

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela Académico Profesional de Biología-Microbiología**

**Determinación de la concentración letal media (CL<sub>50-96</sub>) y efecto  
histopatológico del sulfato de cobre mediante bioensayos con  
alevinos del carachi amarillo (*Orestias luteus*)**

Tesis presentada por:

**WILLIAM ROBERT ATENCIO MAMANI**

Para optar el Título Profesional de

**BIÓLOGO MICROBIÓLOGO**

**Tacna – Perú**

**2013**

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**TESIS N° 191 Título Profesional de Biólogo Microbiólogo**

El secretario Académico Administrativo de la Facultad de Ciencias certifica que el Consejo de Facultad ha designado como jurados para la sustentación de la tesis: "DETERMINACIÓN DE LA CONCETRACIÓN LETAL MEDIA (CL<sub>50-96</sub>) Y EFECTO HISTOPATOLÓGICO DEL SULFATO DE COBRE MEDIANTE BIOENSAYOS CON ALEVINOS DEL CARACHI AMARILLO (*Orestias luteus*)"; el mismo que está conformado por:

PRESIDENTA : Mgr. Angela Choque Miranda  
SECRETARIO : Mgr. Roberto Castellanos Cabrera  
VOCAL : Mgr. Vicente Freddy Chambilla Quispe

Para examinar y calificar el trabajo de Tesis sustentado en acto público el día lunes 15 de abril del 2013. Presentado por el señor Bachiller WILLIAM ROBERT ATENCIO MAMANI de la Escuela Académico Profesional de Biología-Microbiología.

El jurado calificador, en forma individual y secreta emitieron su calificación, con el siguiente resultado: Aprobado por unanimidad con el calificativo de bueno con la nota de quince (15).

Para ratificar lo detallado firman:



Mgr. Angela Choque Miranda  
PRESIDENTA



Mgr. Roberto Castellanos Cabrera  
SECRETARIO



Mgr. Vicente Freddy Chambilla Quispe  
VOCAL

## DEDICATORIA

Fue un trabajo que costó mucho, de tiempo, dedicación, esfuerzo, ilusiones, problemas, paciencia, humildad y muchas cosas más en las cuales no solo se aumentó el conocimiento, si no que de igual forma se pasó por circunstancias que dejaron enseñanzas buenas y las regulares.

Ante todo, dedico este logro a todas las personas que amo con todo mi corazón, mi familia. Quienes fueron los que se preocuparon por que su hijo se convirtiera en profesional, gracias padres Ángel y Juana y a quien me acompañó durante toda mi carrera universitaria, mi hermana Sandra. A la memoria de mi tía Aurora, por cuidar de Sandra y de mí en nuestra niñez, la recordamos con amor, cariño y respeto.

Gracias a todos aquellos que colaboraron desde lo más simple de este documento hasta lo más complejo de la estadística e interpretación de resultados y observaciones histopatológicas y todos aquellos que aunque no lean esto, les deseo éxitos por acompañarme en este paso de la vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al biólogo Víctor Carbajal Zegarra, asesor del proyecto de tesis, por su colaboración y ayuda durante el desarrollo del mismo.

A la bióloga Orieta Flores Medina, Jefe de Departamento de Investigación en Especies Nativas de la Dirección de Recursos Hidrobiológicos, Proyecto Especial Binacional Lago Titicaca, por su colaboración, apoyo, consejos y guía durante la realización del presente estudio.

Al biólogo Miguel López Ruelas, por su colaboración, guía e importante apoyo en la parte estadística durante la realización de este estudio.

A todos los integrantes de la Dirección de Recursos Hidrobiológicos del Proyecto Especial Binacional Lago Titicaca, en especial al biólogo Howard Arcana Guerra por su ayuda, paciencia y colaboración durante ese largo camino y estadía en Chucuito, Puno.

A todos mis amigos y a las personas que contribuyeron de una u otra manera en el desarrollo de esta investigación.

## RESUMEN

La contaminación de los ambientes acuáticos conlleva a la afectación directa de las especies que se desarrollan en estos medios, tal es así que las especies endémicas son las que sufren más estos efectos en niveles aún no determinados, pero que definitivamente afectan su población y subsistencia. Esto motivó el presente trabajo de investigación, donde se tuvo como objetivo determinar la concentración letal media (CL<sub>50-96</sub>) y efecto histopatológico del sulfato de cobre en alevinos de *Orestias luteus* “carachi amarillo”.

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Acuicultura y el Laboratorio de Muestras Biológicas de la Dirección de Recursos Hidrobiológicos del Proyecto Especial Binacional Lago Titicaca (PELT), ubicado en Muelle Barco S/N, distrito de Chucuito, Puno y en el Laboratorio de Histopatología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Altiplano, durante los meses de Abril a Noviembre del año 2010.

Un total de 280 alevinos del *Orestias luteus* fueron expuestos a concentraciones de 20 µg/l; 10 µg/l; 5 µg/l; 2,5 µg/l; 1,25 µg/l y 0,63 µg/l de sulfato de cobre y un control durante un periodo de 96 horas.

Se observó una mortalidad mínima de 12 alevinos en la concentración de 0,63 µg/l de sulfato de cobre, mientras que el máximo de mortalidad fue 40 alevinos al final de las primeras 72 horas en las concentraciones de 20 µg/l y 10 µg/l de sulfato de cobre. La Concentración Letal Media (CL<sub>50-96</sub>) para el sulfato de cobre mediante el método Probit fue 1,65 µg/l al final de todo el experimento.

Posteriormente y para determinar los efectos histopatológicos en los alevinos, estos fueron procesados, realizando cortes histológicos a diferentes niveles anatómicos y teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina y conservados de manera permanente utilizando Bálsamo de Canadá.

El sulfato de cobre afectó la estructura ocular, produciendo una atrofia celular del cristalino y el iris en la concentración de 20 µg/l, lo mismo en la estructura del iris a 10 µg/l en comparación al control.

## CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN .....	ii
DEDICATORIA .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
RESUMEN.....	v
CONTENIDO.....	vii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Enunciado del problema .....	3
1.2. Hipótesis.....	3
1.3. Objetivos.....	3
1.3.1. Objetivo general.....	3
1.3.2. Objetivos específicos .....	3
II. MARCO TEÓRICO .....	5
2.1. Ecosistemas acuáticos.....	5
2.1.1. Clasificación de los ecosistemas de agua dulce .....	6
2.1.2. Clasificación de los organismos en ecosistemas acuáticos .....	7
2.2. Lago Titicaca .....	9
2.2.1. Hidrología.....	9
2.2.2. Clima.....	11
2.2.3. Comunidades biológicas .....	12
2.2.4. Contaminación .....	12
2.3. <i>Orestias luteus</i> “carachi amarillo” .....	16
2.3.1. Posición taxonómica .....	16
2.3.2. Descripción biométrica .....	17
2.3.3. Características biomorfológicas Thernavin (1944).....	17
2.3.4. Alimentación .....	19
2.3.5. Distribución geográfica .....	22
2.3.6. Situación de vulnerabilidad .....	23

2.4.	Características fisiológicas del cobre.....	25
2.5.	Características generales del sulfato de cobre .....	27
2.5.1.	Mecanismo de acción .....	27
2.5.2.	Biotransformación y excreción .....	27
2.5.3.	Destino ambiental.....	28
2.5.4.	Impacto faunístico .....	29
2.5.5.	Usos.....	31
2.6.	Bioensayos.....	33
2.6.1.	Tipos de bioensayos .....	36
III.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	38
3.1.	Materiales.....	38
3.1.1.	Material biológico.....	38
3.1.2.	Material de vidrio .....	38
3.1.3.	Material de metal y otros .....	38
3.1.4.	Medios de cultivo y reactivos.....	39
3.1.5.	Equipos .....	39
3.1.6.	Lugar de experimentación.....	40
3.2.	Métodos.....	40
3.2.1.	Diseño experimental .....	40
3.2.2.	Variables .....	41
3.2.3.	Preparación del agua dulce sintética .....	42
3.2.4.	Obtención de alevinos .....	43
3.2.5.	Determinación de la carga biológica para los bioensayos.....	43
3.2.6.	Determinación de los recipientes de ensayo .....	43
3.2.7.	Aclimatación de los alevinos.....	44
3.2.8.	Bioensayo preliminar de toxicidad .....	45
3.2.9.	Bioensayo definitivo de toxicidad .....	45
3.2.10.	Criterios de mortalidad.....	46
3.2.11.	Análisis estadístico .....	47

3.2.12. Proceso histológico .....	47
IV. RESULTADOS .....	48
4.1. Bioensayo preliminar .....	48
4.2. Bioensayo definitivo.....	51
4.3. Determinación de la CL <sub>50-96</sub> del CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O.....	55
4.4. Determinación del efecto adverso no observado (NOAEC).....	55
V. DISCUSIÓN .....	58
VI. CONCLUSIONES .....	62
VII. RECOMENDACIONES .....	63
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64
IX. ANEXOS.....	68

## I. INTRODUCCIÓN

La contaminación del Lago Titicaca por el ingreso de residuos de origen industrial, agrícola y doméstico directamente al lago o a través de sus ríos afluentes ha contribuido al deterioro de su calidad, que se ha incrementado a través de los años debido al aumento de las actividades desarrolladas por el hombre, en especial en los distritos circunlacustres al Lago Titicaca.

La fauna de especies ícticas nativas de los cuerpos de agua de la Cuenca del Titicaca ha sufrido una drástica disminución en su biomasa en los últimos 20 años. Para el Lago Titicaca Dejoux & Ittis (1991) reportaron 16 especies del género *Orestias* y en la actualidad solo se reportan alrededor de 6 (Segura, 2006). Entre las especies de este género se encuentra *Orestias luteus* “carachi amarillo” considerada una especie muy importante desde el punto de vista ecológico y de gran valor socio-económico.

Aún no existen evidencias científicas que demuestren el efecto del deterioro de la calidad del agua sobre el estado actual de las poblaciones de las especies ícticas como *Orestias luteus*, tampoco se dispone de

información sobre la sensibilidad de esta especie a la contaminación química de su hábitat y particularmente a la presencia de cobre, que se ha reportado en varias bahías del Lago Titicaca en concentraciones superiores a las establecidas en la normatividad ambiental vigente para lagos y lagunas (DIGESA, 2010).

Los bioensayos de toxicidad son empleados para reconocer y evaluar los efectos de los contaminantes sobre la biota. En los bioensayos se usa tejido vivo, organismo, o grupo de organismos para evaluar los efectos de cualquier sustancia contaminante sobre los mismos como lo fue en este caso la exposición de *Orestias luteus* a diferentes concentraciones de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  debido a que esta especie endémica se encuentra vulnerable. Con dicha exposición, se busca determinar la Concentración Letal ( $\text{CL}_{50-96}$ ) del sulfato de cobre que produzca la muerte en el 50% de la población expuesta en 96 horas.

Con el presente trabajo se buscó aportar al conocimiento de los efectos toxicológicos del cobre en forma de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  sobre la población de *Orestias luteus*, y así contribuir a establecer pautas normativas que prevean el impacto del cobre, sobre organismos acuáticos.

### **1.1. Enunciado del problema**

¿Cuál es la concentración letal media (CL<sub>50-96</sub>) y efecto histopatológico del sulfato del cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) en alevinos de *Orestias luteus* “carachi amarillo”?

### **1.2. Hipótesis**

Las elevadas concentraciones de cobre en el Lago Titicaca causan efectos histopatológicos en alevinos de *Orestias luteus*, que contribuyen a la desaparición de su población.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Determinar la concentración letal media (CL<sub>50-96</sub>) y efecto histopatológico del sulfato de cobre en alevinos de *Orestias luteus*.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Determinar de la concentración mínima efectiva a la máxima tolerable de *Orestias luteus* con sulfato de cobre.

- Determinar la concentración letal media (CL<sub>50-96</sub>) de sulfato de cobre en alevinos de *Orestias luteus*.
- Evaluar los efectos de histopatológicos de la exposición a sulfato de cobre en alevinos de *Orestias luteus*.

## **II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Ecosistemas acuáticos**

Los ecosistemas acuáticos son el centro de interacción de un gran número de factores bióticos y abióticos que pueden ser modificados drásticamente por factores ambientales y/o antropogénicos. Estos ecosistemas incluyen las aguas de los océanos (ecosistemas marinos) y las aguas continentales dulces (ríos, lagos, pantanos y demás fuentes acuáticas) o saladas.

Los ecosistemas de agua pueden considerarse entre los más importantes de la naturaleza y su existencia depende totalmente del régimen que tengan (Bernal & Grijalba, 2008). Así, genéricamente, variaciones y la regularidad de las aguas de un lago son de gran importancia para las plantas, animales y personas que viven circunlacustres a éste.

Odum (2006) señala que los ecosistemas de agua dulce ocupan una pequeña porción de la superficie de la tierra, esto cuando son comparados con ecosistemas marinos, sin embargo, su

importancia para el hombre es mucho mayor que al área respectiva, por las siguientes razones:

- Son la fuente de agua más apropiada y barata para las necesidades domésticas e industriales.
- Los componentes del agua dulce constituyen parte del ciclo hidrológico.
- Los ecosistemas de agua dulce constituyen sistemas más prácticos y baratos para el tratamiento de residuos.

#### **2.1.1. Clasificación de los ecosistemas de agua dulce**

Odum (2006) señala que en base al movimiento del agua, los ecosistemas acuáticos pueden ser clasificados en dos, como:

- **Ecosistema léntico** (latín *lenis*, calma): es de agua quieta o de escaso caudal, como en los lagos, estanques, pantanos y embalses.
- **Ecosistema lótico** (latín *lotus*: participio de *lavere*, lavar): sistema de agua corriente como en los ríos, arroyos y manantiales.

Esta clasificación tiene relevancia tanto para estudiar la naturaleza como para la explotación de recursos y la gestión del agua como recurso hídrico.

### **2.1.2. Clasificación de los organismos en ecosistemas acuáticos**

Odum (2006) señala que los ecosistemas acuáticos son aquellos en los que los animales y plantas viven o se relacionan con seres vivos en el agua. Como los seres vivos de aguas dulces (o en cualquier otro hábitat) no están dispuestos en un orden taxonómico (tal como ocurre en los textos taxonómicos o en museos sistemáticos) y útil una clasificación con base ecológica. En primer lugar, pueden ser clasificados según sus nichos principales, con bases en una posición en la cadena trófica, como sigue:

- **Autótrofos (productores):** plantas verdes y microorganismos quimio-sintéticos.
- **Fagótrofos (macroconsumidores):** primarios, secundarios, etc.; herbívoros, predadores, parásitos, etc.

- **Saprófitos (microconsumidores o descompositores):** subclasificados de acuerdo a la naturaleza del estrato orgánico descompuesto.

Adicionalmente, los organismos acuáticos pueden ser clasificados de acuerdo con su forma de vida o hábitat, como sigue:

- **Bentos:** Viven fijos en el fondo o en el sedimento del fondo. Los animales bentónicos pueden ser subdivididos, de acuerdo con su modo de alimentación, en filtradores y comedores de sedimento (una almeja o un caracol acuático, respectivamente, servirán de ejemplos).
- **Perifiton:** Seres vivos (animales) fijados o ligados a tallos y hojas de plantas como el maíz, o a otras superficies situadas sobre el fondo.
- **Plancton:** Organismos flotantes cuyos movimientos son maso menos dependientes de las corrientes. En cuanto a algunos componentes del zooplancton poseen movimientos natatorios activos, que los ayudan a mantener una posición vertical, o plancton

en su conjunto que es incapaz de moverse en contra de la corriente.

- **Necton:** Seres vivos nadadores que se mueven a su voluntad (por tanto son capaces de evitar las redes para plancton, frascos de cosecha, etc.). Peces, anfibios, insectos acuáticos grandes y otros.
- **Neuston:** Seres vivos manteniéndose o nadando en la superficie. La mayoría de los insectos.

## **2.2. Lago Titicaca**

En Puno, la cuenca del Lago Titicaca es endorreica septentrional, que se encuentra en el Altiplano Perú-Bolivia y está ubicado entre las coordenadas 15° 13' 19" - 16° 35' 37" de latitud sur y 68° 33' 36" - 70° 02' 13" de longitud oeste; a una altitud aproximada de 3 809 msnm (QOLLASULLO & CIPP UNA, 2002).

### **2.2.1. Hidrología**

La Hoya del Lago Titicaca se divide en tres zonas: el Lago Mayor o Lago Chucuito al norte, el Lago Menor o Lago Huiñaymarca al sur y la Bahía de Puno al oeste (ver Anexo 8). El lago Mayor y Menor se encuentran unidos por el

estrecho de Tiquina que tiene un ancho aproximado de 850 m y una profundidad máxima de 21 m . La línea de orilla del Lago Titicaca tiene una longitud de 915 km. La distancia máxima del agua entre los dos puntos más alejados según una dirección de Nor-Oeste al Sur-Este, que pasa por el estrecho de Tiquina, es de 178 km y el ancho máximo como una perpendicular al eje longitudinal es de 69 km para el Lago Mayor y de 41 km para el Lago Menor. La superficie total del lago es de 8 562 km<sup>2</sup> y tiene un volumen de agua de 903 km<sup>3</sup> . La profundidad máxima del lago es de 284 m (cerca a la isla Soto) y una profundidad media de 105 m . La bahía de Puno se caracteriza por presentar una profundidad máxima de 52 m y una superficie de 588 km<sup>2</sup> (QOLLASULLO & CIPP UNA, 2002).

El Lago Titicaca tiene como principales tributarios fluviales a los ríos: Ramis, que tiene una cuenca con una superficie de 15 060 km<sup>2</sup> y un aporte hídrico promedio de 74 m<sup>3</sup>/s; Coata, que tiene una cuenca con una superficie de 4 650 km<sup>2</sup> y un aporte hídrico promedio de 47 m<sup>3</sup>/s; llave, que tiene una cuenca con una superficie de 7 290 km<sup>2</sup> y un aporte hídrico

promedio de 38 m<sup>3</sup>/s; Huancané, que tiene una cuenca con una superficie de 3 580 km<sup>2</sup> y un aporte hídrico promedio de 19 m<sup>3</sup>/s; Suches, que tiene una cuenca con una superficie de 3 170 km<sup>2</sup> y un aporte hídrico promedio de 11 m<sup>3</sup>/s; Zapatilla, que tiene una cuenca con una superficie de 440 km<sup>2</sup> y un aporte hídrico promedio de 2,3 m<sup>3</sup>/s .

### **2.2.2. Clima**

En las zonas de altitud inferior a 4 000 m, las temperaturas medias anuales varían entre 7 °C y 10 °C. Alrededor del lago mismo, las temperaturas son sin embargo superiores a 8 °C. Boulange & Aquize Jean (1981) evaluaron que la temperatura media anual a nivel del lago debería ser de 0 °C y atribuyen la diferencia de temperatura al efecto térmico de la masa de agua. Se debe también notar que estaciones comprendidas entre 3 900 m y 4 000 m, en los extremos sur y norte de la región el lago, tienen temperaturas del orden de 7 °C. El lago tempera el clima sobre todo disminuyendo la amplitud de las temperaturas, pero no parece ocasionar en su contorno un aumento de la temperatura media anual superior a 2 °C .

En toda la cuenca, las temperaturas medias más bajas tienen lugar en julio, en pleno invierno, mientras que las más elevadas se sitúan de diciembre a marzo, generalmente centradas en febrero. (Dejoux & Ittis, 1991)

### **2.2.3. Comunidades biológicas**

Los principales recursos hidrobiológicos del Lago Titicaca están constituidos por comunidades de fitoplancton, macrófitas, zooplancton, fauna béntica y la ictiofauna. La comunidad íctica del Lago Titicaca está constituida por dos grupos, el primero son las especies nativas o autóctonas, como el género *Trichomycterus* y sobre todo por el género *Orestias*, endémico del altiplano andino. Y el segundo grupo constituido por las especies introducidas como *Oncorhynchus mykiss* “trucha arcoíris” y *Basilichthys bonaerensis* “pejerrey” (Dejoux & Ittis, 1991).

### **2.2.4. Contaminación**

La morfología misma de la bahía de Puno la vuelve particularmente sensible a serios problemas de contaminación por efluentes urbanos. Al contrario del grande

y profundo lago abierto (285 metros), la bahía de Puno está separada en su mayor parte del gran eje lacustre y es relativamente poco profunda (profundidad máxima alrededor de 30 m). El hecho de que los efluentes de las dos únicas grandes ciudades de la cuenca de drenaje del lago Titicaca, Juliaca y Puno, drenen directamente en esta bahía vuelve la situación aún más crítica, sobre todo la última ciudad que desagua sus efluentes en la parte interior de la bahía de Puno, aún más estrecha (Dejoux & Iltis, 1991).

El origen de la contaminación por la minería en mayor proporción en Puno se encuentra a más de 4 500 msnm en Ancocala, Ananea, La Rinconada y Pampa Blanca que son centros auríferos explotados bajo diferentes modalidades, pero donde los relaves comparten un mismo destino, el río Ramis, y este a su vez desemboca en el Lago Titicaca.

En la industria del petróleo en Puno, las actividades de prospección y explotación petrolera han sido cuestionadas en los últimos años, ya que producen graves impactos sobre los cursos de agua, los recursos naturales y las poblaciones.

Principalmente durante la fase de perforación la contaminación puede ser producida por lodos de perforación, si no son bien tratados en el sumidero de lodos. Estos lodos contienen cloruros, sulfatos y metales pesados tales como bario, cadmio, cobre, mercurio, zinc, y plomo y otros productos tóxicos. Estos productos pueden contaminar el suelo y el agua por lixiviación.

Los Estándares de Calidad Ambiental para Agua (ECA), establecidos por Decreto Supremo 002-2008-MINAM, establecen el nivel de concentración o el grado de elementos, sustancias o parámetros físicos, químicos y biológicos presentes en el agua, en su condición de cuerpo receptor y componente básico de los ecosistemas acuáticos, que no representa riesgo significativo para la salud de las personas ni para el ambiente. Y señala para el cobre en su categoría 3, para riego de vegetales de tallo corto y tallo alto no debe exceder 0,2 mg/l; para bebidas de animales no debe exceder 0,5 mg/l y en su categoría 4, para conservación de ambientes acuáticos como el lago Titicaca, no debe exceder 0,02 mg/l.

DIGESA (2010), señala que en el monitoreo de diciembre del mismo año en la laguna Sillacunca la concentración de cobre es mayor 6,9 veces a los ECA. En la laguna Cerro Lunar las concentraciones de cobre son mayores en 3,6 veces los ECA; incumpliendo con la referida norma debido al impacto ocasionado por la actividad minera informal en la zona de la Rinconada y Pampa Blanca. Y en el río Ananea o Inambari, río Grande, río Crucero, quebrada Chuquisani y quebrada Chogñacota las concentraciones de cobre superan en 1,39; 1,7; 0,29; 0,52 y 0,095 veces respectivamente a los ECA – Categoría 3, incumpliendo con la referida norma.

DIGESA (2008), reporta que en el monitoreo del mes de mayo del mismo año, las concentraciones de cobre para categoría IV en las estaciones de control correspondientes a la laguna Sillacunca fue 0,059 mg/l y para la laguna Rinconada fue 0,067 mg/l superando los valores de la Ley General de Aguas (LGA) de 0,02 mg/l.

DIGESA (2007), señala que en el mes de julio del mismo año las concentraciones de cobre en el monitoreo del río Ananea

en 0,949 mg/l, río Grande en 2,398 mg/l y río Crucero en 1,829 mg/l, sobrepasan los valores límite de la LGA clase 3 de 0,5 mg/l, no cumpliendo con la referida norma nacional.

Segura (2006), señala que en el monitoreo realizado en el mes de mayo y noviembre del 2006, se determinó que los valores mayores de cobre en la cuenca del lago Titicaca, se registraron en Pomata 59,84 µg/l, seguido de la Península de Capachica 57,52 µg/l, superando los niveles de la LGA categoría 4 de 20 µg/l.

## 2.3. *Orestias luteus* “carachi amarillo”

### 2.3.1. Posición taxonómica

Según (Thernavin, 1944) citado por (QOLLASUYO & CIPP UNA, 2000):

**Tabla 1.** Taxonomía de *Orestias luteus*

<b>Phyllum</b>	Chordata
<b>Sub phyllum</b>	Vertebrata
<b>Superclase</b>	Pisces
<b>clase</b>	Osteichthyes
<b>Orden</b>	Cyprinodontiformes
<b>Familia</b>	Cyprinodontidae
<b>Género</b>	<i>Orestias</i>
<b>Especie</b>	<b><i>Orestias luteus</i></b>
<b>Nombre común</b>	“Carachi amarillo”, “punkuru”, “awcha”, “punku”, “punkuku” o “k’ara wasa”.

**Fuente:** (QOLLASUYO & CIPP UNA, 2000)

### **2.3.2. Descripción biométrica**

*Orestias luteus* “carachi amarillo” presenta tallas superiores al rango de 148-163 mm . Existe una ausencia total de machos, posiblemente se deba a que éstos no alcanzan dichas tallas o sean muy escasas, ya que en las tallas comprendidas entre 123-133 mm existen proporciones casi iguales de machos respecto a hembras.

Cruz (1984) manifiesta que la longitud promedio de *Orestias luteus* es de 86 mm el 50% de la población, alcanzan su primer desove a los 112 mm el 100% de los individuos han desovado por primera vez.

### **2.3.3. Características biomorfológicas Thernavin (1944)**

- La coloración del cuerpo es gris amarillenta por la parte dorsal algunos oscuros y la abdominal amarillo cremoso o amarillo canario.
- Presenta el cuerpo comprimido lateralmente y cabeza ligeramente redondeada.
- Dos ojos pequeños cuyas orbitas no sobresalen de la corona, siendo este casi convexo.

- Boca protráctil, la comisura desciende hacia un nivel por debajo de la órbita y con dientes romos.
- Escamas de la parte anterior con granulaciones, grandes y notorias al tacto, de radios circulares (ctenoidea).
- Presenta las siguientes aletas, un dorsal posterior, una anal, dos aletas pectorales, aletas ventrales o pelvianas ausentes, aleta anal presente, aleta caudal típicamente homocerca con el borde convexo.
- Internamente el aparato digestivo se inicia en la boca protráctil con premaxilares y maxilares, previstas de dientes de arcos branquiales simples.
- En la cavidad buco faríngea se encuentra la lengua pequeña y lisa, a los lados de esta se encuentra las branquias.
- No se encuentra un estómago propiamente dicho, sino que mas bien le sigue una región más dilatada del intestino que termina en un ciego pilórico con una curvatura poco distinguible, que se continúa con el intestino, de la mayor longitud que la cavidad celómica y que se repliega en el interior.

- Esto es posible que la parte final del intestino se halla provista de una válvula intestinal que se presume tendría una doble función la de retornar alimentos, para prolongar la digestión y para eliminar los restos de la alimentación.
- El hígado voluminoso y de color rojizo se halla situado en la parte anterior de la cavidad celómica, en el hígado se encuentra la vesícula biliar casi esférica y de color amarillento.
- El corazón pequeño se halla situado cerca de la cavidad opercular y por ende cerca de las branquias.
- El macho presenta un testículo de forma alargada y se comunica con el orificio genital por medio de un conducto de igual manera en la hembra que presente un solo ovario, ambos en la cavidad abdominal cerca de la abertura anal.

#### **2.3.4. Alimentación**

QOLLASUYO & CIPP UNA (2000) menciona para la ***Orestias luteus*** “carachi amarillo” que su dieta esta conformada principalmente por organismos bentónicos en

tres épocas de estudio, haciendo un promedio anual en número 96,32% y en volumen de 97,54% (ver Tabla 2). Dentro de este grupo el constituyente más importante son los anfípodos de las tres épocas de estudio con un promedio en número de 75% y en volumen 93,9%; seguido de larvas de chironómidos es consumido, en la época de invierno seco con un porcentaje número de 8,15% y en volumen 2,05% y en época transitoria con una frecuencia de 4,57% y un volumen de 1,09%; ostrácoda solo es importante en la época de lluvia con un porcentaje en número 19,44% y en volumen 2,27%, tiene una preferencia por moluscos (**pelecípoda**, **planorbis** y **littoridina**) siendo el más importante esta última, que se hace presente con mayor frecuencia en la época transitoria con un porcentaje número del 10,97%, representando en volumen traza alimenticia; los huevos de pez solo han sido consumidos en la época invierno seco con un porcentaje en número de 6,27% que se ha presentado en volumen trazas alimenticias.

El zooplancton y grupo terrestre no son importantes; el grupo nectónico se hace presente solo en la época transitoria y con

único representante corixidae representa en número un porcentaje de 2,37% y en volumen de 4,85%.

En conclusión *Orestias luteus* “carachi amarillo” es una especie de hábitos alimenticios bentónicos carnívoros y con una dieta no muy diversificada (estenófaga), el 94% de su alimento está constituido por anfípoda y muy poco por **pelecípoda**, **planorbis** y **littoridina** que solo hacen presentes en las épocas de invierno seco y transitoria.

**Tabla 2.** Contenido estomacal de *Orestias luteus* por épocas en Ojerani, bahía de Puno 1984-1985

Organismos	Invierno seco		Época transitorias		Época lluvias		Promedio anual	
	%N	%V	%N	%V	%N	%V	%N	%V
I.- BENTÓNICOS	97,69	98,84	96,82	93,95	94,45	99,83	96,32	97,54
Amphípoda	76,21	91,97	74,13	92,37	75,01	97,56	---	---
Larva Chiromidae	8,15	2,05	24,57	1,09	---	---	---	---
Ostracoda	2,37	0,27	1,15	0,06	19,44	2,27	---	---
Pelecípoda	0,81	3,56	2,60	0,02	---	---	---	---
Littoridina	0,81	0,42	10,97	0,03	---	---	---	---
Planorbis	2,66	0,07	2,27	0,01	---	---	---	---
Ovas de pez	6,28	0,40	---	---	---	---	---	---
Ninfa de Odonata	---	---	1,13	0,37	---	---	---	---
Pupa Díptero	0,40	0,10	---	---	---	---	---	---
II.ZOOPLANCTON	0,66	---	---	---	5,55	0,17	2,07	0,05
Chidorus	0,66	---	---	---	5,55	0,17	2,07	0,05
III.- TERRESTRES	1,65	1,13	0,76	1,18	---	---	0,84	0,77
Chironomidae A	1.65	1.13	---	---	---	---	---	---
Díptero A	---	---	0,76	1,18	---	---	---	---
IV.- NECTÓNICO	---	---	2,37	4,85	---	---	0,79	1,61

Fuente: (QOLLASUYO & CIPP UNA, 2000)

### 2.3.5. Distribución geográfica

El rango de **Orestias** se extiende desde la provincia de Ancash, al norte del Perú, hasta Antofagasta, en Chile (09° a 22° Latitud Sur). Es endémico de los lagos y corrientes de los Andes peruanos, bolivianos y chilenos, más de la mitad de las 43 especies conocidas son endémicas de la cuenca cerrada del Titicaca y de aquellas 23 existen solo en el Lago Titicaca.

De las 3 zonas que comprende el lago, la mayoría de especies pertenecen solo a las 2 secciones más pequeñas (Lago Menor y Bahía de Puno), desconociéndose aún si éstas representan la verdadera distribución de **Orestias** en el lago o meramente la facilidad de su colección.

Las mayores densidades relativas de su población, en orden de importancia, se encuentran en los lagos: Titicaca (Perú Bolivia), Junín (Perú) y Poopó (Bolivia), lagunas y ríos aledaños. En los tramos superiores de los ríos, su distribución altitudinal llega hasta los 4 299 msnm, pudiendo vivir en riachuelos y charcos de muy escasa profundidad y

mínimo contenido de oxígeno. En 1979 se descubrió **Orestias** en 3 pequeños lagos al Noreste de Lima, lo que reveló no sólo la presencia de 2 nuevas especies sino también la posibilidad de que puedan encontrarse **Orestias** en los numerosos lagos pequeños que caracterizan el sur de los Andes ecuatorianos (Parenti, 1984).

#### **2.3.6. Situación de vulnerabilidad**

En Bolivia *Orestias luteus*, conocido como: “carachi amarillo”, “Punku” o “Punkuro”, es incluida dentro de la lista de especies amenazadas y categorizada como VU, es decir vulnerable. No obstante en el Perú los peces fueron excluidos de esta categorización de especies amenazadas de fauna silvestre en el Decreto Supremo 034-2003-AG por falta de información. A pesar de que en la actualidad ya se sabe que por lo menos 30 especies de peces de aguas continentales están siendo consideradas en diferentes niveles de amenaza, y dentro de esta consideración se encuentra *Orestias luteus* (Ortega, y otros, 2011).

Un factor que interviene en la reducción del área de distribución de *Orestias luteus* y de manera escalonada en la Cuenca del Lago Titicaca, es a consecuencia especies introducidas e invasoras como la “trucha arco iris” *Oncorrinchus mykiss* y el “pejerrey argentino” *Odontesthes bonariensis* especialmente en las zonas donde se da la práctica intensiva de la acuicultura. Siendo las causas principales la fuerte competencia por alimento y por hábitats, la depredación de los peces juveniles nativos por las especies foráneas (cada vez más incrementada) y algunas veces el desplazamiento de sus hábitats naturales.

Otro factor es la continua sobre explotación de los recursos hidrobiológicos y la contaminación antrópica de los ambientes acuáticos, como en la mayoría de las zonas agrícolas que usan fertilizantes que van a drenar al Lago Titicaca, han dado lugar a la disminución de la población de diversas especies ícticas.

Parenti (1984) reportó 23 especies de *Orestias* en el Lago Titicaca, Dejoux (1991) reportó 12 especies y Segura (2006)

reportó solo 6 especies de este género, lo que haría presumir la extinción de 17 especies, incluido el “Humanto” (*Orestias cuvieri*) declarado como especie extinta en 1989

#### **2.4. Características fisiológicas del cobre**

Muchos metales pesados en forma iónica son elementos biológicamente activos y que se encuentran en bajas concentraciones en aguas naturales. El cobre, junto con otros metales pesados, es un elemento traza esencial para la vida de los organismos, ya que forma parte de la estructura de más de 30 enzimas y de otras moléculas (oxidasas, hidrolasas, metalotioneínas, etc.) (Harris, 1991). A pesar de ser un metal esencial, una cantidad excesiva de cobre resulta tóxico e irritante para los organismos vivos.

El cobre también es un elemento esencial para el organismo humano, siendo necesario un aporte diario de 30-80 µg/kg en función del peso. Los requerimientos son superiores para recién nacidos. En el organismo se encuentra fundamentalmente asociado a proteínas, siendo la principal la ceruloplasmina, que participa en la oxidación de Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup> en una etapa previa a la

formación de la hemoglobina. También forma parte de importantes enzimas que participan en procesos de oxidación, como por ejemplo la citocromo oxidasa, la tirosina y varias aminoxidasas (Ho & Evans, 1997).

Mientras que en animales se conocen claros síntomas de deficiencia de cobre, no hay tal evidencia en seres humanos. La intoxicación por cobre como consecuencia de una contaminación accidental es poco frecuente, ya que su acción emética evita una ingestión y asimilación excesiva. No obstante, el envenenamiento puede producirse por ingestión de cantidades elevadas de sales de cobre por vía oral, sobre todo en forma de sulfato, que pueda producir la muerte (Zimdahl & Skogerboe, 1977). Los síntomas de intoxicación son vómitos, hematemesis, hipertensión, ictericia, anemia hemolítica y coma. También se conocen dos enfermedades hereditarias asociadas a alteraciones en la absorción de cobre, como son la enfermedad de Menke y la enfermedad de Wilson, caracterizadas por una escasa absorción del cobre y una excesiva acumulación en el hígado y cerebro respectivamente (Perez, 2005).

## **2.5. Características generales del sulfato de cobre**

El sulfato de cobre (II) pentahidratado o sulfato cúprico pentahidratado es el producto de la reacción química entre el sulfato de cobre (II) anhidro y agua. Este se caracteriza por su color azul y sus rápidos cambios de temperatura al agregarle más agua, su fórmula química es  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

### **2.5.1. Mecanismo de acción**

Las preparaciones en forma de polvo irritan la piel y las mucosas con las que entra en contacto. Las sales solubles como el sulfato de cobre, son corrosivas para las membranas mucosas y la córnea. El cobre divalente es capaz de fijarse a las proteínas formando compuestos con capacidad antigénica por enlace con la histamina.

### **2.5.2. Biotransformación y excreción**

Puesto que el cobre es un elemento esencial del organismo humano, la carga corporal del mismo se controla estrictamente; en un adulto se mantiene relativamente constante entre 100 y 150 mg . En individuos que no padezcan de la enfermedad de Wilson (trastorno hereditario

en el cual hay demasiado cobre en los tejidos corporales, este exceso causa daño al hígado y al sistema nervioso) el exceso de cobre absorbido es eliminado en la orina y las heces (vía la bilis).

### **2.5.3. Destino ambiental**

El cobre puede entrar al medio ambiente a través de liberaciones desde minas de cobre y otros metales, y desde fábricas que manufacturan o usan cobre metálico o compuestos de cobre. El cobre también puede entrar al medio ambiente desde basurales, del agua residual doméstica, de la combustión de desperdicios y combustibles fósiles, de la producción de madera, de la producción de abonos de fosfato y de fuentes naturales (por ejemplo, polvo en el aire, desde el suelo, volcanes, vegetación en descomposición, incendios forestales y de la espuma del mar). Por lo tanto, el cobre está ampliamente distribuido en el medio ambiente. El cobre se encuentra a menudo cerca de minas, fundiciones, plantas industriales, vertederos y sitios de desechos. Cuando el cobre se libera al suelo, puede adherirse fuertemente a la materia orgánica y a otros

componentes (por ejemplo, arcilla, arena, etc.) en las capas superficiales del suelo y puede que no se movilice muy lejos cuando es liberado.

#### **2.5.4. Impacto faunístico**

El cobre elemental no se degrada en el ambiente pudiéndose encontrar en plantas y en animales, y en concentraciones altas en organismos que filtran sus alimentos como por ejemplo mejillones y ostras. El cobre también se encuentra en una variedad de concentraciones en muchas bebidas y alimentos, incluso en el agua potable (ATSDR, 2004).

Los organismos acuáticos presentan una relación dinámica con el medio ambiente; por tanto, los metales pesados, en general, son incorporados y excretados por los organismos hasta que se logra un equilibrio. Sin embargo, los factores ambientales, las presiones fisiológicas y el metabolismo de los organismos afectan a los procesos de acumulación y excreción (Bryan, 1971).

En alevinos de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), de  $1,75 \pm 0,2$  g y longitud total de  $4,62 \pm 0,4$  cm, expuestos a 2 y 4 mg/l de cobre manifestaron cuadros de hiperexcitación, alternados con letargia y pérdida del eje del nado, con una mortalidad de 100% a las 24 y 6 horas, respectivamente. En los individuos expuestos a 1 y 1,5 mg/l de sulfato de cobre, la mortalidad acumulada a las 24 horas de exposición fue 55 y 90%, respectivamente. Así mismo, estos grupos presentaron aumento moderado en la producción de moco a nivel braquial, acompañado de manifestaciones clínicas de disnea. La CL50 a las 48 horas fue 0,94 mg/l (Velasco, Gómez, & Calderón, 2006).

En postlarvas de camarón de río *Cryphiops caementarius*, los resultados de un estudio revelaron que este estadio es muy sensible al cobre, encontrándose valores de LC<sub>50-96</sub> de 0,546 mg/l. La sobrevivencia y la actividad natatoria fueron afectadas por el cobre, disminuyendo a medida que aumenta la concentración, encontrándose que las concentraciones nocivas fueron 1,0 y 2,0 mg/l (63,3% y 100% mortalidad para 96h); las concentraciones de 0,16 y 0,25 mg/l fueron

tolerables (0% de mortalidad para 48h) (Mendoza-Rodríguez, 2007).

En el caso de lubinas juveniles (*Dicentrarchus labrax*) sometidas a concentraciones de cobre durante 96 horas, se calculó la CL<sub>50-96</sub> del sulfato de cobre en 2,91 mg/l con un ligero aumento de la velocidad de movimiento natatorio hasta concentraciones de 0,8 mg/l de cobre (Martínez-López, Garavato, Guilhermino, & Gracia-Fernández, 2007).

La toxicidad aguda del CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O para el pez de agua dulce *Capoeta fusca* de aproximadamente 2,95 ± 0,55 g de peso promedio fue evaluada mediante bioensayo estático. Determinándose la CL<sub>50</sub> para 24, 48, 72 y 96 horas de exposición de 43,62 mg/l ; 12,6 mg/l; 7,66 mg/l y 6,85 mg/l respectivamente (Zarei, Pourkhabbaz, Alipour, & Hossein, 2012).

#### **2.5.5. Usos**

El sulfato de cobre tiene numerosas aplicaciones, como alguicida en el tratamiento de aguas, fabricación de

concentrados de alimentos para animales, abonos, pesticidas, mordientes textiles, industria del cuero, pigmentos, baterías eléctricas, recubrimiento galvanizados (recubrimiento de cobre ácido por electroposición), sales de cobre, medicina, preservantes de la madera, procesos de grabado y litografía, reactivo para la flotación de menas que contienen zinc, industria del petróleo, caucho sintético, industria del acero, tratamiento del asfalto natural, colorante cerámico, y preparados medicinales como el agua de alibour (empleado en el tratamiento de dermatitis y lesiones infectadas de la piel). El cobre también es empleado fundamentalmente en la industria eléctrica, aunque también se emplea en la fabricación de latón, bronce o aleaciones con otros elementos (Waller & Pickering, 1992).

Las principales fuentes de contaminación ambiental asociadas al cobre, concretamente con respecto a suelos y los sedimentos, son la aplicación de fertilizantes, bactericidas, fungicidas y pesticidas, los cuales, inducen la acumulación de cobre en los horizontes del suelo (Rendell & Batley, 1980). También es usado para corregir deficiencias

de cobre en el suelo cuando la fertilidad de la tierra ha disminuido.

## **2.6. Bioensayos**

Los bioensayos son definidos como el método utilizado para evaluar la potencia relativa de un agente tóxico (químico o no) sobre un organismo vivo, a través de la comparación de ese agente con el efecto de una solución patrón o estándar. La prueba de toxicidad corresponde al método utilizado para detectar y evaluar la capacidad de un agente dado para producir efectos tóxicos sobre los organismos vivos; su objetivo primario, además de obtener datos para determinar los efectos sobre los sistemas biológicos, es caracterizar la relación concentración-respuesta del agente (CETESB, 1990).

Los bioensayos de toxicidad con agentes contaminantes en organismos vivos bajo condiciones de laboratorio, se han incrementado en estos últimos tiempos debido a la brevedad con que se obtiene la información sobre las dosis letales y subletales ( $CL_{50}$ ), la  $CL_{50}$  es el valor de la concentración que es letal para el

50% de los organismos sometidos a la influencia de la sustancia estudio, y se expresa en partes por millón (ppm) (Escobar, 1993).

Las pruebas de toxicidad son aconsejables en evaluaciones de calidad de agua porque solo las pruebas químicas y físicas no son suficientes para ensayar los efectos potenciales en la biota acuática. Por ejemplo, los efectos de interacciones químicas y la influencia de matrices complejas en toxicidad no pueden ser determinadas solo por pruebas químicas. Diferentes especies de organismos acuáticos no son igualmente susceptibles a la misma sustancia tóxica, tampoco son organismos igualmente susceptibles a través de todo su ciclo de vida. Incluso exposiciones previas a tóxicos pueden alterar la susceptibilidad. Además los organismos de la misma especie pueden responder diferentemente a el mismo nivel de un toxico de tiempo en tiempo, incluso cuando todos las otras variables se mantengan constantes.

Los bioensayos son útiles para una variedad de propósitos que incluyen determinaciones: (a) susceptibilidad de condiciones ambientales para la vida acuática, (b) factores ambientales favorables o desfavorables, como OD, pH, temperatura, salinidad, o turbidez, (c) efectos de factores ambientales en la toxicidad de

aguas residuales, (d) toxicidad de agua residual para una especie prueba, (e) sensibilidad de organismos acuáticos a un efluente o tóxico, (f) cantidad y tipo de tratamiento residual necesario para conocer los requerimientos de control de la contaminación en agua, (g) eficacia de métodos de tratamientos de aguas residuales, (h) radio de descarga permisible de efluentes, y (i) cumplimiento con los estándares de calidad de agua, requerimientos de efluentes, y descargas permitidas (EPA, 2002).

Los bioensayos permiten determinar los efectos tóxicos de una sustancia y su repercusión en una población y su medio ambiente (Castillo, 2004). Los bioensayos de toxicidad constituyen un mecanismo para evaluar la calidad de las aguas superficiales afectadas por las descargas de agentes contaminantes, principalmente por compuestos metálicos que causan fuertes impactos en los ecosistemas acuáticos. Estas pruebas se han desarrollado y estandarizado por agencias internacionales de protección ambiental (Del Valls & Conradi, 2000).

### 2.6.1. Tipos de bioensayos

La selección del tipo de bioensayo a emplearse dependerá de los objetivos del bioensayo, la disponibilidad de los recursos, los requerimientos de los organismos de prueba, las características de la sustancia a evaluar y de los objetivos y alcances particulares del estudio. En la Tabla 3 se muestra la clasificación general de los bioensayos.

**Tabla 3.** Clasificación de bioensayos

<b>Según su respuesta</b>	Ensayos de toxicidad aguda	Cuantifican las concentraciones letales de un xenobiótico o sustancia a una especie en particular. El valor calculado se denomina concentración letal media (CL <sub>50</sub> ), en un tiempo determinado (generalmente 48 o 96 horas).
	Ensayos de toxicidad crónica	Estiman la concentración efecto media (CE <sub>50</sub> ), la cual es la concentración de la sustancia de prueba que causa un efecto al 50% de la población experimental, al cabo de un tiempo determinado; depende del ciclo de vida del organismo empleado. Alternativamente, un ensayo definitivo puede utilizarse para estimar el tiempo requerido para producir un efecto al 50% de los organismos (TE <sub>50</sub> ), a una concentración específica.
<b>Según el alcance de la respuesta</b>	Ensayos de respuesta directa	
	Ensayos de respuesta indirecta	
<b>Según su finalidad</b>	De toxicidad de muestra única	
	De toxicidad de efluentes	
	De bioestimulac	Se mide la facultad de las aguas residuales o de las sustancias químicas

	ión	de estimular la multiplicación y el desarrollo de algas, efecto este de eutrofización que frecuentemente se traduce en una superabundancia o proliferación de algas.
	Organolépticos	Algunos contaminantes pueden producir olores o sabores desagradables en los organismos acuáticos. El contaminante puede no ser nocivo para el organismo acuático, pero puede ocurrir que el organismo pierda valor económico. El mejor procedimiento consiste en la evaluación por parte de personas experimentadas en bromatología y emplear gran número de catadores diestros.
<b>Según su técnica</b> (EPA, 2002)	De sistemas estáticos	Se efectúa sin la renovación continua del flujo constante de las diluciones sometidas al ensayo.
	De sistemas de renovación	Los especímenes se someten a una preparación fresca de la misma concentración inicialmente empleada, periódicamente (generalmente cada 24 horas). Tal renovación puede ser necesaria cuando importantes sustancias tóxicas se deterioran, o son absorbidas, o se pierden por cualquier otra razón, con suficiente rapidez para influir considerablemente con los resultados del ensayo.
	De sistemas de flujo continuo	Circula continuamente una corriente de sustancia de prueba nueva en contacto con los individuos experimentales. Se realizan con la renovación continua o casi continua de las diluciones sometidas al ensayo, con el fin de mantener casi constantes las concentraciones de las sustancias tóxicas activas.

**Fuente:** Elaboración propia

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Materiales**

##### **3.1.1. Material biológico**

- Alevinos de *Orestias luteus*
- Alimento vivo *Chlorella sp.*

##### **3.1.2. Material de vidrio**

- Matraces Erlenmeyer
- Probetas
- Baguetas
- Láminas portaobjetos
- Láminas cubreobjetos
- Pipetas
- Embudos
- Placas petri
- Vasos precipitado
- Mecheros
- Fiolas

##### **3.1.3. Material de metal y otros**

- Pinzas, tijeras
- Hojas de bisturí
- Espátula

- Papel aluminio
- Bombillas de absorción

#### **3.1.4. Medios de cultivo y reactivos**

- Agua desionizada
- Agua destilada
- Frascos de vidrio
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- $\text{NaHCO}_3$
- $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- $\text{MgSO}_4$
- KCl
- Bálsamo de Canadá
- Formol al 8%
- Xilol
- Alcohol
- Hematoxilina
- Eosina

#### **3.1.5. Equipos**

- Estereoscopio
- Microscopio óptico
- Balanza analítica
- Termómetro
- Micrótopo
- Potenciómetro

- Oxímetro
- Aireadores
- Difusores de manguera
- Cámara fotográfica

### **3.1.6. Lugar de experimentación**

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Acuicultura (obtención de alevinos) y el Laboratorio de Muestras Biológicas (aclimatación y bioensayos) de la Dirección de Recursos Hidrobiológicos del Proyecto Especial Binacional Lago Titicaca, ubicado en el 17 km , localidad Barco, distrito de Chucuito, Provincia de San Román, Puno. Y el proceso histológico se realizó en el laboratorio de patología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional del Altiplano, ubicado en Avenida Sesquicentenario N° 1150, distrito de Puno, Puno. El experimento se llevó a cabo de abril a noviembre 2010.

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Diseño experimental**

El experimento se desarrolló bajo condiciones de laboratorio, y fue del tipo experimental y longitudinal, constó de un

bioensayo preliminar con 6 concentraciones sin repetición, con 5 alevinos cada uno y un control, en un total de 35 alevinos de *Orestias luteus*. Y un bioensayo definitivo, con 6 concentraciones de 4 repeticiones, con grupos de 10 alevinos cada uno y un grupo control, en un total de 280 alevinos de *Orestias luteus*. Ambos bioensayos bajo el modelo completamente aleatorizado y como sigue:

T <sub>0</sub>	:	Grupo control, sin tratamiento.
T <sub>1</sub>	:	Grupo sometido a concentración 1.
T <sub>2</sub>	:	Grupo sometido a concentración 2.
T <sub>3</sub>	:	Grupo sometido a concentración 3.
T <sub>4</sub>	:	Grupo sometido a concentración 4.
T <sub>5</sub>	:	Grupo sometido a concentración 5.
T <sub>6</sub>	:	Grupo sometido a concentración 6.

Todos los pasos del diseño experimental se detallan gráficamente en el Anexo 3.

### **3.2.2. Variables**

#### **Variables independientes**

- Concentraciones de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O).

#### **Variables dependientes**

- Porcentaje de mortalidad de *Orestias luteus*.

- Efecto Histopatológico del  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en *Orestias luteus*.
- Concentración Letal Media ( $\text{CL}_{50-96}$ ).

### 3.2.3. Preparación del agua dulce sintética

Se preparó agua dulce sintética muy dura para que sea semejante a las condiciones de dureza del lago Titicaca. Para lo cual se preparó 20 litros de agua dulce sintética muy dura de la siguiente manera, se colocó 19 litros de agua desionizada en un bidón. Se adicionó 4,8g de  $\text{MgSO}_4$ , 7,68g de  $\text{NaHCO}_3$ , y 0,32g de  $\text{KCl}$ . Se agitó hasta disolver completamente las sales. Paralelamente se disolvió 4,8g de  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 1litro de agua desionizada en un frasco separado, se agitó hasta que el sulfato de calcio estuvo disuelto, se adicionó a los 19 litros anteriores y mezcló (EPA, 2002). Se aireó adicionalmente para lograr la cantidad necesaria de oxígeno disuelto, aproximadamente 4 mg/l, y se llevó un control de la temperatura, oxígeno disuelto, pH y dureza del agua preparada. El agua dulce sintética se utilizó tanto para la fase de aclimatación como para los bioensayos preliminar y definitivo.

#### **3.2.4. Obtención de alevinos**

El procedimiento para la obtención de los alevinos se detalla en el Anexo 2. Los alevinos que se obtuvieron fueron de  $15 \pm 1$  día de eclosionados, un peso promedio de  $0,0021 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$  y una longitud de  $7 \text{ mm} \pm 0,5 \text{ mm}$ .

#### **3.2.5. Determinación de la carga biológica para los bioensayos**

Para determinar límite de carga máxima de alevinos por litro de agua dulce sintética fue necesario seguir la sugerencia de  $1,1 \text{ g/l}$  a  $15^\circ\text{C}$  de EPA (2002), en base a esta proporción se calculó  $0,1375 \text{ g}$  de peso de alevinos por cada  $125 \text{ ml}$  de agua dulce sintética, teniendo en cuenta que a menor temperatura la capacidad de carga es mayor. Tomando en cuenta el peso promedio del paso anterior se determinó que la carga biológica máxima fue de  $64$  alevinos por cada  $125 \text{ ml}$  de agua dulce sintética.

#### **3.2.6. Determinación de los recipientes de ensayo**

En base a la carga máxima de  $64$  alevinos por cada  $125 \text{ ml}$  se optó por usar frascos de aproximadamente  $150 \text{ ml}$ , en los cuales se podría albergar a  $10$  alevinos en cada uno.

Además de tener en cuenta que la superficie en contacto entre el aire y la solución en el frasco sería mayor a 12 cm<sup>2</sup> cumpliendo con la recomendaciones de AENOR (1998).

### **3.2.7. Aclimatación de los alevinos**

Antes del bioensayo preliminar y definitivo los alevinos de 15 días de eclosionados se mantuvieron aislados por 7 días como un medio preventivo para que se aclimaten a las condiciones del agua dulce sintética preparada pasos anteriores, se desecharon los individuos que presentaron malformaciones durante este periodo, aceptándose una mortalidad del 5% de la población. En el recipiente de aclimatación que se usó se controló la temperatura a 14± 1°C, exposición de luz de 16 horas día y 8 horas oscuridad (EPA, 2002) y con aireación continua mediante burbujeo de aire. Se alimentó a los alevinos con microalgas (*Chlorella sp.*) 2 veces al día hasta 24 horas antes de ambos bioensayos. Se realizó una limpieza del acuario cuando se encontró restos sustancias metabólicas que pudieran generar estrés en los alevinos, esta profilaxis se repitió en el bioensayo preliminar y definitivo.

### **3.2.8. Bioensayo preliminar de toxicidad**

Con el fin de conocer el rango de las concentraciones a utilizar en el bioensayo definitivo, se realizó una prueba preliminar, en el cual grupos de 5 alevinos fueron expuestos a  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , incrementándose gradualmente las concentraciones en proporción geométrica de  $10^{-8}$  mg/l,  $10^{-6}$  mg/l,  $10^{-4}$  mg/l,  $10^{-2}$  mg/l,  $10^0$  mg/l y  $10^2$  mg/l estableciéndose con esto un intervalo de concentraciones relativamente grandes (EPA, 2002). De acuerdo a los resultados de este ensayo preliminar se ajustaron las concentraciones a la mínima efectiva a la máxima de tolerancia aparente. Es decir, los intervalos de la concentraciones menor donde ocurrió la mortalidad del total de alevinos  $10^{-2}$  mg/l, y la concentración mayor que no causo mortalidad total de los alevinos  $10^{-4}$  mg/l .

### **3.2.9. Bioensayo definitivo de toxicidad**

Para la realización del experimento se utilizaron un total de 280 alevinos para 6 concentraciones y un control, se realizaron 4 repeticiones para cada concentración, se expusieron 10 alevinos para cada vaso precipitado. El

agente en estudio  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  grado analítico (99.9% de pureza) fue suministrado por el laboratorio MERCK, se preparó una solución stock de 100 mg/l o  $10^5$   $\mu\text{g/l}$  en una fiola, luego se realizaron las diluciones con el factor de dilución aproximado de 0,5, mezclándose y dejando reposar por una hora para lograr uniformidad y homogeneidad en la solución. Transcurrido el tiempo fijado, los alevinos fueron introducidos aleatoriamente en los vasos, cuidando de que no se dañen y sufran el menor estrés posible. El experimento se realizó bajo condiciones de laboratorio donde se mantuvo un fotoperiodo de 16 horas día y 8 horas oscuridad. Se realizó una prueba de toxicidad con sistema estático. Una vez iniciado el experimento se hicieron las observaciones de mortalidad cada 24 horas hasta que se completó las 96 horas y se terminó con esta fase del experimento.

#### **3.2.10. Criterios de mortalidad**

Los criterios para definir ocurrencia de mortalidad fueron la pérdida de movimiento y falta de reacción al contacto suave del pedúnculo caudal con una varilla de vidrio; para mayor

seguridad se retiraron los alevinos sospechosos del acuario y se observarán en el estereoscopio, notando si existe movimiento de agallas.

### **3.2.11. Análisis estadístico**

Las CL<sub>50</sub> durante los diferentes tiempos y exposición se determinaron mediante el método estadístico de Probit y la Prueba de Dunnet para la significancia estadística, utilizando para su cálculo con el programa estadístico SAS 9,1. La metodología utilizada para la parte estadística se detalla en el Anexo 5 y 6.

### **3.2.12. Proceso histológico**

Se escogió al azar alevinos recién muertos de cada concentración para realizarle los procesos histológicos. Los organismos fueron fijados en una solución de formol al 8%, los cortes se realizaron con la ayuda de un micrótopo rotatorio, a una precisión de 5 mm, posteriormente fueron teñidos con la técnica de hematoxilina y eosina, los cortes fueron conservados de manera permanente utilizando resina de bálamo de Canadá (Roberts, 1989).

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Bioensayo preliminar

En la Tabla 4 se observa los resultados del bioensayo preliminar, donde se determinó el intervalo de  $10^{-2}$  mg/l y  $10^{-4}$  mg/l de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  como valores para la determinación a utilizarse en el bioensayo definitivo.

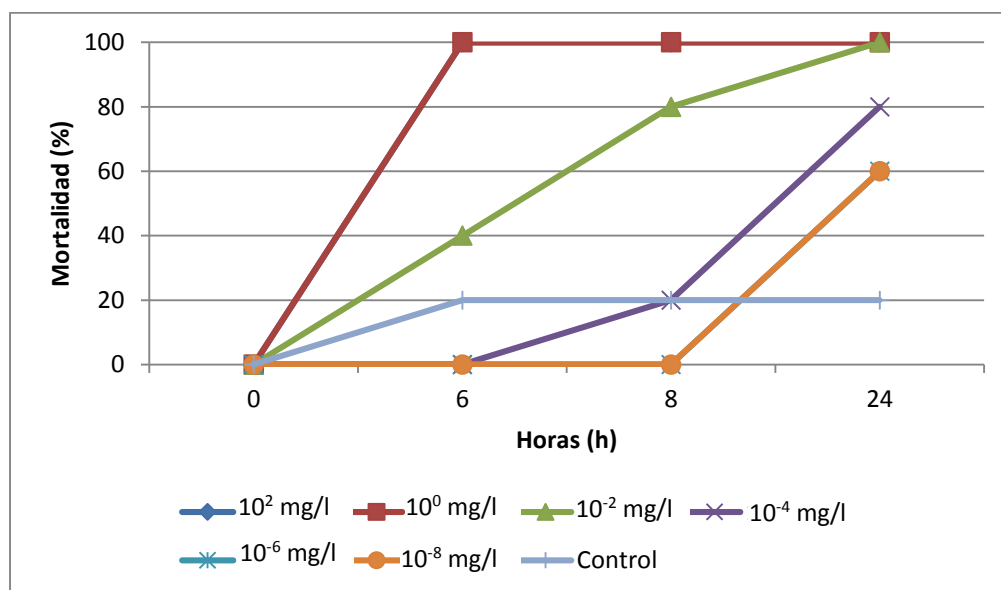
**Tabla 4.** Número de muertes de alevinos de *Orestias luteus* a diferentes concentraciones de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  durante las 24 horas del bioensayo preliminar.

mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Mortalidad de alevinos				
	0 h	6 h	8 h	24 h	Total
$10^2$	0	5	0	0	5
$10^0$	0	5	0	0	5
<b><math>10^{-2}</math></b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>5</b>
<b><math>10^{-4}</math></b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
$10^{-6}$	0	0	0	3	3
$10^{-8}$	0	0	0	3	3
Control	0	1	1	1	3

**Fuente:** Elaboración propia

En  $10^2$  mg/l y  $10^0$  mg/l se pudo notar cambios en las características de apariencia (ver figura 21 y 22 del Anexo 3) como decoloración del cuerpo, ojos opacos y dañados. También cambio en el comportamiento como nado errático, pérdida de los reflejos al contacto de una bagueta y columna curvada

**Gráfico 1.** Comparación los tiempos de mortalidad de *Orestias luteus* a diferentes concentraciones de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  durante 24 horas del bioensayo preliminar.



**Fuente:** Elaboración propia

En el gráfico 1 se observa que la ocurre una mortalidad total en las primeras 6 horas en las concentraciones de  $10^2$  mg/ y  $10^0$ mg/l .

**Tabla 5.** Parámetros fisicoquímicos del agua dulce sintética durante el bioensayo preliminar.

mg/l CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Oxígeno disuelto (mg/l)					pH					Temperatura (°C)				
	0 h	2 h	4 h	6 h	24	0 h	2 h	4 h	6 h	24 h	0 h	2 h	4 h	6 h	24 h
1x10 <sup>2</sup>	3,85	4,03	4,35	4,81	3,9	8,62	8,49	8,46	8,42	8,14	12,4	13,3	13,4	13,6	12,7
1x10 <sup>0</sup>	4,85	4,4	4,57	4,6	3,8	8,48	8,58	8,54	8,48	8,39	12,4	13,2	13,4	13,8	12,9
1x10 <sup>-2</sup>	4,87	4,19	4,39	4,9	3,2	8,62	8,46	8,37	8,44	8,25	12,5	13,5	13,6	13,8	13
1x10 <sup>-4</sup>	4,77	4,99	4,09	4,65	3,5	8,63	8,45	8,39	8,39	8,40	12,5	13,6	13,5	13,8	13
1x10 <sup>-6</sup>	5,04	4,87	4,09	4,56	3,09	8,57	8,84	8,42	8,45	8,23	12,5	13,5	13,4	13,7	12,9
1x10 <sup>-8</sup>	5,11	4,88	3,94	4,7	2,96	8,69	8,41	8,48	8,39	7,66	12,6	13,5	13,4	13,8	13
Control	4,17	3,84	4,68	4,7	3,06	8,61	8,50	8,37	8,45	8,26	12,5	13,3	13,6	13,8	12,8

**Fuente:** Elaboración propia

En la Tabla 5 los parámetros fisicoquímicos están dentro del rango necesario para la normal desarrollo de *Orestias luteus*, los cuales son muy similares a los sugeridos por Flores (2009) para el cultivo de peces nativos en condiciones de laboratorio.

#### 4.2. Bioensayo definitivo

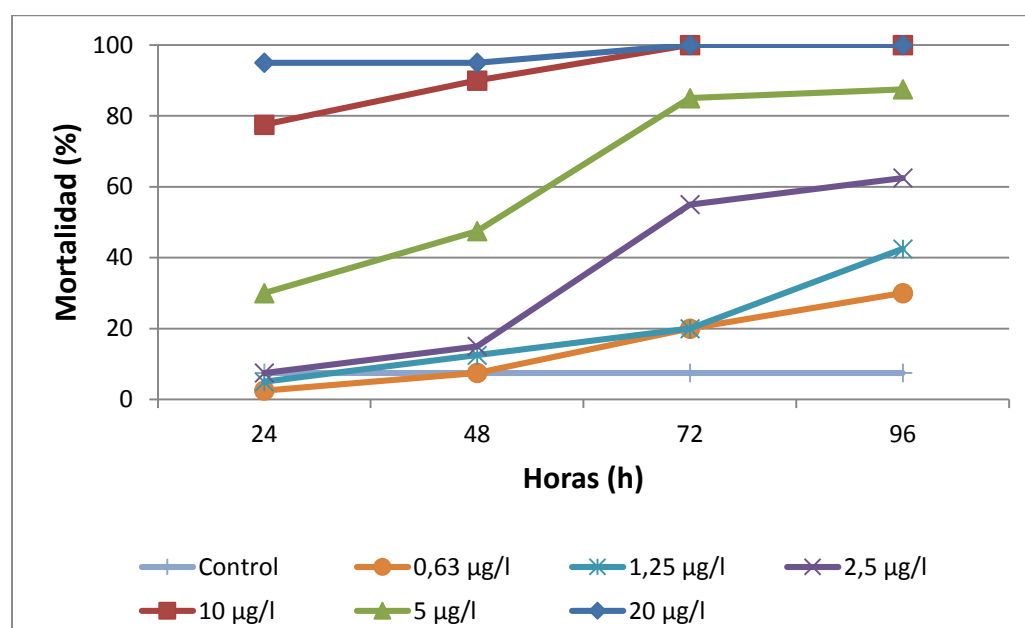
**Tabla 6.** Número de alevinos muertos de *Orestias luteus* a diferentes concentraciones de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  durante 96 horas.

Tratamiento /Repetición	Concentración ( $\mu\text{g/l}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	Mortalidad				Total (96h)
		(24h)	(48h)	(72h)	(96h)	
T6/1	20	8	0	2	0	40
T6/2	20	10	0	0	0	
T6/3	20	10	0	0	0	
T6/4	20	10	0	0	0	
T5/1	10	9	1	0	0	40
T5/2	10	9	1	0	0	
T5/3	10	9	0	1	0	
T5/4	10	4	3	3	0	
T4/1	5	2	2	3	0	35
T4/2	5	6	3	0	1	
T4/3	5	4	1	4	0	
T4/4	5	0	1	8	0	
T3/1	2,5	1	0	4	0	25
T3/2	2,5	0	0	5	2	
T3/3	2,5	0	0	3	1	
T3/4	2,5	2	3	4	0	
T2/1	1,25	0	1	1	2	17
T2/2	1,25	1	2	0	4	
T2/3	1,25	1	0	0	3	
T2/4	1,25	0	0	2	0	
T1/1	0,63	1	0	0	0	12
T1/2	0,63	0	0	2	1	
T1/3	0,63	0	1	3	0	
T1/4	0,63	0	1	0	3	
Control/1	0,00	1	0	0	0	3
Control/2	0,00	1	0	0	0	
Control/3	0,00	0	0	0	0	
Control/4	0,00	1	0	0	0	

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 6, se observa los efectos de los 6 tratamientos y el control, donde los mayores efectos en el menor tiempo fueron en las concentraciones de 20 µg/l y 10 µg/l, donde a las primeras 24 horas causaron la muerte del 95% y 78% respectivamente. Y a las 72 horas el 100% en ambas concentraciones, respecto a las demás concentraciones.

**Gráfico 2.** Comparación los tiempos de mortalidad de *Orestias luteus* a diferentes concentraciones de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O durante 96 horas.



**Fuente:** Elaboración propia

En el Gráfico 2 se observa la mortalidad elevada en las primeras 24 horas de iniciado el bioensayo en la concentración de 20 µg/l, correspondiendo una relación directa de la a la concentraciones empleada, el tiempo y la mortalidad en las demás concentraciones de sulfato de cobre. También se observó pérdida de sensibilidad, equilibrio y dificultad en permanecer en el fondo del vaso a 5 µg/l antes de morir.

En la tabla 7 no se registró los parámetros fisicoquímicos de las concentraciones de 20 µg/l y 10 µg/l porque a las 96 horas ya existía un mortalidad del 100% de alevinos, siendo innecesaria su lectura. También se pudo observar que la temperatura, pH y oxígeno disuelto se encontraban dentro de los parámetros requeridos para el cultivo de *Orestias luteus*, esto a pesar de que en las lecturas se observa una variación de 3,8 °C que coincide con la temperatura fluctuante en el laboratorio de acuicultura, lugar donde se cultiva a la especie.

**Tabla 7.** Parámetros fisicoquímicos del agua dulce sintética durante el bioensayo definitivo.

µg/l CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Oxígeno disuelto (mg/l)				pH				Temperatura (°C)				Alcalinidad total (mg/l CaCO <sub>3</sub> )		Dureza total (mg/l CaCO <sub>3</sub> )	
	0h	24h	48h	96h	0h	24h	48h	96h	0h	24h	48h	96h	0h	48h	0h	48h
20	4,2	4	4,2	---	8,02	8,48	8,5	---	15,5	16,8	11,2	---	237	240	477	318
10	4,3	3,9	4,8	---	8,48	8,46	8,61	---	14,7	16,5	12,3	---	249	252	384	252
5	4,5	4,2	4,3	3,2	8,65	8,45	8,59	8,56	14,4	16,4	12,2	12,1	240	261	375	261
2,5	4,9	4,5	4,4	3,5	8,77	8,32	8,77	8,12	14,4	16,5	12,3	12	243	255	312	255
1,25	4,4	4,2	3,9	3,0	8,76	8,37	8,69	8,37	14,1	16,6	12,1	11,8	240	246	261	312
0,63	4,6	3,9	3,9	2,9	8,75	8,75	8,85	7,87	13,6	16,8	11,9	11,6	237	231	258	273
Control	4,6	3,9	3,8	3,6	8,67	8,48	8,56	8,89	13,8	16,1	11,7	11,7	213	225	249	267

**Fuente:** Elaboración propia.

### 4.3. Determinación de la CL<sub>50-96</sub> del CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O

**Tabla 8.** Probabilidad de mortalidad de *Orestias luteus* según diferentes concentraciones de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O y los intervalos de confianza al 95%

Probabilidad	Concentración (µg/l)	Intervalo de Confianza (95%)	
		Inferior	Superior
LC 1.00	0,178	0,062	0,331
LC 5.00	0,342	0,151	0,559
LC10.00	0,485	0,241	0,742
LC 15.00	0,613	0,33	0,9
<b>LC 50.00</b>	<b>1,653</b>	<b>1,187</b>	<b>2,137</b>
LC 85.00	4,458	3,431	6,313
LC 90.00	5,638	4,245	8,478
LC 95.00	7,983	5,737	13,306
LC 99.00	15,329	9,860	31,742

**Fuente:** Elaboración propia

En la Tabla 8 se observa que la CL<sub>50-96</sub> de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O para *Orestias luteus* en 96 horas fue 1,653 µg/l con límite de confianza inferior y superior de 1,187 y 2,137 respectivamente.

### 4.4. Determinación del efecto adverso no observado (NOAEC)

En el la Tabla 9, se detalla el análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto de la variable independiente concentración sobre la variable dependiente Mortalidad.

**Tabla 9.** Análisis de Varianza (ANOVA) para las concentraciones de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

Fuente	G.L	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Concentración	6	11,43931885	1,90655314	22,97	<,0001
Error	21	1,74338884	0,08301852		
Total corregido	27	13,18270770			

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 9 se observa que al realizar el análisis de varianza (ANOVA) se determinó que existen diferencias significativas entre los 6 tratamientos a razón que el estadístico F calculado (22,97) es mayor que el tabular (2,57071) para un grado de libertad 6.

**Tabla 10.** Prueba de Significancia de Dunnett para diferentes concentraciones de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

Las comparaciones importantes del nivel 0,05 están indicadas por ***				
Comparación con el control	Diferencia entre medias	Simultáneo 95% Límites de confianza		
20 - 0	1,8780	1,3097	2,4464	***
10 - 0	1,8780	1,3097	2,4464	***
5 - 0	1,7508	1,1824	2,3191	***

<b>Las comparaciones importantes del nivel 0,05 están indicadas por ***</b>				
<b>Comparación con el control</b>	<b>Diferencia entre medias</b>	<b>Simultáneo 95% Límites de confianza</b>		
<b>2,5 - 0</b>	1,4259	0,8576	1,9943	***
<b>1,25 - 0</b>	1,0794	0,5110	1,6477	***
<b>0,63 - 0</b>	0,8047	0,2363	1,3731	***

**Fuente:** Elaboración propia

En la Tabla 10, se detalla la prueba de significancia de Dunnett para todos los tratamientos incluido el control, se determinó que existe diferencia entre la concentración más baja de sulfato de cobre 0,63 µg/l que causó la mortalidad de 12 alevinos y el control, lo que indica que la menor concentración utilizada en el estudio ya produce un efecto significativamente superior que el control.

## V. DISCUSIÓN

En este trabajo de investigación se trató de determinar la CL<sub>50-96</sub> del sulfato de cobre en alevinos de *Orestias luteus*, por ser esta concentración una referencia del nivel de toxicidad del cobre sobre su población en el Lago Titicaca. Además de mostrar los daños histopatológicos del cobre sobre la fase de alevino, por ser esta la etapa de su ciclo de vida en la cual deja de alimentarse del saco vitelino e inicia la alimentación directa del medio externo haciéndola más susceptible a factores externos, pues no presenta defensas como en su etapa adulta. Y que estos resultados puedan ser utilizados como referencia por las autoridades que regulan y norman las descargas y efluentes en la Cuenca del Lago Titicaca.

De acuerdo a EPA la muerte es el efecto usado para determinar la toxicidad en un organismo acuático, en pruebas de toxicidad aguda. Algunos criterios usualmente empleados para establecer la muerte como no mover agallas o apéndices y no reaccionar a toques suaves con objetos son criterios que en el presente estudio fueron usados, pero que estos criterios de muerte fueron acompañados por alevinos que

presentaban actividad cardiovascular, notándose movimiento del corazón y circulación sanguínea, a pesar de calificar como muertos según la EPA.

En el bioensayo preliminar se observó daños histológicos a nivel de epidermis con oscurecimiento de globos oculares, ver Anexo 3, esto debido posiblemente al efecto en concentraciones elevadas de sulfato de cobre, que como lo indica su hoja de seguridad al contacto con los ojos o la piel humana es irritante y puede causar quemaduras.

Velasco, Gómez, & Calderón (2006) trabajaron con *Piaractus brachypomus* observando que los individuos sometidos a 2 mg/l y 4 mg/l manifestaron cuadros de hiperexcitación alternados con letargia y pérdida del eje del nado, con una mortalidad de 100% a las 24 y 6 horas respectivamente, esto también fue observado en nuestro estudio ya que en el bioensayo preliminar de 24 horas en las concentraciones de 100 mg/l y 1 mg/l, que fueron las que presentaron mortalidad en un 100% en las primeras 6 horas.

Zarei, Pourkhabbaz, Alipour, & Hossein (2012) determinaron la CL<sub>50</sub> del CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O en 96 horas para otra especie de pez de agua dulce *Capoeta fusca* en 6,85 mg/l, así también Martínez-López, Garavato,

Guilhermino, & Gracia-Fernández (2007) señalan en el caso de lubinas juveniles (*Dicentrarchus labrax*) la CL<sub>50</sub> en 96 horas es 2,91 mg/l. Concentraciones mucho mayores a la obtenida por *Orestias luteus* de 1,653 µg/l. Estos resultados se deben probablemente a la talla, peso promedio y especie que sea sometida a los bioensayos. Notándose que en peces de ciclo más corto los efectos tóxicos del sulfato de cobre son mayores.

En otras especies de la cadena trófica como las postlarvas del camarón de río, Mendoza (2007) menciona que la CL<sub>50-96</sub> para el sulfato de cobre es 0,546 mg/l, siendo también esta mucho mayor a la obtenida en el presente estudio para *Orestias luteus* de 1,653 µg/l. Razón por la cual se puede decir que los efectos tóxicos del sulfato de cobre son mucho mayores en *Orestias luteus* que otras especies de la cadena trófica.

Este trabajo se realizó bajo condiciones de laboratorio, durante la estación de la primavera, donde la temperatura promedio fluctuó según SENAMHI entre 2 °C y 14 °C, el rango de efectividad de los tóxicos como el sulfato de cobre tiene una eficacia a una temperatura menor de 23°C, debido a que a mayores temperaturas puede ocurrir una evaporación significativa

que reduzca su toxicidad, por tanto la temperatura no fue un factor que haya influido de manera negativa en los tratamientos.

El agua desionizada como solvente para preparar agua estándar fuertemente dura a utilizarse en los bioensayos, con el objetivo que sea semejante a las condiciones del Lago Titicaca. Pero se observó que la dureza de algunas zonas del Lago Titicaca era inclusive mucho mayor al nivel de dureza máximo posible de preparación de la tabla base de la EPA (2002), por lo cual se preparó el nivel de dureza más cercano este.

La presencia de nutrientes o alimento producidos por los alevinos (metabolitos) pudieron aumentar la toxicidad del sulfato de cobre en los tratamientos y generar mortalidad no esperada en el control. La reducción de oxígeno disuelto también se pudo deber a este aumento de los metabolitos en el medio tal como se observó en el bioensayo definitivo. Pero a pesar de esto se aceptó el bioensayo definitivo debido a que la mortalidad en el control no superó el 10%, tal y como se sugiere en EPA (2002)

## VI. CONCLUSIONES

- Se determinó la la concentración mínima efectiva de 10 µg/l y la concentración máxima de tolerancia aparente 0,1 µg/l, es decir, la menor concentración que generó la mayor mortalidad y la mayor concentración que generó la menor mortalidad.
- Se determinó la Concentración Letal Media de sulfato de cobre para *Orestias luteus* en 96 horas de 1,653 µg/l con límite de confianza inferior y superior de 1,187 y 2,137 respectivamente.
- En el bioensayo preliminar en las concentraciones de 10<sup>2</sup> mg/l y 10<sup>0</sup> mg/l se notó cambios en las características de apariencia (ver figura 21 y 22 del Anexo 3) como decoloración del cuerpo, ojos opacos y dañados. También cambio en el comportamiento como nado errático, pérdida de los reflejos al contacto y columna curvada.
- El sulfato de cobre afectó la estructura ocular, ver Anexo 8, produciendo una atrofia celular del cristalino y el iris en la concentración de 20 µg/l, lo mismo en la estructura del iris a 10 µg/l en comparación al control.

## VII. RECOMENDACIONES

- Deben realizarse otros bioensayos para la determinación de la CL<sub>50</sub> del sulfato de cobre con otros integrantes de la comunidad biológica del Lago Titicaca para garantizar la validez de los bioensayos y así ampliar los resultados haciéndolos comparables.
- Se deben realizar más estudios con todas las sustancias que sobrepasen los valores de la categoría N° 4 (conservación de ambientes acuáticos como lagos y lagunas) del Decreto Supremo 002-2008 MINAM, correspondiente a los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua.
- Debido a que los alevinos de *Orestias luteus* en el momento de la experimentación presentan una longitud total de 7 mm ± 0,5 mm hace que los cortes histológicos sean más complejos, por tanto sería necesario realizar la experimentación con mayor número de alevinos para así asegurar que los cortes evidencien con mayor claridad el resto de tejidos, además de realizarlo a diferentes etapas de su desarrollo, lo cual facilitará la lectura de los daños histopatológicos en edades mayores a las del estudio.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AENOR. (1998). *UNE-EN ISO 7346-1. Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias frente a un pez de agua dulce*. Barcelona, España.
- ATSDR. (2004). *Resumen de salud pública Cobre*. Agencia para Sustancias Tóxicas y el registro de enfermedades, Atlanta.
- Bernal, O. J., & Grijalba, A. I. (2008). *Determinación de la concentración letal media (CL50-96) de Cadmio y Aluminio mediante bioensayos con Trucha arco iris ale "alevinos de Oncorhynchus mykss"*. Trabajo de grado, Universidad de la Salle, Bogota.
- Boulangé, B., & Aquize Jean, E. (1981). Morphologic, hydrographic et climatologie du lac Titicaca et de son bassin versant. *Hydrobiology tropical*, 14(4), 269-287.
- Bryan, G. W. (13 de April de 1971). The effects of heavy metals (other than mercury) on marine and estuarine organisms. *Proceedings of the royal society B: biological Sciences*, 389-410.
- Castillo, G. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas*. México: Instituto mexicano de tecnología del Agua.
- CETESB. (1990). L5.019-I. Agua, test de toxicidad aguda con peces. Sistema estático.
- Cruz, J. (1984). *Estudio de fecundidad de Orestias ispi "ispi" en Llachón, Lago Titicaca*. Tesis, Facultad de ciencias Biológicas, Puno.
- Dejoux, C., & Iltis, A. (1991). *El Lago Titicaca síntesis del conocimiento limnológico actual*. La Paz, Bolivia: ORSTOM.
- Del Valls, T., & Conradi, M. (2000). *Avances en ecotoxicología marina: Comparación entre test de laboratorio y estudios in situ para la evaluación de la calidad ambiental de los sedimentos* (Vol. 26).

- DIGESA. (2007). *Vigilancia de la calidad de los recursos hídricos - Registro de datos Ríos Ramis y afluentes*. Dirección General de Salud Ambiental, Puno.
- DIGESA. (2008). *Vigilancia de la calidad de los recursos hídricos - Registro de datos Río Ramis y afluentes*. Dirección General de Salud, Puno.
- DIGESA. (2010). *Vigilancia de la calidad de los recursos hídricos - Registro de datos Río Ramis y afluentes*. Puno.
- EPA. (2002). *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms* (Quinta ed.). Washington DC, USA.
- Escobar, P. M. (1993). *Determinación de la toxicidad de los detergentes mediante sistemas estáticos utilizando Daphnia magna*. Universidad de la Salle, Facultad de Ciencias de la Educación- Departamento de Química y Biología, Bogota.
- Flores, O. Y. (2009). *Boletín técnico de cultivos de peces nativos de la cuenca del Titicaca con fines de recuperación y re(poblamiento)*. Proyecto Especial Binacional Lago Titicaca. Puno: PELT.
- Harris, E. D. (1991). Copper Transport: An overview. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 196, 130-140.
- Ho, M. D., & Evans, G. J. (Noviembre de 1997). Operational speciation of cadmium, copper, lead and zinc in NIST standard reference materials 2710 and 2711 by BCR sequential extraction procedure and flame atomic adsorption spectrometry. *Analytical Communications*, 34, 363-364.
- Martínez-López, E., Garavato, C., Guilhermino, L., & Gracia-Fernández, A. J. (2007). Evaluación de los efectos ecotoxicológicos del cobre en Lubina (*Dicentrarchus labrax*) mediante el uso de biomarcadores y otros parámetros ecológicos. *Revista de Toxicología*, 24(2), 79-83.

- Mendoza-Rodríguez, R. (2007). Toxicidad aguda del cobre (Cu<sup>2+</sup>) en postlarvas de camarón de río *Cryphiops caementarius* (Natantia, Palaemonidae). *Revista Peruana de Biología*, 53-54.
- Odum, E. P. (2006). *Fundamentos de ecología* (Sexta ed.). España.
- Ortega, H., Hidalgo, M., Correa, E., Espino, J., Chocano, L., Trevejo, G., . . . Quispe, R. (2011). *Lista anotada de los peces de aguas continentales del Perú: Estado actual del conocimiento, distribución, usos y aspectos de conservación*. Lima, Perú.
- Parenti, L. R. (1984). A Taxonomic revision of the andean killifish genus *Orestias* (Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae). *American Museum of Natural History*, 178(2), 112.
- Perez, G. (2005). *Disponibilidad de metales tóxicos en sitios contaminados, aplicaciones y limitaciones de la fraccionación en la determinación de gradientes de polución*. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.
- QOLLASULLO, & CIPP UNA. (2002). *Especies ícticas nativas del lago Titicaca*. Manual Técnico, Puno.
- QOLLASUYO, & CIPP UNA. (2000). *Sinopsis Biológica de Orestias luteus "carachi amarillo"*. Puno.
- Rendell, P. S., & Batley, G. E. (Marzo de 1980). Adsorption as a control of metal concentrations in sediment extracts. *Environment Science Technology*, 14(3), 314-318.
- Roberts, R. J. (1989). *Fish pathology*. London, United Kingdom: Baillière Tindall Editors.
- Segura, M. (2006). Presencia de contaminación por metales pesados en la cuenca del lago Titicaca y su relación con los recursos hidrobiológicos. Puno, Perú.
- Theravin, V. (1944). A revision of the subfamily Orestiinae. *Proceeding of the general meetings for scientific business of the zoological of London*, 114, 140-233.

- Velasco, Y. M., Gómez, W., & Calderón, J. M. (2006). Toxicidad aguda del sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) en alevinos de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) bajo condiciones de aguas blandas. *Revista ORINOQUIA*, 10(1), 64-70.
- Waller, P., & Pickering, W. (1992). Determination of "labile" phosphate in lake sediment using anion exchange resins: a critical evaluation. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 4(2), 59-68.
- Zarei, I., Pourkhabbaz, A., Alipour, H., & Hossein, S. K. (2012). Acute Toxicity and the effects of copper sulphate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) on the behavior of the black fish (*Capoeta fusca*). *Iranian Journal of Toxicology*, 6(19), 771-778.
- Zimdahl, R. L., & Skogerboe, R. K. (1977). Behavior of lead in soil. *Environment Science Technology*, 11(13), 1202-1207.

## **IX. ANEXOS**

## ANEXO 1. GLOSARIO

**ACLIMATACIÓN:** es el proceso por el cual un organismo se adapta fisiológicamente a los cambios en su medio ambiente, que en general tienen relación directa con el clima. Se suele usar este término para referirse a procesos que ocurren durante un período de tiempo corto, como la vida de un organismo individual o grupo.

**AGUA DESIONIZADA:** El agua desionizada es aquella a la cual se le han quitado los cationes, como los de sodio, calcio, hierro, cobre y otros, y aniones como el carbonato, fluoruro, cloruro, etc. mediante un proceso de intercambio iónico. Esto significa que al agua se le han quitado todos los iones excepto el  $H^+$ , o más rigurosamente  $H_3O^+$  y el  $OH^-$ , pero puede contener pequeñas cantidades de impurezas no iónicas como compuestos orgánicos.

**ANOVA:** En estadística, análisis de varianza (ANOVA). El análisis de varianza sirve para comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos. El procedimiento para comparar estos valores está basado en la varianza global observada en los grupos de datos numéricos a comparar.

**BIOENSAYO DEFINITIVO:** prueba diseñada para establecer la concentración a la cual se presenta el efecto final establecido. Los periodos de exposición son mayores que las pruebas preliminares y las de intervalo, se utilizan múltiples concentraciones a estrechos intervalos y múltiples réplicas.

**BIOENSAYOS DE TOXICIDAD:** son bioensayos empleados para reconocer y evaluar los efectos de los contaminantes sobre la biota. En los bioensayos se usa un tejido vivo, organismo, o grupo de organismos, como reactivo para evaluar los efectos de cualquier sustancia fisiológicamente activa. Permiten establecer los límites permitidos para los distintos contaminantes, evaluar el impacto de mezclas sobre las comunidades de los ambientes que las reciben y comparar la sensibilidad de una o más especies a distintos tóxicos o a diferentes condiciones para el mismo tóxico.

**BIOENSAYO PRELIMINAR:** (Screening): prueba para determinarse si se produce un impacto. Estas pruebas se diseñan utilizando una concentración, múltiples replicas y una exposición de 24 a 96 horas.

**CADENA TRÓFICA:** también llamada cadena alimentaria, es la corriente de energía y nutrientes que se establece entre las distintas especies de un ecosistema en relación con su alimentación.

**CARGA BIOLÓGICA:** es el número máximo de organismos prueba que se pueden usar en base a su peso por una cantidad determinada de solución prueba. Esto para minimizar la pérdida de oxígeno disuelto, la acumulación de concentraciones dañinas de productos metabólicos de desecho y/o el estrés inducido por la aglomeración, y cualquier otro que pudiera significar un efecto a los resultados de la prueba. Sin embargo la probabilidad de exceder los límites de carga biológica es reducida con el uso de organismos prueba muy jóvenes.

**CERULOPLASMINA:** Es la principal proteína portadora de cobre en la sangre. Exhibe actividad oxidasa, la cual está asociada con la posible oxidación del  $\text{Fe}^{2+}$  (ion ferroso) en  $\text{Fe}^{3+}$  (ion férrico), por tanto, ayuda en su transporte en el plasma, en asociación con la transferrina, que sólo pueden llevar el hierro en estado férrico.

**CONCENTRACIÓN EFECTO MEDIA ( $\text{CE}_{50}$ ):** concentración del tóxico que puede causar un efecto adverso observable, mediante una respuesta discreta en un porcentaje dado de organismos.

**CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA ( $\text{CL}_{50-96}$ ):** la concentración de una sustancia que es letal para el 50% de los organismos de prueba, tras periodos de exposición a dicha sustancia. Este valor generalmente se usa cuando se hace referencia a la toxicidad de una sustancia para los organismos expuestos a través de una matriz como el agua.

**CONTAMINACIÓN AMBIENTAL:** presencia en el ambiente de cualquier agente (físico, químico o biológico) o bien de una combinación de varios agentes en lugares, formas y concentraciones tales que sean o puedan ser nocivos para la salud, la seguridad o para el bienestar de la población, o que puedan ser perjudiciales para la vida vegetal o animal, o impidan el uso normal de las propiedades y lugares de recreación y goce de los mismos.

**DESTINO AMBIENTAL:** el movimiento, acumulación y desaparición de los compuestos químicos en el ambiente después de su liberación.

**ECOSISTEMAS ACUÁTICOS:** son sistemas termodinámicamente abiertos que reciben del exterior (sol, materia orgánica) y las transmiten a los ecosistemas vecinos a través de los flujos de materias o los movimientos de individuos (migraciones).

**SULFATO DE COBRE:** Se caracteriza por su color azul y sus rápidos cambios de temperatura al agregarle más agua. Su fórmula química es  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Se usa en tratamiento de aguas es usado como alguicida, y tiene numerosas aplicaciones: fabricación de concentrados alimenticios para animales, abonos, pesticidas, mordientes textiles, industria del cuero, pigmentos, baterías eléctricas, recubrimiento galvanizados (recubrimientos de cobre ácido por electroposición), sales de cobre, medicina, preservantes de la madera, procesos de grabado y litografía,

reactivo para la flotación de menas que contienen Zinc, industria del petróleo, caucho sintético, industria del acero, tratamiento del asfalto natural y colorante cerámico.

**METALES PESADOS:** Son aquellos elementos químicos que poseen un peso atómico comprendido entre 63,55 (Cu) y 200,59 (Hg), y que presentan un peso específico superior a 4 (g/cm<sup>3</sup>). En esta categoría entran prácticamente todos los elementos metálicos de interés económico o de interés minero.

**NOAEC:** (Non Observed Adverse Effects Level) es el nivel de exposición experimental que representa el máximo nivel probado al cual no se observan efectos tóxicos o nocivos. Para el propósito de evaluación de riesgos éste es el dato clave que se obtiene de los estudios de Dosis-Respuesta.

**ppm (partes por millón):** una medida de la concentración en la cual la proporción es tal que hay una parte del soluto por un millón de partes del solvente o de matriz.

**PROBIT:** modelo estadístico que analiza las pruebas de toxicidad. El método consiste en la aplicación de correlaciones estadísticas para estimar las consecuencias desfavorables sobre una población a los

fenómenos físicos peligrosos; nos da una relación entre la función de probabilidad y una determinada carga de exposición.

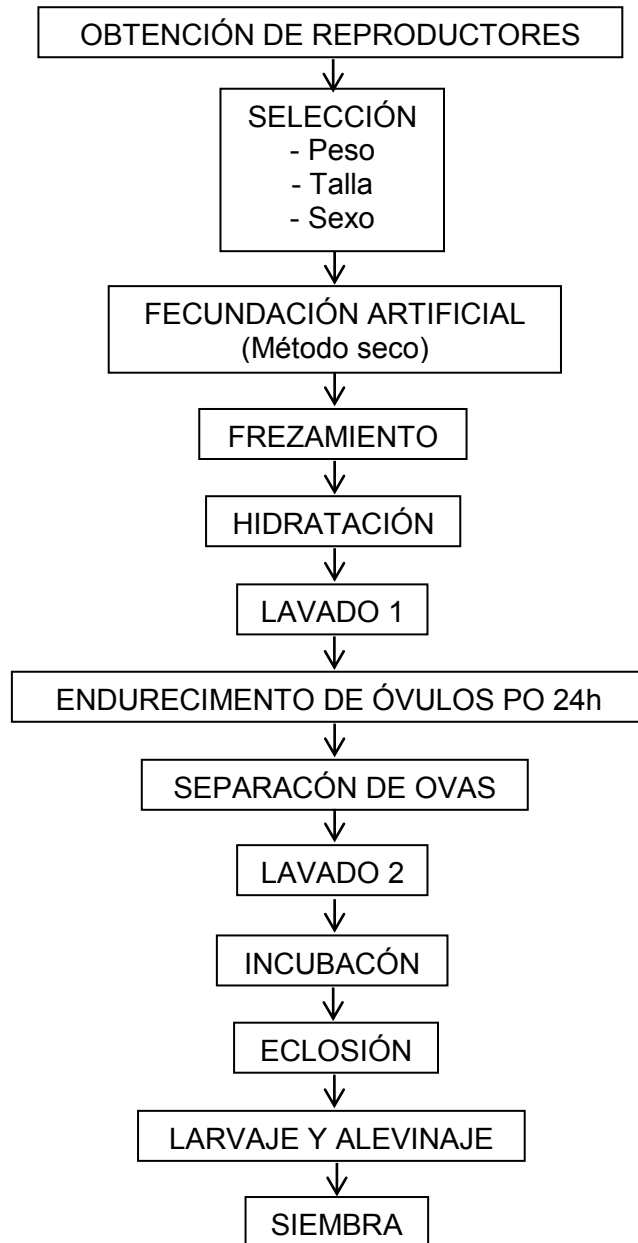
**PRUEBA DE TOXICIDAD:** la determinación del potencial tóxico de una sustancia en particular, bajo condiciones específicas, en un grupo de organismos seleccionados.

**TOXICIDAD AGUDA:** el potencial de un compuesto para causar lesiones o enfermedades cuando se administra en dosis únicas o en dosis múltiples en un periodo corto (por ejemplo, 24 horas). Estos efectos se basan en los mecanismos de la acción química en la cual se pueden apreciar alteraciones fisiológicas poco después de su administración (por ejemplo, la muerte).

**TOXICIDAD CRÓNICA:** la naturaleza de los efectos adversos durante un tiempo prolongado de exposición química. Tales mediciones de los efectos pueden incluir la presentación de un cáncer o el retardo en el crecimiento.

## ANEXO 2. REPRODUCCIÓN ARTIFICIAL DE PECES NATIVOS DE LA CUENCA DEL TITICACA (Flores, 2009)

En el siguiente diagrama de flujo se muestra del proceso de reproducción artificial de peces del género *Orestias* que agrupan a ispi, boga y carachi.



**Diagrama 1.** Diagrama de flujo de reproducción artificial de *Orestias*

### **Obtención de reproductores**

Los reproductores del género *Orestias*, ya sean ispi, boga o carachi, se obtienen mediante pescas directas.



**Figura 1.** Reproductor de *Orestias luteus*

### **Selección y sexado de reproductores**

En la selección y sexado de reproductores, se considera sexo, peso y talla; así como características fenotípicas, seleccionando ejemplares de estadios V y VI.



**Figura 2.** Sexado de reproductores de *Orestias luteus*

El sexado se realiza mediante una pequeña presión a nivel abdominal, determinando la presencia de óvulos viables y esperma.

### **Fecundación artificial**

En la fecundación artificial se extrae los óvulos y esperma mediante presión abdominal usando el método seco, cuando la proporción sexual es 1:1 la adición de esperma se realiza de forma directa, de ser una proporción de 4 hembras para 1 macho, generalmente se sacrifica al macho y se extrae el testículo, molturándolo.



**Figura 3.** Adición de esperma mediante molturación de testículos

### **Frezamiento**

Muy delicadamente se unen óvulos y esperma con la ayuda de una pluma de ave, luego los óvulos una vez fecundados se aglutinan formando un racimo.



**Figura 4.** Unión de óvulos y esperma



**Figura 5.** Óvulos fecundados a manera de racimo

### **Hidratación**

La masa de productos sexuales, se hidratan en una proporción en volumen de Agua: Ovas de 3:1, a temperatura ambiente, durante una hora.



**Figura 6.** Adición de óvulos fecundados en agua

### **Lavado I y endurecimiento de óvulos**

Una vez hidratadas por una hora se lavan los óvulos y se coloca en una bandeja con constante flujo de agua por espacio de 24 horas, para que se endurezcan y poder manipularlos.



**Figura 7.** Flujo de agua constante por 24 horas

### **Separación de ovas**

Como los óvulos se encuentran a manera de racimo, éstas se separan manualmente pero de manera delicada, como desgranar un racimo de uvas, debido a que se encuentran endurecidos no existe peligro de maltratarlos.



**Figura 8.** Separación manual de óvulos

### **Lavado II y Conteo de Huevos**

Con éste segundo lavado se eliminan todo tipo de impurezas que puedan dificultar la incubación de las ovas y luego se realiza el conteo de huevos mediante el método volumétrico o de Burrows.



**Figura 9.** Adición de óvulos escurridos en agua medida



**Figura 10.** Determinación del volumen desplazado

### **Incubación**

En esta fase, las ovas lavadas se colocan en los vasos de incubación tipo Chasse de flujo vertical, con suministro constante de agua, con una capacidad de albergar hasta 25,000 ovas por vaso, en las siguientes condiciones:

- Temperatura: 14,4 °C
- pH: 8,31- 8,34
- Oxígeno disuelto: 7,44 mg/l o ppm
- Dureza: 327 ppm CaCO<sub>3</sub>

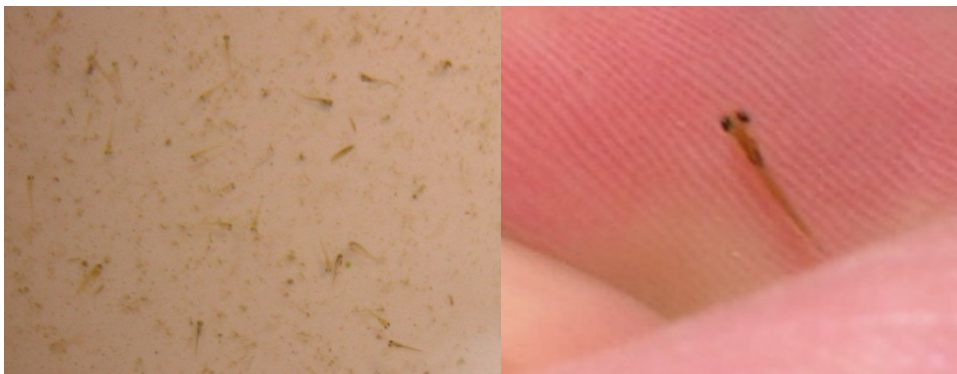


**Figura 11.** Incubación de ovas embrionadas

### **Eclosión, larvaje y alevinaje**

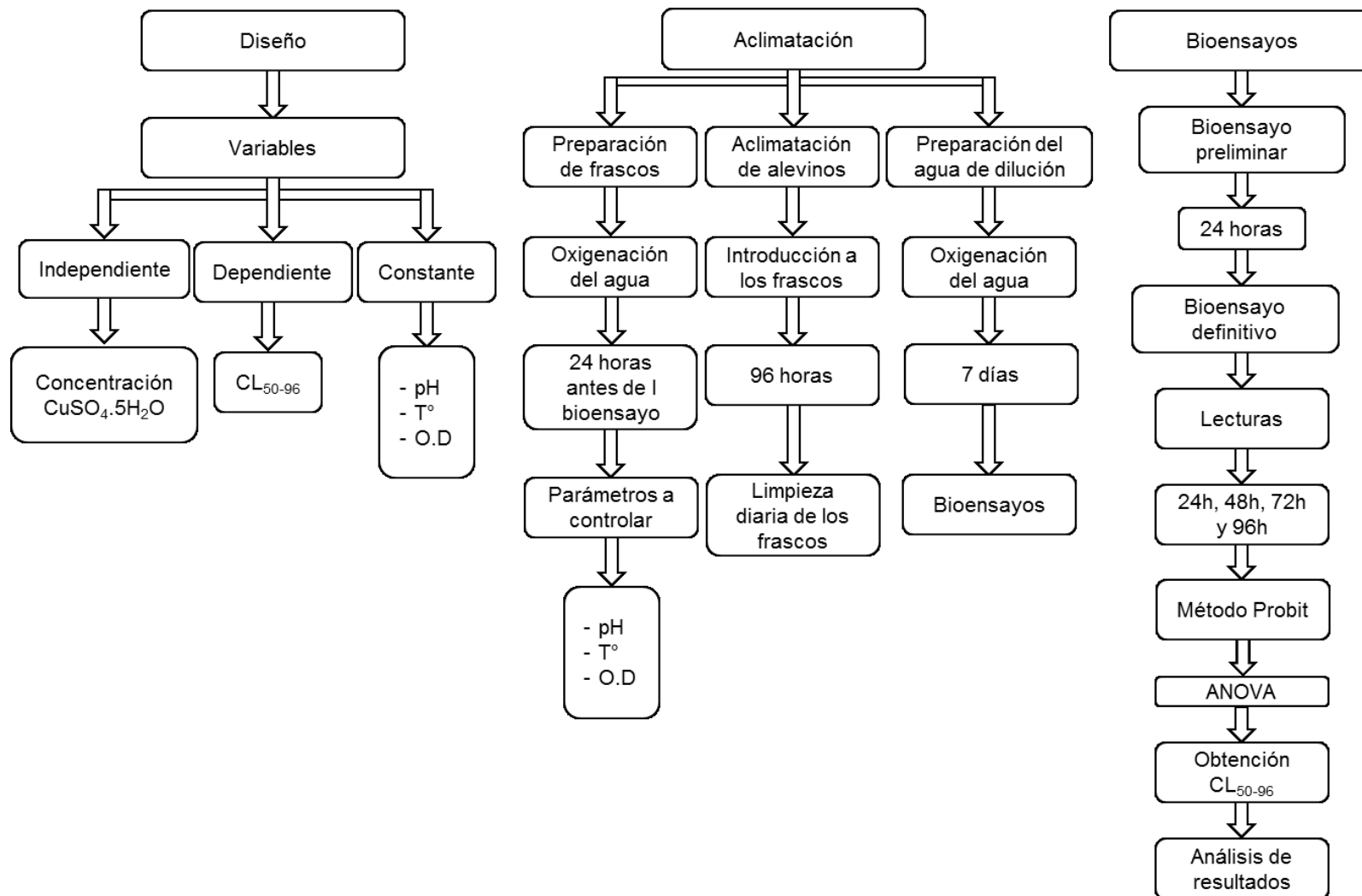
El tiempo de incubación es de 389-432 grados/día, al cabo del cual las ovas eclosionan produciéndose las larvas de *Orestias*, las cuales se trasladan a las artesas de larvaje y alevinaje.

Las larvas reabsorven su saco vitelino a los 53,5 grados/día durante el cual, se alimentan del saco vitelino, cuando aún no ha reabsorbido la última cuarta parte del saco vitelino, se inicia la alimentación con plancton recolectado a orillas del lago.



**Figura 12.** Eclosión, larvaje y alevinaje

### ANEXO 3. METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CL<sub>50-96</sub>



**Diagrama 2.** Metodología para la determinación de la CL<sub>50-96</sub> del Sulfato de cobre mediante bioensayos utilizando alevinos de *Orestias luteus*.



**Figura 13.** Exterior del Laboratorio de Acuicultura



**Figura 14.** Interior 1 del Laboratorio de Acuicultura



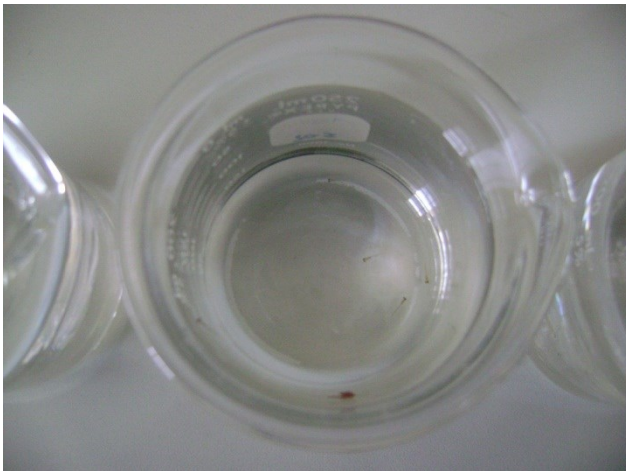
**Figura 15.** Interior 2 del Laboratorio de Acuicultura PELT



**Figura 16.** Aclimatación de alevinos para bioensayo preliminar



**Figura 17.** Bioensayo preliminar



**Figura 18.** Alevinos del bioensayo preliminar



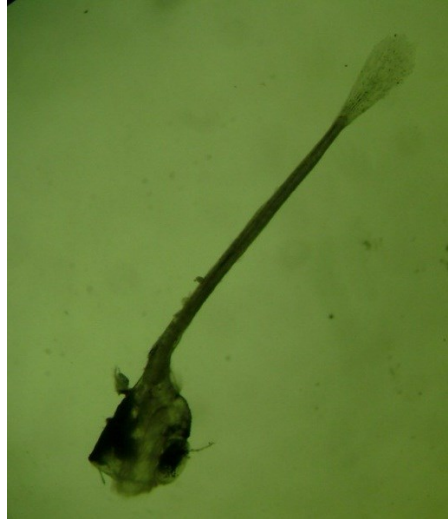
**Figura 19.** Lectura de mortalidad



**Figura 20.** Alevino control



**Figura 21.** Alevino en 100 mg/l  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$



**Figura 22.** Alevino en 1 mg/l CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O



**Figura 23.** Aclimatación de alevinos para bioensayo definitivo



**Figura 24.** Preparación de la solución stock



**Figura 25.** Solución madre 100 mg/l  $\text{CuSO}_4$



**Figura 26.** Introducción de alevinos en frascos para bioensayo



**Figura 27.** Bioensayo definitivo



**Figura 28.** Kit de dureza (izquierda) y alcalinidad (derecha)




**Figura 29.** Determinación de dureza y alcalinidad



**Figura 30.** Muestra en formol al 8% para histopatología

## ANEXO 4. HOJA DE DATOS



### HOJA DE DATOS PARA BIENSAYO DE TOXICIDAD CON $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

**1. PERIODO DE LA PRUEBA**  
 Inicio: Fecha ..... Hora: .....  
 Terminó: Fecha ..... Hora: .....

**4. AGUA UTILIZADA**  
 Dilución: .....  
 Solución: .....

**2. ORGANISMO PRUEBA**  
 Especie: .....  
 Edad: .....  
 Fuente: .....  
 N°/vaseo: .....

**3. VASO CONTENEDOR**  
 Capacidad total: .....  
 Volumen de solución: .....  
 Altura del agua: .....

mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Organismos Muertos (N°)			Oxígeno Disuelto (mg/l)			Temperatura (°C)			pH			Descripción (24 h)
	0	6	8	0	6	8	0	6	8	0	6	8	
100													
1													
0.01													
0.0001													
1E-06													
1E-08													
Control													

**Figura 31.** Hoja de datos del bioensayo preliminar de 24 horas.



## HOJA DE DATOS PARA BIENSAYO DE TOXICIDAD CON $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

### 1. PERIODO DE LA PRUEBA

Inicio: Fecha ...../...../.....  
 Hora: .....  
 Terminó: Fecha ...../...../.....  
 Hora: .....

### 4. AGUA UTILIZADA

Dilución: .....  
 Solución: .....

### 2. ORGANISMO PRUEBA

Especie: .....  
 Edad: .....  
 Fuente: .....  
 N°/vaso: .....

### 3. VASO CONTENEDOR

Capacidad total: .....  
 Volumen de solución: .....  
 Altura del agua: .....

µg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Organismos muertos (N°)			Oxígeno disuelto (mg/l)			Temperatura (°C)			pH			Alcalinidad total (mg/CaCO <sub>3</sub> )	Dureza total (mg/CaCO <sub>3</sub> )	Observaciones (96 h)
	24	48	72	0	24	48	96	0	24	48	96	0			
20															
10															
5															
2.5															
1.25															
0.63															
Control															

Figura 32. Hoja de datos del bioensayo definitivo de 96 horas

## ANEXO 5. EL MÉTODO PROBIT (EPA, 2002)

Para el cálculo de la dosis letal media  $CL_{50-96}$  se usó el método Probit (método paramétrico), bajo el supuesto de:

$$ds = k * d[1_n E]$$

Donde:

$ds$  : Respuesta al estímulo

$k$  : Constante

$d[1_n E]$  : Diferencial del logaritmo neperiano del estímulo

Se consideró como respuesta al estímulo la mortalidad observada, la misma que se asume como directamente proporcional a las dosis de sulfato de cobre (expresado en logaritmos), el modelo se linealiza de la siguiente manera:

$$Y = a + bx$$

Donde:

$Y$  : Probitas esperadas o provisionales

$x$  : Logaritmo de las dosis

$a, b$  : Parámetros estimados

Una vez realizados los cálculos se estimó la dosis letal media para la población en estudio.

## ANEXO 6. PROCEDIMIENTO ESTADÍSTICO

### TRATAMIENTO ESTADÍSTICO PARA LA DETERMINACION DEL EFECTO ADVERSO NO OBSERVADO.

Para el análisis estadístico de los datos, se hizo uso del diseño completo al azar con igual número de repeticiones y la prueba múltiple de Dunnett, para lo cual se hizo uso del programa estadístico SAS versión 9.1.

#### Modelo estadístico lineal.

En este diseño el valor de cada unidad experimental  $Y_{ij}$  se aplica según el siguiente modelo estadístico lineal.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

#### Donde:

$Y_{ij}$  : Unidad experimental que recibe el tratamiento

$i = 1, \dots, t$ ; ( $t =$  tratamientos con dosis diferentes)

$j = 1, \dots, r$ ; ( $r =$  número de repeticiones por tratamiento)

$\mu$  : Efecto verdadero medio.

$\alpha_i$  :Efecto verdadero del  $i$ -ésimo tratamiento.

$\varepsilon_{ij}$  :Efecto verdadero de la  $j$ -ésima unidad experimental (repetición),  
sujeta al  $i$ -ésimo tratamiento (error experimental)

#### Análisis de varianza.

Análisis de varianza de efectos fijos balanceado, método abreviado.

F. de V.	G.L.	S. de C.	C.M.	F <sub>c</sub>	F <sub>t</sub> 0.05
----------	------	----------	------	----------------	------------------------

					<b>0.01</b>
Tratamientos (muestras)	$t - 1$	$\sum_{i=1}^t \frac{Y_{i.}^2}{r} - TC$	$\frac{SC_{Trat}}{GL_{Trat}}$	$\frac{CM_{Trat}}{CM_{ErrExp}}$	
Dentro tratamientos (Error experimental)	$t(r - 1)$	$\sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^r Y_{ij}^2 - \sum_{i=1}^t \frac{Y_{i.}^2}{r}$ $SC_{Tot} - SC_{Trat}$	$\frac{SC_{ErrExp}}{GL_{ErrExp}}$		
Total	$tr - 1$	$\sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^r Y_{ij}^2 - TC$			

Fuente: (ZAR, 2010)

$$TC = \frac{\left[ \sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^r Y_{ij} \right]^2}{tr} = \frac{Y_{..}^2}{tr}$$

$$C.V. = \frac{\sqrt{CM_{EE}}}{\bar{Y}} (100)$$

**Donde:**

F. de V.: Fuente de variación.

G.L.: Grados de libertad.

S. de C.: Suma de cuadrados.

C. M.: Cuadrados medios.

F<sub>c</sub>: F-calculado

F<sub>t</sub>: F-tablas

T: Número de tratamientos

r: Número de repeticiones por tratamiento.

T. C.: Término de corrección o Factor de Corrección.

C.V.: Coeficiente de Variabilidad

P: Probabilidad

## Procedimiento para la prueba estadística de hipótesis.

### La Hipótesis a probarse es:

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_t ; \quad \text{ó } t_i = 0$$

$H_a$  : No todas las  $\mu_i$  son iguales.

### Nivel de Significancia:

$$\alpha = 0.05 \quad \text{y} \quad \alpha = 0.01$$

### Prueba Estadística:

$$F_C = CM_{Trat.} / CM_{EE}$$

### Regla de Decisión:

Utilizando probabilidades:

Si  $p \leq \alpha$ , se rechaza la  $H_0$  y se acepta la  $H_1$ , caso contrario no se rechaza la  $H_0$

## PRUEBA MÚLTIPLE DE DUNNETT

### Procedimiento:

- 1) Encontrar el error estándar de la media:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{2CM_{EE}}{r}}$$

$r$  : Número de repeticiones

$CM_{EE}$  : Cuadrado Medio del Error Experimental

- 2) Encontrar la Amplitud Estudiantizada Significativas de Dunnett:

AES(D)

$$AES(D) = D_{(t-1, GL_{EE}); \alpha}$$

- 3) Determinar la Amplitud Límite de Significación de TUKEY:

Amplitud Límite de Significación de Dunnett: ALS (D)

$$ALS(D) = AES(D)S_{\bar{x}}$$

- 4) Ordenar los promedios de los tratamientos en serie por su magnitud en forma decreciente y realizar las diferencias de medias con el promedio del tratamiento testigo.

## ANEXO 7. MAPA DE UBICACIÓN

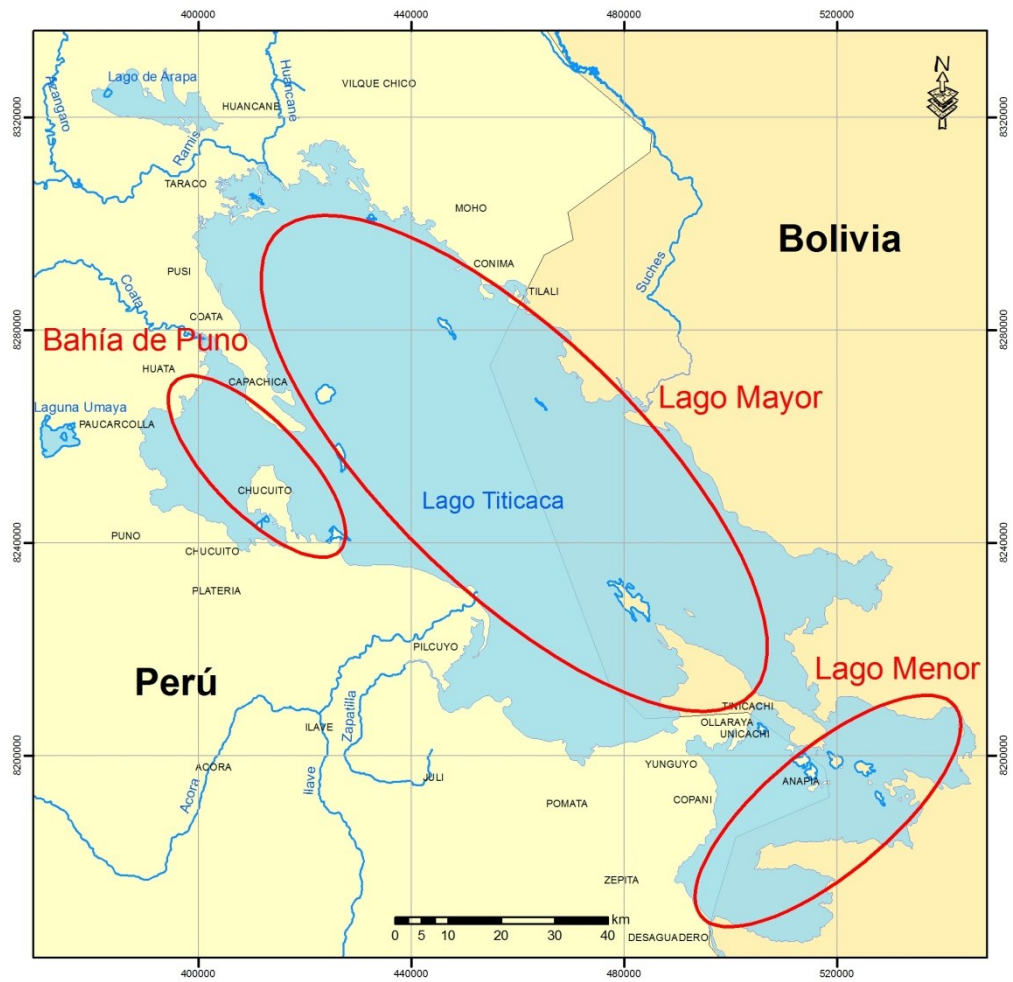
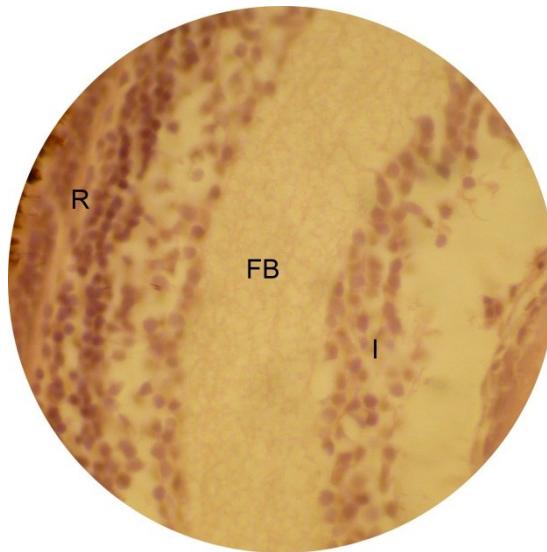


Figura 33. Subdivisiones del Lago Titicaca

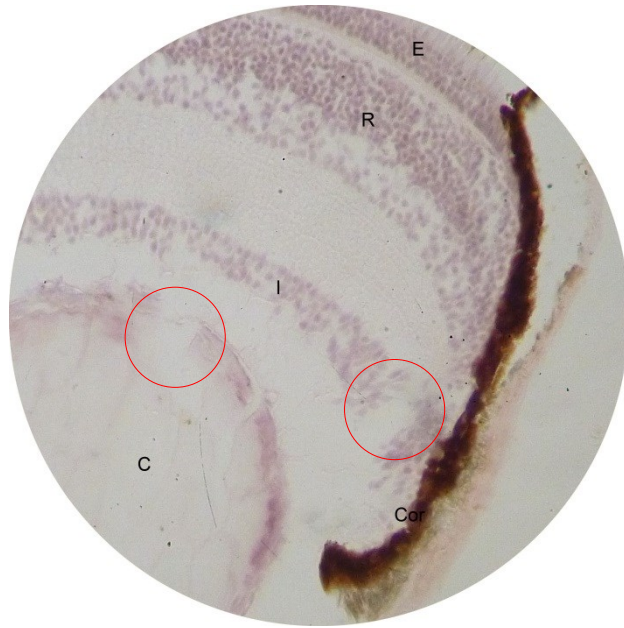
## ANEXO 8. OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS



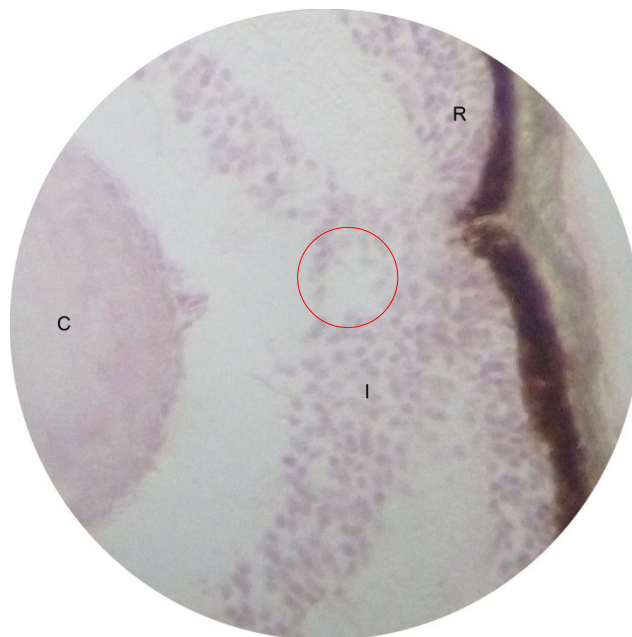
**Figura 34.** Corte longitudinal del ojo del control *Orestias luteus*. Donde se observa la morfología normal de las estructuras oculares C: Cristalino, I: Iris, Cor: Córnea, R: Retina y E: Esclerótica. 400X. Tinción H&E.



**Figura 35.** Corte longitudinal del ojo del control *Orestias luteus*. Donde se observa la morfología normal de las estructuras oculares. I: Iris, FB: Fibras nerviosas y R: Retina. 1000X. Tinción H&E.



**Figura 36.** Corte longitudinal del ojo de *Orestias luteus* del tratamiento con 20 µg/l de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Donde se observa la alteración celular de la estructura del cristalino y el iris. I: Iris, R: Retina, C: Cristalino y E: Esclerótica. 400X. Tinción H&E.



**Figura 37.** Corte longitudinal del ojo de *Orestias luteus* del tratamiento con 10 µg/l de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Donde se observa alteración de la estructura del iris. C: Cristalino, I: Iris, y R: Retina. 400X. Tinción H&E.



---

Bach. William Robert Atencio Mamani

AUTOR



---

Blgo. Víctor Carbajal Zegarra

ASESOR