



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas,
Oceánicas y Recursos Naturales**

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DIESEL SOBRE
Oreochromis niloticus MEDIANTE BIOENSAYO

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIOLOGO

Presentada por:

Cristina Yajaira Jines Muñoz

GUAYAQUIL-ECUADOR

2012

AGRADECIMIENTO

- A Dios por darme la vida y con ello brindarme fuerzas para salir adelante ante cualquier tropiezo.
- A mis padres, Carmencita y Ángel, por su determinación, entrega y apoyo incondicional en todos los momentos difíciles de mi carrera, porque creyeron siempre en mí y nunca desfallecieron hasta verme alcanzar todos mis anhelos y sueños.
- A mi hermano José Luis por su paciencia, amor, esmero y por enseñarme que no existen límites, que lo que me proponga lo puedo lograr y que solo depende de mí.
- A mi hermana Angela, por ser mi amiga incondicional y por haber compartido grandes momentos de su vida a mi lado.
- A mi hermana Carla, por hacerme ver que en la vida lo mejor que puedo hacer es reír, por ser esa vocecita alentadora en cada circunstancia difícil que se me presentó en el camino.
- A Máster Ecuador Marcillo, por sus valiosas sugerencias y su incondicionable colaboración.

- Al Blgo. Alberto, por su paciencia, disponibilidad y generosidad para compartir su experiencia. Su colaboración fue de gran ayuda durante mis estancias en el Laboratorio del CSA.
- Al Instituto Nacional de Pesca (INP) y al Centro de Servicios para la Acuicultura (CSA), por el soporte institucional dado para la realización de este trabajo.
- Al Blgo. Xavier Romero, por su generosidad científica.
- Al Ph.D. Marcelo Muñoz, por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección.
- A mis profesores, porque participaron en mi desarrollo profesional durante mi carrera.
- Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

DEDICATORIA

A DIOS, quién me dio la fe, la fortaleza y la salud para concluir una etapa
más en mi vida

A mis Padres Ángel y Carmencita, por su amor y comprensión

A mis hermanos, José Luis, Angela y Carla, por existir

Ustedes siempre han sido, son y serán mi inspiración

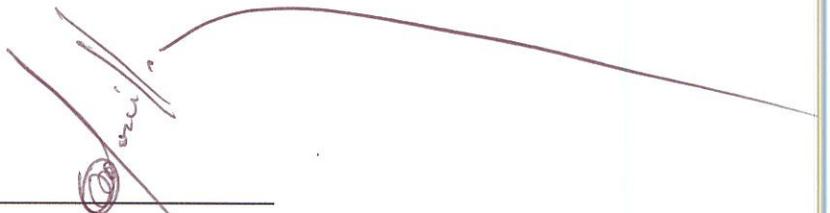
TRIBUNAL DE GRADUACION



Ing. Jerry Landívar Ms.c.
Decano de la FIMCBOR



Ing. Marcelo Muñoz Ph.D.
Director de Tesis

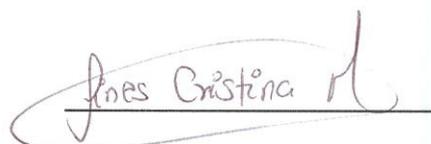


Ing. Ecuador Marcillo Ms.c.
Vocal

DECLARACION EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la **ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL**”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

A handwritten signature in black ink, reading "Jines Cristina M", written over a horizontal line.

Cristina Yajaira Jines Muñoz

RESUMEN

El Diesel es una compleja mezcla que contiene hidrocarburos aromáticos policíclicos, que persisten después de un derrame y pasan rápidamente del agua a los tejidos de los organismos. En el presente estudio se detectó cambios en el comportamiento de la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), se evaluaron las alteraciones histopatológicas de las branquias e hígado y se determinó la mortalidad de los peces ante diferentes concentraciones de Diesel. Se elaboró un ensayo estático de 96 horas con tres dosis diferentes de Diesel (513mg/L, 2050mg/L y 5125mg/L) más el tratamiento control. La mortalidad fue determinada por medio del modelo de probabilidad chi cuadrado, donde la alta sensibilidad de los especímenes se registró a las 96h, obteniendo como valores promedios de mortandad 5.3 (dosis baja), 6.3 (dosis media) y 7 (dosis alta). Las lesiones patológicas de las branquias fueron degeneración celular del arco branquial, hiperplasia interlamelar, fusión de lamelas, levantamiento epitelial, y telangiectasis. El tejido hepático reveló vacuolización lipídica, núcleos picnóticos, dilatación sinusoidal, necrosis de hepatocitos ligera, hepatocitos binucleados y degeneración nuclear. Mediante el programa estadístico SAS se analizó cuantitativamente las primeras lesiones histopatológicas más sobresalientes, presentando en branquias e hígado degeneración celular y vacuolización lipídica respectivamente con valores de 95.83 y 91.66 para la dosis de 5125mg/L

alcanzando el mayor daño a nivel de ambos órganos; mientras que telangiectasis en branquias y núcleos picnóticos en hígado no difirieron estadísticamente entre tratamientos. La tilapia es un pez que puede soportar condiciones extremas de ambiente, pero no las originadas por contaminantes, ya que pueden alterar el hábitat de estos organismos produciendo cambios en su estructura hasta finalmente ocasionar la muerte. Los resultados de este estudio podrían ser utilizados como una guía para los programas de control biológico en las poblaciones de peces de cualquier especie que habiten las zonas contaminadas con hidrocarburos.

Palabras clave: Diesel, *Oreochromis niloticus*, comportamiento, lesiones histopatológicas de branquias e hígado y mortalidad.

INDICE GENERAL

	Pág. No.
AGRADECIMIENTO.....	ii
DEDICATORIA.....	iv
TRIBUNAL DE GRADUACION.....	v
DECLARACION EXPRESA.....	vi
RESUMEN.....	vii
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	3
CAPÍTULO I GENERALIDADES	
1.1 Bioensayos.....	5
1.1.1. Ventajas.....	6
1.1.2. Desventajas.....	7
1.1.3 .Clases de Bioensayos.....	7
1.1.3.1. Letales o Agudas.....	7
1.1.3.2. Sub-letales o Crónicas.....	8
1.1.4. Organismo de Prueba.....	8
1.2 Hidrocarburos (Diesel).....	11
1.2.1. Características.....	11
1.2.2. Efectos de Hidrocarburos.....	12
1.3 Ríos Región Costa.....	14
1.3.1. Río Guayas-Calidad de agua.....	15
1.3.2. Estero Salado-Calidad de agua.....	16
1.3.3. Ríos de Esmeraldas.....	17
1.4 Descripción de Tilapia nilótica.....	20
1.4.1. Características Generales.....	20
1.4.2. Taxonomía.....	21

1.4.3. Estructura y Biología.....	21
1.4.4. Alimentación.....	24
1.4.5. Reproducción.....	24
1.4.5.1. Hábitos Reproductivos.....	26
1.4.6. Ecología.....	27
1.4.7. Requerimientos Ambientales.....	28
1.4.7.1. Salinidad.....	28
1.4.7.2. Temperatura.....	28
1.4.7.3. Concentración de Oxígeno disuelto (OD).....	29
1.4.7.4. pH.....	29
1.4.8. Valor Comercial.....	29
1.5 Descripción morfológica e histológica de branquias e hígado.....	30
1.5.1. Branquia.....	30
1.5.2. Hígado.....	31
1.6 Técnicas Histológicas.....	32
1.6.1. Toma de material.....	33
1.6.2. Fijación.....	34
1.6.2.1. Fijador.....	35
1.6.2.2. Cualidades del Fijador.....	36
1.6.2.3. Agentes Fijadores.....	37
1.6.2.4. Conservación morfológica de Tejidos.....	38
1.6.3. Deshidratación.....	39
1.6.4. Inclusión.....	40
1.6.4.1. Parafina.....	41
1.6.5. Cortes.....	42
1.6.6. Tinción.....	43

1.6.6.1. Colorantes.....	43
1.6.6.2. Tipos de Tinciones.....	44
1.6.6.3. Clasificación de Colorantes.....	44

**CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS**

2.1 Localización.....	47
2.2 Materiales y Equipos utilizados.....	48
2.2.1. Ensayo y toma de muestra.....	48
2.2.2. Equipos-Histología.....	48
2.2.3. Especies utilizadas.....	49
2.2.4. Contaminante.....	49
2.3 Metodología.....	50
2.3.1. Aclimatación.....	50
2.3.2. Ensayo.....	51
2.3.3. Diseño Experimental.....	51
2.3.3.1. Descripción de Tratamientos.....	51
2.3.3.2. Esquema de Análisis de Varianza.....	52
2.3.4. Manejo del Experimento.....	52
2.3.5. Cortes Histológicos.....	54
2.3.5.1. Disección y Recolección de muestras.....	54
2.3.5.2. Deshidratación.....	56
2.3.5.3. Inclusión.....	57
2.3.5.4. Cortes y Tinción.....	58
2.4 Datos.....	62

**CAPÍTULO III
ANÁLISIS DE RESULTADOS**

3.1	Comportamiento.....	71
3.2	Parámetros.....	76
3.3	ANOVA.....	83
3.4	Histopatología.....	85
3.5	Mortalidad.....	92
	DISCUSIÓN.....	95
	CONCLUSIONES.....	98
	RECOMENDACIONES.....	100
	BIBLIOGRAFIA.....	102
	ANEXOS.....	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. 1. Principales afluentes de la provincia de Esmeraldas.....	18
Figura. 2. Mancha de crudo en río Teaone.....	18
Figura. 3. Juvenil de tilapia nilótica (<i>O. niloticus</i>).....	20
Figura. 4. Estructura anatómica externa de <i>O. niloticus</i>	22
Figura. 5. Dimorfismo sexual, genitales de tilapia <i>O. niloticus</i>	23
Figura. 6. Proceso reproductivo de <i>O. niloticus</i>	25
Figura. 7. Hembra de <i>O. niloticus</i> recoge los huevos fertilizados.....	26
Figura. 8. Diferencia en boca de machos y hembras de <i>O. niloticus</i>	27
Figura. 9. Hígado de <i>O. niloticus</i> mostrando dos lóbulos hepáticos.....	32
Figura. 10. Micrótopo y elaboración de cortes.....	42
Figura. 11. Peceras instaladas en laboratorio EPA y acuario del INP.....	50
Figura. 12. Aplicación de dosis baja (a), media (b) y alta (c).....	53
Figura. 13. Potenciómetro (a), medición de parámetros (b).....	54
Figura. 14. Disección lateral izquierda de <i>O. niloticus</i>	55
Figura. 15. Conservación de branquias e hígado disecados, en formalina (40%).....	55
Figura. 16. Cambio de los órganos disecados en formalina a etanol (a y b), hígado y branquia colocados en cassettes histológicos.....	56
Figura. 17. Baño de cassettes histológicos a diferentes porcentajes de etanol.....	57
Figura. 18. Cassettes bañados en xilol (a), cassettes en baño de parafina (b).....	58
Figura. 19. Formación de bloques.....	58
Figura. 20. Cortes y fijación de cortes en portaobjetos.....	59
Figura. 21. Placas histológicas recibiendo baños de xilol-100%.....	60
Figura. 22. Proceso de tinción.....	61
Figura. 23. Montaje de placas histológicas.....	62
Figura. 24. Cambios de comportamiento de <i>O. niloticus</i> originado por diferentes	

dosis de Diesel, 24h después de iniciado el ensayo.....	71
Figura. 25. Cambios de comportamiento de <i>O. niloticus</i> originado por diferentes dosis de Diesel, 48h después de iniciado el ensayo.....	73
Figura. 26. Cambios de comportamiento de <i>O. niloticus</i> originado por diferentes dosis de Diesel, 72h después de iniciado el ensayo.....	74
Figura. 27. Cambios de comportamiento de <i>O. niloticus</i> originado por diferentes dosis de Diesel, 96h después de iniciado el ensayo.....	75
Figura. 28. Parámetros físicos durante el proceso de aclimatación.....	76
Figura. 29. Parámetros físicos durante el proceso de ensayo por cada tratamiento....	78
Figura. 30. Temperatura medida por cada tratamiento con sus repeticiones.....	79
Figura. 31. pH medido por cada tratamiento con sus repeticiones	80
Figura. 32. Oxígeno disuelto (a), oxígeno % de saturación (b) por cada tratamiento con sus repeticiones.....	81
Figura. 33. Conductividad medida por cada tratamiento con sus repeticiones.....	82
Figura. 34. Branquia de pez control.....	86
Figura. 35. Branquia de <i>O. niloticus</i> expuesta a 513mg/L.....	87
Figura. 36. Branquia de <i>O. niloticus</i> expuesta a 2050mg/L.....	88
Figura. 37. Branquia de <i>O. niloticus</i> expuesta a 5125mg/L.....	89
Figura. 38. Descripción de hígado en pez control.....	89
Figura. 39. Hígado de <i>O. niloticus</i> expuesto a 513mg/L.....	90
Figura. 40. Hígado de <i>O. niloticus</i> expuesto a 2050mg/L.....	91
Figura. 41. Hígado de <i>O. niloticus</i> expuesto a 5125mg/L.....	91
Figura. 42. Mortalidad de <i>O. niloticus</i> , 24h después de iniciado el ensayo.....	92
Figura. 43. Mortalidad de <i>O. niloticus</i> , 48h después de iniciado el ensayo.....	92
Figura. 44. Mortalidad de <i>O. niloticus</i> , 72h después de iniciado el ensayo.....	93
Figura. 45. Mortalidad de <i>O. niloticus</i> , 96h después de iniciado el ensayo.....	94

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Características de Diesel.....	12
Tabla II. Diferentes fuentes de contaminación en río Guayas, Estero Salado y ríos de Esmeraldas.....	15
Tabla III. Descripción taxonómica de tilapia nilótica (<i>O. niloticus</i>).....	21
Tabla IV. Descripción de los tratamientos estudiados.....	52
Tabla V. Esquema del análisis de varianza.....	52
Tabla VI. Escala arbitraria: Vacuolización, Degeneración celular, Núcleos picnóticos y Telangiectasis.....	62
Tabla VII. Daños histológicos más sobresalientes en branquias de <i>O. niloticus</i>	63
Tabla VIII. Daños histológicos más sobresalientes en hígado de <i>O. niloticus</i>	63
Tabla IX. Muerte registrada en <i>O. niloticus</i> por tratamientos con cada una de sus repeticiones, durante 96 horas.....	64
Tabla X. Cambios de comportamiento en <i>O. niloticus</i> , 24h después de iniciado el ensayo.....	65
Tabla XI. Cambios de comportamiento en <i>O. niloticus</i> , 48h después de iniciado el ensayo.....	66
Tabla XII. Cambios de comportamiento en <i>O. niloticus</i> , 72h después de iniciado el ensayo.....	67
Tabla XIII. Cambios de comportamiento en <i>O. niloticus</i> , 96h después de iniciado el ensayo.....	68
Tabla XIV. Parámetros físicos tomados durante la aclimatación.....	69
Tabla XV. Parámetros físicos tomados durante el proceso de ensayo por tratamiento y repetición.....	70
Tabla XVI. Resultados obtenidos de la cuantificación de lesiones histológicas en branquias e hígado.....	83

Tabla XVII. Cambios histológicos observados en juveniles de <i>O. niloticus</i> expuestos a diferentes concentraciones de Diesel.....	86
---	----

INDICE DE ANEXOS

Anexo A. Coloración de piel y ojos <i>O. niloticus</i>	111
Anexo B. Comportamiento de <i>O. niloticus</i>	113

INTRODUCCION

Los ecosistemas naturales y las especies que los componen están siendo expuestos, en un periodo de tiempo muy breve, a multitud de factores y circunstancias que no constituyen elementos naturales de su hábitat. Entre estos factores se encuentran miles de compuestos diferentes que continuamente son expulsados al medio, como consecuencia de las diferentes actividades de la sociedad moderna. Contaminar el agua es alterarla física, química o biológicamente, de modo que se perjudique su posterior utilización ⁽¹⁾.

Las actividades de la industria petrolera, a nivel mundial, son consideradas como unas de las más complejas debido a la diversidad de operaciones que implican su desarrollo. Esta situación la hace una de las industrias con más alto riesgo y potencialmente contaminadora ⁽²⁾. En la década de 1970, la contaminación a gran escala en Ecuador comenzó, con el auge petrolero. Durante los veinte años de dominio petrolero en la región amazónica, el impacto en ella fue incrementándose, precisamente por no utilizar tecnologías de protección ambiental, lo que provocó la contaminación de ríos con daños en la flora y fauna del territorio ⁽³⁾. Algo similar ha ocurrido en los ríos y esteros de la Provincia de Esmeraldas, donde se produjo desde accidentes ambientales de magnitud considerables hasta pequeños derrames permanentes ⁽⁴⁾.

La contaminación petrolera puede producir, sin duda, impactos severos en los ambientes dulce-acuícolas ⁽⁵⁾, liberando así sustancias tóxicas en los mismos produciendo una variedad de respuestas complejas en los organismos, las que precisan ser evaluadas. Para ello se han implementado los bioensayos, que son técnicas de evaluación de los efectos tóxicos agudos o crónicos, tanto de sustancias químicas conocidas como de muestras ambientales de composición incierta., que miden el efecto de uno o más contaminantes sobre las especies y consiste en la exposición de las mismas a concentraciones crecientes de un agente dañino, identificando algún cambio en éstos por un cierto período de tiempo ⁽⁶⁾.

Las alteraciones en comunidades de peces, pueden determinarse mediante histología, que es un método rápido para detectar los efectos de diferentes agentes tóxicos en diversos tejidos y órganos de los peces, y que ha sido ampliamente utilizado para determinar los efectos nocivos de los hidrocarburos ⁽⁷⁾. Las especies para ser usadas como herramientas ecotoxicológicas requieren ser sencillas, prácticas, sensibles y repetibles ⁽⁸⁾. La tilapia (Smith, 1840), por ejemplo, presenta una serie de características que la hacen idónea para evaluar los efectos de los compuestos tóxicos, entre ellas: distribución cosmopolita, talla relativamente grande, fácil de cultivar en laboratorio, alta fecundidad, ciclo de vida corto y buena resistencia física a diferentes condiciones ambientales ⁽⁹⁾.

Considerando que la tilapia es una fuente permanente de alimentación para la población rural y urbana, el tema propuesto tiene relevante importancia y este trabajo pretende evaluar y determinar el comportamiento, los daños y mortalidad de *Oreochromis niloticus* (tilapia nilótica), ante cualquier eventualidad contaminante, como derrames de combustibles refinados tal es el Diesel, que no sólo hace referencia a la contaminación del agua sino también al daño que éste provoca en nuestro sistema ecológico. Bajo estas circunstancias se realizó esta investigación que tuvieron los siguientes objetivos:

Objetivos:

General:

Determinar el efecto de diferentes concentraciones de Diesel en *Oreochromis niloticus* mediante bioensayo.

Específicos:

Identificar los cambios del comportamiento de *O.niloticus* sometidas a diferentes dosis de Diesel.

Establecer los daños en *O.niloticus* mediante cortes histopatológicos en varios tejidos sometidos a diferentes dosis.

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Diesel sobre la supervivencia de *O.niloticus*.

Determinar el tiempo de mortalidad de los peces en las diferentes concentraciones de Diesel.

CAPITULO I

1. GENERALIDADES

1.1. Bioensayo

Una de las herramientas utilizadas para evaluar el efecto de los contaminantes sobre los componentes biológicos de los sistemas acuáticos son los bioensayos de ecotoxicidad¹. Por lo tanto un bioensayo se define como una prueba en el cual un tejido vivo, un organismo o grupos de ellos, son empleados como reactivos para la

¹ Es la ciencia que estudia los efectos tóxicos producidos por los agentes físicos y químicos sobre los seres vivos.

determinación del potencial tóxico de alguna sustancia fisiológicamente activa y de función desconocida, o cuya actividad se desea investigar ⁽¹⁰⁾.

Los bioensayos proporcionan la posibilidad de evaluar la toxicidad de una muestra sin conocer la completa composición química de la misma. Muchos de estos ensayos son rápidos, sensibles, económicos y reproducibles, con una ventaja en la obtención de los resultados y con menor costo ⁽¹¹⁾.

Al implementar bioensayos y pruebas de toxicidad es necesario efectuar su estandarización, que consiste en establecer la sensibilidad de las especies y la reproducibilidad del experimento frente a un tóxico de referencia. Las pruebas ecotoxicológicas son complementarios a los resultados de los parámetros físicos y químicos, y los de biomonitoreo² ambiental ⁽¹¹⁾.

1.1.1. Ventajas

La utilidad de los bioensayos recae primordialmente en ser un método de detección relativamente simple y que se puede

² Es la evaluación de los efectos deletéreos de una sustancia tóxica sobre distintos organismos.

emplear para el monitoreo de causas y sus efectos de tipo ambiental ⁽¹⁰⁾.

1.1.2. Desventajas

La principal desventaja de un bioensayo es que sus resultados, difícilmente, generan información específica de un compuesto, causa o condición ambiental. Durante el desarrollo de los mismos, los organismos de prueba son sometidos a diferentes condiciones experimentales en las cuales se incluye la muerte del organismo como un efecto normal y el problema es que las causas de este efecto pueden ser muchas y difíciles de detectar por medio de un bioensayo como para decir que en este proceso, valió la pena el sacrificio del organismo ⁽¹⁰⁾.

1.1.3. Clases de Bioensayo

Los bioensayos pueden ser de dos tipos, según ⁽¹²⁾:

1.1.3.1. Letales o Agudos

Estos test determinan la concentración de efluentes o aguas receptoras que producen un efecto adverso en un grupo de organismos de prueba, durante un tiempo de exposición corto (24, 48, o 96 horas), la respuesta es

letalidad. La toxicidad aguda es medida usando procedimientos estadísticos. Sus respuestas pueden expresarse como: concentraciones medias CL50 que es la concentración tóxica que causa la muerte al 50% de organismos de prueba o simplemente como porcentaje de supervivencia ⁽¹⁰⁾ ⁽¹²⁾.

1.1.3.2. Sub-letales o Crónicos:

Pruebas cuya finalidad es evidenciar respuestas que no implican la muerte del organismo ensayado (conducta, fecundidad, desarrollo y bioacumulación, entre otras). Las pruebas de toxicidad crónica, por ser más flexibles en lo que se refiere a los parámetros utilizados, poseen una mayor amplitud en relación a las respuestas biológicas. Dichas respuestas pueden estar dadas en función del crecimiento, ocurrencia de reproducción, número de puestos, entre otros ⁽¹⁰⁾ ⁽¹²⁾.

1.1.4. Organismo de Prueba

La elección de un organismo de prueba adecuado para un Bioensayo depende del efecto que se desea evaluar y de las características del organismo ⁽¹⁰⁾.

Esta debe cumplir una serie de criterios, como por ejemplo la posibilidad de estar disponible en cantidad suficiente, así sea gracias a cultivo, en laboratorio, en criadero o por recolección en el campo, debe asegurarse que provengan de áreas libres del tóxico en cuestión. También es importante que soporte bien las condiciones de laboratorio, es decir, una buena facultad de adaptarse al estrés surgido como efecto de cambio del medio ambiente del mismo. Los organismos deben además, tener una amplia distribución geográfica y biología conocida, la talla debe adecuarse con las posibilidades de los elementos de experimentación. Algunos ejemplos de organismos usados en bioensayos son, según ⁽¹³⁾:

- Dafnias (pulgas de agua), como: *Daphnia magna*, *D. pulex*, *D. pulicaria*.
- Bacterias: *Vibrio fisheri*.
- Lumbrícidos³: *Eisenia foetida*.
- Algas: *Chlamydomonas reinhardi*, *Selenastrum capricornutum*.
- Zooplancton⁴

³ Comúnmente denominados lombrices de tierra, son una familia de anélidos oligoquetos del orden Haplotaxida.

⁴ Es la fracción de plancton constituida por seres que se alimentan, por ingestión, de materia orgánica ya elaborada, constituido por protozoos (protistas), larvas de animales más grandes, como esponja, gusanos, equinodermos, moluscos o crustáceos y fases juveniles de peces.

- Peces: *Oncorhynchus mykiss* (trucha arco iris), *Salvenilus fontinalis* (trucha de arroyo), *Carassius auratus* (carpa dorada), entre otras.

En general, es preferible utilizar organismos cultivados en el laboratorio en lugar de los recolectados en el campo porque los exámenes estandarizados requieren de un abastecimiento siempre disponible de especímenes en buena salud provenientes de cultivos de condiciones conocidas y constantes. La muerte de los individuos como criterio de valoración de la toxicidad es por tanto de gran interés y muy utilizado en pruebas. Además puede ocurrir que los contaminantes estén en cantidades no letales o en formas poco biodisponibles⁵ haciendo improbable el fallecimiento inmediato. Otro problema es el volumen de muestra ambiental, que en ocasiones, como en estudios con peces, es del orden de litros, lo que dificulta su almacenamiento, mantenimiento y manipulación (13).

Una de las especies de peces más comunes de agua dulce es *O. niloticus*, que es usada en estudios toxicológicos, debido a que presentan una serie de características que pueden

⁵ Biodisponibilidad es la asimilación del contaminante por los organismos, y en consecuencia la posibilidad de causar algún efecto, negativo o positivo.

hacer un modelo adecuado para utilizarlo como indicador de especies en los programas de control biológico ⁽¹⁴⁾.

1.2. Hidrocarburos (Diesel)

1.2.1. Características (Tabla I)

El Diesel es un líquido de color amarillo y de aspecto aceitoso, compuesto en su mayor parte por fracciones que van de C12 a C20 átomos por molécula ⁽¹⁵⁾.

Los hidrocarburos presentes en este combustible son de carácter saturado como los parafínicos⁶, nafténicos⁷, así como, aromáticos⁸ y de carácter mixto ⁽¹⁶⁾.

Utilizado en motores de autoencendido por compresión, motores utilizados en el transporte pesado, en sector naviero de cabotaje, turbinas de generación eléctrica, motores estacionarios de diversos tipos utilizados en la industria, en calderos para la generación de vapor, etc. ⁽¹⁶⁾.

El Diesel es más sencillo de refinar que la gasolina y suele costar menos ⁽¹⁷⁾ ⁽¹⁸⁾.

⁶ Son hidrocarburos saturados homólogos del metano (CH₄), de cadena sencilla o ramificada. Su fórmula general es C_nH_{2n+2}.

⁷ Están igualmente saturados, pero una parte de su molécula forma un ciclo, con fórmula C_nH_{2n}.

⁸ Son hidrocarburos cíclicos insaturados constituidos por el benceno (C₆H₆) y sus homólogos. Su fórmula general es C_nH_n.

Posee un bajo contenido de azufre. Sus principales constituyentes son biodegradables, pero contienen componentes que son persistentes en el medio ambiente. Además se oxida rápidamente en contacto con el aire, por reacción fotoquímica⁹(15).

Tabla I. Característica de Diesel indicado por EP Petroecuador 2011 (19).

Característica	Unidad	Mínimo	Máximo	Método Ensayo
Punto de Inflamación	°C	51	--	INEN 1047
Gravedad API 25°C	°C	--	37.9	
Temperatura de Destilación 90%	°C	--	360	INEN 926
Agua y Sedimentos	% en V	--	0.05	INEN 1494
Índice de Cetano Calculado	--	45	--	INEN 1495
Residuo Carbonoso > 10%	% en peso	--	0.15	INEN 1491
Cenizas	% en peso	--	0.01	INEN 1492
Viscosidad Cinemática 37.8°C	cSt	2.5	6.00	INEN810
Contenido de Azufre	% en peso	--	0.7	INEN 1049

1.2.2. Efecto de Hidrocarburos

La actividad petrolera es una de las industrias que más impactos ambientales y en la biodiversidad genera a nivel local y global. Los derrames petroleros ocurren por un manejo

⁹Es el estudio de las transformaciones químicas provocadas o catalizadas por la emisión o absorción de luz visible o radiación ultravioleta.

rutinario negligente (goteo de las tuberías y otra infraestructura petrolera) y por accidentes ⁽²⁰⁾.

Los cuerpos de agua dulce son altamente sensibles a los derrames de petróleo. En ellos, se alimentan, reproducen y anidan muchos organismos dulceacuícolas. Adicionalmente, los efectos de los derrames en microorganismos de agua dulce, así como en invertebrados y algas impactan a los niveles superiores de las redes tróficas¹⁰. Los efectos de la polución por hidrocarburos en aguas continentales varían de acuerdo al flujo de agua y a las características específicas de los hábitats ⁽²⁰⁾.

Los crudos livianos pueden penetrar más eficientemente en la columna de agua que los crudos pesados y ser muy tóxicos, pero estos últimos permanecen por más tiempo en el ambiente ⁽²⁰⁾.

Luego de un derrame petrolero, se altera la composición de las poblaciones de peces, pues desaparecen las especies sensibles a la contaminación, y se selecciona a las más resistentes. Por otro lado, suelen aparecer alteraciones morfológicas en los peces, como mutaciones, algo de gigantismo o enanismo, alteración en la coloración, perturbación del desarrollo larval y presencia de tumores. Los

¹⁰También llamada Red alimentaria, serie de cadenas alimentarias o tróficas íntimamente relacionadas por las que circulan energía y materiales en un ecosistema

peces acumulan contaminantes en sus tejidos grasos, provocando el envenenamiento crónico de las poblaciones que se asientan tradicionalmente en las orillas de los ríos para proveerse de agua y alimento ⁽²⁰⁾.

1.3. Ríos de la Región Costa

Los principales sistemas de drenaje son el río Guayas en el sur y el río Esmeraldas en el norte. El sistema del río Guayas es el mayor y más importante de los ríos de la región ⁽²¹⁾.

Desde su desembocadura hasta la ciudad de Guayaquil, el río Guayas es uno de los afluentes menos naturales y el que posee más de una vía navegable comercialmente desarrollada ⁽²¹⁾.

Antes de llegar a la ciudad de Guayaquil, se divide en el río Daule y el río Babahoyo, y una multitud de tributarios ⁽²¹⁾.

El desarrollo industrial y técnico en el Ecuador ha causado la contaminación de algunas zonas de la costa ecuatoriana. Según algunos estudios, las áreas más afectadas son el río Guayas, el Estero Salado y el río Esmeraldas, a continuación se describe a estos ecosistemas, que han sido afectados por agentes contaminantes procedentes de diversas fuentes (Tabla II) ⁽²²⁾:

Tabla II. Diferentes fuentes de contaminación en río Guayas, Estero Salado y río Esmeraldas. **Fuente:** Solórzano, L. 1989 ⁽²²⁾.

Área	Clasificación	Descripción
Río Guayas	severo	Escombros domésticos e industriales, descargas de las ciudades cercanas a las cuencas, residuos agroquímicos de efluentes del río Guayas.
Estero Salado	serio	Escombros domésticos e industriales, descargas de la ciudad y terminales petroleras.
Ríos Esmeraldas	moderado	Efluentes de la refinería, que son llevados por el río Teaone.

1.3.1. Río Guayas-Calidad del Agua

El río Guayas recorre una distancia de 50km antes de llegar al Golfo de Guayaquil. Se forma por los ríos Daule y Babahoyo ⁽²²⁾.

La explosión demográfica, así como el rápido crecimiento industrial de Guayaquil ha aumentado el volumen de aguas residuales mucho más allá de la capacidad de los servicios de la infraestructura existente, alterando así las condiciones físico-químicas de los cuerpos de agua que los reciben. Los valores de oxígeno disuelto están entre 2.7 y 4.7mgO₂/l, con los valores más altos se encuentran en la zona adyacente al río Babahoyo, lejos de la influencia de las zonas pobladas; en cambio en el río

Daule donde se vierten los escombros de Guayaquil, los niveles de oxígeno disminuyen a menos de 2.7mg O₂/l (22).

La cantidad de hidrocarburos disueltos y/o coloides encontrados en los cursos más bajos de los ríos Babahoyo, Daule y Guayas variaron entre 0.10 µg/l y 2.80µg/l. El valor más alto se registró de una muestra tomada en el río Guayas después del derrame de petróleo de un buque comercial (22).

1.3.2. Estero Salado-Calidad del Agua

El Estero Salado es una entrante de mar que se extiende desde el Canal del Morro en el sur y para Guayaquil en el norte. Su profundidad varía desde los 5 a 10 metros. Las mareas diarias son de aproximadamente 3m de alto en el Canal del Morro, 3.5m en Puerto Nuevo en Guayaquil y 4m en las inmediaciones de la Universidad de Guayaquil (22).

Los efluentes de aguas residuales entran al Estero Salado, a razón de aproximadamente 100 l/seg., lo que equivale a 81,640 m³ en 24 horas. Desde el canal del Morro a lugares cercanos de Guayaquil, los niveles superficiales de oxígeno fluctúan entre 3 y 4.7mg O₂/l (22).

Los niveles de hidrocarburos solubles y/o coloides fueron relativamente bajos en las muestras tomadas del Estero Salado

cerca de Guayaquil. De hecho, las muestras tomadas en todo el Estero Salado mostraron valores inferiores a $2\mu\text{g/l}$, excepto en las muestras tomadas cerca de derrames ocasionados por buques comerciales ⁽²²⁾.

Sin embargo, han encontrado valores extremadamente altos en el Estero del Muerto, una sección del Estero Salado donde los buques comerciales toman el crudo ⁽²²⁾.

1.3.3. Ríos de Esmeraldas-Calidad del Agua

Los principales cuerpos de agua en la zona son los ríos Esmeraldas y Teaone (Fig. 1) los cuales son alimentados por pequeños riachuelos que pueden llegar a ser significativos en su caudal durante la época de lluvias. Igualmente, es importante mencionar que la contaminación urbana y agrícola es notable en la zona ⁽²³⁾.

El río Teaone (Fig. 2) es de menor caudal que el río Esmeraldas, pero por circular cerca de la refinería Esmeraldas, aumenta su grado de vulnerabilidad, por lo que se le ha categorizado como de alta sensibilidad en función de la calidad de agua ⁽⁴⁾.



Fig. 1. Principales afluentes de la Provincia Esmeraldas.

Fuente: El Comercio 20/07/2011 ⁽²⁴⁾



Fig. 2. Mancha de Crudo en río Teaone

Fuente: La Hora Nacional 14/02/2011 ⁽²⁵⁾

La quebrada Wínchele tributario del río Esmeraldas ha sido destacada como de alta sensibilidad a problemas de erosión y deslizamientos por acumulación de agua y por los derrames de crudo ocurridos durante 1998 y 1999, que le han convertido en una zona de alto riesgo. Más de 700 barriles de crudo fueron derramados el 31 de marzo de 1999, impactando los cuerpos de agua de la zona ⁽²³⁾. La refinería sistemáticamente descarga sustancias tóxicas de refinación de petróleo todos los días, esta cuenca hidrográfica en la actualidad enfrenta serios problemas de contaminación ⁽²⁴⁾.

La refinería, contribuye con niveles altos y variables de hidrocarburos aromáticos encontrándose los valores más altos (28,47 y 33,72 mg/l) durante la noche y madrugada, cabe

anotar que este valor disminuye cuando se diluye con el caudal del río ⁽²³⁾.

Los ríos son las principales fuentes de agua dulce superficial. A pesar que esta agua dulce es abundante, la contaminación del agua es problema serio, especialmente cerca de las áreas pobladas. La contaminación biológica y química de los suministros de aguas superficiales se han extendido en su mayoría, y las condiciones de abastecimiento de agua con frecuencia se ve agravada por el crecimiento de la población ⁽²¹⁾.

El crecimiento económico del Ecuador entre 1970 y 1980, junto con el desarrollo industrial y tecnológico, y, el aumento acelerado de la población produce graves efectos ecológicos. La aplicación de los detergentes de uso doméstico, metales pesados en la industria, los insecticidas en la agricultura y los hidrocarburos en la producción petrolera (como es el caso de la cuenca amazónica y esmeraldas), para el transporte y otros usos, aumentaron considerablemente, siendo estas las principales fuentes de contaminación. Los efectos de estas sustancias en el medio ambiente llevó a la comunidad científica

a investigar los niveles de estos materiales en los cuerpos de agua que reciben los residuos domésticos e industriales de los centros de mayor población del país ⁽²²⁾.

1.4. Descripción de tilapia nilótica

1.4.1. Características generales

La tilapia pertenece a la familia Cichlidae, esta familia es una de las más importantes de la ictiofauna¹¹ dulce-acuícola ⁽²⁶⁾. Debido a su facilidad de adaptación se encuentran actualmente distribuidos en la mayoría de los países tropicales y Subtropicales, como América Central, sur del Caribe, sur de Norteamérica, el sudeste Asiático, Medio Oriente y África. Trewawas (1982) clasifica a las tilapias en cuatro géneros según sus hábitos reproductivos: *Oreochromis* (Fig. 3), *Sarotherodon*, *Tilapia* y *Danakilia* ⁽²⁷⁾.



Fig. 3. Juvenil de tilapia nilótica (*O. niloticus*). **Fuente:** Bravo, E. 2007 ⁽²⁰⁾

¹¹Es el conjunto de especies de peces que existen en una determinada región biogeográfica.

1.4.2. Taxonomía

Tabla III. Descripción taxonómica de tilapia nilótica (*O. niloticus*). **Fuente:** Barrera, R. y Paz, C. 2006 ⁽²⁸⁾.

Tilapia nilótica	
Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Superclase	Gnathostomata
Serie	Pisces
Clase	Actinopterygii
Orden	Perciforme
Suborden	Percoide
Familia	Cichlidae
Género	<i>Oreochromis</i>
Especie	<i>Oreochromis niloticus</i>

1.4.3. Estructura y Biología

Cuerpo comprimido lateralmente alargado, escamas cicloideas¹². Perfiles superiores e inferiores casi igualmente convexos. Posee 27 a 33 branquiespinas¹³, en el primer arco branquial ⁽²⁶⁾. Para su locomoción posee aletas pares e impares, las pares: pectorales y ventrales y las impares: dorsal con 16 a 17 espinas y 11 a 15 radios blandos¹⁴, aleta anal con 3

¹²Son de forma ovalada, están imbricadas unas con otras, es decir que la parte anterior de una escama está por debajo de la parte posterior de la otra. Además el borde posterior de estas escamas es liso.

¹³Permiten a los peces extraer las impurezas del agua, impidiendo así que éstas se obturen. Además, en los peces planctónicos, las partículas recogidas en las branquiespinas pasan directamente al estómago.

¹⁴Los radios son generalmente suaves, flexibles, divididos en segmentos, y pueden ser ramificados. Esta segmentación de radios es la diferencia principal que los separa de espinas dorsales.

espinas y los radios son de 10-11 y aleta caudal truncada y posee fuertes bandas verticales de color negro (28). La boca es protráctil¹⁵, mandíbula ancha, a menudo bordeada por labios gruesos con dientes cónicos y en algunas ocasiones incisivos, en otros casos puede presentar un puente carnosos (freno) que se encuentra en el maxilar inferior, en la parte media debajo del labio (27). Los machos maduros tienen pigmentación gris o rosada en la región de la garganta.

Color variable según la distribución: gris plateado uniforme con matices violeta en los flancos, aleta dorsal y aletas pectorales rojizas; varias bandas transversales en los peces jóvenes. Durante la época de reproducción estos colores se acentúan (26).

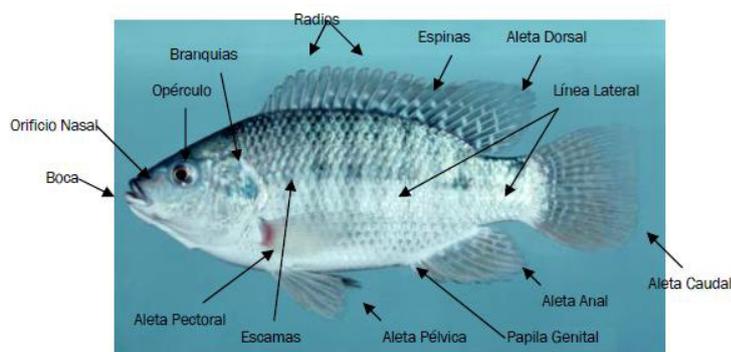


Fig. 4. Estructura anatómica externa de *O. niloticus*. **Fuente:** Sincoagro, 2009 (27).

¹⁵Boca en la que al abrirse, la mandíbula y el maxilar se proyectan hacia fuera formando un tubo cerrado lateralmente por las membranas intermandibulares.

La coloración es a menudo un método poco fiable para distinguir a las especies ya que el medio ambiente, el estado de su maduración sexual y la fuente de alimento, influyen en gran medida la intensidad del color (28).

El dimorfismo sexual¹⁶ de la tilapia nilótica, en el caso de los machos, la papila genital presenta un solo orificio, que es la uretra; mientras que las hembras, presentan dos orificios: la uretra y una ranura horizontal denominada oviducto genital (29).

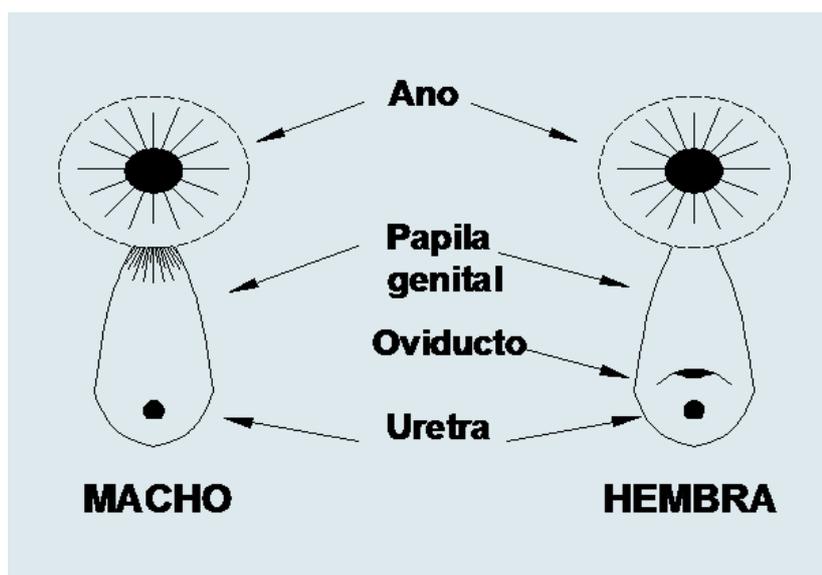


Fig. 5. Dimorfismo sexual, genitales de tilapia *O. niloticus*.

Fuente: Marcillo, E. y Landívar, J. 2008 (29).

¹⁶Definido como las variaciones en la fisonomía externa, como forma, coloración o tamaño, entre machos y hembras de una misma especie.

1.4.4. Alimentación

Es un pez omnívoro, que se alimenta en ambientes naturales de una amplia variedad de ítems, desde plancton, organismos bentónicos, invertebrados de la columna de agua, larvas de peces, detritus¹⁷, etc., los juveniles, también consumen un amplio rango de alimentos tanto de fitoplancton, zooplancton así como pequeños crustáceos (27), aunque no son piscívoras, pueden abastecerse, ocasionalmente, de larvas de peces e inclusive de las propias (30). Si bien esta especie no ingiere activamente vegetales superiores como otras, puede limitar su crecimiento cuando es cultivada en estanques (31).

Los peces buscan invertebrados durante el día e ingieren principalmente aquellas bacterias contenidas en la materia orgánica en descomposición (14).

Los juveniles grandes y los adultos son muy territoriales y la turbidez del agua reduce su agresividad (14).

1.4.5. Reproducción

Lo necesario para la reproducción de tilapia es un estanque con fondo arenoso y suelto, los machos en todos los casos y en

¹⁷Son residuos, generalmente sólidos permanentes, que provienen de la descomposición de fuentes orgánicas (vegetales y animales).

forma natural, comienzan a cavar hoyos en el fondo de los cuerpos de agua donde habitan, aproximadamente de 35cm de diámetro por 6cm de profundidad ⁽¹⁴⁾ ⁽²⁶⁾.

La hembra es atraída hacia el nido en donde es cortejada por el macho. La hembra deposita sus huevos (700 a 1000 huevecillos) en el nido, para que inmediatamente después sean fertilizados por el macho (Fig. 6) ⁽²⁶⁾ ⁽³⁰⁾.



Fig. 6. Proceso reproductivo de *O. niloticus*. **Fuente:** Saavedra, M. 2006⁽³¹⁾.

La hembra recoge a los huevos fertilizados con su boca y se aleja del nido (Fig. 7) ⁽³⁰⁾. Antes de la eclosión los huevos son incubados de 3 a 5 días dentro de la boca de la hembra. Las larvas al nacer quedan en la cavidad bucal hasta la reabsorción de su vesícula vitelina¹⁸ y buscan a menudo refugio durante varios días, hasta después de inflar su vejiga natatoria ⁽²⁶⁾ ⁽³¹⁾.

¹⁸Embriología; llamada también saco vitelino, es aquella estructura que les provee de alimento suficiente durante las 24 horas siguientes a la eclosión.

Las hembras no se alimentan durante los períodos de incubación y cuidado de las larvas (31).

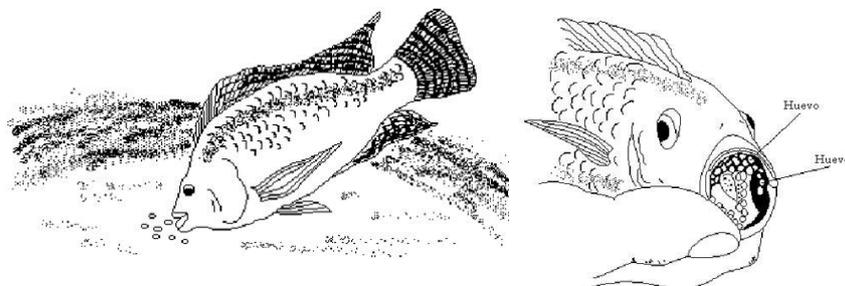


Fig. 7. Hembra de *O. niloticus* recoge los huevos fertilizados. **Fuente:** Saavedra, M. 2006 (31).

Después de esto los alevines¹⁹ salen (dura de 10 a 15 días), y, en éste período si los alevines se separan de la madre podrán valerse por sí solos (siendo la función de ésta etapa de protección contra los predadores). Las tilapias jóvenes maduran de los 2 a 3 meses y deben medir de 6 a 10cm de longitud, en adelante se reproducen cada 3 o 6 semanas, cuando el agua es templada; cuando la temperatura llega a los límites de tolerancia la actividad reproductiva se suspende (14) (26).

1.4.5.1. Hábitos Reproductivos

Es una especie muy prolífera, a edad temprana y tamaño pequeño. Se reproduce entre 20 - 25 °C (trópico). El huevo de mayor tamaño es más eficiente para la

¹⁹Se les designa así a las crías recién nacidas de peces.

eclosión y fecundidad ⁽³¹⁾. Permanece en cardúmenes mientras las condiciones no sean favorables para la reproducción. Los machos se separan y establecen territorios que defienden, la temporada de desove²⁰ es todo el año a intervalos de 30 a 60 días, acentuándose en marzo, mayo y septiembre. La incubación y cuidados están a cargo de la hembra, la tilapia nilótica es del grupo de peces con incubación bucal (Fig. 8) ⁽²⁶⁾.

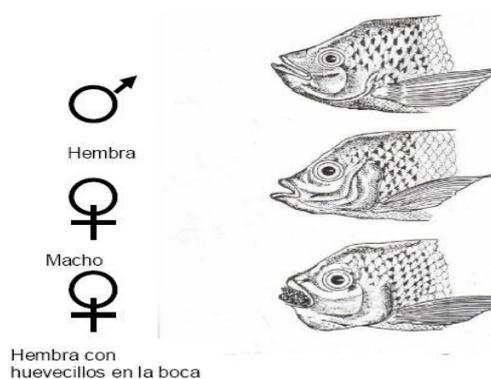


Fig. 8. Diferencias en boca de machos y hembras de *O. niloticus*.

Fuente: Saavedra, M. 2006 ⁽³¹⁾.

1.4.6. Ecología

Es un cíclido de aguas lénticas, someras, claras o turbias, prefiere aguas cálidas, de fondo lodoso, tolera altas salinidades, incluso las marinas ⁽¹⁴⁾ ⁽²⁶⁾. Generalmente permanecen en zonas

²⁰Puesta de huevos o huevas de los peces.

no muy profundas, cercanas a la orilla, donde construyen sus nidos, los mismos que consisten en una excavación en forma de cráter, cuyas dimensiones varían dependiendo de la longitud del pez ⁽²⁹⁾.

1.4.7. Requerimientos Ambientales

Las tilapias son más tolerantes que la mayoría de peces de agua dulce cultivadas ⁽³⁰⁾. Los requerimientos ambientales más importantes que se toman en consideración en los procesos de reproducción de estos peces se detallan a continuación ⁽²⁹⁾:

1.4.7.1. Salinidad

La mayoría de las especies de tilapias son eurihalinas y pueden vivir en aguas salobres, mientras que otras variedades viven en agua del mar, niveles sobre los 10ppt no son recomendables para la reproducción de *O. niloticus* ⁽²⁹⁾.

1.4.7.2. Temperatura

Las temperaturas letales se ubican entre los 10-11 °C. Su alimentación cesa y las enfermedades o muertes se producen cuando se las maneja por debajo de los 16-17°C. Cuando la temperatura excede los 37-38°C se producen también problemas por estrés ⁽³⁰⁾. La

reproducción de tilapias se da entre 22-32°C, el rango óptimo es de 26-29°C ⁽²⁹⁾.

1.4.7.3. Concentración de Oxígeno disuelto (OD)

Es uno de los parámetros más importantes dentro de los procesos de reproducción. La tilapia, se desarrolla normalmente en concentraciones de 5mg/L. Además tienen la facultad de reducir el consumo de oxígeno cuando las concentraciones del medio son bajas e inferiores a 3mg/L. En estas condiciones el pez disminuye su metabolismo ⁽²⁹⁾.

1.4.7.4. pH del agua

Rangos entre 6.6-7.5 son óptimos; sin embargo, los valores por debajo de 4 y superiores a 11 reducen la supervivencia de los peces. Lecturas de pH entre 4.5-5.5 no permite la reproducción ⁽²⁹⁾.

1.4.8. Valor Comercial

Entre todas las especies pertenecientes al denominador común de tilapias, la “tilapia del Nilo o tilapia nilótica” es la de mayor conocimiento y producción a nivel mundial, junto al híbrido de “tilapia roja”. Por lo tanto, el género *Oreochromis* es el que se

considera de mayor importancia dentro de los cultivos comerciales existentes ⁽³¹⁾.

El beneficio de la producción de tilapia en el ingreso por hogar puede ser mayor dado a la mayoría de tilapia cultivada por pequeños productores en países tropicales relativamente pobres para consumo domestico, comercio local e internacional. La tilapia se ha convertido en un producto importante en el comercio internacional ⁽²⁷⁾.

1.5. Descripción Morfológica e Histológica de Branquias e Hígado

Las branquias son los órganos respiratorios en los peces, encargados de realizar el intercambio gaseoso. El hígado en los peces realiza funciones tanto hepáticas como pancreáticas; es el órgano metabolizador por excelencia de todas las sustancias que le llegan por vía sanguínea ⁽³²⁾.

1.5.1. Branquias

En todos los peces, las branquias se encuentran situadas bilateralmente en el cuerpo, se componen de dos arcos branquiales en los cuales se hallan los filamentos (laminillas primarias) que se disponen de manera opuesta en la base de un arco branquial, branquiespinas, entre otras. En las dos caras del filamento se disponen perpendicularmente las laminillas

secundarias respecto al mismo, recorriendo cada superficie de él, de lado a lado. El tejido conectivo del filamento está compuesto por diferentes tipos celulares, este tejido está recubierto por un epitelio plano simple y así forman la mucosa. Inmediatamente por debajo de su epitelio se observa su vaso sanguíneo con eritrocitos. Cada lumen capilar es delimitado y separado por células con capacidad retráctil, que se apilan formando canales; llamadas Células Pilares (CP) ⁽³³⁾. En la base de las lamelas se encuentran las células cloro, son osmoreguladoras²¹, rica en mitocondrias, secreta NaCl participando en el balance ácido base y procesos de aclimatación ⁽³²⁾.

1.5.2. Hígado

En la tilapia el hígado se localiza en la región media y anterior de la cavidad abdominal, se divide en lóbulos que se relacionan con el intestino a lo largo de la cavidad ⁽³²⁾. Su tamaño, forma y volumen se adaptan al espacio disponible entre otros órganos viscerales. El hígado de la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) es un órgano grande y sólo tiene dos lóbulos (Fig. 9).

El lóbulo izquierdo es más grande y se extiende a lo largo de

²¹Los peces de agua dulce viven en un medio hipotónico por lo que el agua tiende a entrar en su cuerpo de forma continua por ósmosis y a través de las branquias. Por ello, tienen que eliminar el exceso de agua, para lo cual los riñones reabsorben las sales pero muy poca agua, con lo que la orina está muy diluida y es abundante.

casi toda la cavidad. En la cara visceral presenta la impresión del intestino. La vesícula biliar está bien desarrollada y tiene una forma redondeada.

El parénquima hepático está formado por los hepatocitos ⁽³⁴⁾, que son células poliédricas grandes con un núcleo redondo ⁽³²⁾ y se extienden como cordones anastomosados dispuestos en dos capas celulares y cercados por sinusoides ⁽³⁴⁾, que está constituido por endotelio y lámina basal ⁽³²⁾.

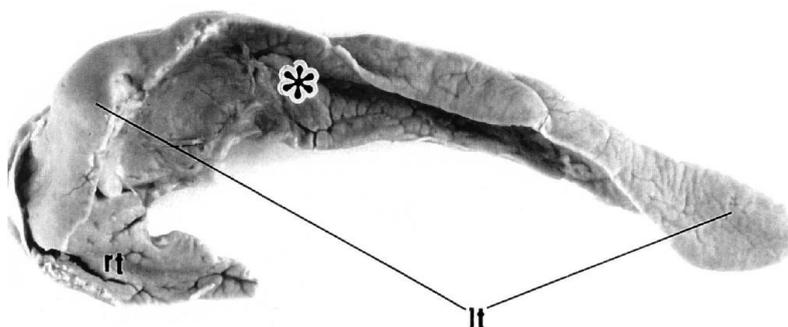


Fig. 9. Hígado de *O. niloticus* mostrando dos lóbulos hepáticos: derecho (rt) e izquierdo (lt). **Fuente:** Vicentini, C. et al. 2005 ⁽³⁴⁾

1.6. Técnicas Histológicas

Se llama técnica histológica a la serie de pasos que han de darse para obtener un preparado observable con el microscopio óptico. Es un proceso largo que abarca desde el momento en que se toma el material hasta que el preparado puede observarse ⁽³⁵⁾.

La histología²² en peces es un campo no investigado suficientemente. Las diversas alteraciones histológicas que pueden observarse en los peces como resultado de distintas situaciones (edad, stress, infecciones, parásitos, sustancias tóxicas como manifestaciones carenciales, etc.) (36).

1.6.1. Toma de material

El material ha de ser de un animal sano y normal. Si es posible debe extraerse de un animal vivo y anestesiado, en caso contrario, al menos han de extraerse él o los órganos sanos lo más rápidamente posible después de la muerte. En la técnica histológica muchos componentes texturales se pierden durante los sucesivos pasos de la misma (35).

En cuanto la sangre deja de llevar oxígeno a los tejidos y de extraerles el anhídrido carbónico, las enzimas²³ de las células que componen los tejidos comienzan a actuar y se produce la autólisis²⁴, las propias estructuras moleculares son deformadas, que es lo que precisamente se evita. Los tejidos y órganos se han de extraer considerando las siguientes prioridades (35):

²²Es la ciencia que estudia todo lo referente a los tejidos orgánicos: su estructura microscópica, su desarrollo y sus funciones.

²³Consideradas como unidad fundamental de la vida, son moléculas proteicas que tienen el poder de catalizar, facilitar, y agilizar determinados procesos sintéticos y analíticos

²⁴Es un proceso biológico por el cual una célula se autodestruye, ya sea porque no es más necesaria o porque está dañada y debe prevenirse un daño mayor.

- Las glándulas exocrinas y endocrinas lo más rápidamente posible.
- El páncreas y el riñón deben extraerse no más de 10 a 15min post-mortem.
- Otros órganos tales como intestino delgado y/o grueso, estómago, hígado, se deben extraer no más allá de los 30 min.
- Los músculos esqueléticos, huesos, piel, encéfalo, médula, ganglios nerviosos no deben extraerse más allá de 60min post-mortem.

La cantidad de líquido fijador debe ser aproximadamente 10 a 20 veces el volumen de la muestra. Los fragmentos de órganos no deben ser mayores de 1 cm de espesor; deben ser tomados en ángulos rectos a la superficie de los órganos y deben ser suficientemente profundos para comprender los constituyentes anatómicos normales. A veces pueden cortarse trozos de órganos de mayor tamaño, 2 o 3 cm y luego de algunas horas en fijador, las piezas serán más fáciles de manejar, después se realizan cortes más pequeños de los mismos ⁽³⁵⁾ ⁽³⁶⁾.

1.6.2. Fijación

La fijación es una operación destinada a “matar” las células, conservándolas, cuanto sea posible en el estado en que están

durante la vida. Es una técnica que permite analizar las características de las células (químicas y morfológicas) y los tejidos después de la muerte ⁽³⁵⁾.

El verdadero papel de la fijación es el de producir una coagulación o una precipitación lo más completa posible, Una buena fijación debe ⁽³⁵⁾:

- Inmovilizar la célula
- Conservar exactamente todas las partes constitutivas.
- No hacer aparecer artificialmente otros detalles en la estructura.

La fijación debe hacerse muy cuidadosamente antes de proceder a la deshidratación ⁽³⁶⁾.

1.6.2.1. Fijador

Los fijadores son sustancias de composición variable, orgánicas o inorgánicas y que pueden ser simples o formados por la mezcla de varias sustancias (compuestos) ⁽³⁶⁾.

Al sumergir un trozo de tejido en el fijador, todas las células no mueren instantáneamente al mismo tiempo, por lo que pueden producirse alteraciones a la falta de oxígeno, cambios de pH, etc. Como el fijador penetra por

difusión²⁵, las células periféricas se fijan mejor y más rápidamente que las del centro (36).

1.6.2.2. Cualidades del Fijador

El fijador ideal sería aquel que conservase la célula en un estado idéntico al estado viviente, este fijador en realidad no existe, por eso debemos buscar una serie de cualidades en el fijador a utilizar que nos acerquen lo más posible al “ideal”. Para que una sustancia sea un buen fijador debe presentar las siguientes características (35) (36):

- Gran poder de penetración: de esta manera el líquido puede fijar muy bien las zonas más profundas e igualmente las capas superficiales.
- Que actúe rápidamente precipitando (coagular) el coloide celular, sin causar alteraciones morfológicas.
- Deben presentar un pH generalmente ácido, ya que los fijadores alcalinos provocan alteraciones
- No deben entorpecer los métodos de inclusión, microtomía y coloración.

²⁵Es el movimiento neto de sustancia (líquida o gaseosa) de un área de alta concentración a una de baja concentración.

1.6.2.3. Agentes fijadores

Los fijadores se pueden clasificar de la siguiente manera

(36):

a) Físicos

- Calor: Ejerce una acción muy diferente según se aplique a objetos secos o húmedos
- Frío: Endurece los tejidos y suspende las alteraciones celulares debidas a la necrosis y a la autodigestión.

b) Químicos

- Simples (cuya fórmula es una solución fijadora): ácido acético, ácido ósmico, ácido pícrico, alcohol etílico, formaldehido, etc.
- Compuestos (cuya fórmula presenta varias soluciones fijadoras. Se utilizan para técnicas de rutina o para técnicas especiales, entre ellas: de von Tellyesniczki²⁶, de Bouin²⁷, de Carnoy²⁸.

²⁶Formada por: bicromato de potasio (3g) ácido acético (5cc.) y agua destilada (100cc), el bicromato conserva bien el citoplasma. El ácido acético conserva bien los núcleos.

²⁷Componentes: solución saturada de ácido pícrico 15cc, formol 40% 5cc y ácido acético 1cc. Es uno de los mejores fijadores para el estudio del glucógeno.

²⁸ Componentes: alcohol etílico (60ml), cloroformo (30ml) y ácido acético glacial (10 ml). Este fijador es muy adecuado para pequeños fragmentos tisulares, también inicia la deshidratación, es un buen fijador para el glucógeno, los núcleos se tiñen bien.

Los fijadores pueden ser a base de alcohol, formol, sales de cromo, bicloruro de mercurio y otros. Es muy importante saber elegir el fijador, según el tejido que se va a trabajar, ya sea vegetal o animal, histológico o citológico, si el resultado lo queremos específico sobre determinadas estructuras celulares, o bien si la observación es con microscopio óptico o electrónico ⁽³⁵⁾.

1.6.2.4. Conservación morfológica de los Tejidos

Una acción rápida y enérgica del reactivo impide bien las alteraciones espontáneas post-mortem, pero este modifica también la estructura celular ⁽³⁵⁾.

Los mejores fijadores son los que además de actuar rápidamente producen el menor número posible de reacciones (modificaciones) secundarias o artificios, capaces de darnos una idea muy falseada de la morfología interna de la célula. Un tejido bien fijado mostrará células plenas, no vacuolizadas, ni hinchadas, ni arrugadas, sino presentando muchos detalles de estructura fina. Debe endurecerlos suficientemente para permitirles resistir sin deformarse, todas las

manipulaciones subsiguientes (deshidratación, inclusión, cortes, etc.) ⁽³⁵⁾.

1.6.3. Deshidratación

Los tejidos contienen grandes cantidades de agua, tanto intracelular como extracelular, que debe ser eliminada y reemplazada por parafina ⁽³⁵⁾.

- **Detención de la fijación**

Una vez transcurrido el tiempo de fijación deseado es preciso detenerlo rápidamente. El fijador que rodea la pieza puede ser eliminado por lavado en ⁽³⁵⁾: agua y alcohol.

La deshidratación se realiza por medio de un reactivo anhidro pero ávido de agua. Puede utilizarse la acetona o el alcohol etílico (es el más utilizado), esta se hace en forma progresiva con sucesivos baños de alcohol, cada vez menos hidratados 70%– 80%– 90%– 96%– 100% ⁽³⁵⁾ ⁽³⁶⁾.

A continuación los tiempos de permanencia en cada líquido:

Alcohol 70 ————— las piezas pueden permanecer varios días.

Alcohol 96 ————— 2 baños en un lapso de 24 h.

Alcohol 100 ————— 3 baños de una hora c/u.

- **Preparación para la inclusión**

El aclaramiento o desalcoholización permite que el alcohol de los tejidos sea reemplazado por un líquido (solvente) que disuelva la parafina con la cual el tejido va a ser impregnado. La palabra aclarar proviene además de eliminar el alcohol muchas de estas sustancias tienen la propiedad de transparentar los tejidos ⁽³⁵⁾.

Entre los solventes más utilizados tenemos: Benceno – xileno – tolueno – cloroformo – fenol en alcohol – carbolxilol – etc. ⁽³⁵⁾.

1.6.4. Inclusión

Las piezas fijadas antes de proceder a cortarlas deben ser incluidas en medio plástico (parafina), debe ser lo más neutro posible en la inclusión, no se trata de un simple englobamiento, sino que debe haber una verdadera impregnación a nivel celular ⁽³⁶⁾. En la técnica de inclusión, la pieza debe someterse a una serie de tratamientos sucesivos, cada uno de los cuales

está destinado a preparar la penetración del siguiente y en eliminar el anterior. Cada disolvente debe ser miscible con el que le ha precedido y con el que le sigue ⁽³⁶⁾.

Si la inclusión se hace en un medio no hidrosoluble, el material debe estar totalmente deshidratado, por lo que se someterá a sucesivos baños de alcohol de creciente concentración hasta que desaparezca el menor vestigio de agua. La graduación exacta de los alcoholes es de poca importancia a excepción del alcohol absoluto, así como la permanencia del material en cada uno de los baños, ya que depende de numerosos factores como tipo de pieza, grado de hidratación, etc. ⁽³⁵⁾.

1.6.4.1. Parafina

La parafina es un hidrocarburo sólido no cíclico, con escasa elasticidad que penetra en los tejidos, ocupando hasta sus últimos intersticios. Una temperatura mayor de 65°C llega a disolverla, existen parafinas que funden a distintas temperaturas, para la mayoría de los trabajos pueden utilizarse las que lo hacen a 56-58°C ⁽³⁵⁾.

El Tiempo de cada baño de parafina, depende un poco del tamaño de cada pieza. En cada recipiente pueden

estar de 2 a 3 h. La inclusión consiste en encerrar cada pieza dentro de un bloque de parafina pura (35).

1.6.5. Cortes

Como la finalidad de todos estos pasos es poder observar los tejidos con el microscopio, es necesario reducir las piezas histológicas a delgadas secciones (35).

Las secciones finas y parejas se obtienen con el micrótopo (Fig. 10). Este aparato consiste básicamente en una base pesada que soporta una superficie por la que se desliza una cuchilla, un tornillo que acerque el material y lo ponga al alcance del filo de la navaja, de modo que siempre su avance ofrezca la misma medida del material (35).



Fig. 10. Micrótopo y elaboración de cortes. Por Cristina Jines.

1.6.6. Tinción

El propósito de una tinción histológica es hacer fácilmente visibles estructuras histológicas. Además, permite diferenciar los componentes celulares (núcleo, citoplasma, gránulos secretorios, etc.). Según la técnica de coloración que escojamos podremos colorear los componentes que necesitemos observar. Para que el corte pueda ser teñido, debe estar completamente libre de parafina y suficientemente hidratado ⁽³⁵⁾.

1.6.6.1. Colorantes

Los colorantes son cuerpos químicos disueltos en agua destilada o a veces en alcohol. La parafina no se mezcla con ellos, como aquella ha penetrado en el interior de las células estas no podrán ser teñidas ⁽³⁵⁾.

La mayor parte de los colorantes artificiales (y aún los naturales como la hematoxilina), derivan de cuerpos incoloros, por ejemplo de carburos aromáticos. La coloración es la propiedad que tienen ciertos cuerpos de ejercer una absorción selectiva sobre la luz ⁽³⁵⁾ ⁽³⁶⁾.

1.6.6.2. Tipos de Tinciones

Existen dos tipos de tinciones ⁽³⁵⁾:

- a) Directas: Se producen por inmersión en el baño colorante.
- b) Indirectas: En este tipo de tinción, el colorante no puede actuar directamente, el objeto que colorea debe ser tratado de antemano por otra sustancia que prepare para admitir el colorante, esta se llama mordiente²⁹.

1.6.6.3. Clasificación de colorantes

Puede hacerse desde el punto de vista químico (por su naturaleza) o desde el punto de vista histológico (por su uso) ⁽³⁵⁾:

- Desde el punto de vista químico los colorantes se agrupan conforme a su constitución.
- Desde el punto de vista histológico se los clasifica en naturales y artificiales.

a. Colorantes naturales:

En todos ellos hay un colorante principal producido por la naturaleza que luego la técnica del hombre

²⁹ El mordiente es un intermediario entre el colorante y el tejido, en general entre dos cuerpos que químicamente carecen de afinidad. De alguna manera activa las moléculas del tejido y forma con ellas una unión firme y estable.

ha sabido extraer, componer y hacerlo efectivo, entre ellos ⁽³⁵⁾:

- Hematoxilina, es un polvo cristalino, casi incoloro o algo amarillento a veces más oscuro. Esta sustancia, como tal, aunque esté disuelta en agua o en alcohol de 96° o de 100°, es incapaz de colorear, para poder hacerlo, debe sufrir una oxidación. La hematoxilina oxidada es hemateína y bajo este cambio físico -químico y la unión con una base es capaz de colorear, la base es conocida como mordiente.
- Orceína: Es un colorante extraído de ciertos líquenes. Es un ácido débil. Utilizando una mezcla en que el ácido acético actúa como mordiente se utiliza para colorear cromosomas. También colorea las fibras elásticas.

b. Colorantes artificiales

Algunos son colorantes del núcleo y otros del citoplasma. Son sales producidas de la unión de

una base y un ácido. Se ha dividido a los colorantes según su afinidad que presentan con el núcleo o con el citoplasma ⁽³⁵⁾:

- Colorantes para el núcleo o básicos: Su base es la que se combina con los ácidos nucleicos, por lo tanto ésta es la coloreada. El ácido es el incoloro.
- Colorantes para el citoplasma o ácidos: El ácido del colorante es el que se combina con el citoplasma. La base es la incolora.
- Colorantes neutros: tanto el ácido como la base son coloreados.

CAPITULO II

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Localización

Este trabajo de investigación, para bioensayo se realizó en el laboratorio EPA³⁰ y Acuario del Instituto Nacional de Pesca (INP), mientras que los cortes histológicos de los especímenes se efectuaron en el Centro de Servicios para la Acuicultura (CSA).

³⁰ EPA- Laboratorio de Ensayos de Productos de uso Acuícola

2.2. Materiales y Equipos utilizados

2.2.1. Ensayo y toma de Muestra

Los recipientes de experimentación fueron acuarios rectangulares de vidrio con capacidad de 32L. Además utilizamos una red de nylon, alimento balanceado, mangueras plásticas, compresor de aire, piedra difusora, tijeras de disección, bisturí, frascos plásticos (60ml), Formalina (40%)³¹. Para pesar y medir los especímenes se usó una balanza eléctrica marca Scout Pro SP202 y un ictiómetro³² manual, respectivamente. La medición de los parámetros físicos tanto en aclimatación como en ensayo se ejecutó con el equipo Orion 5 Star.

2.2.2. Equipos-Histología

Para la parte histológica se manejó etanol a diferentes concentraciones, a más de lo anterior, xilol (100%), pinzas, vasos de precipitación (100ml), cassette histológicos³³, moldes de inclusión, embudo, porta-objetos, cubre-objetos,

³¹ La Formalina al 40% también llamada formol, es un líquido incoloro de olor penetrante y sofocante. Esta resulta de la disolución de formaldehído en agua con una proporción de alrededor del 40% en peso. Además contiene alcohol metílico como estabilizante.

³² Es un aparato de uso en Ictiología que permite cuantificar la longitud de los peces. Puede emplearse en el campo, con peces vivos o anestesiados, o en el laboratorio, sobre ejemplares fijados.

³³ Utilizados en las técnicas histológicas, llamados también cassette de inclusión, son totalmente resistentes a los disolventes orgánicos y a los agentes decalcificantes.

calentador de agua, colorante H&E³⁴, cubeta de tinción plástica, solución de resina marca Paradon, papel aluminio y caja portaobjetos. Los baños de parafina se efectuaron en el equipo Shandon Citadel 1000, mientras que los cortes fueron realizados en el micrótopo³⁵ Shandon AS325 al final se colocó los portaobjetos en una estufa electrotérmica.

2.2.3. Especies utilizadas

Para la ejecución del experimento se utilizó una población de *O. niloticus* (166 peces) que provienen de la empresa acuícola PRODUMAR S.A., ubicada en el km 8 1/2 vía Durán-Tambo, esta granja acuícola se encarga del mantenimiento y crianza de tilapias, las mismas que permanecen en ambientes libres de contaminantes.

2.2.4. Contaminante

Los ensayos se efectuaron con Diesel, midiendo los efectos para *O. niloticus* a diferentes concentraciones: 513mg/L dosis baja, 2050mg/L dosis media y 5125mg/L dosis alta. Se definió como criterio de muerte en la especie, la falta de movimiento en el agua del ejemplar.

³⁴ Tinción Hematoxilina y eosina, es el método de tinción más popular en histología.

³⁵ Es un instrumento de corte que permite obtener rebanadas muy finas de material histológico, conocidas como secciones.

2.3. Metodología

2.3.1. Aclimatación

Los organismos fueron sometidos a una aclimatación de nueve días bajo las mismas condiciones experimentales (Fig. 11), entre ellas, temperatura (21-26°C), oxígeno disuelto (>3mg/L), pH (7), conductividad³⁶ (95.7µS/cm), estos parámetros se tomaron durante toda la etapa del proyecto. La alimentación de los organismos fue a base de balanceado una vez por día durante el proceso de adaptación, concluido este período de prueba, los peces dejaron de ser alimentados 24 horas antes del inicio del ensayo.



Fig. 11. Peceras instaladas en el laboratorio EPA y Acuario del INP. Por Cristina Jines

³⁶ Es la capacidad de un medio (agua) para conducir la corriente eléctrica, es decir, para permitir el paso a través de las partículas cargadas como iones, los que transportan la carga en disoluciones de electrolitos.

2.3.2. Ensayo

Para este estudio se usó 128 peces, en etapa juvenil, machos, con un longitud promedio de 7.4cm y un peso promedio de 7.02g, donde se colocó de 10-11 especímenes en cada uno de los acuarios.

Se realizó un ensayo estático³⁷ con un periodo de 96 h, que inició el décimo día, con cuatro tratamientos designados como T1 (dosis baja), T2 (dosis media), T3 (dosis alta) y T4 (control o testigo³⁸). Estas dosis fueron calculadas utilizando la densidad del contaminante (Diesel) mediante la fórmula , $\rho = \frac{m (gr)}{V (ml)}$ valor de 0.82 g/L.

2.3.3. Diseño Experimental

Se utilizó en el laboratorio un diseño de **Bloques Completos al azar** con cuatro tratamientos y tres repeticiones.

2.3.3.1. Descripción de Tratamientos (Tabla IV)

En la siguiente tabla se mostró las diferentes dosis de forma ordenada tanto para concentración, tratamiento (T) y repetición (R).

³⁷ Son ensayos generalmente de corta duración en los que los organismos están durante todo el periodo de experimentación en el mismo medio.

³⁸ Es el tratamiento de comparación adicional.

Tabla IV. Descripción de los tratamientos estudiados.

Fuente: Cristina Jines.

N°	Concentración (mg/L)	Simbología
1	513	T1RI
2	513	T1RII
3	513	T1RIII
4	2050	T2RI
5	2050	T2RII
6	2050	T2RIII
7	5125	T3RI
8	5125	T3RII
9	5125	T3RIII
10	0	T4RI
11	0	T4RII
12	0	T4RIII

2.3.3.2. Esquema del análisis de Varianza³⁹ (Tabla V)

Tabla V. Análisis de varianza a partir del diseño experimental. Fuente: Cristina Jines

Fuente de Variación	Grados de Libertad
Tratamientos	3
Error Experimental	8
Total	11

2.3.1. Manejo del Experimento

Después de la aclimatación, se colocó en cada acuario 22L de agua potable, dejando que el cloro se evapore por 24h, se

³⁹ Es una colección de modelos estadísticos y sus procedimientos asociados, en el cual la varianza está particionada en ciertos componentes debidos a diferentes variables explicativas.

vertió diesel según las dosis en el agua, sin homogenización ni renovación periódica de ésta, con aeración continua y manteniéndose la temperatura a 24°C, aproximadamente (Fig. 12 a, b y c).

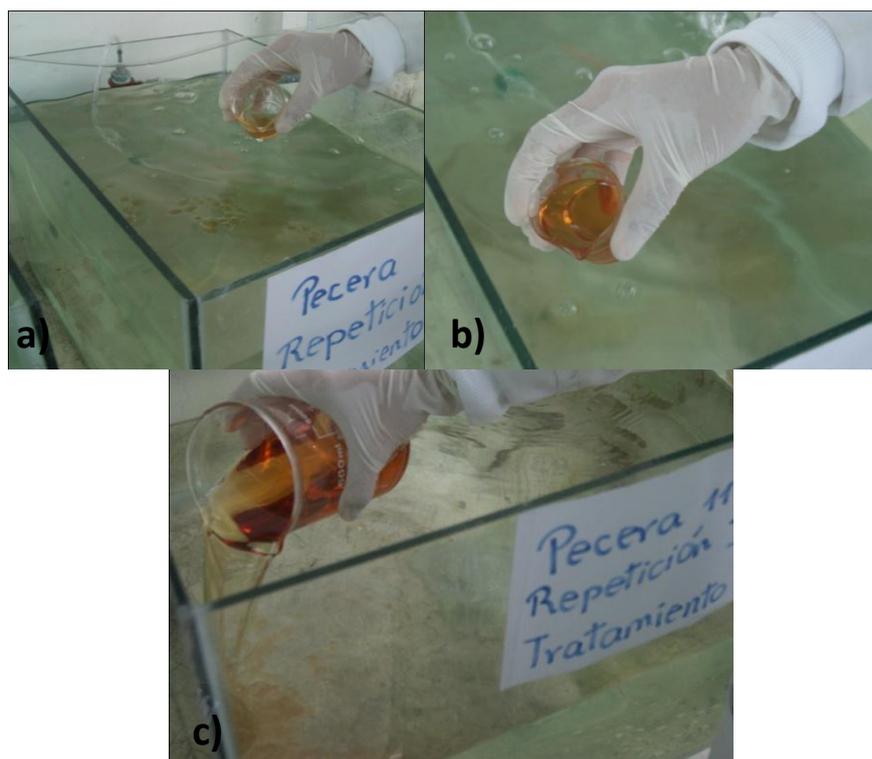


Fig. 12. a) Aplicación de la dosis baja; b) Aplicación de la dosis mediana y c) Aplicación de dosis alta. Por Cristina Jines.

Cada una de las peceras fueron monitoreadas durante las 96 horas (4 días) tanto en la mañana como en la tarde, para observar cualquier cambio en el comportamiento de los organismos. Asimismo se procedió a medir los parámetros físicos durante el ensayo (Fig. 13).



Fig. 13. a) Potenciómetro y b) Medición de parámetros en cada una de las peceras. Por Cristina Jines

Se efectuaron a las 24h, 48h, 72h y 96h⁴⁰ (37) las siguientes observaciones para *O. niloticus*: número de individuos muertos, pérdida de equilibrio, agresividad, letargo, falta de movimiento, pigmentación de ojos y piel.

2.3.2. Cortes Histológicos

2.3.5.1. Disección y Recolección de muestras

Los tejidos de peces fueron procesados por el método de (38). Se procuró que la toma de muestras de los especímenes⁴¹ sea durante un estado agónico o en la etapa de deceso. Para este proyecto se disecó tejido del segundo arco branquial⁴² izquierdo e hígado (Fig.14).

⁴⁰ Se determinó observaciones de comportamiento y mortalidad cada 24h por finalizar el ensayo de 96h (4 días).

⁴¹ Significa muestra o ejemplar.

⁴² Arcos óseos que forman parte de la estructura de la branquia, de cada arco branquial salen dos filas de filamentos branquiales y cada filamento lleva una serie de laminillas en donde tiene lugar el intercambio de gases.



Fig. 14. Disección lateral izquierda de *O. niloticus*. Por Cristina Jines.

Estas muestras fueron fijadas en frascos plásticos de 60ml con formalina buffer al 40% por 24 horas (Fig. 15).



Fig. 15. Conservación de branquias e hígado disecados en Formalina (40%). Por Cristina Jines

Luego de este procedimiento las muestras fueron cambiadas a etanol al 50%, inmediatamente se ubicaron en los cassettes histológicos, tanto tejido de hígado como branquias, para continuar con el siguiente paso (Fig. 16).

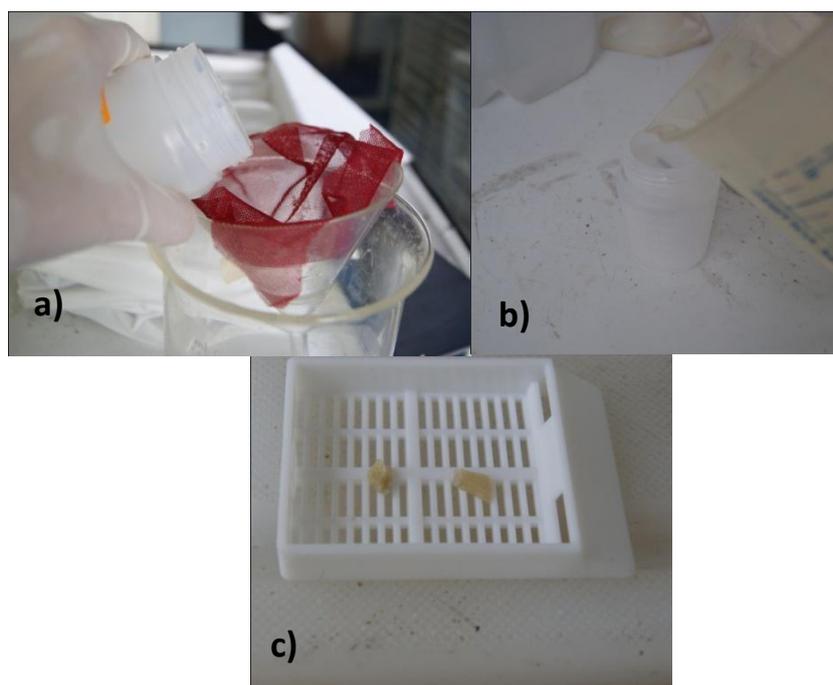


Fig. 16. a y b) Cambio de órganos disecados en Formalina (40%) a etanol (50%); c) Hígado y branquia colocados en cassettes histológicos. Por Cristina Jines.

2.3.5.2. Deshidratación

Para deshidratar las muestras, se procedió a lavarlas con etanol a diferentes porcentajes para eliminar el fijador, los lavados con el químico siguen un orden

sucesivo: (Fig. 17) etanol al 70%, etanol al 80%, etanol al 95% y dos lavados a etanol al 100%, todos se los hizo a intervalos de una hora cada uno, a excepción del último donde se dejó reposar las muestras durante toda la noche, cubiertos con papel aluminio.



Fig. 17. Baño de cassettes histológicos a diferentes porcentajes de etanol. Por Cristina Jines.

2.3.5.3. Inclusión

Al día siguiente, los cassettes fueron cambiados a 2 baños de xilol (100%) por una hora cada uno, transcurrido el tiempo se realizó dos baños de parafina de igual forma una hora cada uno (Fig. 18 a y b).





Fig. 18. a) Cassettes bañados en xilol; b) Cassettes en baño de parafina. Por Cristina Jines.

Sin dilación se empezó a formar los bloques en los cassettes en cuyo interior contenían los tejidos de los órganos anteriormente mencionados (Fig. 19 a y b).

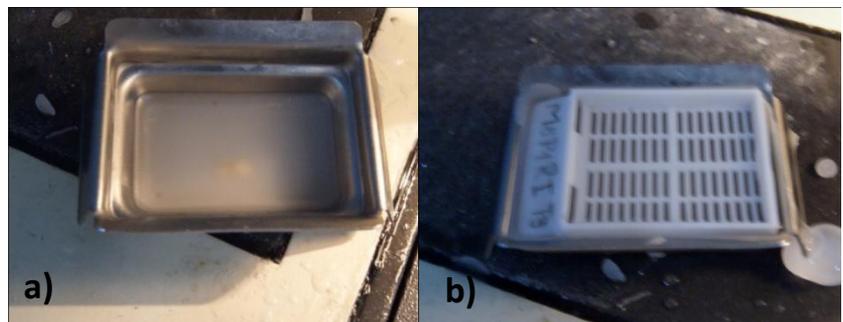


Fig. 19. Formación de los bloques, a) en moldes de acero y b) moldes etiquetados. Por Cristina Jines.

2.3.5.4. Cortes y Tinción

Una vez que la parafina se endurece, se elaboraron cortes de 5μ en el micrótomo Shandon Citadel 1000, los

cuales fueron colocados primero en un recipiente con agua fría, donde se recogió la lámina con un portaobjetos y se colocó en otro recipiente con agua caliente que ayuda a que el corte se pueda fijar en la placa, al final se dejó secar durante toda la noche en la estufa electrodérmica, procediendo al día siguiente con la tinción (Fig. 20 a, b y c).

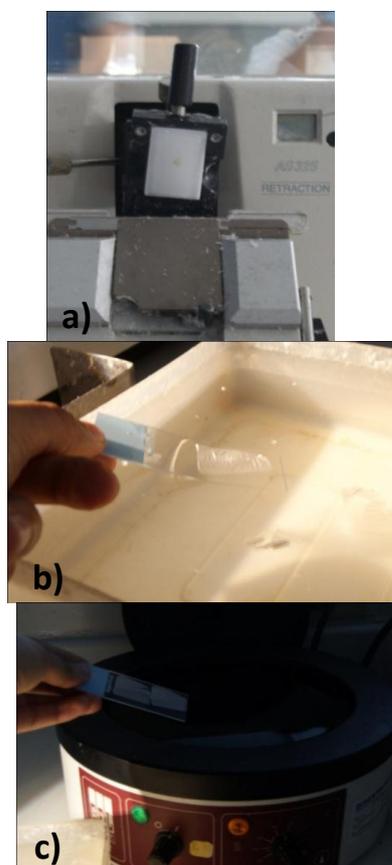


Fig. 20. Cortes y fijación de cortes a) Bloque colocado en el micrótopo posterior a realizarse los cortes; c y b) Los cortes fueron recolectados en portaobjetos y fijados a través de un medio frío y caliente. Por Cristina Jines.

Con la aplicación del método de tinción H&E de ⁽³⁸⁾, se procedió la tinción con dos baños de xilol por 5min cada uno para eliminar la parafina (Fig.21).



Fig. 21. Placas histológicas recibiendo baños de xilol 100%. Por Cristina Jines.

Inmediatamente se realizaron baños de etanol (Fig. 22a): 100% (2)⁴³, 95% (2), 80% (1), agua destilada, posteriormente se tiñeron las placas con hematoxilina (H) (Fig. 22b) y se retiró el exceso del colorante, a continuación se sumergieron las placas en etanol al 80%, para luego bañarlas en eosina (E) (Fig. 22c), finalmente se pasaron por baños de etanol siguiendo un orden contrario: 95% (2) y 100% (2).

⁴³El número 1 y 2 entre paréntesis significa una/dos veces se repite el baño de etanol en diferentes porcentajes.

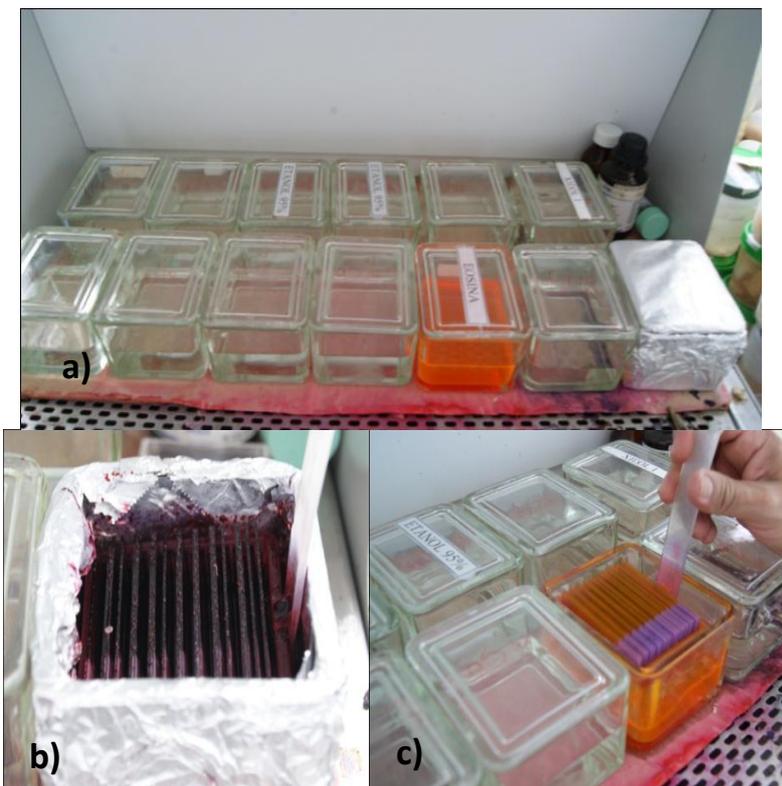


Fig. 22. Proceso de tinción. a) Recipientes de vidrio con etanol a diferentes porcentajes, agua destilada, hematoxilina y eosina. b) Placas durante la tinción con hematoxilina. c) Placas durante la tinción con eosina. Por Cristina Jines.

Para finalizar se ejecutó 2 baños de xilol y se cubrieron los cortes teñidos con cubre-objetos, con la ayuda de una solución de resina (Paradon), procurando eliminar cualquier tipo de desperfecto en la placa (Fig. 23 a, b, c y d).

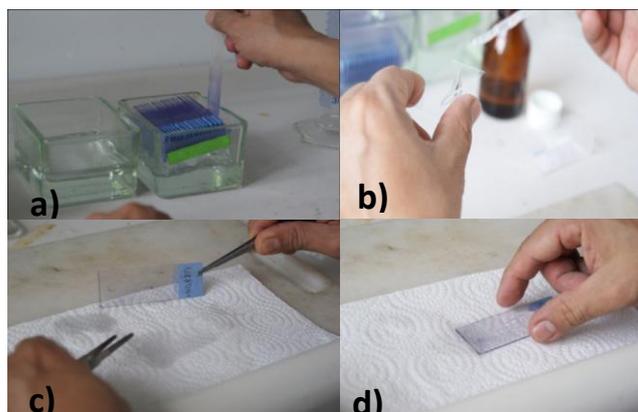


Fig. 23. Montado de placas histológicas. a) Baños de xilol 100%. b) Placa con resina para cubrir la muestra. c) y d) Secado y verificación de cualquier desperfecto en la placa. Por Cristina Jines.

2.4. Datos

Tabla. VI. Escala arbitraria (Vacuolización⁴⁴, Degeneración celular⁴⁵, Núcleos picnóticos⁴⁶ y Telangiectasis⁴⁷). Fuente: Cristina Jines.

Número escala	Valor Porcentaje %
1	0= Sin daño
2	25=Leve
3	75=Moderado
4	100=Severo

⁴⁴ Proceso de formación de vacuolas que tiene lugar en los procesos de degeneración celular.

⁴⁵ Destrucción total de las células que forman parte del arco branquial.

⁴⁶ Núcleo celular, cuya cromatina está extremadamente condensada debido a un proceso patológico.

⁴⁷ Es la pérdida de la integridad vascular de la branquia, causada por la ruptura de las células pilares o sus uniones. Esto trae como consecuencia la dilatación de los capilares y acumulación de eritrocitos.

Tabla VII. Daños histológicos más sobresalientes en branquias de *O. niloticus*. Fuente: Cristina Jines

TRATAMIENTOS	REPETICIONES (Tejido Branquias)																	
	I						II						III					
	Necrosis		X	Telangiectasis		X	Necrosis		X	Telangiectasis		X	Necrosis		X	Telangiectasis		X
	P1	P2		P1	P2		P1	P2		P1	P2		P1	P2		P1	P2	
T1(513mg/L)	25	0	25	0	50	25	25	25	25	0	12.5	0	25	12.5	25	25	25	
T2(2050mg/L)	50	75	62.5	25	25	25	75	75	75	25	25	25	50	75	75	50	25	37.5
T3(5125mg/L)	100	100	100	25	0	12.5	100	75	87.5	50	75	50	100	100	100	0	25	12.5
T4(Testigo)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla VIII. Daños histológicos más sobresalientes en hígado de *O. niloticus*.. Fuente: Cristina Jines

TRATAMIENTOS	REPETICIONES (Tejido Hígado)																	
	I						II						III					
	Vacuolización		X	Núcleos Picnóticos		X	Vacuolización		X	Núcleos Picnóticos		X	Vacuolización		X	Núcleos Picnóticos		X
	P1	P2		P1	P2		P1	P2		P1	P2		P1	P2		P1	P2	
T1 (513mg/L)	25	25	25	25	50	37.5	50	50	50	25	50	37.5	25	25	25	25	50	37.5
T2 (2050mg/L)	50	75	62.5	50	25	37.5	75	75	75	50	50	50	75	75	75	50	25	37.5
T3 (5125mg/L)	100	75	87.5	50	25	37.5	100	100	100	75	75	75	100	75	87.5	75	75	75
T4 (Testigo)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla IX. Muerte registrada en *O.niloticus* por tratamiento con cada una de sus repeticiones, durante 96 horas. Fuente: Cristina Jines

TIEMPO DE MUERTE Y REPETICIONES POR TRATAMIENTO									
24H									
TRATAMIENTOS	I		II		III		T (M)	X (V)	X (M)
	V	M	V	M	V	M			
T1 (513mg/L)	10	0	11	0	11	0	0	10.7	0
T2 (2050mg/L)	10	1	11	0	10	0	1	10.3	0.3
T3 (5125mg/L)	9	2	10	0	11	0	2	10	0.6
T4 (Testigo)	11	0	10	1	10	0	1	10.3	0.3
48H									
T1 (513mg/L)	10	0	11	0	11	0	0	10.7	0
T2 (2050mg/L)	10	0	11	0	7	3	3	9.3	1
T3 (5125mg/L)	5	4	9	1	11	0	5	8.3	1.7
T4 (Testigo)	11	0	10	0	10	0	0	10.3	0
72H									
T1 (513mg/L)	8	2	8	3	10	1	6	8.7	2
T2 (2050mg/L)	8	2	10	1	2	5	8	6.7	2.7
T3 (5125mg/L)	0	5	4	5	6	5	15	3.3	5
T4 (Testigo)	11	0	10	0	9	1	1	10	0.3
96H									
T1 (513mg/L)	1	7	4	4	5	5	16	3.3	5.3
T2 (2050mg/L)	1	7	0	10	0	2	19	0.3	6.3
T3 (5125mg/L)	0	11	0	4	0	6	21	0	7
T4 (Testigo)	10	1	9	1	7	2	4	8.7	1.3

Cambios en la especie *Oreochromis niloticus* causados por Diesel

No hay cambio-0%
 Cambio moderado-50%
 Cambio alto-100%

Tabla X. Cambios del Comportamiento en *O. niloticus* 24H después de iniciado el Ensayo. Fuente: Cristina Jines

TRATAMIENTOS	REPETICIONES Y CAMBIOS 24H																	
	Pigmentación de ojos			Pigmentación Del cuerpo			Agresividad			Perdida de Equilibrio			Letargo			Falta de Movimiento		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
T1(513mg/L)																		
T2(2050mg/L)																		
T3(5125mg/L)																		
T4(Testigo)																		

Tabla XI. Cambios del Comportamiento en *O. niloticus* 48H después de iniciado el Ensayo. Fuente: Cristina Jines

TRATAMIENTOS	REPETICIONES Y CAMBIOS 48H																	
	Pigmentación de ojos			Pigmentación Del cuerpo			Agresividad			Perdida de Equilibrio			Letargo			Falta de Movimiento		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
T1(513mg/L)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
T2(2050mg/L)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
T3(5125mg/L)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
T4(Testigo)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Tabla XII. Cambios del Comportamiento en *O. niloticus* 72H después de iniciado el Ensayo. Fuente: Cristina Jines

TRATAMIENTOS	REPETICIONES Y CAMBIOS 72H																	
	Pigmentación de ojos			Pigmentación Del cuerpo			Agresividad			Perdida de Equilibrio			Letargo			Falta de Movimiento		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
T1(513mg/L)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
T2(2050mg/L)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
T3(5125mg/L)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
T4(Testigo)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Tabla XIII. Cambios del Comportamiento en *O. niloticus* 96H después de iniciado el Ensayo. Fuente: Cristina Jines

TRATAMIENTOS	REPETICIONES Y CAMBIOS 96H																	
	Pigmentación de ojos			Pigmentación Del cuerpo			Agresividad			Perdida de Equilibrio			Letargo			Falta de Movimiento		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
T1(513mg/L)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
T2(2050mg/L)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
T3(5125mg/L)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
T4(Testigo)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Tabla XIV. Parámetros físicos tomados durante la Aclimatación. Fuente: Cristina Jines.

PARÁMETROS	RECIPIENTES											
	1 (T3-RI)	2 (T4-RII)	3 (T1-RIII)	4 (T4-RI)	5 (T2-RII)	6 (T3-RIII)	7 (T2-RI)	8 (T1-RII)	9 (T4-RIII)	10 (T1-RI)	11 (T3-RII)	12 (T2-RIII)
TEMPERATURA	24,4	24,4	24,2	24,1	24,2	24,1	23,4	23,8	23,9	23,8	24,3	24,3
Ph	6,99	7,37	7,32	7,29	7,18	7,00	7,12	7,66	7,44	7,24	7,10	7,51
CONDUCTIVIDAD	77,8	80,2	82,2	92,9	96,6	78,6	74,1	165,0	132,2	108,4	93,7	66,6
OXÍGENO (mg/L)	4,99	6,19	7,81	8,09	5,8	4,15	6,71	8,68	5,04	3,56	6,39	9,34
OXÍGENO (%Sat.)	60,8	74,2	93,5	95,6	69,5	49,1	79,7	104,5	60,9	43,2	76,0	112,0

Tabla XV. Parámetros físicos tomados durante el proceso de ensayo por tratamiento y repetición. Fuente: Cristina Jines.

TRATAMIENTOS	PARAMETROS														
	TEMPERATURA (°C)			pH			CONDUCTIVIDAD (µs/cm)			OXIGENO (mg/l)			OXIGENO (%Sat.)		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1 (513mg/L)	23.7	23.6	23.8	7.92	7.74	7.51	93.6	91	89.2	2.92	4.72	5.69	34.6	56	68.4
2 (2050mg/L)	23.5	23.9	24.4	7.57	7.53	7.30	144.1	159.4	79.2	0.85	4.3	5.7	10.2	51.8	68.7
3 (5125mg/L)	24	24	23.6	7.06	6.90	7.47	138.6	109.1	114.5	1.71	2.97	0.02	20.5	39.6	0.2
4 (Testigo)	23.9	24	23.7	7.56	7.81	7.57	141	83.6	119.6	6.15	6.22	7.96	74	73.4	94.1

CAPITULO III

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Comportamiento

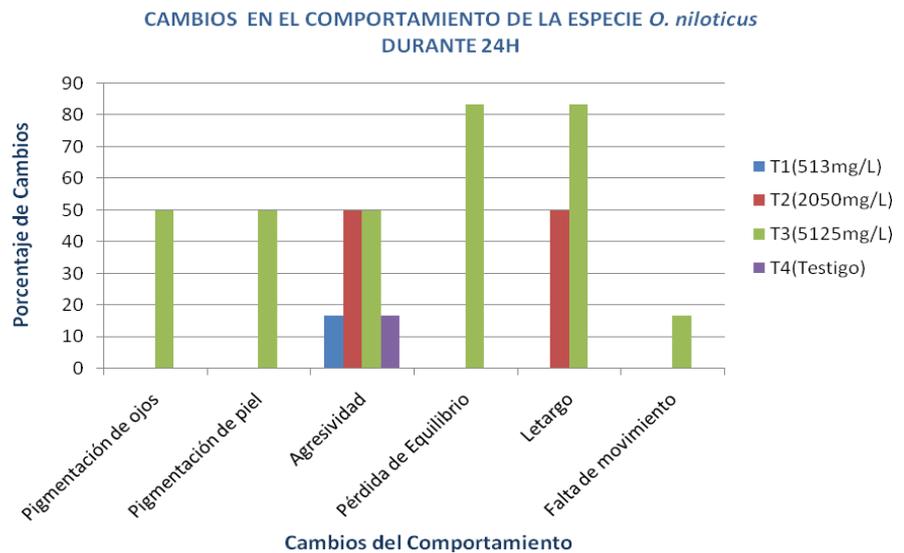


Fig. 24. Cambios de comportamiento de *O. niloticus* originado por diferentes dosis de Diesel, 24h después de iniciado el ensayo. Por Cristina Jines.

La Figura 24 muestra que durante las primeras 24h del ensayo, el tratamiento con la dosis T3 (5125mg/L) mostró cambios en todas las variables propuestas de comportamiento para los organismos, el cambio más evidente fue la pérdida de equilibrio y letargo que presentaron un 83.3% de alteración, seguidas de la pigmentación de piel, ojos y agresividad que alcanzaron valores del 50% y finalmente la variable falta de movimiento con un porcentaje del 16.7% no presentaron ninguna incidencia de cambio.

La coloración original de los peces fue plateada para la piel y amarillo claro para los ojos (Anexo A), al final de las 24h la pigmentación resultante en ambos órganos fue: plateado con rayas y anaranjado amarillo (Anexo A) respectivamente.

Los demás tratamientos con las dosis de 513mg/L y 2050mg/L, no tuvieron gran variación en la conducta, solamente la agresividad y el letargo respectivamente en el cual se incluye al tratamiento control, cuyos valores fueron entre 16.7% y 50%.

Cabe recalcar que la agresividad se puede presentar por la falta de alimento, por el estrés ante cualquier clase de contaminante al cual estaban sometidos los especímenes, así como por el territorialismo que defiende el área para atraer a las hembras ⁽²⁷⁾.

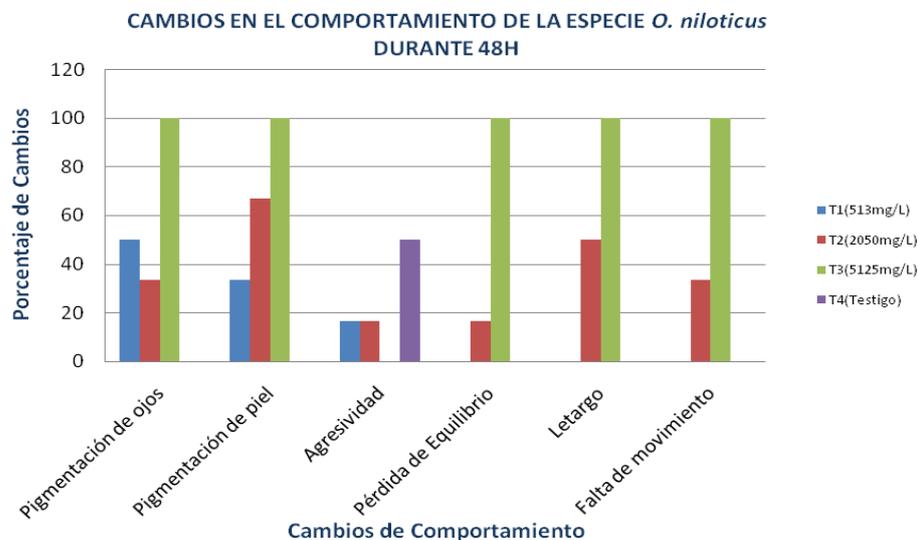


Fig. 25. Cambios de comportamiento de *O. niloticus* originado por diferentes dosis de Diesel, 48h después de iniciado el ensayo. Por Cristina Jines.

La Figura 25 indica que durante las 48h de ensayo, los tratamientos 2 con dosis de 2050mg/L y 3 con dosis de 5125mg/L, presentaron cambios en el comportamiento de pigmentación de ojos y piel, pérdida de equilibrio, letargo y falta de movimiento cuyos porcentajes aumentaron con respecto a las 24h de ensayo, sus valores de 16.7%, al 100% demuestra que a mayor concentración de contaminante y mayor tiempo de exposición mayor será el deterioro en los especímenes. Para el tratamiento 1 con dosis de 513mg/L, mostró el 50%, 33.3% y 16.7% de cambio en la pigmentación de ojos, piel y agresividad respectivamente, esta última variable fue la más notable

en el testigo, que también indicó un 50%, pero estuvo ausente durante el periodo de tiempo establecido.

La tonalidad de color en los peces durante este intervalo de tiempo, fue de plateado rayado a plateado amarillo con rayas para la piel, mientras que los ojos variaron de anaranjado amarillo a anaranjado vivo (Anexo A).

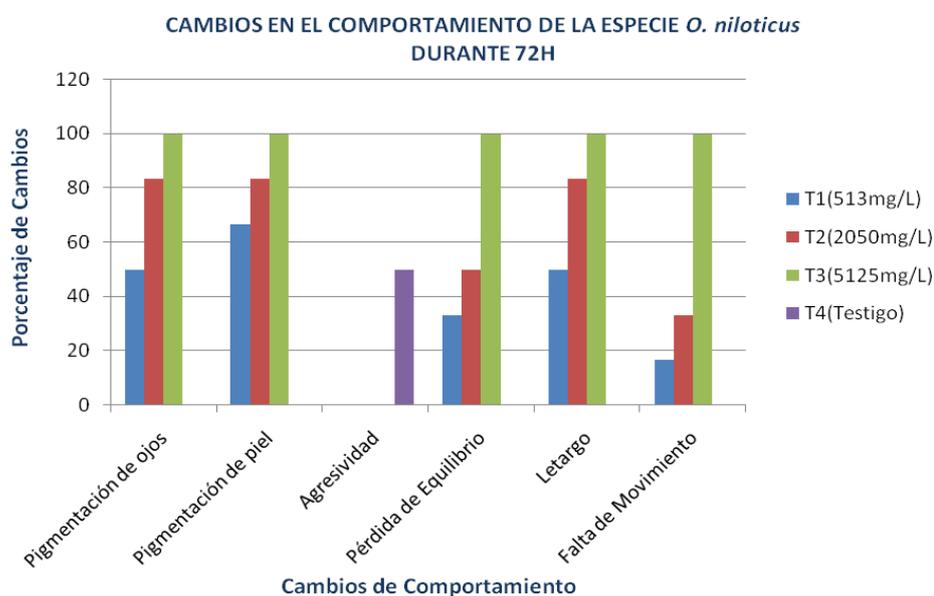


Fig. 26. Cambios de comportamiento de *O. niloticus* originado por diferentes dosis de Diesel, 72h después de iniciado el ensayo. Por Cristina Jines.

La Figura 26 muestra que a las 72 horas de ensayo los peces, poco a poco van perdiendo el interés de agredirse unos a otros, la coloración de la piel y ojos, la pérdida de equilibrio, el letargo y la falta de movimiento fue el comportamiento más frecuente, presentando el 100% en la dosis de 5125mg/L, mientras que el

33.3%, 50% y 83.3% para la dosis de 2050mg/L y entre 16.7% y 66.7% para el tratamiento con dosis de 513mg/L. El tratamiento testigo mostró normalidad en todos los puntos de comportamiento mencionados, excepto la agresividad, donde se demostró un 50% en esta conducta, deduciendo como una reacción normal entre machos juveniles, los cuales son agresivos por territorialidad (27).

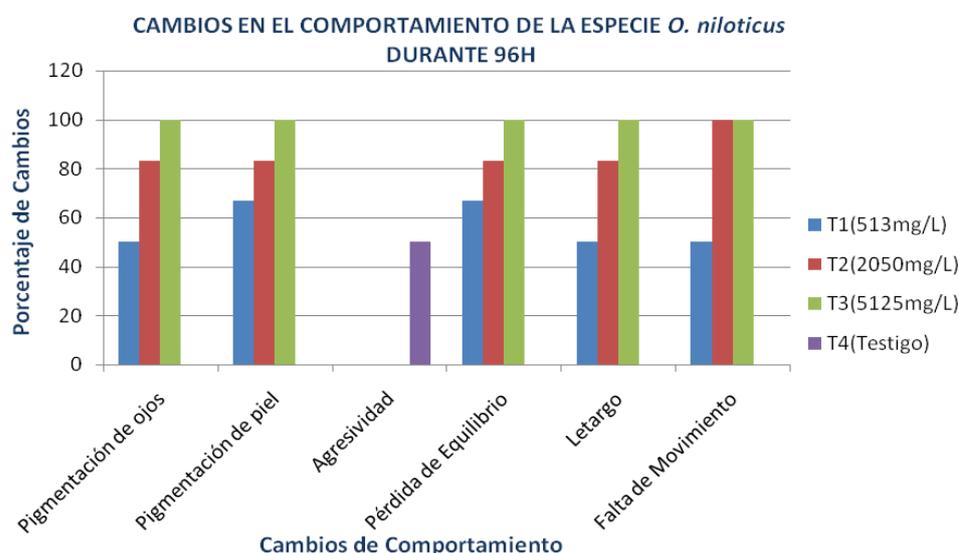


Fig. 27. Cambios de comportamiento de *O. niloticus* originado por diferentes dosis de Diesel, 96h después de iniciado el ensayo. Por Cristina Jines.

La Figura 27 indica que el contaminante a las 96h afecta la mayor parte de las variables medidas en el comportamiento, la pigmentación de ojos y piel, la pérdida de equilibrio, el letargo y la falta de movimiento indicaron el 83.3 y 100% de cambio en los tratamientos con dosis de 2050mg/L y 5125mg/L. Mientras que para el tratamiento con dosis de 513mg/L se obtuvo el 50% y 66.7% de estos cambios en

el comportamiento. La agresividad tuvo un resultado similar que en la figura 27, solo se presentó en el tratamiento control, donde las causas fueron análogas.

La pigmentación de ojos y cuerpo también presentaron variación, donde se obtuvo como resultado: para la piel una tonalidad amarilla grisácea intensa azulada con rayado acentuado y para los ojos la coloración fue anaranjado fuerte (Anexo A).

3.2. Parámetros

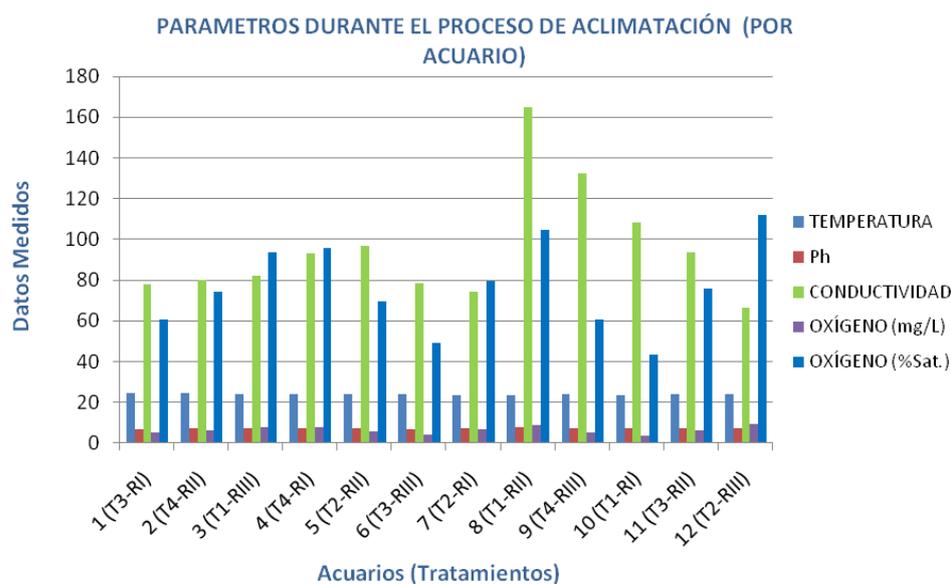


Fig. 28. Parámetros físicos durante el proceso de aclimatación. Por Cristina Jines.

La Figura 28 muestra cada uno de los parámetros medidos en los acuarios durante el proceso de aclimatación por cada tratamiento.

El pH en cada uno de los acuarios se mantuvo neutro aproximadamente, la temperatura del agua no tuvo gran variación, se planteo neutral durante esta etapa de 23.9°C y 24.1°C. El rango adecuado de pH en el agua para el desarrollo de la tilapia está entre 6 y 9. La temperatura del agua influye en la tasa de crecimiento y metabolismo de los peces, para la tilapia el rango óptimo está entre 22 y 32°C ⁽²⁰⁾. La temperatura y el pH del agua en el ensayo estuvieron dentro del rango aceptable y permanecieron relativamente estables, por lo que no fueron una fuente de variación.

El oxígeno disuelto en el agua para la aclimatación, presentó variaciones en cada uno de los recipientes entre 4.56mg/L y 9.34 mg/L, para *O. niloticus* lo recomendable es mantener niveles de oxígeno igual o superior a 3 mg/L ⁽³⁹⁾, el porcentaje de saturación de Oxígeno estuvo entre un 43.2% y 112%. Estos valores indican que se alcanzó los niveles óptimos de oxígeno, siendo idóneos para la supervivencia y crecimiento de los organismos a prueba, durante el proceso de aclimatación.

La conductividad del agua mostró variación para cada recipiente, cuyos valores están dentro del rango de 74.1µS/cm a 165µS/cm, con un promedio de 95.7µS/cm, calificando a esta agua poco

mineralizada, ya que para este estudio se utilizó agua potable, por lo tanto había un bajo nivel de sales disueltas.

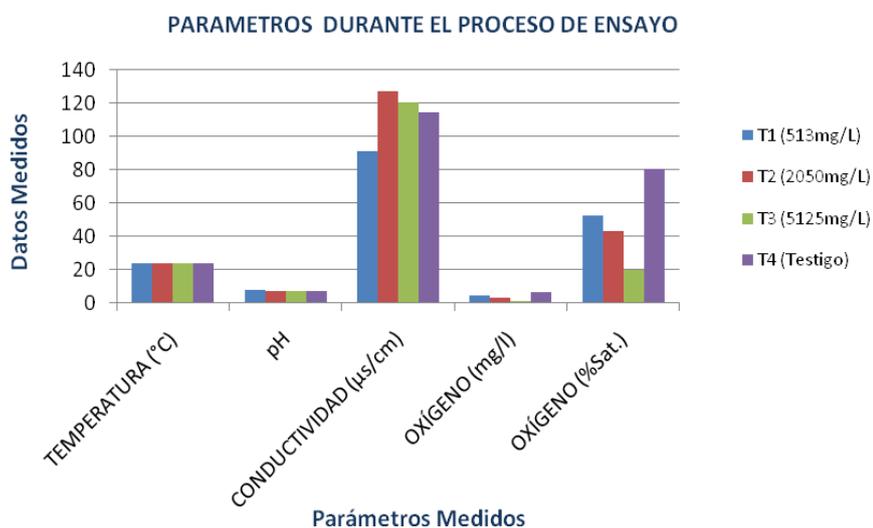


Fig. 29. Parámetros físicos, durante el proceso de Ensayo por cada tratamiento. Por Cristina Jines.

La Figura 29 muestra los valores recopilados de cada tratamiento con sus respectivas repeticiones de todos los parámetros medidos, uno de ellos la temperatura, que se mantuvo aproximadamente a 24°C para todos los tratamientos.

El pH presentó niveles entre 7.14 a 7.72 manteniéndose cerca de la alcalinidad. La conductividad varió sus valores desde 91.3µS/cm a 127.6µS/cm, conservando una baja mineralización, es decir un nivel bajo de sólidos disueltos. El oxígeno disuelto disminuyó considerablemente en todos los tratamientos en comparación con la

aclimatación, obteniendo niveles desde 1.57mg/L a 6.78mg/L, siendo el valor más bajo para la dosis más elevada de 5125mg/L.

El porcentaje de saturación resultó elevado para el tratamiento control con el 80.5% y el más bajo fue para el tratamiento de dosis 5125mg/L con el 20.1%

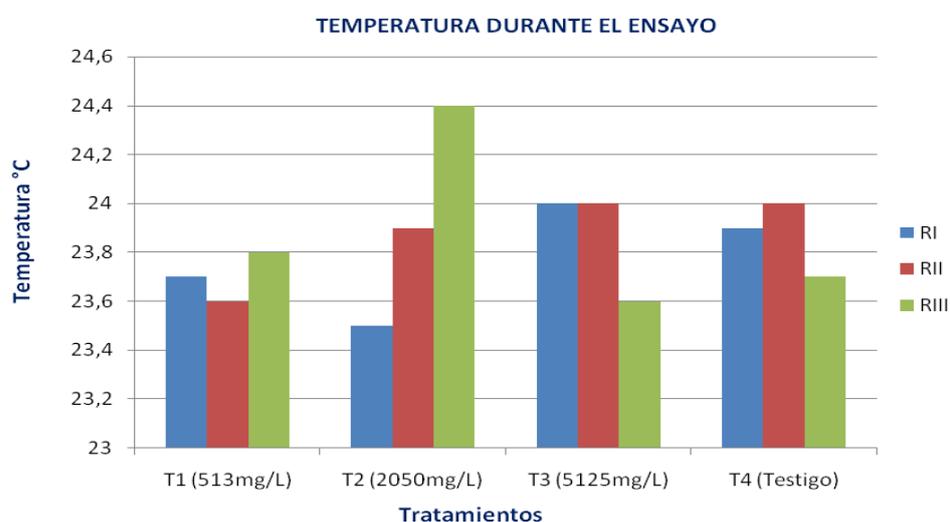


Fig. 30. Temperatura medida por cada repetición de los tres tratamientos. Por Cristina Jines.

Los valores de temperatura (Fig. 30) durante el ensayo fueron de 23.5°C y 24.4°C teniendo una diferencia de 0.2°C, mínima entre tratamientos, lo cual indica que se encontraba dentro de los límites aceptables ⁽³¹⁾.

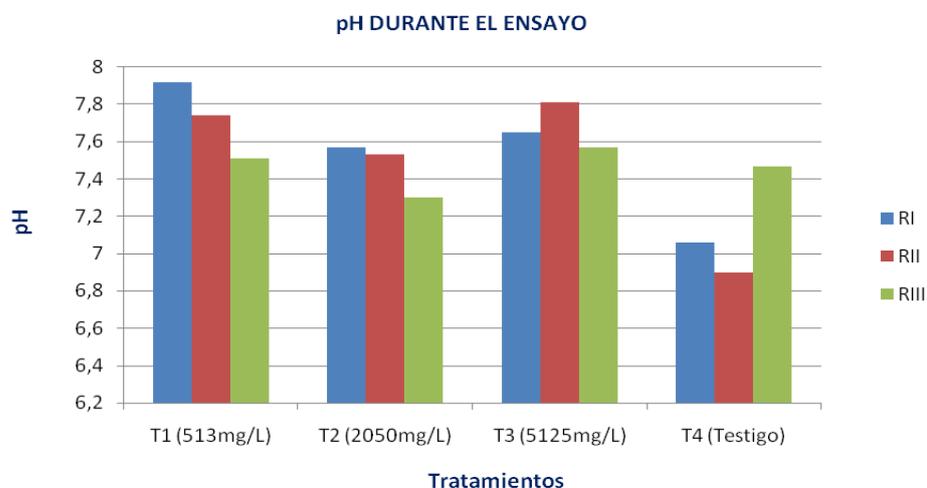
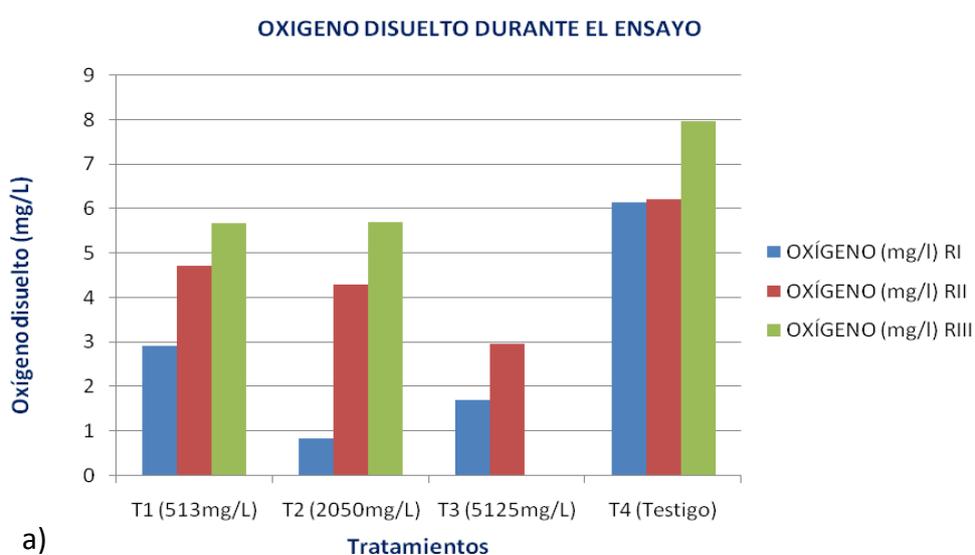


Fig. 31. pH medido por cada tratamiento con sus repeticiones. Por Cristina Jines.

El pH (Fig. 31) durante este proceso presentó valores entre 6.90 y 7.92 mostrando una pequeña diferencia con el pH que se tomó durante la aclimatación. El cual demuestra que con la contaminación, el pH del agua cambia su neutralidad a una alcalinidad mínima, en cada uno de los tratamientos, cuyas dosis fueron de 513mg/L (T1), 2050mg/L (T2) y 5125mg/L (T3).



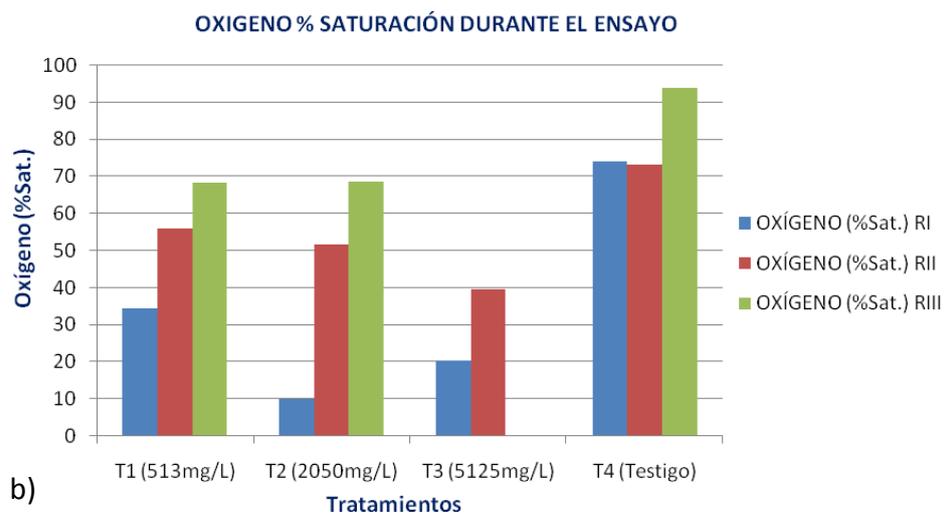


Fig. 32. a) Oxígeno disuelto (mg/L) y b) Oxígeno % de saturación, por cada tratamiento con sus repeticiones. Por Cristina Jines.

EL oxígeno disuelto (Fig. 32a) en esta etapa de contaminación indicó niveles muy bajos, cuyos valores estuvieron entre 0.02mg/L y 7.92mg/L, los resultados más bajos se dieron en los tratamientos con dosis de 2050mg/L y 5125mg/L, mientras los tratamientos 1 y 4, mantuvieron el rango aceptable para la tilapia nilótica ⁽³⁹⁾.

El oxígeno en porcentaje de saturación cuyos valores fueron de 0.2% y 94% (Fig. 32b), presentaron niveles muy bajos para los tratamientos con dosis de diesel más altas de 5125mg/L que fluctuaron entre 0.2% y 40%, le siguen en orden de contaminación los tratamientos 2 y 1, con dosis de 2050mg/L y 513mg/L respectivamente, con un

porcentaje de 10% y 69%. Estos resultados indican que a mayor concentración de contaminante menor será el nivel de oxígeno.

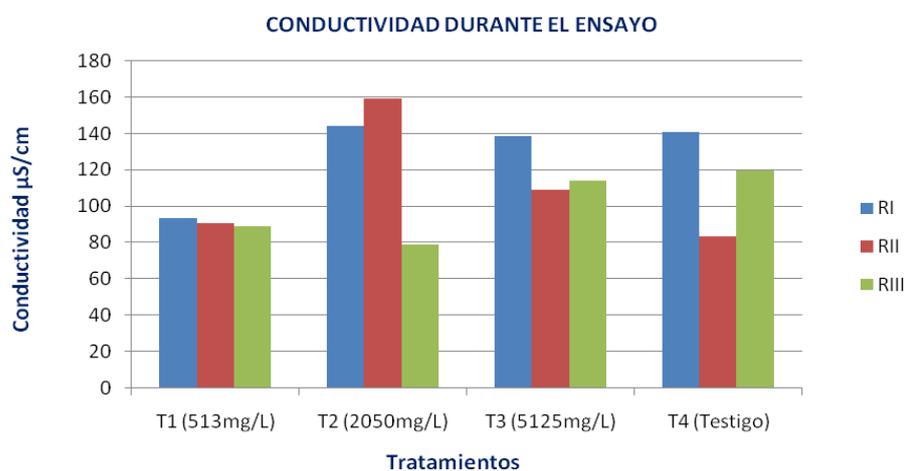


Fig. 33. Conductividad medida por cada tratamiento con sus repeticiones. Por Cristina Jines.

La Figura 33 muestra valores de conductividad con un rango de $79\mu\text{S/cm}$ a $159\mu\text{S/cm}$, las cantidades para los tratamientos con las tres dosis 513mg/L , 2050mg/L y 5125mg/L no modificaron mayormente el nivel de conductividad, a excepción del tratamiento testigo el cual mantuvo los niveles aproximados de los parámetros como la aclimatación.

Debe tenerse en cuenta que al producirse derrames de hidrocarburos como diesel no se produce grandes cambios en este parámetro (40).

3.3. ANOVA

Tabla XVI. Resultados obtenidos de la cuantificación de lesiones histológicas en branquias e hígado, por medio del programa estadístico SAS. Fuente: Cristina Jines.

TRATAMIENTOS	BRANQUIAS		HIGADO	
	DEGENERACIÓN CELULAR (Arco Branquial)	TELANGIECTASIS	VACUOLIZACIÓN LIPÍDICA	NÚCLEOS PICNÓTIOS
T1 (513mg/L)	20.83 c	20.83 a	33.33 b	37.50 a
T2 (2050mg/L)	70.83 b	29.16 a	70.83 a	41.66 a
T3 (5125mg/L)	95.83 a	25 a	91.66 a	62.50 a
T4 (Testigo)	0 d	0 a	0 c	0 b
C.V%	13.33	63.83	18.05	32.22
F. calculada	**	NS	**	**

Las lesiones observadas tanto en branquias como en hígado de la especie *O. niloticus* mostraron los siguientes resultados (Tabla 16): En las branquias se determinaron dos lesiones importantes presentes en todas las muestras histológicas. La primera lesión, degeneración celular (arco branquial), indicó que el tratamiento 3 con concentración de 5125mg/L, alcanzó el mayor daño a nivel de branquias con valor de 95.83, seguido de los tratamientos 2 (2050mg/L) y 1 (513mg/L) que alcanzaron valores de 70.83 y 20.83 respectivamente, todos los

tratamientos difieren estadísticamente del testigo con valor 0, que no presentó ninguna lesión a nivel de branquias.

A diferencia de la primera lesión, la Telangiectasis no difiere estadísticamente entre los tratamientos en estudio, es decir no se registró deterioro de manera considerable en dicho órgano.

En el hígado se analizaron de igual manera dos lesiones, que fueron muy frecuentes en las placas histológicas observadas: Vacuolización lipídica y Núcleos Picnóticos.

La primera lesión, vacuolización lipídica, muestra como el tratamiento 3 con dosis de 5125mg/L ocasionaron el mayor daño a nivel de hígado con valor de 91.66, seguido de los tratamientos 2 con 70.83, ambos tratamientos no difieren estadísticamente, pero sí de el tratamiento 1 y del testigo con valores de 33.33 y 0 respectivamente, lo cual significa que a nivel hepático presentaron un grado mínimo de deterioro o nada.

Los núcleos picnóticos, para los tratamientos 3, 2 y 1 con valores de 62.50, 41.66 y 37.50 respectivamente, difieren estadísticamente del testigo con valor 0, indicando que el daño fue similar en los tres tratamientos, pero el testigo no presentó dicha lesión.

3.4. Histopatología

Para realizar estas pruebas se tomaron muestras de los peces que se sometieron a las dosis estudiadas, determinando mediante cortes histológicos daños en branquias e hígado, estas pruebas se realizaron 96 horas después de las aplicaciones.

Los resultados se presentan en la Tabla 17, representan los cambios histológicos observados en los juveniles de *O. niloticus* expuestos a diferentes dosis de Diesel: 513mg/L, 2050mg/L y 5125mg/L más el tratamiento control.

Las lesiones histopatológicas en las branquias e hígado fueron similares en todos los tratamientos, la intensidad del daño en los tejidos aumentó, cuando la concentración del contaminante y el tiempo de exposición se iban acrecentando, mientras que el control no presentó ninguna lesión a nivel del tejido y órgano observado.

Las branquias de los peces utilizados como testigos en el ensayo presentaron un arco branquial, compuesto por numerosos filamentos branquiales con dos filas de laminillas secundarias que corría

perpendicular cada filamento, en la siguiente figura se describe la branquia⁴⁸ del pez. (Fig. 34 a y b).

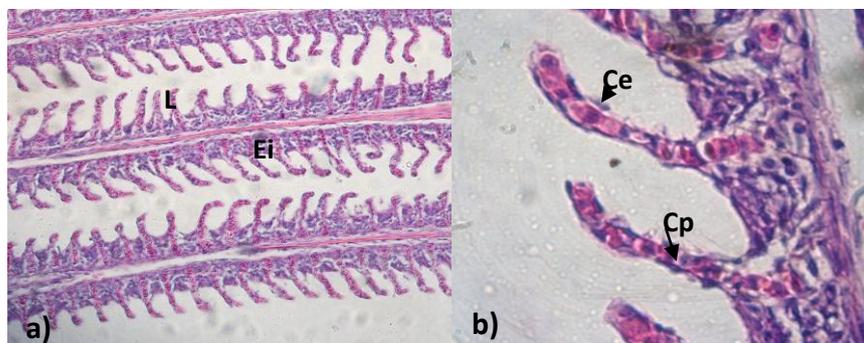


Fig. 34. Branquia de pez control (*O. niloticus*). a) Filamentos, se identifican lamelas (L), epitelio interlamelar (Ei) H&E 10X. b) Laminillas secundarias, se identifican células planas (Ce), células pilares (Cp). H&E 100X. Por Cristina Jines.

Tabla XVII. Cambios histológicos observados en juveniles de *O. niloticus* expuestos a diferentes concentraciones de Diesel. Fuente: Cristina Jines.

Tratamiento (mg/L)	Branquias	Hígado
513	En la mayoría de las muestras hay presencia de telangiectasis y degeneración celular del arco branquial	Presentaron marcada dilatación sinusoidal, hepatocitos binucleados, aparición reciente de núcleos picnóticos y una ligera vacuolización lipídica
2050	Algunas muestras presentan levantamiento epitelial, hiperplasia interlamelar, fusión de laminillas, degeneración celular del arco branquial y telangiectasis en ciertas partes del arco branquial	Número elevado en la formación de vacuolas (vacuolización lipídica), necrosis ligera en hepatocitos y núcleos picnóticos
5125	Degeneración celular completa (arco branquial) presencia de telangiectasis	Vacuolización lipídica intensa, núcleos picnóticos, degeneración nuclear, en ciertas muestras se presentó necrosis de hepatocitos
Testigo	Branquia normal, ninguna lesión patológica observada	Hígado normal, ninguna lesión patológica observada

⁴⁸ Descripción de branquia realizada por Torres; G. et al. 2010 (32).

Después de la exposición a Diesel, los cambios en la estructura histológica de la branquia en peces tratados con 513mg/L, indicaron degeneración celular de arco branquial y telangiectasis en mínimo porcentaje (Fig. 35 a, b y c).

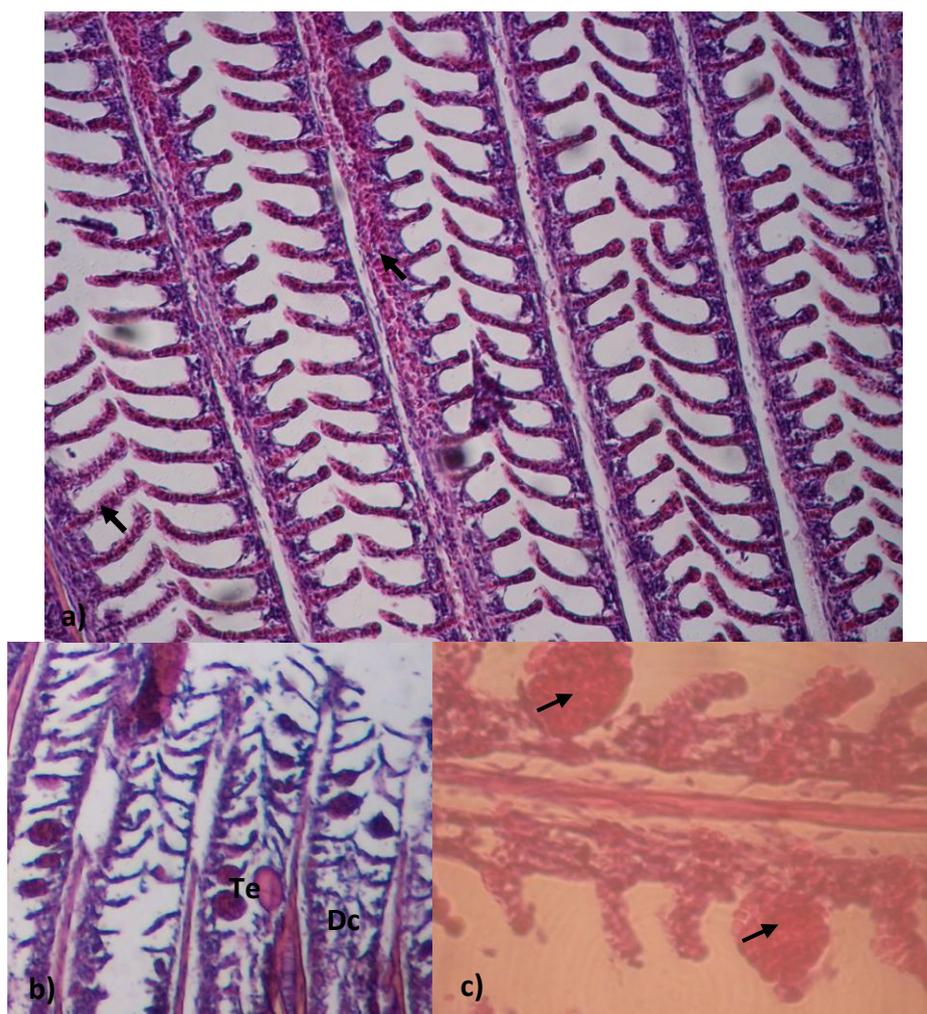


Fig. 35. Branquia de *O. niloticus* expuesta a 513mg/L. a) Filamentos indicando una degeneración celular ligera (flechas) H&E 10X. b) Filamentos con presencia de telangiectasis (Te) y degeneración celular de arco branquial (Dc) ligera H&E 10X. c) Presencia de Telangiectasis. H&E 40X. Por Cristina Jines.

Los peces tratados con 2050 mg/L, presentaron: levantamiento epitelial, hiperplasia con fusión de laminillas, degeneración celular del arco branquial y telangiectasis, estas dos últimas lesiones se observaron en ciertas partes del arco branquial (Fig. 36 a, b, c y d).

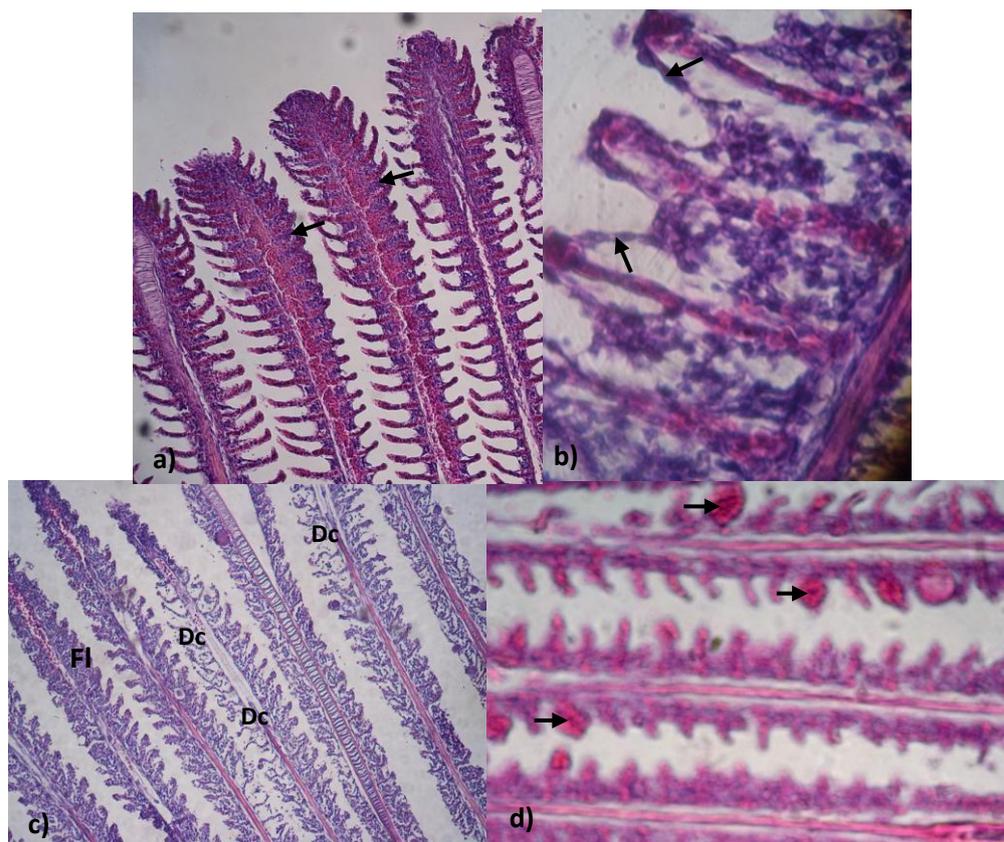


Fig. 36. Branquia de *O. niloticus* expuesta a 2050mg/L. a) Filamento, hiperplasia interlamelar (flechas) H&E 10X. b) Lamelas, levantamiento epitelial (flechas) H&E 100X. c) Fusión lamelar (FI) y degeneración celular de arco branquial (Dc) H&E 10X. d) Presencia de telangiectasis en los filamentos branquiales (Flechas) H&E 40X. Por Cristina Jines.

A una concentración de 5125mg/L, se produjo de la misma manera telangiectasis y degeneración celular de arco branquial, esta última

tiene un porcentaje muy elevado en comparación con el tratamiento de dosis baja (Fig. 37. a y b).

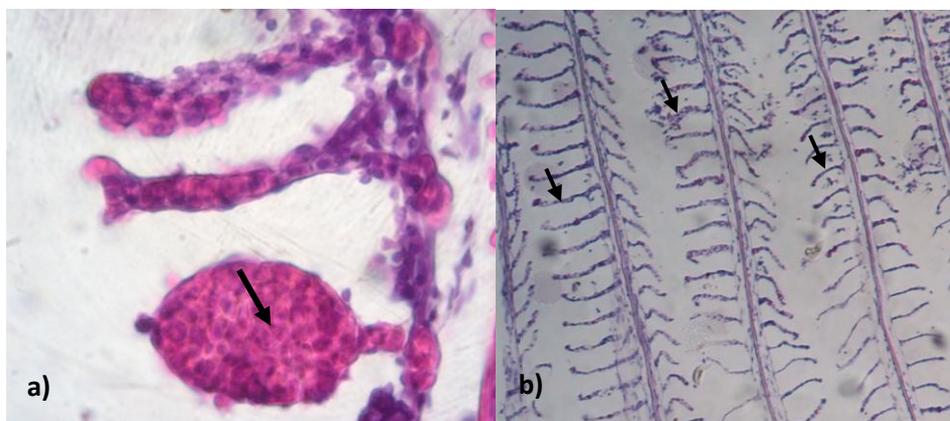


Fig. 37. Branquia de *O. niloticus* expuesta a 5125mg/L. a) Telangiectasis en laminillas (flechas) H&E 100X. b) Filamentos indicando degeneración celular del arco branquial (flechas) H&E 10X. Por Cristina Jines.

El hígado fue otro de los órganos blancos para analizar cambios histológicos. En el tejido hepático de los peces con tratamiento control, estaba compuesto principalmente por los hepatocitos poliédricos normalmente con un núcleo central (Fig. 38 a y b.).

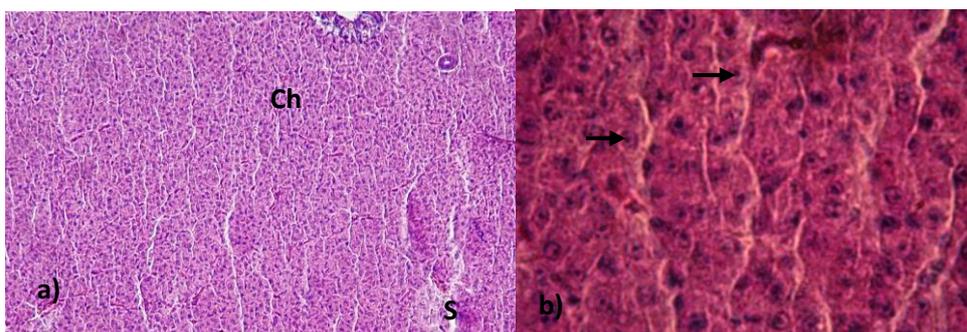


Fig. 38. Descripción⁴⁹ de hígado en el pez control. a) Cordones hepáticos (Ch) y Sinusoides (S) H&E 10X. b) Hepatocitos (H-flechas) H&E 100X. Por Cristina Jines.

⁴⁹ Descripción de hígado realizada por Torres, G. et al. 2010 (32).

Los peces expuestos a concentración de 513mg/L mostraron marcada dilatación sinusoidal, hepatocitos binucleados, núcleos picnóticos en mínima cantidad y vacuolización lipídica que de igual forma fue ligera (Fig. 39).

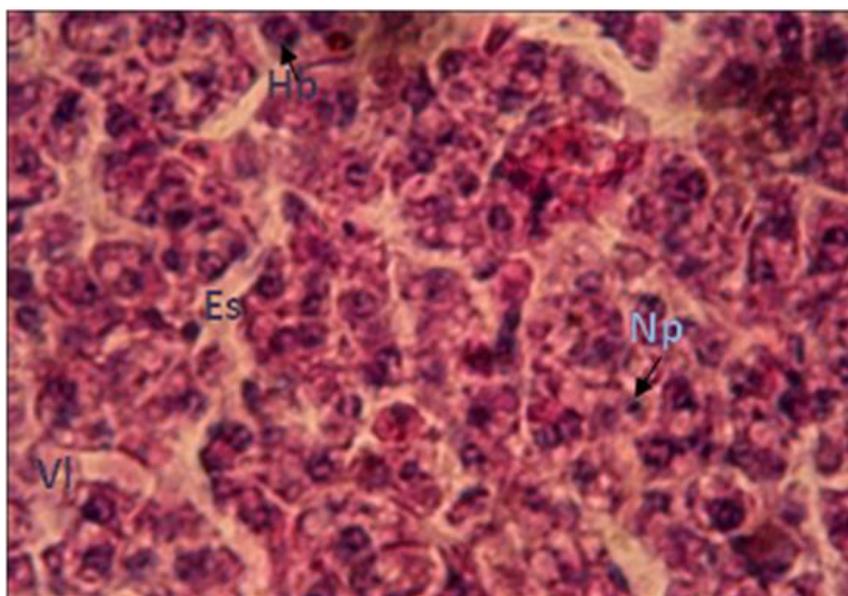


Fig. 39. Hígado de *O. niloticus* expuesto a 513mg/L. Aumento en el espacio sinusoidal (Es), Hepatocitos binucleados (Hb), presencia tenue de núcleos picnóticos (Np) y vacuolización lipídica (VI), H&E 100X. Por Cristina Jines.

La vacuolización lipídica, la degeneración del parénquima (necrosis ligera en hepatocitos), los núcleos picnóticos se registraron en la concentración de 2050mg/L (Fig. 40 a y b).

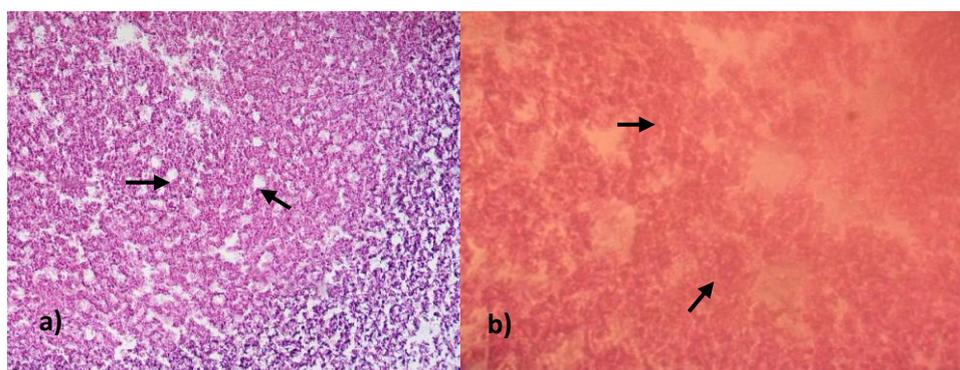


Fig. 40. Hígado expuesto a 2050mg/L. a) Las vacuolas ocupan la mayor parte del parénquima hepático (flechas) H&E 10X. b) Presencia tenue de Necrosis en hepatocitos (flechas) H&E 40X. Por Cristina Jines.

La exposición de los peces a la dosis de 5125mg/L, presentó vacuolización lipídica intensa, núcleos picnóticos, degeneración del parénquima (hepatocitos) y nuclear en algunas muestras de tejido (Fig. 41 a, b y c).

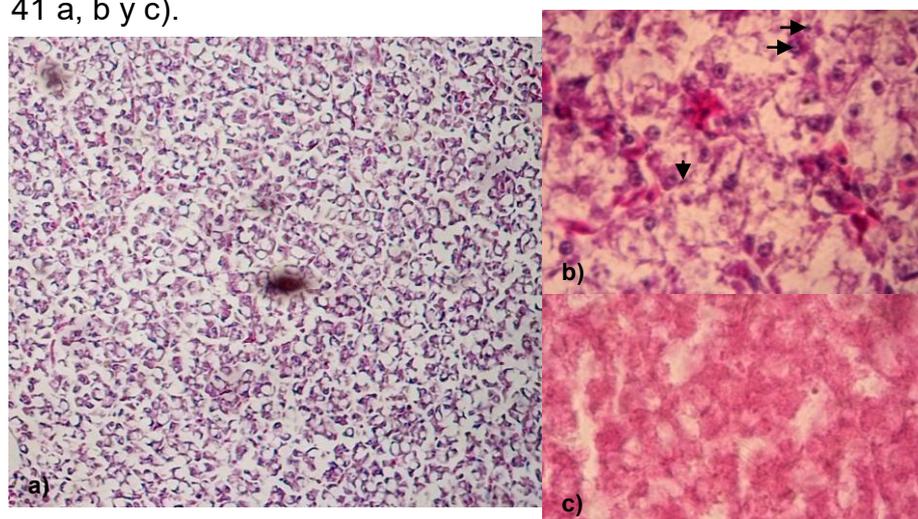


Fig. 41. Hígado expuesto a 5125mg/L. a) y b) Presencia de vacuolas y núcleos picnóticos (flechas) en todo el parénquima H&E 10X y 100X. c) Degeneración del parénquima (hepatocitos). Por Cristina Jines.

3.5. Mortalidad

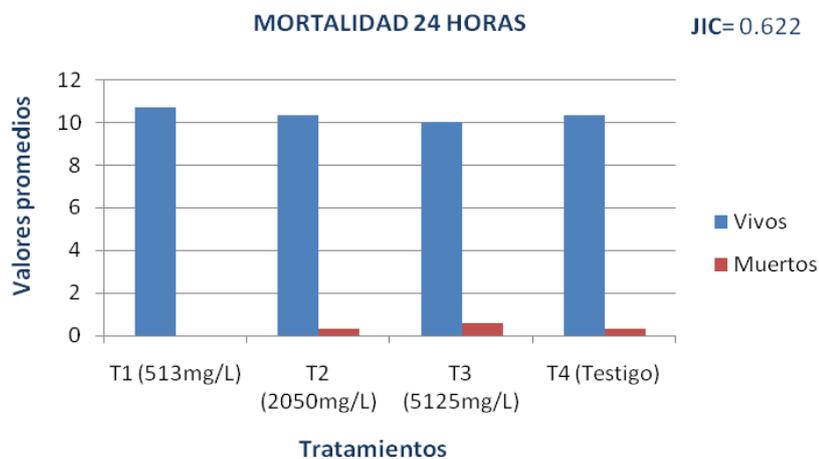


Fig. 42. Mortalidad de *O. niloticus*, 24h después de iniciado el ensayo. Por Cristina Jines.

La figura 42 señaló ausencia de mortalidad a las 24h en cada uno de los tratamientos, con un valor de chi cuadrado (χ^2) de 0.622 podemos deducir la no significancia entre tratamientos, aunque existen porcentajes de valores diferentes en presencia mínima.

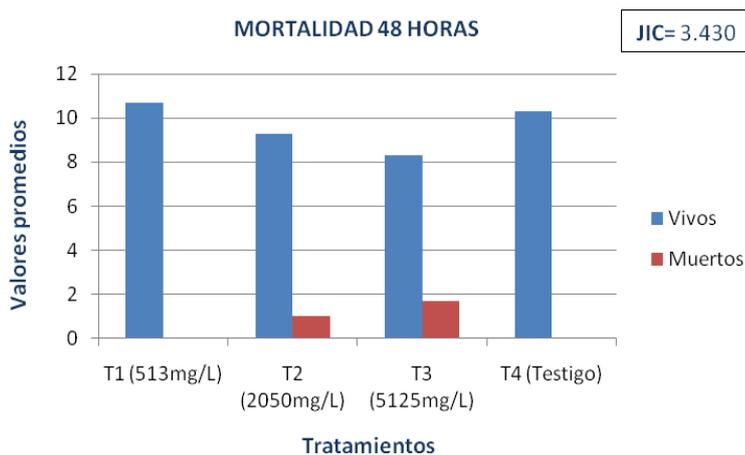


Fig. 43. Mortalidad de *O. niloticus*, 48h después de iniciado el ensayo. Por Cristina Jines.

La figura 43 indicó también ausencia de mortalidad a las 48h en cada uno de los tratamientos, con un valor de chi cuadrado de 3.430 determinamos la no significancia entre tratamientos, a pesar que estos numéricamente pueden ser diferentes, las dosis todavía no afectan considerablemente a los organismos durante este periodo de tiempo.

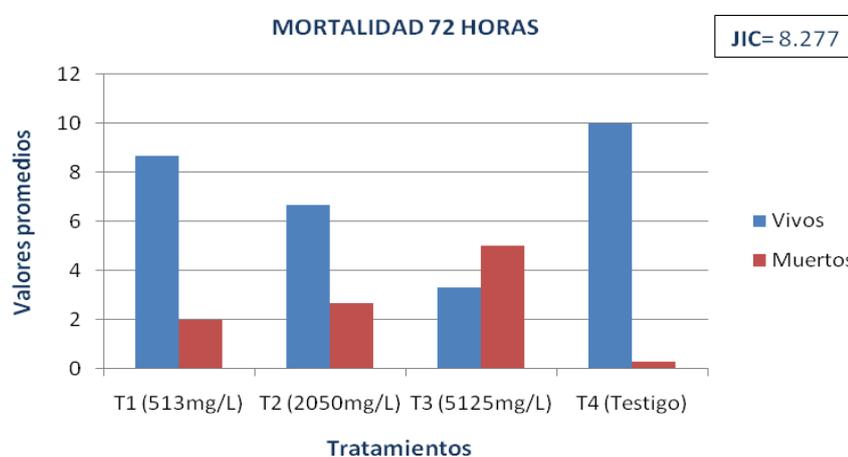


Fig. 44. Mortalidad de *O. niloticus*, 72h después de iniciado el ensayo. Por Cristina Jines.

La figura 44 mostró que a las 72h se obtuvo un valor de chi cuadrado de 8.277 al hacer una comparación con los valores críticos de los niveles de confianza establecidos, resultó que $7.81 < 8.277 < 11.34$, por lo tanto todos los tratamientos resultaron significativos, dicho de otra manera la mortalidad en este lapso de tiempo se hizo evidente, sobre todo en el tratamiento 3 con un índice de mortandad promedio de 5.

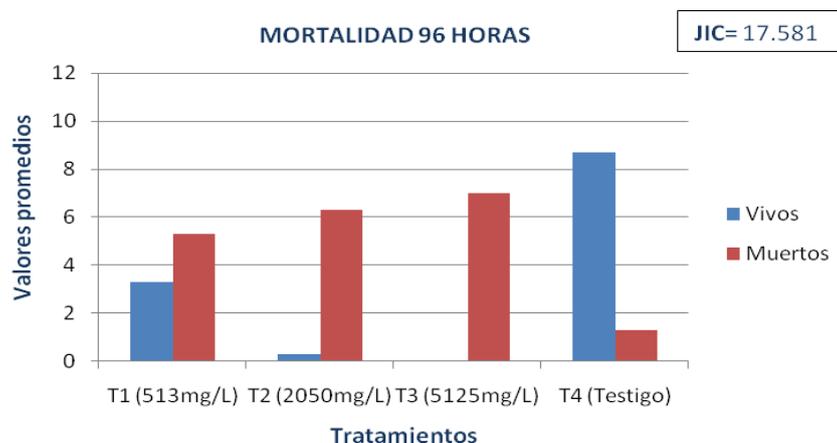


Fig. 45. Mortalidad de *O. niloticus*, 96h después de iniciado el ensayo. Por Cristina Jines.

La figura 45 mostró mortalidad evidente a las 96h, con un valor de chi cuadrado que fue mayor a los valores críticos de ambos niveles de confianza ($7.81 < 17.581 > 11.34$), resaltando como altamente significativos entre tratamientos, donde el mayor índice de mortandad fue el tratamiento 3 seguido de los tratamientos 2 y 1, cuyo valores promedios fueron de 7, 6.3 y 5.3 respectivamente.

DISCUSIÓN

Los derrames de Diesel a menudo se consideran un riesgo de toxicidad aguda para los organismos acuáticos, debido a que presenta mayor concentración de fracciones volátiles. Algunos de estos componentes pueden producir efectos narcóticos en animales hídricos en concentraciones cerca a su solubilidad acuosa ⁽⁴²⁾ ⁽⁴³⁾.

La exposición de juveniles de *O.niloticus* a concentraciones diferentes de Diesel, mostraron mortalidad a las 72h y 96h en todos los tratamientos, mediante chi cuadrado⁵⁰. Algo similar fue reportado en alevines de la misma especie utilizando el mismo contaminante donde la mortandad se presentó a las 96h, mediante un análisis estadístico diferente como CL50 ⁽⁴⁴⁾.

El nivel de oxígeno disuelto disminuyó durante el ensayo practicado en los peces, donde los valores variaron desde 1.57mg/L a 6.78mg/L; a diferencia de los niveles de pH que no tuvieron gran variación. Alevines de *O. niloticus*, fueron también expuestos a varias dosis de Diesel, obteniendo como resultados valores similares de este parámetro (4.5mg/L a 7.2mg/L), así mismo el pH no fue afectado adversamente ⁽⁴⁴⁾. Por otra parte los autores demostraron que la muerte de los alevines pudo estar relacionada con la

⁵⁰Modelo de Probabilidad, es la suma de las diferencias cuadráticas relativas entre valores experimentales y teóricos.

disminución del contenido de oxígeno disuelto debido a la presencia del diesel.

El comportamiento de los peces expuestos al contaminante se determinó en agresividad, cambios en la pigmentación de la piel, pérdida de equilibrio, período de inactividad (letargo) y finalmente la muerte. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por quienes trabajaron con un contaminante diferente conocido como herbicida Gramoxone ⁽⁴⁵⁾.

El estudio histopatológico de las branquias mostraron anormalidades estructurales tales como hiperplasia interlamelar, fusión de laminillas, levantamiento epitelial, degeneración celular de lamelas y telangiectasis. Esto corrobora algunos trabajos elaborados con la misma especie expuesta a contaminantes diferentes, como exposición de polvo de cemento en solución y Deltamethrin, determinando lesiones similares en el órgano ⁽⁴⁶⁾ ⁽⁴⁷⁾. La branquia es el principal órgano blanco por contaminantes; su tejido epitelial es un excelente parámetro para evaluar los efectos de variables ambientales y sustancias tóxicas tal como lo expuesto por ⁽³³⁾.

Los resultados obtenidos de las lesiones hepáticas en los organismos expuestos a Diesel, fueron vacuolización lipídica y núcleos picnóticos en los tres tratamientos, estudios evaluados en tilapia nilótica mostraron lesiones

idénticas en este órgano, con la única diferencia el contaminante utilizado (Glifosato) y las concentraciones, quienes utilizaron solo dos ⁽⁴⁸⁾. Varios resultados han demostrado que en la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) a concentraciones bajas de diesel no presenta ningún cambio histológico a menos que estas sean iguales o mayores a 10000mg/L de este tóxico ⁽⁴²⁾.

CONCLUSIONES

1. Se logró identificar los cambios de comportamiento tales como cambios en la pigmentación de piel y ojos, agresividad, pérdida de equilibrio, letargo y falta de movimiento de *O. niloticus* que fueron sometidas a diferentes concentraciones de Diesel.
2. Se presentaron algunos efectos histopatológicos en branquias e hígado pero los más sobresalientes fueron degeneración celular del arco branquial y telangiectasis para branquias y vacuolización lipídica y núcleos picnóticos para hígado, hay que aclarar que estas lesiones se presentaron en todos los tratamientos excepto en el testigo que presento normalidad.
3. Se evaluó cada una de las concentraciones de Diesel para la supervivencia de los organismos, donde los mismos no sobreviven

mientras sean expuestos a una mayor concentración de contaminante en un periodo de tiempo largo.

4. Se obtuvo diferentes índices de mortalidad en cada uno de los tratamientos, presentándose el más alto a las 96h de exposición al contaminante, el cual presentó un valor promedio de 7.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda mayor oxigenación durante el traslado de los organismos hacia el lugar donde se realizará el experimento
2. La aclimatación debe realizarse durante un periodo de tiempo más prolongado para observar mayores cambios en el comportamiento y/o mortalidad de los peces.
3. Utilizar mayor oxigenación en las peceras, para reducir el índice de mortalidad por asfixia.
4. No realizar ensayos toxicológicos en especies que presenten mayor susceptibilidad a cambios climáticos y contaminantes.

5. Se recomienda trabajar en un lugar cerrado donde ingrese poca cantidad de luz ya que podría haber un crecimiento de algas en los acuarios.
6. Este trabajo puede realizarse a futuro con otras especies de peces comerciales, utilizando otros componentes derivados del petróleo para poder realizar una comparación de toxicidad entre contaminantes.
7. Se podría elaborar cortes histológicos en otros órganos claves capaces de indicar daño a causa de un contaminante.
8. Sería recomendable elaborar trabajos en los sitios de foco de contaminación de la industria petrolera, para así entender mejor el daño que estos productos producen en la fauna y flora acuática.

BIBLIOGRAFIA

1. Bohórquez, P. y Campos, C. 2007. Evaluación de *Lactuca sativa* y *Selenastrum capricornutum* como indicadores de toxicidad en aguas. Revista de la Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana. Vol. 12 N°2. pp. 84,85,87,94.
2. Osorio, A. y Célis, H. 1992. La industria petrolera en el ámbito internacional y el medio ambiente. La industria petrolera ante la regulación jurídico-ecológica. Primera Edición. México D.F. pp. 211-213.
3. Fontaine, G. et al. 2003. Petróleo y desarrollo sostenible en Ecuador: Las reglas del juego. Primera Edición. FLACSO Editorial. pp. 13,80-85.

4. Jurado, J. et al. 2007. Las implicaciones sociales y éticas de la política petrolera: El petróleo como fuente de conflicto ambiental. FLACSO editorial. Quito-Ecuador. pp. 7-13,17-19.
5. Arcos, V. y Castro, R. 2005. Metales pesados en agua, sedimentos y organismos; Revista de Ciencias Naturales y Ambientales; Vol.1 N°1; pp.103-109.
6. Silva, J. et. al 2007. Estandarización del bioensayo de toxicidad aguda con *Diplodon chilensis* usando un tóxico de referencia. Revista Gayana-Concepción Chile. Vol.71 N°2. pp.135-141.
7. Vieira, R. et al. 2010. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasolina on marine pjerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. Science of the Total Environment. Vol.408. pp. 2054-2059. www.elsevier.com/locate/scitotenv.
8. De Bórtoli, M. y Contreras, J. 2009. Bioensayos para la detección de contaminación en el agua. Revista Ingeniería Sanitaria y Ambiental. N°52. pp. 40-42.
9. Ramírez, P. y Mendoza, A. 2008. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo, la experiencia de México. Primera Edición. Delegación Tlalpan-México D.F. pp. 155-166.
10. Espinoza, C. (s.f.). Bioensayos de toxicidad aguda y crónica con especies marinas de la costa chilena. Centro de estudios y gestión

- ambiental-Instituto de investigación pesquera. Consultado 27 de septiembre 2011. Disponible en: www.inpesca.cl.
11. Peña, J. 2010. Introducción y conceptos básicos de bioensayos. Centro de estudios del mar en Ensenada, pp. 21-23, 30. Consultado 29 de septiembre 2011. Disponible en: <http://www.slideshare.net/guest2e9107f/apuntes-bioensayos>.
12. Varela, R. 2005. "Determinación del nivel toxicidad aguda del fungicida carbendazim y el herbicida 2,4 d mediante bioensayos con *Galaxias maculatus*. Tesis de Licenciado. Universidad Católica de Temuco. pp. 5-6.
13. Catala, M. et. al 2010. Bioensayo de toxicidad ambiental basado en helechos. Universidad Rey Juan Carlos. Consultado 29 de septiembre 2011. Disponible en: <http://patentados.com/patente/bioensayo-de-toxicidad-ambiental-basado-en-helechos/>.
14. Plutarco, C. y Bernal, G. 1997. Ecología y adaptaciones de la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) en ambientes naturales -caso embalse de Betania y ciénaga de Chilloa, sistema del río Magdalena, Colombia. Revista Asociación Colombiana Ictiológica. N°2. pp. 3-29.
15. Vivanco, D. y Guayaquil, G. 2007. Unidad de protección ambiental y seguridad industrial: Hoja de seguridad-MSDS-DIESEL 2. Petrocomercial. Versión 00. pp. 3,6,12-15.

16. Parra, R. 2010. Optimización de la operación en el transporte de derivados de petróleo-análisis y estudio hidráulico del poliducto Quito-Ambato operado por Petrocomercial. Tesis de Ingeniero. Quito. Universidad Central del Ecuador. pp. 75,76,85.
17. Ciria, I. 2003. Propiedades y características de combustibles diesel y biodiesel. Wearcheck Ibérica, pp.1-20.
18. Sterling, G. 2009. Diesel. Power Point. 13 diapositivas. Colombia. Consultado 17 de octubre 2011. Disponible en: <http://www.slideshare.net/ghsterlingm/diesel-2473621>.
19. EP. Petroecuador. 2001. Características de Diesel 2. Realizado por Ing. José Jines.
20. Bravo, E. 2007. Los impactos de la explotación petrolera en ecosistemas tropicales y la biodiversidad. Acción ecológica. Quito-Ecuador. pp. 9, 19, 25-27, 35, 36, 42, 51, 52.
21. Buckalew, J. et al. 1998. Water resources assessment of Ecuador. Us Army corps of engineers mobile district and topographic engineering center. Estados Unidos. pp. 11, 20, 33, 63.
22. Solórzano, L. 1989. Status of coastal water quality in Ecuador (Tech. Rep. TR-E-6). Rhode Island: University of Rhode Island. Coastal Resources Center. pp. 164-169.

23. Oleoducto para crudos pesados (OCP). 2001. Definición de áreas sensibles, evaluación y mitigación de impactos. N°131104. Quito-Ecuador. ENTRIX. pp. 28, 144-146.
24. Los ríos de Esmeraldas contaminados. 2011, 20 de julio. El Comercio. Consultado el 27 de septiembre 2011. Disponible en: http://www.elcomercio.com/sociedad/rios-Esmeraldas-contaminados_0_520148116.html.
25. Vertido tóxico en río Teaone de Esmeraldas. 2011, 14 de febrero. La Hora Nacional. Consultado 27 de septiembre 2011. Disponible en: http://www.lahora.com.ec/index.php/noticias/show/1101094547/-1/vertido_t%c3%b3xico__en_r%c3%ado_teaone_de_esmeraldas.html
26. Reisman, F. y Reisman, S. 1981. Inducción al crecimiento en tilapia nilótica. Universidad Autónoma Metropolitana. México D.F. pp. 3,6-9.
27. Sincoagro S.C. 2009. Manual de producción de tilapia con especificaciones de calidad e inocuidad. pp. 10, 11, 17. Consultado 27 de septiembre. Disponible en: <http://www.funprover.org/formatos/cursos/manual%20buenas%20practicas%20acuicolas.pdf>
28. Barrera, R. y Paz, C. 2006. Control de alevines de tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Perciforme: Cichlidae) usando guapote lagunero (*Parachromis dovii*) (Perciforme: Cichlidae) en los estanques de la Universidad Earth. Tesis de Ingeniero. Costa Rica. pp. 20-22.

29. Marcillo, E. y Landívar, J. 2008. Tecnología de producción de alevines monosexo de tilapia. Primera Edición. ESPOL. Guayaquil. pp. 23, 27, 28, 39.
30. Acerca del cultivo de tilapia nilotica y tilapia roja. 2001. pp. 1-16. Consultado 04 de octubre 2011. Disponible en:
<http://www.tilapiasdelosur.com.ar/downloads/AcercaDelCultivodeTilapiaNiloticayTilapiaRoja.pdf>
31. Saavedra, M. 2006. Manejo del cultivo de tilapia. CIDEA. Nicaragua. pp. 3-7.
32. Torres, G. et al. 2010. Descripción anatómica, histológica y ultraestructural de la branquia e hígado de tilapia (*Oreochromis niloticus*), International Journal Morphology. Vol. 28 N°3. pp. 703-712.
33. González, S. et al. Descripción histológica de la branquia de tilapia (*Oreochromis niloticus*) presente en la laguna de sonso (Valle del Cauca). En: Congreso Interamericano de Microscopía Electrónica, (Rosario-Argentina 25-28 de octubre del 2009). V. X. pp. 1-3.
34. Vicentini, C. et al. 2005. Morphological study of the liver in the teleost *Oreochromis niloticus*. International Journal of Morphology. Vol.23 N°3. pp. 211-216.
35. Alzola, R. 2001. Curso de Histología, Embriología y Teratología, guía de estudio: técnicas histológicas. Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aires-Argentina. pp. 1-15.

36. Alvarez, F. y Támez, O. 1992. Técnicas histológicas y hematológicas. Universidad Autónoma Nacional de Nuevo León. pp. 1-4. Consultado 14 de octubre 2011. Disponible en: http://cdigital.dgb.uanl.mx/la/1020082556/1020082556_021.pdf.
37. De Mahieu, G., Mascitti, G. y Jaffe, K. 1981. Efecto del petróleo crudo sobre los moluscos comerciales litorales *Donax denticulatus* y *Crassostrea rhizophorae* en Venezuela. Thirty-Third anual Gulf and caribbean Fisheries Institute. Miami-USA. pp. 125-139.
38. Roberts, R. 1978. Fish Pathology. Bailliere Tindall-London. Casell Ltd. pp. 235-241.
39. Navarro, A. 2002. Ensayo de dos modelos de policultivo empleando bagre (*Ictalurus punctatus*) tilapia híbrida (*Oreochromis niloticus* vs. *Oreochromis mossambicus*) y langostino (*Macrobrachium tenellum*), en estanques semi-rústicos caso Jocotepec, Jalisco. Tesis de Maestro en Acuicultura. Universidad de Colima. México. pp. 11-13.
40. Canovas, J. 1986. Criterios de interpretación de la calidad agronómica de las aguas de riego. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. Madrid. pp. 1-3.
41. Grajales, T. 1999. La prueba Chi cuadrada (X^2). pp. 1-3. Consultado 07 de febrero 2012. Disponible en: <http://tgrajalves.net/chicuada.pdf>
42. Schein, A. et al. 2009. Oil dispersion increases the apparent bioavailability and toxicity of Diesel to rainbow trout (*Oncorhynchus*

- mykiss). *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol.28 N°3. pp. 595-602.
- 43.Vera, G et al. 2009. Efectos ecotoxicológicos del petróleo cerudo, Diesel 2 y kerosene sobre el crecimiento poblacional de la microalga *Chaetoceros gracilis Schutt*. *Ecología Aplicada*. Vol.8 N°1. pp. 3-7.
- 44.Dede, E. y Kaglo, H. 2001. Aqua-toxicological effects of wáter soluble fractions (WSF) of Diesel fulo n *O. niloticus* fingerlings. *Sciences Environmental Mgf*. Vol. 5 N°1. pp. 93-96.
- 45.Babatunde, M. et al. 2000. Acute toxicity of Gramoxone to *Oreochromis niloticus* (Trewawas) in Nigeria. *Water Air and Soil Pollution*. Vol.131. pp. 1-10.
- 46.Adamu, K et al. 2008. Toxicity and histopathological effects of Portland cement poder in solution on the structure of the gill and liver tissues of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: a microscopic study. *Tropical Freshwater Biology*. Vol.7 N°1. pp. 1-12.
- 47.Yildirim, M. et al. 2006. Acute toxicity, behavioral changes, and histopathological effects of Deltamethrin on tissues (gills, liver, brain, spleen, kidney, muscle, skin) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Environmental Toxicology*. Vol. 21 N°6. pp. 614-620.
- 48.Jiraungkoorskul, W. et al. 2003. Biochemical and histopathological effects of Glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology*. Vol. 18 N°4. pp. 260-267.

ANEXOS

Anexo A

Coloración de piel y ojos *O. niloticus*



Coloración normal en piel (plateada) y ojos (amarillo claro)

Los peces de esta especie sometidos a estrés provocado por un contaminante, alteran la pigmentación de la piel y ojos, dos órganos que pueden observarse a simple vista.



Coloración a las 24h-48h



Coloración a las 72h-96h

ANEXO B**Comportamiento de *O. niloticus***

Pérdida de equilibrio después de haber recibido las diferentes concentraciones de Diesel 2



Esqueleto juvenil de *O. niloticus*