

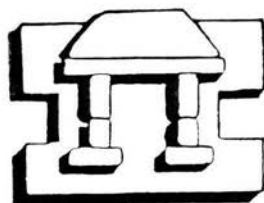


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“EVALUACION DE LA RESPUESTA DE JUVENILES
DEL PEZ OSCAR (*Astronotus ocellatus*) A
EXPOSICIONES AGUDAS Y CRONICAS DE SULFATO
DE COBRE EN DOS TEMPERATURAS”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
O M A R A N G E L E S L O P E Z



IZTACALA

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

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MEXICO

2002



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTADA DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE JUVENILES DEL PEZ OSCAR
(*Astronotus ocellatus*) A EXPOSICIONES AGUDAS Y CRÓNICAS DE
SULFATO DE COBRE EN DOS TEMPERATURAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

PRESENTA:
OMAR ANGELES LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. Mario Alfredo Fernández Araiza

Tlanepantla, Edo. De México.

2002

DEDICATORIA.

A Toda mi familia.

Que han sido de gran importancia en toda mi vida.

A mis padres, Juan Angeles y Arcelia López, que tanto Admiro y Amo.

Por enseñarme lo importante que es una familia y por darme todo su

Cariño, por estar Siempre a mi lado e Inculcarme esos Principios tan

necesarios, por Enseñarme a ser Persistente, Prudente, Sensato y

Forjar mi Carácter.

Por Acompañarme durante mi vida.

A mis hermanas, Blanca y Silvia, que Adoro y Admiro.

Por su Cariño e Inyectarme la Alegría de su Juventud y hasta su Locura,

Por todo este Grato tiempo.

Y a todos aquellos que han sido y son parte de mi vida.

Y para aquellos que ya no están conmigo.

A todos **Gracias.**

AGRADECIMIENTOS.

A mi director de Tesis, M en C. Mario Alfredo Fernandez Araiza, por guiarme y enseñarme durante este período, así como confiar en mi y haberme apoyado en la realización de este trabajo y lo más importante, brindarme su amistad.

A todos mis sinodales, por su amistad y paciencia. Al M. en C. José Luis Gama, por su tiempo y sus acertados cometarios. A la Dra. Nandini Sarma por sus observaciones y apoyo, Al M. en C. Ángel Duran por su ayuda en la realización de los análisis estadísticos, A la M. en C. Alba Márquez por sus cometarios y observaciones.

Al Profesor Alfonso Lugo y a la Profesora Rosario Sánchez por su apoyo en la realización de este trabajo.

A mi tío y a mi primo, Pedro y Erick, por su apoyo.

A los Laboratorios Aplicaciones Farmacéuticas y a mi Padre.

A todos mis amigos por estar en el momento preciso y cuando los necesitaba, en especial a José Luis y Gustavo.

Y por supuesto a mis hermanas.

ÍNDICE

IZT.

PAGINA.

← INTRODUCCIÓN_____	1
← ANTECEDENTES_____	4
← OBJETIVOS_____	6
← MATERIAL Y MÉTODO_____	7
← RESULTADOS_____	11
← ANÁLISIS Y DISCUSIÓN_____	24
← CONCLUSIONES_____	29
← REFERENCIAS_____	30

INTRODUCCIÓN

A partir de la revolución industrial además del uso de materiales orgánicos el hombre empleó sustancias químicas, en sus diferentes actividades, incluyendo las agrícolas, en las que son utilizados compuestos químicos como fertilizantes y biocidas. De los primeros, los compuestos nitrogenados como el amonio y el nitrato, son los más usados, y de los segundos, químicos formados por diferentes compuestos entre ellos, metales. Estos materiales después de ser utilizados, son vertidos a cuerpos de agua, a través de los escurrimientos de las tierras aledañas al sistema con el consecuente deterioro de los mismos por cambios en factores ambientales como por ejemplo una disminución en la concentración de oxígeno disuelto (Heath, 1995). También en las actividades piscícolas, son utilizados solos o mezclados con formalina para combatir enfermedades o infecciones. En México, la acuicultura se ha desarrollado de manera empírica en muchos casos y por un desconocimiento de la biología de las especies con que se trabaja, los tratamientos preventivos y profilácticos, la mayoría de las veces no han sido los mas adecuados.

Los daños que estos compuestos químicos producen en los organismos acuáticos, son la disminución de hematocitos, eritrocitos y niveles de proteína en la sangre, además de afectar órganos como el hígado, branquias, corazón, gónadas. (Alcaraz, Espina, 1993 y Helmy, Afaf, 1994).

La respuesta de los individuos a los contaminantes depende además de la concentración de estos, a factores como la especie, el comportamiento, la condición fisiológica y el tamaño del organismo además de la interacción con factores ambientales como la temperatura y la composición química del agua. (Alcántara, Espina. 1993).

Los efectos que una exposición aguda a contaminantes de los organismos pueden ser letales ya que en casos de vertidos accidentales, la concentración potencialmente elevada de materiales tóxicos daña directamente las poblaciones y las comunidades, al alterar las principales funciones de los organismos lo que ocasiona eventualmente, problemas en el ecosistema completo. Los efectos a concentraciones subletales y exposiciones crónicas del contaminante son menos evidentes, aunque no menos significativos. (Patin, 1982)

La temperatura, es un factor que afecta las respuestas fisiológicas y el comportamiento en los organismos. (Heath, op. cit.) Se ha observado que los organismos expuestos a gradientes térmicos experimentales permanecen mayor tiempo en un rango de temperatura considerado como su *preferendum*, por lo que este factor se debe tomar en cuenta en los modelos de toxicidad. La toxicología, estudia los efectos y las reacciones fisiológicas, que algunas sustancias químicas tienen sobre los organismos, (Heath, op. cit.) ya que provocan trastornos fisiológicos como la actividad termorreguladora de los organismos acuáticos, (Alcaraz, Espina. 1993), que modifica por ejemplo, el comportamiento de peces cuando son expuestos a metales pesados, que se refleja en cambios de locomoción, comportamiento reproductivo, reducción del pH y nivel de oxígeno en la sangre además de influir en su tolerancia térmica. (James, Wissing, 1988)

En investigaciones toxicológicas, se debe conocer la concentración letal media (CL50) en un tiempo a través de exposiciones agudas, así como evaluar los efectos de toxicidad crónica mediante exposición en concentraciones subletales, para generar criterios que regulen la formulación de estándares legales de calidad del agua. (Heath, op. cit; Alabaster, Lloyd, 1980; EPA, 1986).

El Cobre, aunque es un elemento esencial para la vida, en concentraciones altas puede ser tóxico a los organismos acuáticos (Cedeño-Maldonado, Swader, 1974; Duffus, 1980; Sadiq, 1992; Kennish, 1996) La forma de cobre mas utilizada como agente profiláctico de una amplia variedad de enfermedades en peces, es en sales, particularmente el sulfato de cobre. (Roberts, Sheperd, 1974 en Williams, Wootten 1981). Sin embargo, la aplicación del cobre se hace utilizando como referencia la concentración empleada en especies comestibles como la trucha, que es un organismo característico de zonas frías, por lo que el conocimiento de la respuesta que organismos de aguas templadas y tropicales tengan ante el sulfato de cobre es importante para plantear alternativas de aplicación de esta sustancia en forma eficiente en organismos que se desarrollan en diferentes climas. Debido a que la temperatura es un factor importante en el efecto de sustancias químicas en el agua y en el comportamiento de los organismos, si consideramos que en México la temperatura del agua varía de acuerdo a las diferentes estaciones del año, se tiene la necesidad de generar información básica que apoye el uso de compuestos de este tipo en la Acuicultura, específicamente en organismos de ornato como es el caso de *Astronotus ocellatus*, conocido por los aficionados como "pez oscar", el cuál pertenece a la familia Cichlidae, y se distribuye en la cuenca del Amazonas, el río Paraná y el río Negro. Se caracteriza por tener línea lateral interrumpida, es moderadamente de color oscuro. Habita en aguas con pH entre 6.8 y 7.5 , dureza general entre 10 y 15 ppm de CaCl_2 y temperaturas entre 24 y 28 °C. (Joseph, 1994)

Con base a lo anterior se pretende evaluar el efecto de Sulfato de Cobre en diferentes temperaturas con la finalidad de encontrar la mejor forma de utilización de este compuesto en los tratamientos preventivos en granjas acuícolas.

ANTECEDENTES

Se han desarrollado estudios de toxicidad de compuestos químicos y metales pesados en diferentes especies de organismos acuáticos, para determinar la CL50 y los daños que estos causan, por ejemplo, en crustáceos, Burton, et al. (1972) determinaron que la concentración letal media Zn en camarón *Lepomis macrochirus* se reduce con el incremento de temperatura. Vogt (1994) determinaron que en el camarón tigre *Penaeus monodon* la acumulación de Cu, Pb, Fe y Ca es mayor en el hepatopáncreas, mientras que. Chen (2001), demostró una relación entre el sulfato de cobre y las respuestas fisiológicas de este crustáceo al observar una tolerancia al sulfato de cobre cuando disminuye la salinidad. Mientras que Boitel, Truchot (1989), demostraron que la exposición de concentraciones subletal y letales de cobre en cangrejos *Carcinus maenas* producen la acidificación metabólica y alteran la concentración de iones en la hemolinfa.

Phillips (1976) encontró que la toxicidad de metales (Zn, Cd, Pb y Cu) se incrementa inversamente con la salinidad y temperatura reflejándose en una pérdida de peso del mejillón *Mytilus edulis*. Mientras que Havilsom (1983) encontró que la toxicidad del cobre en mejillones se obtuvo por diferencias genotípicas en el locus PGI, o por la diferente susceptibilidad de los mejillones al cobre. Viarengo, et al. (1994) discute que los efectos del mercurio y del cobre a nivel celular en mejillones, afecta los canales de calcio, produciendo alteraciones bioquímicas y fisiológicas en las células.

Herkovits, Helguero (1997) realizaron pruebas de tóxicos en embriones de *Bufo arenarum* para encontrar la CL₉₀ de Cu/L obteniéndola en 0.105 mg. Cu/L en un pH de 6.8.

Pelgrom, *et al* (1994) notaron en la tilapia *Oreochromis mossambicus* que la acumulación de Cu y Cd provocó la pérdida de iones de calcio y sodio, con la consecuente disminución de peso. Perkins *et al.*(1997) explican la asociación entre la expresión de los niveles de Metalotonina MT y estrés subletal en machos de bagre *Ictalurus punctatus*, mientras que en hembras la MT le sirve como un mecanismo de defensa a la exposición del cobre. Por su parte Tucker (1986) propone que en el bagre de canal *Ictalurus punctatus* la CL₅₀ de permanganato de potasio (KMnO₄) produce el aumento de la demanda bioquímica de oxígeno en este organismo.

Se observó que en crías de trucha la CL₅₀ es mayor con un incremento en la temperatura y el efecto de dosis subletales afectando el desarrollo de las gónadas. Burton, *et al.* (1972) Williams, Wootten (1981) encontraron un incremento en la actividad de enzimas LDH, HBDH, GPT, GOP en trucha arco iris por los efectos de sulfato de cobre y formalina. Espina *et al* (1995 a, b) reportaron que concentraciones subletales de cadmio producen perturbaciones en el balance hídrico de juveniles de carpa herbívora reflejadas en una ineficiencia en la extracción de oxígeno y reportan el aumento de toxicidad de los nitritos en la carpa herbívora y en salmónidos dependiendo de la temperatura y la condición física del pez.

La respuesta del pez oscar *Astronotus ocellatus*, en condiciones de estrés por hipoxia, a 28°C, varía en función de su talla, los adultos toleran mas condiciones de anoxia como consecuencia de una reducción de su metabolismo (Almeida-Val *et al.*, 2000), mientras que en juveniles, aunque el metabolismo no se ve afectado, (Almeida-Val *et al.*, 1998) se observa una deficiencia en crecimiento, por la ausencia de oxígeno. (Almeida-Val *et al*, 2000)

Tomando en cuenta la información anterior, se considera importante generar información básica de la respuesta de especies de ornato como el pez oscar ante agentes químicos por lo que en el presente trabajo se plantean los siguientes:

OBJETIVOS

General

- Evaluar la respuesta en juveniles del pez oscar (*Astronotus ocellatus*) al sulfato de cobre en dos temperaturas.

Particulares

- Determinar la concentración letal media a 96 horas ($CL_{50-96hr}$) del sulfato de cobre a 24 y 32 (°C) en juveniles de *A. ocellatus*
- Evaluar el efecto de dosis subletales a diferentes temperaturas (24, y 32 °C) en juveniles de *A. ocellatus*, considerando las siguientes variables:
 - Supervivencia.
 - Crecimiento.
 - Respuesta fisiológica.

MATERIAL Y MÉTODO

Aclimatación.

Los peces *A. ocellatus* procedieron de la granja MAHA, en el estado de Morelos, se aclimataron a 24, y 32 ± 1 (°C). manteniéndose durante 10 días en estas condiciones con un foto período de 12 hrs luz. Se les suministro diariamente alimento balanceado comercial en hojuelas, en una ración correspondiente al 5 % de su peso corporal. Después de este lapso, los organismos fueron sometidos a exposiciones agudas y crónicas de Sulfato de Cobre en las temperaturas mencionadas anteriormente.

Concentración Letal Media, $CL_{50-96 H}$, mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ /L.

Las pruebas de toxicidad aguda, fueron de tipo estático sin recambio (Sprague, 1990); en ellas se trabajo con un total de 300 peces en etapa juvenil, dividiéndose en partes iguales. 150 organismos a 24 °C y 150 a 32 °C. Se mantuvieron sin alimentación 24 h previas a la experimentación, y durante la misma. Para cada temperatura se utilizaron 15 acuarios con capacidad de 20 Lts en los que se distribuyeron 10 ejemplares en cada uno y se expusieron a 5 concentraciones de Sulfato de cobre (0, 1, 2, 4 y 8 mg. de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; Merck, 99% de pureza). Las observaciones sobre la mortalidad se realizaron a las 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 36, 48, 72 y 96 horas, los peces muertos se retiraron con una red y se preservaron en fijador Bouin, el cual contiene 750 ml. de solución acuosa saturada de ácido picrico, 250.0 ml. de formol (40 %), 50.0 ml. de ácido glacial. Como criterio de muerte se adopto la falta de respuesta de los animales a estímulos mecánicos suaves (Sprague, 1990).

El valor de la concentración letal media (CL_{50}) se obtuvo a través del método Probit, usando el programa de computo Stephan (1977)

Toxicidad Crónica del Sulfato de Cobre

Para esta fase en cada una de las temperaturas trabajadas (24 °C y 32 °C), se utilizaron dos acuarios de 40 L de capacidad en los cuales se colocaron 10 organismos en cada uno de ellos. Un grupo se expuso a una concentración de 0.1 mg/L. de Sulfato de cobre (correspondiente a la CL1); el otro se utilizó como grupo testigo, para determinar el efecto del compuesto en exposiciones subletales. La etapa crónica duró 21 días durante los cuales se mantuvieron los organismos en los acuarios equipados con calentadores, aireación constante y fotoperiodo de 12hrs. Diariamente se efectuó un recambio total de agua, reemplazándola con solución fresca de contaminante. Antes de alimentar a los organismos se extrajeron las heces, posteriormente se alimentaron con el 5 % de su peso corporal durante 15 minutos, después de los cuales se retiraba el alimento remanente. Se evaluaron los siguientes parámetros.

Respuestas Fisiológicas

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

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 $\text{g}^{-1}\text{org}^{-1} \text{ día}^{-1}$. y la tasa de ingestión se expresó $\text{g}^{-1}\text{org}^{-1} \text{ día}^{-1}$.

Después de 24 hrs. de haber retirado el alimento sobrante y efectuado el recambio de agua se recolectaron las heces producidas y se sometieron al mismo tratamiento que el alimento. La producción de heces se expresó en $\text{g org}^{-1}\text{día}^{-1}$.

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

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

IZT.

La eficiencia de asimilación del alimento se calculó acorde al modelo de Conover (1966):

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



- Tasa respiratoria (R)

La tasa respiratoria se evaluó como consumo de oxígeno ($\text{mg L}^{-1} \text{org}^{-1} \text{ h}^{-1}$) en un respirómetro semicerrado (Cech, 1990). Al término del período de exposición al contaminante los ejemplares en etapa juvenil, se colocaron individualmente en cámaras respirométricas de 1000 ml conectadas a un sistema de flujo continuo. Con el fin de medir el oxígeno consumido por los peces, se cerraron las cámaras durante 60 min. desconectando el flujo de agua y tomando una muestra inicial y otra final en las que se determino la concentración del gas con oxímetro (YSI-54 ARC; $\pm 0.05 \text{ mg O}_2/\text{L}$).

$$VO_2 = \{ ([O_2]_i - [O_2]_f) V \} / T$$

- Efecto calorigénico (EC)

Se cuantifico por diferencia entre los valores del consumo de oxígeno medido en peces recién alimentados y en ayunas por 24 h.

- Tasa de excreción nitrogenada (U)

La tasa de excreción nitrogenada (U) se evaluó como excreción amoniacal expresada en (mg L⁻¹ org⁻¹) (Jobling, 1994) en las muestras de agua de manera similar a las empleadas para medir concentración de oxígeno. La concentración de amonio en las muestras se determinó con equipo Hach DR-2000.

La tasa de excreción de amonio se calculo por diferencia entre la concentración de las muestras tomadas al inicio y al final del período en el cual las cámaras respirométricas permanecieron cerradas:

$$VN-NH_4 = \{([NH_4^+]_f - [NH_4^+]_i)\} V / T$$

- Tasa de crecimiento

La tasa de crecimiento relativo (TCR,%) (Busacker *et al.* 1990), se estimó a través del cambio en peso (g) experimentado por los peces en etapa juvenil, en el lapso de 21 días de exposición a las distintas combinaciones de cobre-temperatura.

$$TCR = \{(Pf - Pi) / [Pi (Tf - Ti)]\} 100$$

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza multifactorial multivariado, así como a través de la prueba de comparación múltiple de medias (Prueba LSD de Tukey) mediante el programa Statistica V.5.

RESULTADOS

Fase de Exposición Aguda (Concentración Letal Media 96-Hrs)

En la tabla 1 se presentan los valores de $CL_{50-96hrs}$ del $CuSO_4$ en juveniles del pez oscar *Astronotus ocellatus* a temperatura de 24 y 32 °C., obtenidos a través de PROBIT observando en ella una relación inversamente proporcional entre los factores. Ya que al aumentar la temperatura, la concentración en la que se presenta la mortalidad del 50% de los organismos es menor.

Temperatura	24 °C	32 °C
CL_{50} (mg/L)	0.40	0.16

Tabla 1. CL_{50-96h} de $CuSO_4$ en juveniles de *Astronotus ocellatus* a temperatura de 24 y 32 °C.

En las figuras 1 y 2 se representa el porcentaje de la mortalidad registrada a 24 y 32 oC respectivamente en diferentes intervalos de tiempo durante la exposición aguda del $CuSO_4$. En ambas se observa una efecto más rápida en los organismos a concentraciones mas altas, sin embargo, el factor temperatura incide en el tiempo de respuesta ya que a la temperatura de 32 °C la mortalidad se presenta en un tiempo mucho menor que a 24 °C.

Figura 1. Mortalidad (%) de juveniles de *Astronotus ocellatus* con respecto al tiempo en temperatura de 24 °C a expuestos a diferentes concentraciones de Sulfato de Cobre.

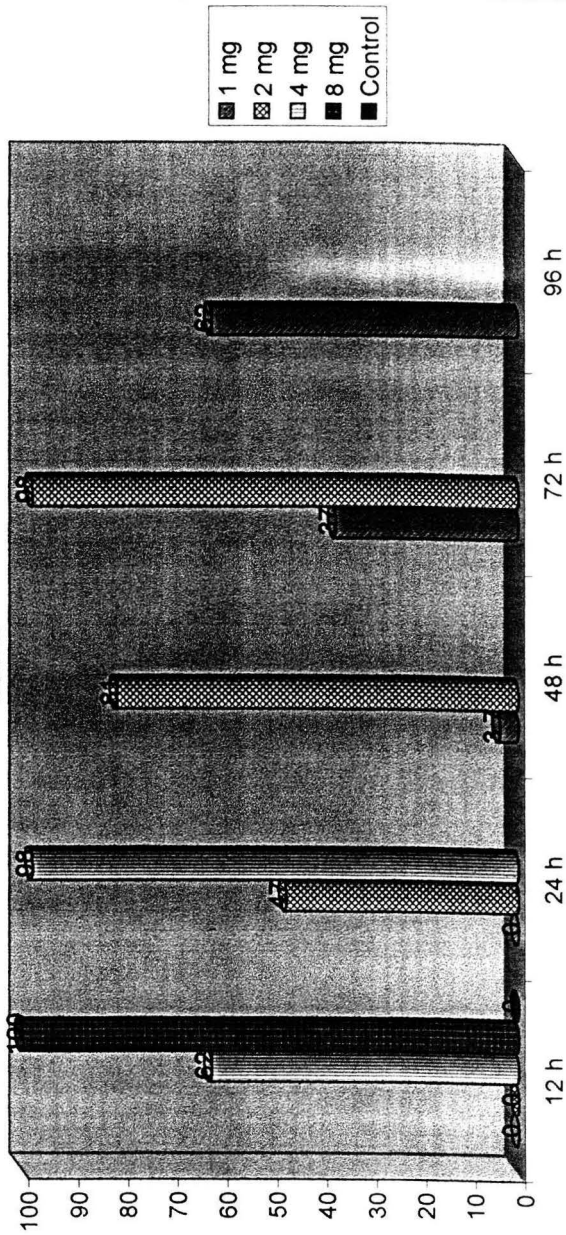
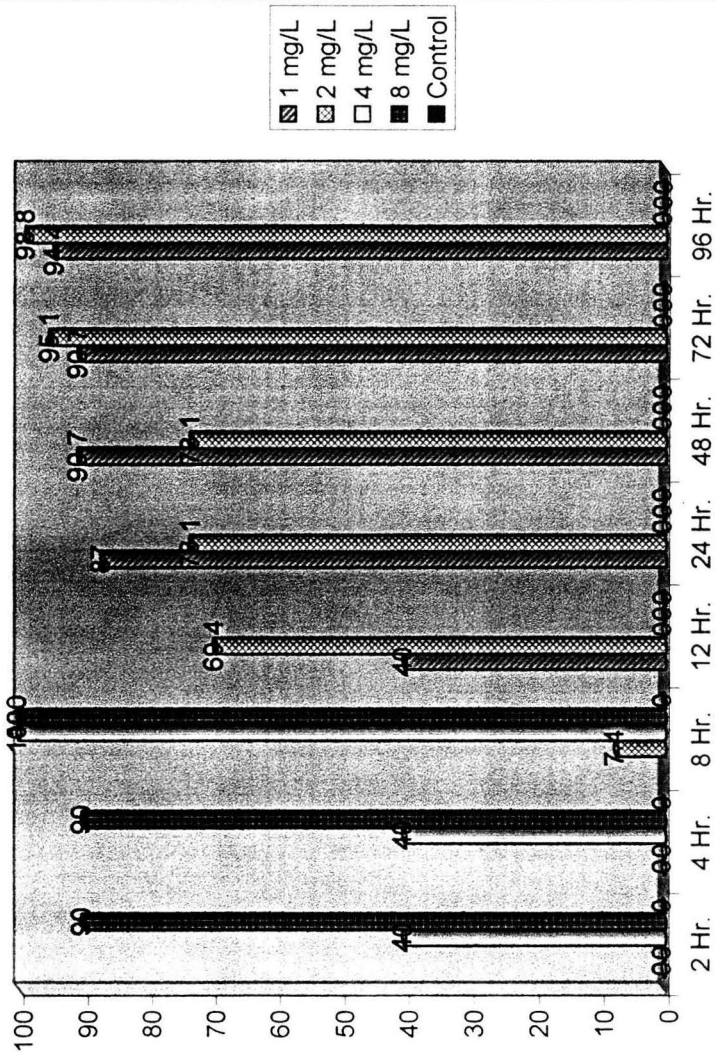


Figura 2. Mortalidad (%) de juveniles de *Astronotus ocellatus* con respecto al tiempo en temperatura de 32°C expuestos a diferentes concentraciones de Sulfato de Cobre.



Fase de Exposición Crónica (Concentración Subletal)

En la tabla 2 se resumen las respuestas fisiológicas (ingesta, respiración, heces producidas, excreción nitrogenada, acción dinámica específica, crecimiento) de los organismos expuestos a concentraciones sub-letales de CuSO_4 así como las de los controles respectivos a 24 Y 32 °C.

	24 °C		32 °C	
	Experimental	Control	Experimental	Control
Tasa de crecimiento (g día ⁻¹)	0.02	0.03	0.04	0.01
Ingesta (g org ⁻¹ día ⁻¹)	0.06	0.06	0.07	0.09
Eficiencia de asimilación (%)	81	72	77	35
Tasa de asimilación (g org ⁻¹ día ⁻¹)	0.05	0.04	0.05	0.03
Producción de heces (g org ⁻¹ día ⁻¹)	0.01	0.02	0.02	0.06
Consumo de O ₂ (mg L ⁻¹ org ⁻¹ h ⁻¹)	1.20	1.88	1.53	1.29
Excreción nitrogenada (mg L ⁻¹ org ⁻¹ h ⁻¹)	0.11	0.23	0.09	0.07
Acción Dinámica Específica	1.03	1.47	-0.40	-0.37
Supervivencia %	100	100	30	70

Tabla 2. Valores de respuestas fisiológicas en juveniles de *Astronotus ocellatus* a temperaturas de 24 y 32 °C expuestos a concentraciones subletales de CuSO_4 .

En las figuras 3, 4 y 5, se representan los valores medios (\pm Dev. est.) de la tasa de ingestión eficiencia de asimilación, producción de heces respectivamente mientras que en las figuras.

Factores	Heces	Tasa de Ingestión	Eficiencia de Asimilación	Tasa de Asimilación	Consumo de O ₂ (Alimentados)	Consumo de O ₂ (Inanición)	Excreción Nitrogenada
Temperatura	F=34.06 (p=0.00)	F=21.09 (p=0.00)	F=9.99 (p=0.0022)	F=0.061 (p=0.08055)	F=0.8486 (p=0.366120)	F=374.56 (p=0.070360)	F=3.59 (p=0.0700360)
Grupo	F=3129 (p=0.0)	F=5.70 (p=0.0320)	F=4.76 (p=0.032)	F=3.17 (p=0.0789)	F=2.35 (p=0.1387)	F=0.0416 (p=0.840122)	F=1.4880 (p=0.23439)
Interacción	F=19.02 (p=0.00037)	F=5.24 (p=0.0245)	F=1.19 (p=0.2789)	F=1.03 (p=0.3141)	F=10.85 (p=0.003050)	F=11.86 (p=0.002701)	F=2.4291 (p=0.132197)

Tabla 3. Valores de F y de p del análisis de varianza multifactorial multivariado, para los pez Oscar (*Astronotus ocellatus*) expuestos a diferentes concentraciones de CuSO₄ y dos temperaturas.

Tratamiento Grupo/Temp.	Heces	Tasa de Ingestión.	Eficiencia Asimilación.	Tasa Asimilación.	Consumo de O ₂ (Alimentados)	Consumo de O ₂ (Inanición)	Excreción NH ₃
Control/24°C	0.0168 ^a	0.0568 ^a	0.7083 ^a	0.04039 ^a	1.8777 ^a	0.4111 ^a	0.2344 ^a
	±0.02222	±0.020778	±0.342535	±0.027060	±0.2333	±0.0927	±0.183038
Control/32°C	0.0630 ^b	0.09323 ^b	0.3209 ^a	0.0317 ^a	1.2857 ^b	1.6571 ^b	0.0743 ^a
	±0.0250	±0.016015	±0.344667	±0.028324	±0.195180	±0.250713	±0.04504
Exp/ 24°C	0.0111 ^a	0.0563 ^a	0.8078 ^a	0.0457 ^a	1.2000 ^b	0.1666 ^c	0.1056 ^a
	±0.0084	±0.01613	±0.118107	±0.014540	±0.502494	±0.070711	±0.0384
Exp/ 32°C	0.0179 ^a	0.06853 ^a	0.6190 ^a	0.0509 ^a	1.5333 ^a	1.9333 ^d	0.0900 ^a
	±0.023	±0.0378	±0.6732	±0.047714	±0.115470	±0.41633	±0.043589

Tabla 4. Resultados de la prueba de la comparación múltiple de medias (PRUEBA DE LSD). Los Valores correspondientes a Medias y Desviaciones de Estándar de las replicas

NOTA: La misma literal indica que las medias de los valores no hay diferencias significativas.

Fig 3. Diagramas de caja para la tasa de ingestión

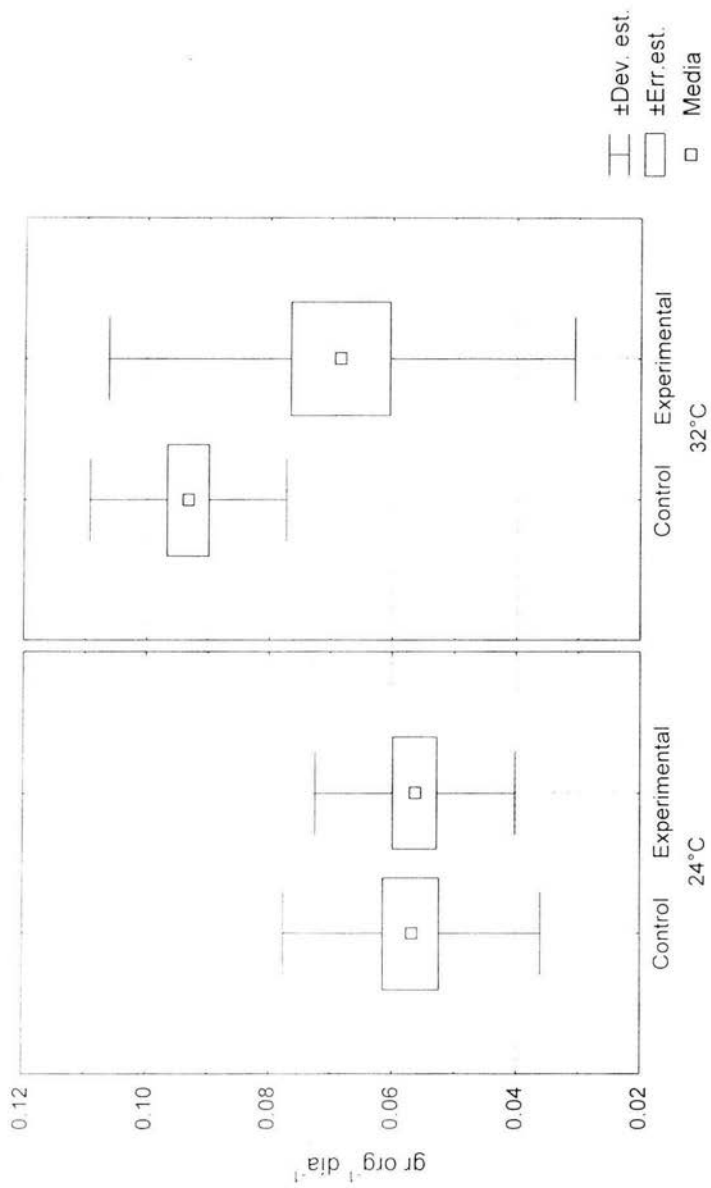


Fig 4. Diagramas de caja para la eficiencia de asimilación.

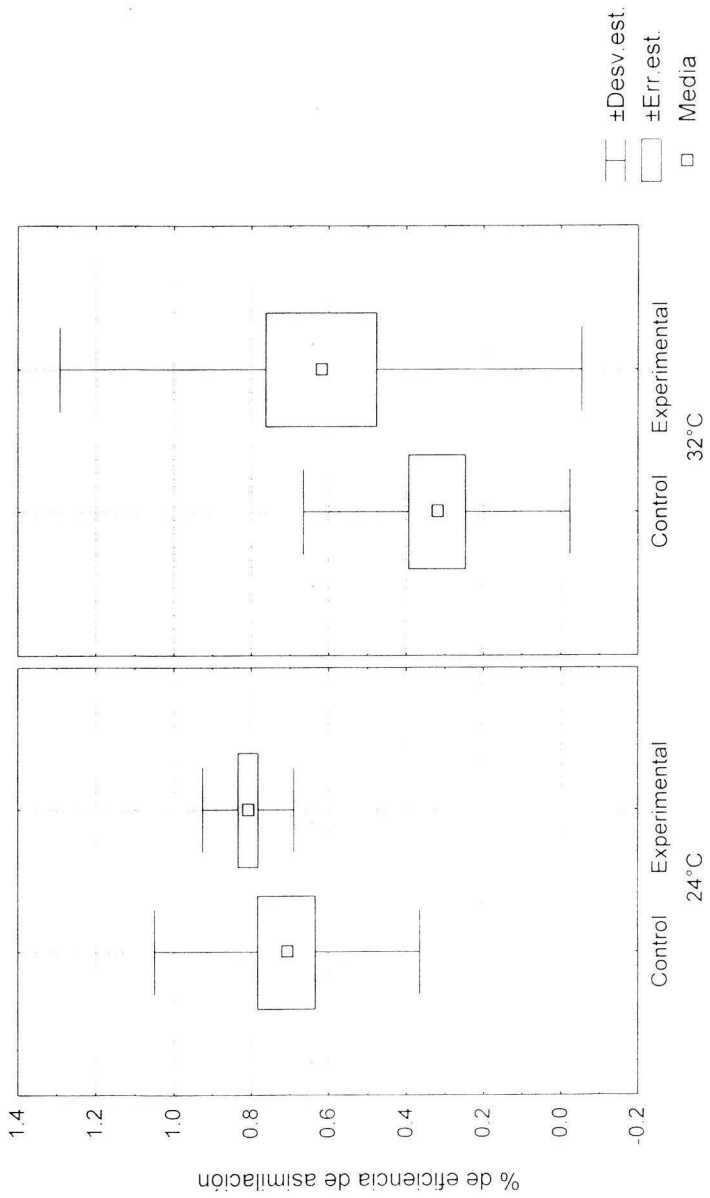


Fig 5. Diagramas de caja para la producción de heces.

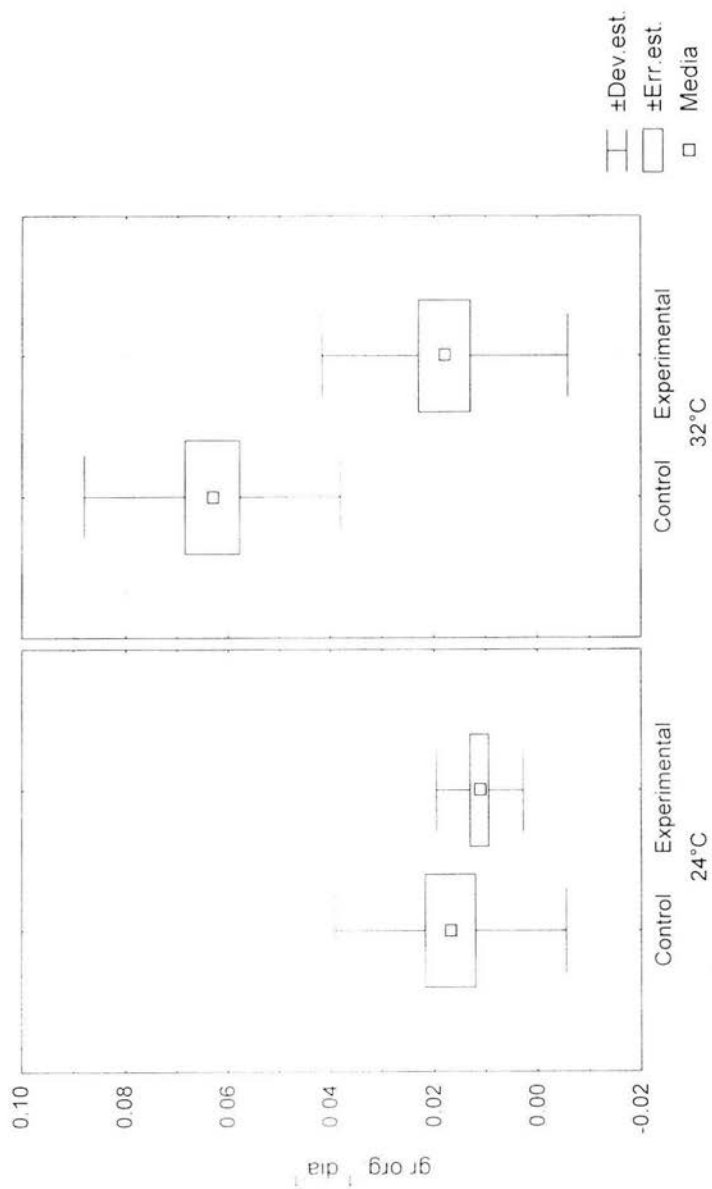


Fig 6. Diagramas de caja para el consumo de oxígeno en organismos alimentados.

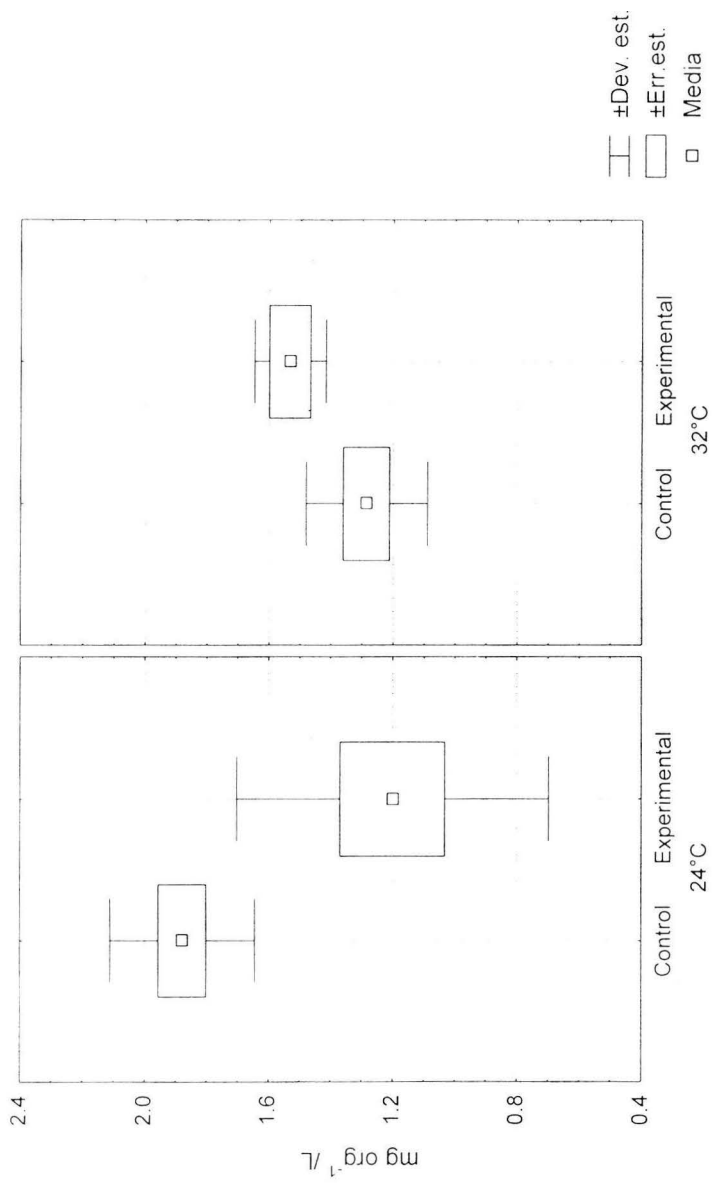


Fig. 7 Diagramas de caja para el consumo de oxígeno en organismos en inanición

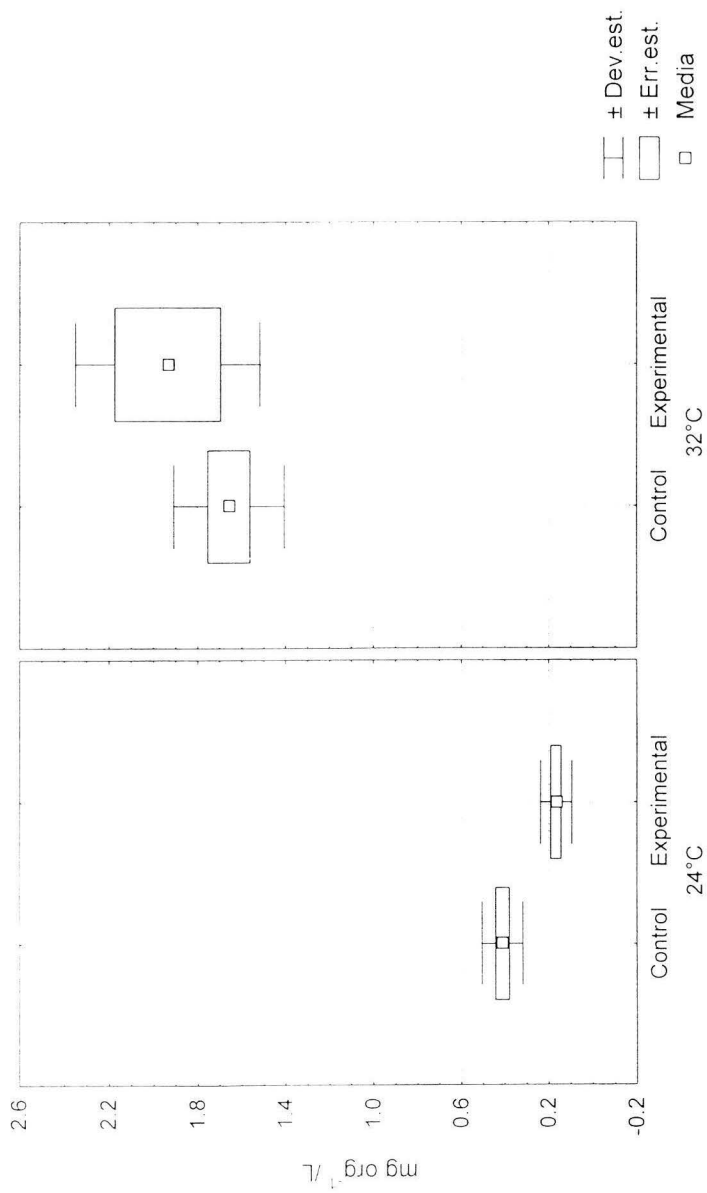
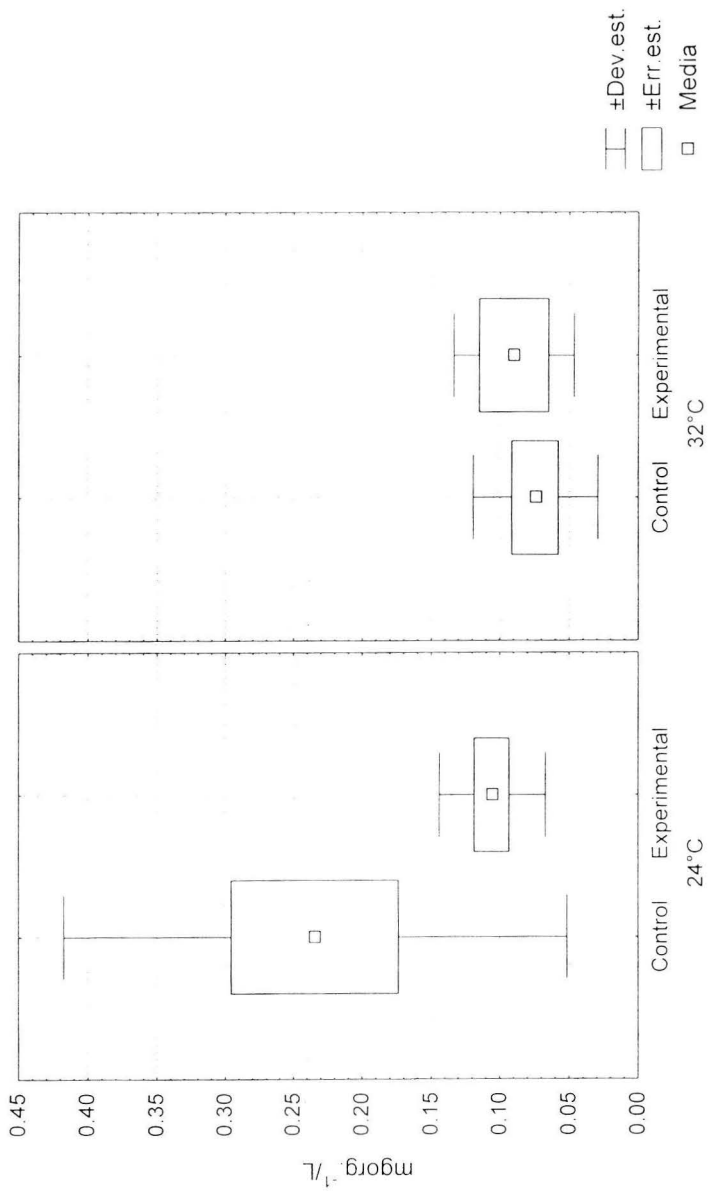


Fig 8. Diagramas de caja para excreción nitrogenada.



En las figuras 6, 7 y 8, se muestran los valores medios del consumo de O₂ de los organismos alimentados y en inanición, así como la excreción de amonio respectivamente.

La influencia de la temperatura en la respuesta de los organismos se evidencia y se corrobora con los análisis estadísticos utilizados, sucintos en la tabla 3, en donde se observa que existen diferencias entre los factores (respuestas fisiológicas y los grupos (temperaturas). En la tabla 4 se presentan los resultados de la comparación múltiple de medias de la que se evidencian aquellos factores y grupos en los que hay diferencias significativas.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.

Fase de Exposición Aguda (Concentración Letal Media 96 Hrs)

La concentración letal media a 96 horas ($CL_{50-96hrs}$) del sulfato de cobre a los 24 °C y 32 °C (0.4 mg/L y 0.16 mg/L respectivamente) indican una relación inversa de estos factores, que se refleja en una mortalidad mas rápida a concentraciones más bajas en temperaturas altas. Esta relación se corrobora al analizar el porcentaje de la mortalidad a diferentes intervalos de tiempo, durante el periodo de exposición.

El porcentaje de mortalidad en la fase aguda (LC_{50}) a 96 hrs, varía en función de la temperatura y el tiempo de exposición (figuras 1 y 2) ya que en la concentración de 8 mg/L, el porcentaje de mortalidad alcanzó el 100% a las 12 hrs. de exposición en 24 °C mientras que en 32°C, a las 2 horas se tuvo el 90% y la mortalidad de toda la población fue a las 8 hrs. En las primeras horas de exposición, a los 24 °C, en concentraciones de 4 y 8 mg/L, se observó una respuesta hasta las 12 horas, con el 62 y 100 % de mortalidad respectivamente, mientras que a los 32 °C, hubo resultados a las 2 horas con 40 y 90 % de mortalidad respectivamente y a las 8 horas se alcanzó el 100 % de mortalidad en ambas concentraciones. La concentración de 2 mg/L en la temperatura de 24 °C provocó una mortalidad del 47 % a las 24 hrs. la que se incremento hasta el 81 % a las 48 hrs alcanzando el 100 % de mortalidad a las 72 hrs, sin embargo, a la temperatura de 32 °C empezó a registrarse mortalidad de organismos en la concentración de 2 mg/L, a partir de las 8 hrs con un 7.4 %, el que se incremento a las 24 hrs. a 73.1 % alcanzando a las 72 y 96 hrs. el 95.1 y 98.8 (%) respectivamente. En la concentración de 1mg/L a los 24 °C, se obtuvo a las 48 hrs. el porcentaje más bajo de mortalidad, (3.7 %), que llegó a 37 % a las 72 hrs, y 62 % de mortalidad a las 96 horas de exposición. Por otro lado, en la temperatura de 32 °C, el

porcentaje de mortalidad fue del 40 % a las 12 hrs, el 87 %; a las 24hrs. y a las 48 horas se alcanzo el 95 %.

La respuesta que tuvieron los organismos como efecto de la temperatura, fue una actividad opercular mas acelerada a los 32 °C comparada con la que exhibieron a los 24 °C, y por consiguiente una entrada mayor de partículas presentes en el medio al interior del organismo. Considerando lo anterior, la entrada de sulfato de cobre al organismo fue mayor en concentraciones altas teniendo como resultado la mortalidad de los organismos en tiempos mas cortos y concentraciones más bajas a los 32 °C que a los 24°C. El comportamiento registrado, concuerda con Alcaraz y Espina, (1995), quienes trabajando con carpa herbívora expuesta a diferentes concentraciones de nitrito consideran a la temperatura como un factor que determina la toxicidad de compuestos químicos , ya que las temperaturas altas incrementan el flujo lamelar y el intercambio iónico a través de la branquia y como consecuencia un aumento de la concentración de tóxicos en la sangre.

Fase de Exposición Crónica (Concentración Subletal)

Las respuestas fisiológicas de los oscars tuvieron durante la exposición crónica a concentraciones subletales diferencias que dependieron por una parte de la temperatura y en algunos otros casos de los grupos control y experimental, por ejemplo, se aprecia en la tabla 2, que a 24 °C, la supervivencia en ambos grupos fue del 100% mientras que en 32 °C, en el grupo expuesto al sulfato de cobre, hubo una supervivencia del 30 % y en el control del 70%, infiriendo que existe un efecto por la interacción de la temperatura y el tóxico.

Por otra parte, la tasa de asimilación es independiente de la temperatura así como el consumo de oxígeno de los organismos en inanición en presencia o no del tóxico ya que no

se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) (tabla 3), Sin embargo entre todos los demás factores hay una interacción significativa.

En la tasa de ingestión (fig. 3) y la producción de heces (fig. 5) se encuentran diferencias principalmente con respecto a la temperatura ($p < 0.05$), ya que a los 32 °C, hay una mayor ingestión de alimento y por consiguiente una mayor producción de heces en el grupo control que en el experimental y ambos grupos a los 24 °C, Analizando la tabla 2, observamos a los 24 °C, que la ingesta, en el grupo experimental y el control fue igual, y que a pesar de que la eficiencia de asimilación (fig. 4) en el grupo control fue menor (72 %) con respecto al experimental (81 %), no existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellas ni con la temperatura de 32°C, los resultados de este factor, son contrarios a los que presentan los parámetros mencionados anteriormente, ya que el grupo en donde se presenta la menor eficiencia es en el grupo control a 32 °C y el valor mas alto se encuentra en los grupos control y experimental a 24 °C. Esta respuesta se debe principalmente a que en temperaturas más altas, el metabolismo de los organismos se incrementa, necesitando por consiguiente una mayor cantidad de energía potencialmente disponible en el alimento, sin embargo, la asimilación en presencia del sulfato de cobre es menor posiblemente por el gasto energético de los organismos en un estrés adicional a la temperatura, Los resultados anteriores y la acción dinámica específica sugieren que la energía que están asimilando los organismos en presencia de sulfato de cobre, no es utilizada para crecimiento, como en el caso de los organismos de los organismos no sometidos al tóxico, sino que fue utilizada para restaurar órganos o estructuras dañadas por el tóxico, como por ejemplo las branquias (Karan , et al,1998.) Por su parte la mayor tasa de crecimiento observada se explica a la densidad, que fue disminuyendo en el transcurso del experimento, ya que al final del mismo, hubo una supervivencia del 30%, explicada por la influencia de la temperatura en una mayor

toxicidad del cobre y por consecuencia, mayor alimento disponible para los organismos restantes.

El consumo de oxígeno, de los organismos alimentados (figura 6) y en inanición (fig. 7), y de la excreción nitrogenada (fig. 8) tienen el mismo comportamiento, en donde los valores son más altos significativamente ($p < 0.05$) en los controles que en los experimentales.

Las diferencias existentes entre los grupos y las temperaturas son notorias, sin embargo, en el primer caso, no hay diferencias significativas entre los grupos experimental y control a 32°C y el grupo experimental a 24 °C mientras que en los organismos control a 24 °C es evidente ($p < 0.05$). Aparentemente los resultados muestran que el consumo de oxígeno de los organismos no se ve influenciado por la temperatura ni la presencia de sulfato de cobre, coincidiendo con Felts, Heath (1984) quienes no encuentran evidencia de interferencia en el consumo de oxígeno desde los 9 y hasta 30 días de continua exposición de organismos a concentraciones de 0.21 mg/L de cobre. Esta información debe corroborarse manteniendo a los organismos por periodos más largos ya que un comportamiento característico de los oscars (observación personal) aún en condiciones óptimas, es que reducen su consumo de oxígeno bajo ciertas condiciones, que se hace evidente cuando el organismos se posa en el fondo de los acuarios y de acuerdo a Almeida-Val et al.(1998), *Astronotus ocellatus*, disminuye su metabolismo cuando hay condiciones de hipoxia por lo que esta condición no es factor estresante para este organismo, sin embargo, observamos durante el experimento que a los 32 °C había un mayor movimiento opercular que probablemente afectó directamente las branquias, ya que a través de ellas se lleva a cabo el intercambio iónico y por consecuencia, existe una mayor entrada de cobre al organismo.

Con base a lo expuesto anteriormente, consideramos que *Astronotus ocellatus* se desarrolla óptimamente alrededor de los 24 °C que fue la temperatura en la cuál las respuestas tanto a exposiciones agudas como crónicas de sulfato de cobre, no fueron tan fuertes como las observadas a los 32 °C, tomando en cuenta que Alcaraz, Espina, (1995) afirman que la temperatura equivalente al *preferendum* tienen un efecto protectorio contra la toxicidad. Así mismo, se recomienda conocer la respuesta de estos peces a temperaturas intermedias, posiblemente 28 °C y tener con ello información básica de la respuesta fisiológica de organismos en un espectro de temperaturas más amplio, ya que, aun cuando los peces se encuentren en temperaturas equivalentes al *preferendum*, la presencia de contaminantes deteriora sus funciones fisiológicas, lo cuál debe ser considerado en las prácticas de cultivo, para una aplicación eficaz de tratamientos tanto preventivos como profilácticos y por otra parte usar las concentraciones adecuadas de los biocidas sin un daño para los organismos ni el ecosistema.

CONCLUSIONES

- La concentración letal media ($LC_{50-96hrs.}$) de Sulfato de cobre en juveniles de *Astronotus ocellatus*. fue de 0.40 mg/L para 24 °C y de 0.16 mg/L para 32 °C. Lo que indica la influencia de la temperatura en la toxicidad del Cu .
- Las respuestas fisiológicas de los organismos en exposiciones crónicas estuvieron significativamente influenciadas por la temperatura y las concentraciones de sulfato de cobre.
- El consumo de oxígeno estuvo influenciado por la temperatura.
- No existieron diferencias significativas entre los grupos y las temperaturas con respecto a la tasa de asimilación y eficiencia de asimilación.

IZT.

- La temperatura no influyo en la excreción nitrogenada y en producción de heces.
- El crecimiento vario con respecto a los grupos y las temperaturas.



REFERENCIAS

- ❖ Alan G. Heath, 1995. Water Pollution and Fish Physiology. Edit. Lewis Publishers, Segunda Edición.

- ❖ Alcaraz G. 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.

- ❖ Alcaraz 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.

- ❖ Alcaraz. G. Espina S. Rosas C. 1993, Effect of detergent on the Response to Temperature and Growth of Grass, *Ctenopharyngodon idella*. 50. 659-664

- ❖ Almeida-Val, A.L. Val, W.P. Duncan, F. C. A. Souza, M. N. Paula-Silva, S Land 1998, hypoxia tolerance of Amazon fish respirometry and energy metabolism of the cichlid *Astronotus ocellatus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 120, 151-156.

- ❖ Almeida-Val, A.L. Val, W.P. Duncan, F. C. A. Souza, M. N. Paula-Silva, S Land 2000, Scaling effects on hypoxia tolerance in Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae): contribution of tissue enzyme level. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 125, 219-226.

- ❖ Boitel F., Truchot J.P. 1989, Effects of sublethal 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., Espina S., 1994. Scope for Growth as Function of temperature, Salinity and body Weight in *Tivela stultorum* (Mollusca, Lamellibranchia). *Journal of Applied Aquaculture*, Vol. 4(4), 91-100.

- ❖ Burton. D. T., 1972. Mortality curves of Bluegills (*Lepomis macrochirus Rafinesque*) Simultaneously Exposed to Temperature and Zinc Stress, *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 3, 435 441.

- ❖ Busacker, G.P., Adelman, I. R. E.M.Goolosh, 1990. Growth, pp. 363-387. *In*: C.B. Schreck and P.B. Moyle (Eds.) 1990. *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.

- ❖ Cech, Jr.J.J., 1990. Respirometry,. *In*: C.B. Schreck and P.B. Moyle *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland. (Eds.) 1990. pp. 363-387.

- ❖ Cedeno Maldonado, A., Swader, J. A. 1974. Studies on the mechanism of copper toxicity in *Chlorella*. *Weed. Sci.* 22, 443-449.
- ❖ Claussen. D., Thermal acclimation in the Cryfish, *orconectes rusticus* and *O. Virilis*, *Bio. Hem. Phisyol.*, 66, 377- 384.
- ❖ Conover, R.J., 1966. Assimilation of the organic matter by zooplankton. *Limnol. Oceanog.* 11: 346-354.
- ❖ Donald Mc., Milligan G , 1997. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress, p. 119-144.
- ❖ Duffus, J. H. 1980. *Environmental Toxicology. Resource and Environmental Science Series.*
- ❖ Espina S., Diaz F., Rodríguez C. Soto F., 1998. Preferred temperature of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*, (Valenciennes), and brema carp, *Megalobrama amblycephala* (Yih),(Pices, Cyprinidae) in horizontal and vertical gradients. *Aquaculture Research*, 29, 643- 648.
- ❖ Espina S., Salibián A., Rosas C., Sánchez A. Alcaraz G., 1995. Acute physiological responses of Grass Carp *Ctenopharyngodon idella* Fingerlings to sublethal concentration of cadmium. *Acta toxicol. Argentina*, 3 (1): 8-10.

- ❖ 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 avoided temperatures in the crawfish *Procambarus clarkii* (decapoda, cambaridae), J. Therm. Biol., 1: 35 39.
- ❖ Fish Stress and Health in Aquaculture. Cambridge University Press, segunda edición, ,USA. Cambrige. 278pp
- ❖ Gutierrez-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 M. S. Afaf A. E., 1994. Toxic interactions between copper sulphate and some organic agrochemicals, Toxicology letters. 70: 109-119.
- ❖ Hephher B, 1988, Nutrición de peces comerciales en estanques. Edit Limusa, México, primera edición,
- ❖ Herkovits J., Helguero A.. 1998, Copper toxicity and Copper-zinc interactions in amphibian embryos. The Science of the total Environment, 221: 1-10.

- ❖ Hwang P.P. Yang C. H., 1997. Modulation of calcium uptake in cadmium-petreated tilapia (*Oreochromis mossambicus*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* 16:403-410.

- ❖ I. Moreno-Garrido, L. M. Lubián, A. M. V. M. Soares, 1999, In Vitro Populations of Rotifer *Brachionus plicatilis* Müller (1999). Demonstrate Inhibition When Fed with Copper-Preaccumulating Microalgae, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44, 220-225

- ❖ James M. Wissing E., 1988. Effect of sublethal concentrations of copper on the critical thermal maxima (CTMax) of the fantail (*Etheostoma flabellare*) and Johnny (*E. nigrum*) darters. *Aquatic toxicology*, 12: 311-322.

- ❖ Jiann-Chu Chen, Chia- Hsin Lin, 2001. Toxicity of copper sulfate for survival, growth, molting and feeding of juveniles of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 192,55-65.

- ❖ Jobling, M., 1994. *Fish Bioenergetics*. Chapman and Hall, London.

- ❖ Joseph S. Nelson. 1994, *Fishes of the world*, tercera edición, Edit. Wiley and Sons, Estados Unidos, pp. 381- 383.

- ❖ Karan V, Vitorivic S, Tutundzic V, Poleksic V, 1998. Functional enzymes activity and histology of carp after copper exposure and recovery. 40: 49 - 55

- ❖ Kennish, M. J. 1996. Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution. CRC Press, Boca Raton, FL.
- ❖ Little. E., Behavioral Methods for Assessing Impacts of Contaminants on Early Life Stage Fishes. American Fisheries Society Symposium, 14: 67-76.
- ❖ Pelgrom S.M.G.J, Lamers L.P.M., Garritsen J.A.M., Pels B.M., Lock R.A.C., Balm P.H.M., Wendelaar Bonga S.E. 1994, Interactions between copper and cadmium during single and combined exposure in tilapia *Oreochromis mossambicus*: Influence of feeding conditions on whole body metal accumulation and the effect of the metals on tissue water and ion content. Aquatic Toxicology, 30: 117:135.
- ❖ Pelgrom. S. M. G. J., 1994. Interaction between copper and cadmium during single and combined exposure in juvenile tilapia, Aquatic Toxicology, 30, 117 135.
- ❖ Perkins E.J., Griffin B., Hobbs M., Gollon J., Wolford L., Schlenk D.(1997) Sexual differences in mortality and sublethal stress in channel catfish following a 10 weeks exposure to copper sulfate. Aquatic Toxicology, 37: 327-339
- ❖ Phillips. D. J. H.,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.

- ❖ Redshaw C.J.. 1995, Ecotoxicological risk assessment of chemicals used in aquaculture: a regulatory viewpoint, *Aquaculture Research*. 26, 629-637.

- ❖ Ridout. P. S.1986, Concentrations of V, Cr, Mn, Fe, Ni, Co, Cu, Zn, As, and Cd in mesopelagic crustaceans from the North East Atlantic Ocean, *Marine Biology*, 100, 465:471.

- ❖ Rosas C., Espina S., Diaz F.,Curts J, Rosas I. (Eds), 1988, Effect of sublethal, detergent concentration upon gill, permeability of *Ctenopharyngodon idella* (PICES; CYPRINIDAE). *Water, Air and Soil Pollution* 42:253-258.

- ❖ Sadiq, M. 1992. Copper in marine environments. In *Toxic Metal Chemistry in Marine Environments*, pp. 198-249. Dekker, New York.

- ❖ Schreck, C.B. Moyle P.B.(Eds), 1990. *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.684pp.

- ❖ 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.

- ❖ Stephan, C.E. 1977. Methods for calculating an LC50. In: American Society for testing and materials (ASTM), *Aquatic toxicology and hazard evaluation*, FL. Mayer and J. L. Hamelink, Editors. ASTM STP 534, Philadelphia, Pennsylvania. pp 65-84,

- ❖ Tucker, C.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 A.V., Villanueva S., 1997. Acute Toxicity and Synergism of Cadmium and Zinc in White Shrimp, *Penaeus setiferus*, Juvelines. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58: 87-92.
- ❖ 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, G.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. 278pp.
- ❖ Williams Anne, Wooten R. 1981, Some effects of therapeutic levels of formalin and copper sulphate on blood parameters in rainbow trout. *Aquaculture*. 24, 341-353.