de los océanos Índico, Atlántico oeste y Pacífico desde los 43 °N – 38 °S; y 180 °W- 180 °E (Froese y Pauly, 2010). Esta distribuida desde Kenia y Sudáfrica hasta las Islas Marianas, las Islas Ryukyu, Nueva Caledonia y desde los Estados Unidos hasta el Perú , incluyendo las Islas Galápagos.
Reproducción	Ovípara con fertilización externa.
Rango de salinidad	Rango de tolerancia entre los 16 ppm a 33 ppm
Morfología	Cuerpo robusto, fusiforme y casi comprimido lateralmente, protegido por escamas pequeñas, color aceitunado en dorso, los flancos más claros y vientre blanquecino a plateado . Cabeza con un perfil dorsal curvado, hocico redondeado, boca grande con dientes pequeños, numerosos y presentados en bandas en mandíbulas, los platinos, vómer y lengua.
Hábitat	Demersal y pelágico, principalmente oceánico.
Etapas de crecimiento	Huevo, larva, juvenil y adulto.
Genero	<i>Seriola</i>
Especie	<i>revoliana</i>

1.4.2 Características de la especie

En Ecuador existen especies del género *Seriola*, con la denominación común de huayaibe: *Seriola mazatlana*, *Seriola rivoliana*, *Seriola lalandi*, *Seriola peruana* (Blacio & Alvarez, 2002). El pez Huayaibe (*Seriola rivoliana*) es un pez marino que pertenece a la familia Carangidae, orden Perciformes (Blacio & Alvarez, 2002), con cuerpo alargado, moderadamente alto y levemente comprimido con una franja vertical oscura en la nuca y dorso marrón, teleósteo carnívoro pelágico, en cautiverio sigue el orden de cardumen el cual es un patrón típico de los carangídeos.



Figura 1.3 Pez Huayaibe. (Aguilar Galarza & Vera Delgado, 2021)

1.4.3 Calidad del agua relacionado al cultivo

Varias investigaciones han sugerido criterios para calidad de agua en relación con la carga de nutrientes, límites de nitrógeno y fósforo total, para prevenir la eutrofización en regiones templadas (Dodds, Jones, & Welch, 1998). De este modo, para reducir o mitigar la toxicidad de compuestos nitrogenados varios autores (Howarth, y otros, 2006); (Camargo, J.A.; Alonso., A., 2007) recomiendan que las concentraciones deben encontrarse en rangos entre 0,005 y 0,35 mg/L NH_3 -N en exposiciones de muy corta duración, mientras que para exposiciones de larga duración se recomienda concentraciones entre 0,004 y 0,02 mg/L NH_3 -N como máximo limitante para proteger

las especies que son menos tolerantes al amoníaco. Así mismo, para concentraciones de nitrato (Camargo, 2006), proponen niveles de 2 mg/L NO₃-N como un valor máximo para prevenir eutrofización y acidificación en todos los ecosistemas acuáticos (Camargo, J.A.; Alonso., A., 2007).

1.4.4 Compuestos nitrogenados

Los compuestos nitrogenados son de vital importancia en la piscicultura industrial, dado que compuestos como el amoníaco (NH₃) y nitrito (NO₂⁻) aún en concentraciones bajas son letales y/o tóxicos y los medios acuáticos están expuestos a la toxicidad de estos compuestos, y a altas concentraciones producen alteraciones fisiológicas, reducen la capacidad de crecer, reproducirse y sobrevivir en estos medios. (Camargo, J.A.; Alonso., A., 2007)

El amoníaco es un contaminante acuático y un producto final del metabolismo del nitrógeno que ocurre principalmente en el hígado, debido a la desanimación hepática de los aminoácidos de la dieta, la actividad enzimática de la flora gastrointestinal y actividades metabólicas de los tejidos nerviosos y musculares (Sperry, Belnap, & Evans, 2006). Este se excreta a través de las branquias por difusión pasiva como amoníaco no ionizado o por transporte activo como amonio a cambio de sodio. El amoníaco representa problemas serios en piscicultura, especialmente en los sistemas de recirculación, estanques y acuarios de peces (Peh, Chew, Ching, Loong, & Ip, 2010).

Para especies de agua dulce, la toxicidad aguda y crónica del amoníaco es un problema importante, sin embargo; la información es relativamente escasa en especies de peces marinos (Lemarié, y otros, 2004).

1.4.4.1 Ciclo del Nitrógeno

En el ciclo del nitrógeno intervienen compuestos nitrogenados tales como el amoníaco, nitrito y nitrato que tienen origen en los estanques de cultivo y son liberados durante la disgregación que realizan las bacterias sobre la materia orgánica vegetal o animal (Figura 1.4). Los desechos nitrogenados se deben a la acción de bacterias aeróbicas como *Nitrosomas*, que son las responsables de convertir amonio

a nitrito ($NH_3 \rightarrow NO_2$), mientras que las *Nitrobacter* continúan con la oxidación del nitrito a nitrato ($NO_2 + \frac{1}{2} O_2 \rightarrow NO_3$) (Rodríguez & Anzola, S.F.). Por otro lado, algunas bacterias pueden convertir los nitratos a nitritos el cual sale del agua como gas disuelto. La desnitrificación de nitratos (NO_3) a nitrógeno se lleva a cabo por diferentes bacterias, éstas pueden ser *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium* y *Achromobacter*.

El amoníaco se presenta en el agua bajo dos formas: ion amonio (NH_4^+) el cual no es tóxico siempre que la concentración no sea demasiado alta, y el amoníaco no ionizado (NH_3) que es tóxico. Por ejemplo, el rango de niveles de toxicidad para el amonio en la tilapia (*Oreochromis* sp.) en exposiciones de corta duración por lo general está entre 0.6 y 2 mg/L, y los efectos subletales entre 0.1 y 0.3 mg/L.

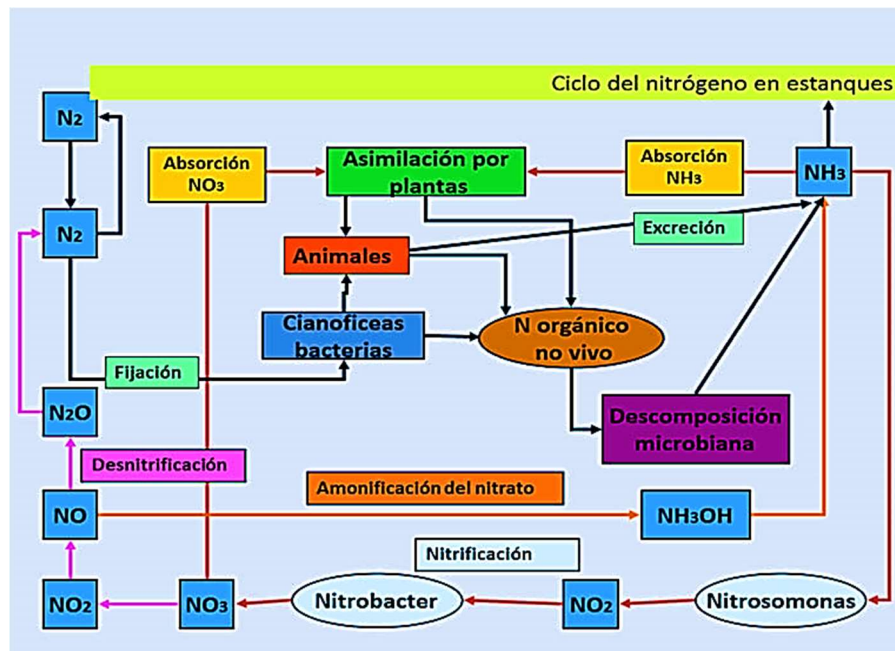


Figura 1.4 Ciclo del nitrógeno en un estanque (Balnova, 2014)

1.4.4.2 Amoníaco

El Amoníaco está presente en ambientes acuáticos y terrestres, los animales y plantas excretan amoníaco, el cual se produce por la descomposición de organismos y actividad de los microorganismos (Prosser & Embley, 2002). La

exposición al amoníaco terrestre es un problema menor en comparación con el medio acuático, dado que el amoníaco se volatiliza continuamente desde la superficie de la tierra y entra a la atmósfera donde es destruido por reacciones fitolíticas.

A través del equilibrio químico $NH_4^+ + OH^- \Leftrightarrow NH_3 * H_2O \mapsto NH_3 + H_2O$ el amoníaco ionizado (NH_4^+) y el no ionizado (NH_3) se encuentran relacionados, y las concentraciones dependen del pH y temperatura del agua (Russo, 1985). Si el pH y temperatura se incrementan, el NH_4^+ disminuye, pero el NH_3 aumenta. (Camargo, J.A.; Alonso., A., 2007)

Según (Camargo, J.A.; Alonso., A., 2007); el NH_3 es letal para los peces o especies acuáticas (tabla 1.2), esto puede ser debido a la destrucción del epitelio branquial, estimulación de la glucólisis y supresión del ciclo de Krebs, inhibición de la producción de ATP y reducción de sus niveles, alteración de la actividad osmorreguladora y disminución del sistema inmunológico (Camargo J. y., 2006).

Tabla 1. 1 Parámetros de Toxicidad del amoniaco para especies sensibles. Los valores en la columna de parámetros de concentración letal (CL) y los efectos observados de la concentración más baja (LOEC, siglas en inglés) CL_{50} , $CL_{0,01}$ y $LOEC$ se expresan en mg NH_3 -N/l (adaptado de Camargo y Alonso, 2006)

Especies	Parámetros
<i>Villosa iris</i> (molusco; juveniles)	0,11 (96 h CL_{50})
<i>Lampsilis cardium</i> (molusco; juveniles)	0,15 (96 h CL_{50})
<i>Lampsilis fasciola</i> (molusco; juveniles)	0,26 (96 h CL_{50})
<i>Polycelis felina</i> (planaria; adultos)	0,39 (96 h CL_{50}) 0,05 (30 d LOEC)
<i>Sphaerium novaezelandiae</i> (molusco; juveniles)	0,49 (96 h CL_{50}) 0,05 (60 d LOEC)
<i>Polycelis tenuis</i> (planaria; adultos)	0,58 (96 h CL_{50})
<i>Eulimnogammarus toletanus</i> (anfípodo; adultos)	0,65 (96 h CL_{50}) 0,09 (96 h $CL_{0,01}$)
<i>Oncorhynchus gorbuscha</i> (salmónido; alevines)	0,08 (96 h CL_{50})
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (salmónido; alevines)	0,16-0,37 (96 h CL_{50}) 0,05 (72 d CL_{50})
<i>Salmo salar</i> (salmónido; alevines)	0,23 (24 h CL_{50})
<i>Perca fluviatilis</i> (pércido; alevines)	0,29 (96 h CL_{50})
<i>Rutilus rutilus</i> (ciprínido; alevines)	0,35 (96 h CL_{50})

1.4.4.3 Factores que incrementan la concentración de compuestos nitrogenados

Se pueden considerar algunos factores como: excreción de desechos de la propia especie y su posterior acumulación en la base de los estanques (sedimentos), alimento sobrante o pérdidas de nutrientes por la mala calidad del alimento, variaciones estacionales de temperatura y pH (tabla 1.3) (Dong-Jin, Dong-ig, & Keller, 2006).

Tabla 1.2 Porcentaje de NH₃ (amoníaco) a diferentes valores de pH y temperatura. (Emerson, Russo, Lund, & Thurston, 1975)

Temperatura oC	pH				
	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5
16	0.1	0.3	0.9	2.9	8.5
18	0.1	0.3	1.1	3.3	9.8
20	0.1	0.4	1.2	3.8	11.2
22	0.2	0.5	1.4	4.4	2.7
24	0.2	0.5	1.7	5.0	14.4
26	0.2	0.6	1.9	5.8	16.2
28	0.2	0.7	2.2	6.6	18.2
30	0.3	0.8	2.5	7.5	20.3

1.4.4.4 ¿Cómo medir el Amonio?

Entre el 70 y 90% del NH₄⁺ entra en contacto con el agua y atrapa protones (H⁺) quedando libres y se convierten en amonio. Los métodos de indofenol o de Nessler se emplean en la mayoría de las pruebas comerciales para la medición de nitrógeno en los estanques, se realizan bajo condiciones extremadamente alcalinas, es decir, en ausencia de protones. De esta forma todo el amonio (NH₄) que existe en el agua se convierte en amoníaco NH₃ para luego ser medido mediante un reactivo que colorea el NH₃ (Figura 1.5), tanto el que ya se encontraba presente en el agua, como el que se convirtió a amoníaco al subir el pH; de esta forma, se obtiene la

concentración TAN (nitrógeno amoniacal total, por sus siglas en inglés) (Nicovita, 1987).



Figura 1.5 Medición de TAN amonio y amoniaco en biofloc. Imagen de Bioquafloc ©, todos los derechos reservados.

Para calcular el porcentaje de amonio y amoniaco que hay en el agua se requiere conocer el valor de TAN, temperatura y pH del agua. Para ellos se emplea una tabla de cálculos de equilibrio del amoníaco en agua (Tabla 1.4) y así conocer que porcentaje de amoniaco a cierta temperatura y pH concreto.

Por ejemplo: Si se tiene un valor de pH de 7.8 y 28°C el porcentaje de NH_3 del TAN para esas condiciones es de 4.23%. Ahora, si el valor de TAN es 1mg/L, con ese pH y temperatura se tendría 0.0423 mg de amoniaco/L o amonio no ionizado y 0.957 mg de NH_4^+ (BIOAQUAFLOC, 2021).

Tabla 1.3 Tabla de cálculos de equilibrio del amoníaco en agua: Efecto del pH y la temperatura. (Journal of the Fisheries Board of Canada, Emerson et al. 1975).

pH	Temperature (°C)														
	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32
7.0	0.11	0.13	0.16	0.18	0.22	0.25	0.29	0.34	0.39	0.46	0.52	0.60	0.69	0.80	0.91
7.2	0.18	0.21	0.25	0.29	0.34	0.40	0.46	0.54	0.62	0.82	0.83	0.96	1.10	1.26	1.44
7.4	0.29	0.34	0.40	0.46	0.54	0.63	0.73	0.85	0.98	1.14	1.31	1.50	1.73	1.98	2.26
7.6	0.45	0.53	0.63	0.73	0.86	1.00	1.16	1.34	1.55	1.79	2.06	2.36	2.71	3.10	3.53
7.8	0.72	0.84	0.99	1.16	1.35	1.57	1.82	2.11	2.44	2.81	3.22	3.70	4.23	4.82	5.48
8.0	1.13	1.33	1.56	1.82	2.12	2.47	2.86	3.30	3.81	4.38	5.02	5.74	6.54	7.43	8.42
8.2	1.79	2.10	2.45	2.86	3.32	3.85	4.45	5.14	5.90	6.76	7.72	8.80	9.98	11.29	12.72
8.4	2.80	3.28	3.83	4.45	5.17	5.97	6.88	7.90	9.04	10.31	11.71	13.26	14.95	16.78	18.77
8.6	4.37	5.10	5.93	6.88	7.95	9.14	10.48	11.97	13.61	15.41	17.37	19.50	21.78	24.22	26.80
8.8	6.75	7.85	9.09	10.48	12.04	13.76	15.66	17.73	19.98	22.41	25.00	27.74	30.62	33.62	36.72
9.0	10.30	11.90	13.68	15.65	17.82	20.18	22.73	25.46	28.36	31.40	34.56	37.83	41.16	44.53	47.91
9.2	15.39	17.63	20.08	22.73	25.58	28.61	31.80	35.12	38.55	42.04	45.57	49.09	52.58	55.99	59.31
9.4	22.38	25.33	28.47	31.80	35.26	38.84	42.49	46.18	49.85	53.48	57.02	60.45	63.73	66.85	69.79
9.6	31.36	34.96	38.38	42.49	46.33	50.16	53.94	57.62	61.17	64.56	67.77	70.78	73.58	76.17	78.55
9.8	42.00	46.00	50.00	53.94	57.78	61.47	64.99	68.31	71.40	74.28	76.92	79.33	81.53	83.51	85.30
10.0	53.44	57.45	61.31	64.98	68.44	71.66	74.63	77.35	79.83	82.07	84.08	85.88	87.49	88.92	90.19
10.2	64.53	68.15	71.52	74.63	77.46	80.03	82.34	84.41	86.25	87.88	89.33	90.60	91.73	92.71	93.58

1.4.4.5 Intensificación de los cultivos

Básicamente se emplea para fines comerciales, se requiere de estanques técnicamente aprobados para aplicar mayor tecnología basado en los recambios continuos de agua y/o aireación, además de contar con salida y entrada de agua. En este tipo de piscicultura se destaca el sistema de recirculación en acuicultura (RAS) debe suministrar el alimento concentrado con niveles mayores de proteína de manera permanente y programar la densidad de siembra de acuerdo al grado de explotación y especie (Sal, 2020).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1 Descripción del lugar

El ensayo experimental fue realizado dentro de las instalaciones del laboratorio de Maduración y la sala experimental #4 en CENAIM (Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas “Edgar Arellano”), ubicado en la comuna San Pedro, Manglaralto, Santa Elena, Ecuador.

2.2 Información disponible sobre el límite de tolerancia del amonio no ionizado en juveniles de huayaibe

La investigación se orientó en los estudios previos sobre otras especies de peces ya sea mediante la experimentación utilizada o el límite alcanzado durante las pruebas de toxicidad, toda la información recolectada fue sintetizada en una tabla informativa donde se describieron cuáles son los niveles de amonio no ionizado que soportan estas especies y sus estados de desarrollo. Se logró recabar información de treinta y nueve ensayos técnicos, y se determinó el método para poder identificar el límite de amoniaco tolerado por los juveniles de Huayaibe y los síntomas asociados a estos niveles. (Pedrotti, et al., 2018)

2.3 Animales utilizados

2.3.1 Larvicultura

Las juveniles de huayaibe (50 DPE(días post-eclosión)) con un peso promedio de 4.8 ± 0.5 g empleados en el ensayo fueron obtenidos a través del protocolo de larvicultura del CENAIM, las larvas fueron alimentadas con rotíferos durante sus primeros días, luego con nauplios de artemia y metanauplios de artemia hasta el día 18 - 21 (dependiendo de la temperatura). La deshabitación al alimento vivo “weaning” se realizó utilizando la co-alimentación a partir del día 21 hasta el día 27. Se utilizó

balanceado de 500 micras con una proteína mínima de 45% (NICOVITA ®), a una frecuencia de cada hora desde las 6h00 hasta las 18h00.

2.4 Transferencia y aclimatación

Los animales utilizados fueron puestos en inanición durante al menos 15 horas antes de iniciar el ensayo. Los peces fueron transferidos a los tanques de experimentación mediante el uso de redes para acuarios siendo colocados alrededor de 10 animales en baldes con agua salada y llevados a la sala experimental #4 para ser pesados y sembrados directamente en los tanques. Se utilizaron 8 peces por tanque experimental. Se descartaron los peces que presentaban deformidades (boca abierta, boca incapaz de cerrar, aleta dorsal deforme).

2.5 Diseño experimental y pruebas de toxicidad

2.5.1 Unidades observacionales

En el ensayo se utilizaron 18 tanques de fibra de vidrio cada uno de 50 litros (Figura 2.1). Se utilizó un sistema experimental semiestático con una sola renovación de agua y adición de cloruro de amonio cada 24 horas para poder mantener las mismas concentraciones de TAN en los tanques. El primer día se realizaron monitoreos de parámetros (pH, oxígeno disuelto, salinidad y temperatura) cada 3 horas, a partir del segundo día fueron cada 12 horas y el monitoreo visual de supervivencia y estado de salud de los peces fue realizado durante todo el ensayo cada 3 horas. La variabilidad de la concentración de TAN se comprobó tomando muestras por triplicado cada 24 horas. La concentración de NH_3 se determinó con base en los valores de TAN, pH, salinidad y temperatura del agua según (Whitfield, 1974).

Los juveniles de Huayaipe se mantuvieron en inanición durante todo el experimento, con fotoperiodo de 12 h Luz: 12 h oscuridad, con un salinidad de alrededor de 31 ± 2 ppt y temperatura de 24°C .



Figura 2.1 Sistema experimental ubicado en la sala experimental #4 en las instalaciones del CENAIM. (Aguilar Galarza & Vera Delgado, 2021)

2.5.2 Descripción del control del sistema

Para el estudio se utilizaron sistemas de aireación funcional con una maquina Blower conectada a la energía eléctrica, se dispuso de mangueras y piedras difusoras en cada tanque, también se colocaron tubos centrales para que el agua de estos no se vea reducida. Los parámetros como el oxígeno disuelto, la temperatura y el porcentaje de saturación de oxígeno fueron tomados con un equipo multiparámetro EcoSense DO200A (YSI Incorporated, Yellow Spring, OH, USA), la salinidad fue tomada con un refractómetro (Vital Sine™ SR6, Pentair Aquatic Eco Systems, Inc., Apopka, FL, USA) y el pH fue tomado utilizando un pH metro pH55 meter (Milwaukee Instrument, Rocky Mount, NC, USA).

Los parámetros como el pH y la salinidad se tomaron luego de limpiar el equipo con agua dulce después de medir cada control, para evitar lecturas erróneas.

2.5.3 Prueba de toxicidad

La evaluación del efecto del amoníaco sobre el estado de salud y supervivencia de los peces se realizó mediante una prueba de concentración letal a la que el 50% de los organismos muere después de 96 h de exposición (LC₅₀). Se utilizaron 5 concentraciones de amoníaco y un control (0.0 mg/L) que fueron distribuidos al azar (Tabla 2.1), cada uno con 3 réplicas. Las concentraciones nominales y reales de TAN y amoníaco se muestran en la tabla 5.

Las soluciones de prueba de amoníaco se prepararon disolviendo 100,000 mg/L de cloruro de amonio (NH₄Cl; VWR Chemicals, Solon, OH, EE. UU.) en 1L de agua destilada (Zuffo, et al., 2021) como solución madre y luego diluyéndola a la concentración deseada.

Tabla 2.1 Nitrógeno amoniacal total (TAN) y niveles de NH₃ en el experimento de exposición. (Aguilar Galarza & Vera Delgado, 2021)

TAN mg/L Nominal	0.00	10.00	18.00	32.00	56.00	100.00
TAN mg/L Medido	0.00	12.78±0.26	22.82±0.2.37	35.00±3.55	66.73±2.25	103.40±1.56
NH ₃ mg/L Calculado	0.00	0.55±0.03	0.94±0.01	1.18±0.04	1.72±0.16	1.97±0.04

2.5.4 Supervivencia

Los peces se observaron externamente cada 3 horas para determinar la mortalidad y el comportamiento de natación, como natación errática, comportamiento letárgico y pérdida de equilibrio. Los juveniles sin movimiento opercular y sin respuesta a estímulos mecánicos fueron considerados muertos y retirados de los tanques. La supervivencia fue estimada como:

$$\% \text{ Supervivencia} = \frac{\# \text{ inicial de peces} - \# \text{ final de peces}}{\# \text{ inicial de peces}} \times 100 \quad (2.1)$$

2.6 Análisis de sangre e histología

Luego de las 96 horas del ensayo experimental, los juveniles fueron anestesiados en una solución de 25 ppm de Eugenol® para la obtención de sangre directamente del corazón y en algunos casos de la vena caudal que fueron colocadas en tubos con EDTA para evitar la coagulación.

El recuento total de glóbulos rojos (RBC) y el valor del hematocrito (Ht) se determinaron inmediatamente después de tomada la muestra de sangre. Los glóbulos rojos se contaron utilizando un microscopio óptico (OLYMPUS CX 31, Olympus America Inc., Center Valley, PA, EE. UU.) con un hemocitómetro Neubauer mejorado después de la dilución 1:200 con solución de Dacie. La condición del Ht fue determinada por la centrifugación (Centrifuge Sorvall ST 8/R; Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, USA) de la sangre en un tubo capilar a 10.000 g por 10 min (Pedrotti, et al., 2018) y expresada como total porcentaje de volumen. El volumen corpuscular medio (MCV) se calculó mediante la siguiente formula:

$$\text{MCV (fL)} = \frac{\text{Ht (\%)} \times 10}{\text{RBC (10}^6\text{/}\mu\text{L)}} \quad (2.2)$$

Después de la extracción de sangre, tres juveniles de cada tratamiento fueron sacrificados para la recolección del segundo arco branquial que se fijó en solución de Davidson durante 24 horas y luego se transfirió a una solución de etanol al 70%. Excepto por el tratamiento con mayor concentración de amoníaco (0.94 ± 0.01 , 1.18 ± 0.04 , 1.72 ± 0.16 y 1.97 ± 0.04 mg.L⁻¹), las branquias de los peces fueron removidas inmediatamente después de la muerte del último pez. Una vez fijadas, las muestras se deshidrataron a través de una serie de solución de etanol, seguida de xileno antes de incluirlas en parafina. Las secciones de micrótomos (4 µm de espesor) se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Los portaobjetos se examinaron bajo un microscopio óptico (OLYMPUS CX31) equipado con una cámara (LANOPTIK MDX503, Lanoptik Technologies, China). Los cambios histopatológicos se analizaron de manera semicuantitativa, utilizando el método del grado de cambio tisular (*I value*) descrito por (Poleksić & Mitrović-Tutundžić, 1994) con tres etapas según la gravedad de cada lesión;

etapa I (no afecta el funcionamiento del órgano), etapa II (la función del tejido esta alterada moderada y parcialmente) y etapa III (la función del tejido sufrió una alteración muy grave e irreversible). El grado de cambios en una sola branquia (*I value*) fue calculado usando la formula:

$$I \text{ Value} = 1 \times \Sigma I + 10 \times \Sigma II + 100 \times \Sigma III \text{ (2.3)}$$

Donde, I, II, III corresponden al número de tipo de lesiones dentro de cada uno de las tres etapas.

La escala de los *valores I* y los efectos asociados es la siguiente: branquias funcionalmente normales (0-10%); branquias ligeramente a moderadamente dañadas (11-20%); branquias moderadamente a severamente dañadas (21-50%) y branquias irreparablemente dañadas (>100%). (Poleksić & Mitrović-Tutundžić, 1994)

Finalmente, se tomaron muestras de cada pez para determinar la longitud total (LT) y peso (peso corporal, BW) con una precisión de 1 g utilizando la báscula SP2001 (Scout™ Pro, OHAUS Corporation, Parsippany, NJ, EE. UU.) para calcular el factor de condición (KF) de la siguiente manera:

$$K_F \text{ (g.cm}^{-3}\text{)} = 100 \times \frac{BW}{LT^3} \text{ (2.4)}$$

2.7 Análisis estadísticos

Las concentraciones letales (LC50, concentración a la que muere el 50% de los peces) de NH₃ y su intervalo de confianza (95%) se estimaron a las 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 h utilizando el método de transformación probit (Finney, 1971) y análisis de regresión. El análisis estadístico de este estudio se realizó con XLSTAT® 2016.5 (Addinsoft, París, Francia). La normalidad y la homogeneidad de la varianza de los datos se verificaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y Bartlett. Si se detectaba la falta de homogeneidad de las varianzas (p. ej., KF), los valores se transformaban usando $y=1/x$ para cumplir con los supuestos de las pruebas paramétricas. Los datos se compararon mediante el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de la prueba de diferencia significativa honestamente de Tukey (nivel de significancia $P < 0,05$). Todos los datos se expresan como media \pm desviación estándar

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Parámetros de calidad de agua

Los parámetros de calidad de agua durante el experimento se muestran en la tabla 3.1.

Tabla 3.1 Parámetros de calidad de agua tomados en las diferentes concentraciones de Amonio no ionizado. Los valores ($\sigma \pm s$) indican la media y desviación estándar de los valores. (Aguilar Galarza & Vera Delgado, 2021)

NH₃ <i>mg/L</i>	T °C	Salinidad <i>g/L</i>	Oxígeno Disuelto <i>mg/L</i>	pH	Alcalinidad <i>mg/L CaCO₃</i>
0.00	24.7±0.0	32±1	5.25±0.09	8.0±0.1	91.54±2.87
0.55	24.7±0.0	32±1	5.63±0.10	8.0±0.0	88.41±7.53
0.94	24.7±0.1	33±1	5.47±0.16	8.0±0.0	93.42±2.87
1.18	24.7±0.0	33±1	5.61±0.08	8.0±0.0	92.80±2.17
1.72	24.7±0.0	32±1	5.53±0.14	7.9±0.0	94.05±4.97
1.97	24.6±0.1	33±1	5.69±0.14	7.8±0.1	90.92±3.91

En la tabla 3.1 se puede observar que no existieron diferencias estadísticas en los parámetros de calidad de agua entre ninguno de los tratamientos versus el control, lo que indica que la mortalidad registrada no fue causada por variaciones en los parámetros de cultivo sino por efecto de la prueba de toxicidad del amoniaco.

3.2 Mortalidad

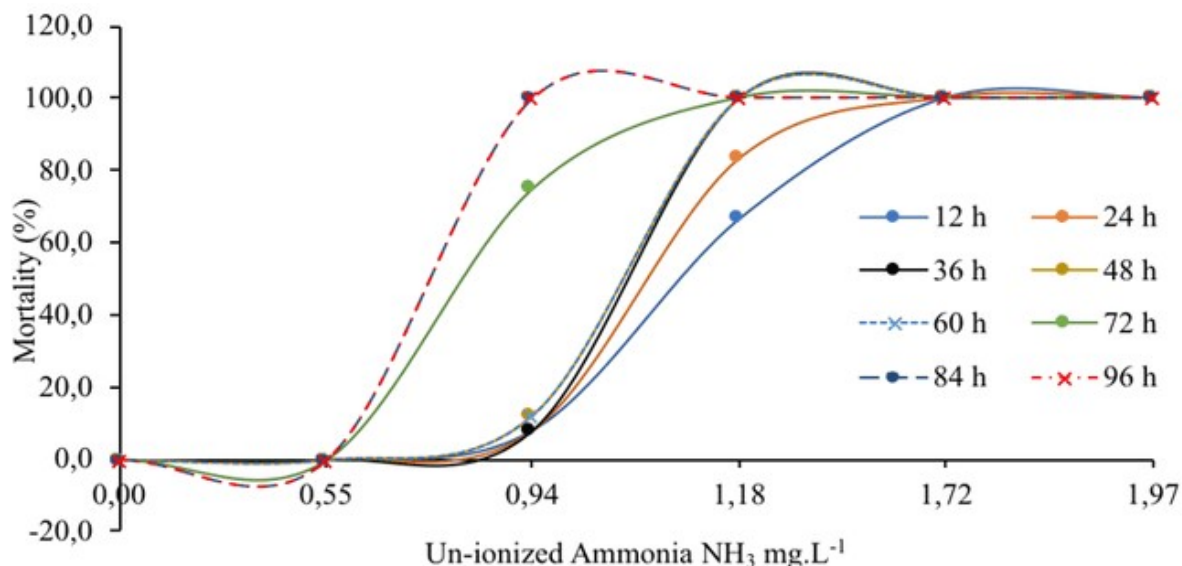


Figura 3.1 Mortalidad acumulada (%) de los juveniles de huayaibe (*Seriola rivoliana*) con relación al tiempo de exposición a diferentes concentraciones de NH₃. (Aguilar Galarza & Vera Delgado, 2021)

Los tratamientos control y 0.55 mg/L registraron el 100% de supervivencia luego de 96 h de experimentación (Figura 3.1). En los tratamientos con las concentraciones de NH₃ más altas 1.72 y 1.97 mg/L NH₃ se observó mortalidad total incluso antes de las 12 primeras horas de exposición, lo que indica que dichas concentraciones no solo son peligrosas para el cultivo de juveniles de Huayaibe si no que son irreversibles. También se puede observar una mortalidad creciente en el tratamiento de 0.94 mg/L donde se tuvo que esperar hasta las 72 horas de comenzado el ensayo para que la totalidad de animales asociada a dicho tratamiento haya muerto. En el tratamiento de 1.18 mg/L se registró el 100% de mortalidad a las 36 horas de haber iniciado la prueba.

3.3 Prueba de toxicidad LC₅₀

Tabla 3.2 Concentraciones letales (LC 50) de amoniaco y TAN a diferentes tiempos de exposición. (Aguilar Galarza & Vera Delgado, 2021)

Tiempo (h)	Modelo	LC50		Límite superior		Límite inferior	
		NH ₃ (mg/L)	TAN (mg/L)	NH ₃ (mg/L)	TAN (mg/L)	NH ₃ (mg/L)	TAN (mg/L)
12	PROBIT	0.99	30.58	1.04	32.11	0.94	29.05
24	PROBIT	0.95	29.15	1.00	30.61	0.90	27.69
36	PROBIT	0.80	24.11	0.84	25.32	0.76	22.90
48	PROBIT	0.78	23.56	0.82	24.74	0.74	22.38
60	PROBIT	0.78	23.56	0.82	24.74	0.74	22.38
72	PROBIT	0.69	20.34	0.72	21.36	0.65	19.32
84	PROBIT	0.58	16.76	0.61	17.59	0.55	15.92
96	PROBIT	0.58	16.76	0.61	17.59	0.55	15.92

En la tabla 3.2., se pueden observar los diferentes resultados de la prueba LC₅₀ (es la concentración en la cual se murieron el 50% de los peces en cada tratamiento), después de 96 h de exposición a las diferentes concentraciones aplicadas de TAN. Cabe mencionar que los resultados de los LC₅₀ fueron obtenidos usando el método de transformación de la función probit (Finney, 1971) y análisis de regresión lineales.

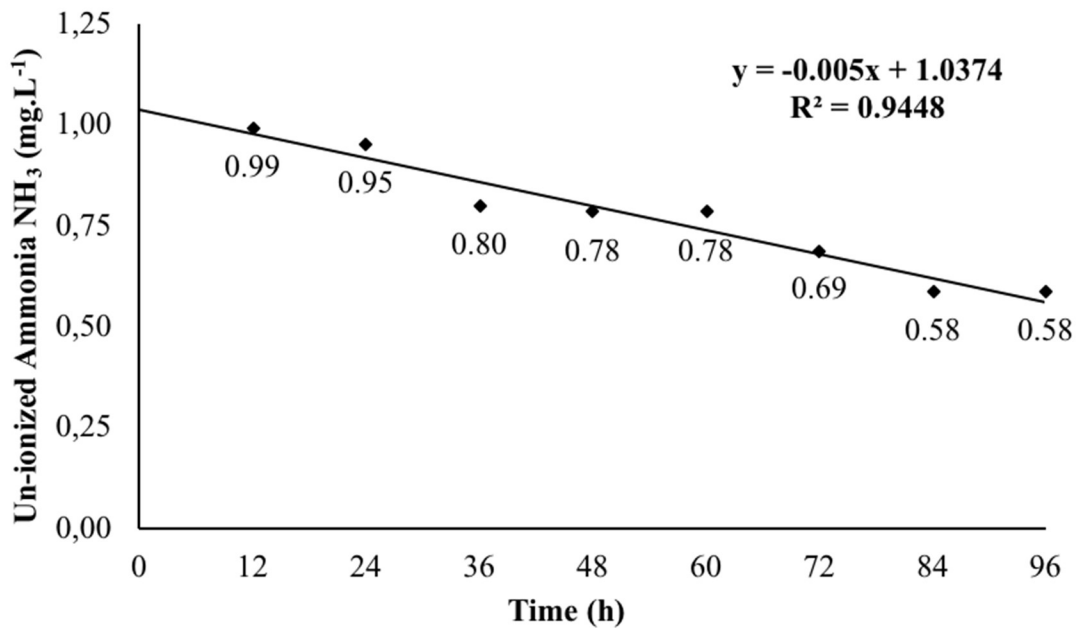


Figura 3.2 Concentración letal media (LC₅₀) de juveniles de huayaibe (*Seriola rivoliana*) en diferentes tiempos de exposición de amonio no ionizado (NH₃). (Aguilar Galarza & Vera Delgado, 2021)

Las concentraciones letales (LC₅₀) en juveniles de huayaibe (*Seriola rivoliana*) mostraron un decrecimiento durante todo el ensayo, ya que a las 12 horas de exposición a NH₃ fue de 0.99 mg/L, a las 24 horas de exposición la concentración letal media fue de 0.95 mg/L, a las 36 horas la concentración letal fue de 0.80 mg/L, a las 48 y 60 horas la concentración letal fue 0.78 mg/L en ambos casos, también observamos que para las 72 horas la concentración letal fue de 0.69 mg/L y que para las 84 y 96 horas de exposición fue de 0.58 mg/L NH₃ (Figura 3.2).

Acorde a Sprague (1971) and Kir & Sunar (2018) un nivel seguro es definido como una cantidad de sustancia tóxica que no tiene efectos adversos en organismos acuáticos, el cual es calculado entre la división del valor LC₅₀ a las 96 horas por un factor de 10. Aquellos niveles de seguridad de NH₃ y de TAN son importantes y se deben considerar para un manejo adecuado de compuestos nitrogenados en producción de sistemas de *Seriola rivoliana*.

3.4 Biometría y parámetros hematológicos

Tabla 3.3 Parámetros de biometría (Peso(W, longitud(LT) y factor de condición(K_F)) y hematológicos (Hematocritos(HT), recuento de glóbulos rojos(RBC), volumen corpuscular medio (MCV)) en los juveniles de huayaípe (*Seriola rivoliana*) expuestos a diferentes concentraciones de amonio no ionizado. Los valores (media ± desviación estándar) con diferentes letras son diferentes significativamente (Prueba de Tukey, *P* < 0.05). (Aguilar Galarza & Vera Delgado, 2021)

NH ₃ mg/L	W g	LT cm	K _F %	Ht %	RBC x10 ⁶ cel.μL	MCV fL
0.00	4.9±0.6 ^{ab}	7.2±0.2	1.32±0.15 ^{ab}	18±5	0.70±0.28	293±134
0.55	5.0±0.3 ^a	6.8±0.4	1.62±0.39 ^a	17±5	0.68±0.27	275±113
0.94	4.3±0.3 ^{ab}	7.2±0.3	1.15±0.07 ^b			
1.18	3.9±0.5 ^b	6.9±0.4	1.21±0.10 ^{ab}			
1.72	4.4±0.2 ^{ab}	7.0±0.1	1.29±0.02 ^{ab}			
1.97	4.4±0.3 ^{ab}	7.0±0.2	1.29±0.02 ^{ab}			

En las pruebas hematológicas (recuentos de eritrocitos o glóbulos rojos, porcentaje de hematocritos y volumen corpuscular medio) realizadas a los juveniles de huayaípe del control (0.00 mg/L) y la concentración de 0.55 mg/L no se encontraron diferencias significativas (Tabla 3.3).

El factor de condición si supuso diferencias significativas en los tratamientos, como se puede observar en la tabla 3.3., que la concentración con 0.55 mg/L NH₃ fue la que obtuvo el K_f más elevado, caso contrario a la concentración con 0.94 mg/L que obtuvo el k_f más bajo de todos los tratamientos. Así mismo, el peso promedio de todos los juveniles de huayaípe utilizados en el ensayo fue de 4.48 g y su longitud promedio alcanzo los 7.02 cm.

Los análisis histológicos de cada etapa (I, II, III) de las branquias se muestran en la tabla 3.4. Las branquias de los peces expuestos revelaron una deformación lamelar caracterizada por la hiperplasia irregular, fusión, telangiectasia y acortamiento de las lamelas secundarias, así como, hemorragias con ruptura del epitelio, engrosamiento y destrucción del epitelio lamelar (Figura 3.3). También tenemos que el acortamiento de las lamelas secundarias y la hemorragia con ruptura del epitelio y del epitelio lamelar mostraron el mas alto incidente en las etapas I (14.8%), etapa II (4.6%) y etapa III (8.3%)

respectivamente. La figura 3.4 muestra el *I value* en cuatro diferentes categorías de cambios tisulares.

Tabla 3.4 Lesiones branquiales en las etapas I, II, III y porcentaje de ocurrencia en cada tratamiento de los juveniles de *Seriola rivoliana* expuestos a diferentes concentraciones de NH₃. N=18 peces (Aguilar Galarza & Vera Delgado, 2021)

Etapa	Lesiones branquiales	NH ₃ (mg/L)					
		0.00	0.55	0.94	1.18	1.72	1.97
I	Hiperplasia irregular y elevación de células epiteliales.	11,1	16,7	0,0	16,7	16,7	16,7
	Acortamiento de lamelas secundarias.	16,7	5,6	16,7	16,7	16,7	16,7
	Fusión de las puntas de las lamelas secundarias.	5,6	5,6	5,6	16,7	16,7	5,6
	Fusión de varias lamelas secundarias.	0,0	11,1	0,0	0,0	5,6	0,0
	Telangiectasia lamelar.	0,0	0,0	0,0	11,1	5,6	11,1
II	Hemorragias con ruptura del epitelio.	0,0	5,6	11,1	0,0	11,1	0,0
	Fusión completa de todas las lamelas secundarias.	0,0	0,0	0,0	0,0	5,6	16,7
III	Tejido cicatricial - engrosamiento lamelar.	0,0	0,0	16,7	16,7	5,6	11,1
	Tejido cicatricial: destrucción del epitelio lamelar	0,0	0,0	0,0	0,0	11,1	16,7

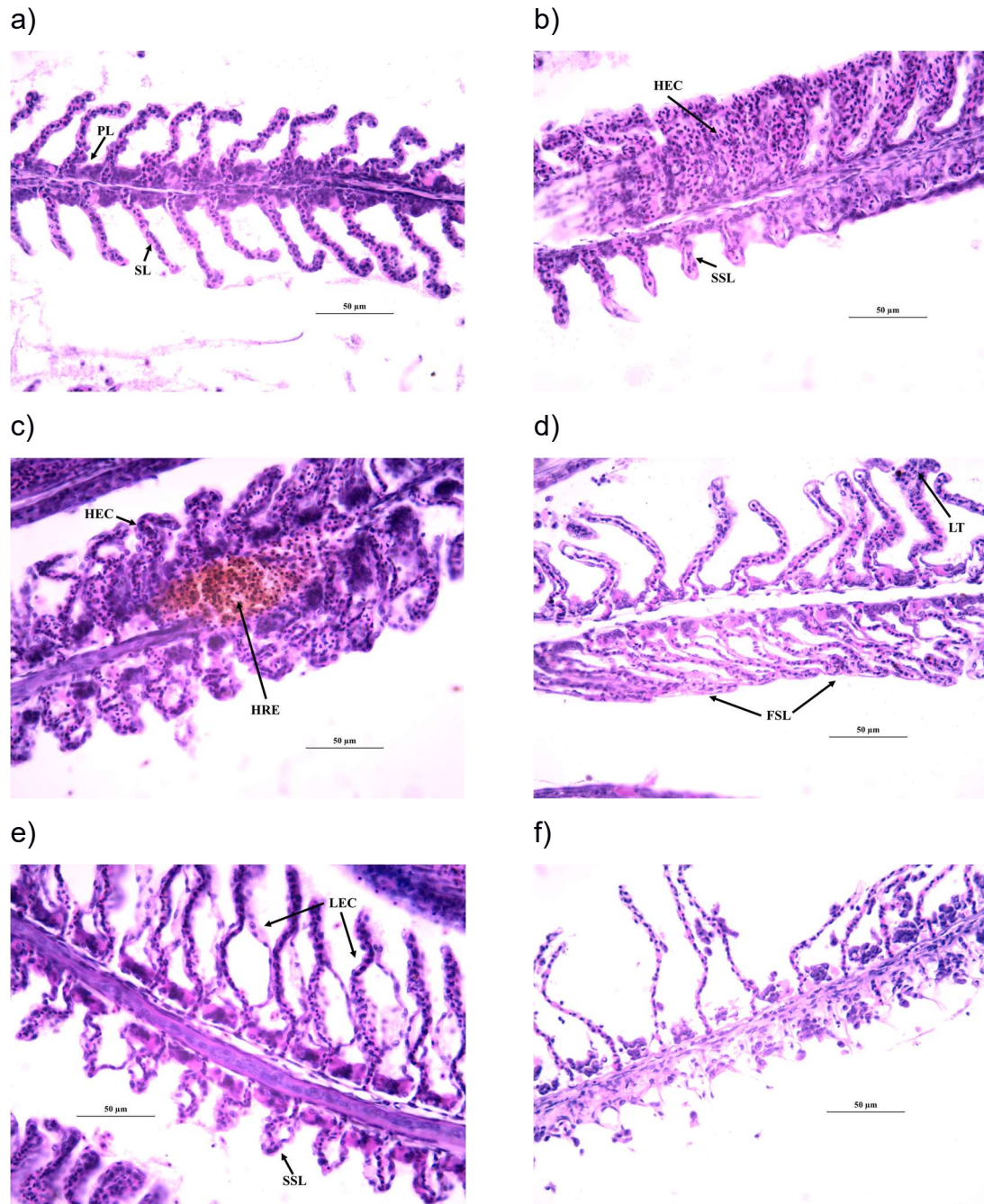


Figura 3.3 Cortes histológicos de branquias de juveniles de *Seriola rivoliana* (400X). a) un control; b-e) alteraciones branquiales de peces expuestos a diferentes concentraciones de NH_3 ; f) destrucción severa del epitelio lamelar (tejido cicatricial). PL lamelas primarias, SL lamelas secundarias, HEC hiperplasia irregular de células epiteliales con relleno de espacios interlaminares, SSL acortamiento de lamelas secundarias, HRE hemorragias con ruptura del epitelio, LT telangiectasias lamelares, FSL fusión de las puntas de las lamelas secundarias, LEC levantamiento de vías respiratorias células epiteliales. (Aguilar Galarza & Vera Delgado, 2021)

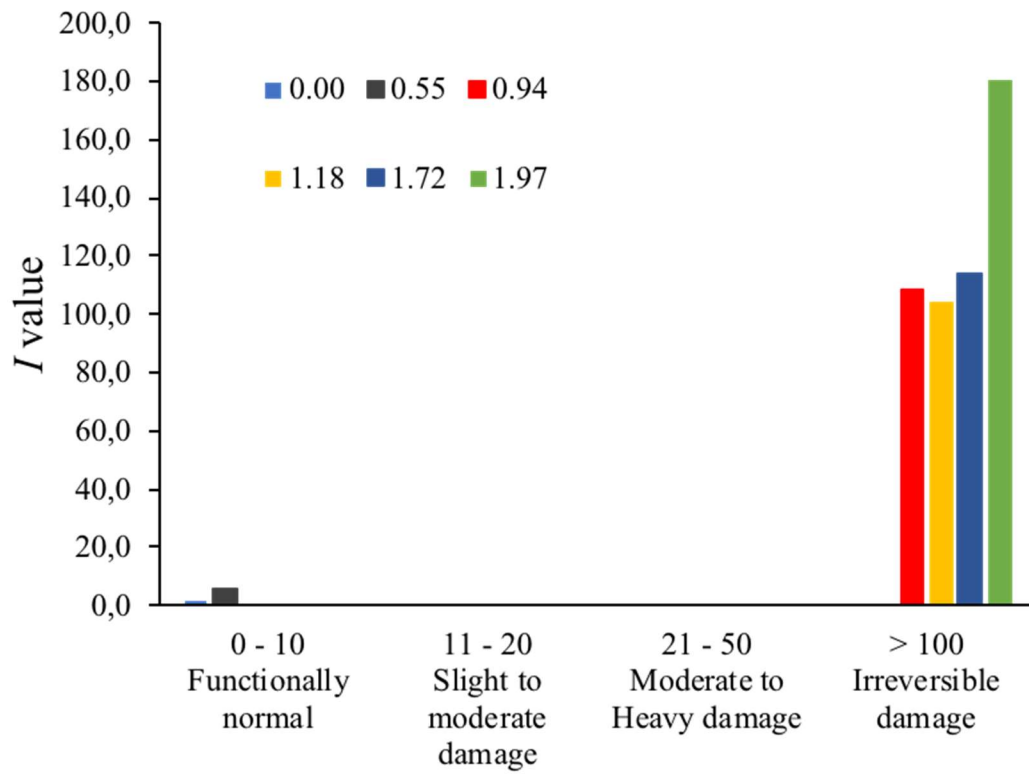


Figura 3.4 Grado de cambios (*I value*) y efectos asociados en branquias de juveniles de *Seriola rivoliana* expuestos a diferentes concentraciones de amonio no ionizado NH₃. (Aguilar Galarza & Vera Delgado, 2021)

3.5 Síntomas asociados a las diferentes concentraciones de amonio no ionizado en juveniles de Huayaibe (*Seriola rivoliana*)

Tabla 3.5 Síntomas asociados a la toxicidad generada por las diferentes concentraciones de amonio no ionizado (NH₃) en los juveniles de huayaibe (*Seriola rivoliana*). (Aguilar Galarza & Vera Delgado, 2021)

Concentraciones (mg/L)	Síntomas asociados a la toxicidad
0.00	No presentaron ningún síntoma adverso, su coloración se presentaba natural.
0.55	Se mostraron sin ningún comportamiento extraño, su único cambio con respecto a los peces del control fue su coloración oscura luego de las 72 horas de comenzado el ensayo experimental.
0.94	Todos los peces de este tratamiento se mostraron adormecidos, con su cabezas hacia el fondo del tanque desde las 15 horas de comenzado el ensayo experimental, nados erráticos e hiperventilación fueron observados luego de las 36 horas.
1.18	Mostraron el mismo comportamiento que la concentración anterior solo que desde las 6 horas de comenzado el ensayo experimental, nados erráticos e hiperventilación fueron observados luego de las 15 horas.
1.72	En estas dos últimas concentraciones los peces se mostraron irritados y con movimientos erráticos que inducían hacia la hiperventilación lo que mostraba un claro síntoma asociado a las altas concentraciones expuestas de amonio no ionizado, siendo estos dos últimos tratamientos los que empezaron a presentar muertes desde las 3 primeras horas.
1.97	

3.6 Formas de reducir y/o controlar los niveles altos de amoniaco en los cultivos de juveniles de Huayaipe (*Seriola rivoliana*)

- (Rivera, 2011) sugiere que para poder reducir los niveles de amoniaco en estanques de producción acuícola se debe realizar recambios de agua de un 10 al 30% máximo, esto con la finalidad de que el agua nueva que ingrese reduzca los niveles altos de amoniaco, otra manera es la de aplicar productos químicos al agua como zeolita que permitan absorber el amoniaco en agua dulce.
- La utilización de algas y/o cianobacterias que usen el nitrógeno como sustento para su desarrollo.
- Realizar una reducción en la tasa de alimentación de la especie, esto debido a que el exceso de alimento en el fondo del tanque o piscina juntamente con las excretas de los animales elevan sustancialmente los niveles de TAN.
- Realizar un aumento constante de la aireación del tanque, piscina o estanque con el objetivo de aumentar el oxígeno disuelto evitando así que los animales se estresen.
- Proveer agua dulce en el sistema, esto permitirá que la salinidad y pH del agua bajen, permitiendo que los niveles de amoniaco disminuya (GmbH, 2018).
- Mezclar junto con la dieta balanceado diferentes tipos de aditivos como la melaza, harina, etc. Con el afán de incrementar la correlación entre el carbono y nitrógeno (C:N).

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Durante el periodo experimental los parámetros que caracterizan al amonio no ionizado mostraron que la *Seriola rivoliana* en etapa juveniles sobrevivieron en su totalidad en un rango entre 0.00 y 0.55 NH₃ mg. L⁻¹ (96h y 100% supervivencia). Por otro lado, al incrementar el NH₃ a 0,94 mg/L se registró un 75% de mortalidad a las 72h de exposición, y a concentraciones 1.72 y 1.97 NH₃ mg/L tuvieron efecto letal incluso a menos de 12h de exposición (100% mortalidad).
- Los síntomas asociados al cultivo de juveniles de Huayaipe con la presencia de amonio no ionizado son comportamiento letárgico, abrasión de branquias, nado circular errático, hiperventilación, pérdida de equilibrio con la cabeza en dirección hacia el fondo del estanque y mortalidad con branquias y boca abierta. Por lo tanto, los juveniles sin movimiento opercular y sin respuesta a estímulos mecánicos fueron considerados muertos y retirados de los estanques.
- Los niveles seguros estimados en este estudio para *Seriola rivoliana* fueron 0.06 mg. L⁻¹ NH₃ y 1.68 mg. L⁻¹ TAN.
- Dentro de la biometría y parámetros hematológicos entre 0.00 y 0.55 mg. L⁻¹ NH₃ no se encontraron diferencias significativas en los niveles de hematocritos (HT), recuento de glóbulos rojos (RBC) y volumen corpuscular medio (MCV).
- La reducción de niveles de amonio en sistemas abiertos se logra realizando recambio de agua; mientras que en sistemas cerrados se debe tomar mediciones periódicas de parámetros físicos y/o químicos, por lo que uno de los mecanismos propuestos para intensificación de cultivos ha sido el sistema de recirculación

para acuicultura (RAS) que permite reciclar el agua, es independiente de las condiciones climáticas y ayuda a la reducción de volumen de efluentes.

4.2 Recomendaciones

- Dentro del presente proyecto se han presentado complicaciones causadas por la presencia de parásitos, por lo que se recomienda realizar bioensayos de calidad de agua para evitar mortalidad de la especie.
- Evaluar en diferentes estados de desarrollo las concentraciones letales de amonio no ionizado para la especie *Seriola rivoliana*, así como ensayos de toxicidad crónica para determinar los efectos de concentraciones no letales a largo plazo.
- Se recomienda que el sistema sea estático o semi-estático, incrementar el número de réplicas y animales en el proceso experimental.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar Galarza, B., & Vera Delgado, L. (2021). San Pedro, Santa Elena.
- Balnova. (2014). Obtenido de <https://balnova.com/amonio-y-ciclo-del-nitrogeno-en-estanques/>
- BIOAQUAFLOC. (16 de 11 de 2021). *BIOAQUAFLOC*. Obtenido de Como calcular la toxicidad verdadera del amonio y amoniaco en biofloc:
<https://www.bioaquafloc.com/biofloc/como-calcular-la-toxicidad-verdadera-del-amonio-y-amoniac-en-biofloc/>
- Blacio, E., & Alvarez, R. (2002). Propuesta de selección de especies de peces y moluscos paradiversificación de la Acuicultura Marina. *CENAIM-ESPOL*, Pp62.
- Blacio; Darquea; Rodríguez. (2003). Avances en el cultivo de Huayaípe, *Seriola rivoliana* (Valenciennes, 1833), en las instalaciones de CENAIM. *ResearchGate*, 3.
- Camargo, J. y. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environment International*, 32: 831-849.
- Camargo, J.A.; Alonso., A. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas mediambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *REVISTA CIENTÍFICA Y TÉCNICA DE ECOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE*, 13.
- CHIM, L. (1989). *CONSULTORÍA EN CULTIVO DE CAMARÓN, informe técnico de la serie no5*. FRANCE: FAO. Obtenido de <https://www.fao.org/3/ac397s/AC397S02.htm>
- Cobo, Sonnenholzner, Wille, & Sorgeloos. (2014). *Ammonia tolerance of Litopenaeus vannamei (Boone) larvae*. Belgium: Aquaculture Research, 2012, 1-6.
doi:doi:10.1111/j.1365-2109.2012.03248.x
- Dodds, W., Jones, J., & Welch, E. (1998). *Suggested classification of stream trophic state: distributions of temperate stream types by chlorophyll, total nitrogen, and phosphorus*. *Water Res.*; 32: 1455-1462.
- Dong-Jin, K., Dong-ig, L., & Keller. (2006). *Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH*. Korea: Bioresource Technology, 97 459–468.
- Emerson, Russo, Lund, & Thurston. (1975). *Aqueous Ammonia Equilibrium Calculations: Effect of pH and Temperature*. Canada: Journal of the Fisheries Board of Canada.
doi:Journal of the Fisheries Board of Canada

- Finney, D. (1971). *Probit Analysis*. Cambridge, Inglaterra: Cambridge University Press.
- Franklin, D., & Edward, L. (2019). *Ammonia toxicity and adaptive response in marine fishes*. Belgium: Indian Journal of Geo Marine Sciences; Vol 48 (03), 273-279.
- Froese, R., & Pauly. (2010). *FishBase*. Obtenido de www.fishbase.org
- GmbH, B. H. (2018). *biomin.net*. Obtenido de <https://www.biomin.net/mx/legal/>
- Howarth, Swaney, Boyer, Marino, Jaworski, & Goodale. (2006). *The influence of climate on average nitrogen export from large watersheds in the Northeastern United States*. United States: Biogeochemistry, 79: 163–186. doi:DOI 10.1007/s10533-006-9010-1
- Kubitza, F. (2009). *Panorama da Aquicultura*. Obtenido de https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/bpa/_archivos//091230_Buenas%20Pr%C3%A1cticas%20de%20transporte%20de%20peces.pdf
- Lemarié, G., Dosat, A., Covés, D., Dutto, G., Gasset, E., & Ruyet., J. P.-L. (2004). Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *ELSEVIER*, 13.
- Lemarié, G., Dosat, A., Covés, D., Dutto, G., Gasset, E., Ruyet, J., & Person-Le. (2004). Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *ELSEVIER*, 13.
- Meeren, v. d., & Mangor-Jensen. (2020). *Tolerance of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae to acute ammonia exposure*. Norway: Aquaculture International. doi:<https://doi.org/10.1007/s10499-020-00555-8>
- Mojica, B. H., & Villaneda, J. A. (s.f.). PARÁMETROS QUÍMICOS. En B. H. Mojica, & J. A. Villaneda, *La calidad del agua y la productividad de un estanque en acuicultura* (pág. 30). <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/4997/3/051.3.pdf>.
- Nicovita, B. (1987). AMONIACO EN ESTANQUES DE PRODUCCION CAMARONERA. *Boletín Nicovita*, Julio; Volumen 2; Edición 01.
- Pedrotti, F., Laterça, M., Baloi, M., Magnotti, C., Scheuer, F., Sterzelecki, F., & Cerqueira, V. (2018). Mortalidad, hematología e histopatología del róbalo *Centropomus undecimalis* (Perciformes:Centropomidae) expuestos a la toxicidad aguda del amoniaco. *Revista de acuicultura aplicada*.
- Peh, Chew, Ching, Loong, & Ip. (2010). *Roles of intestinal glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in environmental ammonia detoxification in the euryhaline four-eyed sleeper, *Bostrychus sinensis**. Singapore: Aquatic Toxicology.
- Person-LeRuyet, j., Chartois, H., & Quemener., L. (1995). Comparative acute ammonia toxicity in marine fish and plasma ammonia response. *ELSEVIER*, 14.

- Poleksić, V., & Mitrović-Tutundžić, V. (1994). Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. 339-352.
- Prosser, & Embley. (2002). *Cultivation-based and molecular approaches to characterisation of terrestrial and aquatic nitrifiers*. London: Antonie van Leeuwenhoek, 81: 165–179.
- Rivera, R. M. (Mayo de 2011). *Ecuacuicultura*. Obtenido de <http://ecuanoticias.com.ec/acuacuicultura1.html>
- Rodríguez, G. H., & Anzola, E. E. (S.F.). En G. H. Rodríguez, & E. E. Anzola, *Compuestos Nitrogenados* (pág. 30). <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/4997/3/051.3.pdf>.
- Russo, R. (1985). *Ammonia, nitrite and nitrate*. En: *Fundamentals of aquatic toxicology : (editores Rand, G.M. y Petrocelli, S.R.)*. Washington DC.: Hemisphere Publishing Corporation; pp.45-471.
- Sal, F. M. (2020). *Cultivos Intensivos en Acuicultura*. Argentina: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Obtenido de https://inta.gov.ar/sites/default/files/ntesivos_en_acuicultura.pdf
- Sinha, A., Shrivastava, J., Romano, N., & De Boeck, G. (2019). Prevención de la alta toxicidad inducida por amoníaco en peces cultivados. *Global Seafood Alliance*.
- Sperry, Belnap, & Evans. (2006). *Bromus tectorum invasion alters nitrogen dynamics in an undisturbed arid grassland ecosystem*. United States: Ecology, 87, pp. 603-615.
- Vaniz, S., Kaufman, & Glowacki. (1995). *Species-specific patterns of hyperostosis in marine teleost fishes*. Boston: Marine Biology.
- Viader, M. (2019). *Influencia de la temperatura sobre el desarrollo larval temprano del jurel Seriola rivoliana*. La Paz: Centro de investigaciones biologicas del noroeste, S.C.
- Whitfield, M. (1974). The hydrolysis of ammonium ions in sea water - A theoretical study. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 54, 565-580.
- Wilkie. (1997). *Mechanisms of Ammonia Excretion Across Fish Gills*. Toronto: Comp. Biochem. Physiol; Vol. 118A, No. 1, pp. 39-50.
- Zuffo, Ratke, González, & Steiner. (2021). *Bradyrhizobium spp. inoculation associated with nitrogen application enhances the quality of soybean seeds*. Brasil: Agricultural Sciences; eISSN 1981-1829.
- Zuffo, T., Durigon, E., Berticelli, M., Picoli, F., Folmann, S., Kinas, J., . . . De Alcantaras Lopes, D. (2021). Lethal temperature and toxicity of ammonia in juveniles of Curimatá (*Prochilodus lineatus*). *Aquaculture* 545.

APÉNDICES

Apéndice A Fotografías de la realización de la larvicultura, experimentación y pruebas realizadas (Aguilar Galarza & Vera Delgado, 2021)









