



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales

“Diseño de Bioensayo Agudo Toxicológico con Sulfato de
Cobre en Alevines de *Oreochromis sp.*”

Proyecto Integrador

Previo a la Obtención del Título de:

Ingeniería en Acuicultura

Presentado por:

Murillo Castro Tatiana Azucena
Erazo Quezada Rosa Elena

Guayaquil – Ecuador
Año 2015

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, a Dios quien nos ha guiado en cada paso de nuestras vidas, permitiéndonos culminar nuestros estudios universitarios, y alcanzar la meta fijada desde el inicio de nuestra carrera. Por ser siempre un pilar, guía, ayuda y fortaleza en cada decisión tomada.

A nuestros padres Azucena Castro Proaño, Javier Murillo Plaza, Rosa Quezada Valle, Jorge Erazo Erazo (+) y nuestros hermanos, quienes estuvieron al pendiente de forma constante en el desarrollo de nuestro Proyecto Integrador .Les agradecemos también a nuestros maestros por todos los conocimientos impartidos, no solo en el desarrollo del proyecto sino también durante toda la etapa académica; especialmente a la Dra. Paola Calle, por ser nuestra tutora.

Agradecemos también a todas aquellas personas que de una u otra forma, formaron parte de este proceso educativo.

DEDICATORIA

A nuestros padres y familiares por su apoyo incondicional en cada etapa de nuestras vidas, por guiarnos e impulsarnos siempre a culminar nuestras metas y propósitos.

A todas aquellas personas que puedan dar buen uso de la información recolectada.

Dedicamos a nuestro grupo de trabajo de Laboratorio quienes día a día contribuyeron con conocimientos para el buen del desarrollo del proyecto.

Tatiana Azucena Murillo Castro

Rosa Elena Erazo Quezada

EVALUADORES

Paola Calle, Ph.D.

Directora del Proyecto

Ana Tirapé, Ph.D.

Evaluadora

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de este Proyecto de Graduación, nos corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

Tatiana Azucena Murillo Castro

Rosa Elena Erazo Quezada

RESUMEN

Esta propuesta de diseño de bioensayo se realizará en 96 horas, usando el compuesto sulfato de cobre penta-hidratado en alevines de *Oreochromis sp* debido a que este pez es de interés socio-económico en el país.

Basándonos en estudios realizados anteriormente, se propondrá una metodología que nos ayudará al cálculo de las concentraciones letales para el organismo ya mencionado. Se presenta detalladamente los procedimientos a desarrollarse como son: aclimatación, range finder y la propuesta de diseño.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|-----|
| RESUMEN..... | I |
| ÍNDICE GENERAL..... | II |
| ABREVIATURAS..... | V |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | VI |
| ÍNDICE DE TABLAS | VII |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| CAPÍTULO I. ASPECTOS GENERALES | 5 |
| 1.1. Bioensayo..... | 5 |
| 1.2 Propósito de los bioensayos | 6 |
| 1.3 Clases de Bioensayos | 7 |
| 1.3.1 Letales o Agudos..... | 7 |
| 1.3.2 Sub letales o Crónicos..... | 7 |
| 1.4 Ventajas..... | 8 |
| 1.5 Desventajas | 8 |
| 1.6 Alevines de tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i> | 9 |
| 1.7 Biología y Estructura del Organismo..... | 10 |

| | | |
|--|--|----|
| 1.8 | Taxonomía del organismo..... | 11 |
| 1.9 | Sulfato de Cobre..... | 12 |
| 1.9.1 | Características Generales..... | 12 |
| 1.9.2 | Propiedades Físicas y Químicas..... | 13 |
| 1.9.3 | Uso de Sulfato de Cobre en Acuicultura..... | 13 |
| 1.9.4 | Efectos Toxicológicos..... | 14 |
| 1.9.5 | Efectos que puede producir en el hombre..... | 15 |
| 1.10 | Toxicidad del cobre como metal pesado para los peces. | 16 |
| CAPÍTULO II. DISEÑO DEL BIOENSAYO..... | | 19 |
| 2.1. | Descripción del Diseño del Bioensayo | 19 |
| 2.2 | Especie Utilizada..... | 19 |
| 2.3 | Materiales y Equipos Utilizados | 20 |
| 2.3.1 | Material Biológico..... | 20 |
| 2.3.2 | Materiales de laboratorio | 20 |
| 2.3.3 | Equipos..... | 21 |
| 2.4 | Contaminante | 22 |
| 2.5 | Metodología | 22 |
| 2.5.1 | Aclimatación | 22 |
| 2.6 | Parámetros a medir..... | 23 |
| 2.7 | Range Finder | 24 |
| 2.8 | Ensayo | 26 |
| 2.9 | Diseño Experimental..... | 28 |

| | | |
|------|--|----|
| 2.10 | Método para estimación de LC50 | 29 |
| | CAPÍTULO III. RESULTADOS ESPERADOS | 30 |
| 3.1. | Resultados Esperados..... | 30 |
| | BIBLIOGRAFÍA | 32 |
| | ANEXOS..... | 37 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------------------|---|
| p | % de efecto |
| Cd | Cadmio |
| °C | Centígrados |
| m ³ | Centímetro cúbicos |
| cm | Centímetros |
| Cu | Cobre |
| C ₂ | Concentración Final |
| C ₁ | Concentración Inicial |
| LC50 | Concentración Letal media |
| g | Gramos |
| kg | Kilogramo |
| Hg | Mercurio |
| mg/l | Miligramo por Litro |
| H ₂ O | Molécula de Agua |
| n | Número de individuos |
| r | Número de organismos muertos o afectos |
| ppm | Partes por Millón |
| pH | Potencial de Hidrogeno |
| SO ₄ | Sulfato |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | Sulfato de Cobre Penta hidratado |
| V ₂ | Volumen Final |
| V ₁ | Volumen inicial |
| Zn | Zinc |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Fig. 1 Tilapia Roja (<i>Oreochromis sp</i>)..... | 12 |
| Fig. 2 Sulfato de cobre II ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en grano y piedra | 13 |
| Fig. 3 Estructura Molecular del Sulfato de cobre II ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). | 13 |
| Fig. 4 Organismo de prueba alevines de <i>Oreochromis sp</i> | 20 |
| Fig. 5 Diseño Experimental de Bioensayo..... | 28 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla I. Parámetros Físicos- Químicos del agua..... | 13 |
| Tabla II. Características Físicas del Sulfato de cobre..... | 17 |
| Tabla III. Valores de CL-50 del Cu en diferentes especies de peces | 11 |
| Tabla IV. Parámetros óptimos para la aclimatación de organismos 96 horas..... | 23 |
| Tabla V. Condiciones de prueba del bioensayo en 96 horas..... | 27 |

Introducción

El uso generalizado de las sustancias químicas como el cobre es altamente tóxico para la salud humana; el cobre lo encontramos de origen natural, proveniente de actividades industriales, productivas y toda aquella actividad que el hombre realice para la obtención de un fin, constituyendo así un serio riesgo de contaminación al ambiente circundante (1).

En la industria es necesaria la transformación de la materia prima, para llegar a un producto terminado, esto trae como consecuencia la propagación de desechos tóxicos a los ecosistemas, en la cual estos productos llegan a tener diferentes niveles de peligrosidad (1).

Los tipos de contaminantes importantes son los que afectan a los recursos naturales básicos como son; aire, suelo, agua, que inciden directamente a los diferentes niveles tróficos en el ecosistema (2).

Los metales pesados como; Mercurio (Hg), Cobre (Cu), Zinc (Zn), Cadmio (Cd) entre otros, se caracterizan por tener una distribución similar en su nivel electrónico formando parte de los metales de transición. La mayoría de ellos son esenciales para

el metabolismo de los seres vivos a bajas concentraciones, pero pueden ser tóxicos para los organismos cuando aparecen a elevadas concentraciones (3).

El cobre (Cu) es uno de los metales pesados de mayor importancia toxicológica en la actualidad, como serio contaminante de ecosistemas acuáticos (4). El hecho de que las algas marinas acumulen contaminante constituye el primer eslabón de la cadena trófica ya que los peces se alimentan de estos microorganismos y se produce la transmisión de metales contaminantes a los demás organismos superiores.

El cobre (Cu) como compuestos no biodegradables es absorbido y acumulado por los peces en los tejidos, e incorporados en la cadena trófica, como principal consumidor el hombre, causándole problemas perjudiciales latentes de salud (5). El hombre es el último eslabón en la cadena trófica por tanto al consumir alimentos contaminados, bioacumula en su sistema digestivo cierta cantidad de sustancia química adquirida por el animal.

Por lo general los peces son utilizados como indicadores en investigaciones por su tamaño, biología y también su rápida tasa de reproducción, ayudando a realizar modelos experimentales en bioensayo, puesto que estos son adecuados para pruebas de investigación toxicológica dando así una respuesta del grado de contaminación del medio acuático. A su vez, presentan diferentes patrones de acumulación, dependiendo del metal pesado, la concentración en el medio y del tiempo de exposición (25).

En 1997 Robinson y Avenant-Oldewage, realizó investigaciones de toxicidad del Cu en tilapia (*Oreochromis mossambicus*) dió como resultado alta acumulación de Cu

en el hígado, branquias, al contrario de los músculos estructurales que se observó bajas propiedades de acumulación.

La incorporación del Cobre como metal pesado en peces se da por medio de tres rutas las cuales son: branquias, deglución de alimento y con una baja posibilidad en la superficie corporal (6).

Un método clásico y efectivo para estudios de investigaciones en el medio acuático son los bioensayos, evalúan y registrar la presencia o ausencia de efectos tóxicos aparentes de los contaminantes sobre los organismos vivos. Las pruebas letales o toxicidad aguda (LC50) han sido definidas como la dosis o concentración de un agente que produzca la muerte del 50% de la población acuática, en un tiempo determinado < 96 horas. El LC50 se puede clasificar según su exposición este puede ser de corto a largo plazo, crónico o agudo respectivamente (7).

Debido a las actividades antropogénicas realizadas en nuestro país, como la industria, metalurgia, entre otras podemos observar la acumulación de contaminantes en el medio estos comúnmente desembocan en los sistemas terrestres y acuáticos, contaminando organismos y poblaciones representando un grave problema para la salud del hombre, ya que la tilapia es considerada como mayor suministro de comida por ser un nutriente básico y esencial para la localidad, definiéndolo así como un factor muy importante a nivel socio - económico para el Ecuador.

Con esta información recolectada acerca de bioensayos y contaminantes que afectan directamente a los organismos en el ambiente realizamos una “Propuesta de Diseño de Bioensayo toxicológico agudo con Sulfato de Cobre en alevines *Oreochromis sp.*”

utilizaremos este organismo para determinar la toxicidad aguda del contaminante sulfato de cobre.

Este proyecto pretende diseñar un bioensayo que permite evaluar el comportamiento y daños en el organismo, cuando esté expuesto a altas concentraciones de cobre.

En el presente bioensayo se plantea el siguiente objetivo general:

Diseñar un bioensayo toxicológico agudo con sulfato de cobre para determinar un LC50 a 96 horas de alevines del híbrido *Oreochromis sp* y como objetivo específico.

Evaluar el comportamiento y daños en alevines de tilapia roja (*Oreochromis sp*) durante el bioensayo.

CAPÍTULO I. ASPECTOS GENERALES

1.1. Bioensayo

Los bioensayos se los utiliza para evaluar efectos de contaminantes o cualquier sustancias tóxicos en sistema acuáticos (9) determinando el grado de afectación sobre los organismos vivos (10) (11).

Los bioensayos de toxicidad aguda son nada más que ensayos en los cuales se cuantifica las concentraciones letales para un organismo denominándolos concentraciones letales medias (LC50) y nos da a conocer que dicha concentración causa la muerte del 50% de la población experimental en un tiempo establecido (15).

Los bioensayos son esenciales en la creación de nuevos fármacos y en el seguimiento de los contaminantes ambientales, (3) esto nos ayuda también a determinar la concentración de cada uno de los contaminantes nuevos o la constitución particular de una mezcla (9). El uso frecuente de los bioensayos es debido al tiempo de duración pues son rápidos, sensibles, reproducibles y de poco costo comercial, esto facilita la investigación para usar un contaminante.

Se debe establecer la estandarización tanto en los bioensayos como en las pruebas de toxicidad, así se constituye la sensibilidad que podrá tener la especie frente a un compuesto, y la que tan reproducible es el experimento frente a otro tóxico de referencia (12).

La estandarización y calibración es relacionado con el control de calidad y la precisión que debe alcanzarse en los resultados generados por el bioensayo. Se da esta determinación puesto que así se puede corroborar que los resultados son dados por el efecto del tóxico y no por variantes del medio.

Las dosis de sustancia administradas pueden venir dadas en diferentes unidades de medida como lo son ppm o mg/l (10). Las repuestas son reflejadas en la aplicación de las dosis determinadas pues cada dosis reflejara diferentes resultados (10).

1.2 Propósito de los bioensayos

- Medición de la actividad de las sustancias.
- La búsqueda del efecto ocurrido por la sustancia
- Determinar la concentración letal media (LC50) de sulfato de cobre
- Determinar la relación Dosis- Respuesta
- Definir la sensibilidad de la especie y su secuencia de efecto frente al tóxico.

El uso de los bioensayos para la toxicidad de sustancias liberadas al medio como es el LC50 se ha convertido en herramientas ampliamente utilizadas en el campo del ecotoxicología a nivel mundial para conocer los efectos en los diferentes sistemas.

1.3 Clases de Bioensayos

1.3.1 Letales o Agudos

Son pruebas en donde la exposición se realiza en un periodo ≤ 96 horas. Pero existen variaciones en cuanto a las especies evaluadas pues no todas utilizan el mismo periodo para completar el ciclo como por ejemplo las bacterias, protistos y ciertos vertebrados (13). Es común categorizar los ensayos por su duración sin importar la especie empleada (13).

Por medio de procesos estadísticos, se podrá presentar los datos de la toxicidad agua, sus respuestas pueden expresarse como: concentraciones medias LC50 (15).

1.3.2 Sub-Letales o Crónicos

La finalidad es evidenciar las respuestas de los organismos ante el contaminante y no debe existir la muerte del organismo ensayado (9). El tiempo de exposición del componente es relativamente largo.

Al cabo de un tiempo establecido y dependiendo del estadio de organismo, se estiman concentraciones de las sustancias a probar, con el efecto del 50% de efectos no letales (CE50).

Un ensayo definitivo se podrá usar para considerar un tiempo requerido y producir un efecto al 50% de los organismos, a una concentración específica (14).

1.4 Ventajas

- Los bioensayos son método de detección, relativamente simple.
- Se pueden emplear para monitoreo de las causas y efectos de tipo ambiental.
- Existen dos tipos de respuestas, cuantitativas y cualitativas.
- El costo es bajo.
- Se los puede realizar en cualquier lugar libre de microorganismos.
- Cualquier organismo puede ser sometido a un bioensayo (19).

1.5 Desventajas

- No existe un bioensayo estándar o universal.
- No nos informa de manera específica de ciertos compuestos.
- Limitaciones en cuanto a lugares donde realizar la prueba.
- Gran sensibilidad frente al tóxico.
- Muerte de los organismos debido a estrés o antes de dar inicio.
- La prueba se anula si existen organismos muertos en el control (19).

1.6 Alevines de tilapia roja *Oreochromis sp.*

La tilapia fue distribuida en 1939 originalmente desde África y habitan la mayor parte de regiones tropicales, hoy podemos encontrarla en varios países como México, Estados Unidos, Ecuador, entre otros, por su gran acogida tanto por su valor social como por su valor comercial (8).



Fig. 1: Tilapia Roja (*Oreochromis sp.*)
Fuente: Escuela Superior Politécnica del
Guayas; (2015).

La tilapia roja posee alto porcentaje de proteína animal por lo que se considera una especie de importancia comercial siendo cultivado en diferentes países, la producción de tilapia roja abarca alrededor de 1.6 millones de toneladas métricas al año, ocupando así el segundo puesto a nivel mundial (21).

El Ecuador en el año 2013, exportó 40.13 toneladas de tilapia roja aproximadamente, distribuidas de la siguiente manera: EEUU 39.46 t, Holanda (países bajos) 0,67 t. (41)

La tilapia es un pez teleósteo, de aguas cálidas que habita tanto en agua dulce como salada, es de fácil adaptabilidad en aguas poco oxigenadas ya que no se afecta su reproducción ni su crecimiento (22).

1.7 Biología y Estructura del Organismo

- Edad de madurez sexual: Machos (4 a 6 meses); Hembras (3 a 5 meses)
- Número de desoves: 5 a 8 veces el año.
- Temperatura de desove: 25 a 31 °C
- Número de huevos/hembra/desove: >100 huevos hasta 1500
- Vida útil de los reproductores: 2 años.
- Tipo de incubación: bucal
- Rango de pesos en adultos: 600 - 800 g
- Tiempo de incubación: 3 a 6 días

La tilapia presenta características especiales que marcan la diferencia de otras especies; familia de los Cíclicos (22).

La tilapia roja es un pez tetra híbrido, que se lo conoce por ser una mutación albina entre cuatro especies: *O. aureus*, *O. niloticus*, *O. mossambicus*. La tilapia presenta

características importantes como resistencia a bajas temperaturas, es resistente a enfermedades, mayor capacidad de crecimiento, y color más estable que apareció luego de una década a partir de la generación de alevines de coloración rojiza anaranjada (23). La tilapia posee vitaminas como D, E, complejo B, fosforo, calcio, y ácido fólico.

1.8 Taxonomía del organismo

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Superclase: Gnathostomata

Clase: Actinopterygii

Orden: Perciforme

Suborden: Percoide

Familia: Cichilidae

Género: Oreochromis

Especie: *Oreochromis sp.*

Condiciones óptimas para el desarrollo normal de la tilapia

| | |
|--------------------|--------------|
| Temperatura | 26 °C |
| Oxígeno | 5mg/l |
| Ph | 7 |
| Dureza | 100-170 mg/l |
| Turbidez | 4cm |
| Transparencia | 45cm |

Tabla 1. Parámetros Físicos- Químicos del agua.

Fuente: clases dictadas por el Marcillo, Ecuador M.S,c. (2014).

1.9 Sulfato de Cobre

Este compuesto químico se deriva del Cobre en la cual forma cristales azules solubles en agua. El sulfato de cobre (II) anhidro más agua da como producto sulfato de cobre (II) penta-hidratado o sulfato cúprico penta-hidratado y una coloración de azul brillante muy tóxico para el medio ambiente (16).



Fig. 2: Sulfato de cobre II ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en grano y piedra
Fuente: SOLYSAL.SL; (2008).

1.9.1 Características Generales

Una de las características del sulfato de cobre es que tiene geometría molecular octaédrica y es paramagnético, también es llamado como "vitriolo azul" y "piedra azul"(16, 18).

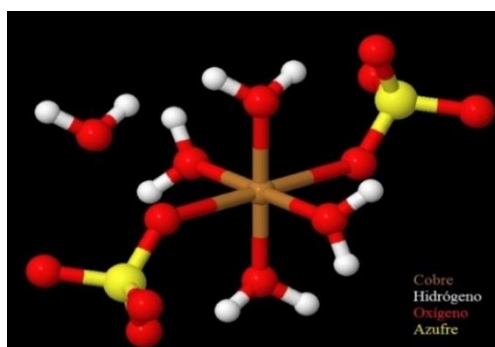


Fig. 3: Estructura Molecular del Sulfato de cobre II ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).
Fuente: Deborah García; (2013).

1.9.2 Propiedades Físicas y Químicas

| Apariencia | Cristales azules transparentes |
|---------------------|---------------------------------------|
| Punto de Ebullición | 650 °C |
| Peso molecular | 249.686 |
| Olor | No tiene y corrosivo al acero |
| Densidad | 2,3 g/cm ³ |
| Masa molar | 159,6 g/mol |
| Punto de fusion | 110 °C |
| pH | 2 |
| Solubilidad en agua | 31,7 a 0 °C, g/100 ml |

Tabla 2. Características Físicas del Sulfato de cobre
Fuente: FAO, 2003

1.9.3 Uso de Sulfato de Cobre en la Acuicultura

El sulfato de cobre es un compuesto usado en el sector acuícola, con un valor de 2 kg/ha aproximadamente, entre sus usos más importante tenemos (20):

- Combaten la concentración altas de fitoplancton en las piscinas.
- Controla moluscos como caracoles en la cual este transmite platelmintos parásitos en los peces.
- Tratamiento de ctenóforos y protozoarios parásitos como el *Ichthyophthirius multifiliis* este es un patógeno que produce puntos blancos.
- Como tratamiento para el hongo Saprolegnia, este tipo de hongo mata los huevos e invade las heridas de los peces a diferentes edades.
- Controla las cianobacterias ya que estas causan mal sabor en los peces (21).

1.9.4 Efectos Toxicológicos

El sulfato de cobre es un compuesto químico que se deriva del cobre y por ser este un metal se encuentra en el ambiente que ocurre naturalmente en varias formas que favorecen al ecosistema como sales que está presente: rocas, suelo, agua y aire. En los individuos es esencial en la absorción del hierro y síntesis de la hemoglobina (20).

El sulfato de cobre es utilizado en la agricultura como: fungicida cúprico, nutriente de plantas como abonos, corrección de deficiencia de cobre en suelos (19).

En la ganadería como: Suplemento alimenticio, crecimiento, engorde, desinfectante, germicida, antiséptico y prevención de bacterias (19).

Industria metalúrgica: En solución para baños galvánicos, producción de circuitos impresos de cobre, baterías eléctricas, obtención de cátodos de cobre entre otros (17).

El sulfato de cobre expuesto en altas cantidades se convierte en un tóxico peligroso para los sistemas acuáticos (19), en los peces se acumula primordialmente en el hígado (19). El sulfato de cobre es considerado como un tóxico para bivalvos y nemátodos, es un tóxico peligroso en anfibios, abejas, algunas plantas. Para zooplancton, peces y crustáceos es moderadamente tóxico entre alta / baja concentraciones y no para aves (19).

1.9.5 Efectos que puede producir en el hombre:

Los seres humanos están propensos a tener contacto directo a ser expuesto al sulfato de cobre por medio de la inhalación e ingestión causando los siguientes efectos (20):

- **Sistema cardiovascular:** Hipertensión
- **Sistema gastrointestinal:** Vómitos, diarrea, gastroenteritis hemorrágicas se asocia con erosión de las mucosas, gusto metálico, quemaduras en el epigastrio, afectando el hígado y riñón dando lugar la anemia hemolítica.
- **Sistema ocular:** Producir una fuerte irritación en los ojos como conjuntivitis, inflamaciones, ulceración.
- **Sistema dérmico:** En la piel puede producir una fuerte irritación, picazón o eczema (20).

1.10 Toxicidad del cobre como metal pesado para los peces.

En los peces las concentraciones altas de este metal causan alteraciones en los sitios activos de las enzimas, peroxidación de las membranas ocasionando modificaciones en las células y tejido hematopoyético, quimiorreceptores, mecanorreceptores, entre otros (31, 32).

El LC50 en 96 horas de cobre en perca gigante (*Lates calcarifer*) juvenil oscilaron entre 0,27 a 0,41 mg/l, en la cual los peces murieron solo altas concentraciones en las bajas mostraron signos de estrés (34).

En el bagre (*Clarias gariepinus*) el LC50 del sulfato de cobre penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) dio una concentración de 70.135 mg/l, dando cambios en la conducta, en su mayoría se observaron respuestas de locomoción entre los organismos y mortalidad a la exposición de las diferentes concentraciones de sulfato de cobre (35).

Las concentraciones del LC50 de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) fue de 0.94 – 4 ppm en la cual los individuos manifestaron los siguientes síntomas: hiperexcitación, letargo y pérdida del eje de nado, aumento moderado en la producción de moco a nivel branquial y fatiga, hiperplasia epitelial inter-lamelar, inter-filamental, e infiltrado de células inflamatorias, primordialmente en los granulocitos y microscópicamente hiperplasia epitelial inter-lamelar junto con fusión y severa congestión lamelar (36).

| Pez | CL50 (µg/l) a 96 horas | °C | Ppm CaCO ₃ | Fuente |
|---|---------------------------|----|--------------------------|---|
| Pez dorado (<i>Carassius auratus</i>) | 1380 | 18 | 272 | U.S Department of Interior, Fish and Wildlife Service, 1980 |
| Carpitas cabezonas (<i>Pimephales promelas</i>) | 838 | 18 | 272 | - |
| Percasol verde (<i>Lepomis cyanellus</i>) | 3510 | 18 | | - |
| Perca de agallas azules (<i>Lepomis cyanellus</i>) | 884 | 18 | | - |
| Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) | 135 | 13 | | - |
| Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>) | 50000 | | | Lam et al.,1998 |
| Lubina rayada (<i>Morone Soxatilis</i>) | 1000 | | | Hughes,1970 |
| Tilapia (<i>Tilapia mossambica</i>) | 1520 | | | Lam et al.,1998 |
| Tilapia (<i>Tilapia mossambica</i>) | 6000 en 48 h | | | Balavenkatasubbaiah et al.,1984 |
| <i>Salmo gairdneri</i> | 42 | | | U.S,EPA,1980 |
| <i>Fundulus diafanus</i> | 840 | | | U.S,EPA,1980 |
| <i>Salmo clarki</i> | 73,6 | | | U.S,EPA,1980 |
| <i>Lepomis macrochirus</i> | 1100 | | | U.S,EPA,1980 |
| <i>Pimephales promelas</i> | 75-84 | | | U.S,EPA,1980 |
| <i>Lepomis gibbosus</i> | 2400- 2700 | | | U.S,EPA,1980 |
| <i>Salvelinus fontinalis</i> | 100 | | | U.S,EPA,1980 |
| <i>Poecilla reticulata</i> | 138 | | | U.S,EPA,1980 |
| <i>Carassius auratus</i> | 300 | | | U.S,EPA,1980 |
| <i>Roccus saxatallis</i> | 4000 | | | U.S,EPA,1980 |
| <i>Roccus americanus</i> | 4000 – 6400 | | | U.S,EPA,1980 |
| <i>Cyprinus carpio</i> | 800 | | | U.S,EPA,1980 |
| <i>Anguilla rostrate</i> | 6400 | | | U.S,EPA,1980 |
| <i>Lepomis machochirus</i> | 884 | | | U.S,EPA,1985 |
| <i>Lepomis cyanellus</i> | 3510 | | | U.S,EPA,1985 |
| <i>Pimephales promelas</i> | 838 | | | U.S,EPA,1985 |
| Salmon plateado (<i>Oncorhynchus Kisutch</i>) | 286 | | | U.S,EPA,1985 |

Tabla 3. Valores de CL-50 del Cu en diferentes especies de peces.
Fuente: US. EPA. (U.S Department of Interior, Fish and Wildlife Service).

Es importante realizar un LC50 en tilapia ya que este es un organismo que se exporta del Ecuador y debe cumplir con requerimientos establecidos por los diferentes países a los cuales se exporta. Las tilapias deben cumplir con requerimientos y estándares de calidad para poder venderse a otros países, es por esto que se realiza estudios de diversos tipos sobre este pez (33). En la tabla 3, nos muestra las concentraciones letal 50 de cobre o efectos de toxicidad en los organismos de agua (33).

CAPÍTULO II. DISEÑO DEL BIOENSAYO

2.1. Descripción del Diseño del Bioensayo

Esta propuesta de bioensayo de toxicidad aguda, se lo realiza para calcular la concentración letal media (LC50) de sulfato de cobre a 96 horas en los alevines de tilapia roja.

2.2 Especie Utilizada

Para la ejecución del bioensayo se utilizará una población de 350 alevines de la especie *Oreochromis sp.*, obtenidos de una misma línea genética, libre de patógenos, que posean buena coloración, textura, y su alimentación haya sido adecuada. Los alevines a usarse deben permanecer en un ambiente libre de contaminantes. El peso aproximado de los individuos será entre 0.9 a 1.1g, con una longitud de 1 a 2.5 cm; los organismos tendrán 30 días de nacido.



Fig. 4: Organismo de prueba alevines de *Oreochromis sp.*

Fuente: Instituto Nacional de Pesca; (2014).

2.3 Materiales y Equipos Utilizados

2.3.1 Material Biológico

Alevines *Oreochromis sp.*

2.3.2 Materiales de laboratorio

- 30 peceras de vidrio con capacidad de 5 litros
- Mangueras de aire
- Piedras difusoras
- Compresor de aire
- Conexiones “T”
- Recipientes
- Elementos para pesar (Recipientes y espátulas)
- Micro pipetas y puntas
- Pera de Goma
- Toalla de Papel
- Tubo de ensayo
- Gradillas

- Agua Destilada
- Pizeta
- Papel Aluminio
- Guantes
- Mascarillas
- Mandil
- Lámpara (iluminación algal)
- Agua dulce

2.3.3 Equipos

- Balanza
- Autoclave
- Medidor Multiparámetros
- Medidor de pH
- Cámara Neubauer
- Mechero de Bunsen
- Microscopio
- Aireado

2.4 Contaminante

El bioensayo se realizará con sulfato de cobre penta- hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ya que es su presentación comercial en la cual es utilizado generalmente en el sector acuícola para controlar altas concentraciones de fitoplancton y cianobacterias en las piscinas, tratamientos de moluscos, protozoarios parásitos y para hongos que mata los huevos e invade las heridas de los peces (20). El sulfato de cobre será medido en unidades mg/l a diferentes concentraciones.

2.5 Metodología

2.5.1 Aclimatación

Los organismos deberán ser colocados en un acuario con capacidad mínima de 400 litros, se alimentara con balanceado al 45% de proteína de acuerdo a la biomasa obtenida luego de haber pesado los alevines, se dosificará el alimento dos veces al día (37). Los pellets del balanceado poseen un micraje de 0.5 a 1 mm.

Para una óptima calidad de agua y adaptación de los organismos se colocará un sistema de aireación, para la extracción de materia orgánica se sinfoniará, los parámetros físico- químicos serán monitoreados periódicamente. El agua que se extraiga deberá ser devuelta a la pecera, previamente pasada por un filtro de 5 μm , así se evitará realizar recambios de agua.

Todo el proceso mencionado se deberá efectuar por 10 días, antes de ser sometidos al contaminante. Regularmente se estima que un 15% de la población muere durante la fase de aclimatación (15).

2.6 Parámetros a medir

Los parámetros de calidad de agua, deberá emplearse un multiparámetro o en su defecto o con los respectivos equipos dependiendo del parámetro a medir, manteniendo los rangos adecuados de:

| Parámetro | Rangos |
|------------------|-------------|
| Temperatura | 24- 27 ° C |
| Oxígeno disuelto | 5-7 mg |
| pH | 6-7 |
| Alcalinidad | 50-100mg/l |
| Dureza | 80-100 mg/l |
| Amonio | 0-0.05mg/l |

Tabla 4. Parámetros óptimos para la aclimatación de organismos 96 horas.
Fuente: Secretaria de Desarrollo Rural del Estado de Puebla, (39).

Se deberán controlar los parámetros de aclimatación durante todo el bioensayo o el tiempo que dure el mismo.

2.7 Range Finder

Previo al ensayo se realizará el ranger- finder, en la cual nos ayuda a determinar el rango de concentración del contaminante que será usado en el bioensayo final. Se obtendrá la concentración con 0 y 100% de mortalidad que serán determinadas en orden de magnitud de 0.01, 0.1, 10, 100,1000 ppm.

Para ello se utilizará de 3 a 5 organismos por pecera y un control con cinco concentraciones a 96 horas.

Se utilizará una solución stock con una concentración de 100 ppm de sulfato de cobre penta-hidratado en un litro de agua destilada y considerando como referencia una concentración de 4 ppm de sulfato de cobre penta-hidratado en alevines con 100% de mortalidad. Para nuestro bioensayo final se utilizará concentraciones de 0.5, 0.86, 1.44, 2.4, 4 mg/l con una solución stock de 100 ppm en la cual se determinará el volumen que se necesita para obtener dichas concentraciones en cinco litros de agua para lo cual emplearemos la siguiente fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Dónde:

V_1 & V_2 = volúmenes iniciales y finales

C_1 & C_2 = concentraciones iniciales y finales.

Concentraciones en 5 litros de agua.

100 ppm=100mg/l

$$C_1 = 0,5 \text{ mg/l}$$

$$V_2 = \frac{(0.5 \text{ mg/l})(5000 \text{ ml})}{100 \text{ mg/l}} = 25 \text{ ml}$$

$$C_2 = 0,86 \text{ mg/l}$$

$$V_2 = \frac{(0.86 \text{ mg/l})(5000 \text{ ml})}{100 \text{ mg/l}} = 43 \text{ ml}$$

$$C_3 = 1.44 \text{ mg/l}$$

$$V_2 = \frac{(1.44 \text{ mg/l})(5000 \text{ ml})}{100 \text{ mg/l}} = 72 \text{ ml}$$

$$C_4 = 2.4 \text{ mg/l}$$

$$V_2 = \frac{(2.4 \text{ mg/l})(5000 \text{ ml})}{100 \text{ mg/l}} = 120 \text{ ml}$$

$$C_5 = 4 \text{ mg/l}$$

$$V_2 = \frac{(4 \text{ mg/l})(5000 \text{ ml})}{100 \text{ mg/l}} = 200 \text{ ml}$$

Utilizando la fórmula descrita anteriormente los volúmenes dados son 25, 43, 72, 120, 200 ml para la obtención de las concentraciones del sulfato de cobre pentahidratado del bioensayo serán de: 0.5, 0.86, 1.44, 2.4, 4 mg/l en cinco litros de agua.

Para dar inicio al bioensayo los materiales a usarse deberán ser lavados de manera correcta: pasando por agua potable en primer lugar, para luego recibir un baño ácido el cual lo liberará de cualquier detergente o residuos de contaminante que pudiera

estar en los mimos; al cabo de 24 horas se extraerá del baño ácido los materiales y se enjuagaran con agua destilada.

2.8 Ensayo

Se utilizará 350 alevines de tilapia roja sin recambio de agua en un periodo de 24 a 96 horas, después de la aclimatación del alevín se deberá suspender la alimentación 24 horas antes de empezar hacer el bioensayo, el cual se llevará a cabo en las peceras de vidrio con los organismos distribuidos aleatoriamente. Las peceras tendrán una capacidad de 5 litros y contarán con un sistema de aireación el cual proveerá aire por medio de piedras difusoras. El bioensayo se realizará en un área limpia y con una temperatura controlada; se medirá los parámetros físico- químicos cada 12 horas durante las 96 horas, pasadas las 24 horas se adicionara las concentraciones de: 0.5, 0.86, 1.44, 2.4, 4 mg/l de sulfato de cobre penta-hidratado en cada una de las peceras para obtener la concentración deseada para cada uno de los tratamientos. El sulfato de cobre deberá ser colocado de forma lenta. En la tabla 5. Se mostrara las condiciones del bioensayo.

| Factor | Condición |
|--|---|
| Temperatura | 25 – 26 ° C |
| Oxígeno disuelto | 5-6 mg/l |
| pH | 6-7 |
| Amonio | 0-0.05mg/l |
| Fotoperiodo | 12:12 h Luz/oscuridad |
| Tipo de bioensayo | Estático |
| Edad de organismos prueba | Alevines de 0.9-1.1 g y una longitud de 1-2.5cm |
| Nº de réplicas por concentración | 3 |
| Nº de concentraciones incluye el control | 0, 0.5, 0.86, 1.44, 2.4, 4 mg/l |
| Organismos por pecera | 10 |
| Organismos totales por concentración | 30 |
| Alimentación | No requiere |
| Agua de dilución | Agua destilada |
| Tiempo de exposición | 96 h |

Tabla 5. Condiciones de prueba del bioensayo en 96 horas.
Fuente: Autores

Se procederá a realizar observaciones a las 24, 48, 72, y 96 horas luego de la exposición con el sulfato de cobre, se eliminará los residuos de organismos muertos en el medio y llevaremos un conteo de supervivencia.

Todo lo observado y desarrollado durante el proceso, de inicio a fin, se registrara en una bitácora en la cual será escrita diariamente con la finalidad de conocer todo el desarrollo del bioensayo y registrar todos los datos del mismo. La bitácora será de gran ayuda por si existiere algún tipo de error.

2.9 Diseño Experimental

Se utilizará en el laboratorio un diseño llamado “bloques al azar” es decir que distribuiremos las peceras aleatoriamente con sus diversas concentraciones; no se colocará las peceras linealmente debido a que se puede presentar algún tipo de contaminación y nos dieran valores erróneos.

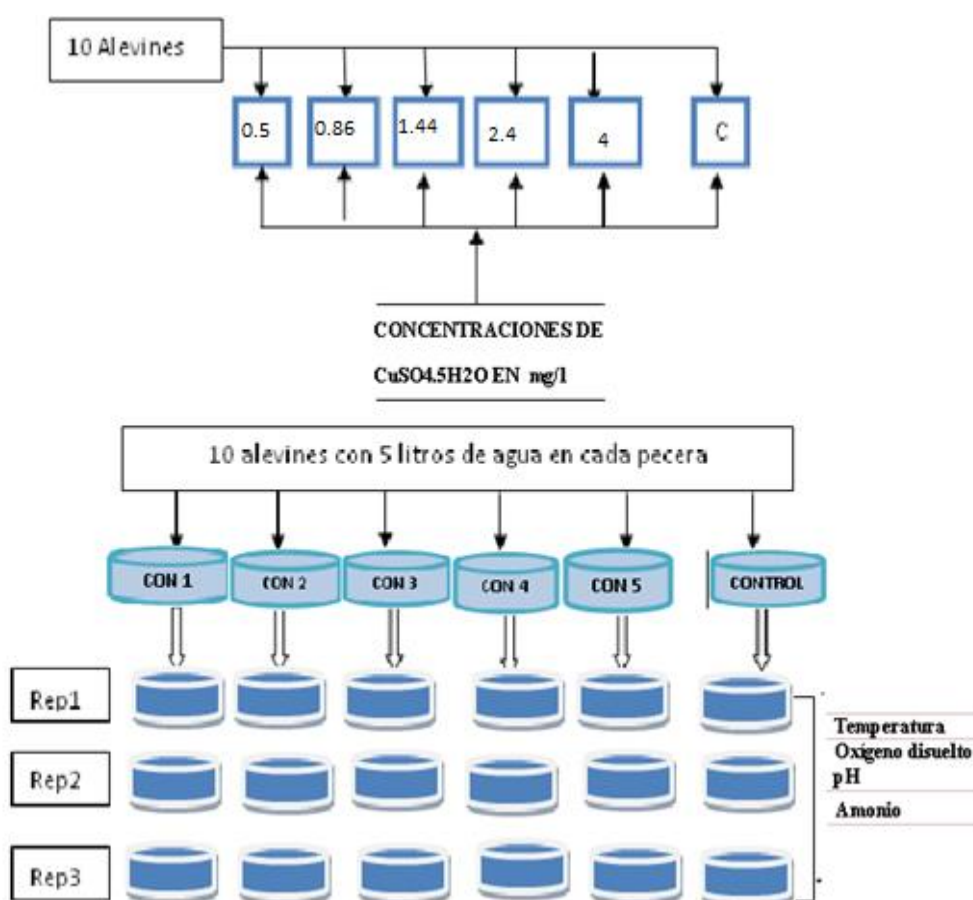


Fig. 5. Diseño Experimental de Bioensayo

Fuente: Autores

Los datos que proporcionará el bioensayo se analizarán por medio del análisis estadístico Probit que nos permitirá calcular la concentración letal 50 de cobre en alevines de tilapia roja.

2.10 Método para estimación de LC50

El método Probit es utilizado comúnmente en las pruebas de toxicidad aguda LC50, sus respectivos límites de confianza al 95% y se lo calcula mediante la fórmula:

$$p = \left(\frac{r}{n} \right) \times 100$$

n = número de individuos

r = número de organismos muertos o afectados

p = % de efecto

El análisis estadístico Probit ajusta los datos de mortalidad por medio de una técnica de probabilidad en la cual estima valores alcanzados con una distribución logarítmica de tolerancias (36).

CAPÍTULO III. Resultados Esperados

3.1. Resultados Esperados

Los controles deberán mantener el 90% de sobrevivencia en todo el bioensayo para que este sea válido; si existiera la muerte de al menos el 10% de organismos del control, se descarta el bioensayo.

En la pecera de control se espera observar a los alevines desplazándose en toda la columna de agua con reacciones rápidas a estímulos físicos.

Esperamos observar los siguientes resultados:

La actividad natatoria y la tasa de sobrevivencia serán los principales factores afectados conforme se aumenta la concentración del contaminante.

El sulfato de cobre provoque un pequeño cambio en el movimiento natatorio del pez, el mismo que podría ser errático o en círculos, o quizás golpearse con los bordes de la pecera.

Tener mortalidades en los organismos expuestos a diferentes concentraciones de sulfato de cobre a excepción de 0.5 mg/l; así mismo se estima que las reacciones serán lentas hacia cualquier estímulo y el 100% de mortalidad en los organismos expuestos a 4mg/l de sulfato de cobre.

Finalmente los organismos probablemente presentarán un total letargo, escasez de actividades natatorias, una reacción muy pobre en los estímulos mecánicos, signos de desesperación ante el contaminante sometido y no realizarán movimientos con sus aletas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ministerio de Ambiente; Gobierno Nacional del Ecuador; (2009). “*Estudio para conocer los Potenciales Impactos Ambientales y Vulnerabilidad Relacionada Con Las Sustancias Químicas Y Tratamientos De Desechos Peligrosos. En El Sector Productivo Del Ecuador*”. Recuperado de <http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/03/PART11.pdf>
- [2] Sonnenholzner, S. (2008). “*Tratamiento Químicos Miselánicos*”; Fundación CENAIM-ESPOL.
- [3] Abalde, J., Cid, E. Torres & C. Herrero. (1995). “*Bioaculacion de cobre en diatomea marina Phaeodactylum tricornutum Bohlin*”. (Universidad de la Coruna, Campus La Zapateira s/n)
- [4] Jeannette Silva, Carmen Fuente alba, Enrique Bay-Schmith & Alberto Larrain; (2007). “*Estandarización del Bioensayo de Toxicidad aguda con Toxicidad agua con Diplodon chilensis usando en tóxico de referencia*”. (Artículo de investigación).
- [5] Fundación Regional de Asesoría en Derechos Humanos, INREDH Ecuador (2011). “*Los Impactos De La Explotación Petrolera en Relación Al Derecho Humano al Agua*”. Recuperado de http://inredh.org/index.php?option=com_content&view=article&id=176%3Alos-impactos-de-la-explotacion-petrolera-en-relacion-al-derecho-humano-al-agua&Itemid=126
- [6] Mendoza Rodríguez, R. (2007). “*Toxicidad aguda del cobre (Cu²⁺) en postlarvas de camarón de río Cryphiops caementarius (Natantia, Palaemonidae)*”. (Nota Científica, Universidad Nacional de Santa.

[7] Centro EULA - Chile, (2007); “*Programa de Monitoreo Eco tóxicológico de los Efluentes Industriales en el Río Cruces, Provincia de Valdivia Chile*”. (Universidad de Concepción).

[8] Acerca del cultivo de tilapia Nilotica y Tilapia Roja. FAO, 2003. Copescal. Recuperado de http://www.minagri.gob.ar/site/pesca/acuicultura/01=Cultivos/01-Especies/_archivos/000008-Tilapia/071201_Acerca%20del%20Cultivo%20de%20Tilapia%20Roja%20o%20Del%20Nilo.pdf

[9] Jinés, C. (2012). “*Evaluación del Efecto de diferentes concentraciones de diésel sobre Oreochromis niloticus mediante bioensayo*”. (Tesis de Grado, Escuela Superior Politecnica del Litoral).

[10] PNUMA/IPCS. (1999). “*Evaluación de Riesgos Químicos. Evaluación de Riesgos Humanos, Evaluación de Riesgos ambientales y Evaluación de Riesgos Ecológicos*”. Módulo de Capacitación No.3 Recuperado de: <http://www.bvsde.paho.org/tutorial/fulltex/riesgos.pdf>

[11] Lauwerys, R. (s.f). “Control Biológico en enciclopedia de salud y seguridad en trabajo”. (Línea, 03/08/2015). Recuperado de: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo1/27.pdf>

[12] Silva, J. (2003). “*Calibración del bioensayo de toxicidad agua con Daphnia Pulex (Crustacea cladóceras) usando un tóxico de referencia*”. Gayana 67. Recuperado de <http://www.scielo.cl/pdf/gayana/v67n1/art11.pdf>

[13] Landis, W & Ming-Ho. (2005) ENVIRONMENTAL TÓXICOLOGY. IMPACTS OF CHEMICAL UPON ECOLOGICAL SYSTEMS. Lewis Publishers.

[14]. Gamez, C & Ramirez E (2008). “*Determinación de la concentración letal media (CL₅₀₋₄₈) del herbicida ROUNDUP 747 sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con Daphnia magna*”. (Tesis de grado de la Universidad de la Salle. Facultad de Ingenierías Ambientales y Sanitaria Bogotá D.C) Recuperado de: <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/14062/T41.08%20G145d.pdf?sequence=1>

[15] Orozco, J & Toro, A. (2007). “*Determinación de la concentración letal media CL₄₈⁽⁵⁰⁾ del cromo y el cobre por medio de bioensayos de toxicidad acuática sobre*

Daphnia". (Tesis de grado de la universidad de la Salle. Facultad de Ingenierías Ambientales y Sanitaria Bogotá D.C)

Recuperado:<http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/14931/41021022.pdf;jsessionid=8D55ADD53B8A507360767D6D3B7D3BA8?sequence>

[16]. Barreto Solano, J & Peralta Pérez G;(2009).” *Determinación de la concentración letal media (CL50-96) de cobre (Cu) Y cinc (Zn) mediante pruebas toxicológicas (bioensayos), utilizando alevinos de Oncorhynchus Mykiss (Truchas Arcos Iris)*”; (Tesis de Grado de la Universidad de la Salle).Recuperado de: https://www.murciasalud.es/recursos/ficheros/138601-Sulfato_de_cobre_pentahidratado.pdf

[17]. Heredia Avalos, S. (2006). “*Experimentos de Química Recreativa con Sulfato de Cobre pentahidratado. Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias*”, 3(3), pp. 467-484. En línea en: http://www.apac-eureka.org/revista/Volumen3/Numero_3_3/Heredia_2006b.pdf

[18]. Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC); (2014). “*Sulfato de Cobre*”: Recuperado de: http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/sulfato_de_cobre.pdf

[19]. Cousillas, A. (2008). “*Contaminación de agua*”. (Informe toxicológico). Recuperado de: http://cedoc.infod.edu.ar/upload/Informe_Toxicologico_agua_adriana_cousillas.pdf
 APHA. 1991. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17 ed. Washington, D.C. p.81-143

[20]. Marin Ruiz;J. (2008).”*Cobre efectos sobre la salud*”. (Centro Toxicología Nicaragua. Civatox). Recuperado de: <http://socializandovoces.blogspot.com/2008/02/cobre-efectos-en-la-salud.html>.

[21]Proyecto de tilapia, Estudio realizado en la provincia de Pastaza Ecuador <http://es.slideshare.net/faviomeneses/proyecto-inversion-de-tilapia>

[23].Suarez Jacome. V. (2007). “*Proyecto de factibilidad para producción y exportación de tilapia al mercado alemán entre 2007-2016*”. (Tesis de grado, UTE).Recuperado de http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/6952/1/32119_1.pdf

[24]. Suarez Alvarez, G. Ocean Docs (1996); E- Repository of Ocean Publications. “*Metodología de bioensayos y efectos tóxicos de algunos contaminantes sobre organismos de interés ecológico pesquero*”. (Tesis de Maestría). Recuperado de: http://www.oceandocs.org/bitstream/1834/2610/1/TesisMaestria_GSA.pdf

[25] Descripción de un protocolo estandarizado de toxicidad aguda para cladóceros. Monografias.com Recuperado de: <http://www.monografias.com/trabajos11/clado/clado.shtml>

[26]. Fernández; A. (2015). “*Practica Modulo eco toxicológico: Cálculos de las Concentraciones Letales (LC50) a 96 horas para la toxicidad del nitrito en dos especies de invertebrados de agua dulce (Eulimnogammarus toletanus y Polycelis felina)*”. (Cursos de Ciencias Ambientales, Universidad de Alcalá); Recuperado de: <http://alvaroalonsodocencia.wikispaces.com/Probit-CL50>

[27]. Castillo Morales, G. (2004). “*Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*”. (Libro de la Universidad de Chile); Primera Edición; Recuperado de: <http://www.idrc.ca/EN/Resources/Publications/openebooks/147-7/index.htm>; ISBN 968-5536-33-3 (Diseño de bioens)

[28]. Abdel-Tawwab, M. and Mousa, M. A. A. (2005). “*Effect of calcium pre-exposure on acute copper toxicity to juvenile Nile tilapia, Oreochromis niloticus*”. (Zagazig Vet. J., 33 (1): 80–87.

[29]. Romero Alvarado, B & Valarezo Macias; C. (2015).” *Determinación de la concentración letal media (CL50) producida por sulfato de cobre (CUSO4.5H2O) en alevines de tilapia roja (Oreochromis sp.)*”. (Tesis de Grado de la Universidad técnica de Machala).

[30]. Abdulali Taweel, M. Shuhaimi-Othman and A. K. Ahmad, (2013). “*In vivo Acute Toxicity Tests of Some Heavy Metals to Tilapia Fish (Oreochromis niloticus)*. Journal of Biological Sciences.” 13: 365-371. Recupérate de: <http://scialert.net/abstract/?doi=jbs.2013.365.37>.

[31]. Robinson, J; Avenant-Oldewage, A. 1997. “*Chromium, copper, iron and manganese bioaccumulation in some organs and tissues of Oreochromis mossambicus from the lower Olifants River, inside the Kruger National Park*”. Water SA, vol 23, nº4: 387-403.

- [32].Hall, LW; Sott, MC; Killen, WD. 1998. "*Ecological risk assessment of copper and cadmium in surface waters of Chesapeake Bay Watershed*". Environmental Toxicology and Chemistry, vol 17, n° 6, pp. 1172-1189.
- [33].U.S. Environmental Protection Agency. 1985. "Ambient Water Quality Criteria Doc: Cadmium p.59". EPA 440/5-84-032.
- [34]. AWT Environment, Science and Technology (2002). "*Testing of the Toxicity of Copper to Barramundi*". (Investigation of AWT). Recuperado de: <http://www.oktedi.com/media-items/reports/environmental/biology/195-testing-of-the-toxicity-of-copper-to-barramundi/file>
- [35].Zeonyejakui, C.D.E, obiakor, M.O & Ezenwelu , C.O. (2012). "*Toxicity of copper sulphate and Behavioral locomotor response of Tilapia (Oreochromis Niloticus) and catfish (Clarias Gariepinus) species*". (Artículo Volumen 1, Issue 4: 130-134 (2011) en el Department of Zoology; Department of Environmental Management; Department of Applied Biochemistry Nnamdi Azikiwe University, P.M.B 5025, Awka, Anambra State). Recuperado de: [file:///C:/Users/Tatiana/Downloads/OJA%20FR,%20A,19%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/Tatiana/Downloads/OJA%20FR,%20A,19%20(3).pdf)
- [36].Velasco, M, Gomez,W & Calderon , J. (2006, 28 de Marzo). "*Toxicidad aguda del sulfato de cobre (CuSO4) en alevinos de cachama blanca (Piaractus brachypomus) bajo condiciones de aguas blandas*". (Artículo de la Universidad de Llanos). Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/896/89610108.pdf>
- [37] Saucedo, R., Rendon & Saucedo E. (2009) "*Modelo Tecnológico para cultivo de tilapia (Oreochromis sp.) en jaulas*".
- [38] Cruz L (1996). "*Factores que afectan la toxicidad. Bogotá*".(Universidad Nacional de Colombia).
- [39] Bravo, N. (2007). "*Efecto Agudo del Amoniaco en tilapia roja (Oreochromis sp.)*". (Zamorano, Honduras)

ANEXOS

ANEXO A

Bitácora de parámetros ambientales Físico- Químico del agua para la Aclimatación:

| |
|------------------------------|
| Nombre Laboratorio: |
| Nombre del Encargado: |
| Fecha: |

| Hora | N° de Pecera | N° de Organismo | Temperatura (°C) | Conductividad eléctrica (µS/cm) | Turbidez (UNT) | OD (mg/L) | Alcalinidad (mgCaCO ₃ /L) | %OD (mg/L) | pH | Dureza Total (mgCaCO ₃ /L) |
|------|--------------|-----------------|------------------|---------------------------------|----------------|-----------|--------------------------------------|------------|----|---------------------------------------|
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |

Observaciones :

| |
|--|
| |
|--|

ANEXO B

Bitácora de Resultados de la prueba de toxicidad de alevines de Tilapia Roja (*Oreochromis mossambicus*)

| |
|-----------------------|
| Nombre Laboratorio: |
| Nombre del Encargado: |
| Fecha: |

| Muestra | Concentración del CuSO ₄ .5H ₂ O (mg/L) | Replica 1 | | Replica 2 | | Replica 3 | | Promedio de Alevines vivos | % Mortalidad | Desviación Estándar |
|------------------|---|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|----------------------------|--------------|---------------------|
| | | Núm. Inicial | Núm. Final | Núm. Inicial | Núm. Final | Núm. Inicial | Núm. Final | | | |
| Control Positivo | | | | | | | | | | |
| Control Negativo | | | | | | | | | | |
| 1 | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |

| |
|----------------|
| Observaciones: |
|----------------|

