

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar



**“DISEÑO DE BIOENSAYO DE LA AFECTACIÓN DEL COBRE  
SOBRE EL *Litopenaeus vannamei*”**

**PROYECTO INTEGRADOR**

Previa a la obtención del Título de:

**BIÓLOGO**

Presentado por:

Douglas Orlando Vera Aguilar

Guayaquil – Ecuador

2015

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a la VIDA, PACHAMAMA, PATRIA...

## **DEDICATORIA**

Dedicada a mi hijo SIMON.

## TRIBUNAL DE EVALUACION

---

Paola Calle Delgado, Ph.D  
**Proyecto de titulación**

---

Ana Tirape Bajaña, Ph.D  
**Presidente de Tribunal**

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

“La responsabilidad del contenido de este Proyecto Integrador me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

---

Douglas Orlando Vera Aguilar

## RESUMEN

El presente trabajo conlleva el diseño de un bioensayo de toxicidad aguda para evaluar la afectación del cobre en nauplios de *Litopenaeus vannamei*, utilizando sulfato cúprico penta hidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). El bioensayo de 96 horas de duración será utilizado para determinar la concentración letal media ( $\text{LC}_{50}$ ). Este bioensayo tendrá 96h de duración, constará de 5 concentraciones de cobre 50, 125, 250, 500, 1000 partes por billón (ppb), se utilizará agua de mar (34% salinidad). Se usaran 90 ejemplares por ensayo (3 réplicas de 30 larvas c/u) serán acondicionadas en envases de plástico con 500 ml de cada solución. Como control se usará agua de mar a 34%. Debe esperarse que exista una relación directa entre la mortalidad de los nauplios del *L. vannamei* y la concentración de cobre para los distintos periodos de exposición y con los resultados se calculará la concentración

letal media del cobre  $LC_{50}$  a 24h, 48h, 72h y 96h con el uso de un probit análisis.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	VI
ÍNDICE GENERAL .....	VIII
ABREVIATURAS .....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE TABLAS .....	XII
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1 .....	3
MARCO TEÓRICO .....	3
1.1 Litopenaeus vannamei.....	3
1.2 Micronutrientes .....	5



1.3	Cobre .....	6
1.4	Bioensayos como evaluación de la contaminación.....	8
1.5	Usos de los bioensayos.....	10
1.6	Tipos de bioensayos.....	11
1.6.1	Letales o Agudos .....	11
1.6.2	Sub-Letales o Crónicos .....	11
1.7	Ventajas .....	11
1.8	Desventajas .....	12
1.9	Metodologías para bioensayos.....	13
1.9.1	Método rutinario de bioensayos .....	13
1.9.2	Método probabilístico de Bliss (Probits) .....	14
1.9.3	Modificación de Litchfield y Wilcoxon .....	14
CAPÍTULO 2.....		16
BIOENSAYO .....		16
Generalidades.....		16
Range Finder .....		19
CAPÍTULO 3.....		22
RESULTADOS ESPERADOS .....		22
CONCLUSIONES PARA EL DISEÑO DE BIOENSAYO .....		24
REFERENCIAS .....		25

## **ABREVIATURAS**

APHA	American Public Health Association
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
LC50	concentración letal media
LT50	tiempo letal media
mg/l	microgramos/litros
ml	mililitros
pH	potencial de hidrogeno
PL	postlarvas
Ppb	partes por billón
ppm	partes por millón
µg/l	microgramos/litros
%	porciento

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 Camarón <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	5
FIGURA 2. Diseño experimental de concentraciones de CuSO <sub>4</sub> .....	20
FIGURA 3. Diseño experimental de bioensayo.....	21

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I. Número de ejemplares y porcentaje de mortalidad de los nauplio del camarón <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	17
--	----

## INTRODUCCIÓN

El sector camaronero se ha convertido en uno de los ejes dinámicos en la economía ecuatoriana, este ha necesitado el incremento de nuevas técnicas para controlar las mortalidades del camarón. Algunos de los factores que intervienen en la sobrevivencia del camarón es el tipo de clima de la región en la cual se hace el cultivo y la luminosidad (1),

El cobre ha sido utilizado en la acuicultura para el control de algas y parásitos en los peces durante mucho tiempo y con una gran efectividad, sin embargo existe una pequeña línea entre el tratamiento que requiere el organismo y una sobredosis que puede matar al mismo. en esta investigación mostramos los efectos tóxicos del cobre y sus posibles incidencias como metal pesado en la producción del camarón *Litopenaeus vannamei* (2).

La liberación de desechos en el ecosistema se produce como consecuencia de un gran desarrollo en los procesos de industrialización en el mundo actual, muchos de estos desechos se los considera muy tóxicos hacia

diferentes organismos que viven en el sistema acuático, como ejemplo los iones de metales pesados, estos se encuentran en baja abundancia y están biológicamente activos (3).

Este trabajo presenta un diseño de bioensayo de toxicidad aguda del cobre, como sulfato de cobre en solución, en el primer estadio larval (nauplio) del camarón *Litopenaeus vannamei*, con lo que se calculará LC50 a 24h, 48h, 72h y 96h. Entre los resultados deseados encontraremos los LC50 y límites de confianza de las constantes. (3) (12).

Así mismo, se analizará los efectos subletales que ocasiona el cobre en los nauplios de camarón (12).

El objetivo general de este proyecto será el diseño de un bioensayo de toxicidad aguda para la obtención de resultados para el cálculo de los LC50 y EC50 utilizando el método probit.

Objetivos Específicos:

- a) Determinar los efectos subletales del cobre en el camarón.
- b) Calcular LC50 del cobre a 24h, 48h, 72h, 96h.

# CAPÍTULO 1

## MARCO TEÓRICO

### 1.1 *Litopenaeus vannamei*

El *L. vannamei* se encuentra dentro de la siguiente clasificación taxonómica:

**Phylum:** [Arthropoda](#)

**Subphylum:** [Crustacea](#)

**Clase:** [Malacostraca](#)

**Orden:** [Decapoda](#)

**Suborden:** [Dendrobranchiata](#)

**Familia:** [Penaeidae](#)

**Género:** *Litopenaeus*

**Especie:** *Litopenaeus vannamei*

El camarón *Litopenaeus vannamei* lo encontramos en toda la costa del Océano Pacífico, desde México hasta Perú, donde el agua alcanza una temperatura mayor a los 20°C durante todo el año. Su hábitat por excelencia son los que reúnen las condiciones marinos tropicales.

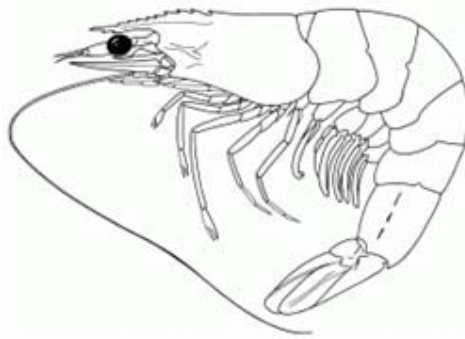
Los camarones adultos se reproducen y viven en mar abierto, y en su estadio de postlarva viaja hacia las costas a cumplir su etapa juvenil, mientras que viven en estuarios, manglares y lagunas costeras cuando se encuentran en su etapa de adolescente y pre adulta. Los *L. vannamei* maduran entre los 6 y 7 meses de edad, mientras el promedio de peso para los machos es de 20 gr y de las hembras desde los 28 gr (3).

Cuando el camarón alcanza entre 30 y 45 gr libera entre 100000 a 250000 huevos de aproximadamente 0.22 mm de diámetro. Después de 16 horas ocurre la incubación, una vez que ya se hayan fertilizados los huevos. En su primer estadio, la larva, llamada nauplio, es fototáctica positiva y se mueve intermitentemente. Los nauplios se nutren de su vitelo embrionario al igual que los nauplios los siguientes estadios (protozoa, mysis y postlarva) conservan su movilidad del plancton, cambian su alimentación a zooplancton y fitoplancton. Las postlarvas (PL) después de 5 días cambian su dieta



alimenticia, se retiran a las costas, llevados por las corrientes y comienzan a alimentarse de crustáceos, bivalvos.

***Penaeus (Litopenaeus\*) vannamei* Boone, 1931 [Penaeidae]**



Fuente FAO

**Figura 1 Camarón *Litopenaeus vannamei***

## **1.2 Micronutrientes**

Es indispensable algunos metales traza como el cobre, magnesio, hierro, cobalto y zinc, ya que estos funcionan como micronutrientes que actúan en numerosas enzimas como co-factores, pero en altas concentraciones el cobre, zinc y hierro presentan una toxicidad perjudicial (4)

Si los niveles de exposición y concentración de los metales, abarcando también los micronutrientes, son suficientemente elevados, estos virtualmente se vuelven tóxicos para cualquier organismo viviente (5).

En el agua de mar encontramos al cobre en su estado natural en concentraciones de alrededor de 2  $\mu\text{g}$  por litro o parte por billón, esto es relativamente baja, puesto que es de 7  $\mu\text{g}$  por litro, en el agua de los ríos (5). Algunos metales pesados como el cobre pueden ser bioacumulados por algunos organismos filtradores, mediante el proceso de concentración biológica y en los macroinvertebrados pueden alcanzar diferentes órdenes de magnitud (6).

La asimilación corresponde a la formación de complejos más las sustancias orgánicas, dificultando su excreción. En el hepatopáncreas y la sangre se concentra la mayor proporción de cobre en los crustáceos decápodos, este forma parte del colorante respiratorio o hemocianina (7).

### **1.3 Cobre**

El cobre, como sulfato de cobre, se considera un fuerte alguicida y plaguicida, por su estructura como metal pesado. Los factores ambientales y la calidad de agua determinan cuanto y por cuanto tiempo el cobre va a estar biológicamente disponible en el cuerpo de agua. También se lo usa ya que no cambia el color del agua, además se lo emplea para la inferencia de la

muda en ciertos decápodos como el camarón y langostino y para el control de una perjudicial vegetación acuática (3).

El cobre adquiere una gran importancia por sus diferentes usos en la industria como por ejemplo en los intercambiadores de sistemas de enfriamiento de las plantas atómicas que usan agua de mar, ya que se utiliza como antifouling la aleación cobre-níquel en los intercambiadores de calor (4). Ciertas propiedades biocidas se encuentran en las sales de abundantes metales pesados (6).

El cobre es un elemento acumulativo que se puede presentar en aguas que proceden de minas o en los residuales de diferentes industrias, escurrimientos de la agricultura o procesadoras de minerales,

El cobre diferirá considerablemente su toxicidad aguda dependiendo del nivel trófico del organismo y a su fase de su ciclo de vida (4). Algunas otras fuentes que proporcionan cobre son las industrias metalúrgicas, fábricas de pinturas, colorantes, pigmentos contra la corrosión (8).

Son necesarios ciertas cantidades de iones metálicos para que se desarrollen los procesos fisiológicos de los organismos, pero un exceso de estos iones provoca estrés y conlleva a un gran daño del organismo o también la muerte.

El “metabolismo de los metales” son estrategias adaptivas desarrolladas por los organismos, estas pueden incluir la regulación en los campos de absorción, distribución del metal, como este afecta su metabolismo y su posterior excreción (4).

La especificidad química del cobre y su actividad iónica demuestra estar más relacionada con su toxicidad, en lugar que a la concentración total o diferentes combinaciones de otros metales (9). Las sustancias quelantes, tanto sintéticas como naturales disminuyen la toxicidad del cobre si existe una presencia o adición de esta. (4).

Al realizar un estudio de toxicidad en una especie de importancia en nuestra pesca y esencialmente en la acuicultura permite que tenga mayor relevancia (10), ya que es necesario llevar un control de calidad de las aguas en los diferentes estadios del organismo, principalmente para la cría de larvas.

Los estadios de los organismos acuáticos (huevos y larvas) se presentan muy sensibles por el rápido crecimiento y división celular en el que se encuentran, estos pueden ser usados como bioindicadores de estrés (4,11).

#### **1.4 Bioensayos como evaluación de la contaminación**

Para preservar la vida acuática es recomendado obtener información general para lograr comprender las diferentes respuestas biológicas con respecto a ciertos contaminantes que provocan cierta toxicidad en algunos

organismos. Los toxicólogos a través de bioensayos son los primeros que miden estas respuestas estructurando diferentes metodologías (13); con diferentes procedimientos y datos, muchos de estos pasados por alto por otros analistas, son los que permiten analizar estadísticamente sus respuestas.

Todo bioensayo tiene como fin fijar los límites que nos posibilitan diferenciar sustancias que se descargan a los afluentes, porque el análisis químico y físico de estas aguas no nos proporcionan la real dimensión de una sustancia tóxica, ni para estimar un potencial toxic en la biota (14).

A través de los bioensayos y sus resultados, se analizan y se procura establecer diferentes criterios de calidad y usos del agua, ya sea por la ley o por normas sociales establecidas en los diferentes países o regiones.

Los bioensayos son pruebas en las cuales un tejido vivo, organismo o grupo de organismos vivos son usados como agentes para determinar la potencia de cualquier sustancia fisiológicamente activa o de actividad desconocida (14,15).

La toxicidad puede verse alterada por las inter-reacciones entre los desechos con sus componentes individuales y los diferentes productos minerales que se han disuelto en las fuentes receptoras. Cada especie muestra diferentes susceptibilidades a diferentes contaminantes y concentraciones. (14)

## **1.5 Usos de los bioensayos**

Un bioensayo de toxicidad aguda tiene como objetivo encontrar una respuesta medible, casi siempre letal, diagnosticando los efectos que las concentraciones de una sustancia a las que una población en condiciones vigiladas en un laboratorio ha sido sometida. Para el análisis experimental, lo mejor es usar el método de respuesta cuantitativa midiendo la supervivencia numérica y analizar el vínculo entre el efecto y la concentración (14).

El análisis estadístico de la curva concentración vs mortalidad se lleva a cabo mediante los datos cuantitativos, estos posibilitan el análisis para los periodos de tiempo y el error del mismo.

Los periodos de exposición deberán ser precisados antes de comenzar el bioensayo por lo general son de 24 a 96 horas; dependiendo del material analizado, ya que en ciertos casos no demuestran, por el lapso de análisis de tiempo un significativo cambio de la mortalidad en la especie (9,10).

Se recomienda que los lapsos de experimentación no se limiten al periodo de exposición de los organismos a la sustancia analizada, por el contrario se debe tratar de que se amplíen de 5 a 10 días más para incorporar en las observaciones los efectos colaterales y así mejorar la comprensión de cómo afectaría esto en la naturaleza; para el análisis de cuantos o cuanto fue su capacidad de recuperarse después de haber estado expuestos a los efectos

de la contaminación. Para un análisis más profundo y global puede incluirse experimentos fisiológicos. (10)

## **1.6 Tipos de bioensayos**

### **1.6.1 Letales o Agudos**

Las pruebas en este test se las realiza en un lapso de tiempo  $\leq 96$  horas. Es importante conocer la biología de las especies a evaluarse ya que no todas usan el mismo tiempo para completar el ciclo, como por ejemplo los protistas, invertebrados y bacterias. Los ensayos son clasificados por su duración y no por la especie utilizada (9).

A través de cálculos estadísticos, se presenta la toxicidad como: concentraciones medias LC50, siempre a un tiempo de  $\leq 96$  horas (10).

### **1.6.2 Sub-Letales o Crónicos**

Este ensayo tiene como fin demostrar la mortalidad del organismo y las posibles afectaciones acumuladas por el contaminante, ya que el tiempo de exposición puede ser mayor a 5 días. (9) Los test crónicos se centran en resultados sub-letales.

Las concentraciones de las sustancias a probar son estimadas dependiendo del estadio del organismo, con el efecto del 50% de mortalidad (CE50) hasta que se pueda producir el deceso y comprobar esa concentración específica (10).

## **1.7 Ventajas**

Los bioensayos nos demuestran una gran utilidad debido a su bajo costo, de manera controlada y relativamente simples de implementar, gracias a esto se puede ejercer un monitoreo completo y observar las causas y efectos de tipo ambiental a la que una población ha sido sometida (10).

Esto nos da como resultados valores cuantitativos y de porcentajes, mediante la cantidad de individuos se hace una relación con la dosis que se ha suministrado

Con pequeñas cantidades de agua o del medio, se puede emular las posibles afecciones en poblaciones más grandes.

### **1.8 Desventajas**

Se debe conocer la biología de cada una de los organismos ya que no existe una metodología universal, esto dificulta la observación de ciertas afecciones o alteraciones que algún contaminante este provocando del organismo.

El agotamiento de oxígeno disuelto (OD) puede ser consecuencia de la alta demanda química de oxígeno (COD), la demanda de oxígeno biológico (BOD) o desechos metabólicos (10). Posibles pérdidas del tóxico a través de la volatilización y/o absorción en los recipientes de prueba (9,10)

En un bioensayo se trabaja en óptimas calidades ambientales mientras los organismos en su vida silvestre tienen que enfrentar muchas condiciones medio ambientales muy cambiantes. Durante este proceso los organismos no se encuentran en su habitat por lo que pueden generar ciertas afecciones



por el stress u otro tóxico que no está siendo analizado. Si existe un 10% de muerte en el control se invalida la prueba (10).

## **1.9 Metodologías para bioensayos**

Para el análisis de la toxicidad del cobre utilizado sobre los organismos *L. vannamei*, se utilizarán tres métodos; comprendiendo procedimientos simples y complejos.

### **1.9.1 Método rutinario de bioensayos**

El APHA (17), es el método más simple para evaluar en un grupo de una misma especie la concentración de una sustancia contaminante. Con este procedimiento se calcula el LC50, que significa la concentración letal para el 50% de los individuos que serán sometidos a una experimentación o a su vez demuestra la mediana del límite de tolerancia en un periodo específico de tiempo.

Por lo general este periodo es de 24, 48 y 96 horas. Las concentraciones de las diluciones, se expresan como por ciento en volumen, para los residuales industriales y en partes por millón (ppm o mg/l) o en partes por billón (ppb o µg/l) para las sustancias toxicas individuales. (17)

En este experimento no deberá emplearse animales con síntomas de estrés, de presentarse alguno será reemplazado. Todas las observaciones de cada recipiente serán monitoreadas, principalmente la cantidad de organismos muertos después de 24, 48 y 96 horas, en las primeras 4 a 8 horas también

debió hacerse observaciones, para determinar la naturaleza de la sustancia usada.

Cualquier señal de anomalía debe ser tomada con el fin de que ayude al análisis de los resultados. Para evitar la contaminación y descomposición del agua se deberá retirar los animales que presenten signos de muerte. Las condiciones físico-químicas de cada uno de los recipientes de los bioensayos deberán ser verificadas y anotadas, cada 24 horas, después de que cualquier organismo muera en las concentraciones de los recipientes, y a la finalización del bioensayo.

### **1.9.2 Método probabilístico de Bliss (Probits)**

Este método (18), se fundamenta en la relación concentración- efecto, donde el logaritmo de la concentración del contaminante es proporcional a los efectos y corresponden a una distribución normal. Una curva sigmoidea se obtendrá si el porcentaje de organismo muertos tiene relación con el logaritmo de la concentración de la sustancia toxica que está siendo analizada.

Bliss ejecutó la transformación de la curva sigmoidea para convertirla en una línea recta modificando a la escala de las ordenadas a través de unidades probit. Este sistema de valoración define la ecuación de línea de regresión entre el logaritmo de las concentraciones usadas y los probits de mortalidad.

### **1.9.3 Modificación de Litchfield y Wilcoxon**

Con la metodología del método probabilístico de Bliss (19) podemos calcular la LC50 o LT50 mas la obtención de los errores estándar y sus límites de confianza sin embargo es muy laboriosa. Litchfield y Wilcoxon (20) a través de la sustitución de los cálculos por tres nomogramas acceden a la estimación de los límites de confianza de las curvas incompletas o completas más los parámetros de toxicidad.

## CAPÍTULO 2

### BIOENSAYO

#### Generalidades

Los nauplios del camarón *L. vannamei* se deberán obtener en laboratorio autorizado, para obtener especímenes que se encuentren libres de patógenos y concentraciones de metales mínimas. Se deberá preparar una solución de sulfato cúprico penta hidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) que se diluirá con agua destilada. Se medirá el pH, oxígeno, salinidad, temperatura. Los elementos que están en contacto con el contaminante deberán ser de cristal, silicona y PVC.

Durante el periodo experimental se medirá la concentración del cobre entre 3 a 4 veces y los valores fueron promediados y usados como resultados de las pruebas, todos los valores pueden ser anotados en una tabla de control. En

los tanques de experimentación se colocaran aleatoriamente los ejemplares, y se deberá tomar su peso al morir o al término del bioensayo.

**Tabla I. Número de ejemplares y porcentaje de mortalidad de los nauplio del camarón *Litopenaeus vannamei*.**

Tratamiento	# Organismos por tratamiento		Tiempo (horas)			
			24 h	48h	72h	96h
Control		# Org. muertos				
		%				
50ppb		# Org. muertos				
		%				
125ppb		# Org. muertos				
		%				
250ppb		# Org. muertos				
		%				
500ppb		# Org. muertos				
		%				
1000ppb		# Org. muertos				
		%				

Se deberá determinar la concentración letal a través de un range finder, esta a su vez diluida con concentraciones de cobre que equivaldrán a 1000, 500, 250, 125, 50 ppb en agua debidamente filtrada y acondicionada con una salinidad de 33-34% y una temperatura que oscile en los 22 °C.

Como “control” se empleará agua de mar (16). Se realizarán las pruebas de toxicidad aguda con unas 540 larvas en total, en su estadio de nauplios,

desde su primer día de la eclosión. Las larvas serán distribuidas a 90 individuos por cada uno de los 5 diferentes tratamientos, a más del control.

Cada uno de los tratamientos consistirá en tres grupos (réplicas) de 30 larvas cada uno. Cada una de las réplicas deberán ser acondicionadas en envases de plástico de prueba con 500 ml de agua de mar al 34%. Ya que en el estadio de nauplios por su carácter de lecitotrofos, las larvas se alimentan a expensas del vitelo intracelular, a razón de eso no se suministrará alimento (16). Los ensayos de toxicidad aguda deberán ser estáticos, sin aireación y a las 24 horas un total recambio de la solución.

A diario el contenido del recipiente se filtrará a través de un tamiz de 77 micrones. Para obtener registros diarios de mortalidad, crecimiento (mudas) y desarrollo de setas, deberán ser observadas las larvas vivas y muertas con un microscopio estereoscópico.

La toxicidad aguda será expresada en términos de mortalidad, porcentajes, y número total a su vez que los diferentes efectos del desarrollo como: muda, desarrollo de setas, estadio, etc., esto siguiendo las recomendaciones de la Water Pollution Control Federation (1980).

La toxicidad se indica como concentración letal media (LC50), es decir, la concentración letal que mata al 50% de los organismos que estarán bajo estudio, más los valores de los límites de confianza (95% y 99%). Los datos obtenidos se analizarán mediante software.

## Range Finder

Este nos ayudará a establecer el rango de concentraciones de la sustancia contaminante a utilizar en el bioensayo, el que incluirá la concentración que presente 0% de mortalidad y la concentración con 100% de mortalidad.

Para esto se dispondrá un control y 5 concentraciones test diferentes, con 5 organismos por recipiente durante 96 horas, Las concentraciones a utilizar difieren en un orden de magnitud son un orden de magnitud diferente la una de la otra en el range finder ej : 0.01. 0.1, 1, 100, 1000ppb

Se deberá realizar una solución Stock de 20 ppt, así la concentración será: 20000 mg/L. El cobre con un peso de 20,00g se deberá mezclar con un 1L de agua destilada. La disposición

Para decidir el volumen de la solución que se requiere en 0.5 litros de agua emplearemos la siguiente fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{C_1}$$

Dónde:

**V<sub>1</sub> & V<sub>2</sub>** = volúmenes iniciales y finales

**C<sub>1</sub> & C<sub>2</sub>** = concentraciones iniciales y finales.

Concentraciones en 500 ml

**1ppb=1ug/l**

**50 ppb**

$$V_1 = \frac{50\text{ug/L} \cdot 0.5\text{L}}{20000000 \text{ ug/L}} = 0.00000125 \text{ L} = 1.25 \text{ uL}$$

**125 ppb**

$$V_1 = \frac{125\text{ug/L} \cdot 0.5\text{L}}{20000000 \text{ ug/L}} = 0.000003125 \text{ L} = 3.12 \text{ uL}$$

**250 ppb**

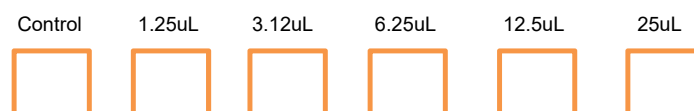
$$V_1 = \frac{250\text{ug/L} \cdot 0.5\text{L}}{20000000 \text{ ug/L}} = 0.00000625 \text{ L} = 6.25 \text{ uL}$$

**500 ppb**

$$V_1 = \frac{500\text{ug/L} \cdot 0.5\text{L}}{20000000 \text{ ug/L}} = 0.0000125 \text{ L} = 12.5 \text{ uL}$$

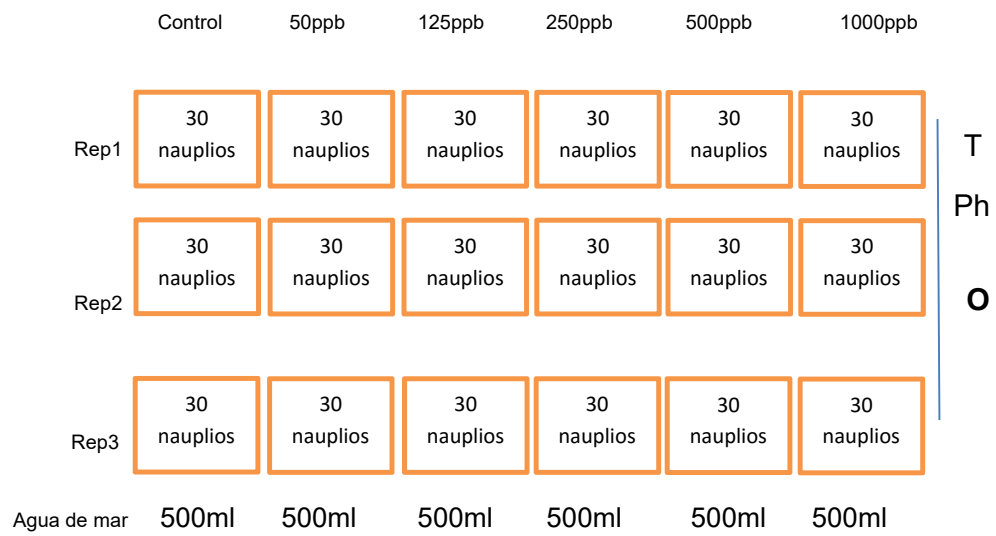
**1000 ppb**

$$V_1 = \frac{1000\text{ug/L} \cdot 0.5\text{L}}{20000000 \text{ ug/L}} = 0.000025 \text{ L} = 25 \text{ uL}$$



**Figura 2. Diseño experimental de concentraciones de CuSO4**





**Figura 3. Diseño experimental de bioensayo**

## **CAPÍTULO 3.**

### **RESULTADOS ESPERADOS**

Debe esperarse que exista una relación directa entre la mortalidad de los nauplios del *L. vannamei* y la concentración de cobre para los distintos periodos de exposición.

Se estima que a la máxima concentración de cobre correspondiente a 1000ppb, existirá el deceso del 100%, según estudios del departamento de ciencias marinas de Argentina se produce un semejante de deceso en otra especie de nauplio de camarón *Artemesia longinaris*, mientras que para la concentración de 500 ppb de cobre, el deceso del 100% de los organismos se dará a mayor tiempo. Así el deceso de los organismos se dará en un tiempo más prolongado a medida que las concentraciones de cobre disminuyan.

(21)

En el recipiente “control” se estima que exista la mortalidad de alguno de los ejemplares en un período aproximado de 96 horas por falta de aireación y alimentación, y el posible estrés al que esté sometido. Si existe la mortalidad del 10% en este control el experimento no es válido.

Se espera que la mayor concentración de LC50 sea en las 24 horas del experimento y que vaya decreciendo a medida que el tiempo aumente, debido a que las concentraciones de cobre se vuelven más tóxicas y el efecto aumenta con el aumento de la concentración y el tiempo de exposición, esto va acorde a la ley de Harber que dice:

$$\text{Efecto} = \text{Dosis} \times \text{Duración de la exposición}$$

Lo que quiere decir que el efecto se incrementa cuando la dosis/concentración o la duración de la exposición aumentan.

El cobre también debe influenciar en el cambio de estadio de las larvas, inhibiéndolo y provocando malformaciones, principalmente en las setas y en la furca caudal, cuyas espinas no se prolongan y se deforman.

## **CONCLUSIONES PARA EL DISEÑO DE BIOENSAYO**

Para el desarrollo de un bioensayo se debe tomar ciertas consideraciones:

- Se debe realizar un range finder acorde con el bioensayo.
- Optar por una medición de la dosis constante
- La distribución de los organismos en el experimento debe ser aleatorio
- La disposición de los recipientes debe ser al azar
- Se debe de ver o conocer la biología de la especie para tomar consideraciones adecuadas para el desarrollo del bioensayo.
- Se debe medir permanentemente y a la misma hora los parámetros de control del experimento.
- Se debe medir a la misma hora lo mortalidad y efectos nocivos en los organismos.

## Referencias

1. Sonnenholzner S, Rodríguez J, Betancourt I, Echeverría F, Calderón J. Supervivencia y respuesta inmune de camarones juveniles *L. Vannamei* desafiados por vía oral a WSSV a diferentes temperaturas. Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones marinas CENAIM. Enero 2002.
2. Villamar F. Bioensayo para calcular el cl50 del dispersante de petróleo BP 1100-WD con larvas de camarón *Penaeus vannamei*. Acta oceanográfica del Pacífico. Inocar, Ecuador, 6 (1), 1990.
3. Yanong, R. Use of Copper in Marine Aquaculture and Aquarium Systems. University of Florida. The Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS). United States. #FA165. 2013
4. National Aquaculture Sector Overview. Visión general del sector acuícola nacional - Ecuador. National Aquaculture Sector Overview

- Fact Sheets. Texto de Schwarz, L. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 1 February 2005.
5. Scelzo M. Toxicidad del cobre en larvas nauplii del camarón comercial *Artemesia longinaris* Bate (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Invest. Mar. Valparaíso, 25: 177-185, 1997
  6. Dorigan J, Harrison F. Physiological responses of marine organisms to environmental stresses. Department of Energy, USA. 1987. DOE/ER-0317: 501 pp.
  7. Laws, E. Aquatic Pollution. An Introductory Text. N.Y. 1981
  8. Waldichuk M. Some biological concern in heavy metals pollution. Pollution and Physiology of Marine Organisms. Academic Press, N.Y.; pp. 1-59 1974.
  9. U.S. Environmental Protection Agency. 1985. "Ambient Water Quality Criteria Doc: Cadmium p.59". EPA 440/5-84-032
  10. EPA U.S. Environmental Protection Agency. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to fresh water to organisms. EPA-600-4-91-002
  11. Orozco, J & Toro, A. (2007). "Determinación de la concentración letal media  $CL_{48}^{(50)}$  del cromo y el cobre por medio de bioensayos de toxicidad acuática sobre *Daphia*". (UNIVERSIDAD DE LA SALLE FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA BOGOTA DC.)

12. Bryan G. Concentrations of zinc and copper in the tissues of Decapod Crustaceans. *J. mar. biol. Ass., U.K.* 1968., 48: 303-321
13. Lewis R. *Sax's dangerous properties of industrial materials.* 8th de. Van Nostrand Reinhold. N. Y. 1992 : 4368 pp
14. Costlow J, Sanders B. Effects of cyclic temperature on larval development of marine invertebrates: II. Regulation of growth as a general indicator of stress. *Physiological Responses of Marine Organisms to Environmental Stresses*, 1987. pp. 105-109.
15. Roman K, Castillo H. Analisis de los canales de exportación del camarón al mercado de España para la compañía "Frigopesca C.A." UPS .2012.
16. Crecelius E, Bloom N. Marine chemistry of energy-related contaminants. *Physiological responses of marine organisms to environmental stresses.* 1987. pp. 121-125
17. Suarez G. Metodología de bioensayos y efectos toxicos de algunos contaminantes sobre organismos de interes ecologico pesquero. Cuba. 1996
18. SPRAGUE J. Lethal concentrations of copper and zinc for young atlantic salmon. *J. Fish. Res. Bd. Canada.* 1964. 21(1): 17-26
19. REISH D. *Manual of methods in aquatic environment research.* Part. 10. Short term bioassays. FAO. (1986).Fish. Tech. Paper. (247): 62 pp.

20. MOORE D, OSHIDA P. Manual of methods in aquatic environment research. Part. 10. Short term static bioassays. FAO. (1987) Fisheries Technical Paper. 247 : 64 pp.
21. Boschi E, Scelzo M. Desarrollo larval y cultivo del camarón comercial de Argentina *Artemesia longinaris* Bate (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). In: La Acuicultura en América Latina. FAO .1978. Inf. Pesca 159(1): 287-327
22. APHA. Standard methods for the examination of water and waste waters. 16 th Ed. Water Pollution Control Federation. N. Y. 1985. : 834 pp.
23. Bliss C. The calculation of the dosage, mortality curve. Ann. Appl. Biol. 1935. pp: 134-167
24. Bliss C. The determination of the dosage mortality curve from small numbers. Q. J. Pharmacol. 1938. 11.: pp: 192-216
25. Litchfield J y Wilcoxon F . A simplified method of evaluating dose effect experiments. J. Pharmac. 1949. Exp. 96: 99-11