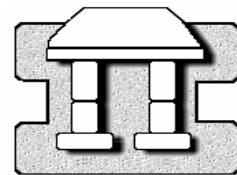




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES Campus IZTACALA**



**“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE CRÍAS DE CARPA
HERBÍVORA (*Ctenopharyngodon idella*) A EXPOSICIONES
AGUDAS Y CRÓNICAS DE SULFATO DE COBRE A 21°C”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIOLOGO PRESENTA:
ALEJANDRO TEODORO VILLAUNUEVA SÁNCHEZ.**

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. MARIO ALFREDO FERNÁNDEZ ARAIZA

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, AGOSTO 2004.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A la memoria de Demetrio Villanueva Ávalos, Dora María Kramsky Ramos, Ricardo Sánchez Espinosa y Daría Trejo Ángeles.

A mi familia, y en especial a las personas que más admiro y amo en este mundo, mis padres, Edmundo Villanueva Kramsky y Cristina Sánchez Trejo.

Papá, gracias por enseñarme el significado de la palabra hombre, por contribuir a la formación de mi carácter, por demostrarme lo que son el trabajo y la responsabilidad, por darme casa y sustento, por haber hecho de mí un hombre seguro de sí mismo, responsable, honesto y trabajador, por enseñarme a diferenciar lo que me conviene de lo que no, por enseñarme a caminar entre el fuego sin quemarme, pero sobre todo, gracias por ser mi amigo.

Mamá, eres el centro de la familia, y la autora de los valores que llevo dentro, gracias por tu apoyo para llegar hasta aquí, por tus detalles y tus atenciones, por tus regaños, por tus lágrimas, por toda una vida de cuidados, por el esfuerzo y dedicación que le has puesto a tu papel como madre, por tu confianza mientras me la tuviste, por los ratos alegres y los amargos, por enseñarme a distinguir lo bueno de lo malo, pero mil gracias por tratar de comprenderme.

A las personas que me han dado un poco de sí:

Edmundo, gracias por haber sido mi papá tantos años y pensar en mí como tal.

Armando, siempre has sido un claro ejemplo de perseverancia e ingenio.

Alfredo, gracias a ti, se que los límites no existen, uno es el que los imagina.

Fernando, trabajo y más trabajo, siempre tomando al toro por los cuernos.

Jorge, es bueno ver la tierra desde el cielo, muy buenos puntos de vista, pero mal carácter.

A todos ustedes gracias, y no por formar parte de mí, sino por dejarme formar parte de ustedes, por compartir conmigo esas dichas y amarguras de las que esta hecha la vida, por dejar acercarme y aprender un poco de cada uno, por darme la oportunidad de apoyarme en sus hombros para levantarme cuando fracaso, pero sobre todo, gracias por ser mi familia, la vida no seria igual sin ustedes, los quiero.



A quien me entregó todo sin pedirme nada:

Por fin llegó el momento, y no de hablar ni de decir,
sino de describir, tal vez suene muy sencillo,
pero te juro que no lo es, es algo así como conocer el tema
y no saber como empezar, es tratar de comentar la suavidad de las rosas
en medio de las rocas, es intentar oler su perfume en medio de la peste,
es como evitar sentir frío en plena tormenta
y es como no sentirse sofocado a mitad del desierto.

¿Verdad que es difícil?

Sí que lo es,

así son ahora los días, poco a poco trato de cambiarlos y de vivirlos,
pero el intento ha sido en vano, el trabajo a sido arduo y un solo día no he bajado la
guardia, pero en cada noche y en cada día estas ahí, siempre ahí,
tal como lo estabas en cada tarde, en cada risa, en cada triunfo y en cada lagrima.

¿Sabes?

Aunque el tiempo ha seguido, hay cosas que uno no olvida,
hay ciertas cosas que uno no puede dejar pasar y menos cuando solo pasan una vez en la
vida, hay cosas que a pesar del tiempo se deben cumplir,
en especial cuando se trata de promesas, porque en cada promesa cumplida se entrega el
corazón,
y para no fallar, te presento una de las tantas promesas que un día te hice.

La promesa ha sido concluida, y a partir de hoy, se entregará cada día y cada noche sin
importar el clima y el sentir,
solo espero que lo entiendas, lo hice por mi pensando en ti,
y lo hice por ti pensando en mi,
solo que hace falta mencionar lo mas importante,
el motor de todo lo que hago,
sigues siendo tú.

Gracias por estar siempre ahí.

Te Amo Marcela.



A la familia Ramón Rocha, por abrirme las puertas de su casa, por su confianza, sus atenciones, su apoyo, su paciencia, su comprensión y su cariño durante casi toda mi carrera, de verdad, se los agradezco con todo el corazón.

A la familia Téllez González, por brindarme su amistad durante tantos años, con mucho cariño para ustedes.

A mis amigos que están muy lejos, Manuel y Luis, gracias por su comprensión, por la paciencia y por su apoyo.

A toda la familia, tíos, primos, sobrinos, agregados y los que gusten.



Acuario Juan Luis Cifuentes Lemus, Facultad de Estudios Superiores Iztacala.



AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, M. en C. Mario Alfredo Fernández Araiza no solo por dirigir el presente trabajo, sino por contribuir a mi formación profesional, por enseñarme que los biólogos somos gente de trabajo, por su paciencia, por creer y confiar en mí, pero sobre todo por darme su amistad.

A mis sinodales, Biól. José del Carmen Benítez Flores, por su asesoría y el apoyo brindado en la parte histológica; al Dr. Sergio Chazado Olvera, por su tiempo y apoyo; a la M. en C. Alba Márquez Espinosa, por sus observaciones y comentarios y al M. en C. José Luis Gama Flores, por la revisión tan detallada que llevó a cabo, así como por sus comentarios y observaciones.

A mis compañeros de laboratorio, Biól. Lucía Alicia Cruz Yáñez y Omar Ángeles López, por ese apoyo moral que nunca faltó y por hacer más ligeras y amenas las horas de trabajo.

Al Centro de Producción Acuícola de Tezontepec de Aldama, Hgo., por facilitarme las crías de carpa.

Al M. en C. Leonardo F. Sasso Yada., por la confianza y el apoyo bibliográfico brindados.

Al Biól. y MVZ. José Alejandro Medina Gándara, por compartir su experiencia conmigo, por el tiempo otorgado y por sus precisas observaciones.

A todos los que me faltaron, muchas gracias.

A todos los cuates de generación, salud.



ÍNDICE

	Página
• Introducción _____	7
• Antecedentes _____	8
• Objetivos _____	9
• Material y Métodos _____	10
• Resultados _____	13
• Discusión _____	22
• Conclusiones _____	28
• Sugerencias _____	28
• Bibliografía _____	29



INTRODUCCIÓN.

La palabra Acuicultura esta relacionada con el cultivo de organismos y hace referencia a las diferentes artes, métodos y técnicas empleadas para el manejo y control de los recursos acuáticos.

El objetivo de la Acuicultura es la producción de organismos en un medio acuático, en condiciones controladas con diferentes fines (alimentación, recreación, conservación, docencia, investigación, etc.) y por tanto incluye todas las actividades de crianza, engorda y reproducción de organismos acuáticos.

La eficiencia en la producción de organismos acuáticos se logra con el adecuado manejo de las condiciones ambientales, la nutrición de los organismos en sus diferentes etapas de desarrollo así como la prevención y el control de enfermedades, cuya aparición se ve favorecida en cualquier sistema de cultivo por la presencia de factores como el estrés, virus, bacterias, hongos, protozoarios, nemátodos entre otros, además de que una enfermedad es difícil de reconocer en sus etapas tempranas (Sticney R., Kohler C., 1990).

En el control y prevención de enfermedades, se han utilizado diferentes sustancias, de ellas, las elaboradas a base de cobre y en particular el sulfato de cobre, son usadas comúnmente por su eficacia contra los protozoarios *Oodinium ocellatum* y *Cryptocaryon irritans*, dos de los más frecuentes parásitos encontrados en peces marinos cautivos; y en cultivos de peces de ornato, para la prevención y combate de enfermedades bacterianas es aplicado desde alevines hasta organismos adultos en concentraciones subletales.

En el uso del sulfato de cobre como agente preventivo o terapéutico se debe considerar que la sensibilidad de los organismos esta en función de factores intrínsecos como la especie, la edad, (Anderson y Spear, 1980., citados en Mcfaraland, 1989), factor de condición (Howarth y Sprague, 1978., citados en Mcfaraland, 1989), y factores ambientales entre los que están la temperatura, importante como controlador de los procesos fisiológicos (Huey *et al.* 1984, citado en Alcaraz *et al.* 1993) y el pH. Cuando se utilizan agentes químicos en sistemas de cultivo, es necesario conocer el nivel de respuesta producido en función de la concentración (Rand y Petrocelli, 1985; Gutiérrez-Galindo, 1989, citados en Espina *et al.* 1996), a través de pruebas de toxicidad de corto plazo ó agudas y de largo plazo ó crónicas.

Las pruebas basadas en el corto plazo proporcionan información acerca de la letalidad en relación a la concentración de los contaminantes; las pruebas basadas en el largo plazo sirven para medir respuestas como la sobrevivencia, el campo de crecimiento, el éxito reproductivo y la concentración tóxica tolerable; concentraciones mayores producen cambios irreversibles de las funciones vitales de un organismo. (Patin, 1982, citado en Espina *et al.* 1996).



Con base a lo anterior, se desarrolló este trabajo para obtener información básica acerca de la toxicidad del sulfato de cobre en crías de carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*), y conocer el efecto que produce en ellas en exposiciones letales y subletales, tanto a nivel fisiológico como anatómico.



ANTECEDENTES

Se han realizado muchos estudios de toxicidad, tanto agudos como crónicos, de metales pesados en una gran variedad de especies acuáticas con el fin de determinar la CL₅₀ y los efectos que estos producen, así:

Dempster en 1955, encontró que una concentración de 0.15 mg/L de sulfato de cobre por 10 días fue efectiva contra *Oodinium ocellatum* y *Cryptocaryon irritans*, dos de los parásitos que frecuentemente se encuentran en peces marinos cautivos (Dempster y Shipman, 1969, citado en Keith, 1981).

Nigrelli y Ruggieri en 1966 usaron una solución de ácido cítrico y CuSO₄ de 0.15 a 0.20 mg/L por 15 días.

Wilkie y Gordon en 1969 utilizaron CuSO₄ en concentraciones de 0.30 a 0.40 mg/L también para tratar peces marinos contra estos parásitos (Keith, 1981).

En relación a la influencia de la temperatura en la toxicidad de un compuesto, T. Burton, L. Morgan y Cairns Jr., en 1972, encontraron que en crías de *Lepomis macrochirus Rafinesques* la CL₅₀, estaba en relación inversa con la temperatura mientras que J. Phillips en 1976, encontró que la mortalidad en ostión expuesto a 10°C y 18°C, ocurría en menor tiempo a las temperaturas más altas, expuestos a dosis letales y subletales de zinc, cadmio, plomo y cobre.

Keith 1981, evaluó la estabilidad de varios compuestos de cobre en acuarios marinos cerrados, determinando que la presencia de los filtrantes de coral, carbón activado y grava sílica, reducían la eficiencia terapéutica de una combinación de CuSO₄ + citrato, y CuSO₄.

A. Williams y R. Wootenhan en 1981, realizaron estudios del (CuSO₄) y formalina en trucha arco-iris observándose daños en hígado, debido a que los tratamientos inducen cambios térmicos en la estructura hepática y por ende en su función, además observaron que los niveles de glucosa en sangre eran altamente significativos después de 24 hrs. de exposición al tóxico.



G. Vont, E. Qunitio, en 1994, observaron que en *Penaeus monodon*, expuestos por 10 días a 1 mg/L hubo una acumulación de gránulos de cobre en los túbulos del hepatopáncreas acortando la vida de las células de este.

En un estudio realizado en 1995 se evaluó el efecto del Cobre en el camarón *Penaeus japonicus*, obteniendo LC_{50} a 48 hrs. en larvas nauplio y zoea y a las 96 hrs. en post-larvas y juveniles. Se determinó también el efecto de concentraciones subletales y su efecto en la capacidad osmorregulatoria. Se manejaron concentraciones de 500, 1000 y 1500 mg Cu/l, observándose que la capacidad osmorregulatoria se vio significativamente reducida después de cuatro días de exposición al químico a las concentraciones mencionadas. También se observó que la capacidad de respuesta de los camarones es variable, dependiendo del estadio y la concentración manejada.



OBJETIVOS

GENERAL:

- Determinar el efecto del CuSO_4 en respuestas funcionales y anatómicas de crías de carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) en exposiciones agudas y crónicas.

PARTICULARES:

- Determinar la Concentración letal media a 96 horas (CL_{50} –96hrs.) del sulfato de cobre en crías de *C. idella* a 21°C
- Evaluar el efecto de dosis subletales de CuSO_4 en la tasa de asimilación y de excreción, así como el daño branquial.



MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron crías de *Ctenopharyngodon idella* (carpa herbívora) con una longitud aproximada de 2.5 a 3.5 cms., provenientes del Centro de Producción Acuícola de Tezontepec de Aldama, Hgo. Los organismos se aclimataron colocándolos en acuarios de 100 L, con aireación permanente, y temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$. Los peces se alimentaron con alimento balanceado comercial *at libitum* y alimento vivo; el fotoperiodo se fijó en 12 hrs. luz y 12 hrs. oscuridad. La fase de mantenimiento de los peces en estas condiciones ambientales duró aproximadamente 21 días.

Después de la fase de aclimatación, las carpas se mantuvieron a la misma temperatura, durante 10 días más para posteriormente determinar:

EXPOSICIÓN AGUDA

-Concentración letal media, $CL_{50-96 \text{ hrs}}$, del CuSO_4 (mg /l.)

Las pruebas de toxicidad fueron de tipo estático sin recambio (Sprague, 1990), con peces de etapa cría, provenientes de la temperatura de aclimatación. Los peces se mantuvieron en inanición 24 hrs. previas a la experimentación y durante la misma; se utilizaron 15 acuarios con capacidad de 20 l. en los que se colocaron 10 ejemplares en cada uno, dónde permanecieron 12 hrs. antes de poner el contaminante. Con lo que el diseño quedó en cinco grupos (concentraciones) de 3 acuarios cada uno (réplicas). En cada uno de los grupos, se utilizó una concentración de sulfato de cobre diferente (0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) preparadas en agua destilada. **Figura 1.** La mortalidad se registró a las 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 y 96 (horas), para observar el daño los peces muertos se retiraron con una pinza de material inerte y se preservaron en fijador Bouin para su posterior observación, el cual contiene 750 ml. de solución acuosa saturada de ácido pícrico, 250 ml. de formol (40%) y 50 ml. de ácido glacial. Como criterio de muerte se adoptó la falta de movilidad de los animales a estímulos mecánicos suaves (Sprague, 1990).

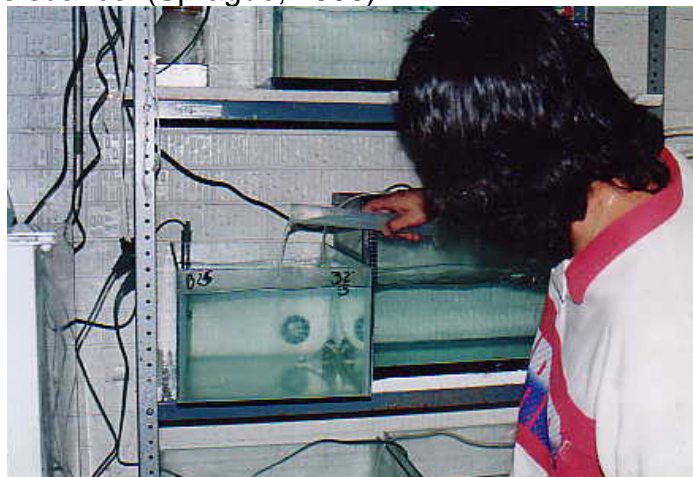


Figura 1. Agregando la solución del tóxico a los grupos experimentales.



Al finalizar los experimentos se sacrificaron los peces sobrevivientes, y se fijaron en Bouan para posteriormente realizar cortes histológicos de branquias.

El valor de los parámetros de toxicidad $CL_{50} \pm S_x$ se determinó utilizando el programa de computo PROBIT (Ramírez, 1989). El análisis PROBIT consiste de métodos estadísticos para analizar datos de experimentos de concentración-respuesta, y proporciona una estimación de la CL_{50} y la precisión de esta estimación. En el análisis PROBIT los porcentajes de organismos afectados son convertidos a Probits (unidades de probabilidad), y las concentraciones son transformadas a logaritmos. La relación entre Probits y los valores logarítmicos de las concentraciones es aproximadamente lineal (USEPA, 1985, citado en Castañeda, 2000).

-Toxicidad crónica del sulfato de cobre.

Un lote nuevo de organismos con las mismas características se expuso por 21 días a una concentración subletal de $0.15 \text{ mg Cu}^{2+} / \text{l}$. Se utilizaron 6 acuarios de 20 l. equipados con termostatos para mantener una temperatura de 21°C , con aireación suave y constante y fotoperiodo de 12 hrs. luz. En total se ocuparon seis acuarios y en cada uno de ellos se colocaron 10 organismos y se dividieron en dos grupos, experimental y control, cada grupo por triplicado (réplicas). Diariamente se efectuó un recambio total del agua, manteniéndose las condiciones experimentales y evaluándose los siguientes parámetros:

RESPUESTAS FISIOLÓGICAS

-Tasa de Ingestión (I) y de producción de heces (H)

A cada acuario se suministró diariamente 0.625 grs. de alimento (equivalente al 10% de la biomasa total de organismos). El periodo de alimentación duró 15 minutos y luego se retiró el alimento sobrante con el empleo de un sifón que en su extremo tuvo una malla de plancton de $500 \mu\text{m}$ previamente pesada. Las redes con el alimento se deshidrataron a temperatura ambiente con el fin de conocer su peso seco (PS).

La tasa de ingestión (I) se calculó por diferencia entre el peso seco del alimento suministrado y el del alimento remanente en los acuarios y se expresó en $\text{mg día}^{-1}\text{g}^{-1}$ PS corporal, corregido por la dilución del alimento de los acuarios testigos.



Después de 24 hrs. de haber retirado el alimento sobrante se recolectaron las heces producidas y se sometieron al mismo tratamiento que el alimento y se determinó la tasa de producción de heces (H).

Se determinó el valor calórico del alimento y de las heces a través de un galvanómetro con bomba calorimétrica GALLENKAMP, mod. CBB-330-010L, expresando la tasa de ingestión y la producción de heces en peso seco en $\text{mg día}^{-1} \text{g}^{-1}$ PS corporal y en $\text{joules día}^{-1} \text{g}^{-1}$ PS, posteriormente se estimó su equivalencia en kilocalorías.

-Tasa de asimilación (A) y eficiencia de asimilación (U') del alimento ingerido.

La tasa de asimilación (A) del alimento ingerido se calculó como el producto de los valores de la tasa de ingestión (I) y la eficiencia de asimilación (U') y se expresó en $\text{mg/org}^{-1} \text{ día}^{-1}$.

-Eficiencia de asimilación.

La eficiencia de asimilación del alimento se calculó de acuerdo al modelo de Conover (Conover, 1966).

$$U', \% = (I' - H') / (I - H) I'$$

RESPUESTAS ANATÓMICAS

-Daño branquial

Para evaluar el efecto tóxico se extrajeron las branquias y se procesaron para su estudio histológico convencional de inclusión en parafina y tinción de Hematoxilina y Eosina (HE).

Las branquias de cada organismo se observaron al microscopio estereoscópico para identificar probables anomalías, se buscaron parásitos, cambios degenerativos y/o necróticos, hemorragias, etc.



RESULTADOS

-Fase de exposición Aguda.

En la figura 2 se presenta el porcentaje de mortalidad registrado a 21°C en los distintos intervalos de tiempo hasta las 96 hrs. en las diferentes concentraciones utilizadas (control, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/l), en todas ellas se observó una mortalidad de casi el 100%, variando únicamente en el tiempo de exposición.

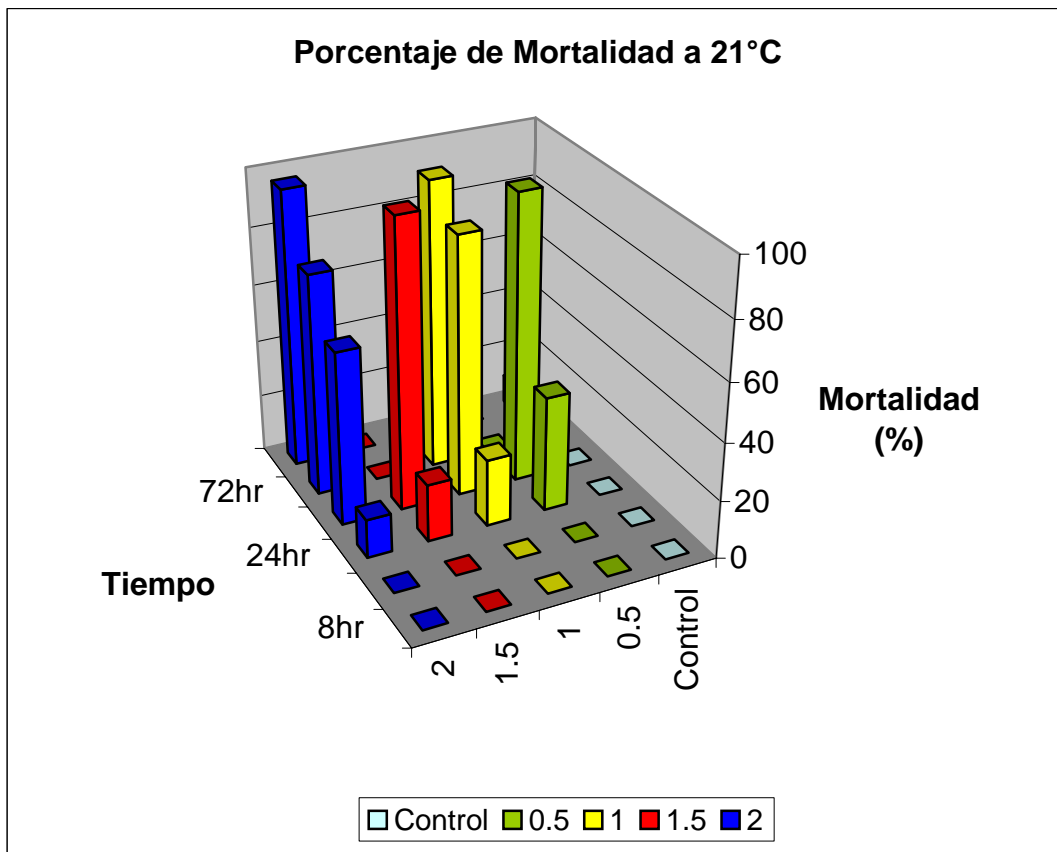


Figura 2. Porcentaje de Mortalidad a 21°C.

La concentración letal media de CuSO_4 a 96 hrs. (**CL50-96hrs.**) a 21°C, en crías de carpa herbívora (*C. idella*) fue de **0.67 mg/l**.



-Fase de exposición Crónica.

La fase de exposición crónica se llevó a cabo con dos grupos de organismos los cuales se encontraron en las mismas condiciones experimentales de los grupos de la fase aguda. Se seleccionaron también de manera aleatoria y se agregó la solución previamente preparada del tóxico. Cabe mencionar que a partir de las dos horas posteriores a la adición del tóxico comenzó a registrarse mortalidad en los organismos, por lo que el experimento se repitió tres veces en total. La mortalidad de los organismos varió únicamente en cuanto al intervalo de tiempo, que fue cada vez mayor. La mortalidad del total de organismos se presentó a los 14 días, tiempo en que se dio por terminada la etapa experimental, planeada originalmente para 21 días.

Es importante mencionar que al momento de hacer la necropsia de los organismos para hacer las pruebas, se detectó en un pez la presencia de un parásito del género *Bothriocephalus* y se procedió a hacer el análisis histopatológico del organismo.

En la tabla 1 se presentan los resultados promedio de las respuestas fisiológicas (tasa de ingestión, heces producidas, kilocalorías alimento, kilocalorías heces, tasa de asimilación y eficiencia de asimilación) de las crías de *C. idella*.

TABLA 1 RESPUESTAS FISIOLÓGICAS.

	Tasa ingestión mg/org.día	Producción de heces/org.mg.día	Densidad calórica del alimento kcalorías	Densidad calórica de heces kcalorías	Tasa de asimilación mg/org.día	Eficiencia de asimilación (%)
Experimental	20.0695	10.827	1.9465	1.1055	9.242119	46
Control	21.556	4.699	1.9465	0.9476	16.857727	78
Diferencia %	8.9	230	----	16.6	54.82	58.97

TABLA 1. Respuestas fisiológicas de *C. idella* a 21°C expuestos a dosis subletales de CuSO₄.

En cuanto a la tasa de ingestión de los organismos se encontró que en el grupo experimental fue de 20.0695 mg/org, mientras que el grupo control consumió 21.556 mg/org, presentándose una diferencia entre ellos de 0.139 mg/org únicamente. En cuanto a la producción de heces, la del grupo experimental fue mayor, registrando 10.827 mg/org y el grupo control solo 4.699 mg/org, es decir, más del doble.

La densidad calórica del alimento es de 1.9465 kilocalorías/gr. Por su parte, la pérdida de energía por excreción, en el grupo experimental presentó el valor



más alto y fue de 1.1055 kilocalorías, y en el grupo control fue de 0.9476 kilocalorías, lo que representa el 16.66% más de pérdida de energía.

La tasa de asimilación en el grupo experimental fue de $9.2421 \text{ mg/org}^{-1} \text{ día}^{-1}$, mientras que en el control fue de $16.8577 \text{ mg/org}^{-1} \text{ día}^{-1}$, en cuanto a la asimilación se encontró que en el grupo experimental fue del 46% mientras que en el control fue del 78%, diferencia muy significativa.

-Daño Histológico

Las preparaciones de los cortes histológicos de las branquias, se analizaron en microscopio estereoscópico (en fresco), y posteriormente en el microscopio óptico, se determinó el daño histológico, observándose lo siguiente:

Grupos Experimentales.

Hiperplasia severa difusa de las células epiteliales y/o del cloro (a), melanosis difusa (b), (respuesta del tejido a la estimulación nociva), atrofia lamelar (c).
Figura 3.

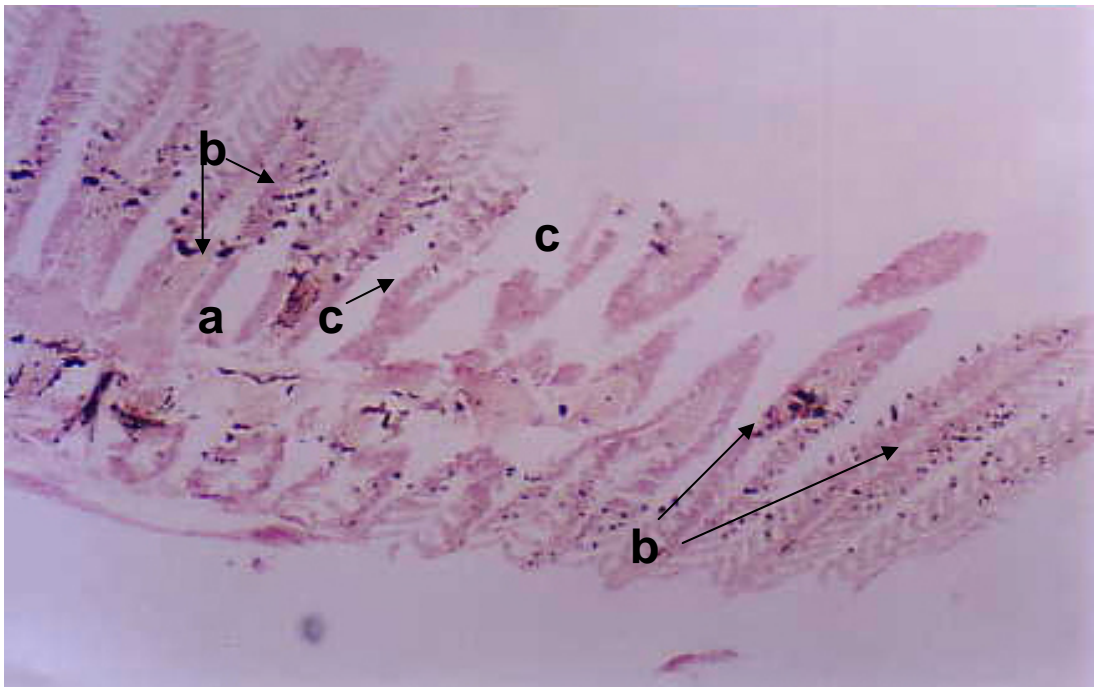


Figura 3. Corte histológico de branquia, grupo experimental. Técnica de H-E. Imagen a 80 X.



Melanosis difusa (a), hiperplasia de las células epiteliales y/o del cloro (b) y atrofia lamelar severas (c). **Figuras 4 y 4''**.

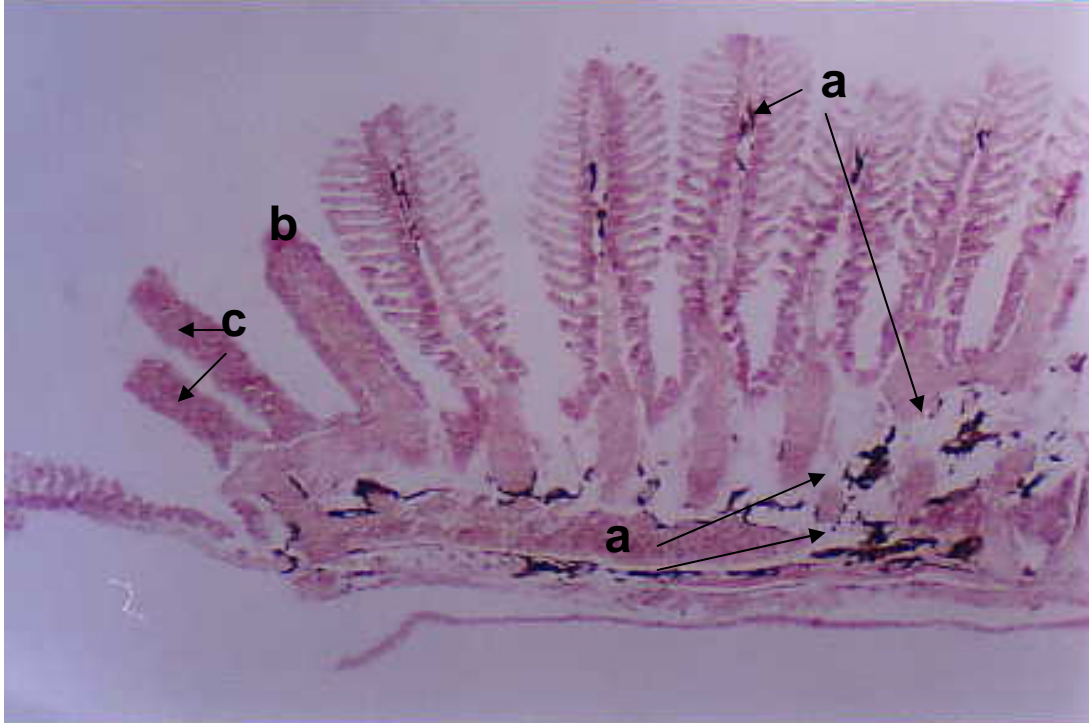


Figura 4. Corte histológico de branquia presentando atrofia lamelar severa y melanosis difusa. Técnica de H-E. Imagen a 80 X.



Figura 4''. Detalle de corte histológico de branquia, presentando atrofia lamelar severa (a), hiperplasia de células epiteliales y/o del cloro (b) y melanosis difusa (c). Técnica de H-E. Imagen a 200 X.



Branquia totalmente necrosada. **Figura 5.**



Figura 5. Corte de branquia con necrosis total de filamentos y lamelas Técnica de H-E. .
Imagen a 80 X.

Necrosis lamelar y de los filamentos branquiales (a), melanosis difusa (b) y se observa un quiste parasitario (c). **Figura 6.**

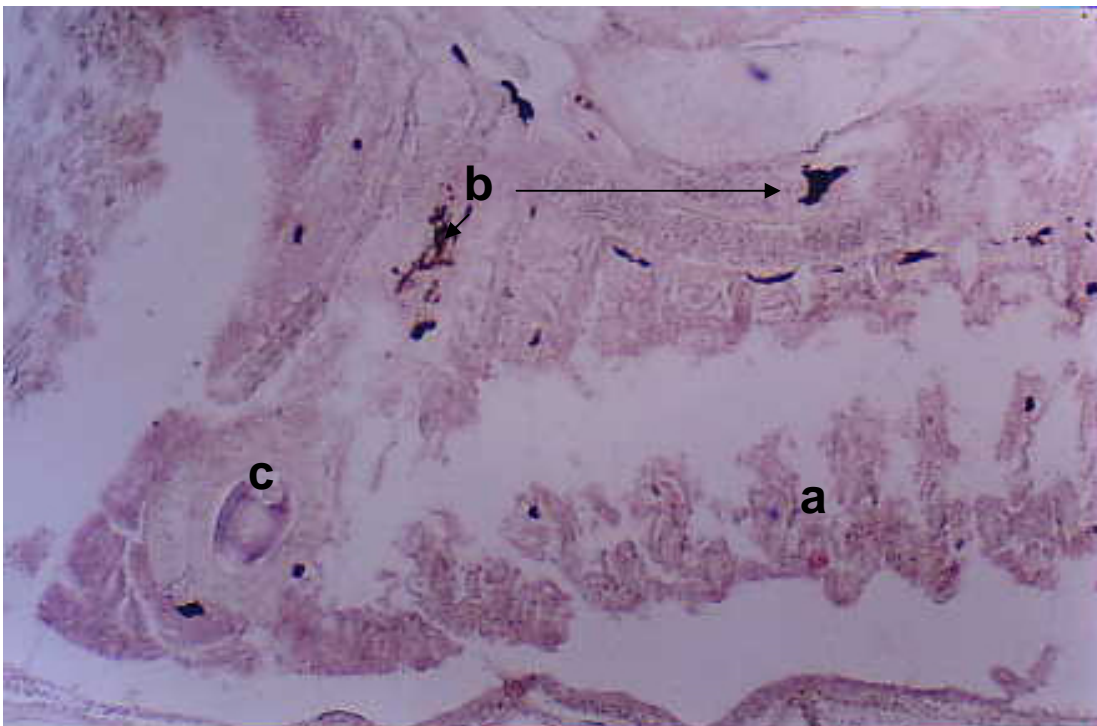


Figura 6. Corte histológico de branquia en el que se observa un quiste parasitario. Técnica de H-E.
Imagen a 80 X.



Detalle de quiste parasitario (a), presumiblemente de *Gyrodactylus* o *Dactylogyrus*, cartílago (b). **Figura 7.**



Figura 7. Corte histológico de branquia en el que se observa la presencia de un quiste parasitario. Técnica de H-E. Imagen a 200 X.

Diagnosis de los grupos *Dactylogyrus* y *Gyrodactylus*:

Dactylogyrus

Los miembros del género presentan una longitud aproximada de un mm, cuatro manchas oculares en extremo anterior, opistohaptor con un par de anclas unidas por barras, 16 ganchos marginales (este género posee numerosas especies y esta ampliamente distribuido). A diferencia de *Gyrodactylus* que vive exclusivamente sobre las agallas, las cuales se vuelven pálidas o se cubren de manchas blancas con abundante exudado mucoso, la *Dactylogyrosis* se diagnostica revisando al microscopio las agallas de los peces que presentan la sintomatología, diferenciándose por poseer manchas oculares, huevos dentro del útero y 16 ganchos marginales.

Gyrodactylus

Los organismos de este género suelen presentar opistohaptor con un par de anclas y 16 ganchos marginales. Son vivíparos. (Este género posee numerosas especies y esta ampliamente distribuido.) Provoca deshilachamiento de las aletas, irritación en las zonas de adherencia en la cabeza y forma ámpulas en las barbelas. En las crías causa daños más severos, como son emaciación y muerte, estos síntomas y la observación microscópica de los gusanos sin manchas oculares conteniendo el embrión son útiles para diagnosticar la enfermedad. La *Gyrodactylosis* se previene utilizando agua libre de parásitos y revisando



cuidadosamente las crías o adultos provenientes de otras piscifactorías antes de introducirlas a los estanques. Su periodo de incubación es de aproximadamente 60 horas. La especie de importancia en América es *G. ictaluri*, ya que parasita al bagre en el sureste de los Estados Unidos.

Hiperplasia severa difusa de las células epiteliales y/o del cloro (a) y atrofia del filamento branquial (b). **Figura 8.**

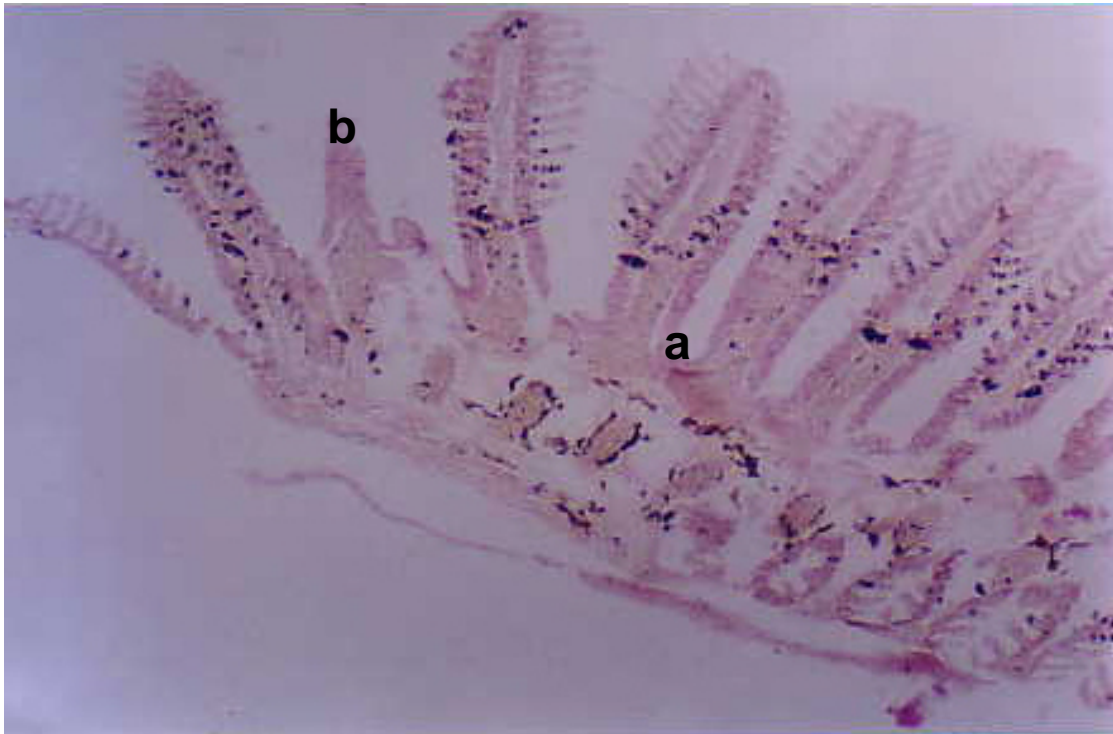


Figura 8. Corte histológico de branquia, en el que se observa hiperplasia severa difusa y atrofia del filamento branquial. Técnica de H-E. Imagen a 80 X.

Con base en los daños observados en las preparaciones de las branquias, se puede afirmar que el CuSO_4 empleado a concentraciones subletales por periodos prolongados en crías de carpa herbívora afecta el sistema respiratorio, presentándose de manera general los siguientes daños:

- Necrosis.
- Melanosis difusa.
- Hiperplasia de células epiteliales y/o del cloro.
- Atrofia lamelar.
- Atrofia del filamento branquial.

A continuación se enuncia una breve descripción de los daños presentados de manera homogénea dentro de los cortes antes descritos:



-HIPERPLASIA

Aumento en el espesor debido a un crecimiento de células, aunque este tipo de reacción histopatológica puede agravar otros síntomas debidos a la absorción de los productos por el epitelio branquial.

-MELANOSIS.

Pigmento endógeno no derivado de la hemoglobina, de color pardo negruzco, producido por melanocitos y que aparece como consecuencia de un proceso patológico.

-NECROSIS.

Es un evento celular o tisular de desintegración biológico irreversible, que ocurre cuando se sobrepasa la capacidad de respuesta celular.

Por otro lado y con el fin de comparar los cortes de las estructuras branquiales, se hace la comparativa con las siguientes imágenes de tejido branquial sano, obtenidas del Atlas de Histología de Vertebrados, UNAM, 2002. **Figuras 9, 10 y 11.**



Fig. VI.1
Branquias del pez *Brachydanio rerio* (pez cebra). Filamentos branquiales (F) formados por prolongaciones perpendiculares del arco branquial (A). En la base de las branquias se observan tejido conjuntivo laxo (c), vaso sanguíneo arterial (v), tiroides (t) y haces de músculo estriado (m). H-E 32X

Figura 9



Fig. VI.2
Filamentos
branquiales (F) del pez
Brachydanio rerio (pez
cebra). Se observa la
zona de inserción de
los filamentos
branquiales (l), en su
base se relacionan
con músculo estriado
(m).
H-E 78X



Figura 10.

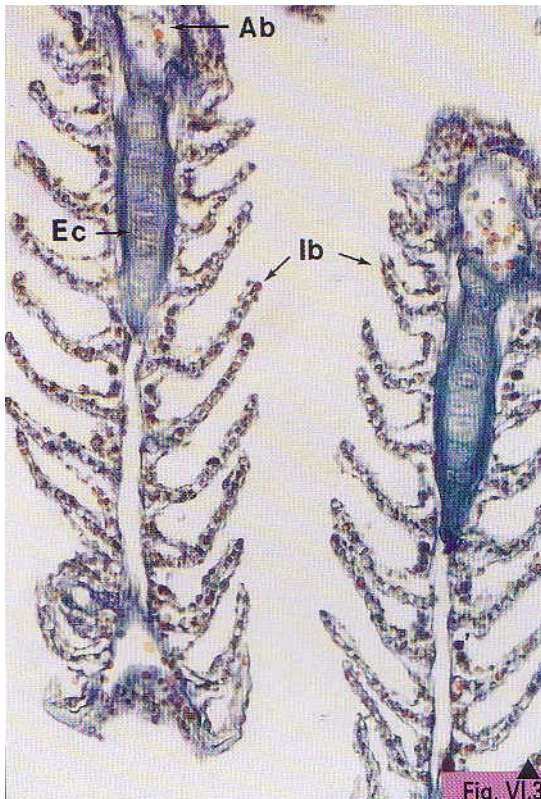


Fig. VI.3
Filamentos
branquiales del pez
Brachydanio rerio (pez
cebra). Se distinguen
diversas estructuras
como ejes
cartilagosos (Ec),
laminillas branquiales
(lb), comunicación de
las arterias
branquiales (Ab)
aferente y eferente en
el extremo distal del
filamento branquial.
Mallory 200X

Figura 11



DISCUSIÓN

- Fase de exposición aguda.

Durante la exposición aguda al sulfato de cobre, el porcentaje de mortalidad en la concentración de 0.5 mg/l fue del 40% a las 24 hrs., alcanzando el 100% a las 48 hrs. La concentración de 1 mg/l presentó 23% de mortalidad a las 24 hrs., 67% a las 48 hrs. y alcanzó el 100% a las 72 hrs. La concentración de 1.5 mg/l tuvo el 20% de mortalidad después de 24 hrs., registrando el 100% a las 48 hrs. y la concentración de 2 mg/l comenzó a las 24 hrs. presentando un 13%, a las 48 hrs. un 60%, a las 72 hrs. 76% y por último a las 96 hrs. 96%. Así mismo el grupo control registró una mortalidad del 6% a las 72 hrs. y 10% a las 96 hrs. Sin embargo estos resultados no tuvieron el comportamiento esperado de una mortalidad proporcional a la concentración. Esto se debe a que los organismos responden de diferente manera ante cualquier estímulo y a que existe en ellos un límite de tolerancia. Como se observa los porcentajes de mortalidad en las diferentes concentraciones varió de acuerdo a los intervalos de tiempo durante el periodo de exposición. Estas diferencias pueden ser debidas al estrés al que fueron sometidos los organismos durante su manejo.

En un estudio realizado por Vázquez 2003, en el cual se determinó el estrés producido por un tratamiento terapéutico con sulfato de cobre en *Carassius auratus*, se observó que en uno de los grupos experimentales fue mayor el tiempo de muerte de los peces al incrementarse las concentraciones de cobre. Actualmente se sabe que la temperatura es un importante controlador de los procesos fisiológicos y por lo tanto influye la sensibilidad de los organismos acuáticos a los contaminantes, (Huey *et al.* 1984, citado en Alcaraz *et al* 1993), sin embargo, los datos permitieron tener una base para utilizar una concentración subletal CL1 (concentración letal 1) en 0.125 mg/l en la siguiente etapa. Cabe mencionar que la CL1 se encuentra por debajo de los rangos propuestos por Nigrelli y Ruggieri (1966) quienes usaron una solución de ácido cítrico y CuSO_4 de 0.15 a 0.20 mg/l por 15 días y Wilkie y Gordon (1969) que utilizaron CuSO_4 de 0.30 a 0.40 mg/l también por 15 días (Keith, 1981).

La manera en la que se registró la mortalidad en cierto aspecto concuerda con (Alcaraz y Espina, 1993, 1995), quienes trabajaron con carpa herbívora a diferentes concentraciones y en uno de los grupos experimentales la muerte de los organismos se presentó en un tiempo mayor. De acuerdo con estos autores, la temperatura es un factor determinante en la respuesta de un organismo a un tóxico y cuando los organismos se encuentran en rango de temperatura óptimo, se presenta un efecto protector contra la mortalidad, reduciendo el efecto del contaminante, de esta manera se explica porque los organismos respondieron de manera similar en las diferentes concentraciones debido a que la temperatura de 21°C en la que se mantuvieron los organismos, se considera la óptima para esta



especie, presentándose así una mortalidad simultanea en los diferentes grupos. Pudiera ser que una mayor temperatura el efecto del tóxico en las diferentes concentraciones hubiese sido proporcional a esta.

-Fase de exposición crónica.

Respuesta fisiológica.

Se puede observar claramente que la respuesta del grupo experimental corresponde a organismos alterados fisiológicamente, ya que comparado con el grupo control presentó, una ingesta menor (6.9%), una pérdida energética por excreción mas alta (16.6%) y el porcentaje de asimilación fue del 46% mientras que en el control fue del 78%.

Por lo que se infiere que en el grupo experimental se mostró un efecto directo a la exposición al tóxico en la respuesta fisiológica de los organismos, ya que la vía de entrada más importante está constituida por las branquias, la absorción es directa, por difusión simple a través de las finas estructuras epiteliales, se considera que en los peces aproximadamente la mitad de la superficie de la interfase (medio interno - medio externo) está constituida principalmente por el fino epitelio de las branquias, muy independientemente de posibles errores sistemáticos existentes.

El efecto del cobre fue directo sobre los organismos ya que una vez vertido en el agua siempre se mantuvo en suspensión y no se sedimentó en ningún momento, además de que todos los sistemas carecían de materiales filtrantes, para así evitar la pérdida del cobre por filtración, ya que el porcentaje de pérdida de cobre es proporcional a la masa de filtrante presente. Además, la precipitación no es un mecanismo de pérdida de cobre significativo. (Keith, 1981).

-Daño Histológico

Todos los daños observados en la estructura branquial son una consecuencia de la exposición al tóxico, ya que cualquier tipo de contaminación en el agua afecta a la población de peces. Algunas sustancias producen hipoxia, ya sea por la reducción de la concentración del oxígeno disuelto en el agua o **por la modificación de las branquias** disminuyendo así la velocidad de transferencia del oxígeno, o bien afectan el metabolismo de este elemento.

Se sabe que bajos niveles de O₂ disuelto estimulan la respuesta respiratoria de los peces e indirectamente la toxicidad de los contaminantes, puesto que en tales circunstancias son captados del medio con mayor eficiencia. En tal caso las



condiciones de hipoxia en los tejidos, aunado a las altas concentraciones del tóxico en el interior del animal serian las causas de la muerte y no la concentración del contaminante. (Espina, *et al.* 1996). En el caso particular de este trabajo, se tiene plena certeza de que la principal causa de muerte de los organismos fue la exposición al tóxico, debido a que el nivel de oxígeno se mantuvo constante durante todo el periodo en el que se desarrollo el trabajo, evitando así posibles errores debidos a mortalidad por hipoxia, pero es posible que el efecto del tóxico haya producido una alteración branquial en los organismos y de esta manera presentarse hipoxia, pero claramente provocada por la exposición al tóxico.

Los tóxicos pueden afectar el metabolismo en muy distintas formas, por ejemplo, la modificación del nivel de una enzima, **la permeabilidad de una membrana** o alteran algún organelo celular. Estos cambios pueden afectar la integridad celular o la eficiencia energética de la célula. Si los cambios son lo suficientemente severos, pueden provocar la muerte de un número considerable de células en un órgano determinado **produciendo una necrosis visible al microscopio óptico y considerarse una respuesta tóxica observable**. Como se puede observar en las **figuras 3 a 8**.

La muerte celular o necrosis no es simultánea con la muerte somática, sino que se establece gradualmente según la resistencia que tenga cada uno de los tejidos a la anoxia, o puede presentarse anoxia y por lo tanto necrosis celular sin que necesariamente haya muerte somática. Un tóxico puede causar engrosamiento y necrosis en el epitelio branquial, lo anterior puede reducir la permeabilidad del oxígeno en este órgano, afectando la función respiratoria y por lo tanto producir una hipoxia afectando considerablemente el comportamiento del pez impactado.

Por otro lado cabe mencionar que los daños en los peces tratados se presentaron tanto en las branquias como en la cavidad abdominal, pero debido a los objetivos del proyecto nos enfocamos principalmente a las branquias. Sin embargo se hace referencia a que el daño observado en la cavidad abdominal se debió muy probablemente a la presencia de *Bothriocephalus*.

Los organismos muertos de fijaron en Bouin y se revisaron detenidamente en el microscopio estereoscópico, observándose daños en las branquias frescas (**Figura 12.**) y encontrándose un parásito de la familia *Bothriocephalus* (**Figura 13.**) el cual fue hallado al analizar a los organismos muertos, a continuación se describe la diagnosis de este género.



Melanosis difusa (a). **Figura 12.**



Figura 12. Branquia en fresco presentando melanosis difusa. Imagen a 32 X.

Diagnosis del género:

Bothriocephalus

Los organismos de este género presentan escolex elongado, indentaciones a los lados. Botrios elongados longitudinalmente. Sin cuello. Proglótides acampanulados. Pseudometamerización secundaria, algunas veces presente en las proglótides más viejas. Atrio genital dorsomedial. Poro uterino medial, anterior al atrio genital. Ovario elongado transversalmente, compacto. Vitelaria vertical. De las seis especies que han sido encontradas en América *B. acheilognathi* se diferencia por su escolex, que es más grande y triangular en las demás especies. Vive en el duodeno, la presencia de varios gusanos causa obstrucción y distensión, los daños a la mucosa incluyen degeneración y necrosis acompañada por enteritis hemorrágica e infiltración celular. Para efectuar su ciclo biológico utiliza un copépodo del género *Cyclops*, que ingiere al coracidio y se desarrolla una larva procercoide en la cavidad del cuerpo, los peces adquieren la enfermedad cuando ingieren los copépodos infectados. La quimioterapia es la única forma de erradicar el parásito.



Parásito del género *Bothriocephalus*. **Figura 13.**

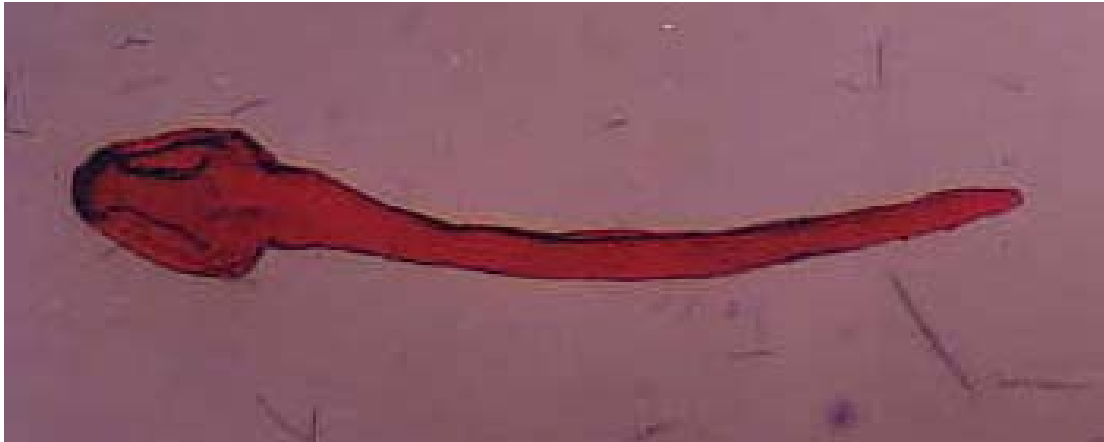


Figura 13. Parásito de la familia *Bothriocephalus*. Imagen a 200 X.

Los parásitos de esta familia producen daños muy severos en la mucosa y submucosa del intestino de los peces, lo cual se pudo corroborar al realizar cortes histológicos transversales de la cavidad abdominal de los organismos encontrándose lo siguiente (**Figuras 14 y 15.**) y pudiendo comprobar la existencia del parásito en esa región, es bien sabido que la presencia de *Bothriocephalus* en los peces ocasiona el síndrome de mala absorción por lo que los peces mueren de inanición.

Figura 14.

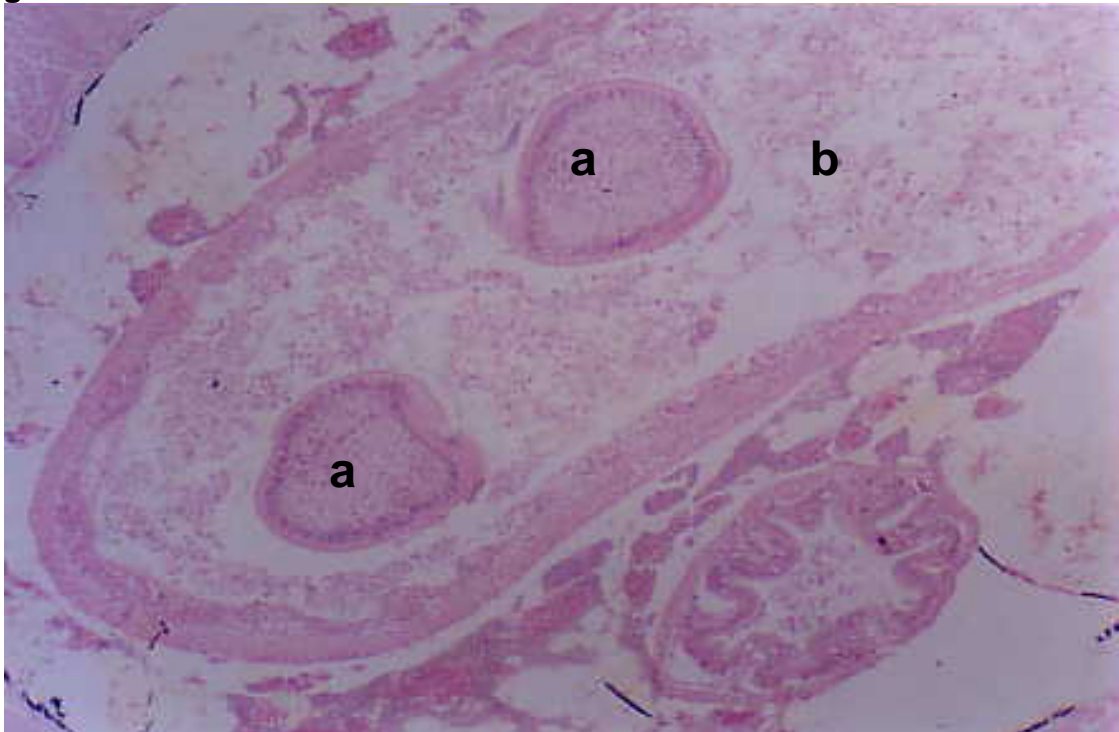


Figura 14. Presencia de parásitos (a) y bacterias (b). Técnica de H-E. Imagen a 80 X.



Figura 15.



Figura 15. Corte transversal de intestino, daño en la mucosa (a) y submucosa (b), ambos tejidos completamente necróticos. Técnica de H-E. Imagen a 80 X.

Con base en este hallazgo es probable que los resultados obtenidos pudieran verse enmascarados por la presencia de estos organismos en la población, ya que el lote de carpas proviene de Tezontepec de Aldama, Hgo, en donde se han reportado casos severos de botriocephalosis (López S., 1980).



CONCLUSIONES.

- La (CL₅₀-96h) del Sulfato de cobre a 21°C en crías de *C. idella* es de 0.67 mg/l.
- El CuSO₄ afecta notoriamente la respuesta fisiológica de las crías de carpa herbívora expuestas a concentraciones subletales por periodos prolongados.
- El CuSO₄ afecta el sistema respiratorio (branquias), a nivel histológico de las crías de carpa herbívora expuestas a concentraciones subletales por periodos prolongados.



-Sugerencias

Debido a que en el presente trabajo se presentaron eventos que no se tenían contemplados en su realización se propone lo siguiente:

1. Realizar la fase experimental a diferentes temperaturas con el propósito de ver el efecto del tóxico al interactuar con estas.
2. Proponer un rango más amplio de concentraciones y al mismo tiempo realizar el estudio con los diferentes estadios de la especie.
3. En cuanto a la parte histológica sería recomendable realizar los cortes en diferentes estructuras u órganos además de las branquias.



REFERENCIAS.

- Alcaráz G., Espina S., Rosas C., 1993. Effect of detergent on the Response to Temperature and Growth of Grass Carp, *Ctenopharyngodon idella*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 50, 659 664.
- Alcaráz G., Espina S., 1993. Efecto de la temperatura y del cloruro sobre la toxicidad del nitrito en la carpa herbívora *Ctenopharyngodon idella*, (PICES, CYPRINIDAE), Rev. Int. Contaminación Ambiental. 9(1), 21 28.
- Alcaráz G., Espina S., 1995¿Es tóxico el nitrito?, Acta toxicol. Argentina, 3 (1):2 4.
- Alcaráz G. and Espina S., 1994. Effect of nitrite on the survival of Grass Carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.), with Relation to Chloride. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 52: 74 79.
- Arana. F., 1894 Reproducción y Crecimiento en Cautiverio de *Chirostoma jordani* Wolman. (Pisces: Atherinidae) de Xochimilco, Distrito Federal, Zoología Informa, 41, 39 52.
- Arrignon, J., 1979. Ecología y piscicultura de aguas dulces, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Boitel. F., Effects of sub lethal and lethal copper levels on hemolymph acid-base balance and ion concentrations in the shore crab *Crcinus maenas* kept in undiluted sea water, Marine Biology, 103, 495 501.
- Boitel F. and Truchot P., 1989. Effects of sub lethal and lethal copper levels on hemolymph acid-base balance and concentrations in the shore crab *Carcinus maenas* kept in undiluted sea water. Marine Biology. 103, 495 501.
- Bückle F., Diaz F., Espina S., 1996. Thermoregulatory behavior applied to the culture of *Procambarus clarkii* (decapoda: Cambaridae). Rev. Biol. Trop., 44(1): 123 126.
- Bückle F., Díaz F., Espina S., 1994. Termal stress reponses of *Procambarus clarkii*.
- Bückle F., Espina S., 1994. Scope for Grown as Fuction of temperature, Salinity and body Weight in *Tivela stultorum* (Mollusca, Lamellibranchia). Journal of Applied Aquaculture, Vol. 4(4), 91 100.
- Burton T., 1972. Mortality curves of Bluegills (*Lepomis macrochirus Rafinesque*) Simultaneously Exposed to Temperature and Zinc Stress, Trans. Amer. Fish. Soc., 3, 435 441.
- Cairns J., Invertebrate response to thermal Shock Following Exposure to Acutely Sub-Lethal concentrations of Chemicals, Arch. Hidrobiol., 2, 164 175.



- Castañeda O., 2000. Efecto tóxico del aluminio presente en los lodos generados por la planta potabilizadora “Los Berros” del Sistema Cutzamala. UNAM, Facultad de Ingeniería.
- Claussen. D., Thermal acclimation in the Cryfish, *orconectes rusticus* and O. Virilis, Bio. Hem. Phisyol., 66, 377 384.
- Conover, J., 1966. Assimilation of the organic matter by zzoplancton. Limnol. Oceanog. 11, 346 354.
- Donald Mc., Milligan G, 1997. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress, p. 119-144. In G. K. Iwama, A.D. Pickering, J.P.
- Espina S., 1994. Effect of nitrite on the respiratory response of grass carp *Ctenopharyngodon idella* (val.) with relation to Chloride, Comp. Biochem. Physiol., 3, 761 764.
- Espina S., 1994. Preferred and avioded temperatures in the crawfish *Procambarus clarkii* (decapoda, cambaridae), J. Therm. Biol., 1, 35 39.
- Espina S., Salibián A., Rosas C., Sánchez A. and Alcaraz G., 1995. Acute physiological responses of Grass Carp *Ctenopharyngodon idella* Fingerlings to sub lethal concentration of cadmium. Acta toxicol. Argentina, 3 (1): 8 10.
- Espina, S. y C. Vanegas, 1996. Ecofisiología y contaminación, p. 45-68. In: A. V. Botello, J. Rojas Galaviz, A. Benitez y D. Zárate (Eds.) Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. EPOMEX Serie Científica 5. Universidad Autónoma de Campeche. México, 666 p.
- Espina S., Díaz F., Rodríguez C. and Soto F., 1998. Preferred temperature of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*, (Valenciennes), and brema carp, *Megalobrama amblycephala* (Yih),(Pises, Cyprinidea) in horizontal and vertical gradients. Aquaculture Research, 29, 643 648.
- Estrada E., Uribe M., Compiladoras, Atlas de Histología de Vertebrados, Universidad Nacional Autónoma de México, México 2002.
- Gutiérrez. A., Peces dulceacuícolas Mexicanos XVII. *Chirostoma attenuatum* (Atheriniformes: Atherinopsidae), Zoología Informa, 41, 29 38.
- Gutiérrez-Galindo, E.A., 1989. Bioensayos y pruebas de evaluación toxicologicas. P.1-58. Curso Regional de Entrenamiento IDERENA/PAC/PNUMA/FAO/COI- Ensayos Biológicos y pruebas de toxicidad Para Formar un Criterio de Calidad de Agua en el Gran caribe y Golfo de México. Cartagena de Indias Colombia.
- Helmy S. and Afaf E., 1994. Toxic interactions between copper sulphate and some organic agrochemicals, Toxicology letters. 70, 109-119.



- Herkovits J., Helguero A.. 1998, Koper toxicity and Koper-zinc interactions in amphibian embryos. *The Science of the total Environment*, 221, 1-10.
- Hwang P. and Yang H., 1997. Modulation of calcium uptake in cadmium-petreated tilapia (*Oreochromis mossambicus*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* 16:403-410.
- James M. and Wissing E., 1988. Effect of sub lethal concentrations of copper on the critical thermal maxima (CTMax) of the fantail (*Etheostoma flabellare*) and Johnny (*E. nigrum*) darters. *Aquatic toxicology*, 12. 311-322.
- Keith E., 1981. The of therapeutic copper in closed marine systems, Department of Chemistry, The Ohio State University, Mansfiel Campus, Mainsfiel, OH. (USA). *Aquaculture*, 24, 355 362.
- Little E., Behavioral Methods for Assessing Impacts of Contaminants on Early Life Stage Fishes, *American Fisheries Society Symposium*, 14, 67 76.
- López S., 1980, An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. de Méx., 51 (1) Ser. Zool. 69-84.
- Pelgrom M., 1994. Interaction between copper and cadmium during single and combined exposure in juvenile tilapia, *Aquatic Toxicology*, 30, 117 135.
- Phillips J., 1976. The Common Mussel *Mytilus edulis* as indicator of Pollution by Zinc, Cadmium, Lead and Copper. I. Effects of Environmental Variables on Uptake of Metals, *Marine Biology*, 38, 59 69.
- Rainbom S., Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustaceans: zinc, copper and cadmium in a decapod, an amphipod and a barnacale, *Hidrobiología*, 174, 245 262.
- Rainbow S., Copper, cadmium and zinc concentration in oceanic amphipod and euphausiid crustaceans, as a source of heavy metals to pelagic seabirds, *Marine Biology*, 103, 513 518.
- Redshaw J. 1995, Ecotoxicological risk assessment of chemicals used in aquaculture: a regulatory viewpoint, *Aquaculture Research*. 26, 629 637.
- Revista Italianan Acquacoltora, 29- 149/154.
- Ridout S., 1986. Concentrations of V, Cr, Mn, Fe, Ni, Co, Cu, Zn, As, and Cd in mesopelagic crustaceans from the Noth East Atlantic Ocean, *Marine Biology*, 100, 465 471.
- Roberts J., Stability of L-Ascorbic Acid (vitam C) and its forms in Fish Fedds During Processing, Storage and Leaching, *Aquaculture*, 60, 73 83.



- Rosas C., Espina S., Diaz F., Curts J., and Rosas I. (Eds), 1988, Effect of sub lethal, detergent concentration upon gill, permeability of *Ctenopharyngodon idella* (PICES; CYPRINIDAE). *Water, Air and Soil Pollution* 42:253-258.
- Schreck B. and Moyle B.(Eds), 1990. *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland. 684 pp.
- Sprague, 1990. *Aquatic Toxicology*; *In*: C. B. Schreck and P. B. Moyle. *Methods for fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland. (Eds.) 1990 p. 491-528.
- Sticney R., Kohler C., 1990. Chapter 20, *Maintaining Fishes for Research and Teaching*.
- Sumpter B. Schreck (Eds). *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge. 278 pp.
- Suresh A., Comparative study on the inhibition of acetyl cholinesterase activity in the freshwater fish *Ciprinus carpio* by mercury and zinc, *Biochemistry International*, 26, 367-375.
- Tucker S., 1987, Acute toxicity of potassium permanganate to channel fingerlings. *Aquaculture, Mississippi, Agricultural and forestry Experiment Station, Delta Branch Experimental Station, Stoneville*, 60:93-98.
- Vanegas C., Espina S., Botello V., Villanueva S., 1997. Acute Toxicity and Synergism of Cadmium and Zinc in White Shrimp, *Penaeus setiferus*, Juveniles. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58: 87-92.
- Vázquez T, Determinación del estrés producido por el tratamiento terapéutico con Sulfato de Cobre en *Carassius auratus* (Pises; Cyprinidae, UAM Xochimilco, México D. F., 2003.
- Viatengo A., Effects of Hg²⁺+Cu²⁺on the cytosolic Ca²⁺level in molluscan blood cells evaluated by confocal microscopy and spectrofluorimetry, *Marine Biology*, 119, 557-564.
- Vogt. G., Accumulation and excretion of metal granules in the pawn, *Penaeus monodon*, exposed to water-borne copper, lead, iron and calcium, *Aquatic Toxicology*, 28, 223-241.
- Wedemeyer A., 1997. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. P 35-71. *In*: G. K. Iwama, A.D. Pickering, J.P. Sumpter, C.B., Schreck (Eds). *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge. 278 pp.
- Williams A., and Wootton R. 1981, Some effects of therapeutic levels of formalin and copper sulphate on blood parameters in rainbow trout. *Aquaculture*. 24, 341-353.

